

莲心碱对血管平滑肌细胞增殖及热应激蛋白 70 和 P53 表达的影响

熊一力^① 王嘉陵^② 钱家庆^②

(同济医科大学 ①附属同济医院心内科, ②药理学教研室, 武汉 430030)

Effects of Liensinine on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Heat Stress Protein 70 and P53 Expression

XIONG Yi-Li, WANG Jia-Ling and QIAN Jia-Qing
(Department of Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT

Aim To determine the effects of Liensinine on endothelin-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and expression of heat stress protein (HSP70) and antioncogene P53.

Methods The experimental models of proliferation of cultured porcine aortic smooth muscle cells induced by endothelin were established, and ³H-thymidine (³H-TdR) incorporation, flow cytometry, Western blot and Northern blot analysis were used.

Results Liensinine may drop ³H-TdR incorporation induced by endothelin and hold-back VSMC from G₀/G₁ phase to DNA synthetic phase(S) and mitotic phase (G₂/M). Furthermore, Liensinine could reverse the enhanced expression of HSP70 and HSP70 mRNA and reduced expression of antioncogene P53 induced by endothelin.

Conclusions Liensinine may inhibit DNA synthesis and proliferation of VSMC, related to the mechanism of molecular biology of controlling HSP70 and P53.

KEY WORDS Liensinine; Endothelin; Vascular smooth muscle cell; Heat stress protein 70;

摘要 采用培养的内皮素所致血管平滑肌细胞增殖模型。用氚-胸腺嘧啶核苷掺入法、流式细胞术、Western blot 及 Northern blot 分析方法, 观察了莲心碱对血管平滑肌细胞增殖的作用及对热应激蛋白 70 及其 mRNA 和抑癌基因 P53 表达的影响。结果发现, 莲心碱能逆转内皮素所致的³H-TdR 掺入量增多, 阻止血管平滑肌细胞由 G₀/G₁ 期进入 DNA 合成期(S 期)和有丝分裂期(G₂/M 期), 并能使热应激蛋白 70 及 mRNA 表达减弱, P53 抑癌基因及 mRNA 表达增强。以上结果提示, 莲心碱能抑制血管平滑肌细胞增殖, 这可能与热应激蛋白 70 及 P53 的调控有关。

关键词 莲心碱; 内皮素; 血管平滑肌细胞; 热应激蛋白 70; P53

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的异常增殖是高血压, 冠心病的重要病理特征之一, 此病变尚受涉及 VSMC 增殖的癌基因调控。抑制 VSMC 增殖已成为防治高血压、冠心病的重要环节, 因而抑制 VSMC 增殖的药物急待开发^[1]。莲心碱是从中药莲子心中提取的有效成分, 已有研究证明了该药的降压作用及钙拮抗机制^[2,3]。但此作用是否与拮抗 VSMC 增殖相关, 有待证实。本实验建立了用内皮素引起的培养猪主动脉 SMC 增殖模型, 观察了莲心碱对 VSMC 增殖的影响, 同时探讨了莲心碱对热应激蛋白 70 (heat stress protein 70 kDa, HSP70) 及其 mRNA 和抑癌基因 P53 表达的影响。旨在证明莲心碱是否具有抑制 VSMC 增殖的作用, 该作用是否与 HSP70 及 P53 的调控有关, 并探讨其分子生物学作用机制。

1 材料与方法

1.1 血管平滑肌细胞培养及鉴定

取猪胸主动脉用贴块法进行 VSMC 培养^[4]。光镜、电镜下各组细胞形态相似,呈长梭状或带状,平行排列,部分重叠呈“峰与谷”特征,胞核卵圆形。

1.2 实验分组

采用生长稳定的 2~4 代 VSMC,共分三组:对照组:加 10% 胎牛血清 M199 培养液(购自 GILBCO 公司);内皮素组:加含 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 内皮素(购自北京医科大学心肺内分泌研究室)的对照组培养液;莲心碱组:加含 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 莲心碱(同济医科大学药理植物化学室提供,含量 > 98% MP97~98.5 $^{\circ}\text{C}$ ^[5])的内皮素组培养液。各组细胞在分组前实行同步处理。

1.3 氚标胸腺脱氧嘧啶核苷掺入量测定

将 VSMC 以细胞数 5×10^4 /孔接种于 96 孔培养板,12 孔/组,另设阳性及阴性对照。各组加上述不同试剂培养 24 h 后收集样本,每次收样前 6 h 加 ^3H -TdR (购自上海核技术开发公司)37 MBq/L。收样时加 NaOH 溶解细胞,在液体闪烁计数仪(瑞典 RACKBETA LKB1215)上行放射活性计数测定。

1.4 流式细胞仪分析

调各组 VSMC 浓度至 $6 \times 10^5/\text{L}$,换无血清培养液,同时各组加上述不同试剂,继续培养 24 h 后收样。细胞用 70% 酒精在 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 30 min,洗涤,碘化丙锭染色 15 min 后,用流式细胞仪(美国 BECTON DICKINSON FACS440)进行细胞周期分析,微机处理得出各期细胞数占细胞总数的百分值。

