

通脉汤方对实验性动脉粥样硬化家兔胸主动脉表皮生长因子受体和 $c-myc$ 基因表达的影响

张娟¹, 孙明², 周宏研²

(中南大学湘雅医院 1. 急诊科, 2. 心内科, 湖南省长沙市 410008)

[关键词] 中药学; 通脉汤方/药理作用; 动脉粥样硬化模型; 表皮生长因子受体; 原癌基因 $c-myc$; 基因表达; 实验动物, 家兔

[摘要] 目的 探讨通脉汤方对实验性动脉粥样硬化家兔胸主动脉表皮生长因子受体和 $c-myc$ 基因表达的影响。方法 日本大耳白兔 40 只, 随机分为 4 组: 对照组 10 只, 以普通饲料喂养, 每日两次; ④模型组 10 只, 以高胆固醇饲料[胆固醇 0.5 g/(kg·d)、蛋黄 2 g/(kg·d) 和猪油 2 g/(kg·d)] 喂养, 每日两次; ④通脉汤方低剂量组(简称低剂量组) 10 只, 高胆固醇饲料喂养(剂量同模型组), 同时予通脉汤方灌胃, 每只剂量相当于生药 7.3 g/(kg·d), 分上下午两次给药; 通脉汤方高剂量组(简称高剂量组) 10 只, 高胆固醇饲料喂养(剂量同模型组), 同时予通脉汤方灌胃, 每只剂量相当于生药 21.9 g/(kg·d), 分上下午两次给药; 共喂养 16 周。运用免疫组织化学染色法检测主动脉表皮生长因子受体的表达, 同时用内参比逆转录聚合酶链反应定量分析 $c-myc$ mRNA 在主动脉的表达。结果 模型组主动脉表皮生长因子受体及 $c-myc$ mRNA 表达显著高于对照组(分别为 0.327 ± 0.030 比 0.209 ± 0.006 , $P < 0.01$; 0.52 ± 0.11 比 0.34 ± 0.07 , $P < 0.01$); 高剂量组主动脉表皮生长因子受体及 $c-myc$ mRNA 表达显著低于模型组(分别为 0.242 ± 0.014 比 0.327 ± 0.030 , $P < 0.01$; 0.41 ± 0.07 比 0.52 ± 0.11 , $P < 0.05$); 低剂量组与模型组比较无显著差异(分别为 0.301 ± 0.027 比 0.327 ± 0.030 $P > 0.05$; 0.44 ± 0.09 比 0.52 ± 0.11 $P > 0.05$)。结论 动脉粥样硬化时促进血管平滑肌细胞增殖的表皮生长因子受体及原癌基因 $c-myc$ mRNA 表达增强。④通脉汤方通过抑制血管壁表皮生长因子受体及 $c-myc$ 基因的表达, 从而抑制血管平滑肌细胞增殖。

[中图分类号] R28

[文献标识码] A

Effect of Tongmai Recipe on Epidermal Growth Factor Receptor and Protooncogene $c-myc$ mRNA Expression in Aorta of Atherosclerotic Rabbit

ZHANG Juan, SUN Ming, and ZHOU Hong-Yan

(Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410008, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Epidermal Growth Factor Receptor; Protooncogene $c-myc$; Gene Expression

[ABSTRACT] **Aim** Aim To study effect of Tongmai recipe on epidermal growth factor receptor and protooncogene $c-myc$ mRNA expression in aorta of atherosclerotic rabbit. **Methods** Forty rabbits were randomly divided into four groups: Control group: 10 rabbits were fed with common food twice daily; ④Model group: 10 rabbits were fed with high cholesterol diet supplemented by cholesterol 0.5 g/(kg·d), yolk 2 g/(kg·d) and lard 2 g/(kg·d); ④Low dosage Tongmai recipe administration group (LT group): 10 rabbits were fed with high cholesterol diet as well as in model group, simultaneously administrated with Tongmai recipe at a dosage of 7.3 g/(kg·d), High dosage Tongmai recipe administration group (HT group): 10 rabbits were fed with high cholesterol diet as well as in model group, simultaneously administrated with Tongmai recipe at a dosage of 21.9 g/(kg·d). After 16 weeks, epidermal growth factor receptor were assessed by immunohistochemistic assays. $c-myc$ mRNA in aorta were quantified with semiquantitative RT-PCR methodology. **Results** we found that in model group, accumulation of epidermal growth factor receptors and mRNA expression of protooncogene $c-myc$ in aorta significantly increased as compared to those in control group (0.327 ± 0.030 vs 0.209 ± 0.006 , $P < 0.01$; 0.52 ± 0.11 vs 0.34 ± 0.07 , $P < 0.01$). In HT group, they significantly decreased as compared to those in model group (0.242 ± 0.014 vs 0.327 ± 0.030 , $P < 0.01$; 0.41 ± 0.07 vs 0.52 ± 0.11 , $P < 0.05$). In LT group, there was no significant change as compared to those in model group (0.301 ± 0.027 vs 0.327 ± 0.030 $P > 0.05$; 0.44 ± 0.09 vs 0.52 ± 0.11 $P > 0.05$). **Conclusion** Expression of epidermal growth factor receptor and $c-myc$ which promoted proliferation of vascular smooth muscle cells increased in atherosclerotic individuals. ④Tongmai recipe may possess the role of depression of proliferation of vascular smooth muscle cells by depressing the expression of epidermal growth factor receptor and protooncogene $c-myc$.

