

亮氨酸脑啡肽抑制血管平滑肌细胞增殖和 *c-fos* 基因表达

李 莹 王 睿 林树新

(第四军医大学病理生理学教研室, 西安 710032)

Inhibitory Effects of Leucine-Enkephalin on the Proliferation and *c-fos* Proto-oncogene and Expression of Vascular Smooth Muscle Cell

LI Ying, WANG Rui and LIN Shu-Xin

(Department of Pathophysiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the effects of leucine-enkephalin(L-ENK) on the proliferation, the DNA synthesis and *c-fos* oncogene expression of vascular smooth muscle cell (VSMC).

Methods Techniques of cell culture, MTT method, ^3H -thymidine incorporation and Dot blot.

Results L-ENK (10^{-5} mol/L) could markedly inhibit the proliferation, DNA synthesis and *c-fos* oncogene expression of VSMC. Naloxone (10^{-6} mol/L), opioid receptor antagonist, had no effect on the proliferation, DNA synthesis and *c-fos* oncogene expression of VSMC, but, naloxone could antagonized the inhibitory action of L-ENK to the proliferation of VSMC. The inhibitory action of L-ENK to the VSMC could be antagonized by the noradrenaline (10^{-5} mol/L), adrenoceptor activator.

Conclusion L-ENK inhibit the proliferation, DNA synthesis and *c-fos* oncogene expression of VSMC by activation of opioid receptors.

KEY WORDS Leucine-enkephaline; Noradrenaline; Naloxone; Vascular smooth muscle cell; Proto-oncogene; *c-fos*

运动的局部调节机制,用 MTT 法、氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法和斑点杂交技术发现亮氨酸脑啡肽可抑制 SD 大鼠胸主动脉平滑肌细胞的增殖、DNA 合成和 *c-fos* 基因的表达;阿片受体阻断剂纳洛酮无上述抑制作用,但可拮抗亮氨酸脑啡肽的上述抑制作用;上述作用还可被去甲肾上腺素所拮抗。结果提示,脑啡肽通过影响血管平滑肌细胞功能来参与血管运动的局部调节,这种调节可能是通过阿片受体介导的。

关键词 亮氨酸脑啡肽; 去甲肾上腺素; 纳洛酮; 血管平滑肌细胞; 原癌基因; *c-fos*

许多资料已证实血管壁上有脑啡肽能神经纤维分布,并证明脑啡肽(enkephaline, ENK)与去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)共存于动脉壁上的交感神经末梢中。神经末梢释放出的脑啡肽作用于突触前膜上的阿片受体,从而与去甲肾上腺素一起参与生理及病理状态下血管运动的局部调节^[1~3]。血管壁结构与功能的异常与多种血管疾病密切相关,而血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖、迁移是其基本的病理特征。本实验研究了亮氨酸脑啡肽、纳洛酮(naloxone)和 NA 对 VSMC 的增殖、DNA 合成和 *c-fos* 原癌基因表达的影响,并初步探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

亮氨酸脑啡肽(leucine-enkephalin, L-ENK)、纳洛酮和 NA 均为美国 Sigma 公司产品,氘标胸腺嘧啶脱氧核苷(^3H -thymine deoxyriboside, ^3H -TdR;中国科学院上海原子能研究所,摩尔活度为 851 TBq/mol),MTT(四唑盐,华美生物工程公司), α - ^{32}P dATP(北京亚辉生物技术工程公司,体积活度为 370 GBq/L),*c*-

摘要 为探讨脑啡肽与去甲肾上腺素一起参与血管

fos 基因探针(华美生物试剂公司),随机引物(Random Primer 由本校生物技术中心惠赠)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取 150~200 g 8~12 周龄的 Sprague dawley (SD) 大鼠腹腔麻醉后,无菌取出胸主动脉段,按 Chamley Campbell 方法^[5]培养 VSMC。实验用第 3~10 代传代细胞。

1.2.2 实验分组 按加入试剂的不同将实验分为七组:①对照组;②L-ENK 组,加入 L-ENK;③纳洛酮组,加入纳洛酮;④NA 组,加入去甲肾上腺素;⑤L-ENK+纳洛酮组,先加入纳洛酮,10 min 后加入 L-ENK;⑥L-ENK+NA 组,先加入 L-ENK,10 min 后加入 NA;⑦L-ENK+NA+纳洛酮组,加入纳洛酮后,每间隔 10 min 依次加入 L-ENK 和 NA。各试剂浓度分别为 L-ENK 10^{-5} mol/L, NA 10^{-5} mol/L, 纳洛酮 10^{-6} mol/L。

