

葛根素能诱导血管平滑肌细胞凋亡部分 相关基因差异表达

王绿娅¹, 刘舒², 王伟³, 荆涛³, 吕燕宁¹, 杜兰平¹, 石凤茹¹, 张涛¹

(1. 北京市心肺血管疾病研究所, 北京 100029; 2. 中国医学科学院基础医学研究所病理生理教研室, 北京 100005;
3. 北京中医药大学东直门医院内科重点实验室, 北京 100700)

[关键词] 葛根素; 肌, 平滑, 血管; 凋亡, 细胞; mRNA 差异显示

[摘要] 为观察葛根素诱导兔血管平滑肌细胞凋亡过程中相关基因 mRNA 的差异表达, 探讨葛根素促进血管平滑肌细胞凋亡的分子机制。应用葛根素体外诱导兔血管平滑肌细胞凋亡模型和 mRNA 差异显示技术观察葛根素诱导与正常细胞间基因差异表达, 将葛根素作用后高表达的 cDNA 片段克隆、测序, 与 GeneBank 进行同源性分析, 并用³²P 标记探针, 再与不同浓度葛根素作用的血管平滑肌细胞总 RNA 进行 Northern 印迹分析。结果发现, 1、差异显示图谱出现一些仅在葛根素组高表达而在对照组无表达的 cDNA 片段。2、将其序列与 GeneBank 进行同源性比较, 证实其中 3 个序列均与兔葡萄糖调节蛋白 94 基因高度同源。3、Northern 杂交证实兔葡萄糖调节蛋白 94 基因在葛根素作用的血管平滑肌细胞中高表达, 与差异显示图谱一致。4、灰度扫描分析, 兔葡萄糖调节蛋白 94 基因在血管平滑肌细胞中表达量与葛根素浓度成正比。上述结果提示, 葛根素诱导血管平滑肌细胞凋亡过程中上调了兔葡萄糖调节蛋白 94 基因表达, 该基因在此过程中可能起到一定作用。

[中图分类号] R961

[文献标识码] A

Effect of Puerarin on The Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cell and Correlation Genes Differential Display

WANG Lir-Ya¹, LIU Shu², WANG Wei³, JING Tao³, LU Yang-Ning¹, DU Lang-Ping¹, SHI Feng-Ru¹, and ZHANG Tao¹

(1. Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029. 2. Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100005. 3. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100070, China)

[MeSH] Puerarin; Muscle, Smooth, Vascular; Apoptosis, Cell; mRNA Differential Display

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of one of the flavone puerarin on the apoptosis of the vascular smooth muscle cell (VSMC) and the molecular mechanism of this effect and observe the influence of puerarin on the expression of the relevant genes of apoptosis. **Methods** By using the method of differential display RT-PCR on the puerarin induced rabbit aorta smooth muscle cell (SMC) apoptosis model, the different expressed fragments were recovered, cloned, sequenced and compared with GeneBank databases. Then labeled the probe by ³²P, and observed the gene expression by northern hybridization with the VSMC mRNA stimulated by puerarin in different concentration. **Results** 1. Some ESTs showed significant higher level of expression in puerarin group than in control group. 2. Three ESTs were isolated from VSMCs stimulated by puerarin, similar to the gene of glucose regulated protein 94 (GRP94) in the rabbit. 3. Northern hybridization showed the high level expression in puerarin treated VSMC. 4. Gray scale scan proved that GRP94 was positive ratio with puerarin concentration. **Conclusion** The molecular mechanism of the function of promoting apoptosis of VSMC by puerarin perhaps results from promoting the gene expression of the GRP94 of VSMC.

