

· 实验研究 ·

雷公藤红素对大鼠血管平滑肌细胞 c-myc 和血小板源性生长因子的 mRNA 的影响*

陈 星^{1△} 汪 洛² 丰美福² 朱国英¹

内容提要 目的:观察雷公藤红素对大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)中原癌基因(c-myc)和血小板源性生长因子(PDGF)的 mRNA 表达水平的影响。方法:分别将所培养的第 5~10 代 VSMC 同步化培养 24h 后,加入 20% 胎牛血清(FCS)和不同剂量的雷公藤红素(0.1、0.2 和 0.3mg/L),共同孵育 6h 和 12h 后,分别提取 VSMC 胞浆总 RNA,通过地高辛标记探针,采用斑点杂交方法检测 c-myc 和 PDGF 的 mRNA 表达。结果:经雷公藤红素作用后,VSMC 的 c-myc 和 PDGF 的 mRNA 表达较对照组明显降低,c-myc mRNA 表达水平的降低具有一定的药物剂量依赖性关系。结论:雷公藤红素可能是通过抑制 VSMC 的 c-myc 和 PDGF 的 mRNA 的表达,而引起抑制 VSMC 的过度增殖。

关键词 雷公藤红素 血管平滑肌细胞 原癌基因 血小板源性生长因子

Effect of Tripterine on mRNA Expression of c-myc and Platelet Derived Growth Factor of Vascular Smooth Muscle Cell in Rats Chen Xing, Wang Luo, Feng Meifu, et al *Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Beijing Medical University, Beijing (100034)*

Objective: To observe the effect of Tripterine on mRNA expression of c-myc and platelet derived growth factor (PDGF) in vascular smooth muscle cell (VSMC) of rats. **Methods:** 5~10th passage culture of VSMC was used. Tripterine and 20% fetal calf serum were added into the medium of cultured VSMC in concentration of 0.1, 0.2 and 0.3 mg/L after free-serum cultivation for 24 hours. The general RNA was isolated from VSMC at 6 and 12 hours after the drug addition for detection of mRNA expression of c-myc and PDGF respectively by dot blot hybridization. The cDNA probes were labeled by digoxin. **Results:** Tripterine inhibited the PDGF mRNA expression of VSMC and decreased c-myc mRNA expression in a dose-dependent manner, either vs. control. **Conclusion:** Tripterine could inhibit mRNA expression of c-myc and PDGF in VSMC, therefore, it would inhibit overproliferation of VSMC.

Key words Tripterine, vascular smooth muscle cell, proto-oncogene, platelet derived growth factor

经皮冠脉腔内血管成形术(PTCA)已经广泛运用冠心病的临床治疗,但其术后 3~6 个月仍有 30%~40% 发生再狭窄⁽¹⁾,研究表明,血管平滑肌细胞(VSMC)过度增殖在再狭窄中起重要作用,而原癌基因(c-myc)等基因活化与血小板源性生长因子(PDGF)等生长因子的明显增加是其中心环节之一^(1,2)。本实验研究了雷公藤红素对 VSMC 中 c-myc 和 PDGF mRNA

表达的影响,现报告如下。

材料与方法

1 动物 雄性 Wistar 大鼠 4 只,1~1.5 月龄,体重 100~150g,中国科学院动物研究所提供。

2 主要药物及试剂 雷公藤红素(上海医科大学药学院天然药物合成室提供),二甲基亚砜(DMSO,英国 Baker 产品),胎牛血清(FCS,美国 Gibco 产品),地高辛探针标记试剂盒(德国 Boehringer 产品)。

3 主要仪器 CO₂ 孵育箱(德国 Heraeus 产品),倒置光学显微镜(日本 Olympus 产品),低温离心机(德

* 卫生部科研基金资助课题(No. 94-1-248)

1. 北京医科大学第一医院(北京 100034);2. 中国科学院动物研究所生物膜与膜生物工程国家重点实验室

△ 现在天津胸科医院(300051)

