

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2007)15-05-0358-03

## 阿司匹林对血管平滑肌细胞增殖及增殖细胞核抗原表达的影响

涂兵<sup>1</sup>, 贺红<sup>2</sup>, 杨发林<sup>1,2</sup>, 刘贤锡<sup>1</sup>, 苏继新<sup>2</sup>

(山东大学 1. 医学院生物化学和分子生物学研究所; 2. 齐鲁医院, 山东省济南市 250012)

[关键词] 病理学与病理生理学; 阿司匹林; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 增殖细胞核抗原; 免疫细胞化学; 基因表达

[摘要] 目的 探讨阿司匹林对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响及相关机制。方法 体外培养大鼠主动脉平滑肌细胞, 用不同浓度的阿司匹林处理, 并且设置对照组, 采用 MTT 法检测阿司匹林对血管平滑肌细胞增殖活性的影响, 用免疫细胞化学和逆转录聚合酶链反应检测阿司匹林作用后血管平滑肌细胞中增殖细胞核抗原的表达。结果 较高浓度( $5 \times 10^{-3}$  mol/L) 的阿司匹林对血管平滑肌细胞的增殖有明显抑制作用( $P < 0.05$ ), 相对抑制率为 31.5%。与对照组相比, 该浓度组血管平滑肌细胞中增殖细胞核抗原的蛋白和 mRNA 表达量均显著降低( $P < 0.05$ )。结论 阿司匹林可能通过降低增殖细胞核抗原的表达来抑制血管平滑肌的增殖, 对心血管系统具有抗血小板聚集之外的保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Effects of Aspirin on the Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells and the Expression of Proliferating Cell Nuclear Antigen

TU Bing<sup>1</sup>, HE Hong<sup>2</sup>, YANG Fa-Lin<sup>1,2</sup>, LIU Xian-Xi<sup>1</sup>, and SU Ji-Xin<sup>2</sup>

(1. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, 2. Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Aspirin; Vascular Smooth Muscle Cell; Cell Proliferation; Proliferating Cell Nuclear Antigen; Immunocytochemistry; Gene Expression

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate effects of aspirin on the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and the mechanism involved. **Methods** The rat aortic smooth muscle cells were treated with various concentrations of aspirin for 24 hours, then MTT assay was performed to determine the number of the cells. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected by immunocytochemistry. In addition, reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was applied to detect the mRNA expression of PCNA. **Results** High concentration ( $5 \times 10^{-3}$  mol/L) of aspirin inhibited the proliferation of VSMC and the relative inhibition ratio was 31.5%. Compared with the control group, the expression of PCNA protein and mRNA in the  $5 \times 10^{-3}$  mol/L aspirin group were significantly decreased ( $312 \pm 48$  and  $0.663 \pm 0.035$ ,  $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Aspirin may arrest the proliferation of VSMC by inhibiting the expression of PCNA.

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的异常增殖在动脉粥样硬化、冠状动脉搭桥及冠状动脉支架内再狭窄等的发生中有着重要的作用<sup>[1,2]</sup>。阿司匹林作为抗血小板药物广泛用于缺血性心脏病和缺血性脑卒中等疾病的治疗<sup>[3]</sup>。有报道表明高浓度的阿司匹林可抑制一些细胞的增殖,且这种抑制作用不是通过抑制环氧合酶(cyclooxygenase, COX)和前列腺素(prostaglandin, PG)的合成<sup>[4]</sup>。但目前有关阿司匹林对 VSMC 影响的研究不多,其

内在的机制也不清楚。本文观察阿司匹林对体外培养的大鼠 VSMC 增殖和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达的影响,研究其对 VSMC 增殖的作用并对涉及的机制进行探讨。

## 1 材料和方法

## 1.1 主要材料和试剂

血管平滑肌细胞(VSMC)由 Wistar 大鼠主动脉分离所得;DMEM 培养基为 Gibco 公司产品;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和小牛血清(fetal calf serum, FCS)购自杭州四季青公司;MTT、阿司匹林为美国 Sigma 公司产品;羊抗鼠 PCNA 一抗购自北京中山生物技术公司,免疫组织化学二抗 DAB 显色试剂盒购自晶美生物公司,Trizol 购自上海生工,RT 试剂盒

[收稿日期] 2007-01-23 [修回日期] 2007-03-15

[基金项目] 山东省自然科学基金(Y2005C50);济南市青年科技明星计划(60143)

[作者简介] 涂兵,硕士研究生,研究方向为心血管分子生物学, E-mail 为 tubing216@gmail.com。贺红,博士,副教授,主要从事绝经后女性心血管病研究, Email 为 hehong@medmail.com.cn。通讯作者刘贤锡,教授,博士研究生导师, E-mail 为 xianxi@sdu.edu.cn。

