

# 人主动脉硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对胎儿主动脉平滑肌细胞 *c-fos* 和 *c-myc* 基因表达的影响

刘俊明 丛祥凤 张春玲 张英珊

(中国协和医科大学中国医学科学院, 心血管病研究所阜外心血管病医院, 北京 100037)

## The Effect of Human Aortic Heparan Sulfate Proteoglycan on the Expression of *c-fos* and *c-myc* Gene in the Cultured Fetal Aortic Smooth Muscle Cells

LIU Jun-Ming, CONG Xiang-Feng, ZHANG Chun-Ling and ZHANG Ying-Shan

(Peking Union Medical college and Chinese Academy of Medical Sciences, Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, Beijing 100037, China)

**ABSTRACT** Our laboratory have found that human aortic heparan sulfate proteoglycan (HSPG) can suppress the proliferation of cultured fetal aortic smooth muscle cells (hASMC). In this study Northern blot was used to investigate the effect of HSPG on the expression of *c-fos* and *c-myc* proto-oncogene in hASMC. The results showed that former can suppress both *c-fos* and *c-myc* gene. It is concluded that suppression of protooncogene expression may be one of the causes that HSPG suppresses smooth muscle cell proliferation.

**KEY WORDS** Heparan sulfate proteoglycan; Smooth muscle cell; Proto-oncogene

**摘要** 本室以往的研究发现硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对培养的胎儿主动脉平滑肌细胞的增殖有明显的抑制作用。本实验采用 Northern blot 的方法观察硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对胎儿主动脉平滑肌细胞的 *c-fos*, *c-myc* 原癌基因的表达的影响,发现前者能抑制后者的表达。因此硫酸乙酰肝素蛋白聚糖抑制平滑肌细胞增殖的途径之一可能为抑制原癌基因的表达。

**关键词** 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖; 平滑肌细胞; 原癌基因

硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (heparan sulfate proteoglycan, HSPG) 是血管壁的正常组分之一,具有多种生物学功能,且与动脉粥样硬化斑块的形成密切相关,而原癌基因的表达又是血管平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 增殖、迁移所必需。*c-fos* 和 *c-myc* 基因编码核蛋白<sup>[1]</sup>,其表达在细胞增殖中起重要作用。与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖糖链结构和功能类似的肝素对 SMC 的增殖有明显的抑制作用,有报道肝素抑制某些细胞 (平滑肌细胞、成纤维细胞、某些来源的内皮细胞等<sup>[2-6]</sup>) 的增殖。国内外关于肝素作用于培养的动物 SMC 的研究较多,而未见硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对培养的人胎儿主动脉平滑肌细胞 (human aortic SMC, hASMC) 的影响。我室发现硫酸乙酰肝素蛋白聚糖能抑制培养的胎儿主动脉平滑肌细胞生长 (细胞计数及 <sup>3</sup>H-TdR 的掺入均减少),本实验通过观察硫酸乙酰肝素蛋白聚糖对培养的胎儿主动脉平滑肌细胞的 *c-fos* 和 *c-myc* 原癌基因的影响,以初步探讨作用机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

DMEM 培养粉 (Gibco), 胎牛血清 (Sigma), 人血清 (天津血液研究所), 硝酸纤维素膜 (Amersham), PVP (Sigma), BSA (Sigma), Ficoll 400 (Pharmacia),  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (北京亚辉公司),  $\alpha$ -Gene 随机引物核酸标记试剂盒 (Promega), *c-fos*, *c-myc* 和  $\beta$ -actin 探针 (原平生物制品公司)。其它试剂均为北京化工厂 AR 级产品,水囊引产胎儿由本院妇产科得到。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 含硫酸乙酰肝素蛋白聚糖培养液的制备

聚蛋白聚糖水溶液以  $0.45 \mu\text{m}$  微孔膜过滤,测定过滤前  
后肝素浓度(HSPG 浓度以  $\text{mg/L}$  数表示)以计算过  
滤回收率。

