

方药研究

中药糖心宁口服液对血管平滑肌细胞原癌基因
C-myc 和 C-fos 表达的影响宋冰¹ 魏执真² 吕仁和¹

摘要 目的:从分子生物学水平探讨中药糖心宁口服液防止糖尿病源性动脉粥样硬化(AS)发生以及对糖尿病性冠心病的防治机理。方法:将高糖培养的兔血管平滑肌细胞(VSMC)分别加入含糖心宁药物血清(分高、中、低剂量)及含鲁南欣康药物血清,并以不含药血清作为对照,采用 Northern 印记杂交技术观测各组不同药物血清对原癌基因 C-myc 和 C-fos 表达的影响。结果:高糖持续刺激平滑肌细胞一定时间后,C-myc 和 C-fos 基因表达量分别较正常对照组明显增强;在含药血清组中,不同剂量组糖心宁药物血清可呈剂量依赖性地抑制平滑肌细胞 C-myc 和 C-fos 的表达;与含鲁南欣康药物血清的西药对照组相比,中剂量组糖心宁药物血清即可达到西药对照组对 C-myc 和 C-fos 基因表达的抑制作用。结论:提示高糖可促进血管平滑肌细胞原癌基因 C-myc 和 C-fos 的表达,而糖心宁药物血清可呈剂量依赖性地抑制高糖促 C-myc 和 C-fos 基因表达的作用,从而抑制血管平滑肌细胞增殖,这是糖心宁防治糖尿病源性动脉粥样硬化以及糖尿病性冠心病的重要机制之一。

主题词 肌,平滑,血管/代谢 癌基因/遗传学

糖尿病性冠心病是指糖尿病(DM)患者所并发或伴发的冠状动脉粥样硬化性心脏病,是一种多因素引起的严重心血管疾病,其病理基础是动脉粥样硬化(AS)。动脉粥样硬化是一个多因素参与的复杂的病理生理过程,国内外学者对此进行了大量研究,其中以 Ross 提出的损伤应答学说为学者们所公认。对于糖尿病致动脉粥样硬化来说,包括高血糖、高血脂等多种因素所致的动脉内皮损伤是动脉粥样硬化发生的始动环节,其后在多种细胞因子共同作用下,动脉中膜的平滑肌细胞(SMC)迁移到内膜增殖、分泌,加之平滑肌细胞内外脂质沉积,形成了动脉粥样斑块。其中血管平滑肌细胞(VSMC)的增殖在病理过程中起着关键作用,所以糖尿病性冠心病是一种以细胞增殖为主要病变的疾病,而失去对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用是糖

尿病性冠心病形成的关键和根本原因之一^[1~3]。

在细胞增殖的调控中,细胞增殖丝裂信号作用于细胞膜受体后,经 G 蛋白和蛋白磷酸化激酶传递给细胞增殖调控相关的核蛋白,后者通过促进与细胞分裂有关的基因进行表达而引起细胞增殖。在血管平滑肌细胞增殖研究中,原癌基因 C-myc、C-fos 的调控作用日益引起学者们的关注。原癌基因 C-myc、C-fos 属于早期基因范围,其表达产物是与细胞增殖调控有关的主要核蛋白,与细胞从 G₀ 期到 G₁ 期有关,它们的激活是平滑肌细胞增殖的一个始动因素^[4~7]。本实验采用 Northern 印迹杂交技术观察了中药糖心宁对高糖培养条件下血管平滑肌细胞原癌基因 C-myc 和 C-fos 表达的影响,从分子生物学水平探讨了其防止糖尿病源性动脉粥样硬化发生以及防治糖尿病性冠心病的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物:实验所用纯种日本大耳白兔由北京大学医学部动物房提供。

1.2 实验药物:实验用药糖心宁口服液(由太子参 6g,麦冬 3g,五味子 2g,香附 2g,丹参 6g,牡丹皮 4g,黄连 2g 等药物组成,每毫升含生药 0.2g)由北京中医医院制剂室提供,鲁南欣康(山东鲁南制药厂生产,批号 961018)由北京中医药大学东直门医院药房提供。