[收稿日期] 2007-05-11

[修回日期] 2007-06-15

[作者简介] 张娟, 博士, 主治医师, 联系电话 0731-4327090 或 13975140811, E-mail 为 doctorjoy690228@sina.com。孙明, 主任医师, 教授, 博士研究生导师。周宏研, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师。

大量的实验研究表明在动脉粥样硬化的病理生理过程中,血管平滑肌细胞增殖起着重要的作用^[1],表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)和原癌基因 $c-myc$ 的过度表达可促进血管平滑肌细胞增殖^[2]。中药方剂通脉汤方是我院在多年的临床实践中总结出来的,该方由红参、麦冬、生地、郁金、枸杞、茵陈、首乌等组成,本文旨在研究经高胆固醇饮食致动脉粥样硬化的日本大耳白兔 EGFR 和 $c-myc$ mRNA 的表达的关系及通脉汤方对它们的影响,探讨动脉粥样硬化中血管平滑肌增殖及通脉汤方的影响。

1 材料和方法

1.1 动物及其饲养

日本大耳白兔 40 只,雌雄各半,随机分为 4 组:对照组 10 只,体重 3.32 ± 0.96 kg,普通饲料喂养,每天两次;④模型组 10 只,体重 3.28 ± 0.93 kg,高胆固醇饲料[胆固醇 0.5 g/(kg·d),蛋黄 2 g/(kg·d),猪油 2 g/(kg·d)]喂养,每天两次;④通脉汤方低剂量治疗组(简称低剂量组)10 只,体重 3.30 ± 0.98 kg,高胆固醇饲料喂养(剂量同模型组),同时予通脉汤方煎剂灌胃,根据体表面积系数计算剂量相当于生药 7.3 g/(kg·d),每天两次给药;通脉汤方高剂量治疗组(简称高剂量组)10 只,体重 3.36 ± 0.90 kg,高胆固醇饲料喂养(剂量同模型组),同时予通脉汤方灌胃,剂量相当于生药 21.9 g/(kg·d),每天两次给药;共喂养 16 周。

1.2 标本采集

所有动物在喂养 16 周后用 25% 乌拉坦按 4 mg/kg 静脉注射麻醉,取出胸主动脉,分为二段,取一段置于 10% 的中性福尔马林固定液中,石蜡包埋后,切成 4 mm 厚的石蜡切片,用于免疫组织化学染色和 HE 染色;④另一段胸主动脉分别用生理盐水和 0.1% 焦碳酸二乙酯(DEF)水冲洗一次,置于液氮中保存,用于 RT-PCR。

1.3 表皮生长因子受体表达的检测

采用 SABC 法,EGFR 兔抗及即用型 SABC 免疫组织化学试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供,石蜡切片置烤箱 60°C 60 min,常规脱蜡脱水,3% 过氧化氢室温 20 min 以灭活内源性过氧化物酶,蒸馏水洗后,将切片浸入 10 mmol/L, pH 6.0 枸橼酸盐缓冲液中,微波炉煮沸 \rightarrow 冷却,循环两次, PBS 洗后加曲酮 X100,室温下放置 15 min, PBS 洗,再加 10% 正常羊血清,置 37°C 20 min,封闭非特异性免疫球