在经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后再狭窄过程中血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)过度增殖是关键环节。细胞增殖和凋亡在正常情况下处于动态平衡, 如果细胞增殖过多或凋亡减少则可能导致再狭窄发生。如能使增殖的 VSMC 凋亡则有可

能防止再狭窄的发生。我们曾报道葛根素体外可促进兔主动脉增殖的 VSMC 凋亡^[1,2], 但其促凋亡机理尚未明确。本文应用 mRNA 差异显示法(mRNA differential display)^[3] 分析葛根素诱导的 VSMC 部分 mRNA 片段差异表达, 旨在探讨葛根素促 VSMC 凋亡的机理。

[收稿日期] 2002-07-31 [修回日期] 2002-11-26

[基金项目] 北京市科委重点实验室基金(953850700)资助。

[作者简介] 王绿娅, 女, 1953 年出生, 副研究员, 从事动脉硬化性疾病的病理生理学研究, 现任北京市心肺血管疾病研究所动脉硬化研究室主任。刘舒, 男, 1972 年出生, 中国医学科学院基础医学研究所病理生理学博士研究生。王伟, 男, 1964 年出生, 教授, 博士研究生导师, 北京中医药大学中医内科重点实验室。

1 材料和方法

实验参照文献[1,2]进行, 现简述。

1.1 兔主动脉平滑肌细胞凋亡模型的建立

取体重 1.5~2.0 kg 雄性新西兰兔, 无菌条件下

取出胸主动脉,剥离中膜,组织贴块法在含 20% 胎牛血清的 IMDM 培养基中体外原代及传代培养。应用鼠抗人 α -肌动蛋白(SM α -actin)单克隆抗体(福建迈新生物技术公司)和 SP 免疫组织化学试剂盒(北京中山公司)检测细胞内 α -actin,以证实为平滑肌细胞。取第四代细胞,每瓶 2×10^5 细胞中加入葛根素(中国药品及生物制品检定所)终浓度分别为 10^{-5} mol/L, 10^{-6} mol/L 和 10^{-7} mol/L 继续培养 48 h,同时设空白对照组。

用 FAC420 流式细胞仪检测细胞凋亡率,细胞周期峰低于 G1 期 DNA 含量的细胞为凋亡细胞。细胞滴片, OlympusXSZ-D2 型荧光显微镜观察凋亡细胞数并拍照;铀、铅双重染色, H-600 透射电镜观察细胞核内结构变化和凋亡小体^[2]。

1.2 样品总 RNA 的提取及鉴定

用 Trizol 试剂(GIBCOBRL 产品)分别提取葛根素诱导和正常细胞总 RNA, DNase iv 消化总 RNA 样品中残留的 DNA, 甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性,紫外分光光度计测定样品 260/280 比值。

1.3 引物设计及荧光差异显示

参照 GENOMYX 的“HIEROGLYPHTM Preamplification System”试剂盒,设计上游随机引物为:

M13r-ARP9 5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATA AGA CTA GC-3'

M13r-ARP10 5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGA TCT CAG AG-3'

M13r-ARP11 5'-ACA ATT TCA CAC AGG AAC GCT AGT GT-3'

M13r-ARP12 5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGG TAC TAA GG-3'

下游锚定引物为: T7(DT12) AP2 5'-ACG ACT CAC TAT AGG GC T TTT TTT TTT TT CG-3'; T7(DT12) AP3 5'-ACG ACT CAC TAT AGG GC T TTT TTT TTT TT CG-3'; T7(DT12) AP7 5'-ACG ACT CAC TAT AGG GC T TTT TTT TTT TT CG-3';

T7(DT12) AP9 5'-ACG ACT CAC TAT AGG GC T TTT TTT TTT TT AG-3'。

应用锚定引物 T(AP2、AP3、AP7 和 AP9) 分别反转录合成 cDNA 一链,然后再分别与 4 条随机引物作 16 种组合进行同步 PCR 扩增,荧光标记,在热循环仪中合成二链 cDNA 模板。反应条件为: 94 °C 30 s \rightarrow 60 °C 30 s \rightarrow 72 °C 2 min, 40 个循环, 72 °C 延伸 7 min。产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶进行恒功率电泳, 4 h 后 gemomyXSC 扫描仪(美国)显示比较差异条带。

