

人主动脉硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对培养的胎儿 主动脉平滑肌细胞 c-fos 基因 mRNA 表达的影响

刘俊明 丛祥凤 张春玲 张英珊

(中国医学科学院心血管病研究所 阜外医院, 北京 100037)

人主动脉壁中的蛋白聚糖与动脉粥样硬化斑块的形成密切相关,而平滑肌细胞(SMC)增殖又为后者的重要因素。体外实验表明人主动脉提取的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)能明显抑制培养的胎儿主动脉 SMC 的增殖,本实验旨在观察 HSPG 对培养的胎儿主动脉 SMC 的 c-fos 基因表达(mRNA 水平)的影响,以探讨 HSPG 是否通过影响 c-fos 基因的表达而抑制 SMC 增殖。

取意外死亡者(男性,死后 6 h 以内)的正常胸主动脉,剥弃外膜,剪碎内中膜,4 mol · L⁻¹ 盐酸胍提取,经 DEAE-Sephacel 柱层析,0.15~1.5 mol · L⁻¹ NaCl 浓度梯度洗脱,收集 HSPG,用蒸馏水及超纯水透析,0.45 μm 滤膜除菌后,配成含 HSPG 的 DMEM 溶液。

水囊引产的 26 周胎儿死后 6 h 之内取主动脉,以贴块法培养(37℃,5%CO₂)SMC,常规传代,用第四代细胞。

第四代细胞共 6 瓶[150 万/瓶(75 cm²)]接种 24~48 h 后改用 0.4% 血清(人血清及胎牛血清各 0.2%)的 DMEM 液培养 72 h(抑制于 G₀/G₁ 期),分为三组,第一组于抑制 72 h 后直接提取 SMC 的总 RNA(快速提取法);第二组(实验组)含 HSPG(终浓度 20.7 mg 醛液/L)及 10% 血清(人血清及牛血清各 5%,下同)的 DMEM 液,30 min 后提取 SMC 总 RNA;第三组(对照组)加入含 10% 的 DMEM 液,30 min 后提取总 RNA。总 RNA 上样 20 或 30 μg,1% 琼脂糖电泳,转移 RNA 至硝酸纤维素膜后,以 α-³²P-dCTP 标记的 c-fos 探针检测基因的表达。经 β-actin 内参照及溴化乙锭荧光强度照像表明上样量基本一致。两次重复实验均表明实验组杂交信号明显低于对照组,而对对照组又明显高于第一组。说明 HSPG 能抑制血清刺激引起的 c-fos 基因的表达,因此 HSPG 抑制 SMC 增殖的途径之一为抑制 c-fos 基因的表达。