1.2.2 胎儿主动脉平滑肌细胞的地培 采用常规  
贴法<sup>[8,9]</sup>。超净台内无菌条件剪取水囊引产胎儿(死  
后 6 h 内)主动脉,破坏内膜,剥离中膜,并去外膜,将  
中膜转移至一盛 1 ml 含 20% 血清 DMEM(人血清、胎  
牛血清各半)的青霉素小瓶中,剪碎中膜至约  $0.1 \text{ mm}^2$   
的小块,用滴管将组织尽量均匀地贴在  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶  
内并保持合适的密度,用含 20% 血清(人、牛血清各半)  
的 DMEM 培养液,置 95%  $\text{O}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、 $37^\circ\text{C}$  培养,每三天  
换液一次,细胞汇合传代后,传代细胞用含 10% 血清  
(人、牛血清各半)的 DMEM 液培养,实验采用第四代  
细胞。

1.2.3 总 RNA 的提取 第四代细胞传代 24~48 h  
后改用含 0.4% 血清(人、牛血清各半)的 DMEM 液培  
养 72 h,使细胞处于汇合状态。第四代细胞共六瓶( $75$   
 $\text{cm}^2$  瓶),分为三组,每组两瓶(约  $8 \times 10^8$  个细胞)。第一  
组为静止组(细胞被抑制在  $G_0/G_1$  期),以含 0.4% 血清  
的 DMEM 液换液,第二组为实验组,以含 10% 血清和  
硫酸乙酰肝素蛋白聚糖( $19.3 \mu\text{g}$  hexouric acid/ml)的  
DMEM 液换液,第三组为对照组,以含 10% 血清的  
DMEM 液换液。第一、第三组 DMEM 均以透析液配  
制,半小时(或 2 h)后提取总 RNA<sup>[10]</sup>,并贮于  $-20^\circ\text{C}$   
(1~2 天内用于下一步实验),或贮存于  $-70^\circ\text{C}$ 。

1.2.4 Northern blot<sup>[11]</sup>杂交 总 RNA 上样 20 或  
 $30 \mu\text{g}$ , 1% 琼脂糖甲醛变性电泳( $3.5 \text{ V/cm}$ , 约 3 h),  
凝胶以 DEPC 处理的水清洗后,  $20 \times \text{SSC}$  浸泡 45 min  
后,以毛细管法将 RNA 转移至硝酸纤维素膜,  $80^\circ\text{C}$   
固定 2 h 后,  $42^\circ\text{C}$  预杂交 ( $5 \times \text{SSPE}$ ,  $2 \times \text{Denhardt}$ ,  $0.1\%$   
 $\text{SDS}$ ,  $50\%$  甲酰胺,  $20 \text{ mg}$  鲑精 DNA/L) 1~2 h 后,并  
去预杂交液,加入杂交液 ( $5 \times \text{SSPE}$ ,  $2 \times \text{Denhardt}$ ,  $0.1\%$   
 $\text{SDS}$ ,  $50\%$  甲酰胺), 及  $50 \text{ ng}$  的随机引物法标记的  
探针(比活性大于  $10^6$  计数/分  $\mu\text{g}$ )。  $42^\circ\text{C}$  杂交 16~24  
h, 然后室温洗膜 20 min,  $65^\circ\text{C}$  洗膜 10 min, 放射自显影  
(Fuji X-光片, 附加增感屏,  $-20^\circ\text{C}$ ) 1~7 天。

平滑肌细胞增殖的途径之一(Figure 1)。

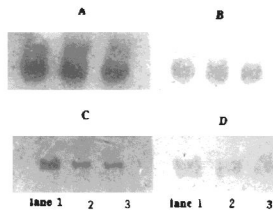


Figure 1. Photograph of Northern blot.

A: the result of *c-fos* gene expression. B: the result of *c-myc*  
gene expression. C & D: the results of  $\beta$ -actin gene expression  
as a control of loading. Lane 1: quiescent group. Lane 2: experi-  
ment group which was treated with HSPG plus 10% serum  
DMEM medium. Lane 3: control group which was treated with  
10% serum DMEM medium. In photograph A and B, that the  
signal of group 2 was a little stronger than that of group 1 and  
weaker than that of group 3 shows the expression of protooncogene  
was suppressed by HSPG. In photograph C and D, that the sig-  
nals of all the 3 lanes are almost equal shows that the amount of  
RNA was nearly equal.