1.4 回收差异区带及克隆测序

切下含葛根素作用后出现明显上调 cDNA 片段的凝胶, cDNA 片段纯化作为模板, 分别以回收片段对应的 3' 锚定引物与 5' 随机引物作再扩增, 产物纯化后与 PGEM-T easy 载体(Promag 公司)连接, 转染 JM109 感受态细胞, EcoR I 酶切鉴定, 以证明克隆片

段与扩增产物片段大小一致。筛选出阳性克隆质粒用 Taq 酶荧光标记引物循环测序法测序^[3](采用中国科学院遗传学研究所 PE-377 型测序仪)。将 cDNA 序列与美国国立生物信息中心(NCBI)的 NR 库和 EST 库进行同源性比较。

1.5 Northern 印迹分析

在培养的兔主动脉 SMC 中加入葛根素, 终浓度分别为 10^{-5} mol/L、 10^{-6} mol/L 和 10^{-7} mol/L, 同时设空白对照组, 共同培养 48 h。提取细胞总 RNA, 以甘油醛磷酸脱氢酶(GAPDH)为内对照, 1% 甲醛变性的琼脂糖凝胶电泳, 用标准毛细管印迹技术转移 RNA 至硝酸纤维素膜。快速杂交液于 68 °C 预杂交 30 min, 用随机引物法³²P 标记回收的 cDNA 片段作为探针, 68 °C 杂交 1 h, 洗膜 5 次, X 线光片放射自显影, 灰度扫描半定量分析其对应基因在葛根素作用的细胞中的表达。

2 结果

2.1 葛根素作用后细胞凋亡的变化

10^{-5} mol/L、 10^{-6} mol/L 和 10^{-7} mol/L 3 种浓度葛根素作用 VSMC 后, 均诱导 VSMC 凋亡, 无明显剂量依赖关系。荧光显微镜观察葛根素作用的 VSMC 染色质 DNA 在胞核内形成较大凝聚块(图 1, Figure 1); 流式细胞仪检测均出现与 G1 峰明显分开的凋亡峰。

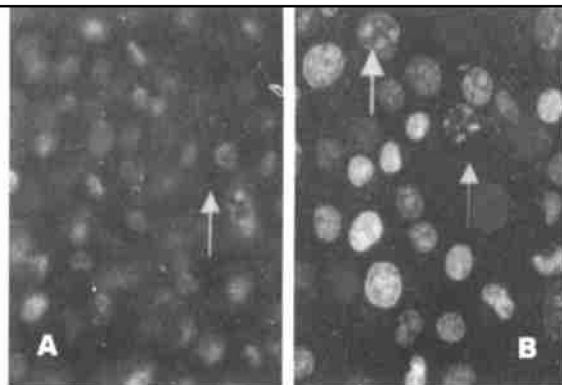


图 1. 40 倍荧光显微镜观察血管平滑肌细胞凋亡。

Figure 1. The apoptosis of VSMC by Fluorescence Microscope. A is control group and B is puerarin group of 10^{-7} mol/L.

透射电镜放大 4 000 倍观察时可见葛根素组的凋亡细胞染色质致密, 固缩边缘化, 凝固成斑块状(白色箭头所示)。而对照组细胞染色质分布均匀, 未见典型的凋亡改变(图 2, Figure 2)。

