

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0147-04

•实验研究•

## 黄芪和当归对血管平滑肌细胞表型标志基因表达和细胞增殖的影响

李琦, 温进坤, 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所生物化学室, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 中药学; 黄芪和当归对血管平滑肌细胞的作用; Northern 印迹分析; 细胞表型转化; 细胞增殖

[摘要] 为了观察黄芪和当归对血管平滑肌细胞表型转化和增殖的影响, 采用体外培养的血管平滑肌细胞, 以碱性成纤维细胞生长因子诱导其表型转化和增殖, 在此基础上, 通过 Northern 和 Western 印迹法检测平滑肌细胞表型标志基因表达的变化, 研究黄芪和当归注射液对碱性成纤维细胞生长因子上述效应的抑制作用。结果发现, 碱性成纤维细胞生长因子可明显下调分化型标志基因平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白的表达, 上调去分化型标志基因平滑肌胚胎型肌球蛋白重链和骨桥蛋白表达, 诱导原癌基因  $c-jun$  表达及促进血管平滑肌细胞 DNA 合成。黄芪和当归可上调分化型标志基因的表达活性, 下调去分化型标志基因的表达, 不同程度地抑制碱性成纤维细胞生长因子诱导的血管平滑肌细胞表型转化和 DNA 合成, 有效抑制血管平滑肌细胞增殖, 其作用机制可能与抑制碱性成纤维细胞生长因子诱导的  $c-jun$  基因表达有关。二者相比, 当归的作用大于黄芪。结果提示, 黄芪和当归可从多位点上拮抗碱性成纤维细胞生长因子促血管平滑肌细胞表型转化及细胞增殖。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

### Effects of *Astragalus Membranaceus* and *Angelica Sinensis* on Phenotypic Modulation and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

LI Qi, WEN Jür Kun, and HAN Mei

(Department of Biochemistry, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cell; Northern Blot; Phenotypic Modulation; Proliferation; *Astragalus Membranaceus*; *Angelica Sinensis*; Basic Fibroblast Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* on vascular smooth muscle cell (VSMC) phenotypic modulation and proliferation. **Methods** Basic fibroblast growth factor (bFGF) was used as a stimulus and the effects of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* on VSMC differentiation, DNA synthesis and proto-oncogene expression in VSMC induced by bFGF were observed. **Results** bFGF could downregulate the expression of smooth muscle (SM)  $\alpha$  actin, induce the expression of smooth muscle embryonic myosin heavy chain and osteopontin, stimulate the expression of  $c-jun$  gene and promote the DNA synthesis. Both *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* could inhibit VSMC phenotypic modulation and DNA synthesis induced by bFGF, and result in the effective inhibition of VSMC proliferation. The mechanisms were related with the inhibition of  $c-jun$  gene expression stimulated by bFGF. Compared with *Astragalus membranaceus*, *Angelica sinensis* was more effective in inhibiting the VSMC phenotypic conversion and proliferation. **Conclusions** All results above reflected multi-site effects of *Astragalus membranaceus* and *Angelica sinensis* on VSMC phenotypic conversion and proliferation, and revealed their new pharmacological mechanisms.

血管内皮损伤可使局部细胞释放大量生长因子和细胞因子<sup>[1]</sup>, 这些因子如碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)可促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的去分化和 DNA 合成, 从而刺激 VSMC 表型转化和增殖, 其机制可能与诱导原癌基因表达有关<sup>[2,3]</sup>。黄芪和

当归也可不同程度地抑制内皮损伤所致的内膜增生, 对血管再狭窄有显著疗效。为进一步探讨两味中药防治血管再狭窄的分子机制, 本文以平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白(smooth muscle  $\alpha$  actin, SM  $\alpha$  actin)作为分化型 VSMC 的分子标志, 以平滑肌胚胎型肌球蛋白重链(smooth muscle embryonic myosin heavy chain, SMemb)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)作为去分化型 VSMC 的分子标志<sup>[3]</sup>, 以 bFGF 诱导 VSMC 去分化和 DNA 合成及原癌基因  $c-jun$  表达, 在此基础上, 观察黄芪和当归注射液对 bFGF 上述效应的抑制作用。