购自晶美生物公司,PCR 试剂盒是 Takara 公司的产品。

## 1.2 大鼠血管平滑肌细胞培养

由 Wistar 大鼠主动脉分离 VSMC<sup>[5]</sup>,放入含 10%FBS、 $10^5$  u/L 青霉素和  $10^5$  u/L 链霉素的 DMEM 培养基中,于 5% CO<sub>2</sub>、37℃温箱中培养,用 0.25% 的胰酶传代。光镜下观察细胞呈峰—谷状表现,经肌动蛋白抗体免疫细胞化学鉴定后证实为 VSMC,4~7 代细胞用于实验。

## 1.3 MTT 法检测细胞增殖

将对数生长期的细胞以每孔  $10^4$  个种于 96 孔板中,待其长至 80% 汇合,换用不含血清和酚红的 DMEM 培养基培养 24 h,使细胞同步于 G<sub>0</sub> 期,然后换用 2%FCS 的 DMEM,加入阿司匹林,使终浓度分别为  $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ 、 $2 \times 10^{-3}$ 、 $5 \times 10^{-3}$  mol/L 四个处理组,并设对照组。培养 24 h 后,每孔加入 MTT(0.5 g/L)20  $\mu$ L 孵育 4 h,吸去上部液体,然后加入二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu$ L,轻微震荡 10 min 使沉淀完全溶解,用酶标仪在 570 nm 波长处测定吸光度。实验重复 6 次,每次设 6 复孔,结果取均值。相对抑制率 (IR, %) 按下列公式计算:

相对抑制率 =  $(1 - \text{实验组 OD 值} / \text{对照组 OD 值}) \times 100\%$ 。

## 1.4 免疫细胞化学法检测细胞中增殖细胞核抗原蛋白表达量

用 VSMC 制作细胞爬片,将对数生长期细胞以每孔  $10^5$  个接种于 6 孔板中,盖玻片预先放置在 6 孔板中,待长至 80% 汇合时用无血清无酚红 DMEM 静止 24 h,换含 2%FCS 的 DMEM,加入阿司匹林,分组同上。24 h 后,移去培养液,PBS 漂洗 3 次,4% 多聚甲醛固定,PBS 洗 3 次。用试剂盒中的山羊血清室温孵育 30 min,加一抗置湿盒中 4℃孵育 12 h,然后按照试剂盒说明书加二抗,显色,复染。在 100 倍视野下随机选取细胞爬片上不同部位的 5 个视野,用 Simple PCI 图象分析软件对各组免疫细胞化学结果进行分析,计算阳性反应细胞平均吸光度值(A)。

## 1.5 逆转录聚合酶链反应检测细胞中增殖细胞核抗原 mRNA 表达量

细胞经不同浓度阿司匹林(分组为  $10^{-3}$ 、 $2 \times 10^{-3}$ 、 $5 \times 10^{-3}$  mol/L 三个处理组和对照组)处理 24 h 后,用 Trizol 提取总 RNA,具体操作步骤按照说明书。用紫外分光光度法测定 RNA 纯度和浓度。用  $\beta$ -actin 作内参,引物序列为上游 5'-GCG GAT GTC CAC GTC ACA CT-3',下游 5'-CCA CTG GCA TCG TGA TGG AG-3',扩增片段为 428 bp;PCNA 引物序列

为上游 5'-GAC ACA TAC CGC TGC GAT CG-3',下游 5'-TCA CCA CAG CAT CTC CAA TAT-3',扩增片段为 307 bp。按照试剂盒说明书逆转录合成 cDNA 后,PCNA 和  $\beta$ -actin 同管进行 PCR 扩增。50  $\mu$ L 反应体系含 5  $\mu$ L 2  $\mu$ mol/L 的上游及下游引物,4  $\mu$ L 25 mmol/L Mg<sup>2+</sup>,3  $\mu$ L 10 mmol/L dNTP,1.25 u Taq DNA 聚合酶。PCR 反应条件为 94℃预变性 5 min 后,94℃变性 40 s  $\rightarrow$  60℃退火 40 s  $\rightarrow$  72℃延伸 1 min,共 28 个循环。PCR 产物在含 0.5 g/L EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。应用凝胶成像分析系统(Bio-rad)对条带进行半定量分析,PCNA 基因的表达量通过扩增的  $\beta$ -actin 表达进行校正,即以 PCNA/ $\beta$ -actin 比值作为 PCNA 基因表达相对水平。

