

· 实验研究 ·

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-myc 基因表达的影响

李 静¹ 陈可冀¹ 张靖溥² 丁大成³

内容提要 本实验采用斑点印迹杂交和原位杂交技术, 进一步探讨血管通对与血管平滑肌细胞(VSMC)增生相关基因表达的影响。结果表明, 高脂组家兔血管壁血小板衍生生长因子(PDGF)-A 的 mRNA 呈高表达, 杂交阳性颗粒主要分布在动脉粥样硬化(AS)斑块边缘区及新生斑块区的 SMC 胞浆内, 而血管通组家兔血管壁 PDGF-A mRNA 表达水平明显低于高脂组; 高脂组血管斑块组织 c-myc 的 mRNA 表达水平亦比正常组高, 血管通组血管壁 c-myc mRNA 表达水平下降。上述结果初步说明血管通可能是通过影响血管壁 PDGF-A、c-myc 的 mRNA 表达水平, 以抑制 VSMC 增生, 阻止 AS 形成。

关键词 血管通 动脉粥样硬化 血管平滑肌细胞增生 血小板衍生生长因子 c-myc

Effect of Xue Guan Tong on PDGF-A, PDGF-B and c-myc Gene Expression of Vessel Wall in Atherosclerotic Rabbits Li Jing, Chen Ke-ji, Zhang Jing-pu, et al *Xiyuan Hospital, China Academy of TCM, Beijing (100091)*

In this study, the effect of Xue Guan Tong (XGT) on platelet-derived growth factor-A (PDGF-A), PDGF-B and c-myc gene expression of vessel wall was explored with dot blot and in situ hybridization. The results shown that the expression of PDGF-A mRNA in atherosclerotic plaque of the model group was higher, PDGF-A gene hybridizations were mainly distributed in smooth muscle cell which located in newly emerging plaque and edge of atherosclerotic plaque. In contrast, level of PDGF-A mRNA in the XGT group was lower than that in the model group, which indicated that XGT could influence the level of PDGF-A mRNA. The c-myc oncogene expression in the model group was significantly enhanced than that in the normal group. However, the expression in XGT group decreased less than that in the model group. From the results shown above, it suggested that one of the effects of XGT on preventing VSMC proliferation was its influence on PDGF-A and c-myc mRNA expression level.

Key words Xue Guan Tong, atherosclerosis, smooth muscle cell proliferation, platelet-derived growth factor, c-myc

血管平滑肌细胞(VSMC)增生是形成动脉粥样硬化(AS)病变的关键, 而研究 VSMC 增生的机制, 已成为研究 AS 发病机制的一个焦点。随着细胞分子生物学技术在心血管病研究的应用, 使人们逐渐认识到一些生长因子、细胞因子以及一些癌基因在 VSMC 增生, AS 病变成过程中的作用。血管通是活血化瘀方药, 在实验动物模型中已证明它具有防治实验性家兔 AS 形成和抑制 VSMC 增生的作用。本

实验旨在进一步探讨血管通对与 VSMC 增生相关基因表达的影响, 阐明其抑制 VSMC 增生的作用机制。

材料与方 法

1 药物、试剂与仪器 血管通(血府逐瘀汤的颗粒制剂): 由当归、红花、生地、川芎、赤芍、桃仁、牛膝、枳壳、桔梗、柴胡、甘草等 11 味中药组成, 每克药量相当生药量 3g, 由厦门中药厂提供。阿斯匹林为济南第三制药厂产品。限制性内切酶 EcoR I、BamH I、Pst I、HindIII 均为美国 Promega

1. 中国中医研究院西苑医院心血管病研究室(北京 100091); 2. 中国科学院生物物理研究所; 3. 北京协和医院

公司产品；生物素光标记试剂盒为北京医科大学产品；地高辛-dUTP 标记试剂盒：德国 Boehringer Mannheim 公司产品。硝酸纤维素膜为美国 Promega 公司产品；斑点杂交点样器由国营科普仪器厂出品。

