

地塞米松对血管平滑肌细胞增殖及一氧化氮合成酶基因表达的影响*

乔亚明 温进坤

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 石家庄 050017)

Effects of Dexamethasone on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and the Expression of Nitric Oxide Synthase Gene

QIAO Ya-Ming and WEN Jin-Kun

(Department of biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT In this study, the effects of dexamethasone (Dex) on the DNA synthesis and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) were studied by ³H-thymidine (³H-TdR) incorporation and counting cell number. With Northern blot analysis and measuring the amount of nitrite, we observed the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in VSMC of control and treated by tumor necrosis factor- α (TNF- α), TNF- α +Dex respectively. It was found that the DNA synthesis and proliferation of VSMC were obviously inhibited by dexamethasone, the inhibitory rate was proportional to the dose and the duration of dexamethasone treatment. The results of Northern blotting and quantity of nitrite in culture medium showed that dexamethasone obviously inhibited the expression of iNOS gene and nitric oxide (NO) production in VSMC induced with TNF- α . These results indicate it is not by increasing the NO production that dexamethasone inhibits the DNA synthesis and proliferation of VSMC.

KEY WORDS Nitric oxide synthase; Vascular smooth muscle cell; Dexamethasone; Cell prolifer-

ation; Gene expression

摘要 用³H-胸腺嘧啶核苷掺入实验及细胞计数检查地塞米松对体外培养的大鼠血管平滑肌细胞DNA合成及细胞增殖的影响;经Northern印迹分析和亚硝酸盐含量测定观察一氧化氮合成酶基因表达及一氧化氮合成酶活性的变化。结果是,地塞米松显著抑制血管平滑肌细胞DNA合成及分裂增殖,其抑制强度与地塞米松剂量和细胞被处理的时间呈正相关。地塞米松显著抑制肿瘤坏死因子 α 对血管平滑肌细胞一氧化氮合成酶表达的诱导作用,降低培养液内亚硝酸盐含量。证实地塞米松对血管平滑肌细胞DNA合成及细胞增殖的抑制作用不是通过增加一氧化氮含量来实现的。

关键词 一氧化氮合成酶; 血管平滑肌细胞; 地塞米松; 细胞增殖; 基因表达

近年来的研究证明,一氧化氮(nitric oxide, NO)是心血管系统中的一种新型信息传递体,具有舒张血管、降低血压、抑制血管平滑肌细胞增殖和血小板粘附等多种生理功能,在高血压、心肌缺血、动脉粥样硬化、休克等心血管疾病的发生发展过程中起着重要作用^[1]。一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)催化L-精氨酸和分子氧形成NO,是调节体内NO含量的限速因子。NOS分为结构型和诱导型,血管平滑细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)内的NOS属诱导型,只有在某些细胞因子和内毒素的作用下才进行表达^[2]。本实验主要观察糖皮质激素地塞米松(dexamethasone, Dex)对VSMC中诱导型NOS(inducible NOS, iNOS)基因表达及DNA合成和细胞增殖的影响。

* 河北省自然科学基金资助项目

1 材料和方法

1.1 材料

M199 培养基购自 Sigma 公司, ^3H -胸腺嘧啶核苷 (^3H -thymidine, ^3H -TdR) 为原子能科学研究院产品, Dex 为石家庄第一制药厂产品, 重组肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 为北京邦定生物医学公司产品, iNOS cDNA (compiement DNA) 探针为本室保存。[α - ^{32}P] 脱氧胞苷三磷酸购自北京亚辉生物医学公司, 核酸探针随机引物标记试剂盒为 promega 公司产品, 其它试剂为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 VSMC 培养 取 6 周龄 Sprague-Dawley (SD) 大鼠胸主动脉, 按本室报道的贴片法进行原代培养^[1], 待 VSMC 长满培养瓶后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。本实验选用 4~8 代细胞。