1.3 实验试剂:Gibco BRL 公司:Hank's 液、DMEM 培养基、胎牛血清、甘氨酸、胰蛋白酶、Trizol 试剂。Santa Cruz 公司:抗 α -SM actin、抗 myosin 抗体。北京华美生物工程公司:MTT 溶液。Promega 试剂公司:Wizard plus 质粒微量缺血试剂盒,核酸限制性内切酶、无 RNase 的 DNaseI。Amersham-Pharmacia 公司:硝酸纤维素膜。Boreigner 公司:High Prime 探针标记系统。Serva 公司:丙烯酰胺。亚辉公司:³²P-dCTP。Kodak 公司:X 线片。

1.4 主要仪器:96 孔细胞培养板(NUNC)、800ml 细胞培养瓶(NUNC)、二氧化碳培养箱(美国 Sellab 公

1 北京中医药大学东直门医院肾病内分泌科,北京市东直门内海运仓 5 号(100700)

2 北京中医医院心血管病科

收稿日期:2002-12-17;修回日期:2003-03-18

司)、低速离心机、Beckman DU650 紫外分光光度计、Kodak 凝胶成像分析系统。

2 方法

2.1 血管平滑肌细胞的培养与鉴定:取纯种日本大耳白兔胸主动脉,去除血管内膜及外膜后,置于含 Hank's 液的平皿中漂洗 3 次,将中膜剪成 1mm×1mm 大小,贴于培养皿底部,用含 20% 胎牛血清(FCS)的 DMEM 液培养,细胞生长融合后,用 0.125% 胰蛋白酶消化传代。细胞在光镜下呈典型的峰—谷状表现,免疫细胞化学检查:抗 α -SM actin 和抗 myosin 抗体染色阳性,电镜检查显示细胞浆内含有大量肌原纤维,以鉴定平滑肌细胞,实验采用第 4~8 代培养细胞。

2.2 含药血清的制备:取纯种日本大耳白兔 15 只,随机分为 5 组(每组 3 只),即糖心宁组(设高、中、低 3 个剂量组)、鲁南欣康组和不含药血清组。糖心宁组每日依照分组分别按 8ml/kg、4ml/kg、1ml/kg(含生药量分别为 1.6g/kg、0.8g/kg、0.2g/kg)给予糖心宁口服液,将药液溶于蒸馏水中灌胃,连续用药 7 天;鲁南欣康组每日用鲁南欣康 2.4mg/kg 溶于蒸馏水中灌胃,连续用药 7 天;不含药血清组给予等量生理盐水灌胃,连续 7 天。以上各组均在最后一次灌胃 2 小时后心脏采血,分离血清,56℃ 灭活 30 分钟,分装后于 -20℃ 保存。

2.3 分组及处理:共设 6 组。(1)不含药血清(正常糖)组:培养基中加入不含药血清,终浓度为 20%。(2)高糖加不含药血清组:(1)组加入葡萄糖液,终浓度为 30mmol/L。(3)高糖加含糖心宁高剂量血清组:培养基中加入含糖心宁高剂量组血清,终浓度为 20%,再加入同(2)组等量的葡萄糖液。(4)高糖加含糖心宁中剂量血清组:培养基中加入含糖心宁中剂量组血清,终浓度为 20%,再加入同(2)组等量的葡萄糖液。(5)高糖加含糖心宁低剂量血清组:培养基中加入含糖心宁低剂量组血清,终浓度为 20%,再加入同(2)组等量的葡萄糖液。(6)高糖加含鲁南欣康血清组:培养基中加入含鲁南欣康血清,终浓度为 20%,再加入同(2)组等量的葡萄糖液。

2.4 观测方法

2.4.1 血管平滑肌细胞的收集:将浓度为 1×10^4 细胞/ml 的血管平滑肌细胞悬液接种于铺有明胶的 96 孔培养板中(100 μ l/孔),37℃ 5%CO₂ 培养箱中培养至生长融合后,倾去培养基,按分组的不同加入不同含药血清和刺激物的 DMEM 培养液 100 μ l/孔(每组 6 复孔),不加刺激物的血管平滑肌细胞作为正常对照,37℃ 5%CO₂ 培养箱中共育,置于相差显微镜下观察各组细胞形态的变化,分别于 0.5 小时、2 小时收集平滑

