

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-08-0662-03

三七总皂甙对血管平滑肌细胞增殖及 c-myc 基因表达的影响周永兰¹, 陈清枝², 张延斌², 李东野²

(1. 江苏大学附属徐州医院 徐州市第三人民医院心内科, 江苏省徐州市 221005;

2. 徐州医学院附属医院心内科, 江苏省徐州市 221002)

[关键词] 分子生物学; 三七总皂甙的药理作用; 四甲基偶氮唑盐比色法和细胞免疫组织化学; 三七总皂甙; 血管平滑肌细胞; 血小板源生长因子; c-myc 蛋白

[摘要] 目的 探讨三七总皂甙对血小板源生长因子刺激的血管平滑肌细胞增殖的影响及其可能机制。方法 运用血小板源生长因子刺激兔体外血管平滑肌细胞增殖模型, 通过四甲基偶氮唑盐比色法、流式细胞术及免疫细胞化学法观察三七总皂甙对其增殖活性、细胞周期及 c-myc 蛋白表达的影响。结果 血小板源生长因子显著刺激血管平滑肌细胞增殖, 三七总皂甙呈浓度依赖性抑制血管平滑肌细胞增殖, 对血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖亦具有显著抑制作用; 三七总皂甙作用下血管平滑肌细胞处于 G_1/G_0 期的细胞数增多, 而 G_2/S 期的细胞数显著减少, c-myc 蛋白的表达亦降低。结论 三七总皂甙对基础状态下及血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖均具有显著抑制作用, 部分机制与其阻滞血管平滑肌细胞 G_1/G_0 期向 S 期转化以及下调 c-myc 基因表达有关。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

Effects of Total Spaoins of Panax Notoginseng on c-myc Gene Expression and Proliferation of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells

ZHOU Yong-Lan¹, CHEN Qing-Zhi², ZHANG Yan-Bin², and LI Dong-Ye²

(1. Department of Cardiology, the Third People's Hospital of Xuzhou; Affiliated Xuzhou Hospital of Jiangsu University, Xuzhou 221000, China;

2. Department of Cardiology, the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China)

[KEY WORDS] Total Spaoins of Panax Notoginseng; Vascular Smooth Muscle Cell; Platelet-Derived Growth Factor; c-myc Protein; Cell Proliferation; Cell Cycle

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of total spaoins of panax notoginseng (tPNS) on the proliferation of vascular smooth muscle cell (VSMC) induced by platelet derived growth factor (PDGF) and the possible underlying mechanisms.

Methods Cell proliferating model of rabbit aorta VSMC induced by PDGF-BB was established. The proliferative activity of VSMC with tPNS was analyzed by MTT method; the effect of tPNS on cell cycle of VSMC was observed by flow cytometry technique; the effect of tPNS on c-myc gene expression in VSMC was observed by immunocytochemical method. **Results** MTT metabolism of VSMC in the basic and PDGF-BB stimulated situation was inhibited by tPNS, and the cells numbers of G_0/G_1 phase were increased and that of G_2/S phase were decreased markedly. At the same time, highly expression of c-myc gene protein stimulated by PDGF could be inhibited by tPNS significantly.

Conclusions tPNS can inhibit the proliferation of VSMC induced by PDGF significantly, at least in part by preventing VSMC from G_0/G_1 phase entering S phase and downregulating the expression of oncogene c-myc protein.

