

## 内皮素灌流可导致大鼠离体主动脉 c-myc 和 hsp70 基因表达增加

刘宗汉 张巧云\* 林 拓 杨和平

(衡阳医学院心血管病研究所 生理学教研室 衡阳 421001)

### The Increase of c-myc and hsp70 Gene Expression in Rat Aortae Induced by Perfusing Endothelin in Vitro

LIU Zong-Han ZHANG Qiao-Yun\* LIN Tuo YANG He-Ping

(Institute of Cardiovascular Disease, \* Department of Physiology, Hengyang Medical College, Hengyang, 421001 Hunan, China)

**ABSTRACT** In the study rat aortae were perfused by endothelin in vitro and then RNA sample was extracted from them for Northern blotting in which c-myc and hsp70 gene probes were labeled by  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP. The results on the bands of autoradiographs show that c-myc and hsp70 gene expression increases in the rat aortae. It might play an important role on proliferation of vascular smooth muscle cells in hypertension and atherosclerosis.

**KEY WORDS** Endothelin; Aortae; c-myc; hsp70 gene; Gene expression

**摘要** 本实验用含内皮素的 KH 液灌流大鼠离体主动脉 60 min 后, 提取大鼠主动脉中 RNA, 用 Northern 印迹杂交方法检测 c-myc 和热休克蛋白 70 基因的表达, 放射自显影结果显示: 内皮素可诱导大鼠主动脉细胞 c-myc 和热休克蛋白 70 基因表达增加, 这在高血压和动脉粥样硬化发病过程中对血管平滑肌的增殖可能起重要作用。

**关键词** 内皮素; 主动脉; c-myc; 热休克蛋白 70; 基因表达

1987 年 Yanagisama 等从培养的猪主动脉内皮细胞中分离并序列化一种作用强大的血管收缩肽——内皮素 (Endothelin, ET)。它作为血管活性物质, 参与心血管功能的调

节<sup>[1]</sup>。具有强烈血管收缩作用的 ET 可显著影响血压, 原发性高血压病患者血浆中 ET 的含量增加<sup>[2]</sup>。血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 中 c-myc 基因表达增加与高血压 (hypertension, HP) 和动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发病过程中 VSMC 增殖密切相关<sup>[3]</sup>。c-myc 的表达产物 Myc 蛋白调控热休克蛋白 70 (heat shock protein 70) 基因表达<sup>[4]</sup>。Hsp70 不仅在应激情况下, 在某些非应激情况下也参与细胞增殖<sup>[5]</sup>。已知 ET 可诱导 c-myc 基因表达<sup>[6]</sup>。本实验用 ET 灌流离体大鼠主动脉, 观察 ET 对大鼠主动脉条的 c-myc 和 hsp70 基因表达诱导作用, 从分子生物学角度探讨 ET 参与 HP 和 As 发病过程的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Kreb' s-Henseleit (KH) 液成分 (mmol/L): NaCl 118, KCl 4.70, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.20, MgSO<sub>4</sub> 1.20, CaCl<sub>2</sub> 2.50, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, Glucose 11.0, 以上试剂均为分析纯。RNA 提取溶液成分: 4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 醋酸铵 (pH 7.0), 0.5% (w/v) N-十二烷基肌酸钠, 0.1 mol/L B-巯基乙醇, 以上均为 Sigma 公司产品。氯仿-异戊醇 (49:1), 2 mol/L 醋酸钠, 异丙醇, 75% 乙醇, 0.5% 十二烷基磺酸钠, 以上试剂均为分析纯。

### 1.2 大鼠主动脉条的制备及灌流

体重为 200~250 g Wistar 大鼠 18 只, 处死后 20 min 腹腔内注射 0.1% 肝素 2.5 ml 抗凝。乙醚麻醉后断头处死, 快速开胸取出主动脉 (约 500 mg), 用 4℃ 生理盐水冲洗干净, 远心端固定在浴槽挂钩上, 近心端插入塑料管连接蠕动泵, 用 95% O<sub>2</sub> 加 5% CO<sub>2</sub> 平衡的 37℃ KH 液预灌流 15 min (5 ml)。