2 动物模型建立与标本制备 纯种新西兰家兔 20 只，雌雄不限，体重 1.5~2.0 kg，随机分为 4 组，每组 5 只。(1)正常组：喂饲基础饲料。(2)高脂组：喂饲基础饲料加胆固醇饲料(2%胆固醇及 3%猪油)。(3)高脂加阿斯匹林组：高脂组饲料加阿斯匹林 20 mg/kg·d。(4)高脂加血管通组：高脂组饲料加血管通 6 g/kg·d。4 组均喂饲 12 周。用气栓法处死家兔，取胸主动脉 1 cm，用甲醛固定，石蜡包埋，用于 RNA 原位杂交；余主动脉放入液氮内保存，用于提取主动脉壁总 RNA。

3 探针制备 血小板衍化生长因子 A 链(PDGF-A)、B 链(PDGF-B)和 c-myc 等 DNA 探针用碱变性法^[1]提取质粒 DNA。分别用相应插入位点的 EcoR I 和 BamH I 限制性内切酶酶解后，从低熔点琼脂糖中回收 PDGF-A(1.23 kb)、PDGF-B(3.02 kb)和 c-myc(2.4 kb)cDNA 片段。

4 主动脉总 RNA 提取与斑点印迹杂交(Dot blot) 用 AGPC 法^[2]提取主动脉总 RNA。用 α -³²P-dCTP 按随机引物法标记 PDGF-A、PDGF-B 和 c-myc 探针。斑点印迹杂交参照 Sambrook J 等

的方法^[1]，用 IBAS 1/II 图像分析仪测定杂交信号相对光密度(IOD)。

5 组织原位杂交 以地高辛-dUTP 按地高辛标记试剂盒介绍的方法标记 PDGF-A 探针^[3]。石蜡切片入 PBS 及 HCl 液水化各 5 min，蛋白酶 K 消化，4%多聚甲醛固定，预杂交 37°C 1~2 h(预杂交液：50%去离子甲酰胺/6×SSC/5×Denhardt's/0.5%SDS/100 mg ssDNA)，杂交加 4 ng/ml 变性探针的杂交液 42°C、20 h，于 2×SSC、1×SSC、0.2×SSC 37°C 洗涤各 15 min。加碱性磷酸酶标记的抗 Dig 抗体 37°C、30 min，用 NBT-BCIP 显色 4 h。镜下观察血管壁深蓝色信号。设立 RNase 处理、无探针及无酶对照组。

结 果

1 PDGF-A 基因杂交结果 以 PDGF-A cDNA 为探针，对实验性 AS 家兔血管壁的 RNA 进行斑点杂交，结果表明：高脂组家兔血管壁 PDGF-A mRNA 表达明显高于正常组；用血管通、阿斯匹林家兔血管壁 PDGF-A mRNA 表达水平低于高脂组(见图 1、附表)。组织原位杂交结果显示，正常家兔血管壁未见 PDGF-A 阳性杂交信号(图 4 A)；高脂组 PDGF-A 基因杂交阳性颗粒主要分布在 AS 斑块边缘区及新生斑块区的平滑肌(SMC)胞浆内，

附表 各组 PDGF-A、PDGF-B 及 c-myc 基因斑点杂交结果 (IOD)

组别	兔数	PDGF-A			PDGF-B			c-myc		
		(RNA) 4 μ g	1 μ g	0.25 μ g	4 μ g	1 μ g	0.25 μ g	4 μ g	1 μ g	0.25 μ g
正常	3	8.23	6.14	1.80	5.35	4.86	2.01	8.03	6.95	6.06
高脂	3	13.13	7.45	3.05	9.12	8.01	5.15	20.65	12.66	6.91
阿斯匹林	3	10.75	6.95	2.72	8.65	6.90	4.58	14.26	12.24	5.52
血管通	3	9.07	5.29	2.12	5.77	4.71	2.63	11.30	7.69	2.46