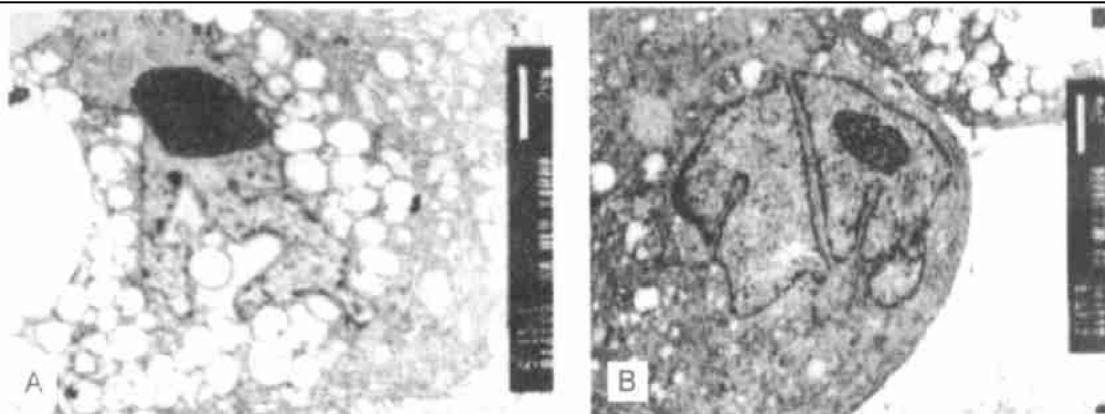


图 2. 透射电镜观察血管平滑肌细胞凋亡.

Figure 2. The apoptosis of VSMC by Electron Microscopy. A is control group and B is puerarin group of 10^{-7} mol/L.

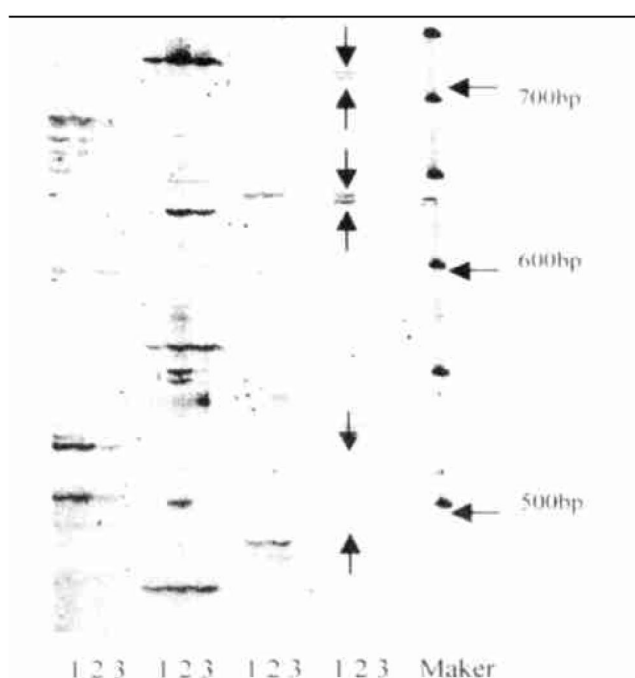


图 3. 葛根素调节兔 VSMC 凋亡相关基因聚丙烯酰胺凝胶电泳图. 黑色箭头所指为葛根素组表达而对照组未见表达的基因片断. 1. 为葛根素组, 2. 为对照组, 3. 为其它黄酮类药物组.

Figure 3. The PAGE of regulation of puerarin on the apoptosis of the correlation genes of vascular smooth muscle cell

2.2 差异显示分析

应用 4 种锚定引物(T 引物)和 4 种随机引物(P 引物)的不同组合进行 mRNA 差异显示,发现两种细胞的基因表达存在明显差异,有些基因经葛根素诱导后表达增加,而有些基因表达降低或完全被抑制(图 3, Figure 3)。提示这些基因表达增加或减少可能与葛根素诱导的细胞凋亡过程有关。

2.3 cDNA 片段的序列测定及同源性分析

选择了 10 个葛根素诱导后表达明显上调的 cDNA 片断,克隆到 pGEM-T Easy 中,经转染后,利用互补现象来筛选重组质粒。发现 pGEM-T Easy 载体插

入位点两边各有一个 EcoR I 酶切位点,酶切后行 1% 凝胶电泳,证明有 750 bp 的 cDNA 插入片段。测定序列通过 Blast 软件将其与 NCBI 的 NR 库和 ESTs 库进行同源性比较,结果发现,其中 3 个 EST 均与兔葡萄糖调节蛋白 94 (glucose-regulated protein 94, GRP94) 具有 100% 同源性,与人的 GRP94 同源性大于 85%。这 3 个 EST 不含两端引物的序列长度分别为 652 bp、733 bp 和 761 bp。

