

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2000)-04-0319-03

川芎嗪对血管平滑肌细胞增殖及表达 $c-myc$ 基因的影响王宏伟¹, 张 露², 赵华月³

(华中科技大学同济医学院附属同济医院 1. 儿科; 2. 药剂科; 3. 心内科, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 川芎嗪; 肌, 平滑, 血管; 细胞增殖; 凝血酶; $c-myc$ 基因; 流式细胞术

[摘要] 为观察川芎嗪对血管平滑肌细胞增殖的影响, 在建立凝血酶诱导的体外培养的兔主动脉血管平滑肌细胞增殖模型后, 应用免疫细胞化学方法观察川芎嗪对血管平滑肌细胞表达 $c-myc$ 基因蛋白的影响; 并用流式细胞术观察了血管平滑肌细胞增殖周期的变化。结果发现, 川芎嗪能够显著抑制凝血酶诱导的血管平滑肌细胞 $c-myc$ 基因蛋白表达增加, 使血管平滑肌处于 G1 期的细胞数显著增多, S 期和 G2+M 期的细胞数显著减少。结果提示, 川芎嗪对凝血酶诱导的血管平滑肌细胞增殖有显著抑制作用, 其机制与抑制 $c-myc$ 基因表达有关。

[中图分类号] R284.1

[文献标识码] A

Effects of Tetramethylpyrazine on $c-myc$ Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

WANG Hong-Wei, ZHANG Lu, and ZHAO Hua-Yue

(Tongji Hospital of Tongji Medical University, Wuhan 430030, China)

MeSH Tetramethylpyrazine; Muscle, Smooth, Vascular; Proliferation; Thrombin; $c-myc$ Gene; Flow Cytometry**ABSTRACT** **Aim** The effects of tetramethylpyrazine (TMP) on vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferation were studied. **Methods** A cells proliferating model of rabbit aorta VSMC induced by thrombin were established; the effect of tetramethylpyrazine on $c-myc$ gene expression in VSMC was observed by immunocytochemical method; the effect of tetramethylpyrazine on proliferation cycle of VSMC was observed by flow cytometry technique. **Results** the highly expression of $c-myc$ gene protein induced by thrombin can be inhibited by tetramethylpyrazine significantly, and the cells numbers of G1 phase were increased and the cells numbers of G1+M phase were decreased markedly. **Conclusion** The VSMC proliferation induced by thrombin can be inhibited by tetramethylpyrazine significantly, and the inhibited $c-myc$ gene expression may contribute to the explanation of one of the mechanism of the inhibited VSMC proliferation.

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,

[作者简介] 王宏伟, 医学博士, 副教授、副主任医师, 1987~1990 年, 主要从事硝苯地平的心血管药理机制研究及青紫性先天性心脏病的凝血机制改变研究。1990~1998 年主要从事川崎病冠状动脉病变的发生机理及预防研究、中药穿心莲成分 API 抗血栓形成和抗动脉粥样硬化的分子机理研究。1999 年至今主要从事血脂代谢和脂肪细胞分化研究。1999~2000 年 6 月在加拿大麦吉尔大学皇家维多利亚医院心血管病研究室做博士后研究。现任同济医院儿科副主任、分子医学中心儿科心血管研究室主任, 中华医学会武汉市儿科学会常委, 中华医学会湖北省儿科分会委员, 中国临床医生杂志编委, 中国实用儿科杂志编委, 实用儿科临床杂志编委。现主持国家自然科学基金项目一项和卫生部科研基金项目一项, 主要参与卫生部重点学科项目基金课题一项。已完成同家自然科学基金项目一项。张露, 医学硕士, 药剂师。1997 年同济医科大学药理专业硕士毕业, 在同济医院任药剂师。赵华月, 1978 年起任同济医科大学心内科教授, 1984 年任博士研究生导师。80 年代以来, 主要从事冠心病和心力衰竭研究, 曾主持镁抗心肌缺血/再灌注损伤机理研究及穿心莲的心血管药理作用机制研究等国家自然科学基金课题二项和省部级课题多项。

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。晚近研究表明, 凝血酶具有血清源生长因子作用, 能够强烈诱导血管损伤部位的平滑肌细胞增殖, 在动脉粥样硬化的发生发展和血管成形术后再狭窄过程中起重要作用^[1]。本研究发现, 凝血酶能够诱导血管平滑肌细胞表达 $c-myc$ 基因蛋白^[2]。本文观察川芎嗪对凝血酶诱导的体外培养兔血管平滑肌细胞表达 $c-myc$ 基因蛋白和促血管平滑肌细胞增殖的影响, 旨在探讨川芎嗪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 主要试剂和仪器

α -凝血酶(Sigma 公司), $c-myc$ 基因蛋白单克隆抗体(Santa cruz 公司), LSAB 法免疫组织化学试剂

盒(Zymed 公司), 流式细胞仪(EPICS-751 型, 美国)。

1.2 兔主动脉平滑肌细胞培养及分组

按文献[3]方法取 4 周龄日本大耳白兔主动脉中膜平滑肌细胞进行原代和传代培养。在第 3 次传代培养前, 在培养瓶内置入 1 cm 消毒盖玻片, 当第三代平滑肌细胞生长达亚融合时, 依次分为 3 组:

对照组, M 199+ 10% 胎牛血清; ④凝血酶组, 同对照组培养基, 另加入 α 凝血酶 100 nmol/L; ④川芎嗪组, 同对照组培养基, 另加入 α 凝血酶 100 nmol/L 和川芎嗪 20 mg/L。在加入川芎嗪和/或 α 凝血酶后, 置 CO₂ 培养箱内培养 1 h, 将培养瓶内盖玻片小心取出, 置 0.1 nmol/L PBS 中轻洗后, 立即用冷丙酮固定 10 min, 置 -20℃ 保存备用。其余各组培养瓶内细胞继续培养 11 h, 然后用胰蛋白酶消化后离心, 弃去上清, 细胞用 70% 乙醇固定, 置 4℃ 冰箱备检。

1.3 免疫细胞化学染色

采用 LSAB 法, 按试剂盒操作说明进行各组平滑肌细胞的 $c-myc$ 蛋白免疫细胞化学染色。 $c-myc$ 蛋白单克隆抗体工作浓度为 1:200。阳性对照为已知 $c-myc$ 蛋白表达阳性的原发性肝癌组织切片, 阴性对照为已知阳性切片, 以 PBS 代替一抗时, $c-myc$ 蛋白染色呈阴性。采用 TJTY-300 型自动图像分析仪, 对各组阳性切片进行图像分析, 测定其平均吸光度值。

1.4 流式细胞术分析

样本离心, 弃去上清液, 采用溴化乙啶一步插入性 DNA 染色。每份样本细胞数调整到 $10^5/L$ 。按文献[4]方法测定各组血管平滑肌细胞的细胞周期构成, 了解其分裂增殖情况。每组标本每次计数 10 000 个细胞, 重复 6 次, 以细胞周期中各期细胞的多少表示结果。

1.5 统计方法

各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 免疫细胞化学染色结果

各组培养血管平滑肌细胞内均有 $c-myc$ 原癌基因蛋白的表达。阳性信号呈棕黄色粗细不匀颗粒, 位于细胞核内。对照组表达较弱; 凝血酶组 $c-myc$ 蛋白表达明显增强, 表现为胞核着色明显加深; 川芎嗪组 $c-myc$ 蛋白表达明显受到抑制, 表现为胞核阳性着色明显变淡(图 1, Figure 1)。各组血管平滑肌细胞内 $c-myc$ 蛋白表达强度的平均吸光度值见表 1

(Table 1)。

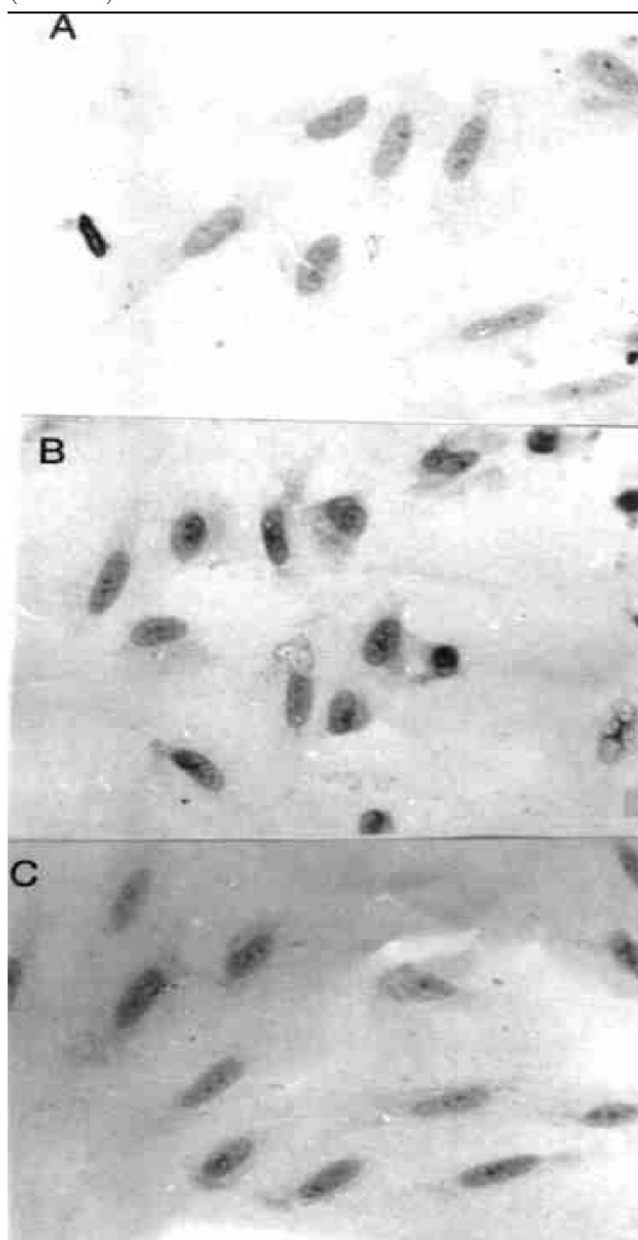


图 1 $c-myc$ 原癌基因在血管平滑肌细胞核内的表达 ($\times 200$)

Figure 1 The expression of $c-myc$ oncogene protein in nucleus of vascular smooth muscle cells (LSAB $\times 200$). A: control group; B: thrombin (100 nmol/L) group; C: tetraetnypyrazine (100 nmol/L) + thrombin (20 mg/L) group.