实验分为两组, 实验组( $n=10$ )用 KH 液加  $10^{-8}$  mol/L ET 灌注; 对照组( $n=8$ )用单纯 KH 液灌注; 60 min 后终止灌注, 取下主动脉夹提取 RNA。

### 1.3 RNA 提取

按 Chomczynski 法<sup>[7]</sup>稍加改动。大鼠主动脉夹加上 1 ml RNA 提取溶液, 在冰上匀浆, 加入 2 mol/L 醋酸钠 0.1 ml, 倒转混合, 再加 0.2 ml 氯仿-异戊醇, 剧烈振荡 10 s, 在冰上预冷 15 min, 离心 20 min ( $10\ 000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ )。将上清液转移到新塑料管中, 加入 1 ml 异丙醇, 在  $-20^{\circ}\text{C}$  下过夜。第二天再离心 20 min ( $10\ 000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ )。倾去上清液, 将沉淀溶于 0.3 ml RNA 提取溶液中, 加入等体积的异戊醇, 在  $-20^{\circ}\text{C}$  下过夜。离心 10 min ( $10\ 000\times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ )。倾去上清液, 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 真空干燥, 溶于 5  $\mu\text{l}$  0.5% 十二烷基磺酸钠内。

### 1.4 c-myc 探针的提取

c-myc (含第三外显子, 0.7 kb, 湖南医科大学肿瘤研究所曾亚教授提供); hsp70 基因 (2.3 kb, 北京医科大学第三附属医院吴希加教授提供), 在 LB 培养基中扩增。用碱性法提取质粒, 低熔点琼脂糖回收 c-myc 片段和 hsp70 基因片段。

### 1.5 Northern 印迹杂交

RNA 样品经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分离后, 转移到硝酸纤维素膜上。以  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP (福瑞同位素公司产品) 按随机引物标记法 (Promega 公司产品) 标记 c-myc 和 hsp70 基因探针。预杂交 6 小时, 杂交 48 小时后洗膜, 然后进行放射自显影 1~5 天。用双波长薄层色谱扫描仪 (Dual-Wavelength TLC scanner, CS-930) 检测杂交带的光密度, 两组光密度值的差异用  $t$  检验。

## 2 结果

大鼠主动脉灌注 ET 后, 提取总 RNA 用  $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP 标记的 c-myc 和 hsp70 探针进行 Northern 杂交。放射自显影结果显示: 实验组 mRNA 杂交带颜色比对照组深 (Fig 1)。双波长薄层色谱扫描仪扫描显示: 实验组大鼠主动脉 c-myc 和 hsp70 基因放射自显影杂交带光密度值与对照组比较, 具有显著性差异 ( $P<0.01$ , Tab 1)。

## 3 讨论

近年来研究表明, 血管内皮细胞在血液循环, 心血管功能的调节中起着重要作用, 它

可以释放血管舒张物质和血管收缩物质, 前者包括具有扩张血管, 抑制血小板功能的物

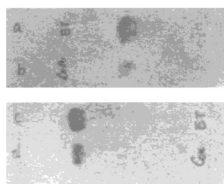


Fig 1. The bands of the autoradiographs of Northern blotting for c-myc and hsp70 gene in aortae perfused by endothelin.