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的异常增殖和迁移是动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄的主要病理基础。血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)是一种亲水的阳离子糖蛋白,主要来源于血小板的 α 颗粒,是VSMC强烈的促丝裂剂和趋化剂,且能上调 c-myc 基因的表达^[1],在血管增殖病变中起重要作用。本文通过

观察三七总皂甙(total spaoins of panax notoginseng, tPNS)对PDGF诱导的VSMC增殖及 c-myc 蛋白表达的影响,旨在探讨tPNS防治动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄的可能作用及机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

家兔体重1.5~2.0 kg,由徐州医学院实验动物中心提供;tPNS(昆明制药有限公司);DMEM(Gibco公司); α -SM-action 单克隆抗体、PDGF-BB、 c-myc 基因蛋白抗体(美国 Santa 公司);SABC-AP 试剂盒、

[收稿日期] 2006-01-16

[修回日期] 2006-06-19

[作者简介] 周永兰, 硕士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病的分子生物学, E-mail 为 zhouyonglan94101@yahoo.com.cn。陈清枝, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病的基础研究。张延斌, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病的基础研究。

RNA 酶、PI 染液(北京中山生物技术有限公司);MTT (Sigma 公司);胎牛血清(杭州四季青有限公司)。

1.2 血管平滑肌细胞的培养与鉴定

采用颈动脉放血法处死家兔,取其胸主动脉, Hanks 液冲洗去除残余血液,剥去外膜,弯头镊子轻刮去内膜。采用组织贴块法培养,将组织剪成 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ 的小块,均匀涂布于瓶壁,每小块间距 5 mm ,轻轻翻转培养瓶,于瓶内加入适量的培养基(含 20% FCS 的 DMEM),置 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养 $1 \sim 2\text{ h}$,待小块贴附后,将培养瓶缓慢翻转平放,静置培养,待 80% 细胞已汇合或接近汇合,即可进行首次传代。相差显微镜观察细胞生长形态,取第三代细胞进行特异性抗平滑肌细胞 α -actin 免疫组织化学染色以鉴定。取第 4~6 代 VSMC。

1.3 实验分组

对照组为 DMEM+ 10% FCS; PDGF 组同对照组培养基,另加入 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ PDGF; tPNS 组同对照组培养基,另分别加入 100、400 及 800 mg/L tPNS; tPNS+PDGF 组同对照组培养基,另加入 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ PDGF 和 400 mg/L tPNS。

1.4 平滑肌细胞增殖活性的检测

胰酶消化制成细胞悬液(浓度为 $5 \times 10^8/\text{L}$),将细胞接种于 96 孔板中,每孔 $100\text{ }\mu\text{L}$,将培养板置 CO_2 孵箱中,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下,培养 24 h ,去除培养基,加入含 0.2% FCS 的 DMEM 培养 24 h ,使其同步化后,加入上述各组培养基,继续培养 48 h ,去除培养基,每孔加入 MTT 液 $10\text{ }\mu\text{L}$,继续培养 5 h ,终止培养,每孔加入 DMSO $100\text{ }\mu\text{L}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 2 h ,将细胞内和周围的 MTT 颗粒充分溶解。用酶标仪测定各孔吸光度值,波长 570 nm 。

1.5 α -myc 蛋白的检测

胰酶消化制成细胞悬液(浓度为 $4.5 \times 10^8/\text{L}$),接种于内置盖玻片的 24 孔培养板,每孔加入 1 mL ,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养 24 h ,去除培养基,加入含 0.2% FCS 的 DMEM 培养 24 h ,使其同步化后,分别加入上述各组培养基,继续培养 24 h 后,取出盖玻片进行细胞免疫组织化学检测,具体步骤参照 SABC-AP 试剂盒说明。

1.6 细胞周期的检测

胰酶消化制成细胞悬液(浓度为 $5.5 \times 10^8/\text{L}$),接种于 6 孔培养板,每孔加入 3 mL ,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养 24 h ,去除培养基,加入含 0.2% FCS 的 DMEM 培养 24 h ,使其同步化,分别加入上述各组培养基,继续培养 48 h ,消化离心收集细胞(细胞总数大于 10^6),PBS 洗 2 次,70% 冰乙醇固定, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱

过夜,离心沉淀去除固定液,并用 PBS 洗 2 次,加入 PI 染液(含 RNA 酶),每份标本加入 1 mL ,避光,流式细胞仪进行细胞周期检测。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的检验采用独立样本 t 检验,并进行直线相关分析, $P < 0.05$ 具有统计学差异。采用 SPSS11.5 统计软件。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞的鉴定