2.2 流式细胞术检测结果

从表 2(Table 2) 可见, 与对照组比较, 凝血酶组 VSMC 处于细胞周期中 S 期和 G₂+ M 期的细胞数显著增多 ($P < 0.01$)。川芎嗪+ 凝血酶组的 VSMC 处于 G₁ 期的细胞数则较凝血酶组明显增多 ($P < 0.01$), S 期和 G₂+ M 期的细胞数明显减少 ($P < 0.01$)。

表 1 三组血管平滑肌细胞表达 $c-myc$ 基因蛋白的平均吸光度值($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The average optical density of expression of $c-myc$ oncogene protein in vascular smooth muscle cells in the three groups

Groups	Number of cell	$c-myc$
Control	36	0.0660 \pm 0.0071
Thrombin	34	0.1965 \pm 0.0108 ^a
TMP+ thrombin	37	0.1274 \pm 0.0107 ^b

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with thrombin group.

表 2 三组血管平滑肌细胞的细胞周期构成($\bar{x} \pm s$, $n = 1000$)

Table 2 The constitution of cell cycle of vascular smooth muscle cells in the three groups

Groups	G ₁	S	G ₂ + M
Control	6343 \pm 197	2714 \pm 156	682 \pm 79
Thrombin	2375 \pm 134 ^a	6072 \pm 141 ^a	1553 \pm 137 ^a
TMP+ thrombin	5412 \pm 168 ^b	3820 \pm 151 ^b	776 \pm 68 ^b

a: $P < 0.01$, compared with control group; b: $P < 0.01$, compared with thrombin group.

3 讨论

川芎是常用的活血化瘀类中药,与其它中药组成方剂,广泛用于高血压、冠心病和脑中风的防治。川芎嗪是从川芎中分离提纯的有效成分,其化学结构为四甲基吡嗪,有较广泛的药理作用。本研究室晚近研究证明,川芎嗪能够预防家兔髂动脉去内皮后内膜增生^[5]。本文研究发现,川芎嗪能够抑制凝血酶诱导的体外培养的兔主动脉平滑肌细胞增殖,使处于 G₁ 期的平滑肌细胞增多。表明川芎嗪有抗血管平滑肌细胞增殖作用,可能是其预防家兔髂动脉去内皮后内膜增生的机制之一。

$c-myc$ 原癌基因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。 $c-myc$ 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。 $c-myc$ 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^[6]。本文结果显示,川芎嗪能够抑制凝血酶诱导的血管平滑肌细胞表达 $c-myc$ 基因,为探索川芎嗪抗血管平滑肌细胞增殖的分子机制提供了新的实验依据。

冠状动脉腔内成形术是治疗冠状动脉严重粥样硬化性狭窄的重要方法。在冠状动脉成形部位,再狭窄的发生率高达 30% 以上,并且目前尚无有效的临床防治药物^[7]。再狭窄的主要病理改变是成形部位动脉内膜平滑肌细胞增殖,因此,人们试图从中草药中筛选抗血管平滑肌细胞增殖的药物成分,以期冠状动脉成形术后再狭窄的防治开辟新途径。本实验研究结果提示,川芎嗪对预防血管成形术后再狭窄可能有临床应用价值。

参考文献

- [1] Fager G. Thrombin and proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 1995, **77**: 645
- [2] 王华,王宏伟,熊一力,等. 凝血酶对平滑肌细胞增殖和 $c-myc$ 基因表达的影响 [J]. 同济医科大学学报, 1998, **27**(增刊): 73
- [3] 邓仲端,邱红明,瞿智玲,等. 巨噬细胞源性趋化因子致平滑肌细胞迁移 [J]. 中华病理学杂志, 1993, **22**: 163
- [4] Gong J, Li X, Traganos F, et al. Expression of G₁ and G₂ cyclines measured in individual cells by multiparameter cytometry: a new tool in the analysis of the cell cycle [J]. *Cell Prolif*, 1994, **27**: 357
- [5] 周小明,陆再英,赵华月,等. 川芎嗪预防去内皮后内膜增生的实验研究 [J]. 中华老年医学杂志, 1997, **16**(4): 244
- [6] Sun LQ, Cairns MJ, Gerlach WL, et al. Suppression of smooth muscle cell proliferation by a $c-myc$ RNA-cleaving deoxyribozyme [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**(24): 17 236
- [7] Schmitt JF, Keogh MC, Dennehy U, et al. Tissue selective expression of dominant-negative proteins for the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Gen Ther*, 1999, **6**(6): 1 184

(此文 2000-01-26 收到, 2000-10-26 修回)

(此文编辑 胡必利 朱雯霞)