

芦荟大黄素对球囊动脉血管损伤后体外培养的平滑肌细胞 c-myc 基因表达的影响^{*}

尹春琳¹ 徐成斌² 王申五²

内容提要 目的 探讨芦荟大黄素抑制平滑肌细胞增殖的作用机制。方法 用 3F Fogarty 球囊拉栓导管对纯种日本大耳白兔腹主动脉进行球囊内皮剥脱损伤,48h 后取出腹主动脉中膜进行原代平滑肌细胞培养,细胞同步于 G₀/G₁ 期后,实验组加芦荟大黄素 20μg/ml,对照组加等体积的细胞培养液,3h 后分别用 Northern 杂交法、Western 杂交法和免疫细胞化学技术检测两组动物平滑肌细胞 c-myc 基因 mRNA 和蛋白表达产物的变化。结果 与对照组比较,实验组平滑肌细胞 c-myc mRNA 和蛋白水平的表达变化差异均无显著性。结论 芦荟大黄素对平滑肌细胞的增殖抑制作用可能不是通过影响 c-myc 基因的表达实现的,而是通过其他途径。

关键词 芦荟大黄素 平滑肌细胞 动脉血管损伤 c-myc 基因表达

Effect of Aloe-Emodin on c-myc Gene Expression of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells of Injured Artery
YIN Chun-lin, XU Cheng-bin, WANG Shen-wu *Department of Cardiology, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing (100053)*

Objective: To study the molecular mechanism of aloe-emodin (AE) in inhibiting smooth muscle cells' (SMC) proliferation. **Methods:** Deendothelialization was performed in abdominal aorta of Japanese white ear rabbits by using 3F Fogarty arterial embolectomy catheter. The media of abdominal aorta was isolated 48 hrs later for performing primary SMC culture. Cells were synchronized with G₀/G₁ phase by serum starvation, the AE was then added to the culture medium of experimental group, at a concentration of 20 μg/ml, and to the control group, equal volume of culture solution was added instead. The c-myc mRNA and protein expressions were examined 3 hrs later by using techniques of Northern blotting, Western blotting and immunocytochemistry respectively. **Results:** In comparing with the control group, neither the expression of c-myc mRNA nor the expression of c-myc protein was changed after addition of AE. **Conclusion:** The inhibition of AE on SMC might not be due to influencing c-myc expression, but via other pathway.

Key words aloe-emodin, smooth muscle cell, injured artery, c-myc gene expression

芦荟大黄素是中药大黄的活性成分蒽醌类衍生物之一,蒽醌类衍生物具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等药理作用⁽¹⁾。本实验采用平滑肌细胞原代培养技术,观察芦荟大黄素对动脉损伤后平滑肌细胞 c-myc 基因表达的影响,以探讨其抑制平滑肌细胞增殖的作用机制。

材料与方法

1 药物和试剂 芦荟大黄素系从大黄中经 3 次结晶提纯,由北京大学医学院沈家祥教授惠赠。以 0.5mol NaOH 在热水浴溶解,冷却后以 0.25mol HCl 调至 pH7.4 配成所需浓度。在沸水浴煮沸消毒,临用

时配制,并注意避光。异硫氰酸胍、牛血清白蛋白 (BSA)、琼脂糖、考马斯亮蓝 G250,均购自 Sigma 公司;胎牛血清 (FCS):天津川页生化制品有限公司;DMEM (Dulbecco Minimum Essential Medium) 培养液:GIBCOBRL 公司产品;胰蛋白酶:Serva 公司产品 [α -³²P]dCTP (比活度 111TBq/mmol, 3000mCi/mmol;放射性强度 2×1.85MBq, 2×0.050mCi;放射性比浓度 370MBq/ml, 10mCi/ml;放射化学纯度 95% 水溶液)北京市亚辉生物医学工程公司产品;随机引物标记试剂盒:Promega 公司产品。

2 探针及抗体 c-myc 裸探针 (cDNA, 1.4Kb):北京大学医学院病理教研室提供;c-myc 单克隆抗体 (小鼠源):Santa Cruz 生物技术公司;Bio-IgG 二抗和 SA-AP:中山生物技术公司;低分子量标准蛋白,上海