1.2.3 MTT 比色试验 将细胞悬液移入 96 孔板 (5×10^3 个/孔),培养 24 h 后,换成含 5% 小牛血清的 DMEM 培养液,同时各组加入不同试剂继续培养,每 24 h 更换新的试剂,培养 44 h 后,每孔加入 MTT (5 g/L) 溶液 20 μ l, 37°C 继续孵育 4 h,终止培养。吸弃孔内培养液,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜,振荡 10 min,在酶联免疫检测仪上测定各孔的光吸收值 (490 nm),实验结果以光密度值的增殖率(实验组光密度值除以对照组光密度值)表示。

1.2.4 ^3H -TdR 掺入实验 将细胞悬液移入 96 孔板 (5×10^3 个/孔),培养 24 h 后,换成 5% 小牛血清 DMEM 培养液,同时各组加入不同试剂继续培养,42 h 后加入 ^3H -TdR (0.5 μCi /孔),6 h 后收集细胞,测定放射性强度。实验结果以每分钟计数(count per minute, cpm)的掺入率(实验组 cpm 除以对照组 cpm)表示。

1.2.5 *c-fos* 斑点杂交 调制 10^5 细胞/L 悬液,加入 100 ml 培养瓶中 (2 ml/瓶),培养 24 h 后换用 5% 小牛血清 DMEM 培养液,继续培养 24 h 后弃培养液,各组加入不同试剂 2 ml,培养 30 min 后收集细胞,按 Gough 方法^[6]提取总 RNA,260 nm 紫外吸光度测得样品中的总 RNA 含量约为 80 μg 。用随机引物法制备 α - ^{32}P -dATP 探针^[7]。取各样品 20 μg 点样于尼龙膜上,80°C 真空负压烘烤 30 min,65°C 水浴预杂交 2 h。倾出预杂交液,加入含 *c-fos* 基因探针的杂交液,65°C 水浴过夜,杂交后的尼龙膜经漂洗后在 -20°C 放射自显影 2 周。用图像分析仪扫描每一杂交斑点,其杂交信号强度以每一斑点面积透光度值 (IOD) 表示。

1.3 统计分析

实验数据均以均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,实验组与对照组之间的差异显著性用 *t* 检验。

2 结果

2.1 对细胞增殖和 DNA 合成的影响

从图 1 (Figure 1) 可见, L-ENK 组血管平滑肌细胞增殖率和 ^3H -TdR 掺入率与对照组相比显著降低 ($P < 0.05$), 而纳洛酮组与对照组比较无显著差异 ($P > 0.05$), NA 组与对照组比较显著增高 ($P < 0.01$)。

我们将不同试剂两两或全部加入培养液中培养后发现, L-ENK+纳洛酮组细胞增殖率与 ^3H -TdR 掺入率较对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 较 L-ENK 组显著升高 ($P < 0.05$)。L-ENK+NA 组较对照组无显著差异 ($P > 0.05$), 较 L-ENK 组显著升高 ($P < 0.05$)。而 L-ENK+NA 组较 L-ENK 组、对照组和纳洛酮组均显著升高 ($P < 0.01$), 较 NA 组无显著差异 ($P > 0.05$)。

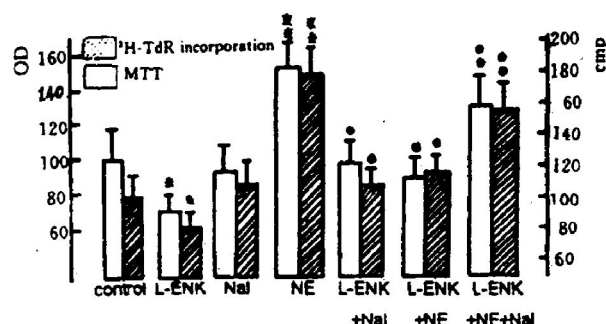


Figure 1. Effects of L-ENK on the proliferation and DNA synthesis of VSMC incubated with NA and naloxone. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with control group, • $P < 0.05$, •• $P < 0.01$, compared with L-ENK group, ($n=9$, $\bar{x} \pm s$).