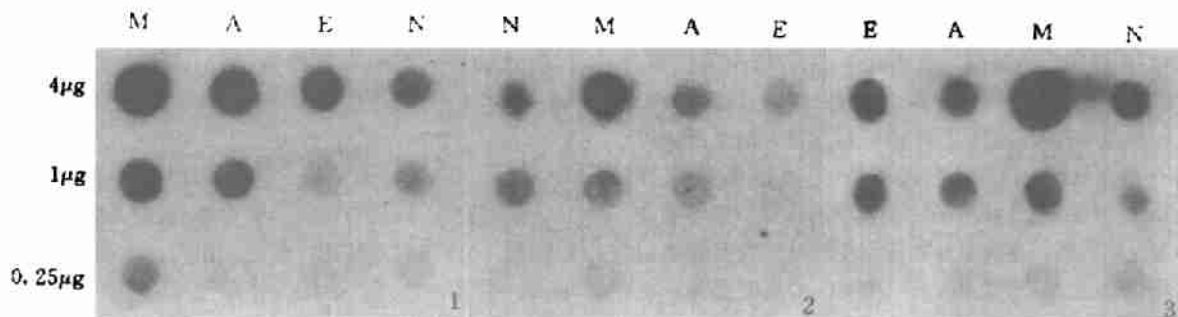


图 1 各组 PDGF-A 基因斑点杂交结果。图 2 各组 PDGF-B 基因斑点杂交结果。图 3 各组 c-myc 基因斑点杂交结果。图中 N 为正常组，A 为阿斯匹林组，M 为高脂组，E 为血管通组

呈星点状或片状分布(图4B);血管通组血管壁PDGF-A基因杂交阳性颗粒明显减少,在血管内膜斑块SMC内可见散在分布的杂交信号(图4C);阿斯匹林组血管壁可见PDGF-A基因杂交阳性信号,其分布同血管通组,PDGF-A mRNA表达量比高脂组低(图4D)。组织原位杂交设立的三个阴性对照组,RNase处理组,无探针及无酶组仅见本底水平的颗粒,说明本实验原位杂交是特异的。

2 PDGF-B基因杂交结果 以PDGF-B基因为探针做斑点杂交,结果表明,高脂组PDGF-B mRNA表达水平略高于正常组及用药组,但其表达量明显少于PDGF-A基因表达量(见图2、附表)。组织原位杂交,高脂组只见PDGF-B mRNA可疑杂交信号,用药组未见PDGF-B mRNA杂交阳性信号。

3 c-myc基因的杂交结果 以c-myc基因为探针,测定各组家兔血管壁相应的mRNA转录水平,斑点杂交结果表明:高脂组血管斑块组织c-myc mRNA表达水平比正常组高2.5倍,用药组血管壁c-myc mRNA表达水平下降,其中血管通组c-myc mRNA表达量比高脂组低1倍(见图3、附表)。

讨 论

1 血管通对PDGF基因表达的影响 在VSMC增生过程中,PDGF是最为重要的因素之一。早在1974年Ross⁽⁴⁾曾发现VSMC增殖有赖于血小板源性血清因子,SMC和成纤维细胞在无胎牛血清的培养中是不能增殖的,只有加入富含血小板血清后,细胞才能分裂增殖。在SMC培养基内加入PDGF,12~16h后³H-TdR掺入DNA就开始增加,24h后达高峰,30~36h使细胞数倍增。PDGF是一种细胞致分裂原和趋化剂,由其受体介导,活化蛋白激酶C并动员Ca⁺⁺,诱导许多基因(c-fos、c-myc、 β -干扰素、胶原酶基因等)表达⁽⁵⁻⁸⁾,这些癌基因接受致分裂原刺激而异常表达,进而促进SMC增生。Sejersen⁽⁹⁾报道体外培养的大鼠主动脉SMC表达PDGF-A链基因,并产生PDGF样蛋白,但不表达PDGF-B链基因。Barret⁽¹⁰⁾等用原位杂交技术在人的动脉粥样斑块及正常SMC内证明有PDGF-A基因表达。Wilcox⁽¹¹⁾用原位杂交技术,发现AS内膜SMC有PDGF-A mRNA表达,内皮细胞有PDGF-B mRNA表达。Sjolund⁽¹²⁾等报道,成年大鼠动脉SMC表达PDGF-A mRNA,并分泌PDGF样致有丝分裂因子,培

养的SMC由收缩型转变为合成型,表达A链基因但不表达B链基因。因此,认为SMC增生与其自身分泌或旁分泌的PDGF有关。

本实验结果也证实,高脂组家兔血管壁PDGF-A mRNA呈高表达,其杂交阳性颗粒主要分布在AS斑块边缘区及新生斑块区的SMC内,在AS斑块中心区阳性颗粒较少,这提示PDGF可能是在AS斑块形成初始阶段起作用,与其刺激SMC增生与迁移有关。血管通组PDGF-A基因表达量比高脂组低,这表明血管通可能是通过影响PDGF基因表达,以抑制SMC增生。关于血管通对PDGF-A mRNA表达水平的影响,其具体机制尚待进一步探讨,可能与血管通活血化瘀抑制血小板粘附聚集,以减少PDGF释放等有关。

