

· 实验研究 ·

滋补肝肾、益气活血方药对血管平滑肌细胞增殖及相关基因表达的影响*

韩 梅 温进坤

内容提要 目的:采用血清药理学方法研究滋补肝肾、益气活血方药对内皮素(ET)诱导的自发性高血压大鼠(SHR)和 WKY 大鼠血管平滑肌细胞(VSMC)增殖及相关基因表达的影响。方法:采用³H-TdR 掺入实验检测 VSMC 增殖状态,应用 Northern 杂交、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测中药血清对 VSMC 诱导型一氧化氮合酶(iNOS)基因和 ET 诱导的 c-jun、增殖细胞核抗原(PCNA)基因表达活性的影响。结果:中药血清可明显抑制 ET 对 VSMC 的促丝裂作用($P < 0.05$);抑制原癌基因 c-jun 和 PCNA 基因表达,促进 iNOS 转录。结论:滋补肝肾、益气活血方药通过调节 iNOS 和细胞增殖相关基因的表达活性进而阻止 VSMC 增殖。

关键词 滋补肝肾 益气活血 血清药理学 血管平滑肌细胞增殖 基因表达

Effect of Replenishing Liver and Kidney, Supplementing Qi and Activating Blood Circulation Recipe on Proliferation and Relevant Gene Expression of Vascular Smooth Muscle Cells Han Mei, Wen Jinkun *Institute of Basic Medical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017)*

Objective: To study the effect of replenishing Liver and Kidney, supplementing Qi and activating blood circulation recipe (TCM) on the proliferation and relevant gene expression of vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods:** Using ³H-TdR incorporation to investigate the VSMC proliferation, using Northern blotting and reverse Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) to detect the effect of serum with TCM on induced NO synthase (iNOS), endothelin (ET) induced c-jun and proliferation cell nucleus antigen (PCNA) gene expression. **Results:** The ³H-TdR incorporation value of VSMC treated by serum with TCM was lower than that of control serum ($P < 0.05$). Rich iNOS mRNA was detected in the VSMC stimulated by serum with TCM. Expressions of c-jun and PCNA gene induced by ET in the VSMC were significantly inhibited by serum with TCM. **Conclusion:** The TCM could significantly inhibit VSMC proliferation.

Key words replenishing Liver and Kidney, supplementing Qi and activating the blood circulation, seropharmacology, vascular smooth muscle cell proliferation, gene expression

血管中层平滑肌细胞(VSMC)增生所致的高血压血管重构是高血压病的重要病理变化,同时也是高血压维持恶化的结构基础。寻找和研究既可降压又能有效抑制 VSMC 增殖的药物,是预防高血压合并心脑血管意外的重要策略。我们以体外培养的自发性高血压大鼠(SHR)和 WKY 大鼠 VSMC 为对象,采用中药血清药理学方法,探讨了滋补肝肾、益气活血方药对内皮素(ET)促 VSMC 增殖作用的影响及其与诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和细胞增殖及相关基因表达之间的关系。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 SHR、WKY 大鼠,6 周龄,雄性,体重 150~180g(北京阜外医院实验动物中心提供)。

1.2 试剂 M199(Gibco 公司产品),胰蛋白酶(Sigma 公司产品),³H-TdR(中国原子能研究院提供),随机引物试剂盒、禽源反转录酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP(Promega 公司产品),其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 药物 滋补肝肾、益气活血方药由益母草 12g 丹参 12g 夏枯草 10g 桑寄生 15g 徐长卿 10g 杜仲 15g 山慈菇 10g 何首乌 15g 黄芪 12g 当归 12g 组成,药物均由河北医科大学附属医院

* 国家自然科学基金资助项目(No.39470270)

河北医科大学基础所生化室(石家庄 050017)

药剂科提供。对药物进行鉴定后,用水煎煮并浓缩成每毫升含生药 4.4g 药液。大鼠按每天 13.2g/kg 剂量,于上午 9:00~10:00 时 1 次性灌胃给药,连续给药 10 天。