2.2 对 *c-fos* 基因表达的影响

如附表 (Table) 所示, L-ENK 组的斑点暗度及 IOD 值较对照组低, NA 组的斑点暗度及 IOD 值较对照组高, L-ENK 与纳洛酮共同加入培养液时,其杂交斑点暗度及 IOD 值接近对照组, L-ENK 与 NA 共同加入培养液时,其杂交斑点 IOD 值也接近对照组。而当 L-ENK、纳洛

酮和 NA 三者合并加入细胞培养液时,其杂交斑点暗度及 IOD 值较对照组高,与单独 NA 组接近。此结果提示,纳洛酮拮抗了 L-ENK 对

VSMC 增殖的抑制效应,此时仅存有 NA 的促增殖效应(图 2, Figure 2)。

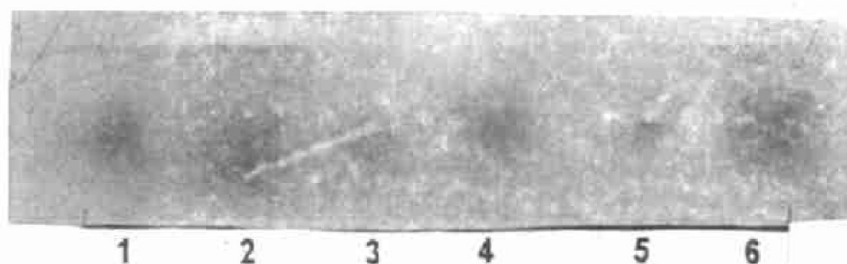


Figure 2. Effect of L-ENK, naloxone and NA on the *c-fos* expression of VSMC. 1. control, 2. NA, 3. L-ENK + NA, 4. L-ENK + naloxone, 5. L-ENK, 6. L-ENK + naloxone + NA.

Table. Effect of L-ENK, naloxone (Nal) and NA on the *c-fos* oncogene expression of VSMC ($\bar{x} \pm s$).

Groups	IOD(%)
control	100 ± 17
L-ENK	81.9 ± 18.8 ^a
NA	404 ± 46 ^a
L-ENK + NA	96.3 ± 1.8 ^d
L-ENK + Nal	115 ± 34 ^d
L-ENK + Nal + NA	394 ± 52 ^a

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

c: $P < 0.01$, d: $P < 0.05$, compared with L-ENK group.

3 讨论

血管活性物质通过短期效应调节血管张力,影响血管的收缩与舒张,通过长期效应作用于血管壁结构,参与血管壁结构的改变^[4]。实验研究发现,能够引起血管平滑肌细胞收缩的活性物质可促进 VSMC 增殖,如 NA、内皮素和血管紧张素-I 等^[8-10];而能够引起 VSMC 舒张的物质均可抑制其增殖,如降钙素基因相关肽和心房钠尿肽等^[11,12]。血管壁结构与功能的异常与多种血管疾病密切相关,而 VSMC 的增殖、迁移是其基本的病理特征。因此,研究 VSMC 增殖的调控机制对于研究血管疾病的发病机理及治疗具有重要的意义。许多资料已证实,L-ENK 广泛分布于多种动脉壁内,并证明 ENK 与 NA 共存于动脉壁上的交感神经末梢

中,对动脉收缩具有抑制作用,参与生理及病理状态下血管运动的局部调节^[1-3]。那么 ENK 是否也和 NA 及其它血管活性多肽一样参与 VSMC 增殖的调控及血管构形的重塑,这些问题国内外尚未见报道。

很少有基因能比 *c-fos* 基因更能显示出它在调节细胞活性方面的重要性。一系列的实验证明 *c-fos* 基因起着一种信号传导作用,*c-fos* 基因表达产物 Fos 与 Jun 通过亮氨酸拉链的形式形成 Fos/Jun 二聚体,即具有较高活性的 AP-1。AP-1 一方面通过顺式作用激活下游与细胞生长、分化及信号传导有关的基因,另一方面,以二聚体中的 Jun 作为桥梁与 TRE 结合,形成自身的正反馈调节^[13,14]。因此,*c-fos* 可能是一种核内“第三信使”分子,起着将细胞膜上传来的短效的细胞生长信息转化为细胞表型上的长效信息的作用。*c-fos* 表达的增强与减弱,是细胞生长、增殖过程在基因水平的标志^[15,16]。

在本次实验中,我们发现 L-ENK 可抑制 VSMC 的增殖、DNA 合成及 *c-fos* 原癌基因的表达,阿片受体阻断剂纳洛酮对 VSMC 的增殖无影响。但是,两者共同孵育时与单用 L-ENK 组相比,其细胞增殖率、³H-TdR 掺入率及 *c-fos* 基因表达均显著性增加,而与对照组相比无显著性差异。说明纳洛酮可拮抗 L-ENK 对 VSMC 增殖的抑制作用。提示 L-ENK 的这种作用是通过细胞上的阿片受体介导的。