2 血管通对c-myc基因表达的影响 癌基因c-myc参与细胞增殖调控,是细胞生长过程中的重要调节基因。c-myc的产物是核内蛋白质,与细胞从G₀→G₁期有关,参与DNA复制⁽¹³⁾。内膜损伤、高脂血症等多种因素可引起血管壁PDGF基因的异常表达,而诱导c-myc等癌基因异常表达,LDL亦可直接促进c-myc基因表达,促进SMC增生。本实验结果也表明,高脂组家兔血管壁c-myc基因表达量增高,而血管通组c-myc mRNA表达水平与高脂组比较降低1倍。血管通对c-myc基因表达的影响,其中一方面可以认为是由于其影响PDGF-A mRNA表达水平,一方面是通过降低血LDL水平,使c-myc表达水平下降,从而抑制SMC增生。

上述结果初步说明血管通通过降低血脂,抗血小板粘附、聚集,影响血管壁PDGF-A、c-myc mRNA表达水平,以抑制SMC增生,阻止AS形成。

(图4见中心插页4)

参 考 文 献

1. Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989:507.
2. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 1987; 162:156.
3. 林万明, 杨瑞馥, 王 津, 等. 核酸探针杂交实验技术. 北京: 中国科学技术出版社, 1991:80-84.
4. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis an update. N Engl J Med 1986; 314:488.
5. Cochram BH, Zuiio J, Verma IM, et al. Posttrans-

(下转第39页)

肝素能明显地抑制培养 VSMC 处于分裂相的细胞数, 其作用呈明显的剂量依赖性, 且随剂量增加, 这种作用更明显。川芎嗪也能明显地抑制原代培养 VSMC 处于分裂相的细胞数, 但其作用没有明显的剂量效应, 各组在培养的第 2 天出现处于分裂相细胞数最多。

讨 论

为了防治冠状动脉粥样硬化及 PTCA 术后再狭窄, 人们不断地寻找抑制 VSMC 增殖的药物。通过对 VSMC 增殖机理的研究, 发现血小板的聚集和激活导致了一系列的细胞因子的释放, 对 VSMC 的增殖和迁移产生了重大作用⁽¹⁾。对抗凝药物在冠状动脉粥样硬化和 PTCA 术后再狭窄中的防治作用的研究引起了人们的关注。

肝素对 VSMC 的影响的研究已比较深入。无论是动物模型还是离体培养, 都能抑制 VSMC 的增殖和分裂, 并认为它是直接作用于 VSMC。肝素通过 VSMC 的内吞作用结合到 VSMC 内, 作用于其细胞周期的 S 期, 阻止细胞由 G₁ 进入 S 期。肝素还能拮抗表皮生长因子的受体而抑制 VSMC 的增殖⁽²⁻⁴⁾。我们的实验结果也证实了肝素的这一效果。

川芎嗪是川芎的有效成分, 它具有多种药理作用, 其中对心肌细胞具有保护作用⁽⁵⁾。国内周伟东等人发现川芎嗪对培养的血管内皮细胞有抑制作用⁽⁶⁾。我们的研究也发现川芎嗪对培养 VSMC 具有明显的抑制其生长分裂的作用, 且对其生长的抑制作用随剂量增加而增加, 其具体的机制有待探讨。

川芎嗪对 VSMC 生长和分裂的影响与肝素比较

有如下差异: (1) 肝素对 VSMC 生长的影响中, 不同剂量组 VSMC 数随时间不断增加, 但与对照组比较, 已经有抑制作用; 而川芎嗪组从药物处理第 2 天起, VSMC 数逐步减少, 最后比加入细胞数还少。(2) 肝素对 VSMC 分裂的抑制呈剂量依赖性, 而川芎嗪没有明显的剂量效应。以上差异提示川芎嗪对原代培养的 VSMC 的生长和分裂的抑制作用在机制上可能有异于肝素的这种作用。