## 1.6 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,各实验组间采用配对  $t$  检验,组内数据采用单因素方差分析。

# 2 结果

## 2.1 阿司匹林对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用

与对照组相比,阿司匹林处理组 VSMC 增殖受到抑制,并且呈现出浓度依赖趋势, $5 \times 10^{-3}$  mol/L 阿司匹林能明显抑制 VSMC 的增殖 ( $P < 0.05$ ,表 1)。

表 1. 阿司匹林对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用

阿司匹林浓度	OD 值	相对抑制率
对照组	0.426 $\pm$ 0.073	
$10^{-4}$ mol/L	0.465 $\pm$ 0.102	0
$10^{-3}$ mol/L	0.360 $\pm$ 0.044	15.5%
$2 \times 10^{-3}$ mol/L	0.357 $\pm$ 0.032	16.2%
$5 \times 10^{-3}$ mol/L	0.292 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>	31.5%

a 为  $P < 0.05$ ,与对照组比较。

## 2.2 阿司匹林对增殖细胞核抗原蛋白表达的影响

增殖细胞核抗原(PCNA)免疫阳性染色位于细胞核,呈棕褐色,核着色深浅不一(图 1)。图象分析结果表明,与对照组(吸光度为  $429 \pm 46$ )相比, $5 \times 10^{-3}$  mol/L 阿司匹林作用后 PCNA 表达(吸光度为  $312 \pm 48$ )明显下降 ( $P < 0.05$ ),而  $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$  和  $2 \times 10^{-3}$  mol/L 组的 PCNA 表达(吸光度分别为  $386 \pm 71$ 、 $407 \pm 63$  和  $394 \pm 55$ )无明显变化 ( $P > 0.05$ )。

## 2.3 阿司匹林对增殖细胞核抗原 mRNA 表达量的影响

对照组和不同浓度阿司匹林处理组均可检测到 PCNA mRNA 的条带(图 2)。各条带和预期的 PCNA

的 PCR 产物大小相符。与对照组比 ( $0.781 \pm 0.028$ ),  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 阿司匹林组 PCNA mRNA 表达 ( $0.663 \pm 0.035$ ) 降低 ( $P < 0.05$ ), 而较低浓度 ( $10^{-3}$  mol/L 和  $2 \times 10^{-3}$  mol/L) 阿司匹林组 PCNA mRNA 表达 (分别为  $0.807 \pm 0.221$  和  $0.834 \pm 0.103$ ) 与对照组比差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

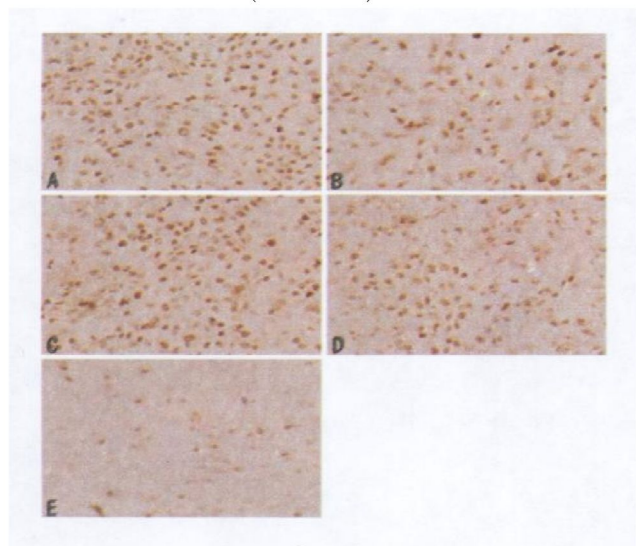


图 1. 不同浓度阿司匹林对增殖细胞核抗原表达的影响 ( $\times 100$ ) A 为对照组, B、C、D 和 E 分别为  $10^{-4}$ 、 $10^{-3}$ 、 $2 \times 10^{-3}$  mol/L 和  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 阿司匹林组。

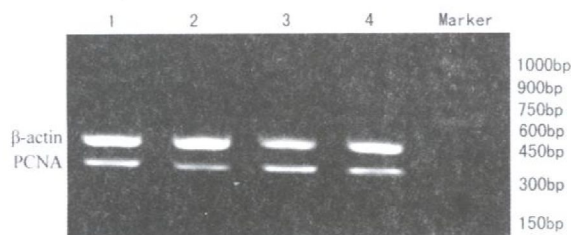


图 2. 不同浓度阿司匹林作用 24 h 后增殖细胞核抗原 mRNA 表达的变化 1 为对照组, 2~4 依次为  $5 \times 10^{-3}$ 、 $2 \times 10^{-3}$  和  $10^{-3}$  mol/L 阿司匹林组。

