

丹参对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶和骨桥蛋白基因表达及细胞增殖的影响*

刘虹彬 温进坤 韩 梅

内容提要 **目的:**探讨丹参(SAL)对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导体外培养的血管平滑肌细胞(VSMC)基质金属蛋白酶(MMP)和骨桥蛋白(OPN)基因表达的影响,以提示 SAL 抑制 VSMC 增殖和迁移的作用机理。**方法:**应用 Northern、Western 印迹和斑点杂交检测 SAL 对 MMP-2、MMP-9 和 OPN 表达的影响;采用³H-TdR 掺入实验,检测 VSMC 增殖活性。**结果:**SAL 或复方丹参(SALC)注射液对 ox-LDL 诱导的 MMP-2 和 MMP-9 表达以及 OPN 的合成与分泌具有明显的下调作用,且可显著抑制 VSMC 的 DNA 合成;将 ox-LDL 与 SAL 或 SALC 注射液共孵育 1h 后再处理 VSMC,ox-LDL 对上述基因表达和 VSMC 增殖的诱导作用基本消失。**结论:**SAL 抗 VSMC 增殖与迁移的作用与其调整基质代谢有关。

关键词 基质金属蛋白酶 骨桥蛋白 血管平滑肌细胞 丹参 氧化低密度脂蛋白

Effects of *Salvia miltiorrhiza* on Matrix Metalloproteinases and Osteopontin Gene Expression and Proliferation of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells LIU Hong-bin, WEN Jin-kun, HAN Mei *Department of Biochemistry, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017)*

Objective: To study the effect of *Salvia* on gene expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9 and osteopontin (OPN) induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in cultured rat vascular smooth muscle cell (VSMC). **Methods:** Northern blot, dot blot and western blot were used to analyse the changes of MMP-2, MMP-9 and OPN expression, ³H-TdR incorporation was used to detect the DNA synthesis to estimate the proliferative activity of VSMC. **Results:** The ox-LDL induced MMP-2, MMP-9 expression as well as synthesis and secretion of OPN could down-regulated obviously by *Salvia* or composite *Salvia* injection (SALC), they could also inhibit the DNA synthesis of VSMC. When VSMC was treated by ox-LDL co-incubated with *Salvia* or SALC for 1 hr, the induction of MMP expressions and cell proliferation decreased significantly. **Conclusion:** *Salvia* plays an important role in regulating extracellular matrix metabolism, which might be the mechanism in depressing VSMC proliferation and migration.

Key words matrix metalloproteinase, osteopontin, vascular smooth muscle cell, *Salvia miltiorrhiza*, oxidized low density lipoprotein

现代药理学研究证明,丹参(*Salvia miltiorrhiza*, SAL)的抗动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)作用与其抑制血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)迁移和增殖密切相关^[1]。近年发现,VSMC 迁移和增殖活性受细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成与降解速率的影响^[2]。中药具有多位点、多层次发挥作用的特点,SAL 抑制 VSMC 迁移与增殖的作用是否与调节 ECM 的代谢有关尚少有报道。本研究用 AS 的高度危险因素氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)作为刺激 VSMC 迁移和增殖的因素,观察

SAL 抑制 VSMC 增殖的同时,对降解 ECM 主要结构成分的基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase, MMP-2)、MMP-9 和细胞迁移相关蛋白骨桥蛋白(osteopontin, OPN)基因表达的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,6 周龄,雌雄不拘,体重 100~120g,河北省实验动物中心提供。

1.2 试剂 M199 培养基为 GIBCO 公司产品, MMP-2、MMP-9 和 OPN cDNA 为本室保存, [α -³²P] dCTP 系北京亚辉生物医学公司产品,核酸随机引物标记试剂盒为 Promega 公司产品,抗 OPN 抗体为本室

* 国家自然科学基金(No. 39770312)及河北省自然科学基金(No. 301358)资助

河北医科大学基础医学研究所生化研究室(石家庄 050017)

