黄芪、当归对血管平滑肌细胞粘着斑激酶表达和细胞凋亡的影响*

杨长春　温进坤　韩　梅

摘要　**目的**:探讨黄芪、当归对体外培养的血管平滑肌细胞(VSMC)粘着斑激酶(FAK)表达和细胞凋亡的影响。**方法**:应用 RT-PCR、Western blot 检测黄芪、当归对 FAK 表达的影响;应用 Greiss 试剂检测 VSMC 培养液中 NO_2^- 含量;应用流式细胞仪检测细胞凋亡及 bcl-2 和 caspase-3 表达活性。**结果**:黄芪、当归注射液可以显著抑制由碱性成纤维细胞生长因子所诱导的 FAK 表达,增加细胞培养液中的 NO_2^- 含量,诱导 caspase-3 表达,下调 bcl-2 表达,促进体外培养的 VSMC 凋亡。**结论**:黄芪、当归诱导 VSMC 凋亡与其促进 NO 合成、抑制 FAK 表达、诱导促凋亡基因 caspase-3 表达及下调抗凋亡基因 bcl-2 表达有关。

关键词　黄芪　当归　粘着斑激酶　血管平滑肌细胞　细胞凋亡

Effect of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* on Focal Adhesion Kinase Expression and Apoptosis of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells YANG Chang-chun, WEN Jin-kun, HAN Mei *Institute of Basic Medical Sciences, Hebei Medical University, Shijiazhuang (050017)*

Objective: To explore the effect of *Astragalus membranaceus* (Ast) and *Angelica sinensis* (Ang) on focal adhesion kinase (FAK) expression and apoptosis of cultured vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods**: RT-PCR and Western blot were used to analyze the changes of FAK expression, Greiss reagent was used to measure concentration of nitric oxide (NO) in culture medium, bcl-2 and caspase-3 protein expressions and VSMC apoptosis were detected by flow cytometry. **Results**: Ast and Ang could significantly inhibit FAK expression induced by basic fibroblast growth factor (bFGF), increase the NO_2^- content in the medium, up-regulate caspase-3 expression and down-regulate bcl-2 expression as well as induce VSMC apoptosis. **Conclusion**: Ast and Ang could induce VSMC apoptosis by increasing NO content, inhibiting FAK expression, down-regulating apoptotic gene bcl-2 expression and up-regulating apoptogenous gene caspase-3.

Key words　*Astragalus membranaceus*, *Angelica sinensis*, focal adhesion kinase, vascular smooth muscular cells, cell apoptosis

近年有研究表明,粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)作为一种非受体酪氨酸蛋白激酶,介导细胞外信号由整合素、酪氨酸蛋白激酶受体、G 蛋白偶联受体向细胞内传导,是细胞内多条信号转导通路的交汇点[1],参与细胞多种生物学功能的调节。我室以往研究表明,FAK 参与血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)粘附、迁移、增殖和凋亡的调节[2,3]。黄芪、当归是益气、活血的常用中药,虽然有关其对心血管系统的作用已有许多研究,但其是否可以影响 VSMC FAK 表达及诱导 VSMC 凋亡目前尚未见报道。本研究对黄芪、当归在此方面的作用进行了观察。

材料与方法

1　材料

1.1　**动物**　健康 SD 大鼠,6 周龄,雌雄各半,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,逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒为 Promega 公司产品,FAK、caspase-3 和 bcl-2 多克隆抗体、ECL 试剂盒、免疫组化试剂盒均购自北京中山生物技术公司,其它试剂为进口或国产分析纯。

1.3　**药物**　黄芪注射液(生药含量 2g/ml,规格:2ml/支,批号 990822-1,由山西晋新制药总厂生产),当归注射液(生药含量 0.05g/ml,规格:2ml/支,批号

* 本课题受国家自然科学基金(No.3997074)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)
通讯作者:温进坤;Tel:0311-6265563;E-mail:wjk@hebmu.edu.cn

万方数据

990513-10,由山西永济市制药厂生产)。

2 方法

2.1 VSMC 的分离培养与分组 取 6 周龄 SD 大鼠胸腹主动脉,按贴块法[4]分离、培养 VSMC,0.25%胰酶消化传代,实验选用 4 ~ 8 代细胞。待细胞生长至 80%融合时,无血清饥饿培养 24h,之后换成含 10%胎牛血清(FCS)的培养液,同时将细胞分为下述 5 组:碱性成纤维细胞生长因子组(简称 bFGF 组,加 bFGF 8U/ml),当归组(bFGF 8U/ml 加当归注射液 3mg/ml),黄芪组(bFGF 8U/ml 加黄芪注射液 6mg/ml),黄芪加当归组(简称联合组,bFGF 8U/ml 加黄芪注射液 6mg/ml 加当归注射液 3mg/ml),对照组。除对照组外,其余 4 组分别在换成含 10% FCS 的培养液的同时加入上述影响因素,继续培养 24h 后,从各组细胞提取总 RNA 和制备蛋白提取液。