### 3 讨论

阿司匹林除了抗血小板聚集作用以外, 还有抑制炎症、影响纤维蛋白和一氧化氮生成、抗动脉粥样硬化、抗氧化和对抗自由基等作用<sup>[6]</sup>。Marra 等<sup>[7]</sup>报道较高浓度的阿司匹林 ( $5 \times 10^{-3}$  mol/L) 抑制 VSMC 增殖, 可能与抑制 P21 和 P27 蛋白的表达有关; Law 等<sup>[8]</sup>报告该抑制作用可能和上调核因子  $\kappa B$  (nuclear factor- $\kappa B$ , NF- $\kappa B$ ) 有关, 国内也有类似的报道<sup>[9]</sup>。本研究采用 MTT 法检测阿司匹林对培养的 VSMC 增殖的影响, 结果表明高浓度的阿司匹林可抑制其增殖能力, 和上述研究结果一致。于雪梅等<sup>[10]</sup>认为这种抑制作用并非细胞毒性所致, 我们对其可能机

制作了进一步的探讨。

增殖细胞核抗原(PCNA) 又称周期蛋白, 是一种与细胞增殖周期有关的核内糖蛋白, 是 DNA 复制的必须成分, 其表达与细胞增殖活性有关<sup>[11]</sup>, 已成为评价细胞增殖状态的一项客观指标。静止细胞中 PCNA 含量相当少,  $G_1$  期开始明显增加, S 期达到高峰,  $G_2$  期和 M 期明显下降<sup>[12]</sup>。免疫细胞化学检测结果表明,  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 的阿司匹林可抑制 PCNA 蛋白的表达, 和 MTT 结果一致。提示阿司匹林对 VSMC 增殖的抑制作用可能与此有关。

本实验还运用 RT-PCR 检测阿司匹林作用 24 h 后 VSMC 中 PCNA mRNA 的改变。结果发现  $5 \times 10^{-3}$  mol/L 阿司匹林能显著抑制体外培养的血管平滑肌细胞 PCNA mRNA 的表达, 与免疫细胞化学检测结果及 MTT 结果一致。提示阿司匹林抑制 PCNA 的表达可能最早发生在 mRNA 水平。

总之, 本研究首次发现较高浓度 ( $5 \times 10^{-3}$  mol/L) 阿司匹林可以降低细胞核内 PCNA 表达, 提示阿司匹林可能通过抑制 PCNA 表达而抑制 VSMC 增殖。其进一步的机制及是否涉及其它的细胞信号途径有待更深入的研究探讨。

### [参考文献]

- [1] Lusis AJ. Atherosclerosis [J]. *Nature*, 2000, **407** (6801): 233-241.
- [2] Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. *Nature*, 2002, **420** (6917): 868-874.
- [3] Colwell JA. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events [J]. *Drugs Today*, 2006, **42** (7): 467-479.
- [4] Aas AT, Tonnessen TI, Brun A, Salford LG. Growth inhibition of rat glioma cells in vitro and in vivo by aspirin [J]. *J Neurooncol*, 1995, **24** (2): 171-180.
- [5] 王关嵩, 杨晓静, 钱桂生, 胡义德, 兰阳君. 大鼠血管平滑肌细胞分离培养的探讨[J]. 第三军医大学学报, 1998, **20** (4): 348.
- [6] Aude YW, Mehta JL. Nonplatelet-mediated effects of aspirin [J]. *Drugs Today (Barc)*, 2002, **38** (7): 501-507.
- [7] Marra DE, Simoncini T, Liao JK. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by sodium salicylate mediated by upregulation of p21(Waf1) and p27 (Kip1) [J]. *Circulation*, 2000, **102** (17): 2124-2130.
- [8] Law BK, Walther-Law ME, Entingh AJ, Clytil A, Aakre ME, Norgaard P, et al. Salicylate-induced growth arrest is associated with inhibition of p70s6k and downregulation of c-myc, cyclin D1, cyclin A, and proliferating cell nuclear antigen [J]. *J Biol Chem*, 2000, **275** (49): 38261-267.
- [9] 刘振华, 刘亚杰, 刘卉, 欧阳平, 赖文岩, 许顶立. 阿司匹林抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖及 p44/42MAPK 的表达[J]. 中华神经医学杂志, 2005, **4** (5): 452-454.
- [10] 于雪梅, 冯萍, 金慧英. 阿司匹林抗大鼠血管平滑肌增殖及与细胞周期的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2005, **21** (6): 1080.
- [11] Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome [J]. *Int J Radiat Biol*, 2001, **77** (10): 1007-021.
- [12] Takasakiy. A nuclear antigen associated with cell proliferation and blast transformation: its distribution in synchronized cells [J]. *Exp Med*, 1981, **154** (6): 1899.

(此文编辑 许雪梅)