2 方法

2.1 中药血清制备 参考文献^[1]方法进行。大鼠于最后 1 次给药后 2~3h,股动脉放血,分离血清,所得的中药血清经 56℃、30min 灭活后,用含 5% 小牛血清(FCS)的 M199 培养液稀释成含 20% 中药大鼠血清的培养液备用。

2.2 大鼠 VSMC 培养 采用贴块法^[2]。将传至 3~5 代的 VSMC 分为中药血清组(实验组)和正常血清组(对照组)进行各指标测定。

2.3 ³H-TdR 掺入实验 将 VSMC 接种于 96 孔板,待其生长至 80% 汇合后,换用含 1% FCS 的 M199 培养液,饥饿培养 24h,使细胞同步于 G₀ 期。实验组加入含 20% 中药血清的培养液,以正常大鼠血清为对照。各组均加入相同浓度的内皮素-1(ET-1, 10⁻⁷mol/L),培养 18h 后,每孔加入 0.1μCi ³H-TdR/100μl 培养液,继续培养 6h。收集细胞,用液闪仪测定细胞³H-TdR 掺入量(cpm 值)。

2.4 Northern 印迹分析 SHR 和 WKY 大鼠 VSMC 生长至 90% 汇合时,分别加入含 20% 中药血清的培养液,以正常大鼠血清为对照,继续培养 24h,收集细胞,提取 RNA。各取 30μg RNA 进行电泳、转膜,固定后与 α-³²P-dCTP 标记的 iNOS cDNA 探针进行杂交。

大鼠 VSMC 生长至 80% 汇合时,加入 10⁻⁷mol/L ET-1 和 20% 中药血清的培养液,对照组加入相同浓度的 ET-1 和 20% 正常大鼠血清,刺激 30min 后,收集细胞,提取 RNA 进行 Northern 印迹,然后与同位素标

记的 c-jun cDNA 探针进行杂交。

2.5 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR) 以含 ET-1 的中药血清(或正常血清)培养的 SHR 和 WKY 大鼠 VSMC 24h 后提取的总 RNA 为模板,按照增殖细胞核抗原(PCNA) cDNA 设计引物 5'ACTCTGCGCTCCGAAGG3' 和 5'TCTCCAATTAGGCTAAG 3' 并进行 RT-PCR,扩增产物经 7% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,EB 染色,于紫外灯下观察各组织细胞 PCNA 的表达活性变化。