1.2.2 ^3H -TdR 掺入实验 将传代细胞接种到 25 ml 培养瓶内, 待细胞生长达 80% 融合时, 换成含 0.5% 小牛血清的 M199 培养, 36 h 后再换成含 20% 小牛血清的 M199, 同时加入 Dex, 观察不同浓度 Dex (0.2×10^{-7} 、 10^{-7} 、 2×10^{-7} 、 10^{-6} mol/L) 作用 36 h 及同一浓度 Dex (2×10^{-7} mol/L) 作用不同时间 (6、12、24、36、48 h) 对 VSMC DNA 合成及细胞增殖的影响。回收细胞前 6 h, 向各瓶细胞的培养液中加入 ^3H -TdR 至终浓度为 2 mCi/L。按前文方法^[1]回收细胞, 测定 ^3H -TdR 掺入, 计算每组 (4 瓶) 细胞的平均值, 按下式计算 Dex 对 VSMC 生长的抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组 cpm} - \text{实验组 cpm}}{\text{对照组 cpm}} \times 100\%$$

注: cpm—counting per minute (计数率)

细胞 (每组 3 瓶) 用冷磷酸盐缓冲生理盐水 (phosphate buffer saline, PBS) 洗 3 次, 经 0.25% 胰酶消化后, 用 PBS 吹打成单个分散细胞, 进行细胞计数。实验结果要以均值士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 差异的显著性意义用 t 检验。

1.2.3 Northern 印迹分析 将 VSMC 传代至 100 ml 培养瓶内, 待细胞生长达 80% 融合时, 弃去培养液, 细胞用 PBS 洗 3 次, 换成含 10% 小牛血清的无酚红 M199 培养液, 同时加入 TNF- α + Dex (在加入 TNF- α 前、后各 3 h 分别加入 Dex (10^{-6} mol/L)), 24 h 后, 收集培养液测亚硝酸盐 (NO_2^-) 含量, 按 AGPC 法^[4]提取 RNA。取 RNA 30 μg 经 1% 琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳后, 转移到尼龙膜上, 按 Sambrook 等^[5]方法与用随机引物标记的 iNOS cDNA 探针进行杂交。

1.2.4 NO_2^- 测定 参照文献^[6]测定 NO_2^- 含量。取

上述收集的培养液 800 μl , 加入等量的 Greiss 试剂 (1% 对氨基苯磺酰胺, 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺, 5% H_3PO_4), 室温放置 10 min, 用紫外分光光度计于 550 nm 波长测定样品的吸光度, 以亚硝酸钠为标准品制做标准曲线, NO_2^- 浓度用 $\mu\text{mol/L}$ 表示。

2 结果

2.1 地塞米松对血管平滑肌细胞 ^3H -胸腺嘧啶核苷掺入的影响

如 Table 1 所示, Dex (2×10^{-7} mol/L) 作用于 VSMC 6 h 后, ^3H -TdR 掺入开始降低, 12 h 后与对照组相比出现显著差异, 作用 24 h, 对细胞 ^3H -TdR 掺入的抑制率达 50% 以上; 之后, 随作用时间延长, 抑制作用进一步增强, 48 h 后, 抑制率高达 70% 左右。从 Table 2 可见, 向培养液中加入终浓度为 2×10^{-8} mol/L Dex 可使 ^3H -TdR 掺入抑制率达 50% 左右, 抑制作用随 Dex 浓度升高而增强, 呈现明显的量-效关系。

Table 1. Influence of Dex on incorporation of ^3H -TdR into VSMC.

Groups	hours of Dex treatment	cpm $\times 10^3$ ($\bar{x} \pm s$)	inhibition rate (%)
control	0	3.47 \pm 0.66	0
experiment	6	2.13 \pm 0.23	38.5
	12	1.96 \pm 0.30 ^a	43.6
	24	1.64 \pm 0.56 ^a	52.9
	36	1.49 \pm 0.24 ^b	57.2
	48	1.01 \pm 0.15 ^b	71.0

Compared with control, a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$.