- a. c-myc experiment group
- b. c-myc control group
- c. hsp 70 experiment group
- d. hsp 70 control group

Tab 1. The density of the bands of autoradiographs of Northern blotting for c-myc and hsp 70 gene in aortae perfused by ET. ( $\bar{x}\pm s$ )

Groups	n	c-myc	hsp 70
Experiment	10	76.3 $\pm$ 7.4	134.0 $\pm$ 12.1
Control	8	23.1 $\pm$ 4.6	43.3 $\pm$ 6.4
P		<0.01	<0.01

质——内皮舒张因子 (EDRF, NO) 和前列环素 ( $\text{PGI}_2$ ); 后者包括前列腺素  $\text{H}_2$ , ET 等。在正常生理情况下, 血管内皮细胞的舒张因子似乎占优势。在 HP 及 As 发病时, 内皮细胞生成的舒张因子和收缩因子失衡<sup>[8]</sup>, Saito 报道在原发性 HP 病人血浆中 ET 水平增加<sup>[9]</sup>。ET 与 VSMC 特异性膜受体结合, 导致细胞内磷脂酶 C 的激活, 形成三磷酸肌醇及二酰基甘油, 使细胞内储备  $\text{Ca}^{2+}$  释放, 进而激活蛋白激酶 C, 诱发持久的血管收缩<sup>[9]</sup>。ET 是已知作用最强大的血管收缩物质<sup>[8]</sup>。在 HP 和 As 的发病过程中, VSMC 增殖参与其发病过程, 这与原癌基因表达增加密切相关<sup>[10]</sup>。本实验中, 我们用含 ET 的 KH 液灌注大鼠主动脉, 结果显示: 实验组 c-myc 杂

交带显色强度比对照组高,说明 c-myc 基因表达水平增加。c-myc 基因表达的蛋白产物可与细胞核内的双链及单链 DNA 结合,促进蛋白质的合成,这种新合成的蛋白质可促进细胞的增殖<sup>[10]</sup>。我们还观察到大鼠主动脉灌流 ET 后,实验组 hsp70 基因杂交带显色强度比对照组高,说明 hsp 70 基因表达同时增加。这是因为 c-myc 表达产物 Myc 蛋白与 hsp 70 基因 5' 一侧上游-160 和-230 碱基处的两个启动子位点结合,起着 DNA 复制起始和转录增强子作用,从而使 hsp70 表达增加<sup>[11]</sup>。hsp70 的表达产物 Hsp 70 作为“分子伴侣”和其他蛋白质一道帮助跨膜转运细胞增殖所需的蛋白质,促进细胞的增殖<sup>[4]</sup>。组织化学亦显示 As 斑块中 SMC 和巨噬细胞中 Hsp 70 浓度高<sup>[5]</sup>。我们认为 ET 分泌的增加不仅引起血管收缩,增加外周阻力,使血压升高,而且可诱导 c-myc 和 hsp 70 基因表达增加,导致血管 SMC 和内皮细胞增殖,参与 HP 和 As 的发病过程。

#### 4 参考文献

- 1 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelium cell. *Nature*, 1988, 332: 411~415.
- 2 Saito Y, Kazuwa N. Increased plasma endothelin level in patients with essential hypertension. *N Engl J Med*, 1990, 322: 205
- 3 Yang HP. Study of c-sis and c-myc expression in arterial smooth muscle cells of different phenotypes. *Chinese Med Sciences J*, 1991, 6 (3 Supl): 117
- 4 Pual MP. Heat shock proteins and cell proliferation. *Federation of European Biochemical Societies Letter*, 1991, 280 (1): 1
- 5 Paul AB, Wendell M, Michael T. Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am J Path*, 1990, 136 (1): 71
- 6 Weissberg PL. The endothelin peptides ET-1, ET-2, ET-3 and sarafotoxin SEB are Co-mitogenic with platelet-derived growth factor vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1990, 85 (2-3): 257
- 7 Chomzynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate - phenol - chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156
- 8 Luscher, TF. Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors: A new concept in hypertension? *Am J Hyperten*, 1990, 3: 317~330.
- 9 余振球, 马长生. 实用高血压学. 北京: 科学出版社. 1993; 75
- 10 Bartlett PF, Reid HH, Bailey KA. Immortalization of mouse neural precursor cells by the c-myc oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 3255
- 11 Takahiro T, Yoichi N, Fumiko K et al. c-myc protein complex binds to two sites in human hsp 70 promoter region. *Biochim et Biophys Acta*, 1992, 1130: 166