肌细胞。

2.4.2 Northern 印迹杂交(常规用 β -actin 做内参照):(1)细胞总 RNA 的提取:分别将各时间点收集的平滑肌细胞于光镜下计数,取 2×10^6 平滑肌细胞用 Trizol 试剂提取总 RNA,完全按说明书加入适量 Trizol 试剂裂解细胞,进行 RNA 提取。总 RNA 最后以 DEPC 处理过的超纯水溶解,在紫外分光光度计上测定样品的 OD260 和 OD280 值,并通过琼脂糖凝胶电泳分析 28s 和 18s rRNA 的比例,确定总 RNA 的质量和浓度。(2)RNA 甲醛变性胶电泳、转膜和固定:15~20 μ g 的总 RNA 进行甲醛变性胶电泳,以 10×MOPS 缓冲液配制 1% 琼脂糖变性胶,100V 电压下电泳 2 小时。电泳完毕后,用 DEPC 水淋洗电泳胶,20×SSC 浸泡 45 分钟,虹吸法 4℃ 持续转移过夜;转移完毕后,将膜在 6×SSC 溶液中浸泡 5 分钟,用滤纸吸干后,80℃ 烘干 2 小时。(3)cDNA 探针的制备和标记:将 C-myc、C-fos 重组质粒分别转化宿主菌后,抽提质粒 DNA。用相应的限制性内切酶切割,经电泳后,回收片段条带作为探针备用。取 25ng 探针 DNA,煮沸变性 10 分钟,迅速于冰盐浴中冷却,依次加入 4 μ l High Prime 溶液,5 μ l 3000Ci/mmol 的同位素水溶液,37℃ 孵育 10 分钟,加入 2 μ l 0.2M EDTA (pH8.0),65℃ 加热 10 分钟以终止反应。(4)预杂交和杂交、放射自显影:将已固定好的 NC 膜浸入 6×SSC 中 2 分钟。将润湿后的 NC 膜装入杂交袋中,按 0.2ml/cm 加入预杂交液,在杂交箱中 68℃ 预杂交 2 小时,加入放射性标记探针,68℃ 杂交过夜。取出杂交膜洗膜,空气干燥滤膜后,以保鲜膜包好后与 X 线片一起置于暗盒内,置 -70℃ 冰箱进行放射自显影。

3 结果

3.1 原癌基因 C-myc 表达的测定:高糖刺激血管平滑肌细胞 2 小时后,C-myc 表达量较不含药血清(正常糖)对照组明显增强。在含药血清组中,不同剂量组糖心宁药物血清可以呈药物剂量依赖性抑制平滑肌细胞 C-myc 表达,表现为低剂量组糖心宁药物血清即可抑制 C-myc 基因的表达,中、高剂量组糖心宁药物血清则可以更好地抑制 C-myc 基因的表达;与含鲁南欣康药物血清的西药对照组相比,中剂量组糖心宁药物血清即可达到西药对照组对 C-myc 基因表达的抑制作用(以 β -actin 为内参照)。

3.2 原癌基因 C-fos 表达的测定:高糖刺激血管平滑肌细胞 0.5 小时后,C-fos 表达量较不含药血清(正常糖)对照组明显增强。在含药血清组中,不同剂量组糖心宁药物血清可以呈药物剂量依赖性抑制平滑肌细

胞 C-fos 表达,表现为低剂量组糖心宁药物血清即可抑制 C-fos 基因的表达,中、高剂量组糖心宁药物血清则可以更好地抑制 C-fos 基因的表达;与含鲁南欣康药物血清的西药对照组相比,中剂量组糖心宁药物血清即可达到西药对照组对 C-fos 基因表达的抑制作用(以 β -actin 为内参照)。

4 讨论

中药糖心宁是魏执真教授积 30 多年临床实践总结的治疗糖尿病性心脏病的经验方,由太子参、麦冬、五味子、香附、丹参、牡丹皮、黄连等药物组成,具有益气养心、理气通脉、凉血清热的功效。既往的研究观察到,造模糖尿病性心脏病大鼠 13 周后,模型组大鼠冠状动脉内皮和内皮下层明显增厚,内皮细胞、平滑肌细胞增生活跃,并有坏死灶;而糖心宁治疗组则基本接近正常组,证实了糖心宁对糖尿病性心脏病冠状动脉病变的治疗作用^[8]。本研究即是在上述工作的基础上进行的。