倒置显微镜下,细胞形态为长梭形,呈放射性生长,呈现典型的“峰”与“谷”样生长。平滑肌细胞 α -actin 免疫组织化学染色可见胞质内含与细胞长轴相平行的棕黄色颗粒,证实为 SMC,细胞纯度在 90% 以上。

2.2 三七总皂甙对平滑肌细胞增殖活性的影响

三七皂甙(tPNS)显著抑制 VSMC 的增殖活性,使其对 MTT 的代谢率明显降低,与对照组相比具有显著性差异(表 1);且这种抑制作用呈浓度依赖关系,二者呈明显负相关($r = -0.986$, $P < 0.01$)。

表 1. 三七总皂甙对血管平滑肌细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)

分 组	吸光度值
对照组	0.425 ± 0.036
tPNS 100 mg/L	0.394 ± 0.035^a
400 mg/L	0.251 ± 0.030^b
800 mg/L	0.143 ± 0.012^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 三七总皂甙对血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖活性的影响

血小板源生长因子(PDGF)显著刺激 VSMC 增殖,PDGF 组 VSMC 对 MTT 的代谢率较对照组明显增加,而 400 mg/L tPNS 则抑制 PDGF 对 VSMC 的刺激作用(表 2)。

表 2. 三七总皂甙对血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞增殖活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 24$)

分 组	吸光度值
对照组	0.421 ± 0.030
PDGF 组	0.987 ± 0.052^a
PDGF+ tPNS 组	0.465 ± 0.004^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 PDGF 组比较。

2.4 血管平滑肌细胞的细胞周期

血小板源生长因子(PDGF)作用下 VSMC 处于 G₀/G₁ 期的细胞数减少, G₂/S 期的细胞数增多;而 tPNS 干预下 G₀/G₁ 期的细胞数增多, G₂/S 期的细胞数减少(表 3)。

表 3. 三七总皂甙对血小板源生长因子诱导的血管平滑肌细胞细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	6275 ± 164	2816 ± 135	793 ± 65
PDGF 组	2473 ± 125 ^a	5972 ± 165 ^a	1549 ± 104 ^a
PDGF+ tPNS 组	5344 ± 178 ^b	3849 ± 129 ^b	786 ± 56 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 PDGF 组比较。

2.5 c-myc 蛋白的表达

各组培养的 VSMC 内均有 c-myc 蛋白的表达。阳性信号呈兰色, 粗细不均的颗粒位于细胞核内。对照组表达较弱, PDGF 组 c-myc 蛋白表达明显增强, 表现胞核着色明显加深, PDGF+ tPNS 组蛋白表达明显受到抑制, 表现为胞核着色明显变淡。

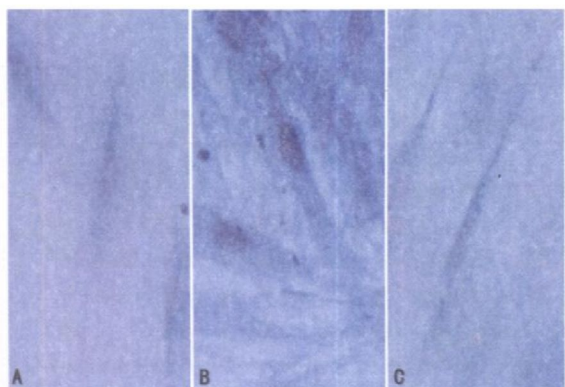


图 1. 各组平滑肌细胞 c-myc 蛋白的表达 ($\times 50$) A 为对照组, B 为 PDGF 组, C 为 PDGF+ tPNS。

3 讨论

三七总皂甙(tPNS)是从三七植物中提取的有效活性成分, 其中主要含有皂甙单体 Rb1、Rg1 等, 是临床常用的活血化淤药物之一。近年的研究表明, PNS 具有抗氧化、抗自由基^[2]、钙拮抗^[3]、降压^[4]等作用。本研究结果发现 tPNS 不仅对基础状态下 VSMC 的增殖活性呈浓度依赖性抑制作用, 而且对 PDGF 诱导的 VSMC 增殖亦有显著抑制作用, 与周晓霞等^[5]的研究结果相一致, 提示 tPNS 具有显著抑制