1.5 Western 印迹法检测热应激蛋白 70 表达

各组 VSMC 裂解收集,蛋白质电转移膜封闭。抗原反应按姜泊方法^[6]进行,一抗为兔抗人 HSP70(加拿大 Tanguay 教授惠赠),二抗用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(购自上海生物制品所)。显色程度用图像分析仪(TJTY-300 型)分析,以积分光密度表示 HSP70 含量。

1.6 Northern blot 分析^[7]

各组 VSMC 计数裂解后,收集裂解液,提取总 RNA。紫外分光光度计测总 RNA A260 nm 与 A280 nm 比值,均为 1.9~2.0。甲醛变性凝胶电泳转膜 24 h $\rightarrow$ 80 $^{\circ}\text{C}$ 烤尼龙膜 2 h $\rightarrow$ 预杂交 $\rightarrow$ 加 ^{32}P -dATP 标记的 cDNA 探针(HSP70 基因探针,美国 R. Morimoto 教授惠赠;野生型 P53 探针,购自中山生物技术公司)42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 24 h $\rightarrow$ 洗膜 $\rightarrow$ 70 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影。探针标记用随机引物法,操作步骤按药盒(Promega 公司)说明书进行。杂交结果用图像分析仪(日本岛津 CS-930 型)对杂交

条带激光扫描,以积分光密度表示 mRNA 表达量。

1.7 统计学处理

除细胞周期以百分值并以 χ^2 检验外,其它数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 氚标胸腺脱氧嘧啶核苷掺入量

测定结果见表 1(Table 1)。内皮素组比对照组明显增高($P < 0.01$),而莲心碱组显著低于内皮素组($P < 0.01$),近似于对照组($P < 0.05$)。

Table 1. Comparison of ^3H -TdR incorporation and cell cycle of vascular smooth muscle cells in three groups($\bar{x} \pm s$, $n=12$).

Groups	^3H -TdR incorporation (cpm)	Cell cycle(%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	499 $\pm$ 92	75	24	1
Endothelin	617 $\pm$ 98 ^b	49 ^b	38 ^a	13 ^b
Liensinine	510 $\pm$ 77 ^d	66 ^d	31	3 ^c

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with endothelin group.

2.2 各组细胞周期百分值

流式细胞仪检测细胞周期结果见表 1 (Table 1)。可见内皮素组 G₀/G₁ 期细胞百分值比对照组低 26% ($P < 0.01$),S 期细胞百分值高 14% ($P < 0.05$),G₂/M 期细胞百分值高 12% ($P < 0.01$),莲心碱组与对照组相似($P > 0.05$)。

2.3 热应激蛋白 70 抗原表达

从 Western 结果(表 2, Table 2)看,内皮素组 HSP70 抗原表达与对照组比较显著增强 ($P < 0.01$),加莲心碱后则逆转其表达,与对照组比较无显著性差异。

2.4 HSP70 和 P53 mRNA 表达

Northern blot 结果(表 2, Table 2)中内皮素组 HSP70 mRNA 表达显著增强,P53 mRNA 表达显著减弱(P 均 < 0.01),莲心碱组与对照组相近。

Table 2. Comparison of absorbance of HSP70, HSP70 mRNA and P53 mRNA expression of VSMC in three groups($\bar{x} \pm s$).

Groups	HSP70	HSP70mRNA	P53mRNA
Control	22.2 $\pm$ 11.2	120.9 $\pm$ 48.6	64.2 $\pm$ 13.2
Endothelin	35.3 $\pm$ 11.4 ^b	215.7 $\pm$ 41.8 ^b	57.4 $\pm$ 8.3 ^b
Liensinine	23.9 $\pm$ 10.7	128.1 $\pm$ 36.5 ^d	61.4 $\pm$ 11.8 ^c

b: $P < 0.01$, compared with control. c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, compared with ET.

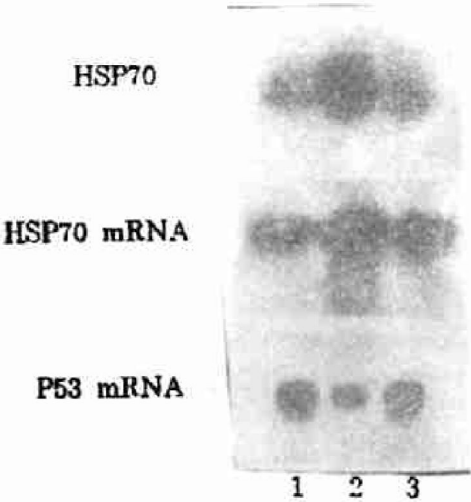


Figure. HSP70 (Western blot), HSP70 mRNA and P53 mRNA (Northern blot) expression of VSMC in three groups. 1. control, 2. endothelin, 3. liensinine.