国 Heraeus 产品), 紫外分光光度计(日本 Hitachi 产品), 影像扫描分析仪(美国 Fotodyne 产品)。

4 实验方法 (1)大鼠 VSMC 培养:参照赵三妹等^[3]方法培养大鼠 VSMC, 取第 5~10 代 VSMC, 无血清 RPMI 1640 培养液去血清同步化培养 24h 后用于本实验。(2)实验加药方法:先以少量 DMSO(其浓度小于 1/1000v/v)助溶雷公藤红素, 每培养瓶的 VSMC (1×10^6) 分别加入 0.1mg/L, 0.2mg/L 和 0.3mg/L 雷公藤红素加 20% FCS; 对照组仅加入 20% FCS, 经与 VSMC 共同孵育 6h 和 12h, 经胰酶消化并收获细胞, 分别用于 c-myc 和 PDGF mRNA 的检测实验。(3)斑点印迹杂交:①细胞总 RNA 提取:采用异硫氰酸胍一步法进行^[4];②探针标记:按照标记试剂盒说明进行, 分别标记 c-myc (1.2kb) 和 β -actin (2.0kb); PDGF-A (1.5kb) 和 PDGF-B (2.7kb);③杂交:根据紫外分光光度计测定的 OD 值标化样品的 RNA 浓度, 做变性处理后, 将其等倍稀释后点于尼龙膜上, 室温晾干后, 80℃ 烤膜 1h 后, 将膜封入杂交管内, 加杂交液 40℃ 保温 2h 后, 标记 cDNA, 沸水煮 5min 后, 骤冰浴变性加入杂交液, 40℃ 保温 12h; 弃杂交液, 洗膜和显色步骤按照常规方法进行;④脱色:常规方法脱色后, 尼龙膜可用于 β -actin 再杂交。(4)印迹杂交结果的扫描定量:采用影像扫描分析仪对杂交信号做扫描分析定量。

结 果

1 雷公藤红素对 VSMC 中 c-myc mRNA 的表达水平的影响 见图 1。结果表明, 雷公藤红素可抑制 VSMC 的 c-myc mRNA 的表达具有剂量依赖性关系; 雷公藤红素 0.1mg/L、0.2mg/L 及 0.3mg/L 浓度抑制率分别为 19.5%、26.9% 和 36.8%。

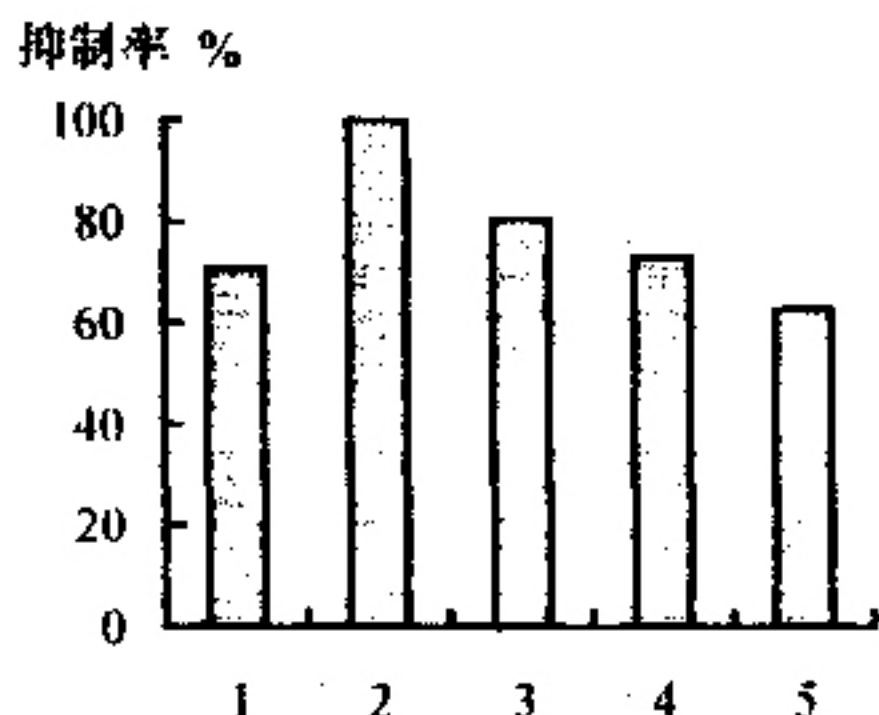


图 1 雷公藤红素对 c-myc mRNA 表达的影响

1. 对照, 2. 20% FCS, 3. 20% FCS 加 0.1mg/L 雷公藤红素, 4. 20% FCS 加 0.2mg/L 雷公藤红素, 5. 20% FCS 加 0.3mg/L 雷公藤红素

2 雷公藤红素对 VSMC 中 PDGF-A mRNA 的表达水平的影响, 见图 2。雷公藤红素能明显抑制 VSMC 中的 PDGF-A mRNA 的表达, 但未象 c-myc mRNA 受抑制所呈现的药物剂量依赖性关系, 3 个剂量药物对 PDGF-A mRNA 的表达抑制无明显差别, 抑制率分别为 27.6%、32.2% 和 38.2%。PDGF-B mRNA 杂交信号阴性, 结果未列出。