[收稿日期] 2003-10-17 [修回日期] 2004-02-28

[基金项目] 国家自然科学基金(39970274)及河北省自然科学基金(301358)资助

[作者简介] 李琦, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为心血管分子生物学。温进坤, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心血管分子生物学。本文通讯作者, 联系电话为 0311-6265563, E-mail 为 wjk@helmu.edu.cn。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

SD 大鼠由河北省实验动物中心提供。M199 培养基为 GIBCO 公司产品。SM  $\alpha$  肌动蛋白、SMemb、OPN 和  $\sigma$ -jun cDNA 探针为本室合成<sup>[21]</sup>。随机引物标记试剂盒由 Promega 公司提供。 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP 为北京亚辉公司产品。兔抗鼠 OPN 抗血清为本室自制。羊抗兔 IgG-HRP 购自中山公司。bFGF 为北京邦定公司产品。其他试剂为进口或国产分析纯。

黄芪注射液(批号 990822-1)为山西晋新制药总厂产品,规格 2 mL/支,生药含量 2 kg/L;当归注射液(批号 990513-10)为山西永济市制药厂产品,规格 2 mL/支,生药含量 50 g/L。

### 1.2 大鼠血管平滑肌细胞的培养

取 5 周龄 SD 大鼠胸主动脉,按本室报道的贴块法<sup>[4]</sup>,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内,用含 10% 小牛血清的 M199 培养基(含青霉素 100 ku/L,链霉素 100 g/L)进行原代培养,待 VSMC 爬满培养瓶后,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取 4~10 代细胞进行实验。

### 1.3 实验分组

待传代培养的 VSMC 生长至 80% 融合时,换成含 0.5% 小牛血清的 M199 培养基饥饿培养 24 h,使细胞同步于 G<sub>0</sub> 期后,随机分为 bFGF(8 ku/L)组、bFGF+ 当归(bFGF 8 ku/L,当归注射液 30 mg/L)组、bFGF+ 黄芪(bFGF 8 ku/L,黄芪注射液 6 g/L)组、分化组和去分化组。除分化组外,其余 4 组均在换成含 10% 小牛血清培养基的同时加入上述药物,各组继续培养 24 h(分化组无血清培养 48 h)之后,从各组细胞提取总 RNA 和制备蛋白提取液。

### 1.4 Northern blot 分析

采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法,分别从上述各组 VSMC 中提取总 RNA。经紫外分光光度计检测 260 nm、280 nm 的吸光度值并计算样品中 RNA 含量和纯度后,每组各取 30  $\mu$ g,经 1% 琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳分离后,转移、固定至尼龙膜上,分别与 <sup>32</sup>P 标记的  $\alpha$  肌动蛋白、SMemb、OPN 和  $\sigma$ -jun cDNA 探针进行杂交。

### 1.5 Western blot 分析

收集上述各组 VSMC,制备蛋白提取液,改良酚试剂法测定蛋白含量。每组各取 20  $\mu$ g 蛋白,经 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移至硝酸纤维膜上,经封闭后相继与兔抗鼠 OPN 抗体及羊抗兔 IgG-HRP 温育,最后以 4-氯-1-萘酚显色液显色。

### 1.6 氚标胸腺嘧啶核苷掺入实验

传代培养的 VSMC 传至 96 孔板,待其生长至 80% 融合时,换成含 0.5% 小牛血清的 M199 培养基,饥饿培养 24 h,使细胞同步于 G<sub>0</sub> 期后,按上述分组加入相应药物,培养 18 h 后,向培养液中加入 <sup>3</sup>H-TdR 至终浓度为 2 mCi/L,继续培养 6 h 收集细胞,用液体闪烁计数器每分钟细胞计数,每组实验重复 3 次,取平均值,进行组间 *t* 检验。结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, *P* < 0.05 表示差异有显著性。

