

• 论著 •

API0134 对血管平滑肌细胞增殖和血小板源生长因子 B 链、碱性纤维母细胞生长因子及相关癌基因表达的影响

熊一力 王宏伟 赵华月

(同济医科大学同济医院心内科, 武汉 430030)

Effects of API0134 on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and Expression of Platelet Derived Growth Factor-B Chain, Basic Fibroblast Growth Factor, *c-sis* and *c-myc*

XIONG Yi-Li, WANG Hong-Wei and ZHAO Hua-Yue

(Department of Medicine, Tongji Hospital, Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

ABSTRACT

Aim To determine the effects of API0134 on endothelin (ET)-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and expression of growth factor, such as platelet derived growth factor (PDGF-B) and basic fibroblast growth factor (bFGF), and oncogene *c-sis* and *c-myc*.

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

Results API0134 may drop ^3H -TdR data increased by ET and hold-back VSMC from static phase (G_0/G_1) to DNA synthetic phase (S) and mitotic phase (G_2/M). Furthermore, API0134 could reverse the enhanced expression of antigen PDGF-B, bFGF and reduced expression of oncogene *c-sis* and *c-myc* induced by ET.

Conclusion API0134 might inhibit DNA synthesis and proliferation of VSMC, related to the mechanism of molecular biology of controlling growth factors and oncogene.

KEY WORDS API0134; Endothelin; Vascular smooth muscle cells; Growth factor; Oncogene.

摘要 为探讨 API0134 防治冠状动脉粥样硬化和腔内成形术后再狭窄的作用机制, 采用内皮素诱导建立培养的血管平滑肌细胞增殖模型, 用氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法、流式细胞术、免疫细胞化学检测及 Northern blot 方法, 观察了 API0134 对血管平滑肌细胞增殖的作用及对血小板源生长因子 B 链、碱性纤维母细胞生长因子及其相关癌基因 *c-sis* 和 *c-myc* 表达的影响。结果发现, API0134 能逆转内皮素所致的氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量增多 (对照组为 499 ± 92 , 内皮素组为 617 ± 98 , API0134 组为 506 ± 102), 阻止血管平滑肌细胞由静止期 (G_0/G_1 期; 对照组为 72%, 内皮素组为 50%, API0134 组为 60%) 进入 DNA 合成期 (S 期; 三组分别为 26%、36% 和 30%) 和有丝分裂期 (G_2/M 期, 三组分别为 2%、14% 和 4%), 并能逆转内皮素引起的血小板源生长因子 B 链、碱性纤维母细胞生长因子抗原、*c-sis* 和 *c-myc* 的 mRNA 表达增强。提示 API0134 有抑制血管平滑肌细胞增殖的作用, 这种作用与生长因子及癌基因调控的分子生物学机制有关。

关键词 API0134; 内皮素; 血管平滑肌细胞; 生长因子; 癌基因

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的异常增殖和迁移是高血压病、动脉粥样硬化性血管病变和经皮腔内血管成形术后再狭窄的主要病理特征。许多生长因子参与此过程, 这些生长因子又是相关癌基因激

活调控的产物。抑制 VSMC 增殖已成为防治高血压病、冠心病和腔内血管成形术后再狭窄的重要环节,因而抑制 VSMC 增殖的药物急待开发^[1]。API0134 是从中药穿心莲(*Andrographis paniculata*, AP)提取的有效成分,具有抗血小板聚集和促纤溶作用。近年发现它还能抑制纤维母细胞 DNA 合成,减少单核巨噬细胞分泌生长因子,防治冠状动脉腔内成形术后再狭窄^[2,3]。这些作用对抑制 VSMC 增殖似有针对性,所以本实验用内皮素(endothelin)诱导建立培养猪主动脉平滑肌细胞增殖模型,来观察 API0134 是否能抑制 VSMC 增殖,并从涉及 VSMC 增殖的血小板源生长因子 B 链(platelet derived growth factor-B chain, PDGF-B)、碱性纤维母细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及其相关癌基因 *c-sis* 和 *c-myc* 着手,探讨 API0134 的作用机理。

1 材料与方法

1.1 细胞培养及鉴定

取猪胸主动脉用贴块法进行 VSMC 培养,于光镜、电镜下行细胞鉴定^[4]。

1.2 实验分组

采用生长稳定的 2~4 代 VSMC,共分三组:对照组加含 10% 胎牛血清的 M199 培养液(购自 Gibco 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;API0134 组加含 0.5 $\mu\text{mol/L}$ API0134(同济医院药剂科植物化学室提供)的内皮素组培养液。

1.3 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量测定

将 VSMC 以细胞数 5×10^4 /孔接种于 96 孔培养板(12 孔/组)。各组加不同试剂,继续培养 24 h 后收集样本,收样前 6 h 加氚标胸腺嘧啶脱氧核苷(^3H -thymine deoxyribonucleotide, ^3H -TdR;购自上海核技术开发公司, Bq/mol) 37 kBq/孔 ,在液体闪烁计数器(美国 IS 3801 型)上行放射活性计数测定。