^{*} 卫生部基金资助课题 (No. 94-2-207)

1. 首都医科大学宣武医院 (北京 100053) 2. 北京大学人民医院

丽珠东风技术有限公司。

3 动物 雄性纯种日本大耳白兔,体重 1.5kg 左右,军事医学科学院动物所提供。

4 体外平滑肌细胞培养及鉴定 细胞培养前 48h,用 3F Fogarty 美国 Bastercare 公司提供的拉栓导管,先行兔髂动脉内皮剥脱术,用组织块种植法⁽²⁾进行兔髂动脉平滑肌细胞培养,培养 7~10 天后,可见平滑肌细胞从组织块缘爬出,14 天左右长满瓶。培养成功后用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。此时细胞经相差显微镜下形态学观察,并经抗 α -actin 单克隆抗体染色标记后呈阳性反应,证明是平滑肌细胞。

5 Northern 杂交 细胞样品的准备 细胞以 1×10^8 /L 接种于培养瓶,每瓶 4ml,用含 10% FCS 的 DMEM 培养 48h 后,换无血清的 DMEM 培养液,继续培养 24h,换为实验培养液:实验组用 10% FCS 加 DMEM 培养液加 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 芦荟大黄素,对照组用 10% FCS 加 DMEM 培养液,均继续培养 3h 后用异硫氰酸胍细胞裂解液裂解细胞,提取细胞总 RNA。RNA 纯度与浓度测定:用紫外可见分光光度计测定样本 RNA 的 OD260 与 OD280 值,计算 OD260/OD280 比值(检测 RNA 样本的纯度),要求 OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间。根据以下公式计算 RNA 样本浓度。加样前使各样品中总 RNA 含量一致。

$$\text{RNA}(\text{mg}/\text{ml}) = \frac{\text{OD260} \times 40 \times \text{稀释倍数}}{\text{RNA 溶液总体积}(\text{ml})}$$

RNA 样本质量鉴定:取少量 RNA,变性后作琼脂糖-甲醛凝胶电泳,溴化乙定染色,在长波紫外线灯下检测,RNA 应显示出边缘锐利的 18S 和 28S rRNA 带和弥散分布的 mRNA 拖影背景,分布范围在 0.2~5Kb 之间,28S/18S 约为 2:1。

Northern 杂交 样品 RNA 经琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳分离后,用毛细管转移法将 RNA 从琼脂糖凝胶转移到尼龙上。用随机引物法对 c-myc 的 cDNA 进行放射性同位素(α - ^{32}P)Dctp 标记,放射性标记的 c-myc 探针与固定于尼龙膜上的 RNA 进行杂交(在 50% 甲酰胺中于 42℃ 水浴预杂交 12h,杂交 36h)。将滤膜用保鲜膜封好,对 X 线片 -70℃ 曝光 72h。

结果分析:用 Leica Q550IW 图像分析仪(Qwin 图像分析处理软件,德国)对杂交斑进行辉度扫描分析,分别计算出对照组和药物组的积分光密度值,积分光密度值的大小可间接反应 RNA 量的多少,积分光密度值大,RNA 量多,反之,则少。

6 Western 杂交 样品制备 细胞以 1×10^8 /L 接种于培养瓶,每瓶 4ml,用含 10% FCS 的 DMEM 培

养 48h 后,换无血清的 DMEM 培养液,继续培养 24h,换为实验培养液:实验组用 10% FCS 加 DMEM 培养液加 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 芦荟大黄素,对照组用 10% FCS 加 DMEM 培养液,继续培养 3h 后,用单去污剂裂解液裂解细胞,提取细胞总蛋白,方法同前。

样品蛋白质定量 采用 Bradford 法⁽³⁾(考马斯亮蓝 G250 染色法),以 BSA 为标准蛋白建立标准曲线($y = 0.0083x + 0.0127$),同样方法测定样品,从标准曲线中查得蛋白质含量,上样前使各样品中蛋白质含量一致。

