

API0134 对氧自由基诱导内皮细胞表达 *c-sis* mRNA 和血小板源性生长因子 B 链的影响*

王宏伟^① 赵华月^① 刘绍春^② 杨木兰^②
(^①同济医科大学 ^②同济医院心内科, ^③病理学教研室, 武汉 430030)

Effects of API0134 on Expression of *c-sis* mRNA and Platelet-derived Growth Factor B Chain Protein in Endothelial Cells Induced by Oxygen Free Radical

WANG Hong-Wei¹, ZHAO Hua-Yue¹, LIU Shao-Chun² and YANG Mu-Lan²

(¹Department of Internal Medicine, Tongji Hospital, ²Department of Pathology, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

Aim The effects of API0134 on expression of *c-sis* mRNA and platelet-derived growth factor B chain protein (PDGF-B) in porcine aortic endothelial cells (EC) induced by oxygen free radical (OFR) were studied in this article.

Methods Immunohistochemistry, in situ hybridization and computer image analysis methods were used.

Results The results showed, that OFR induces *c-sis* mRNA transcription and stimulates PDGF-B expression in EC; The inducible effects of OFR can be inhibited by API0134, the inhibitory effects are dose dependent.

Conclusion These data suggest that API0134 may play a role in anti-atherosclerosis.

KEY WORDS API0134; Oxygen free radical; Endothelium; Platelet-derived growth factor; Immunohistochemistry; In situ hybridization

摘要 本文应用免疫组织化学和原位杂交方法,观察中药穿心莲成分 API0134 对氧自由基诱导猪主动脉

内皮细胞表达癌基因 *c-sis* mRNA 和血小板源性生长因子 B 链的影响。结果是,氧自由基能诱导内皮细胞 *c-sis* mRNA 的转录和促血小板源性生长因子 B 链表达。API0134 能显著抑制氧自由基的上述诱导作用,抑制效应与药物浓度呈正相关。因此提示,API0134 的这一作用可能是其抗动脉粥样硬化的机制之一。

关键词 穿心莲成分 API0134; 内皮细胞; 氧自由基; 血小板源生长因子; 免疫组织化学; 原位杂交

自由基介导的脂质过氧化损伤是血管内皮损伤的重要机制。内皮细胞(endothelial cells, EC)受损伤时所释放的许多生长因子和细胞因子参与了动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生发展过程^[1]。从中草药中开发抗氧化、保护 EC 的药物,对我国的 As 防治具有积极意义。本院既往研究发现,中药穿心莲成分 APN 具有抗粥样硬化性血管狭窄,拮抗自由基、预防心肌缺血一再灌损伤的作用^[2,3]。体外试验表明,穿心莲成分 API0134 能够保护内皮细胞功能、抑制血管平滑肌细胞增殖^[4,5]。本文则观察 API0134 对氧自由基(oxygen free radical, OFR)诱导猪主动脉 EC 表达原癌基因 *c-sis* mRNA 和血小板源性生长因子 B 链(platelet-derived growth factor B chain protein, PDGF-B)的影响,以期探讨 API0134 抗动脉粥样硬化的可能机制。

1 材料与方法

1.1 药物来源

API0134 为中药穿心莲中提取纯化的有效成分,薄层层析展开为一斑点。由同济医科大学同济医院药

* 国家自然科学基金(No. 39470859)和湖北省自然科学基金(94J081)资助项目。

剂科植物化学研究室提供。

1.2 细胞培养和实验分组

按本实验室方法分离猪主动脉EC,加入含10%胎牛血清的M199培养液(Gilbeo),置二氧化碳培养箱中37℃培养,定时换液传代^[1]。免疫荧光因子V β 阳性者鉴定为EC。