VSMC 增殖的作用, 可能是其防治动脉粥样硬化和血管成形后再狭窄的机制之一。

许多原癌基因的激活及其表达异常是 VSMC 增殖的内在基础, 其中 c-myc 是目前较受关注的基因之一, 其编码产物 c-myc 蛋白是一种细胞核内的 DNA 结合蛋白, 对促进细胞从 G₀/G₁ 期进入 S 期完成 DNA 的合成具有关键意义, c-myc 基因的激活被认为是 VSMC 增殖的始动环节之一^[6]。c-myc 表达增高与 VSMC 的增殖与迁移密切相关^[7], 应用 c-myc 反义寡核苷酸能够显著降低 c-myc 蛋白的表达, 从而有效地抑制 VSMC 的增殖与迁移^[8]。c-myc 蛋白主要通过三种机制促进 VSMC 增殖与迁移: 其羧基端与特异的 DNA 序列结合, 开放与细胞增殖有关的基因; ④氨基酸与抑制基因结合, 使其抑制作用解除, 刺激细胞增殖; ④诱导丝氨酸—苏氨酸蛋白激酶 P34cd2 产生, 使细胞迁移。本研究结果发现, tPNS 不仅能阻滞 VSMC G₁/G₀ 期向 S 期转化, 而且可下调 PDGF 诱导的 VSMC c-myc 基因表达, 为探索 tPNS 抗 VSMC 增殖的分子机制提供了新的实验依据。c-myc 基因是一双相调节基因, 不仅参与细胞增殖的调控, 后期还参与细胞凋亡的调控, tPNS 是否能够通过影响 c-myc 基因表达而促进 VSMC 凋亡, 尚值得进一步的研究和探讨。

[参考文献]

- [1] Li J, Huang SL, Guo ZG. Platelet-derived growth factor stimulated vascular smooth muscle cell proliferation and its molecular mechanism[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, **21** (4): 340-344
- [2] 陈 锋, 王成天, 王焱林, 万德宁. 三七总皂甙预处理对在体大鼠心肌缺血/再灌注的保护作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2000, **20** (7): 437-438
- [3] 朱智勇, 王晓晴, 杨映宁, 周定邦. 三七总皂甙对慢性低氧大鼠右心室心肌细胞钙电流的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, **20** (3): 399-401
- [4] Sun HX, Pan HJ, Pan YJ. Haemolytic activities and immunologic adjuvant effect of panax notoginseng saponins[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, **24** (11): 1150-1154
- [5] 周晓霞, 苏佩清, 杨鹤梅, 周晓慧. 三七总皂甙对人高脂血清诱发的胎儿血管平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 43-45
- [6] Brauer-Dullaues RC, Mann MJ, Sedding DG, Sherwood SW, von der Leyen HE, Dzau VJ. Cell cycle-dependent regulation of smooth muscle cell activation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (5): 845-850
- [7] Hilker M, Tellmann G, Buerke M, Moersig W, Oelert H, Lehr HA, et al. Expression of the proto-oncogene c-myc in human stenotic aortocoronary bypass grafts[J]. *Pathol Res Pract*, 2001, **197** (12): 811-816
- [8] Zhang XX, Cui CC, Xu XG, Hu XS, Fang WH, Kuang BJ. In vivo distribution of c-myc antisense oligodeoxynucleotides local delivered by gelatin-coated platinum-iridium stents in rabbits and its effect on apoptosis[J]. *Chin Med J*, 2004, **117** (2): 258-263

(此文编辑 文玉珊)