### 1.7 密度扫描分析

采用美国 Kodak 公司 ID 数码成像分析系统软件对 Northern 杂交信号和 Western 区带进行定量分析,扫描灰度值用积分吸光度值(IOD)表示。

## 2 结果

### 2.1 黄芪和当归对碱性成纤维细胞生长因子抑制 $\alpha$ 肌动蛋白基因表达的影响

如图 1(Figure 1)所示,分化组 VSMC 中  $\alpha$  肌动蛋白表达活性最强,去分化组该基因表达明显下调。bFGF 作用后其表达活性进一步降低。加入当归或黄芪后该基因表达活性的下降幅度比单纯 bFGF 组减小,说明 bFGF 对 VSMC 的去分化作用可被当归和黄芪部分拮抗,且当归的拮抗作用强于黄芪。

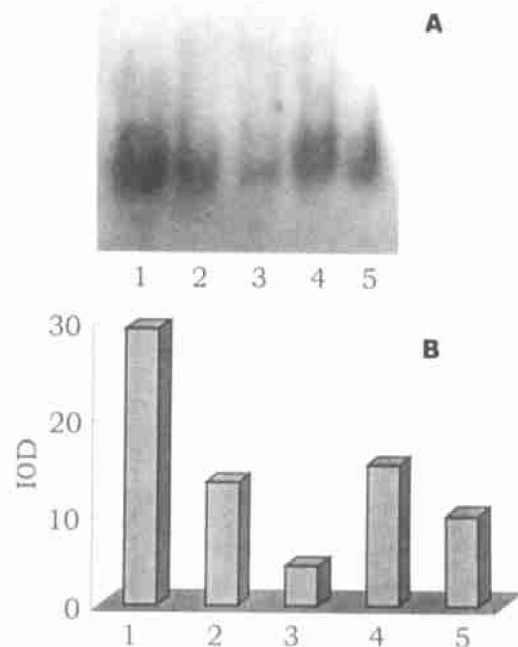


图 1. 黄芪和当归对平滑肌  $\alpha$  肌动蛋白基因表达的影响

A 为 Northern 印迹, B 为灰度扫描; 1 为分化组, 2 为去分化组, 3 为 bFGF 组, 4 为 bFGF 组+ 当归组, 5 为 bFGF 组+ 黄芪组。

Figure 1. Northern blot analysis for SM  $\alpha$ -actin gene expression in VSMC treated with Astragalus and Angelica

## 2.2 黄芪和当归对碱性成纤维细胞生长因子诱导 SMemb 基因和骨桥蛋白表达的影响

与 SM  $\alpha$  肌动蛋白变化趋势相反, 分化组 VSMC 中 SMemb mRNA 几乎未能检出, 去分化组 VSMC 中该基因明显表达, 经碱性成纤维细胞生长因子作用后, 其表达活性进一步增强, 为去分化组的 5.2 倍。用当归或黄芪处理后, 碱性成纤维细胞生长因子对该基因的诱导作用受到显著抑制。两药比较, 当归比黄芪具有更强的抑制效应(图 2, Figure 2)。

Northern 印迹分析和 Western 印迹分析显示, 各组 VSMC 中 OPN mRNA 和 OPN 蛋白具有相同的变化趋势。分化型 VSMC 中 OPN mRNA 无信号出现, 蛋白几乎不能被检出。去分化型 VSMC 中 OPN 明显表达, 在 bFGF 诱导下, OPN 表达活性进一步增强, mRNA 和蛋白表达量分别为去分化组的 2.7 和 2.4 倍。用黄芪或当归处理细胞后, OPN mRNA 和蛋白水平均明显下降, 说明二者均可抑制 bFGF 诱导的 OPN 表达, 当归的抑制作用较强(图 3, Figure 3)。