1.4 流式细胞仪分析细胞周期

调各组 VSMC 浓度至 0.6×10^5 个/L,各组加不同试剂,继续培养 24 h 后收样。细胞固定、洗涤、碘化丙锭染色后,用流式细胞仪(FACS440 型)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 免疫细胞化学检测

将 10^5 个/L VSMC 接种于装有小盖玻片培养瓶,培养 48 h 后各组加不同试剂,继续培养 24 h,洗涤、固定后,取出盖玻片,吹干,粘于载玻片上,用酶标链霉亲和素—生物素(LSAB)法^[5]检测。培养片用冷丙酮固定 10 min 后,加 2% 牛血清白蛋白作用 15 min,再分别加 bFGF(购自中山生物技术公司)及 PDGF-B 单克隆抗体(日本 Mochida 制药有限公司惠赠, 1:50),4℃ 湿盒过夜。次日加 Biotin 标记的羊抗鼠 IgG(1:100)置于 37℃ 湿盒内 30 min 后,加酶标链霉亲和素蛋白(1:400)湿盒内 30 min 时用 DAB H_2O_2 显色,最后脱水、透明、封片。每组阴性对照一抗用 PBS 替代,阳性对照用已知阳性切片。阳性判断标准:以细胞浆呈棕黄色为阳性。利用计算机图象系统(TJTY-300 型)分析,随机选 30 个细胞,以细胞阳性染色的积分光密度表示各相关抗原表达量。

1.6 细胞总 RNA 提取及 Northern blot 杂交

制备 10^6 个/L 悬液,加各组试剂 24 h 中止反应后收集细胞。每组加 2.5 ml 裂解液(含异硫氰酸胍、十二烷基肌氨酸钠、柠檬酸钠和 β -巯基乙醇)置冰上 5 min 行细胞裂解两次,收集裂解液,用异硫氰酸胍—酚—氯仿法提取总 RNA。用紫外分光光度计测总 RNA A260 nm 与 A280 nm 值,判定纯度及浓度。Northern blot 杂交按 Sambrook 方法^[6]进行。甲醛变性凝胶电泳转膜 24 h \rightarrow 80℃ 烤尼龙膜 2 h \rightarrow 预杂交 \rightarrow 加 ^{32}P -dATP 标记的 cDNA 探针(*c-sis* 和 *c-myc* 探针,购自中山生物技术公司)42℃ 杂交 24 h \rightarrow 洗膜 \rightarrow 70℃ 放射自显影。每组实验重复三次,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。杂交结果以杂交条带的大小及深浅判定 mRNA 的表达水平。

1.7 统计学处理

除细胞周期以百分值表示外,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 ^3H -胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量

内皮素组比对照组 ^3H -TdR 掺入量明显增高(617 ± 98 比 499 ± 92 , $P < 0.01$),而 API0134 组 506 ± 102 显著低于内皮素组($P < 0.01$),近似于对照组,见表 1(Table 1)。

2.2 细胞周期百分值

从表 1(Table 1)可见,流式细胞仪检测结果为内皮素组 G_0/G_1 期细胞百分值比对照组低(50%比 72%, $P < 0.01$), S 期细胞百分值高(36%比 26%, $P < 0.05$), G_2/M 期细胞百分值是对照组的 7 倍(14%比 2%, $P < 0.01$), API0134 组(分别为 66%、30%和 4%)与对照组接近。

2.3 血小板源生长因子和碱性纤维母细胞生长因子抗原表达

免疫细胞化学实验结果见表 2(Table 2)。与对照组相比较,内皮素组 PDGF-B 和 bFGF 抗原表达显著增强($P < 0.01$),加 API0134 后则逆转所有抗原表达,与对照组无差异。

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

Groups	cpm	Cell cycle (%)		
		G_0/G_1	S	G_2/M
Control	499 \pm 92	72	26	2
ET	617 \pm 98 ^b	50 ^b	36 ^a	14 ^b
API0134	506 \pm 102 ^d	65 ^d	30	4 ^c

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

Table 2. Comparison of absorbance of antigen expression of PDGF-B, bFGF in three groups ($\bar{x} \pm s$).

Groups	PDGF-B	bFGF
Control	35.4 \pm 16.0	24.3 \pm 11.5
ET	58.1 \pm 14.6 ^b	36.2 \pm 10.1 ^b
API0134	38.3 \pm 10.7 ^d	29.2 \pm 14.2 ^c

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

2.4 *c-sis* 和 *c-myc* mRNA 表达

Northern blot 杂交结果(见附图, Figure)中内皮素组 *c-sis*, *c-myc* mRNA 表达比对照组显著增强, API0134 组与对照组相比较无明显

差异。

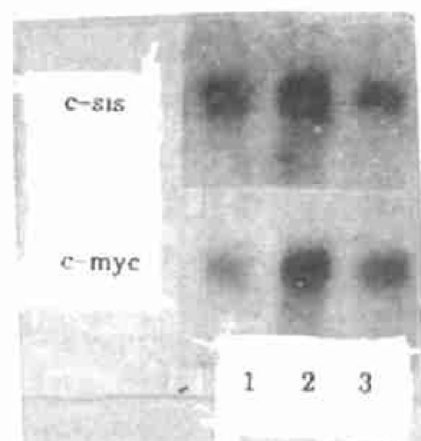


Figure. *c-sis* and *c-myc* mRNA expression of VSMC in three groups (Northern blot). 1: control. 2: ET. 3: API0134.

