

丹参酮 I a 磺酸钠抑制巨噬细胞源性生长因子刺激平滑肌细胞 *c-myc* 基因表达

张文军 包晓峰 王秀凤 徐铭渔 钱振淮
(中国中医研究院西苑医院心血管病研究室, 北京 100091)

Preventive Effect of Sodium *Tanshinone I a* Sulfonate on *c-myc* Gene Expression Stimulated by Macrophage-derived Growth Factor

ZHANG Wen-Jun, BAO Xiao-Feng, WANG Xiu-Feng, XU Min-Yu and QIAN Zheng-Huai
(Department of Cardiovascular Diseases, Xiyuan Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100091, China)

ABSTRACT In the study, the effect of sodium *Tanshinone I a* sulfonate (TN I a) on *c-myc* expression in vascular smooth muscle cell (SMC) was explored with in situ hybridization. It was showed that macrophage-derived growth factor (MDGF) could apparently stimulate high gene expression of *c-myc*. In contrast, TN I a could prevent MDGF's stimulating effect on SMC, decrease the expression level of *c-myc*. The experiment showed TN I a might play an important role on preventing the proliferation of SMC in atherosclerosis.

KEY WORDS Sodium *Tanshinone I a* sulfonate; Smooth muscle cell; Macrophage-derived growth factor; *c-myc* gene

摘要 本实验采用原位杂交技术,探讨丹参酮 I a 磺酸钠对血管平滑肌细胞增殖相关基因 *c-myc* 表达的影响。观察到巨噬细胞源性生长因子可明显促进平滑肌细胞 *c-myc* 高表达;丹参酮 I a 磺酸钠能阻止巨噬细胞源性生长因子刺激平滑肌细胞的作用,使 *c-myc* 表达水平下降,提示丹参酮 I a 磺酸钠可能在动脉粥样硬化疾病中阻止平滑肌细胞增殖起重要作用。

关键词 丹参酮 I a 磺酸钠; 平滑肌细胞; 巨噬细胞源性生长因子; *c-myc* 基因

血管平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 在动脉管壁中膜的增殖,在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成中起着重要作用。SMC 增殖又与各种细胞因子密切相关,其中巨噬细胞分泌的细胞因子在 As 形成过程中起着十分重要的作用。本实验旨在观察巨噬细胞源性生长因子 (macrophage-derived growth factor, MDGF) 对 SMC *c-myc* 基因表达的影响,同时评价丹参酮 I a 磺酸钠 (sodium *Tanshinone I a* sulfonate, TN I a) 对 MDGF 促进 SMC *c-myc* 基因表达的作用。

1 材料和方法

1.1 正常兔主动脉平滑肌细胞的培养

取 4~6 周龄家兔的主动脉中膜平滑肌进行培养,原代培养采用组织贴块法^[1],传代培养参照夏人仪等^[2]方法,经 0.125% 胰蛋白酶消化、清洗、接种等步骤,传代密度为 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ 个,常规培养用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基 (均为 Gibco 公司产品),培养后的 SMC 在倒置相差显微镜下,呈典型“峰谷”状结构,并经透射电镜观察鉴定。

1.2 巨噬细胞培养及其条件培养基的制备

兔巨噬细胞 (macrophage, MP) 培养及贫血小板血清 (platelet-poor serum, PPS) 的制备参照邱红明等^[3]报道的方法稍作修改,将收集到的兔腹腔 MP 进行细胞计数, Giemsa 染色, MP 纯度大于 80%, 台盼蓝拒染试验,活细胞大于 90%, 调细胞浓度为 4×10^5 个/L, 按 1.4×10^5 个活细胞/cm² 的密度接种于 25 cm² 培养瓶中,加入含 20% 小牛血清的 DMEM, 置 37 C, 孵育 2 h, 使其附壁, 弃去培养基, 用温 PBS 轻洗细胞 2 遍

后,更换含 5% PPS 的 DMEM,置 37℃,孵育 24 h,收集培养液,3 000 r/min 离心 30 min,0.22 μm 微孔滤膜过滤,此即为含 MDGF 的条件培养液(conditioned-medium, CM),-30℃保存备用。

1.3 分组实验培养基的配制

1.3.1 正常对照组培养液 为含 5%PPS 的 DMEM,不含生长因子。

1.3.2 阳性刺激组培养液 即 MP-CM,含巨噬细胞源性生长因子。

1.3.3 TNⅠa 实验组培养液 为含 20 mg/L 的 TNⅠa 的 MP-CM。TNⅠa 每安瓿 1 ml 含 10 mg,由上海第一制药厂生产,批号 810324,将 TNⅠa 按 20 mg/L 浓度加入 MP-CM,以 5% NaHCO₃ 调 pH 为 7.2 即得。