实验前将生长良好的第3代EC,按 1×10^6 个/L密度接种于培养瓶中(瓶底放置盖玻片)培养。按以下设计随机分为5组:①对照;②OFR;③OFR+API0134(10 mg/L);④OFR+API0134(50 mg/L);⑤OFR+API0134(100 mg/L)。待EC在盖玻片上生长达亚融合时,弃去原培养基,加入无血清DME/F-12混合培养液(Sigma)继续培养24 h。然后将API0134按上述剂量加入用药各组,37℃温育10 min,再将OFR发生系统分别加入用药各组 and OFR刺激组,作用20 min后终止反应。OFR发生系统的配制参照文献^[6]方法,其反应物终浓度为FeCl₃ 0.025 mmol/L,ADP 0.025 mmol/L和H₂O₂ 1.67 mmol/L。最后将各组细胞培养玻片分别用冷丙酮和4%多聚甲醛固定15 min,取出盖玻片,置-20℃保存备用。

1.3 免疫组织化学染色

采用LSAB法,试剂盒购自美国Zymed公司。抗PDGF-B单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)由日本Mochida制药有限公司惠赠。按LSAB试剂盒操作说明书进行各组细胞培养玻片的免疫组织化学染色。PDGF-B McAb工作浓度为1:500。阴性对照组为已知PDGF-B阳性细胞培养玻片,用PBS代替一抗时染色阴性。

1.4 原位杂交

c-sis 原癌基因探针(cDNA, 2.1 kb)购自北京中山生物技术有限公司,地高辛标记与检测试剂盒购自德国Boehringer-Mannheim公司。按试剂盒操作说明书标记*c-sis*探针,并在EC培养玻片上进行cDNA-mRNA原位分子杂交。阴性对照为已知阳性细胞培养玻片,杂交时用预杂交液代替杂交液,磷酸四唑氨基蓝色阴性。

1.5 图像分析

将每组细胞培养玻片的图像输入IBAS2000型自动图像分析仪,测定*c-sis* mRNA和PDGF-B在EC中阳性表达强度的平均光密度值,并做统计学处理。

2 结果

2.1 形态学观察

免疫组织化学和原位杂交检测显示,体外培养的猪主动脉内皮细胞内,*c-sis* mRNA和PDGF-B都有阳性表达。*c-sis* mRNA转录的阳性信号为紫蓝色颗粒,位于EC的细胞核及胞浆内,后者相对较弱(Figure 1, 2);PDGF-B阳性表达信号位于核周胞浆,呈棕黄色粗细不均匀颗粒(Figure 3, 4)。

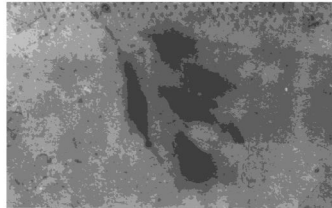


Figure 1. *c-sis* mRNA transcription was increased in EC of OFR group (in situ hybridization, $\times 250$).



Figure 2. *c-sis* mRNA transcription was inhibited in OFR+API0134 (50 mg/L) group (in situ hybridization, $\times 250$).



Figure 3. PDGF-B expression was enhanced in EC of OFR group (LSAB, $\times 250$).

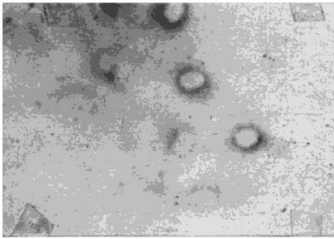


Figure 4. PDGF-B expression was inhibited in OFR + API0134 (50 mg/L) group (LSAB, ×250).

2.2 定量测定结果

氧自由基刺激组 EC 的 *c-sis* mRNA 转录和 PDGF-B 表达均明显增强,其阳性信号的平均光密度值分别是对照组的 2.5 倍和 3.3 倍。用药各组结果显示,不同剂量的 API0134 均可抑制 OFR 诱导的 PDGF-B 表达,且随剂量增大抑制作用增强;API0134 50 mg/L 亦能显著抑制 OFR 诱导的 *c-sis* mRNA 转录 (Table 1)。

Table 1. The average optical density of both *c-sis* mRNA and PDGF-B protein in each group of cultured endothelial cells (n=30, x±s).

