

# 曲尼司特对血管平滑肌细胞增殖 及 *c-myc* 基因表达的影响

顾水明 陈万春 金立仁

(上海市第六人民医院心内科, 上海 200233)

## Effects of Tranilast on Proliferation and *c-myc* Protooncogene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells

GU Shui-Ming, CHEN Wan-Chun and JIN Li-Ren  
(Department of Cardiology, Shanghai Sixth Peoples Hospital, Shanghai 200233, China)

### ABSTRACT

**Aim** To investigate the effects of tranilast on proliferation and *c-myc* protooncogene expression in vascular smooth muscle cells (VSMC).

**Methods** In vitro cultured rat VSMC model was established. <sup>3</sup>H-thymidine (<sup>3</sup>H-TdR) incorporation test and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique were used.

**Results** Both platelet derived growth factor-AB (PDGF-AB) and Angiotensin II (At II) were able to induce expression of *c-myc* protooncogene and increased DNA synthesis in VSMCs. Tranilast markedly inhibited the DNA synthesis in VSMCs induced by both PDGF-AB and At II. In the meanwhile, the drug was able to inhibit the *c-myc* protooncogene expression in VSMCs induced by both PDGF-AB and At II as well.

**Conclusion** Tranilast can inhibit VSMCs proliferation and expression of *c-myc* protooncogene. The inhibitory effect of tranilast on the proliferation of VSMCs may be related to the inhibition of *c-myc* expression.

**KEY WORDS** Tranilast; Platelet derived growth factor; Angiotensin II; Smooth muscle cell; *c-myc*

**摘要** 为探讨曲尼司特防治冠状动脉成形术后再狭窄及动脉粥样硬化的作用机制,以培养的大鼠血管平滑肌细胞为模型,应用脉冲胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验及反转录-多聚酶链反应技术,观察致分裂原对血管平滑肌细胞增殖及 *c-myc* 基因表达的影响;并检测曲尼司特对致分裂原诱导的增殖及 *c-myc* 基因表达的抑制效应。结果显示,曲尼司特可明显抑制血小板源生长因子和血管紧张素 II 诱导的 DNA 合成和 *c-myc* 基因表达。以上提示,曲尼司特能明显抑制血管平滑肌细胞增殖,其作用机制可能与抑制 *c-myc* 基因表达有关。

**关键词** 曲尼司特; 血小板源生长因子; 血管紧张素 II; 平滑肌细胞; *c-myc* 基因。

曲尼司特(N-3',4'-二甲氧基肉桂酰-氨基葡萄糖)是一种抗过敏药物,临床上主要用于支气管哮喘、过敏性鼻炎等过敏性疾病的治疗。其抗过敏作用与肥大细胞脱颗粒时 Ca<sup>2+</sup> 内流减少,抑制了化学递质的释放有关。文献报道曲尼司特能有效治疗成纤维细胞增殖性疾病如皮肤疤痕疙瘩。近年研究发现该药能有效防治冠状动脉成形术后再狭窄<sup>[1]</sup>,抑制大鼠股动脉损伤后血管内膜的增殖<sup>[2]</sup>。本研究以培养的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)为模型,观察曲尼司特对血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)和血管紧张素 II(angiotensin II, At II)诱导的 VSMC 增殖及 *c-myc* 基因表达的影响,旨在探讨曲尼司特是否具有抑制 VSMC 增殖的作用及其可能作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

曲尼司特为中国药科大学制药厂产品(批号 860512)。M199 培养基、胰蛋白酶和反转录酶(AMV) 均为美国 Gibco 公司产品。PDGF-AB、At I 为美国 Sigma 公司产品。Taq DNA 聚合酶由 Promeg 公司提供。Oligo dT、dNTP 由华美生物公司提供。 $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP 由北京亚辉公司提供。氘标胸腺嘧啶脱氧核苷( $^3$ H-thymidine,  $^3$ H-TdR)购自上海原子核研究所。