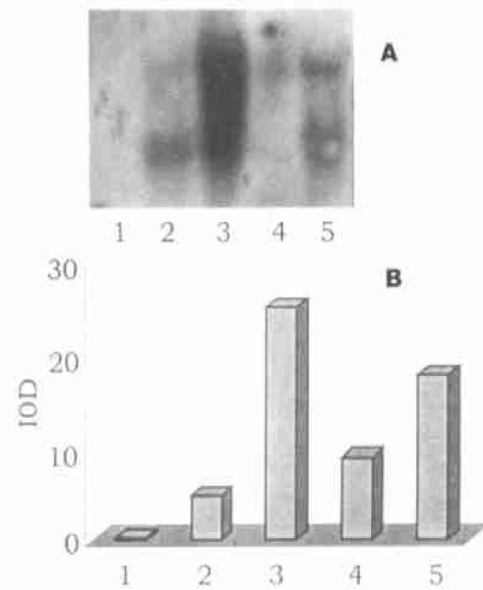


图 2. 黄芪和当归对 SMemb 基因表达的影响 A 为 Northern 印迹, B 为灰度扫描; 1 为分化组, 2 为去分化组, 3 为 bFGF 组, 4 为 bFGF 组+ 当归组, 5 为 bFGF 组+ 黄芪组。

Figure 2. Northern blot analysis for SMemb gene expression in VSMC treated with Astragalus and Angelica

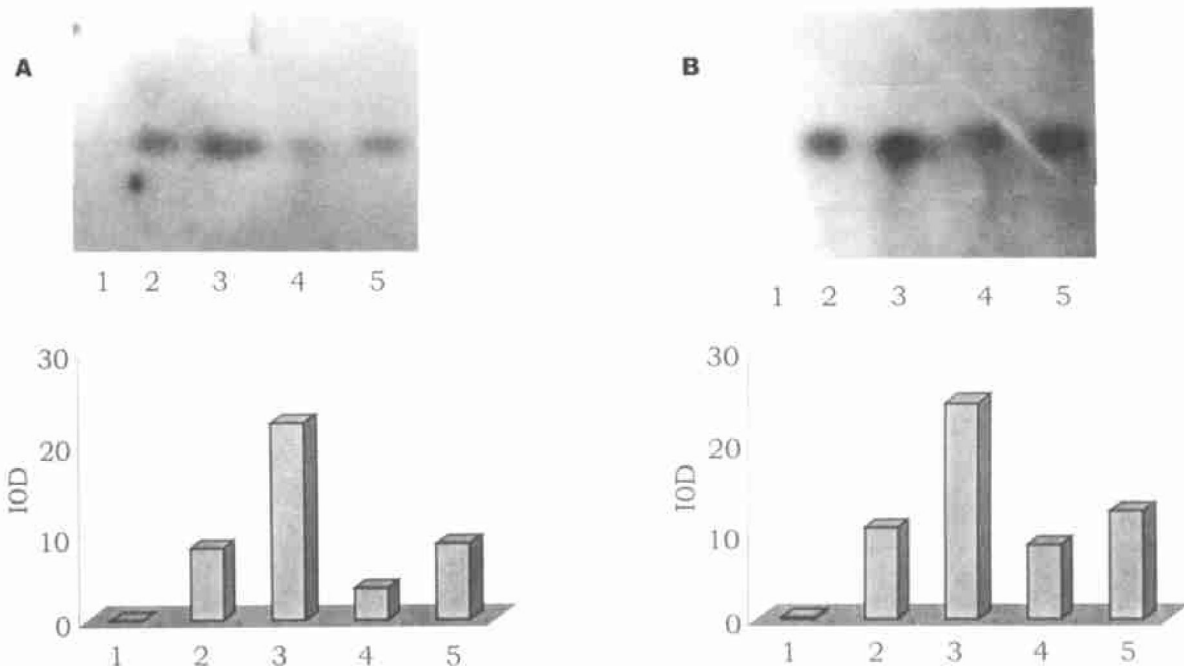


图 3. 黄芪和当归对骨桥蛋白表达的影响 A 为 Northern 印迹, B 为 Western 印迹; 1 为分化组, 2 为去分化组, 3 为 bFGF 组, 4 为 bFGF 组+ 当归组, 5 为 bFGF 组+ 黄芪组。

