

雷帕霉素对血管平滑肌细胞增殖影响的实验研究

王建波¹, 杨建勇¹, 陈伟¹, 庄文权¹, 张珑涓²

(中山大学附属第一医院 1. 放射介入科, 2. 外科实验室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】观察雷帕霉素(rapamycin)对体外培养的大鼠胸主动脉平滑肌细胞(SMC)增殖的作用。【方法】组织贴块法体外原代培养大鼠胸主动脉平滑肌细胞,取对数生长期细胞(第 6~10 代)用作实验,MTT 法检测不同浓度雷帕霉素对平滑肌细胞增殖的效果,并用 RT-PCR 法检测其对平滑肌细胞增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA) mRNA 表达情况的影响。【结果】MTT 法检测显示雷帕霉素呈剂量依赖性抑制体外培养的大鼠平滑肌细胞增殖,各组吸光值(A)分别为:对照组 0.902 ± 0.106 ; 0.1 ng/mL 组 0.873 ± 0.079 ; 1 ng/mL 组 0.797 ± 0.046 ; 10 ng/mL 组 0.692 ± 0.061 ; 100 ng/mL 组 0.624 ± 0.075 。方差分析差异有显著性, $F=28.85$, $P<0.001$; 两两比较 1 ng/mL 以上浓度组与对照组间差异均有显著性,不同浓度间差异显著。0.1 ng/mL 组与对照组相比差异无显著性。RT-PCR 显示雷帕霉素以浓度依赖模式抑制大鼠平滑肌细胞 PCNA-mRNA 合成。各组校正后光密度值分别为:对照组 219.35 ± 7.20 ; 0.1 ng/mL 组 212.39 ± 6.56 ; 1 ng/mL 组 113.15 ± 10.09 ; 10 ng/mL 组 97.17 ± 12.25 ; 100 ng/mL 组 84.38 ± 8.66 。方差分析 $F=195.49$, $P<0.001$ 。两两比较与 MTT 检测相同。【结论】雷帕霉素呈剂量依赖性显著抑制大鼠平滑肌细胞的增殖,1 ng/mL 时即可明显起效。雷帕霉素有望成为治疗内支架术后再次狭窄的理想药物之一。

关键词:雷帕霉素; 血管平滑肌细胞; 细胞增殖; 大鼠

中图分类号:R363.11 文献标识码:A 文章编号 1672-3554(2006)03-0254-04

Experimental Study of Effect of Rapamycin on Proliferation of Rat Aortic Smooth Muscle Cells

WANG Jian-bo¹, YANG Jian-yong¹, CHEN Wei¹, ZHUANG Wen-quan¹, ZHANG Long-juan²

(1. Department of Interventional Radiology, 2. Laboratory of Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To evaluate the proliferative effect of rapamycin on the cultured rat thoracic aortic smooth muscle cells (SMC) in vitro. 【Methods】 The rat thoracic aortic SMC were harvested and cultured for six to ten passages. Cultured SMC were synchronized, then restimulated to enter the cell cycle, and treated with incremental concentrations of rapamycin or without rapamycin as contrast. Forty-eight hours after managed, the proliferative assay was performed with MTT method and RT-PCR was performed to assay the level of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) mRNA. 【Result】(1) Rapamycin progressively inhibits rat aortic SMC proliferation in a concentration-dependent fashion. The absorption (A) value of each group was statistically significant for different concentrations ($F=28.85$, $P<0.001$) and the results were: control, 0.902 ± 0.106 ; 0.1 ng/mL, 0.873 ± 0.079 ; 1 ng/mL, 0.797 ± 0.046 ; 10 ng/mL, 0.692 ± 0.061 ; 100 ng/mL, 0.624 ± 0.075 . Compared to control group or among the different concentration, the difference of A value was statistically significant when the concentration of rapamycin was greater than 1 ng/mL. The difference was not statistically significant when the concentration was 0.1 ng/mL. (2) RT-PCR suggested rapamycin significantly decreased rat aortic SMC PCNA-mRNA transcription in a concentration-dependent fashion. The results of statistical analysis were similar with MTT assay ($F=195.491$, $P<0.001$). The optic density values of each group were: control, 219.35 ± 7.20 ; 0.1 ng/mL, 212.39 ± 6.56 ; 1 ng/mL, 113.15 ± 10.09 ; 10 ng/mL, 97.17 ± 12.25 ; 100 ng/mL, 84.38 ± 8.66 . 【Conclusion】 Rapamycin inhibits rat aortic SMC proliferation in a

收稿日期:2005-12-11

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270417)

作者简介:王建波(1969-),男,山西黎城人,博士生,讲师。Email:wangjianbomd@hotmail.com

concentration-dependent fashion. It is suggested the action concentration was 1 ng/mL. Rapamycin maybe one of the best drugs in the treatment of the in-stent restenosis after vascular interventional operation.