## 1.2 方法

1.2.1 平滑肌细胞培养和鉴定 取 12 周龄 Sprague dawley(SD) 大鼠胸主动脉,以组织贴块法进行平滑肌细胞培养<sup>[4]</sup>。实验用第 3~7 代细胞。以形态学观察及免疫组织化学方法进行细胞鉴定。

1.2.2 实验分组 ①曲尼司特对 PDGF-AB 诱导的 VSMC 增殖抑制作用,分对照组、PDGF-AB 组、曲尼司特(浓度分别为 10、50、100 mg/L)加 PDGF-AB 组;②曲尼司特对 At I 诱导的 VSMC 增殖抑制作用,分对照组、At I 组、曲尼司特(浓度分别为 10、50 和 100 mg/L)加 At I 组;③PDGF-AB 对 *c-myc* 基因表达的影响,分对照组(静止期)和 PDGF-AB 组(分别刺激 2、4、8 和 24 h);④At I 对 *c-myc* 基因表达影响,分对照组(静止期)和 At I 组(分别刺激 2、4、8 和 24 h);⑤曲尼司特对 *c-myc* 基因表达作用,分对照组(静止期)、PDGF-AB 组(刺激 2 h)、At I 组(刺激 2 h)、曲尼司特加 PDGF-AB 组(同时加入 2 h,曲尼司特浓度为 100 mg/L)、曲尼司特加 At I 组(同时加入 2 h,曲尼司特浓度为 100 mg/L)。上述各试剂浓度 PDGF-AB 为 50  $\mu$ g/L,At I 为  $10^{-6}$  mol/L。

1.2.3 细胞增殖试验 将培养的第 3~7 代大鼠 VSMC 消化成单个细胞,用 15% 胎牛血清 M199 培养液调节细胞数,细胞加入含 15% 胎牛血清 M199 培养液的 24 孔培养板中(每孔加入  $5 \times 10^4$  细胞)。培养 24 h 后,以 PBS 清洗,加进无血清 M199 置培养箱 2 天,再换 15% 胎牛血清 M199 培养液,按实验要求分组加入不同试剂及药物,培养 16 h 后各孔加入  $^3$ H-TdR,再培养 8 h,消化、收集细胞,加入闪烁液,用液体闪烁仪测定放射活性。

1.2.4 *C-myc* mRNA 测定 参照 Martin 建立的反转录-多聚酶链反应(reverse transcriptin-polymerase chain reaction, RT-PCR)方法进行测定。按快速提取法提取细胞总 RNA,用紫外分光光度计测定总 RNA 浓度,波长在 260 nm 和 280 nm 的光密度比值在 1.8~2.0 之间,样品总 RNA 用量均为 2.0  $\mu$ g,总 RNA 经反转录后,取 1/10 体积 7  $\mu$ L 反应液,进行 PCR 反应。*c-myc* 和  $\beta$ -actin 基因的引物由中国科学院上海生物工程中心

基因库协助设计,并由中科院上海细胞研究所合成。*c-myc* 引物 A: 5'-GAATCAGAGCTTCATCTGCG-3' (336 到 356),引物 B: 5'-CTTCAGCTCGTTTCT CCTCT-3'(1094 到 1074)。 $\beta$ -actin 引物 A: 5'-TGGACCTGGCTGGCCGGGAC-3'(533 到 553),引物 B: 5'-ACAGTGAGGCCAGGATAGAG-3'(849 到 829)。用这二对引物可以扩增出自 336~1 094 bp(758 bp)的 *c-myc* 和 533~849 bp(316 bp)的  $\beta$ -actin cDNA 序列。每一个反应管中含 0.5  $\mu$ Ci  $\alpha$ - $^{32}$ P dCTP。PCR 反应过程中的变性、退火和延伸温度分别为:93 $^{\circ}$ C、55 $^{\circ}$ C 和 72 $^{\circ}$ C。反应时间分别为:1、1 和 1.5 min,共进行 35 次循环。反应结束后取 10  $\mu$ L PCR 反应液,在 1.7% 琼脂糖凝胶中(含 0.5 mg/L 的溴化乙锭)电泳,以 PWR13/DdeI 为分子量标准,电泳缓冲液为  $1 \times$  TAE。电泳完毕后在紫外灯下拍照记录,在用曲尼司特抑制 *c-myc* mRNA 表达的试验中,PCR 产物在琼脂糖凝胶中电泳,切取含有荧光条带的凝胶,放入液闪液中,应用液体闪烁仪进行放射性测定。