Figure 3. OPN gene expression in VSMC treated with Astragalus and Angelica

## 2.3 黄芪和当归对碱性成纤维细胞生长因子诱导平滑肌细胞 DNA 合成的影响

$^3\text{H-TdR}$  掺入结果显示, 与对照组相比 bFGF 对 VSMC DNA 合成有显著的促进作用。黄芪和当归均可明显抑制 bFGF 诱导的 VSMC  $^3\text{H-TdR}$  掺入, 两组每分钟细胞计数值分别由 bFGF 处理组的  $1\ 060.4 \pm$

$201.9$  下降至  $601.6 \pm 22.5$  和  $275.6 \pm 17.8$ , 抑制率分别为 43.3% 和 74.0%。两药的作用强度差异也有显著性 ( $P < 0.05$ ), 当归具有更强的抑制作用。

## 2.4 黄芪和当归对碱性成纤维细胞生长因子诱导平滑肌细胞原癌基因 $c-jun$ 表达的影响

各组 VSMC 中  $c-jun$  的表达如图 4 (Figure 4) 所

示,  $c-jun$  在分化型 VSMC 中不表达, 去分化 VSMC 中表达; 碱性成纤维细胞生长因子可明显上调该基因表达活性, 对其有较强的诱导作用。该诱导作用可被黄芪和当归所抑制。

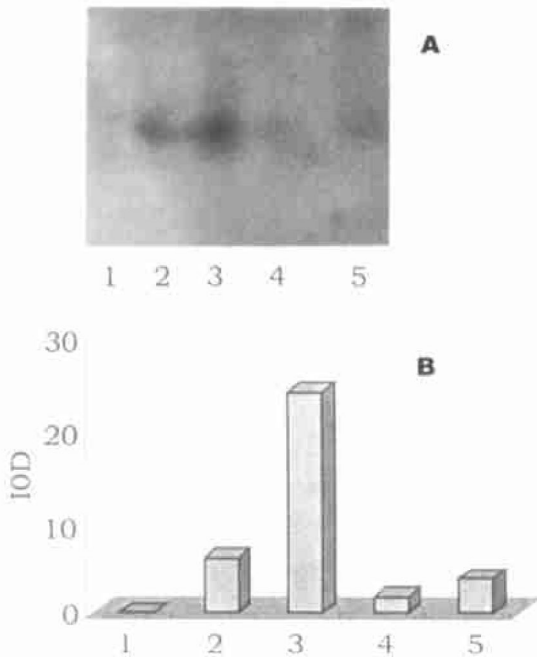


图4. 黄芪和当归对  $c-jun$  基因表达的影响 A 为 Northern 印迹, B 为灰度扫描; 1 为分化组, 2 为去分化组, 3 为 bFGF 组, 4 为 bFGF 组+ 当归组, 5 为 bFGF 组+ 黄芪组。

Figure 4. Northern blot analysis for  $c-jun$  gene expression in VSMC treated with Astragalus and Angelica

### 3 讨论

碱性成纤维细胞生长因子作为一种由内皮细胞、VSMC 和巨噬细胞分泌的重要的生长因子, 本室以往实验证实可促进 VSMC 的去分化和 DNA 合成, 此种作用可能与其诱导原癌基因表达有关<sup>[2,3]</sup>。本实验以 bFGF 为诱导因素作用于 VSMC, 在细胞和分子水平上观察黄芪和当归注射液对 VSMC 表型标志基因和原癌基因  $c-jun$  的表达以及 DNA 合成的影响。结果显示, 在分化型 VSMC 中, 分化型标志基因 SM  $\alpha$  肌动蛋白高表达, 去分化型标志基因 SMemb 和 OPN 不表达; 而在去分化型 VSMC 中, SM  $\alpha$  肌动蛋白表达活性降低, SMemb 和 OPN 明显表达; VSMC 在 bFGF 刺激下, SM  $\alpha$  肌动蛋白的表达下调而 SMemb 和 OPN 的表达上调。这些结果说明 bFGF 具有促进 VSMC 表型转化的作用。黄芪和当归两味中药制剂可不同程度的抑制 bFGF 对 VSMC 的去分化作用。