自制,羊抗兔免疫球蛋白购自北京中山生物技术公司,³H-TdR 购自中国科学院原子能研究所,其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.3 药物 SAL 注射液(2ml/支,批号 960514,每毫升含丹参 1.5g)由江苏常熟制药厂生产。复方丹参注射液(*salvia miltiorrhiza composita*, SALC),2ml/支,批号:000624,每毫升含丹参 1g,降香 1g,为上海中西药业股份有限公司产品。

2 方法

2.1 ox-LDL 的制备 按文献报道的一次性密度梯度超速离心法⁽³⁾分离人血清低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)。所分离的 LDL 经透析后浓缩至蛋白含量为 1g/L,以 10μmol/L CuSO₄ 于 37℃ 氧化 24h,获得 ox-LDL;1% 琼脂糖凝胶电泳及苏丹黑染色进行鉴定,微孔滤膜过滤除菌,4℃ 保存备用。

2.2 VSMC 的培养与分组 取 6 周龄 SD 大鼠胸腹主动脉,按贴块法分离、培养 VSMC,0.25% 胰酶消化传代,实验用 5~8 代细胞。

2.3 Northern blot 分析 用酸性异硫氰酸胍一步法,提取细胞总 RNA。取 30μg RNA 进行电泳分离并转移、固定至尼龙膜上,随后与标记的 MMP-9 或 OPN cDNA 探针进行杂交,按常规方法洗膜后,于 -70℃ 放射自显影 72h。

2.4 Dot blot 分析 将 RNA 用样品变性液进行梯度稀释后,分别点加 2.5、5、10μg RNA 于硝酸纤维素膜上,80℃ 固定 2h,与 α-³²P-dCTP 标记的 MMP-9cDNA 探针进行杂交。

2.5 Western blot 分析 取各组细胞培养液 20μl,经 8% SDS-PAGE 后,转移到硝酸纤维素膜上,4℃ 封闭过夜。与抗 OPN 抗体及偶联有辣根过氧化物酶的羊抗兔二抗室温反应 1~2h,采用 4-氯-1-萘酚显色方法进行显色。

2.6 酶图分析 按文献所报道的方法⁽⁵⁾用含明胶的 SDS-PAGE 检测 MMP-2 和 MMP-9 活性。分离胶浓度为 8%(含 0.2% 明胶),浓缩胶浓度为 5%。取各组细胞培养液 20μl,120V 恒压电泳 2~2.5h,凝胶经 2.5% Triton X-100 漂洗两次后,加入反应缓冲液(50mmol/L Tris-HCl, pH7.8, 50mmol/L NaCl, 10mmol/L CaCl₂, 1% Triton X-100),37℃ 孵育 9h,0.5% 考马斯亮蓝染色 1.5~2h,脱色液(10% 乙酸-40% 甲醇)脱色至蓝色背景下白色条带清晰可见。

用 Kodak 1D 图像分析系统对 Northern blot、Dot blot、Western blot 实验结果进行扫描分析。

2.7 ³H-TdR 掺入试验 将细胞传至 96 孔培养

板中,待细胞生长达 80% 融合时,无血清饥饿培养 24h,然后换成含 10% 小牛血清的培养液,同时按上述分组情况加入不同的影响因素,并继续培养 24h。回收细胞前 6h,向各孔培养液中加入 ³H-TdR 至终浓度为 0.1μCi/100μl。回收细胞,用液闪计数器测定 ³H-TdR 掺入值,计算每组(6 孔)细胞的平均值,所有实验重复 3 次,采用组间 *t* 检验进行统计学处理。

结 果

1 SAL 或 SALC 对 ox-LDL 诱导 VSMC MMP-2 和 MMP-9 基因表达的影响 Northern blot、Dot blot 以及明胶酶图分析结果显示,ox-LDL 可显著诱导 MMP-2 和 MMP-9 基因表达,SAL 注射液与 ox-LDL 同时作用于细胞时,这两种基因的表达活性受到明显抑制,分别比 ox-LDL 组降低了 70% 和 60%;两种注射液比较,SALC 的抑制作用稍强。若将 ox-LDL 与 SALC 或 SAL 注射液预先在 37℃ 中孵育后再加入细胞,则对这两种基因表达的抑制作用较两者同时加入时略有增强,见图 1、2。