中药血清药理研究方法由日本学者田代真一提出,是指给动物经口用药一定时间后采血,取含药血清进行体外实验的一种研究方法。中药复方大多是经口服起作用,用中药粗制剂直接加入离体反应系统中(如细胞培养等)进行实验研究,方法学上还存在大量问题,如中药的杂质成分、各种电解质或鞣质、酸碱度等都会对细胞的成长造成一定影响;有时还会出现中药复方含有的有效成分没有经胃肠道吸收(如某些高分子化合物),或经体内吸收代谢后失活,或本身无直接作用而经体内代谢后产生作用,或通过刺激第二信使而间接起作用等各种情况,都会影响到实验结果的可靠性^[9]。在徐浩等^[9]的研究中提出,中药血清药理学方法采用中药粗制剂经口服吸收后用含药血清进行体外实验,可以有效排除上述影响因素的干扰,且更接近药物体内环境中产生药理效应的真实过程,从而提高实验结果的可信度。因此,本实验亦采用了含药血清的实验方法,以排除外界影响因素的干扰,更接近药物体内环境中产生药效的过程,提高结果的可信度。

本实验结果显示,当平滑肌细胞在培养中加入高糖持续刺激一定时间后,C-myc 和 C-fos 基因的表达量分别较正常对照组明显增强,提示高糖可促进原癌基因 C-myc 和 C-fos 的表达。在含药物血清组中,不同剂量组的含糖心宁药物血清可以呈剂量依赖性抑制平滑肌细胞 C-myc 和 C-fos 基因的表达;与含鲁南欣康药物血清的西药对照组相比,中剂量组糖心宁药物血清即可达到西药对照组对 C-myc 和 C-fos 基因表达的抑制作用,提示糖心宁药物血清可明显抑制高

糖促原癌基因 C-myc 和 C-fos 表达的作用,并通过抑制 C-myc 和 C-fos 基因的表达而起到抑制血管平滑肌细胞增殖的作用,从而防止糖尿病病源性动脉粥样硬化发生、有效防治糖尿病性冠心病。

运用分子生物学方法和手段来研究中药复方还处于不断进步、不断完善的过程。本实验从一定角度探讨了中药糖心宁防止糖尿病病源性动脉粥样硬化发生及防治糖尿病性冠心病的作用机制,显示了糖心宁药物血清对高糖刺激下血管平滑肌细胞 C-myc 和 C-fos 基因表达的抑制作用,在分子生物学水平为治疗糖尿病性冠心病疗效显著的中药制剂——糖心宁的开发研制及临床应用提供了依据,也为中医药防治糖尿病性冠心病的研究提供了新的思路和方法。

参考文献

- 1 Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. N Engl J Med, 1975, 295: 369.
- 2 Stout RW. Insulin as a mitogenic factor: role in pathogenesis of cardiovascular disease. Am J Med, 1991, 90(Suppl 2A): 62S.
- 3 Williamson J, Chang K, Frangos M, et al. Hyperglycemic pseudobypoxia and diabetic complications. Diabetes, 1993, 42: 801.
- 4 孙志贤. 现代生物化学理论与研究技术. 北京: 军事医学科学出版社, 1995: 317-318.
- 5 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.
- 6 周爱儒, 汤健. 心血管分子生物学研究进展. 科技导报, 1996, (3): 36-39.
- 7 Heikila R, Schwab G, Wickstrom E, et al. A C-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G₀ to G₁. Nature, 1987, 328: 445-448.
- 8 魏执真. 糖心宁治疗糖尿病性心脏病的临床及实验研究. 北京中医, 1998, 17(4): 59-60.
- 9 徐浩, 史大卓, 陈可冀, 等. 用血清药理学方法观察芍药胶囊对兔胸主动脉平滑肌细胞增殖凋亡的影响. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(10): 759.

您只需打个电话:

《乙肝康复》手册、VCD 光盘寄到家

欢迎咨询、索取

防治乙肝

“家庭医生”普及工程启动

诚聘“家庭医生”顾问(兼职医生、包括乡医), 年龄不限, 待遇优厚, 资料备索。

主办单位: 北京华神制药有限公司

地址: 北京东直门内北新仓 18 号华神制药有限公司

邮政编码: 100700, 联系人: 杜主任、武小姐

电话: 010-84032002, 010-64024363 转 307