多项检测结果均证实, 当归的作用大于黄芪。这些结果与整体实验结果相符。不仅如此, 黄芪和当归还可抑制 bFGF 促 VSMC DNA 合成的作用, 有效抑制 VSMC 增殖, 其分子机制可能与抑制 bFGF 诱导的  $c-jun$  基因表达有关。中医学认为, 以 VSMC 增殖为主要病理特征的心血管病属于“血瘀证”的范畴, 治疗上当以益气、活血、化瘀为主。目前临床上用于治疗此类心血管疾病的各种中药制剂, 多以黄芪和当归为主要成分<sup>[5]</sup>。现代药理学研究证实, 黄芪具有扩张血管、抗缺氧、保护血管内皮功能、抑制血栓形成及降低血小板粘附率的作用<sup>[6]</sup>。动物实验证实, 以黄芪为主要成分的补阳还五汤可有效抑制 PTCA 术后血管内膜的增生<sup>[7]</sup>。当归具有补血活血化淤的功效, 其主要成分阿魏酸钠对血小板粘附、聚集和释放血管活性物质均具有显著抑制作用<sup>[8,9]</sup>。

用中药注射液进行细胞水平的研究, 无需对药物进行预处理, 其含有的有效成分可直接作用于细胞, 因此能够较客观的反映药物的药理作用。本研究结果充分证明, 黄芪和当归不仅能抑制 bFGF 诱导的 VSMC 增殖, 而且还可有效逆转 bFGF 诱导的 VSMC 表型转化, 提示黄芪和当归可从多途径上拮抗细胞丝裂原的生物学效应。这一发现是对黄芪和当归中药药理作用的重要补充, 揭示了其新的药理作用和防治血管再狭窄的分子机制, 并为应用中药预防和治疗血管再狭窄提供了理论依据。

#### [参考文献]

- [1] 吴永全, 袁良俊, 胡大一. 生长因子在 PTCA 术后再狭窄形成中的作用. 国外医学·心血管疾病分册, 1999, 26: 75-77
- [2] 李琦, 温进坤, 韩梅. 血管再狭窄发生过程中 SM  $\alpha$  actin 和 SMemb 基因表达的变化及其影响机制研究. 中国生物化学与分子生物学报, 2000, 16: 832-836
- [3] 李琦, 温进坤, 韩梅. 反义  $c-jun$  表达质粒对血管平滑肌细胞表型转化标志的影响. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9: 6-9
- [4] 胡静, 温进坤, 魏素珍, 贾根深. 甲基硝基亚硝基胍对血管平滑肌细胞增殖的影响. 中华物理医学杂志, 1994, 16: 211-213
- [5] 王会玲, 胡婉英. 活血化淤治疗冠心病的细胞学和分子学研究进展. 上海中医药杂志, 1999, 7: 46-49
- [6] 韩玲, 陈可冀. 黄芪对心血管系统作用的实验药理学研究进展. 中国中西医结合杂志, 2000, 20: 234-237
- [7] 谢全锦, 侯灿, 吴伟康. 补阳还五汤对球囊扩张主动脉后再狭窄及其内皮 PDGFR 和 SOD 基因表达的探讨. 中国中西医结合杂志, 1997, 17: 61-63
- [8] 谢玲, 杨凌红, 李晓惠. 当归药理作用研究进展. 中医药研究, 2000, 16: 56-58
- [9] 余追, 欧阳静萍, 刘永明, 郑汉巧, 杨静薇, 涂淑珍, 等. 当归抗家兔主动脉粥样硬化形成的作用. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8: 46-48

(此文编辑 朱雯霞)