Western 杂交:不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳分离靶蛋白,蛋白质电转移至硝酸纤维素膜(NC 膜),丽春红 S 染色,将蛋白分子量标准带剪下,并标出参照蛋白的位置。含样品蛋白的滤膜分别与用含叠氮钠、含磷酸盐的封闭液封闭 2h,加入抗靶蛋白抗体溶液(一抗, c-myc1:100 分别加入含叠氮钠、含磷酸盐的封闭液中),与滤膜一同 4℃ 温育过夜,用 250ml PBS 漂洗滤膜 3 次,每次 10min,最后一次用 150mmol/L NaCl 和 50mmol/L Tris Cl(pH7.5)的缓冲液洗涤 10min。将滤膜转移到一个可加热封接的塑料袋中,按滤膜面积 $0.1 \text{ml}/\text{cm}^2$ 加入无磷酸盐、无叠氮钠的封闭液和 1:100 的生物素连接的抗一抗的 IgG 二抗(Bio-IgG),于室温平缓摇动 2h。用 200ml 150mmol/L NaCl 和 50mmol/L Tris Cl 溶液室温平缓摇动,重复洗 3 次。将 SA-AP 用 150mmol/L NaCl 和 50mmol/L Tris Cl 按 1:2200 稀释后与滤膜 37℃ 温育 1h。用 200ml 150mmol/L NaCl 和 50mmol/L Tris Cl 溶液室温平缓摇动,重复洗 3 次。取 $66 \mu\text{l}$ NBT 和 10ml 碱性磷酸酶缓冲液混合,加入 $33 \mu\text{l}$ BCIP 溶液,混匀后,立即加到内放滤膜的杂交袋中,避光反应,如蛋白带的颜色达到要求,即用 200 μl 0.5mol/L EDTA(pH8.0)和 50ml PBS 终止反应,并拍照。

7 细胞免疫化学法 细胞爬片 细胞以 1×10^5 /ml 的密度接种于置有小盖玻片的 6 孔板(2×10^6 细胞/孔),用含 10% FCS 的 DMEM 培养液培养 48h,细胞进入静止期后,换入实验培养液。实验培养液分别为大黄素 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 加 10% FCS 加 DMEM 培养液,对照 10% FCS 加 DMEM 培养液。每组设 2 个复孔。继续培养 24h 后,取出盖玻片, PBS 洗 3 遍, 95% 乙醇固定 15~20min 后染色。细胞计数:每张染色玻片计数 200 个细胞,结果以阳性细胞所占百分数表示。

结 果

1 芦荟大黄素对 c-myc mRNA 表达的影响 平滑肌细胞 c-myc mRNA 的杂交斑:计算机图像分析仪

光密度测定结果显示实验组与对照组杂交斑的平均积分光密度值分别为 7448 和 7466, 差异无显著性(图略)。

2 芦荟大黄素对 c-myc 蛋白表达的影响

2.1 Western 方法检测结果 两组均可见分子量为 67KD 的 c-myc 蛋白的表达。经光密度扫描分析, 实验组与对照组积分光密度值分别为 24.18 和 24.60, 差异无显著性(图略)。提示芦荟大黄素对 c-myc 蛋白表达无影响。

2.2 细胞免疫化学法检测结果 实验组与对照组平滑肌细胞核 c-myc 阳性表达(核黄染)检出率平均分别为 10.0% 和 12.5%, 差异无显著性(图略)。

讨 论

平滑肌细胞是动脉中膜的主要细胞成分。根据再狭窄机理的病理生理学研究, 动脉损伤以后各种刺激因子使中膜平滑肌细胞激活, 细胞由静息/收缩表型转化为增殖/合成表型, 开始分裂和增殖, 并向内膜迁移, 在内膜增殖并合成和分泌细胞外基质, 使内膜增生、血管重塑⁽⁴⁾。因此, 动脉损伤以后平滑肌细胞的增殖在再狭窄病变的形成中起重要的作用。