1.4 实验步骤

1.4.1 杂交样品的制备 将第四代 SMC 接种于用 10 mg/L Polylysine 处理过的飞片上,每 5 天换液 1 次,培养 15 天后,分别加入 3 种实验培养基,48 h 后,用含 4%(W/V)多聚甲醛,0.1%戊二醛和 4%蔗糖的 PBS (pH 7.4)洗 3 次,每次 10 min,用 DEPC 处理过的双蒸水漂洗 1 次,然后浸入 70%乙醇中 4℃保存备用。

1.4.2 cDNA 探针的标记 *c-myc* 基因探针购自华美生物工程公司,探针长度 1.4 kb,生物素-dATP 标记试剂盒为美国 Promega 公司产品,采用随机引物法^[4]制备生物素(biotin)标记的 *c-myc* 基因 cDNA 探针。

1.4.3 细胞内原位杂交 取出保存于 70%,4℃乙醇中的培养细胞飞片,PBS 洗 3 次,每次 5 min;含 0.05% Triton X-100 的 PBS 处理 5 min,PBS 洗 2 次,每次 5 min;含 100 mmol Glycine 的 PBS 处理 10 min;2×SSC 中 37℃平衡 10 min;用不含探针的杂交液预杂交,37℃ 1 h,然后与变性的 cDNA 探针于 37℃杂交 16 h(杂交液:50%甲酰胺,2×SSC,1%BSA,1×denhart's,100 mg/L 鲑精 DNA;1 mg/L biotin-*c-myc* cDNA);用含 50%甲酰胺的 2×SSC,1×SSC,0.1×SSC 于 37℃依次各洗 2~3 次,每次 10 min;PBS 过渡洗涤 2 次,每次 5 min;用含 3%BSA,0.05% Triton X-100,2 mmol MgCl₂ 的 PBS 于 37℃封闭 30 min,加入含 1% BSA 和 0.05% Triton X-100 的 PBS 和 1:500 稀释的 Streptavidin-FITC 室温反应 1 h,PBS 清洗 4 次,每次 10 min,双蒸水冲洗 2 次,用含 50%甘油的 PBS 封片,荧光显微镜观察并照相。

1.5 观察方法

1.5.1 观察阳性细胞百分率 在荧光显微镜下计

数 200 个细胞,观察胞浆内的荧光反应,有反应的为阳性细胞,无反应的为阴性细胞,再按照“阳性细胞数/200×100%计算阳性细胞百分率。

1.5.2 观察全片反应强度 将阳性细胞的反应强度分为 4 级:阳性反应占胞浆 1/4 面积的为 I 级,占 1/2 面积的为 II 级,占 3/4 面积的为 III 级,阳性反应布满胞浆的为 N 级。

全片反应强度积分=(I 级细胞的百分率×100)+(II 级细胞的百分率×200)+(III 级细胞的百分率×300)+(N 级细胞的百分率×400)。

2 结果

2.1 阳性细胞计数结果

培养的血管平滑肌细胞经含 *c-myc* 基因的 cDNA 探针行细胞内原位杂交,镜下发现胞浆内有荧光颗粒呈星点或片状分布的为阳性细胞;计数阳性细胞百分率见 Table 1。可见在巨噬细胞条件培养基中,表达 *c-myc* 基因的血管平滑肌细胞数显著增加($P<0.001$),若同时加入丹参酮Ⅰa 磺酸钠后,阳性细胞百分率下降,虽未下降到正常对照组水平,但与单用巨噬细胞条件培养基相比,差异具有显著性意义($P<0.05$)。实验结果说明,巨噬细胞条件培养基具有较强的刺激血管平滑肌细胞表达 *c-myc* 基因的作用,这种作用可部分地被丹参酮Ⅰa 磺酸钠阻断。

2.2 全片阳性细胞反应强度

将阳性细胞按反应强度进行分级,计数全片反应强度,得到的结果(Table 2)也说明了上述判断。

3 讨论

近年来许多研究证实 MP 能分泌多种调控 SMC 增殖的生长因子,如白细胞介素-1,肿瘤坏死因子及 γ-干扰素等。本实验结果提示 MDGF 能明显促进 SMC *c-myc* 基因表达。文献报道,应用重组 *c-myc* 原癌基因反义 DNA 阻断细胞 *c-myc* 原癌基因表达可抑制细胞增殖反应^[5],在病变过程中,各种病理因素通过诱导 *c-myc* 等癌基因异常表达,促进 SMC 增殖,本

Table 1. Analysis of positive cell percentage on 3 group's in situ hybridization

Group	reaction time(h)	positive cell	negative cell	total cell	% of positive cell
control	48	23	177	200	11.5
MP-CM	48	79	121	200	39.5 ^a
TN I a+MP-CM	48	57	143	200	28.5 ^b

a: $P < 0.001$ compared with control group; b: $P < 0.05$ of positive cell compared with MP-CM group.