蛋白受体,以消除背景色。然后滴加抗兔 EGFR(1:100),置 37°C 2 h, PBS 洗后,加生物素标记二抗,置 37°C 20 min, PBS 洗后,加链霉亲和素-过氧化物酶(SABC),置 37°C 20 min, PBS 洗后, DAB 显色(镜下控制反应时间),蒸馏水洗,苏木素轻度复染。最后脱水,中性树脂封片,镜下观察,同时用 PBS 代替一抗作空白对照,结果为阴性,阳性结果为细胞膜或浆染成棕黄色或黄色。将免疫组织化学结果进行照相,运用 HPIAs1000 高清晰度彩色病理图文分析系统对主动脉 EGFR 染色进行定量分析。

1.4 主动脉组织 $c-myc$ mRNA 表达的检测

1.4.1 主动脉组织总 RNA 的提取 用 Trizol 一步法提取组织总 RNA。步骤是:取主动脉组织约 100 mg 于匀浆器内,加 Trizol 1 mL 快速匀浆,室温放置 5 min。加氯仿 0.2 mL, 震荡 15 s, 室温放置 2~3 min, 用 Eppendorf 管 4°C 下 12 kr/min 离心 15 min。吸取上清液于另一 Eppendorf 管中,加入等体积异丙醇,室温放置 10 min 后, 4°C 下 12 kr/min 离心 10 min。弃去上清液,加 1 mL 75% 乙醇(无水乙醇+DEPC 水新鲜配置)洗涤沉淀, 4°C 下 7.5 kr/min 离心 5 min, 弃去乙醇,空气中干燥 10 min, 加 20 μL 0.1% DEPC 水溶解。用紫外分光核酸蛋白分析仪测定纯度,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性后, -80°C 保存备用。

1.4.2 逆转录 在 0.5 mL PCR 反应管中加入 4 μg 总 RNA, 寡核苷酸 Oligo(dT) 18 1 μL , 用 DEPC 水补至体积为 17 μL 后, 65°C 变性 5 min, 冰上骤冷。上述反应管短暂离心后,加 $5 \times \text{RT}$ 缓冲液 6 μL , 40 MU/L 的 RNA 酶抑制剂 1 μL , 10 mmol/L dNTP 1.5 μL , DTT 3 μL , 200 MU/L 逆转录酶 1.5 μL , 短暂离心后, 37°C 温育 1 h。反应结束后, 95°C 变性 5 min, 冰上骤冷后用于 PCR 扩增或 -20°C 保存备用。

1.4.3 聚合酶链反应扩增 $c-myc$ 上游引物 5'-TCC ACC CAT CAG CAC AAT TAG-3', $c-myc$ 下游引物 5'-TTT GTG TTT CAA CTG TTC TCG C-3'。扩增产物长 284 bp。PCR 总体系 25 μL , 其它组成为 $10 \times$ 缓冲液 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 1.22 μL , 10 mmol/L dNTP 1 μL , cDNA 1 μL , p22phox 或 $c-myc$ 上下游引物(5 $\mu\text{mol/L}$) 各 2 μL , GAPDH 上下游引物(5 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.5 μL , TaqDNA 聚合酶(5 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 双蒸水 13 μL , 加 20 μL 无菌石蜡油覆盖于液面上。p22phox 的反应条件为 95°C 预变性 5 min 后, 94°C 变性 1 min \rightarrow 56°C 退火 1 min \rightarrow 72°C 延伸 1 min, 循环 30 次后, 72°C 再延伸 10 min, 4°C 保存。 $c-myc$ 的反应条件为 95°C 预变性 5 min 后, 94°C 变性 1 min \rightarrow 58°C 退火 1 min \rightarrow

72℃延伸 1 min, 循环 30 次后, 72℃再延伸 10 min, 4℃保存。阴性对照为 RNA 中加 RNA 酶(Promega, 25 ku/L), 37℃水浴 30 min, 然后行 RT-PCR。

1.4.4 反应产物电泳、照相及半定量分析 5% 琼脂糖凝胶中加溴乙锭(10 g/L)使其终浓度为 0.5 mg/L, 成胶后置于电泳槽, 加入 0.5×TBE 缓冲液, 取 5 μL PCR 产物加 2 μL 载样缓冲液(40% 蔗糖溶液和 0.25% 溴酚蓝)混匀点样, 在恒压(100 V)下电泳 30 min, 最后在紫外光下观察和记录结果并照相保存。

1.4.5 结果判定 以肉眼能见到目的片断和 GAPDH 的 PCR 扩增带为阳性, 以未见到目的片断和 GAPDH 的 PCR 扩增带为阴性。在 Eagle Eye ④凝胶成像分析系统扫描定量, 读取各带的积分光密度值(OD)。根据 p22phox、c-myc 带和 GAPDH 带的 OD 比值分析 c-myc mRNA 的表达水平。