1.2.5 统计学处理 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,统计采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 对细胞氘标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量的影响

从表 1 和表 2(Table 1, 2)可见,PDGF-AB (50  $\mu$ g/L)、At I ( $10^{-6}$  mol/L)均能明显增加  $^3$ H-TdR 掺入量,两组与对照组比较均有显著性差异( $P < 0.01$ )。曲尼司特在低浓度(10 mg/L)时抑制 PDGF-AB 及 At I 所诱导的 DNA 合成效应较低,随其药物浓度增加,抑制  $^3$ H-TdR 掺入的作用也增加。

Table 1. Effect of tranilast (mg/L) on  $^3$ H-TdR incorporation induced by PDGF-AB (50  $\mu$ g/L) in VSMCs ( $\bar{x} \pm s$ ).

Groups	n	Tranilast concentration	cpm $\times 10^3$
Control	5	0	6.54 $\pm$ 1.29 <sup>a</sup>
PDGF-AB	5	0	26.94 $\pm$ 3.28 <sup>a</sup>
Tranilast+	5	10	22.57 $\pm$ 3.26
PDGF-AB	5	50	14.08 $\pm$ 4.31 <sup>b</sup>
	5	100	8.03 $\pm$ 0.81 <sup>c</sup>

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

c:  $P < 0.01$ , compared with PDGF-AB group.

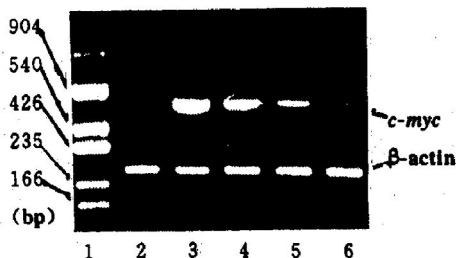
**Table 2. Effect of tranilast (mg/L) on <sup>3</sup>H-TdR incorporation induced by At I (10<sup>-6</sup> mol/L) in VSMCs ( $\bar{x} \pm s$ ).**

Groups	n	Tranilast concentration	cpm × 10 <sup>2</sup>
Control	5	0	7.83 ± 0.96
At I	5	0	22.15 ± 2.09 <sup>a</sup>
Tranilast + At I	5	10	17.03 ± 2.93 <sup>b</sup>
	5	50	11.06 ± 2.38 <sup>b</sup>
	5	100	7.36 ± 1.41 <sup>c</sup>

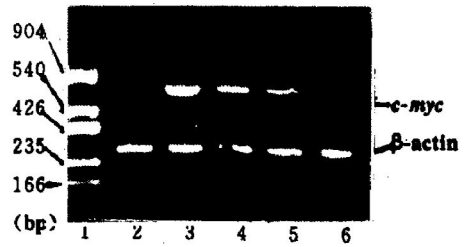
a:  $P < 0.01$ , compared with control group, b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ , compared with At I group.