Table 2. Analysis of the whole reaction intensity of positive cell in 3 group of situ hybridization.

Group	grade I			grade II			grade III			grade IV			total score
	n	%	score	n	%	score	n	%	score	n	%	score	
control	16	8	8	7	3.5	7	0			0			15
MP-CM	29	14.5	14.5	31	15.5	31	10	5	15	9	4.5	18	78.5
TN I a+MP-CM	18	9	9	22	11	22	15	7.5	22.5	2	1	4	57.5

实验结果亦证实巨噬细胞源性生长因子可刺激 c-myc 基因过量表达,从而阐明 As 发病过程中有 MP 浸润和聚集在病灶周围可能通过促进 c-myc 异常表达而刺激 SMC 增殖,对 As 发生和发展有一定促进作用。

丹参酮 I a 磺酸钠是从治疗冠心病的常用中药丹参 (*Salvia Miltiorrhiza Bunge*) 中提取出的一种脂溶性成分丹参酮 I a 经磺化而成的水溶性钠盐^[6],以往研究证实, TN I a 能减轻急性缺氧^[7],改善左心室功能^[8],减少血栓形成^[9],保护损伤的血管内皮细胞^[10],是一种钙拮抗剂,作用优于异博定,推测机理可能是通过膜稳定作用和氧自由基清除作用抑制钙内流^[11],而钙拮抗剂抑制 SMC 增殖的研究屡见报道。本实验通过细胞内原位杂交方法从分子水平证实 TN I a 能降低 SMC 增殖相关基因 c-myc 的表达,提示 TN I a 可能具有抑制 SMC 增殖的作用,进一步工作尚待进行。

参考文献

- 徐叔云. 药理实验方法学. 第 2 版, 北京: 人民卫生出版社, 1991, 535~538.
- 夏人仪, 余铭鹏, 卢耀增, 等. 兔主动脉壁平滑肌细胞培养及形态学观察. 中华心血管病杂志, 1982, 10(2): 134.

- 邱红明, 邓仲端, 武忠弼, 等. 巨噬细胞源性生长因子对培养的动脉平滑肌细胞细胞周期进程的影响. 中华病理学杂志, 1990, 19(1): 4.
- 萨姆布鲁克, 曼尼柯蒂斯. 分子克隆操作指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1992, 502~5.
- Carr JM, Chang TD, Peters CA, et al. Expression of cell growth regulated genes in the fetal kidney. *J Soc Nephrol*, 1993, 3: 465.
- Chine MK, Young PT, Ku WH, et al. Studies on the active principles of Dan-shen I. The structure of sodium tanshinone I-A sulfonate and methylene tanshinquinone. *Acta Chi Sin*, 1978, 36: 199.
- Wang ZM, Chen LX, Zhang YF, et al. Effects of sodium tanshinone I-A sulfonate on myocardium and haemolysis. *Acta physiol Sin*, 1980, 32: 18.
- Wang YP, Chen YH, Xu DZ, et al. Effect of tanshinone I-A sodium sulfonate on the hemodynamics and extent of myocardial infarct in coronary occluded dogs. *Acta Acad Nled Shanghai*, 1980, 7: 34.
- Li CZ, Yang SC, Zhao FD. Effect of tanshinone I-A sulfonate on thrombus, platelet and coagulation in rats and mice. *Acta pharmacol sin*, 1984, 5: 39.
- 王新星, 游杰美, 勒芳, 等. 丹参酮 I a 对低密度脂蛋白引起牛血管内皮细胞损伤的影响. 中国药理学与毒理学杂志, 1993, 7(2): 157~158.
- 岳平, 王孝铭, 梁殿权. 丹参酮 I-A 磺酸钠对心肌钙反常的保护作用. 中国病理生理杂志, 1987, 3(3): 154.

(1995-09-29 收到, 1996-01-19 修回)