实验结果发现 NA 可刺激 VSMC 的增殖、DNA 合成及 *c-fos* 基因的表达。但是 L-ENK 与 NA 共同孵育 VSMC 时发现它们各自的促增殖及抑制效应皆消失,而表现为无影响作用。我们又将 L-ENK、纳洛酮和 NA 三者共同加入 VSMC 培养液中,发现其细胞增殖率、³H-TdR 掺入率及 *c-fos* 基因表达皆升高,表现为促增殖效应,其值接近单用 NA 时的结果,与单用 NA 相比无显著性差异,与对照组相比有显著性差异。说明纳洛酮拮抗了 L-ENK 的抑制作用,此时仅表现为 NA 的促增殖效应。

文献[9]报道, α_1 肾上腺素受体激动剂可刺激主动脉中层平滑肌细胞 *c-fos* mRNA 的表达,该作用可被蛋白激酶 C 抑制剂 H-7 及钙通道阻滞剂 nifedipine 部分阻断,提示,其促表达作用是通过增加细胞内钙离子的浓度及激活蛋白激酶 C 的作用实现的。文献报道,阿片类物质与阿片受体结合后激活细胞膜上 GTP 结合蛋白,使细胞内 cAMP 水平下降。现在已经证实, cAMP 激活蛋白激酶促进胞浆蛋白磷酸化的同时,可诱发胞浆内 Ca^{2+} 浓度的改变,即 Ca^{2+} 由膜外进入或由细胞内贮存库释放,再使一些依赖 Ca^{2+} 的蛋白酶激活,促进磷酸化反应,影响癌基因的表达^[17]。

上述结果提示, L-ENK 可抑制 VSMC 的增殖、DNA 合成及 *c-fos* 基因表达,其抑制作用是通过细胞膜上的阿片受体介导的。其抑制效应可能与 cAMP 水平降低、 Ca^{2+} 浓度下降、*c-fos* 表达改变有关。L-ENK 的抑制作用与 NA 的促增殖作用可能存在有内在的制约性,它们与体内血管活性多肽等物质共同调控 VSMC 的增殖及血管构型的重塑,在生理状态下维持 VSMC 的正常结构,在应激状态下导致血管病理结构的改变。因此,进一步探讨 L-ENK 等阿片类物质对 VSMC 增殖的调控机制具有深远的意义。

参考文献

1 林树新, 范瑾之, 王复周. 动脉壁脑啡肽的含量、存在部

位及作用途径. 生理学报, 1989, 41(3): 241~248.

- 2 Lilles P, Ramme D, Starke K. Inhibition of neuroeffector transmission in the rabbit mesenteric artery by enkephaline. *Eur J Pharmacol*, 1982, 107(3): 397~398.
- 3 杨帆, 林树新, 袁祥鹏, 等. 失血性大鼠动脉壁内啡肽含量的变化. 中国病理生理杂志, 1994, 10(增刊): 705~709.
- 4 Dzau VJ, Gibbons GH, Morishita R. New perspectives in hypertension research potentials of vascular biology. *Hypertension*, 1994, 23(2): 1 132~140.
- 5 Chamley CJ, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev*, 1979, 59: 1~61.
- 6 Gough NM. Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells. *Anal Biochem*, 1988, 173: 93~95.
- 7 卢圣东. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993: 167~169.
- 8 Kuriyana S, Nakamura K. The effects of vasoactive agents on the proliferation of vascular smooth muscle cells grown in vitro. *J Hypertens*, 1988, 6(Sup 4): S154~S156.
- 9 Okazaki M, Hu ZW, Fujenaga M. α_1 -adrenergic receptor induced *c-fos* gene expression in rat aorta and cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1994, 94: 210~218.
- 10 Hahn AWA, Resink TJ, Mackie. Effects of peptide vasoconstrictors on vessel structure. *Am J Med*, 1993, 94(Sup 4A): 13S~19S.
- 11 吴建明, 牛大地, 程彤. 降钙素基因相关肽抑制大鼠主动脉平滑肌细胞增殖. 基础医学与临床, 1993, 13: 5.
- 12 Abell TJ, Richard AM, Lkram H. Atrial natriuretic factor inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells stimulated by platelet-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 160: 1 392~396.
- 13 Tom K, Kerppola, Curram T. DNA bending by Fos and Jun: the flexible hinge model. *Science*, 1991, 254: 1 210~214.
- 14 Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the $\Delta p-1$ complex in cell proliferation and transformation. *Biochem Biophys Acta*, 1991, 1 072: 129~157.
- 15 Marx JL. The fos gene as "master switch". *Science*, 1987, 237: 854~856.
- 16 Verma IM, Sassone CP. Proto-oncogene fos: complex but versatile regulation. *Cell*, 1987, 51: 513~514.
- 17 汤健, 周爱儒. 癌基因与心血管疾病. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990: 108~111.

(1996-10-27 收到, 1997-05-10 修回)