**2.2 对 c-myc 基因表达的作用**

大鼠血管平滑肌细胞在静止期(48 h 静止)、PDGF-AB(50 μg/L)或 At I (10<sup>-6</sup> mol/L) 分别刺激 2、4、8 和 24 h 后,提取总 RNA,分别取 2 μg RNA 逆转录成 cDNA,以 c-myc 和 β-actin 基因的寡核苷酸片段为引物进行 PCR 扩增,结果发现,静止期细胞未见到 c-myc 表达,在 PDGF-AB 或 At I 刺激后,c-myc 表达均增高,其中以 2 h 时最高,8 h 后渐下降,24 h 时隐约可见。对照 β-actin 基因在静止期和致分裂原刺激后各个时间点表达情况基本一致(图 1 和图 2, Figure 1 and 2)。由于 c-myc 基因在 PDGF-AB 或 At I 刺激后 2 h 表达最高,故选择这一时间点研究曲尼司特对 c-myc 基因表达的影响。结果显示,曲尼司特(100 mg/L)抑制 PDGF-AB 和 At I 诱导的 c-myc 表达,分别达 29.7% 和 35.4%,与相应对照组比较有显著差异( $P < 0.05$ )(表 3, Table 3)。



**Figure 1. Agarose electrophoresis of RT-PCR product.** 1: Marker PWR 13/DdeI, 2: Quiescent period, 3~6: After 2, 4, 8 and 24 h exposure of VSMCs to PDGF-AB, respectively.



**Figure 2. Agarose electrophoresis of RT-PCR product.** 1: Marker PWR 13/DdeI, 2: Quiescent period, 3~6: After 2, 4, 8 and 24 h exposure of VSMCs to At I, respectively.

**Table 3. Effect of tranilast(100 mg/L) on c-myc expression in VSMCs induced by PDGF-AB (50 μg/L) and At I (10<sup>-6</sup> mol/L) ( $\bar{x} \pm s$ ).**

Groups	n	cpm × 10 <sup>3</sup>
PDGF-AB	3	22.49 ± 1.81
Tranilast + PDGF-AB	3	15.80 ± 1.36 <sup>a</sup>
At I	3	15.71 ± 1.94
Tranilast + At I	3	10.14 ± 1.21 <sup>b</sup>

a:  $P < 0.05$ , compared with PDGF-AB group, b:  $P < 0.05$ , compared with At I group.

**3 讨论**

血管平滑肌细胞增殖是冠状动脉成形术后再狭窄的主要病理特征,但其增殖的机制尚不清楚。已知 PDGF 能促进细胞增殖,参与再狭窄形成。At I 可促进细胞肥大及 DNA 合成,在血管损伤修复过程中起重要调节作用<sup>[5,6]</sup>。一些生长因子和细胞因子可诱导 c-myc 等原癌基因表达,促进 VSMC 增殖<sup>[7]</sup>。体内外实验应用反义 c-myc 寡核苷酸阻断 c-myc 基因表达可抑制 VSMC 及新生内膜增殖<sup>[8]</sup>。本研究结果显示 PDGF-AB 及 At I 能明显促进 VSMC 增殖,诱导 c-myc 原癌基因表达,证实 PDGF 及 At I 可能通过诱导 c-myc 基因表达而刺激 VSMC 增殖,对再狭窄的发生和发展有一定的促进作用。

由于 PDGF 和 At I 在再狭窄发生中起重要作用,本实验研究了曲尼司特对其诱导的 VSMC 增殖影响,结果显示,曲尼司特以浓度依

赖方式明显抑制 PDGF-AB 和 At I 诱导的<sup>3</sup>H-TdR 掺入 VSMC。表明该药有抑制 VSMC 增殖效应。资料表明该药能抑制血管损伤后内膜增生<sup>[2]</sup>, 小规模临床应用该药能降低再狭窄的发生率<sup>[3]</sup>。提示曲尼司特防治再狭窄形成可能与抑制 VSMC 增殖有关。本研究还显示该药能不同程度抑制 PDGF-AB 或 At I 诱导的 *c-myc* 表达, 提示该药抑制 VSMC 增殖可能与抑制 *c-myc* 表达有关。曲尼司特抑制 VSMC 增殖作用的其它机制尚不清楚。