2 SAL 或 SALC 对 ox-LDL 诱导 VSMC OPN 表达的影响 Northern blot 结果显示,ox-LDL 作用于 VSMC 24h 后,其 RNA 与 OPN 探针杂交出现明显的杂交信号;SAL 或 SALC 注射液与 ox-LDL 同时作用于 VSMC 时,其杂交信号被显著抑制(见图 3),提示 SAL 和 SALC 对 ox-LDL 诱导的 OPN 基因表达具有抑制作用。用 Western blot 对 VSMC 培养液中 OPN 含量进行检测的结果表明,ox-LDL 可显著促进 VSMC 合成与分泌 OPN,其 OPN 含量达对照细胞的 3.7 倍;加入 SAL 或 SALC 后,OPN 水平显著降低,且以预先与 ox-LDL 体外孵育后效果更为明显;同时 SALC 较 SAL 作用强。

3 SAL 或 SALC 对 ox-LDL 诱导 VSMC 增殖的影响 ³H-TdR 掺入结果(见图 4)显示,ox-LDL 可使 VSMC 的 ³H-TdR 掺入增加 1.3 倍(*P*<0.01),SAL 或 SALC 作用于细胞 24h 后,被 ox-LDL 诱导的 VSMC

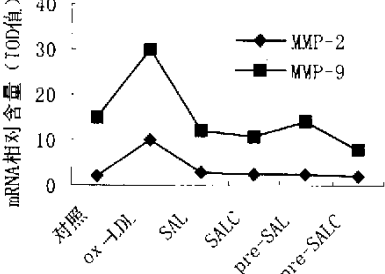
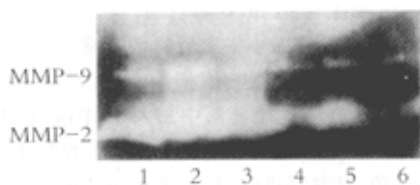


图 1 SAL 或 SALC 对 VSMC MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达的影响



注:1. 对照组;2. ox-LDL;3. SAL;4. SALC;5. pre-SAL;6. pre-SALC

图 2 MMP-2 和 MMP-9 的酶图分析

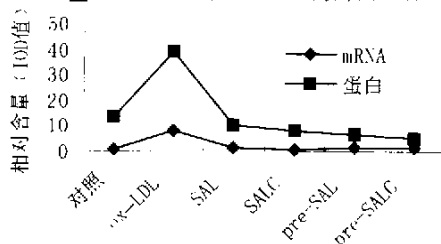
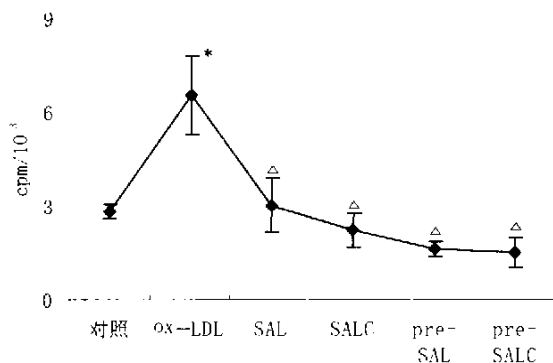


图 3 SAL 或 SALC 对 VSMC OPN 表达的影响



注:与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, ^ $P < 0.01$

图 4 SAL 或 SALC 对 VSMC $^3\text{H-TdR}$ 掺入的影响

$^3\text{H-TdR}$ 掺入受到明显抑制, 分别比 ox-LDL 组降低了 50% 和 60% 左右, 两者与 ox-LDL 预先孵育后再加入细胞, 抑制 VSMC 增殖的效果进一步增强, 经统计学处理差异均有显著性 ($P < 0.01$)。