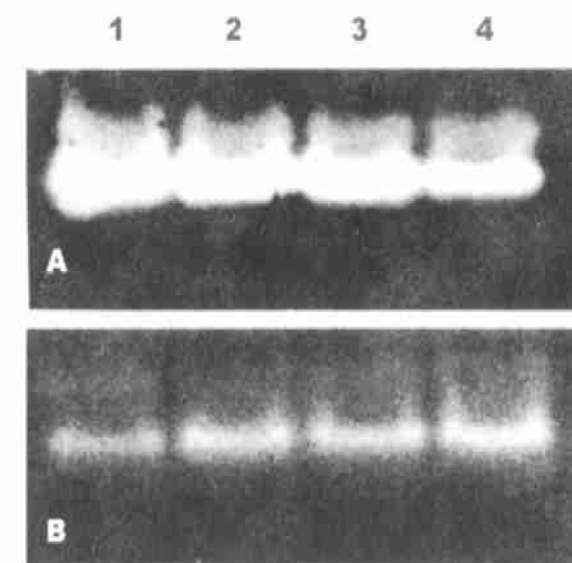


图 4. 葛根素诱导人脐静脉平滑肌细胞 GRP94 mRNA 表达.

Figure 4. The expression of glucose regulated protein 94 mRNA of puerarin-induced human hUVSMC. 1 is control group, and 2 is puerarin group of 10^{-7} mol/L, and 3 is puerarin group of 5×10^{-7} mol/L, and 4 is puerarin group of 2.5×10^{-6} mol/L. A is GAPDH gene, and B is GRP94 gene.

2.4 候选 cDNA 片段 Northern 杂交

为验证差异片断的可靠性,以 32 P 标记与兔 GRP94 基因高度同源的 761 bp 片段为探针,分别对不同浓度葛根素诱导的 VSMC 总 RNA 进行 Northern

杂交。结果发现,随着葛根素浓度的增加,GAPDH 表达量明显下降,表明细胞总体基因表达水平下降;而 GRP94 基因表达量明显增加,表明葛根素诱导兔 VSMC 中 GRP94 表达增加,并与差异显示图谱一致(图 4, Figure 4)。

3 讨论

近年来研究认为,VSMC 的过度增殖是引起再狭窄的重要原因。Bauriedel 等^[4]研究发现,VSMC 过度增殖与其凋亡调控失衡有密切关系,尤其是细胞凋亡基因调控紊乱时,凋亡不足导致内膜增厚可能是再狭窄发生的一个重要机制。Yonemitsu 等^[5]在培养基中加入野生型 P53 基因在促进 VSMC 凋亡的同时,有效地抑制增殖。王耿等^[6]应用 Irbesartan 增加大鼠髂动脉球囊损伤模型的 VSMC 凋亡率时,血管内膜增生显著减轻。因此,采用一定措施诱导 VSMC 凋亡率上升至与增殖相应水平时,一方面有利于减少 VSMC 数量,抑制血管内膜增生,另一方面可以避免 VSMC 内容物扩散引起周围组织炎症反应,可能有利于再狭窄的防治。