1.5 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件储存和分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间均数的比较用独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性统计学意义。

2 结果

2.1 各组兔主动脉组织病理学改变(图 1)

光学显微镜下各组兔主动脉组织结构见图 1。可见对照组主动脉内膜光滑, 未见泡沫细胞及脂质斑块(图 1A)。而模型组主动脉有明显的脂质斑块形成, 光学显微镜下可见泡沫细胞(图 1B 箭头所示), 表明模型复制成功。低剂量通脉汤方组可见大量泡沫细胞(图 1C), 而高剂量通脉汤方组内膜较光滑, 泡沫细胞少见(图 1D)。

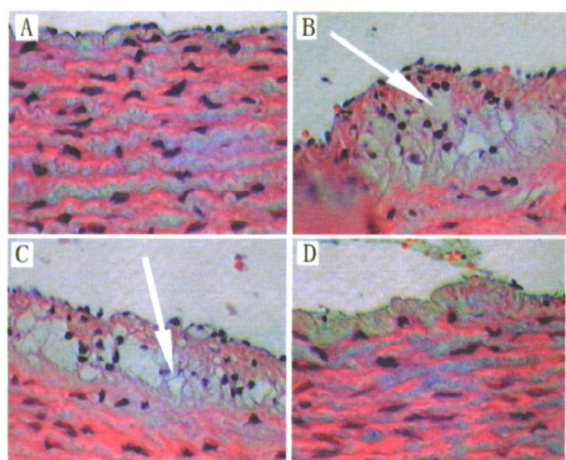


图 1. 各组主动脉 HE 染色照片(×400) A 为对照组, B 为模型组, C 为低剂量组, D 为高剂量组。

2.2 各组兔主动脉表皮生长因子受体的表达比较

兔主动脉组织表达 EGFR 的检测结果见图 2 和表 1。可见模型组主动脉 EGFR 表达均较对照组高($P < 0.01$); 高剂量通脉汤方组主动脉 EGFR 表达均较模型组显著降低($P < 0.01$); 低剂量通脉汤方组与模型组相比无显著差异($P > 0.05$)。

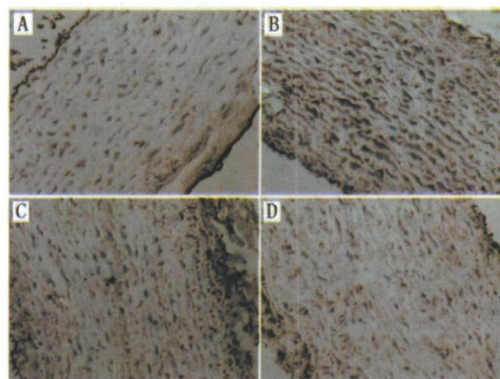


图 2. 各组主动脉表皮生长因子受体的表达(×200) A 为对照组, B 为模型组, C 为低剂量组, D 为高剂量组。

表 1. 各组兔主动脉表皮生长因子受体免疫组织化学染色评分的比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	EGFR 平均光密度
对照组	10	0.209 ± 0.006
模型组	10	0.327 ± 0.030 ^b
低剂量组	10	0.301 ± 0.027 ^b
高剂量组	10	0.242 ± 0.014 ^{bd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.3 各组兔主动脉 c-myc mRNA 的表达水平

用 RT-PCR 检测兔主动脉 c-myc mRNA 表达的结果见图 3 和表 2。可见模型组 c-myc mRNA 表达显著高于对照组($P < 0.01$); 高剂量通脉汤方组 c-myc mRNA 表达较模型组显著降低($P < 0.05$), 但仍高于对照组($P < 0.01$); 而低剂量通脉汤方组 c-myc mRNA 表达较模型组有所降低, 但无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2. 各组兔主动脉 c-myc mRNA 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	c-myc/GAPDH
对照组	10	0.34 ± 0.07
模型组	10	0.52 ± 0.11 ^b
低剂量组	10	0.44 ± 0.09 ^a
高剂量组	10	0.41 ± 0.07 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