参 考 文 献

1. Fingerle J, Johnson R, Clowes AW, et al. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Nat Acad Sci* 1989; 86:8412.
2. Merrilees MJ, Campbell JH, Spanidis E, et al. Glycosaminoglycan synthesis by smooth muscle cells of differing phenotype and their response to endothelial cell conditioned medium. *Atherosclerosis* 1990; 81:245.
3. Casettelot JJ, Pakac LA, Caleb BL, et al. Heparin selectively inhibits a protein kinase C-dependent mechanism of cell cycle progression in calf aortic smooth muscle cells. *J Cell Biol* 1989; 109:3147.
4. Majack RA, Cook SC, Bornstein P, et al. Control of smooth muscle cell growth by components of the extracellular matrix: Autocrine role for thrombospondin. *Proc Nat Acad Sci* 1986; 82:9050.
5. 傅春景, 赵根尚, 张建芳, 等. 川芎嗪对离体大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响. *中国中西医结合杂志* 1993; 13(4):228.
6. 周伟东, 潘明新, 何仁兵, 等. 川芎嗪和阿斯匹林对组织培养内皮细胞生长的影响. *第一军医大学学报* 1992; 12:52.

(收稿: 1994-06-10 修回: 1994-09-16)

(上接第 35 页)

criptional control of proteinsynthesis in Balb/c-3 T₃ cells by platelet-derived growth factor and platelet poor plasma. *J Cell Physiol* 1981; 109:429.

6. Cochram BH, Zullo J, Verma IM, et al. Expression of the c-fos gene and of an fos-related gene is stimulated by platelet derived growth factor. *Science* 1984;226:1080.
7. Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, et al. Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature* 1983; 305:245.
8. Ralston R, Bishop JM. The protein products of the myc and myb oncogenes and adenovirus Ela are structurally related. *Nature* 1983; 306:803.
9. Sejersen T, Betsholtz C, Sjolund M, et al. Rat skeletal myoblasts and arterial smooth muscle cells expressive gene for the A chain but not the gene for the B

chain of platelet-derived growth factor and produce a PDGF-like protein. *Proc Nat Acad Sci* 1986; 83:6844.

10. Barrett TB, Benditt EP. Platelet-derived growth factor gene expression in human atherosclerotic plaques and artery wall. *Proc Nat Acad Sci* 1988; 85:2180.
11. Wilcox JN, Smith K, Williams LT, et al. Platelet-derived growth factor mRNA detection in human atherosclerotic plaques by in situ hybridization. *J Clin Invest* 1988; 82:1134.
12. Sjolund M, Hedin U, Sejersen T, et al. Arterial smooth muscle cell express platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, secrete aPDGF-like mitogen, and bind exogenors PDBF in a phenotype-and growth state-dependent manner. *J Cell Biol* 1988; 106:403.
13. Kelly K, Cochran BH, Stiles CD, et al. Cell-specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell* 1983; 35:603.

(收稿: 1994-09-09 修回: 1994-10-20)

百服宁

全新强力百服宁薄膜衣片 止疼痛更为安全、迅速、有效 决不伤害肠胃

使您的病人心服——口服

!!!

处于全球镇痛药领导地位的百时美施贵宝有限公司—Bristol-Myers Squibb (BMS), 现在郑重向您介绍: 每片含有对乙酰氨基酚500毫克的百服宁

全球镇痛药的领导地位

百时美施贵宝公司已在全世界主要的四个洲拥有自行生产的OTC市强威地推广了镇痛药, 百服宁在日本、法国、台湾等属领导品牌, 在全美排名第3, 目前正在成功的推广用于中国, 并很快将使之成为全球第五个最主要的OTC产品市场

百服宁的主要成份, 是全球医生的首选配方

- 百服宁的主要成份—对乙酰氨基酚—是全球医生和医生的首选配方, 是全世界最多国家和医生使用的成份(见图①)
- 在亚洲的应用更是阿司匹林的4倍(见图②)

百服宁薄膜衣片的特点

为什么百服宁可使您的病人心服口服? 因为百服宁:

· 有效治疗疼痛

根据临床试验证明, 百服宁的成份治疗头痛、发烧, 和各种病症, 比阿司匹林更有效

· 见效迅速

临床试验更证明, 对乙酰氨基酚的见效时间比阿司匹林更迅速(见图③)

· 卓越的安全性

- 服用百服宁不会刺激肠胃, 更不会引起肠胃不适(见图④)
- 妊娠及哺乳妇女使用最广泛的首选药