许多实验业已表明 PDGF 和 At I 对 *c-myc* 表达的影响是通过蛋白激酶 C 介导的, 细胞内钙离子也参与这一信号传导过程<sup>[9]</sup>。曲尼司特能抑制肥大细胞脱颗粒, 其药理作用是通过抑制钙离子内流、降低胞液游离钙浓度介导的<sup>[10]</sup>。据此推测, 曲尼司特可能影响细胞内钙离子、蛋白激酶 C 等第二信使, 从而抑制 *c-myc* 表达及 VSMC 增殖。然而 *c-myc* 表达后如何影响细胞增殖的机制尚不清。Rustgi 等<sup>[10]</sup>最近证实了 *c-myc* 蛋白氨基末端区可中介与成视网膜细胞瘤的基因产物结合(PRb), 由于 Rb 是抑癌基因, 因此, *c-myc* 刺激细胞增殖, 部分是通过使 Rb 抑癌基因失活所致。*c-myc* 基因表达参与诱导 Pcdcz(丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶), 该酶在细胞移动通过细胞周期上起着重要作用<sup>[11]</sup>。故 *c-myc* 基因表达也可能通过该环节影响细胞增殖。

综上所述, 曲尼司特能明显抑制 PDGF 和 At I 诱导的 VSMC 增殖。曲尼司特抑制 VSMC 的 *c-myc* 表达可能是其抗增殖作用的分子机制之一。

#### 参考文献

1 Isaji M, Aruga N, Naito J, et al. Inhibition by tranilast of collagen accumulation in hypersensitive granulomatous inflammation in vivo and of morphological changes and func-

- tions of fibroblasts in vitro. *Life Sci*, 1994, 55(15): PL 287~292.
- 2 The TREAT Study Investigators. The impact of tranilast on restenosis following coronary angioplasty: the Tranilast Restenosis Following Angioplasty Trial (TREAT). *Circulation*, 1994, 90(4): 652.
- 3 Kikuchi S, Umemura K, Kondo K, et al. Tranilast suppresses intimal hyperplasia after photochemically induced endothelial injury in the rat. *Eur J Pharmacol*, 1996, 295(2-3): 221~227.
- 4 Yar Z, Noll G, Luscher TF, et al. Calcium antagonists differently inhibit proliferation of human coronary smooth muscle cells in response to pulsatile stretch and platelet derived growth factor. *Circulation*, 1993, 88(3): 832~836.
- 5 Daemen MJAP, Lombardi DM, Bosman FT, et al. Angiotensin I induced smooth muscle cell proliferation in normal and injured rat arterial wall. *Circ Res*, 1991, 68(2): 450~456.
- 6 Osterrieder W, Müller RKW, Powell JS, et al. Role of Angiotensin I in injury induced neointima formation in rats. *Hypertension*, 1991, 18(Suppl 4): 1160~1164.
- 7 Naftilan AJ, Prati RE, Dzau VJ. Induction of platelet-derived growth factor A-chain and *c-myc* gene expression by Angiotensin I in cultured rat vascular smooth muscle cell. *J Clin Invest*, 1989, 83(4): 1419~1424.
- 8 Bennett MR, Atlin S, McEwan JR, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation *in vitro* and *in vivo* by *c-myc* antisense oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest*, 1994, 93(2): 820~828.
- 9 Roe MW, Hepler JR, Harden TK, et al. Platelet-derived growth factor and Angiotensin I cause increased cytosolic free calcium by different mechanisms in VSMC. *J Cell Physiol*, 1989, 139(4): 100~108.
- 10 Rustgi AK, Dyson N, Bernards R, et al. Amino-terminal domains of *c-myc* and *c-myc* proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 1991, 352(6335): 541~544.
- 11 Furukawa Y, Piwnicka WH, Ernst TJ, et al. CDC2 gene expression at the G1 to S transition in human lymphocytes. *Science*, 1990, 250(4982): 805~808.

(1998-02-16 收稿, 1998-07-16 修回。编辑: 宋雯霞)