2.6 统计学处理 采用 *t* 检验。

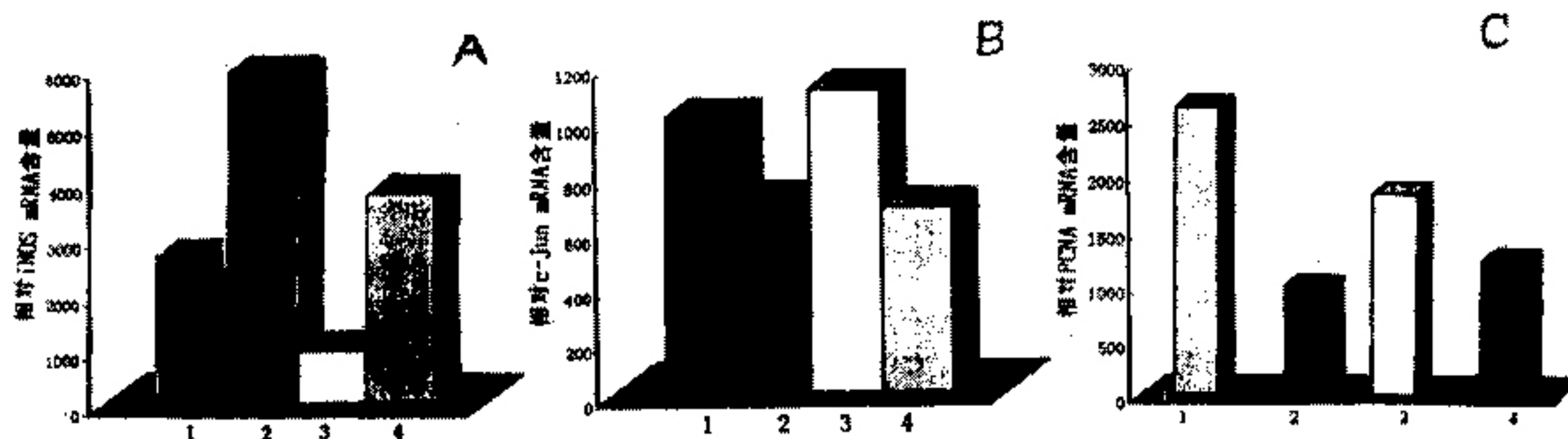
结 果

1 中药血清对 ET-1 促 VSMC 增殖的影响 见表 1。经 ET-1 刺激的 SHR 和 WKY 大鼠 VSMC ³H-TdR 掺入值均显著高于未受刺激的细胞($P < 0.01$); ET-1 加中药血清组的 cpm 值显著低于对照组($P < 0.01$),中药血清对 SHR 和 WKY 大鼠 VSMC 增殖的抑制率分别为 22% 和 19%,说明中药血清对 ET-1 诱导的两种大鼠 VSMC 增殖均有显著的抑制效应,与 WKY 大鼠相比,SHR 大鼠 VSMC 受抑制的效应更强。

表 1 中药血清对 ET 诱导的 VSMC 增殖的影响 (cpm, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	³ H-TdR 掺入值
10% FCS	SHR 5	6381.8 ± 166.4
	WKY 5	4895.6 ± 61.0
ET-1	SHR 5	11399.0 ± 743.2*
	WKY 5	8089.5 ± 876.2*
ET-1 加 20% 对照血清	SHR 5	8646.4 ± 670.6
	WKY 5	7329.7 ± 245.7
ET-1 加 20% 中药血清	SHR 5	6737.6 ± 509.3 [△]
	WKY 5	5873.5 ± 69.9 [△]

注:与 10% FCS 组比较,* $P < 0.01$;与 ET-1 加 20% 对照血清组比较,[△] $P < 0.01$



1 SHR(对照血清组); 2 SHR(中药血清组); 3 WKY(对照血清组); 4 WKY(中药血清组)

图 1 中药血清对 VSMC iNOS、c-jun 和 PCNA 基因表达的影响

2 中药血清对 SHR 和 WKY 大鼠 iNOS、c-jun 和 PCNA 基因表达的影响 Northern 杂交可见,在中药血清中培养的细胞,其 iNOS mRNA 杂交信号显著增高,大约是对照组的 2~3 倍,两种大鼠细胞相比,中药血清对 SHR VSMC iNOS 基因表达的诱导作用更为明显(图 1A)。中药血清可明显抑制两种 VSMC c-jun 基因的表达,与对照组比较有降低趋势(图 1B)。RT-PCR 证实,在中药血清处理的 VSMC 中,PCNA mRNA 表达减弱,其变化趋势与 c-jun 基因表达活性相一致(图 1C)。

讨 论

VSMC 增殖是高血压的主要病理变化,是在多因素(血压、遗传和血管活性物质等)共同作用下,VSMC 增殖相关基因异常表达的结果。因此,阻断促分裂信号的传递,控制细胞增殖相关基因的表达是研制新型抗高血压药物的基本策略。我们采用中药血清药理学研究方法,从细胞和分子水平,深入探讨了滋补肝肾、益气活血方药对 VSMC 增殖的影响及分子机制。实验结果证实,在相同浓度的 ET-1 刺激下,SHR VSMC 的增殖反应性明显高于 WKY 大鼠⁽³⁾,提示 ET-1 不仅具有强烈的收缩血管作用,同时也是 VSMC 的强效丝裂原⁽⁴⁾。中药血清可明显抑制 ET-1 的促增殖效应,与 WKY 大鼠比较,SHR 大鼠受抑制程度更高,表明中药血清中含有的某些成分可影响 ET-1 的促生长信号在 VSMC 中的传递。