3 讨论

高血压病 VSMC 增殖使血管腔增厚变窄, 外周阻力增高引起血压增高, 冠心病的动脉粥样硬化及成形术后再狭窄也以内皮损伤、血小板聚集、生长因子释放致 VSMC 增殖为基本病变, 因而抑制 VSMC 增殖的药物开发已成为国内防治高血压病和冠心病的研究热点^[1]。从睡莲科莲属植物果实中提取的莲心碱属于双苄基异奎啉类生物碱, 已发现具有降低血压、抗心律失常作用, 其作用机制与其阻滞细胞膜上钙离子通道等有关^[1,3]。这些作用对抑制 VSMC 增殖似有针对性, 所以我们探讨了莲心碱对 VSMC 增殖的作用, 并从涉及 VSMC 增殖的 HSP70 及抗癌基因 P53 着手, 探讨了莲心碱的作用机制。

我们采用内皮素建立 VSMC 增殖模型^[4]。

本结果中内皮素组¹ H-TdR 掺入量增高, 大量 G₀/G₁ 期 VSMC 进入 S 和 G₂/M 期以及 HSP70 及其基因表达增强, 野生型 P53 基因表达减弱均证实内皮素促进了 VSMC DNA 合成及细胞的增殖, 此作用与 HSP70 的产生增加及 P53 的调控相平行。在此基础上加用莲心碱后² H-TdR 掺入量明显低于内皮素组。VSMC 进入 S 期和 G₂/M 期的细胞数比内皮素组明显减少, 与对照组相近, 说明莲心碱具有抑制内皮素促 VSMC DNA 合成作用对内皮素刺激下的 VSMC 增殖有明显的抑制作用。从 Western 及 Northern blot 结果看, 在同样内皮素处理过的 VSMC 中加莲心碱后, 内皮素诱导的 HSP70 及其 mRNA 表达均有减弱, 而野生型 P53 mRNA 表达却有增强。可见莲心碱对内皮素促 VSMC 增殖的抑制, 涉及到 HSP 及 P53。HSP 是一组在进化上高度保守的蛋白质, 各种应激条件可诱发机体产生大量的 HSP 来抵御外来的有害作用。近年来 HSP 在细胞信息传递、生长、分化中的调控作用及参与蛋白质折叠、装配、降解、转移、修复中的分子伴侣 (molecular chaperones) 作用, 也日渐受到关注^[5]。P53 是参与控制有丝分裂和细胞增殖的抑癌基因。HSP70 基因启动子与野生型 P53 基因重组后转染细胞可降低 HSP70 的转录激活作用。HSP70 基因启动子与野生型 P53 基因重组后转染细胞可降低 HSP70 的转录激活作用, 抑制细胞增殖。本实验中用内皮素后 HSP70 增加可能是对应激因素的反应。用莲心碱后 HSP70 及野生型 P53 表达的改变可能与药物直接或间接作用于两者有关, 也可能药物仅使野生型 P53 增加, 后者与 HSP70 相互作用使 HSP 减少, 从而抑制

VSMC 增殖。内皮素作用于 VSMC, 通过一系列受体介导激活第二信使系统引起 Ca^{2+} 内流, 胞液游离钙浓度增高, 酶活化, 可使 HSP70 表达增强, 基因异常表达引起 VSMC 增殖^[10]。故推测莲心碱对 HSP, P53 表达的影响, 可能与已证实的莲心碱钙拮抗作用有关。当然, 莲心碱的作用点在第二信使系统以前, 甚至直接调控某些癌基因转录环节还不能否定。

综上所述, 莲心碱有抑制内皮素促 VSMC 增殖的作用, 其抑制 VSMC 增殖的作用与 HSP70 减少, 野生型 P53 表达增高相关。但药物对两者的确切作用点, 两者的相互调控以及是否与钙拮抗等机制直接相关, 还有待于进一步研究证实。

参考文献

- 1 Yili Xiong, Huayue Zao. Effect of Captopril on the proliferation of aortic smooth muscle cells in vitro. *Acta Pharmacol Sinica*, 1996, 17(4): 353~356.
- 2 陈维州, 凌秀珍, 丁光生. 莲心碱及两种季铵盐的降压作用. *药学学报*, 1962, 9(5): 277~280.
- 3 王嘉陵, 农艺, 江明性. 莲心碱对心肌慢反应动作电位及慢内向电流的影响. *药学学报*, 1993, 28(11): 812~815.
- 4 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): 214~216.
- 5 王嘉陵, 胡学民, 尹武华. 莲子心中生物碱成分的研究. *中国中药杂志*, 1991, 16(11): 673~676.
- 6 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 1996, 92~96.
- 7 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. In: *Molecular cloning, A laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989, 343~392.
- 8 Neuser D, Stasch JP, Knorr A, et al. Inhibition by atrial natriuretic peptide of endothelin-1-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993, 22(Suppl 8): S257~261.
- 9 Currie RW, Tanguay RW, Kingma JR. Heat shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation*, 1993, 87(3): 963~971.
- 10 Nicholas A, Jeannie H, Daniel HL. Regulation of human HSP70 promoter by P53. *Science*, 1993, 259(1): 64~67.

(1996-12-17 收到, 1997-03-09 修回)