### 3 讨论

经广泛研究发现,结构与硫酸乙酰肝素蛋白  
聚糖糖链类似的肝素,已被证实能抑制体内<sup>[12]</sup>  
及体外<sup>[2]</sup>培养的血管平滑肌细胞以及其它  
多种细胞的增殖<sup>[2-6]</sup>,但在培养的平滑肌细胞  
中,肝素是否抑制 *c-fos* 及 *c-myc* 基因的表达,  
却有不同结果。较早的实验,如 Reilly 等<sup>[3]</sup>  
在培养的细胞中观察到肝素不抑制 *c-fos* 和 *c-myc*  
的表达,而抑制 *l-f-1* 和 *c-myc* 的表达,认为肝素  
阻止细胞进入 S 期而抑制细胞的增殖;而  
Pukac 等<sup>[2]</sup>在培养的细胞中观察到肝素抑制 *c-*  
*fos* 和 *c-myc* 的表达,并以此为结论进行了更进

一步的研究。我们的实验结果与 Pukac 等的结论类似。亦即硫酸乙酰肝素蛋白聚糖抑制胎儿主动脉平滑肌细胞的增殖的途径之一为抑制其原癌基因的表达。

本实验所采用材料如硫酸乙酰肝素蛋白聚糖及胎儿主动脉平滑肌细胞均来自人体,因而所得的结论比动物实验更有说服力,但是肝素及硫酸乙酰肝素蛋白聚糖等生物大分子结构复杂,功能多样,即使同一种生物学功能也可能通过多种机制实现。生物体是复杂的整体,其生物学反应是复杂且相互关联的,外源因素与基因表达的作用也是非常复杂的,所以硫酸乙酰肝素蛋白聚糖抑制胎儿主动脉平滑肌细胞的增殖与原癌基因表达的关系的原理还需进一步研究。

参考文献

- 1 Bishop J Michael. Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann Rev Biochem*, 1983, **52**: 301~354.
- 2 Pukac Laurel A, Castellot John Jr, Wright Thomas C, et al. Heparin inhibits *c-fos* and *c-myc* mRNA expression in vascular smooth muscle cells. *Cell Regul*, 1990, **1**: 435~444.
- 3 Furth Mark E, Aldrich Thomas H, Cordon-cardo Carlos. Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene*, 1987, **1**: 46~58.
- 4 Giuseppe Torelli, Donatella Venturelli, Alesandro Colo, et al. *Cancer Res*, 1987, **47**: 5 266~269.
- 5 Monnat M, Tardy S, Saraga P, et al. Prognostic implication of expression of the cellular genes *Myc*, *Fos*, *HA-Ras* and *Ki-Ras* in colon Carcinoma. *Int J Cancer*, 1987, **40**: 393~399.
- 6 Alexander W Clowes, Morris J Karnowsky. Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. *Nature*, 1977, **265**: 626.
- 7 张英珊,丛祥凤,朱志敏,等. 人主动脉中的蛋白聚糖 I 提取、分离及初步鉴定. *生物化学与生物物理学学报*, 1987, **19**: 253~259.
- 8 Russell Ross, Thomas N Wight, Eugene Strandness, et al. Human atherosclerosis I cell constitution and characteristics of advanced lesions of the superficial femoral artery. *Am J Pathol*, 1984, **114**: 79~90.
- 9 陈国芬,宋毅,郭明,等. 人体主动脉平滑肌细胞贴块培养法. *中华心血管病杂志*, 1986, **14**: 361~362.
- 10 Sambrook P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156~159.
- 11 萨姆布鲁克等著,金冬雁等译.《分子克隆》实验指南,第二版,科学出版社,1993, 366~372.
- 12 Martial Hamon, Christophe Bauters, Nicolas Wernert, et al. Heparin does not inhibit oncogene induction in rabbit aorta following balloon denudation. *Cardiovas Res*, 1993, **27**: 1 209~213.
- 13 Christopher F Reilly, Mar S Kindy, Karen E Brown, et al. Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G<sub>1</sub> phase of the cell cycle. *J Biol Chem*, 1989, **264**: 6 990~995.

(1996-05-12-收到,1996-06-19 修回)

## 名词术语的汉英对照及缩写(Ⅱ)

补体受体淋巴细胞	complement receptor lymphocyte, CRL
初期硬化	presclerosis
环状硬化	annular sclerosis
环状血栓	annular thrombus
环氧化物	epoxide
环氧化酶	epoxygenase
环一磷酸腺苷	cyclic adenosine monophosphate, cAMP

胡必利编写