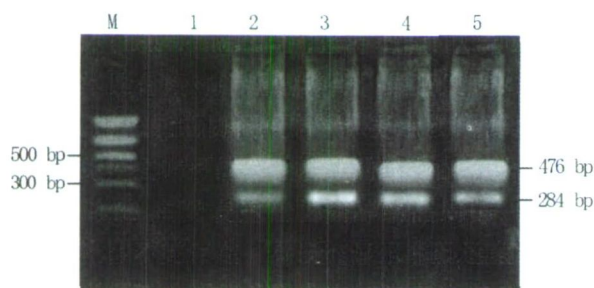


图 3. 4 组主动脉 $c\text{-myc}$ mRNA 表达产物电泳图 M 为 DNA Marker, 1 为阴性对照, 2 为对照组, 3 为模型组, 4 为低剂量通脉汤方组, 5 为高剂量通脉汤方组。

3 讨论

表皮生长因子受体是广泛存在于哺乳类细胞表面的膜受体, 由 N 端的胞外区、跨膜区和 C 端胞内区 3 部分组成, 它通过胞外区的配体结合结构域可以和表皮生长因子(EGF)或转化生长因子 α (TGF α) 特异性结合, 传递生长因子的信号, 影响细胞的生长或分化^[3]。

原癌基因 $c\text{-myc}$ 是一种重要的核蛋白调控基因, 在细胞生长调控、细胞分化和损伤修复过程中发挥重要作用。 $c\text{-myc}$ 基因表达 DNA 结合蛋白, 可促进与细胞增殖有关的基因开放, 从而产生细胞增殖效应。 $c\text{-myc}$ 基因的激活被认为是血管平滑肌细胞增殖的始动环节之一^[4]。

本文分别采用免疫组织化学染色法、RT-PCR 测定 EGFR 及 $c\text{-myc}$ mRNA 在主动脉的表达, 结果表明 As 模型组的 EGFR 及 $c\text{-myc}$ 基因表达较正常对照组明显增强。

李静等^[5]采用斑点印迹杂交及原位杂交技术观察血管通对试验家兔血管平滑肌细胞增殖相关基因 PDGF、 $c\text{-myc}$ 基因表达的影响, 结果高脂组 As 斑块内 PDGF mRNA 表达增强, 血管通组 PDGF mRNA 的表达较高脂组低, $c\text{-myc}$ mRNA 的表达情况与之一

致。近年来有报道补阳还五汤可使血清 LPO 降低, 而 SOD 明显升高, 同时还可抑制 PDGF mRNA 的表达, 以控制细胞的病理性增殖^[6]。

中药方剂通脉汤方是我院在多年的临床实践中总结出来的, 该方由红参、麦冬、生地、郁金、枸杞、茵陈、首乌等组成, 以“补心肾, 理气化痰”为原则, 用于治疗冠心病多年, 并进行了一系列的临床研究, 证明疗效显著^[7]。本文分别采用免疫组织化学染色法及 RT-PCR 检测主动脉 EGFR 和 $c\text{-myc}$ 基因的表达, 结果显示高剂量通脉汤方治疗组 EGFR 及 $c\text{-myc}$ mRNA 表达较模型组显著降低, 表明通脉汤方能抑制血管平滑肌增殖, 与上述报道一致, 其机制可能与降低体内活性氧水平有关。

[参考文献]

- [1] Frank GD, Eguchi S. Activation of tyrosine kinases by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: significance and involvement of EGF receptor transactivation by angiotensin II [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5 (6): 771-780.
- [2] 尹小龙, 朱艳霞, 姚雨凡, 雷芸. 表皮生长因子受体在血管紧张素 II 促血管平滑肌细胞增殖中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14 (9): 783-785.
- [3] Higuchi S, Ohtsu H, Suzuki H, Shirai H, Frank GD, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2007, 112 (8): 417-428.
- [4] Kawakami A, Tanaka A, Chiba T, Nakajima K, Shimokado K, Voshida M. Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves epidermal growth factor receptor transactivation [J]. *Circulation*, 2003, 108 (21): 2679-688.
- [5] 李静, 张靖溥. 血管通对实验性动脉粥样硬化家兔血管壁血小板衍生生长因子 A、B 及 $c\text{-myc}$ 基因表达的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1995, 15 (1): 33-35.
- [6] 谢全锦, 侯灿. 补阳还五汤对球囊扩张主动脉后再狭窄其内皮 PDGFR 和 SOD-1 基因表达的探讨 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1997, 17 (10): 611-613.
- [7] 周宏研, 黎盛蓉, 王振华. 通脉汤方治疗冠心病心绞痛 40 例疗效分析 [J]. *湖南医学院学报*, 1979, 4 (1): 52-54.
- [8] 张民, 王建华, 甘露. 枸杞多糖 24 组成成分及其生理活性研究 [J]. *食品与发酵工业*, 2003, 129 (12): 22-24.

(此文编辑 胡必利)