讨 论

VSMC 从血管中膜向内膜下迁移和增殖是血管重构的病理学基础, MMP-2 和 MMP-9 是参与血管重构的重要酶类。已经证明, 在血管重构过程中不仅有 ECM 的降解, 而且还有粘附蛋白和趋化因子的大量合成, OPN 就是其中的主要成分之一⁽²⁾。我们以往的工

作表明, ox-LDL 促进 VSMC 增殖和迁移的机制之一是刺激 MMP-2、MMP-9 和 OPN 的表达^(6,7)。因此, 有理由认为, 调整 ECM 代谢也可起到抑制 VSMC 增殖、迁移及减缓新生内膜过度增生的作用。本实验结果显示, SAL 或 SALC 注射液对 ox-LDL 诱导的 MMP-2 和 MMP-9 表达以及 OPN 的合成与分泌具有明显的下调作用。将 ox-LDL 与 SAL 或 SALC 注射液共孵育 1h 后再处理 VSMC 时, ox-LDL 对上述基因表达的诱导作用基本消失。说明 SAL 或 SALC 中的有效成分如丹参素、少量维生素 E 和微量元素硒等具有抗氧化作用, 它们通过减弱 ox-LDL 的氧化毒性, 使细胞免受氧化应激的损伤, 故可将 SAL 或 SALC 视为 ox-LDL 的清除剂。同时本研究还观察到, 在 SAL 及 SALC 抑制 ox-LDL 诱导 MMP-2、MMP-9 和 OPN 表达的同时, 还对 VSMC 增殖具有显著抑制作用。本研究提示了一种 SAL 抗 AS 的新的作用机制, 在此基础上, 进一步分离纯化 SAL 中具有抗氧化活性的有效成分, 是中药现代化的任务之一。

参 考 文 献

1. 周小明, 陆再英, 汪道文. 丹参防治实验性动脉再狭窄及机制的初步研究. 中国中西医结合杂志 1996;16(8):480—482.
2. 周秀霞, 温进坤, 韩 梅. 血管再狭窄发生过程中 MMP-2 基因表达与胶原转换的动态变化. 中国生物化学与分子生物学报 1999;15(6):997—1001.
3. 张林华, 刘秉文. 一次性密度梯度超速离心分离人血浆脂蛋白. 生物化学和生物物理学报 1989;21(3):257—259.
4. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162(1):156—159.
5. 孙红霞, 韩 梅, 温进坤. 用含底物 SDS-PAGE 检测明胶酶活性. 基础医学与临床 2000;20(5):94—96.
6. 刘虹彬, 温进坤, 韩 梅. 氧化型低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶-2 和 9 表达的影响. 中国动脉硬化杂志 2001;9(1):10—13.
7. 刘虹彬, 温进坤, 韩 梅. 氧化修饰低密度脂蛋白对大鼠血管平滑肌细胞骨桥蛋白和基质金属蛋白酶-2 基因表达及细胞增殖的影响. 中国老年学杂志 2001;3(21):22—24.

(收稿:2001-10-12 修回:2002-06-20)

《湖北中医学院学报》2003 年征订启事

《湖北中医学院学报》(季刊)是公开发行的综合性中医药学术期刊, 由湖北中医学院主办, 国内外公开发行。本刊以弘扬祖国医学为己任, 积极推进中医药现代化发展, 着力反应湖北中医学院科研、教学、临床诸方面的新成果、新思路、新方法、新经验。本刊提倡理论与实践结合, 基础与临床并重。设有学术理论探讨、实验研究、临床研究、中药研

究、高教园地、综述等栏目。

本刊为季刊, 大 16 开本, 每期 64 页, 每季末月 20 日出版。每册定价 5.00 元, 全年定价 20 元。统一刊号: CN42-1452/R, ISSN1008-987X。邮发代号: 38-337。读者可在当地邮局订阅, 编辑部可代办邮购。地址: 武汉市武昌区云架桥 110 号(昙华林特 1 号)湖北中医学院内, 邮编: 430061; 电话: (027)88910096。