Group	<i>c-sis</i> mRNA	PDGF-B
control	70±3	61±4
OFR	177±4*	196±3*
OFR+API0134 I		143±3 ^Δ
OFR+API0134 II	110±3 ^Δ	82±2 ^Δ
OFR+API0134 III		63±2 ^Δ

The concentration of API0134 is 10 mg/L in I group, that 50 mg/L and 100 mg/L in II and III group. * Compared with control group, P<0.01; ^Δ Compared with OFR group, P<0.01.

3 讨论

动脉粥样硬化是动脉壁对损伤的反应过程,EC 损伤是动脉粥样硬化病变的始动环节和关键因素之一。PDGF-B 是原癌基因 *c-sis* 的表达产物。动脉 EC 在受损伤时合成和释放 PDGF 增多,通过旁分泌机制促进动脉中膜平

滑肌细胞向内膜下迁移和增殖,并对单核细胞有趋化作用。因此 PDGF 在动脉粥样硬化的发生发展中起重要作用^[1]。自由基损伤是 EC 损伤的重要机制之一,自由基损伤与原癌基因表达的关系近年已引起人们重视。Suzuki^[2]应用斑点杂交技术研究发现,与 OFR 产生有关的物质如白细胞介素-1 和肿瘤坏死因子可促进 EC 的 *c-sis* mRNA 转录。本文应用原位杂交和免疫组织化学方法研究发现,OFR 可促进猪主动脉 EC 内 *c-sis* mRNA 转录和 PDGF-B 表达。因此认为,OFR 的这一作用机制在动脉粥样硬化发病过程中可能起重要作用。

如何防止或阻断动脉 EC 损伤及损伤后所发生的一系列变化,将是动脉粥样硬化防治的主要方面。API0134 具有抗自由基损伤、保护 EC 和预防粥样硬化性血管狭窄和再狭窄的作用^[3~5]。本文深入探讨 API0134 抗自由基损伤,预防动脉粥样硬化的分子机制,发现 API0134 能够显著抑制 OFR 所诱导的 EC *c-sis* mRNA 转录增多和 PDGF-B 合成增多,对 PDGF-B 表达的抑制效应与药物浓度呈正相关,因此认为,API0134 的这一作用,可能是其抗动脉粥样硬化的分子机制之一。

致谢 日本 Mochida 制药有限公司 Sugihara 博士惠赠 PDGF-B McAb。

参考文献

- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis, a perspective for the 1990's. *Nature*, 1993, 362(29): 801~808.
- Wang Daowen (汪道文), Zhao Huayue (赵华月). Prevention of atherosclerotic arterial stenosis and restenosis after angioplasty with andrographis paniculata nees and fish oil. *Chinese Medical Journal*, 1994, 107(6): 464~469.
- 郭志波,赵华月,邢信华. 穿心莲对心肌缺血-再灌注损伤的防治作用. *中国中西医结合杂志*, 1993, 13 (基础理论特集): 31~34.
- 熊一力,赵华月,付良武. 穿心莲成分 API0134 和阿斯匹林对内皮细胞抗血栓功能的影响. *中华血液学杂志*, 1993, 14 (10): 530~534.
- 熊一力,赵华月. 穿心莲成分 API0134 对猪主动脉平滑肌细胞增殖的抑制作用. *中华心血管病杂志*, 1995, 23

(3); 214.

- 6 汤健,周爱儒. 原癌基因与心血管疾病. 汤健,周爱儒主编. 心血管疾病-基础与临床. 北京:北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社, 1990; 22~35.
- 7 Suzuki H, Shabano K, Okane M, et al. Interferon-modu-

lates messenger RNA level of *c-sis* (PDGF-B chain), PDGF-A chain, and IL-1 α genes in human vascular endothelial cells. *Am J Pathol*, 1989, **134** (1): 35~43.

(1996-01-03 收到, 1996-02-29 修回)