Table 2. Influence of Dex on incorporation of ^3H -TdR into VSMC.

Groups	concentration of Dex ($\times 10^{-7}$ mol/L)	cpm $\times 10^3$ ($\bar{x} \pm s$)	inhibition rate (%)
control	0	4.01 \pm 0.24	0
experiment	0.2	2.09 \pm 0.65	48.1
	1	1.99 \pm 0.38 ^a	50.3
	2	1.48 \pm 0.59 ^b	63.3
	10	1.05 \pm 0.30 ^b	73.9

Compared with control, a: $P < 0.05$; b: $P < 0.01$.

2.2 地塞米松对血管平滑肌细胞增殖的影响

地塞米松对 VSMC 增殖具有显著抑制作用,从 Table 3 可知,其抑制增殖作用与作用时间有关,随着作用时间延长,抑制作用逐渐增强。

Table 3. Effect of Dex on proliferation of VSMC

Groups	hours of Dex treatment	cell number ($\times 10^4, \bar{x} \pm s$)	inhibition rate (%)
control	0	10.44 ± 1.23	0
experiment	6	9.08 ± 1.13	13.1
	12	8.84 ± 1.46	16.0
	24	6.69 ± 0.00	35.9
	36	5.33 ± 1.23	48.9
	48	3.50 ± 0.45	66.5

2.3 地塞米松对肿瘤坏死因子诱导型一氧化氮合成酶基因表达及其活性的影响

Northern 印迹分析显示 (Figure 1), TNF- α 可明显诱导 VSMC iNOS 基因表达,杂交带位于 28 S 与 18 S rRNA 之间,与文献[6]报道的 iNOS mRNA 长度相一致;随着 TNF- α 剂量增加,iNOS 基因表达活性增强。Dex 显著抑制 TNF- α 对 iNOS 基因表达的诱导作用,并导致培养液中 NO₂ 含量下降约 60% (Figure 2),先加或后加 Dex 对抑制 TNF- α 诱导 iNOS 基因表达及降低 NO₂ 含量的作用无明显差异。

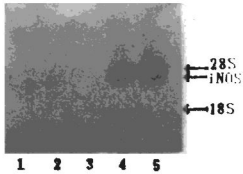


Figure 1. Northern blotting for iNOS mRNA. 1, TNF- α (2 Mu/L) + Dex (3 h posttreatment). 2, TNF- α (2 Mu/L) + Dex (3 h pretreatment). 3, control. 4, TNF- α (2 Mu/L). 5, TNF- α (4 Mu/L)

3 讨论

糖皮质激素除具有抗炎、免疫抑制及代谢调节等生物效应外,还具有抑制细胞繁殖的作

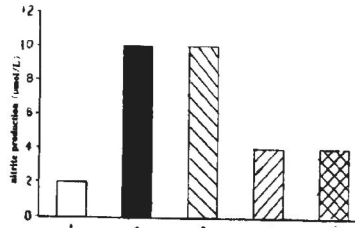


Figure 2. Influence of TNF- α and TNF- α + Dex on concentration of NO₂ in culture medium. 1, control. 2, TNF- α (4 Mu/L). 3, TNF- α (2 Mu/L). 4, TNF- α (2 Mu/L) + Dex (3 h pretreatment). 5, TNF- α (2 Mu/L) + Dex (3 h posttreatment).