Key words: rapamycin; vascular smooth muscle cell; cell proliferation; rat

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):254-257]

经皮血管腔内成形术是目前临床上治疗动脉闭塞性疾患的主要方法之一,然而长期以来术后狭窄一直是困扰临床医生和患者的一大问题。血管内支架置入仅可以对血管壁起到机械性支撑作用,阻止血管弹性回缩及病理性重塑,但并不能阻止平滑肌细胞增殖,同样不能限制新生内膜增厚^[1]。本实验拟探讨新型免疫抑制药雷帕霉素对平滑肌细胞增殖的影响,为雷帕霉素用于临床上预防和治疗血管内支架后再狭窄提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验设计

体外培养的大鼠胸主动脉平滑肌细胞经同步化后,采用不同浓度雷帕霉素进行干预,于干预后48 h,MTT法检测细胞增殖状态,RT-PCR法检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)mRNA含量。数据处理选用SPSS11.5统计软件包进行。细胞培养采用常规组织贴块法进行原代培养,免疫组化胞浆-actin染色鉴定,取对数生长期细胞(第6~10代)用作实验。

1.2 实验分组

实验用雷帕霉素购自美国Alexis Biochemical公司,溶解于二甲基亚砷(上海生工进口分装)内制成不同浓度,实验细胞依据雷帕霉素不同作用质量浓度分为4组:雷帕霉素100 ng/mL、10 ng/mL、1 ng/mL、0.1 ng/mL组,另设正常对照组。为消除溶剂的影响,各实验组二甲基亚砷终浓度为0.1%(V/V),并加0.1%二甲基亚砷于正常对照组中。

1.3 MTT检测

四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国Sigma公司,用去离子水溶解制成5 mg/mL溶液,0.22 μm微孔过滤器过滤除菌,-20℃保存。将第6~10代对数生长期细胞用含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液调制成细胞悬液,细胞密度 5×10^4 /mL,接种于96孔板(Corning)上,每组设6个复孔,每孔200 μL。另设6孔空白对照,每孔只加培养液200 μL,无细胞。次日细胞贴壁后,换成含10 g/L牛血清白蛋白的DMEM培养液继续培养48 h,使细胞同步

于G₁早期。重新换回含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养液,对实验细胞进行再刺激,使其同时进入细胞周期循环,同时各组分别加入不同浓度雷帕霉素进行干预。干预48 h后,每孔各加入配好的MTT溶液(5 mg/mL)20 μL,作用4 h,离心,吸弃培养液。每孔加入DMSO 200 μL,微量震荡仪轻微震荡20 min,酶标仪双波长检测490 nm处吸光度(A)值,选择630 nm作为参考波长,重复3次。结果统计比照区组设计的方差分析,SPSS中统计过程选用General linear model中univariate进行。

1.4 PCNA mRNA检测

采用RT-PCR法。细胞接种、同步及分组干预大致同MTT检测,只是接种细胞至6孔板,每孔2 mL,干预48 h后弃培养液,按TriZOL试剂(Invitrogen)说明一步法提取细胞总RNA,并进行逆转录,逆转录试剂盒购自深圳晶美生物。PCNA及内参照GAPDH的引物设计及分析采用Primer Premier 5.0软件自行设计,合成委托上海生工(Sangon)进行。PCNA,412 bp:上游5'-GTGACTGGTTATCGTCCCTCCT-3',下游5'-TCAGCA TTATCTT CAGCCCTTA-3';GAPDH,307 bp:上游5'-CTCTGGAAAGCTGTGGCGTGAT-3',下游5'-GGAAGAATGGGAGTTGCTGTTG-3'。

PCR反应试剂购自Takara Corporation,引物用灭菌去离子水稀释成20 μmol/L,PCR仪上按下列条件进行扩增:94℃预变性3 min,然后94℃30 s变性、54℃30 s退火、72℃30 s延伸,共28个循环,最后72℃10 min终止反应。