慢性再狭窄病变形成中的平滑肌细胞增殖的发生机理因再狭窄病变形成时间长, 病变复杂, 研究起来比较困难, 而各种动物在体实验模型的建立为这些机理的研究提供了基础, 其中内皮剥脱被广泛用于研究在体动脉平滑肌细胞的加速增殖⁽⁵⁾。正常动物动脉的平滑肌细胞可认为是被阻滞于细胞周期 G_0/G_1 期的静息细胞, 内皮剥脱后, 动脉平滑肌细胞离开静息状态, 开始在中膜的内膜侧增殖, 然后继续在内膜增殖⁽⁶⁾。

c-myc 是一个重要的细胞原癌基因, 编码分子量为 67KD, 寿命极短的序列特异性 DNA 结合核蛋白。研究发现 c-myc 在血管平滑肌细胞的正常增殖及疾病状态下(如粥样硬化和再狭窄病变)的非正常增殖中都起重要的作用⁽⁷⁾。c-myc 在无血清的静息状态平滑肌细胞中不表达, 只有在血清刺激后才开始表达, c-myc mRNA 水平在血清刺激后 30min 开始表达, 1~1.5h 达高峰⁽⁸⁾。但与其他即刻早期基因不同, c-myc 表达不仅限于 G_0/G_1 期, 而在整个细胞周期中连续表达⁽⁸⁾。所以, c-myc 可能在平滑肌细胞进入细胞周期和维持细胞增殖中起重要作用。有报道反义 c-myc 寡核苷酸可以抑制体外和在体血管平滑肌细胞的增殖⁽⁹⁾。我们实验室以往的研究发现芦荟大黄素可以抑制动脉粥样硬化及球囊扩张模型兔离体培养的平滑肌细胞的增殖⁽¹⁰⁾。本实验中, 血清刺激后 3h c-myc mRNA 表达升

高, 但实验组与对照组 mRNA 表达量无差别, 说明芦荟大黄素没有抑制 c-myc mRNA 水平的表达。免疫组织化学和 Western 杂交结果显示芦荟大黄素对 c-myc 核蛋白的表达也没有影响, 说明芦荟大黄素抑制平滑肌细胞的增殖并不是通过抑制 c-myc 基因的表达实现的。在芦荟大黄素存在下血清刺激后 c-myc 仍正常表达。

动脉损伤后, 多种生长因子和细胞因子被释放, 它们分别与中膜平滑肌细胞表面的酪氨酸蛋白激酶偶联受体或 G 蛋白偶联受体结合, 通过酪氨酸蛋白激酶和磷脂酰肌醇信号转导通路, 激活平滑肌细胞周期依赖基因(CCD 基因)。CCD 基因的顺序表达最终使平滑肌细胞由静息状态启动进入细胞周期运行, 开始分裂和增殖。根据 CCD 基因在细胞周期中的表达顺序和特征可分为三类, 即刻早期基因(c-fos, c-myc, KC, JE, A21, L51, ODC), 延迟早期基因(2F1, M11)和 G_1 末期基因(TK, PCNA)。即刻早期基因的表达不依赖于蛋白合成, 与第二信号的产生有关; 即刻晚期基因的表达稍滞后于即刻早期基因, 需要蛋白的合成; G_1 末期基因在 G_1 期结束, S 期开始时表达, 标志细胞进入增殖过程⁽⁸⁾。某些生长因子和细胞因子(如 PDGF、FGF、血管紧张素)可使细胞激活或可使细胞处于启动状态, 即可以赋予 G_0 细胞向 G_1 期推进的能力, 但不能导致 DNA 合成和细胞增殖(这些因子称为启动因子), 经与其他因子合作才能完成细胞周期的运行, 这些因子称为推进因子(如 EGF、IGF、促生长因子等), 它们可以推进经启动因子作用后的 G_1 细胞向 S 期移行。启动状态的特征是即刻早期基因的表达。从我们的实验结果分析, 芦荟大黄素对即刻早期基因 c-myc 的表达无影响, 芦荟大黄素对平滑肌细胞的抑制有可能不是通过抑制启动生长因子的促平滑肌细胞增殖作用, 而是通过抑制推进因子的作用实现的, 使平滑肌细胞虽然能在启动因子作用下进入启动状态但却不能向 S 期移行。

参 考 文 献

1. 西冈五夫. 大黄的生物活性及其有效成分. 国外医学中医中药分册 1986; 8(3): 27—30.
2. 夏人仪, 余铭鹏, 卢耀增, 等. 兔主动脉平滑肌细胞培养及形态观察. 中华心血管病杂志 1982; 10(2): 134.
3. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 1976; 72: 248—254.

(下转 537 页)