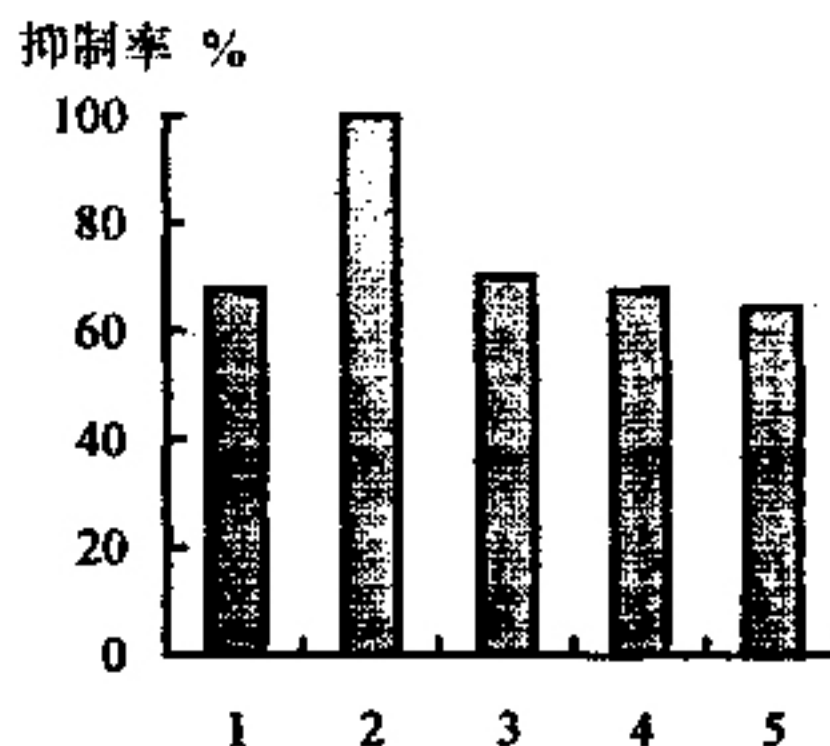


图 2 雷公藤红素对 PDGF-A mRNA 表达的影响

1. 对照, 2. 20% FCS, 3. 20% FCS 加 0.1mg/L 雷公藤红素, 4. 20% FCS 加 0.2mg/L 雷公藤红素, 5. 20% FCS 加 0.3mg/L 雷公藤红素

讨 论

VSMC 的增殖是各种血管成型术后再狭窄(RS)、动脉粥样硬化(AS)以及血管对高血压反应共同病理基础^[1,2]。c-myc 做为细胞核内调控基因, 参与调节 VSMC 细胞的正常生长分化, 受到刺激后可异常表达, 促进细胞的增殖^[2]。PDGF 是由 PDGF-A 和 PDGF-B 链通过二硫键相连的二聚体, 是一种细胞的致分裂原和趋化剂, 可通过旁分泌和自分泌途径促进动脉中膜的 VSMC 向内膜迁移并增殖^[5], 在 RS 和 AS 的发生中起重要作用。

有关资料表明^[6] PDGF 可刺激培养的 VSMC 的计数倍增, 而 Sjound 等^[7]的实验则提示, 大鼠 VSMC 可以表达 PDGF-A 的 mRNA 表达。c-myc 的表达和 VSMC 的增殖虽然密切相关, 但直接作用可能还是其通过调节别的生长因子而发挥作用的^[8], Taubman 等还证实 c-myc 等基因可促进 PDGF 及 JE 基因的表达, 而后两者正是在 RS 发生中起重要作用^[9]。本实验结果提示, 当 VSMC 无血清培养 24h 后加入 20% FCS 持续刺激不同的时间后, c-myc 和 PDGF-A 的 mRNA 表达分别较对照组明显增强, 这与前述研究报告结果相似。不同剂量的雷公藤红素可以呈药物剂量依赖性地抑制 VSMC 的 c-myc mRNA 表达, 而该药物仅低剂量

就可以明显抑制 PDGF-A mRNA 的表达,这可能与雷公藤红素首先抑制 c-myc 基因表达继而再影响到 PDGF-A 基因的表达有关,进而推论,雷公藤红素可能具有抑制 VSMC 过度增殖的作用。

雷公藤做为中药具有免疫抑制及影响细胞增殖的作用^[10],临床上多用于与免疫异常相关的疾病的治疗和某些肿瘤的辅助治疗,尚未有将其用于心血管疾病治疗的报告,本研究结果提示,若将中药用于防治以 VSMC 增殖为主的再狭窄和动脉硬化病变的研究,可能具有光明的前景。

参 考 文 献

1. Hamo M, Bauters C, Mcfadden EP, et al. Restenosis after coronary angioplasty. *Eur Heart J* 1995;16(Suppl 1):33—44.
2. Raulters C, Goote PDE, Adamantidis M, et al. Proto-oncogene expression in rabbit aorta after wall injury, First marker of cellular process leading to restenosis after angioplasty? *Eur Heart J* 1992;13:556—559.
3. 赵三妹,夏人仪,王宗立,等.动脉平滑肌细胞的培养方法及其应用. *中华病理学杂志* 1987;16:260—262.

4. Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156—159.
5. 李 静,陈可冀,丁大成.动脉粥样硬化斑块组织中 PDGF 基因表达的研究. *中华心血管病学杂志* 1995;23(6):453—455.
6. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis as update. *N Engl J Med* 1986;314:488—500.
7. Sjound M, Hedin U, Sejersen T, et al. Artery smooth muscle cells express PDGF-A chain mRNA. *J Cell Biol* 1988;106:403—413.
8. Naftilan AJ, Pratt PE, Dzau VJ, et al. Induction of platelet-derived growth factor α -chain and c-myc gene expression by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. *Clin Invest* 1989;83:1419—1412.
9. Taubman MR, Rolling RJ, Poon M, et al. JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in PDGF stimulated vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1992;80:314—318.
10. 王翠娣,郭玉璞.雷公藤有效成分、药理作用及临床应用. *中国中西医结合杂志* 1993;13(8):507—511.

(收稿:1997-06-13 修回:1997-12-01)

复方丹参液与脑活素合用治疗突发性耳聋的疗效观察

田茂春 吴 波

1995 年以来,我们用复方丹参液与脑活素合用治疗突发性耳聋(突聋)效果较好,并与同期应用血管扩张剂烟酸治疗的病例比较,现报道如下。

临床资料 治疗组 41 例,男 23 例,女 18 例;年龄 21~60 岁,平均 37.9 岁;病程 2~10 天;均为单耳发病。对照组 35 例,男 21 例,女 14 例;年龄 18~60 岁,平均 40.7 岁;病程为 1~11 天;均为单耳发病。突发性聋的诊断依据参照“突发性聋诊断依据和疗效分级”〔中华耳鼻咽喉科学杂志 1997;32(2):72〕。

治疗方法 治疗组:复方丹参液(为丹参、降香经提取制成,河南省焦作市化学制药厂生产,每毫升相当于原生药各 1g),每次用量 16ml,脑活素(由猪脑提取的肽浓缩液,每毫升含 215.2mg,奥地利依比威药厂生产),每次用药量为 10ml。两药分别加入 5% 葡萄糖液 250ml 静脉滴注(习惯先滴丹参,后滴脑活素)。每日 1 次,10 次为 1 个疗程。每疗程结束作纯音测听,并以此结果作疗效判定。如听力提高,继续上述治疗。凡连续 2 个疗程听力提高小于 15dB,改用高压氧治疗,共 6 例,

并均加用维生素 B₁、ATP 等药物,可持续 2 个月以上。

对照组:首次烟酸 100mg 加低分子右旋糖酐 500ml 静脉滴注。以后每日烟酸量递增 100mg,共 9 天,烟酸量达 900mg 为 1 个疗程,复查听力,并以此作疗效判定。以后的治疗方案同治疗组。对照组改用高压氧治疗 10 例,再用前述治疗组方案治疗 5 例。

结 果 (1)疗效标准:参照前述疗效分极标准。(2)治疗结果:治疗组 41 例中,痊愈 5 例,显效 6 例,有效 24 例,无效 6 例,总有效率 85.4%;对照组 35 例,痊愈 4 例,显效 3 例,有效 13 例,无效 15 例,总有效率 57.1%。两组总有效率比较, $P < 0.01$,有显著性差异。

讨 论 文献报道丹参具有活血化瘀等多种作用,可增加耳蜗血流和内耳血氧供应。对突聋的治疗应视为理想的药物。以往的观点把突聋的治疗局限在内耳末梢部位,忽视听中枢的作用,脑活素对突聋听力的改善,提高了我们对突聋的进一步认识。突聋的预后与治疗早晚有非常重要的关系。一般认为病程 1~2 个月后听力恢复可能性很小,但是为了尽量挽救患者的听力,不管采取何种治疗方法,仍需坚持治疗 2 个月以上方可停止治疗。

(收稿:1997-09-05 修回:1997-12-11)