葛根素是豆科植物野葛干燥根的提取物,主要有效成分为 4,7-二羟基-8-β-D 葡萄糖异黄酮,具有扩张血管、改善微循环、修复内皮细胞的作用^[7]。我们曾报道葛根素可诱导 VSMC 凋亡,但机制未明。本研究应用差异显示法筛选到数个在葛根素作用后 VSMC 上调的 EST,提示可能这些基因的表达增加与葛根素诱导的细胞凋亡过程有关。上述 EST 克隆测序后与 GeneBank 比较,其中 3 个 EST 与家兔 GRP94 的 DNA 序列同源性达 100%,与人 GRP94,同源性达 85% 以上。由于假阳性高是 mRNA 差异显示法最显著的缺点^[4],因此须经过鉴定筛选出的差异片断是否是真正来源于药物作用后的细胞,以提高差异显示的可靠性。Northern 印迹分析是目前经典验证方法。我们以³²P 标记的兔 GRP94 基因 cDNA 片段为探针,与葛根素作用的 VSMC 进行 Northern 杂交。结果发现,GRP94 基因在葛根素作用的 VSMC 中表达增高,而在正常对照细胞中表达较低,与差异显示图谱一致,提示这个 EST 与葛根素作用有关。葛根素作用的 VSMC 与正常细胞比较,总 RNA 电泳条带暗淡,经扫描分析管家基因 GAPDH 的 mRNA 水平相对减少,随着葛根素浓度的增加,GAPDH 表达量明显下降;而细胞凋亡相关基因

GRP94 表达量显著增加,GRP94/GAPDH 二者的灰度比值随着药物浓度增加而增加。上述结果提示,葛根素作用 VSMC 后,细胞总体基因表达水平下降,凋亡相关基因 GRP94 表达量明显增加,细胞逐渐走向凋亡。提示 GRP94 基因在葛根素诱导 VSMC 凋亡过程中起着一定的调控作用。

葡萄糖调节蛋白 94(GRP94)的表达与多种因素有关,各种应激,如蛋白质的错误折叠,不完全装配或非糖基化蛋白质的积聚,细胞储存 Ca²⁺ 的排空与病毒感染,葡萄糖饥饿等条件下 GRP94 的表达水平可明显升高。本研究中 GRP94 基因片断在葛根素作用后的 VSMC 表达上调,提示与葛根素对 VSMC 的药理作用有关。

本实验 VSMC 凋亡相关基因片段 GRP94 可能是葛根素的作用靶点,可能会在 As 和再狭窄的机理研究中产生一定作用,但有待于进一步研究。

本研究应用差异显示方法筛选到数个在葛根素诱导 VSMC 凋亡过程中高表达的 cDNA 序列,GenBank 核酸数据库分析其中 3 个与兔 GRP94 基因高度同源,Northern 印迹分析证实该基因在葛根素作用的 VSMC 中高表达并与药物浓度成正比,而在对照组表达较低,与差异显示图谱结果一致。提示,葛根素诱导血管平滑肌细胞凋亡过程中 GRP94 基因表达上调,该基因可能在此过程中起到一定作用,可能是葛根素促进血管平滑肌细胞凋亡的机制之一。

[致谢] 中国医学科学院基础医学研究所细胞生物研究室张世毅教授、北京中医药大学内科重点学科研究室王硕仁教授、中国科学院微生物研究所分子生物学中心周健老师对本研究给予了大力支持和帮助。

[参考文献]

- [1] 王伟,张涛,赵明镜,等. 5 种中药黄酮对血管平滑肌细胞凋亡的交互作用. 北京中医药大学学报, 2000, 23 (4): 18-21
- [2] 吕燕宁,王伟,张涛,等. 葛根素对血管平滑肌细胞凋亡及其相关基因表达的影响. 中华临床医药杂志, 2002, 3 (1): 9-12
- [3] Liang P, Paedee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 1992, 257 (5072): 967-971
- [4] Bauriedel G, Schluckebier S, Hutter R, et al. Apoptosis in restenosis versus stable angina atherosclerosis: implications for the pathogenesis of restenosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998, 18 (3): 1132-139
- [5] Yonemitsu Y, Kaneda Y, Tanaka S, et al. Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. Circ Res, 1998, 82: 147-156
- [6] 王耿,何国祥,迟路湘,等. 平滑肌细胞凋亡对血管球囊损伤后内膜增殖的影响. 第三军医大学学报, 2000, 22 (3): 268-271
- [7] 岳红文,胡文琴. 葛根及葛根素对心血管系统的药用价值. 中国中西医结合杂志, 1996, 16 (6): 382-384

(此文编辑 胡必利)