取PCR产物5 μL,经20 g/L琼脂糖凝胶(含0.5 μg/mL溴化乙啶)电泳,紫外光下立体成像,用Bio Imaging System(Syngene)全自动图像分析系统处理。并以内参照GAPDH的光密度值进行标准校正,然后用校正值进行分析。

2 结果

2.1 雷帕霉素抑制体外培养的鼠平滑肌细胞增殖
MTT法检测显示雷帕霉素呈剂量依赖性抑制

体外培养的大鼠平滑肌细胞增殖(表 1)。方差分析总的 A 值差异有显著性, $F=28.85$, $P<0.001$ 。两两比较雷帕霉素浓度为 0.1 ng/mL 时与对照组相比

统计学上无显著性差异, Dunnett 单侧 t 检验 $P=0.406$; 其余各组同对照组相比差异均有统计学意义, $P<0.01$ 。

表 1 不同浓度雷帕霉素对平滑肌细胞增殖的影响

Table 1 The proliferation effect of SMC treated with elevating concentration rapamycin (A)

Block	Control	0.1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
1	0.975 ±0.062	0.911 ±0.093	0.793 ±0.051	0.689 ±0.044	0.574 ±0.048
2	0.856 ±0.072	0.852 ±0.040	0.785 ±0.045	0.736 ±0.041	0.661 ±0.082
3	0.875 ±0.067	0.856 ±0.066	0.812 ±0.048	0.651 ±0.042	0.636 ±0.065
Total	0.902 ±0.106	0.873 ±0.079	0.797 ±0.046	0.692 ±0.061	0.624 ±0.075

2.2 雷帕霉素抑制体外培养的鼠平滑肌细胞 PCNA- mRNA 转录

RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果见图 1。不同浓度雷帕霉素作用 48 h 后, PCNA mRNA 表达产物光密度值经内参照 GAPDH 校正后结果见表 2, 统计结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差分析 $F=195.491$, $P<0.001$ 。两两比较雷帕霉素浓度为 0.1 ng/mL 时与对照组相比无统计学显著性差异, Dunnett 单侧 t 检验 $P=0.370$; 其余各组同对照组相比差异均有统计学意义, $P<0.001$ 。

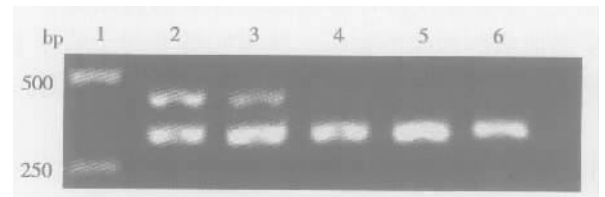


图 1 PCNA- mRNA RT-PCR 产物琼脂糖电泳图

Fig.1 Electropherogram of PCNA- mRNA expression (RT-PCR) in SMC

1: DNA Marker which presents 250 bp and 500 bp strip. 2-6: The upper line presents PCNA while the lower presents housekeeping gene GAPDH as inner control; 2: Control group with no rapamycin treated; 3, 4, 5, 6: 0.1, 1, 10, and 100 ng/mL, respectively

表 2 不同浓度雷帕霉素作用后 PCNA mRNA 表达情况

Table 2 Optic densities of PCNA- mRNA in SMC treated with elevating rapamycin (A)

Block	Control	0.1 ng/mL	1 ng/mL	10 ng/mL	100 ng/mL
1	226.74	205.58	110.46	99.33	77.33
2	212.36	218.67	124.31	108.20	94.04
3	218.96	212.92	104.68	83.98	81.77
Total	219.35 ±7.20	212.39 ±6.56	113.15 ±10.09	97.17 ±12.25	84.38 ±8.66

3 讨论

血管内膜受损伤后的过度增生是导致血管成形术及外科旁路移植术后再狭窄乃至手术失败的主要原因。内膜中过度增殖的平滑肌细胞是增生内膜的主要成分, 血管壁损伤以及中膜静止的平滑肌在紧张刺激下发生表型转变, 由收缩型转化为合成型, 并由中膜跨越内弹力膜向内膜下迁移是内膜过度增殖而导致管腔狭窄的始动因素^[2]。我们的实验研究已经证实炎症过程在内支架术后再狭窄中起着举足轻重的作用^[3]。血管壁损伤后的愈合过程大致包括以下 4 个阶段: 炎症反应;