2.2 RT-PCR 采用异硫氰酸胍一步法[5],从各组细胞提取总 RNA。取 RNA 2μg,按试剂盒说明书进行 RT-PCR。

FAK 引物序列:上游引物为 5′-ACTTGGACGCTG-TATTGGAG-3′,下游引物为 5′-CGGTAGCCT-GTCTTCTGGAG-3′,扩增产物长度为 833bp。

β-actin 引物序列:上游引物为 5′-AGCTGA-GAGGGAAATCGTGCG-3′,下游引物为 5′-GTGCCACCA-GACAGCACTGTG-3′,扩增产物长度为 300bp。

2.3 Western blot 分析 收集各组 VSMC,用细胞裂解液(50mmol/L Tris-HCl,pH7.5,150mmol/L NaCl,1mmol/L EDTA,0.5%脱氧胆酸钠)裂解细胞,离心后取上清,用 Lowry 法进行蛋白定量。各取 150μg 经 8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉和 1%牛血清白蛋白封闭过夜,随之依次与 FAK 抗体及羊抗兔 IgG-HRP 室温反应 2h,用 ECL 试剂盒对反应产物进行检测。用 Kodal 1D 图像分析系统对 RT-PCR、Western blot 结果进行灰度扫描及定量分析。

2.4 免疫细胞化学检测 将 1cm × 1cm 的盖玻片放入 12 孔板中,接种传代培养的 VSMC,细胞密度达 80%左右后,按试剂盒说明书检测 VSMC 中的 FAK。

2.5 亚硝酸盐(NO_2^-)测定 收集各组 VSMC 培养液,取 80μl 加入 96 孔酶标板上,加等量的 Greiss 试剂〔1%对氨基苯磺酰胺,0.1%N-(1-萘基)-乙二胺,5%磷酸〕,室温放置 15min,用微量震荡器充分摇匀后,在酶标仪上读取 550nm 光密度值,以 NO_2^- 为标准品制备标准曲线,NO_2^- 浓度用 μmol/L 表示。

2.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率及 caspase-3、bcl-2 表达 收集各组 VSMC,用 0.4% EDTA 分散为单个细胞后,70%乙醇固定,碘化丙啶(PI)综合染色液(60μg/ml)染色 30min,300 目细胞筛过滤,上机检测细胞凋亡率;用 FITC-actin-bcl-2 和 FITC-actin-caspase-3 处理细胞 30min,将细胞过筛后用流式细胞仪检测细胞荧光强度。

3 统计学方法 应用 SPSS 统计学软件对差异的显著性进行方差分析,再用 Dunnet 检验进行各组与对照组的比较。

结 果

1 黄芪、当归对 FAK 基因表达的影响 见图 1。对照组 VSMC 中可检测到 FAK mRNA 的存在,bFGF 组 FAK 基因表达活性比对照组细胞增加 1.29 倍;黄芪组和当归组 FAK 表达受到明显抑制。黄芪组、当归组和联合组的 FAK 表达活性分别比 bFGF 组降低了 42%、31%和 68%,经统计学处理差异均有显著性($P < 0.01$)。

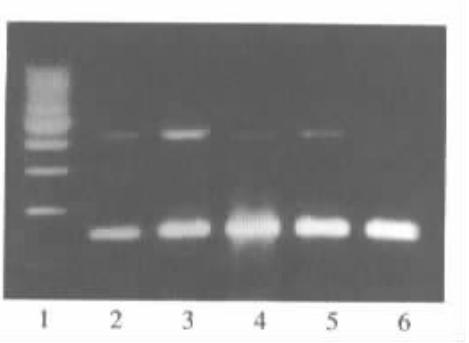

图 1 黄芪、当归对 VSMC FAK mRNA 表达的影响

注:1. 标准参照物;2. 对照组;3. bFGF 组;4. 黄芪组;5. 当归组;6. 联合组

2 黄芪、当归对 VSMC FAK 蛋白表达的影响 见图 2。Western blot 结果显示,对照组 VSMC 中可检测到 FAK 蛋白,bFGF 组 FAK 含量明显升高,达对照

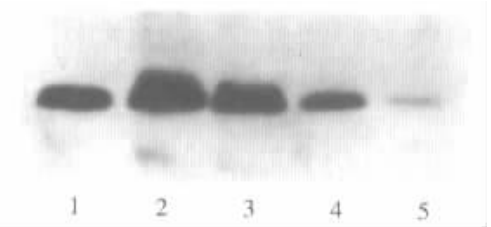

图 2 黄芪、当归对 VSMC FAK 蛋白表达的影响

注:1. 对照组;2. bFGF 组;3. 黄芪组;4. 当归组;5. 联合组

组的 1.43 倍;黄芪组、当归组和联合组分别比 bFGF 组降低 30.0%、40.8%和 70.0%,差异均有显著性($P < 0.01$)。免疫细胞化学染色结果显示,对照组 VSMC 中 FAK 染色呈阳性反应,bFGF 组染色明显加深;黄芪组