进一步研究发现,中药血清的抗 VSMC 增殖作用是通过抑制 c-jun 和 PCNA 基因表达来实现的。SHR 和 WKY 大鼠的 VSMC 经中药血清处理后,其 ET-1 诱导的 c-jun 和 PCNA 基因表达明显减弱。c-jun 基因产物作为 DNA 结合蛋白,参与基因转录调控⁽⁵⁾。处于静止期的细胞不表达 c-jun,在生长因子刺激下,该基因可被激活,是生长信号传递的终端。PCNA 作为细

胞进入细胞周期的标志物,其量的变化与 DNA 合成一致,是细胞进行 DNA 复制和分裂增殖所必需的核蛋白,ET-1 通过其特异的受体,使细胞内游离钙离子增加,进而促进细胞增殖相关基因,如 c-jun、c-fos 和 c-myc 表达⁽⁶⁾。本研究揭示,中药血清可通过抑制 c-jun 和 PCNA 的表达来阻断 ET-1 的促生长作用;同时中药血清还可刺激 iNOS 基因表达,使 NO 生成增加。NO 是 VSMC 增殖的抑制因子。上述两方面作用的最终结果是减缓或逆转 VSMC 的增殖过程。综上所述,可以得出如下结论:本实验从细胞和分子水平阐明了该方药活血化瘀的分子机制,证实中药血清中的某些有效成分通过多位点作用,从转录水平影响 VSMC 增殖相关基因的表达活性,抑制 ET-1 诱导的 c-jun 和 PCNA 表达,进而抑制 VSMC 的增殖,达到化解 ET-1 致丝裂作用之“瘀”。此外,该方药还可明显促进 iNOS 基因表达,这对于机体补偿高血压时内源性 NO 缺陷具有重要意义,NO 生成增多,是该方药益气的结果。NO 又可介导药物行使“行气活血”之功效。

参 考 文 献

1. 王伟,陈可冀,史大卓,等.精制血府胶囊对缺氧缺血心肌细胞一氧化氮合酶基因表达的影响.中国中西医结合杂志 1996;16(1):670—672.
2. 鄂征.组织培养技术.第 2 版.北京:人民卫生出版社,1993:127—128.
3. Luscher TF. Endothelium derived contracting factors. Hypertension 1992;19(1):17—21.
4. Koshland DE. Endothelin: the molecule of the year. Science 1992;258(5090):1861.
5. 汤健,周爱儒.原癌基因与心血管疾病.北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1990:130.
6. Enzo L, Sassone P. Signal transduction and gene regulation. J Biol Chem 1994;269(26):17359—17362.

(收稿:1998-07-13 修回:1999-06-30)

河南省濮阳市南乐县不孕不育新技术培训班招生

为了满足全国各地不孕不育临床工作者的实际需要,决定常年举办不孕不育症临床实用新技术培训班。

1 培训内容 定点临床带教实践、理论与临床相结合:(1)男子不育症的诊断方法;(2)实验室——微型摄像系统在不育症中的应用;(3)男子不育症的最新治疗;(4)女子不孕症的诊断及步骤;(5)常规实验室及阴道 B 超在女性不孕症中的基础应用;(6)女性不孕症的综合治疗;(7)性功能障碍的诊断和治疗。

2 培训对象 该技术适用于广大农村基层卫生院、卫生所,城市中、小医院门诊,特别对于正在从事或准备从事不孕不育症及男科病治疗的专业人员,尤其欢迎某医疗单位配套成组的医疗专业人员集体培训。

3 培训时间 常年招生,每期招收 10~15 名,每月 1、10、20 日开班,为期 1~2 周,每期收费 1000 元,包教包会,食宿费自理。

4 联系地址 河南省南乐县文化路 12 号(华康大酒店北 30 米);邮编:457400;联系人:闫法群;电话及传真:(0393)6225478;手机:1377671898;有专车接送。