用。为探讨糖皮质激素对心血管细胞的作用,本文以 Dex 与大鼠 VSMC 为研究对象,通过³H-TdR 掺入实验及细胞计数观察了 Dex 对大鼠 VSMC DNA 合成及细胞增殖的影响。实验结果表明,该激素对 VSMC DNA 合成及细胞增殖具有显著抑制作用,且抑制效应与 Dex 剂量和细胞被 Dex 处理的时间呈现明显的相关性。近来研究证实^[1],NO 可抑制 VSMC 增殖。为揭示 Dex 是否通过改变 NO 含量来影响 VSMC 增殖,我们检查了 Dex 对 VSMC NOS 基因表达及 NO₂ 含量的影响。由于 VSMC 的 NOS 基因属诱导型,只有在一些细胞因子和内毒素的作用下才大量表达,故本实验首先用 TNF- α 诱导 iNOS 基因表达,在此基础上观察 Dex 对 iNOS 基因表达的影响。结果发现,Dex 可明显抑制 TNF- α 对 VSMC iNOS 基因表达的诱导作用,并进而影响 NOS 的合成,使其催化产生的 NO 含量下降。提示 Dex 对 VSMC DNA 合成及细胞增殖的抑制作用不是通过增加 NO 含量来实现的。姜昆等^[7]报道,糖皮质激素的抗细胞增殖作用可能与该激素与其受体结合后形成的复合物能抑制细胞裂信号传递途径中的核内成员 *c-fos* 和 *c-jun* 的活性有关。糖皮质激素抑制 NOS 基因表达与抑制 VSMC DNA 合成及细胞增殖之间是否存在直接联系? 尚待进一步研究。

参考文献

- 1 Prince RG, Gunson DE. Rising interest in nitric oxide synthase. *TIBS*, 1993, **18** (2): 35~36.
- 2 Beasley D, Eldridge M. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α synergistically induce NO synthase in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1994, **266** (4 pt 2): R1 197~203.
- 3 胡静, 温进坤, 魏素珍. 甲基硝基亚硝胍对血管平滑肌细胞增殖的影响. *中华物理医学杂志*, 1994, **16** (4): 211~213.
- 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 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning, *In: A Laboratory Manual, 2nd ed, Cold Spring harbor Laboratory Press*. 1989.
- 6 Green LG, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, **126** (1): 131~138.
- 7 姜昆, 童坦君. 糖皮质激素细胞生长抑制作用的分子机理. *生命的化学*, 1991, **11** (6): 18~19.

(1995-02-12收到, 1996-02-21修回)

名词术语的汉英对照及缩写(I)

一过性缺血发作	transient ischemic attack, TIA
一过性糖尿病	transient diabetes, TD
一碘酪氨酸	monoiodinated tyrosine, MIT (T ₁)
一磷酸尿苷	uridine monophosphate, UMP
一磷酸鸟苷	guanosine monophosphate, GMP
一磷酸胞苷	cytidine monophosphate, CMP
一磷酸腺苷	adenosine monophosphate, AMP
一磷酸胸腺嘧啶核苷	thymidine monophosphate, TMP
一磷酸次黄嘌呤核苷	inosine monophosphate, IMP
乙二胺四乙酸	ethylene diamine tetra-acetic acid, EDTA
乙酰胆碱受体	acetylcholine receptor, AChR
乙酰胆碱酯酶	acetylcholine esterase, AChE
乙酰神经氨酸	acetylneuraminic acid, ANAA
乙酰胆碱敏感性	acetylcholine sensitivity, AChS
乙酰氨基葡萄糖	acetylglucosamine, AGA
乙二胺四乙酸二钠	edathamil disodium, EDS
乙二胺四乙酸二钠钙	edathamil calciumdisodium, ECDS
二磷酸鸟苷	guanosine diphosphate, GDP
二磷酸尿苷	uridine diphosphate, UDP
二磷酸胞苷	cytidine diphosphate, CDP
二磷酸腺苷	adenosine diphosphate, ADP
十二烷基磺酸钠	sodium dodecyl sulfate, SDS
十二烷基硫酸钠	sodium lauryl sulfate, SLS
二磷酸吡啶核苷	diphosphopyridine nucleotide, DPN (coenzyme I, CoEI)
二磷酸尿苷半乳糖	uridine diphosphate galactose, UDPG
二磷酸次黄嘌呤核苷	inosine diphosphate, IDP

(胡必利编写)