3 讨论

我们采用已证实能促进细胞增殖的内皮素建立 VSMC 增殖模型^[7]。本结果中内皮素组 3H -TdR 掺入量增高,大量 G_0/G_1 期 VSMC 进入 S 期和 G_2/M 期以及 PDGF-B、bFGF 蛋白及 *c-sis*、*c-myc* 基因表达增强,证实了内皮素促进 VSMC DNA 合成及细胞的增殖。且此作用涉及到生长因子与癌基因对细胞增殖的调控网络。在此基础上加用 API0134 后 3H -TdR 掺入量明显低于内皮素组, VSMC 进入 S 期和 G_2/M 期细胞数比内皮素组明显减少,与对照组相近。说明 API0134 有抑制内皮素促 VSMC DNA 合成作用,对内皮素刺激下的 VSMC 增殖有抑制作用。从免疫细胞化学及 Northern blot 结果看,在蛋白翻译水平 API0134 可抑制内皮素诱导的 PDGF-B、bFGF 阳性表达;在 mRNA 转录水平, API0134 则能抑制 *c-sis* 及 *c-myc* mRNA 阳性表达。可见 API0134 对内皮素促 VSMC 增殖的抑制,可能与其抑制上述生长因子基因的表达有关。本研究结果与本室新近得出的另一项实验结果一致^[8]。SMC 增殖和表型转化取决于多种生长因子的作用。PDGF 是很强的致丝裂原和致趋化因子, VSMC 是它的主要靶细胞。PDGF 由 A、B 链构成,其中 B 链是同源癌基因 *c-sis* 的编码产物。bFGF 能促进 VSMC 增殖,也参与癌基因表达的调控,可

激活 *c-myc* 的表达, PDGF 也可诱导 *c-myc* 的表达。*c-myc* 是重要的核蛋白调控基因, *c-sis* 又可激活 *c-myc* 等癌基因而促细胞增殖^[9]。已知内皮素作用于 VSMC 受体后可直接通过 G 蛋白偶联、受体介导或活化 PDGF、bFGF 等生长因子激活第二信使系统, 诱导 *c-sis*、*c-myc* 等癌基因表达, 引起 VSMC 增殖。故推测 API0134 的上述作用, 可能与抑制细胞 DNA 合成(或基因转录)及抑制生长因子分泌作用相关。

综上所述, API0134 有抑制内皮素促 VSMC 增殖的作用。API0134 抑制 *c-sis*/PDGF-B 及 bFGF/*c-myc* 表达的作用可能是其抗 VSMC 增殖的分子机理之一。但其确切作用点还有待于进一步研究证实。

参考文献

- Bohr DF, Dominiczak AF, Webb RC. Pathophysiology of vasculature in hypertension. *Hypertension*, 1991, 18 (Suppl 1): 169~75.
- Zhao Huayue, Fang Weiyi. Antithrombotic effects of andrographis paniculata nees in preventing myocardial infarction. *Chin Med J*, 1990, 104 (2): 770~775.
- Wang Daowen, Zhao Huayue. Prevention of atherosclerotic arterial stenosis and restenosis after angioplasty with andrographis paniculata Nees and fish oil. *Chin Med J*, 1994, 107 (6): 464~466.
- 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.
- 刘绍春, 吴人亮(主编). 免疫组织化学. 第三版, 武汉: 同济医科大学出版社, 1993; 30~31.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; 343~392.
- 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.
- Wang Hongwei, Zhao Huayue. OxLDL induce cytotoxicity and its inhibition by API0134 in cultured porcine aortic endothelial cells. *Tongji Med Uni J*, 1996, 16 (4): 198~199.
- Dubey RK, Overberbeck HW. Culture of rat mesenteric arteriolar smooth muscle cells; effects of platelet-derived growth factor, angiotensin and nitric oxide on growth. *Cell Tissue Res*, 1994, 275 (2): 133~147.

(1997-01-17 收到, 1997-05-24 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(I)

二甲基亚砜	dimethyl sulfoxide, DMSO
二甲基亚硝酸胺	dimethyl nitrosamine, DMNA
二甲基乙醇胺	dimethylethanolamine, DMEA
二甲蓝	dimethylane
二氢硫辛酸脱氢酶	dihydrolipoic acid dehydrogenase, DAD
二巯基丙醇磺酸钠	sodium dimercaptopropane sulfonate, SDS
二巯基丁二酸钠	sodium dimercaptosuccinate, DMS
二软脂酰卵磷脂	dipalmityl lecithin, DPL
二软脂酰卵磷脂	dipalmityl phosphatidylcholine
三甲黄嘌呤	trimethylxanthine, TMX, caffeine
三磷酸胞苷	cytidine triphosphate, CTP
三磷酸鸟苷	guanosine triphosphate, GTP
三磷酸腺苷	uridine triphosphate, UTP
三磷酸胸苷	adenosine triphosphate, ATP