万方数据

和当归组 FAK 染色变浅，联合组 FAK 表达的抑制作用强于两者单独作用，其变化趋势与 FAK mRNA 和蛋白含量的改变相一致。

3 黄芪、当归对 NO 合成的影响 对照组细胞培养液中 NO_2^- 含量（μmol/L）为 6.67 ± 0.55，bFGF 组为 8.53 ± 0.76，虽较对照组有所上升，但差异无显著性；黄芪组为 12.57 ± 1.03，当归组为 10.48 ± 1.06，联合组为 15.71 ± 1.49，分别比对照组增加了 90%、50% 和 135%，与对照组和 bFGF 组比较，差异均有显著性（$P < 0.05$）。

4 黄芪、当归对 VSMC 凋亡的影响 流式细胞仪分析结果显示，对照组 VSMC 的凋亡率为 2.62%，bFGF 组细胞凋亡率的变化不明显；黄芪组、当归组和联合组的凋亡率分别为 6.97%、5.65% 和 8.61%（与对照组比较，均 $P < 0.05$）。

5 黄芪、当归对 bcl-2、caspase-3 表达的影响 黄芪组、当归组和联合组 bcl-2 表达下调（与对照组比较，$P < 0.05$），同时 caspase-3 表达明显升高（与对照组比较，黄芪组 $P < 0.05$，当归组和联合组，$P < 0.01$），表明黄芪、当归可以通过抑制抗凋亡基因 bcl-2 表达及上调促凋亡基因 caspase-3 表达，而诱导 VSMC 凋亡（图略）。

讨 论

近年来有研究表明，VSMC 迁移、增殖及细胞外基质的异常堆积是动脉粥样硬化和血管再狭窄的共同病理特征[6]。我们曾报道，益气活血化瘀中药在有效抑制 VSMC 增殖及细胞外基质合成的同时，还可以显著诱导 VSMC 凋亡[7]。FAK 参与 VSMC 增殖、迁移和凋亡的调节过程[2,3]，活血化瘀中药对心血管系统的作用是否与调节 FAK 的表达有关尚未见报道。本研究以 bFGF 作为促进 VSMC 迁移和增殖的刺激因素，在证实 bFGF 可显著诱导 VSMC 表达 FAK 的基础上，探讨益气活血化瘀中药对 FAK 表达的影响及其与 VSMC 凋亡之间的关系。实验结果表明，黄芪、当归两味中药可以不同程度地抑制 bFGF 所刺激的 FAK 表达，促进 NO 合成，抑制 bcl-2 表达和上调 caspase-3 mRNA 水平，与此同时，VSMC 凋亡率明显增加。bcl-2 是目前公认的凋亡抑制基因[8]，而 caspase-3 是凋亡诱导基因[9]，已证实两者在 NO 诱导细胞凋亡中起重要作用[10]。本研究结果表明，黄芪、当归对 bcl-2 和 caspase-3 的表达调节是通过促进 NO 合成来实现的。

本实验在细胞和分子水平上探讨了与黄芪、当归发挥作用有关的信号转导机制，证明黄芪和当归除可以通过升高 NO 含量来诱导促凋亡基因 caspase-3 表达及下调抗凋亡基因 bcl-2 表达而促进 VSMC 凋亡外，还可以通过抑制 FAK 表达及由其所介导的信号转导途径而发挥其对 VSMC 增殖与凋亡的调节作用，充分体现了中药的多层次、多位点、多环节及整体调节的优势，为活血化瘀防治血管内膜增生性疾病提供了新的实验依据。

参 考 文 献

1 Schaller MD. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. Biochem Biophys Acta 2001;540:1—5.

2 杨长春，温进坤，韩 梅. 粘着斑激酶在一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡中的作用. 中国动脉硬化杂志 2002;10(1):10—13.

3 杨长春，温进坤，韩 梅. 粘着斑激酶表达及活化与血管内皮剥脱后再狭窄的关系初探. 中国应用生理学杂志 2002;18(2):135.

4 Gunther S, Alexander RW, Atkinson WJ, et al. Functional angiotensin Ⅱ receptors in cultured vascular smooth muscle cells. J Cell Biol 1982;92(2):289—298.

5 Chinczyski P, Sacchi N. Single-step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162(1):156—159.

6 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.

7 柴锡庆，温进坤，韩 梅. 益气健脾中药对血管平滑肌细胞凋亡相关基因表达的影响. 中国中西医结合杂志 2001;21(12):909—912.

8 Perlman H, Sata M, Krasinski K, et al. Adenovirus-encoded hammerhead ribozyme to bcl-2 inhibits neointimal hyperplasia and induces vascular smooth muscle cell apoptosis. Cardiovasc Res 2000;45(3):570—578.

9 Li J, Li PF, Dietz R, et al. Intracellular superoxide induced apoptosis in VSMCs: Role of mitochondrial membrane potential, cytochrome C and caspases. Apoptosis 2002;7(6):511—517.

10 韩 梅，温进坤. 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. 中国中西医结合杂志 1999;19(12):734—736.

（收稿：2002-09-25 修回：2002-11-20）

万方数据