肉芽组织形成; 平滑肌细胞迁移和聚集; 血管重塑。这一过程主要发生在球囊扩张或支架植入后 6 个月内。鉴于平滑肌细胞的这种生物学特性, 目前大多数关于再狭窄的研究除了抑制炎症反应外, 大都集中在抑制平滑肌细胞的迁移和过度增殖方面。

雷帕霉素作为一种新型免疫抑制剂, 1989 年被批准用于治疗器官移植后的免疫排斥反应。20 世纪 90 年代初 Gregory 等^[4]发现大鼠腹腔内注射雷帕霉素不仅延长移植心脏的寿命, 而且表现出抑制血管内膜增厚的作用。全身给药可明显减轻猪冠状动脉成形术后的内膜增殖^[5]。有动物实验表明, 雷帕霉素能明显减轻大鼠颈动脉、股动脉等移

植血管内膜增生或球囊损伤后的再狭窄^[4,6,7]。

我们的结果表明:雷帕霉素能剂量依赖性抑制体外培养的大鼠平滑肌细胞增殖,MTT检测结果显示培养液终浓度为1 ng/mL雷帕霉素时可起效,随浓度的增大,其抑制作用增强。雷帕霉素通过与细胞内FK506结合蛋白(FKBP-12)结合抑制雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin,TOR)的活性,结果导致蛋白调节酶p27的升高,最终导致细胞周期过程阻断在G₁/S期,使细胞增殖显著受抑制^[8,9]。

PCNA最初是作为一种核抗原加以描述的,后来证实它是DNA多聚酶的一个辅助亚单位,在细胞分裂时协助DNA引导链和随从链的合成,是细胞增殖的重要指标。阻遏PCNA基因的表达,可以抑制平滑肌细胞的增殖,但不会导致细胞死亡^[10]。对细胞内相关基因mRNA表达水平的检测,可以了解该基因在细胞功能活动中作用是否活跃。本实验结果显示,雷帕霉素能有效抑制大鼠胸主动脉平滑肌细胞PCNA-mRNA的表达,并随浓度增高抑制作用增强,作用48 h时的有效抑制浓度为1 ng/mL,与前述MTT检测结果一致。

本实验结果表明,雷帕霉素能剂量依赖性抑制大鼠平滑肌细胞的增殖,为雷帕霉素在临床上预防血管再狭窄及目前雷帕霉素用作药物涂层支架的首选药物之一提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 刘英梅,伍卫,韦育林. 支架植入诱导平滑肌细胞凋亡在防治再狭窄中的作用[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2004, 25(3S): 30-32.
- [2] MONGIARDO A, CURCIO A, SPACCAROTELLA C, et al. Molecular mechanisms of restenosis after percutaneous peripheral angioplasty and approach to endovascular therapy [J]. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2004, 4(3): 275-287.
- [3] 王子亮,杨建勇,庄文权,等. 活化巨噬细胞培养上清液对VSMCs型胶原合成的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2005, 26(3): 297-299.
- [4] GREGORY C R, HUIE P, BILLINGHAM M E, et al. Rapamycin inhibits arterial intimal thickening caused by both alloimmune and mechanical injury. Its effect on cellular, growth factor, and cytokine response in injured vessels [J]. *Transplantation*, 1993, 55(6): 1409-1418.
- [5] GALLO R, PADUREAN A, JAYARAMAN T, et al. Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle [J]. *Circulation*, 1999, 99(16): 2164-2170.
- [6] MORRIS R E, CAO W, HUANG X, et al. Rapamycin (Sirolimus) inhibits vascular smooth muscle DNA synthesis in vitro and suppresses narrowing in arterial allografts and in balloon-injured carotid arteries: evidence that rapamycin antagonizes growth factor action on immune and nonimmune cells [J]. *Transplant Proc*, 1995, 27(1): 430-431.
- [7] GREGORY C R, HUANG X, PRATT R E, et al. Treatment with rapamycin and mycophenolic acid reduces arterial intimal thickening produced by mechanical injury and allows endothelial replacement [J]. *Transplantation*, 1995, 59(5): 655-661.
- [8] LEVY E I, HANEL R A, HOWINGTON J U, et al. Sirolimus-eluting stents in the canine cerebral vasculature: a prospective, randomized, blinded assessment of safety and vessel response [J]. *J Neurosurg*, 2004, 100(4): 688-694.
- [9] GERSHLICK A H. Treating atherosclerosis: local drug delivery from laboratory studies to clinical trials [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 160(2): 259-271.
- [10] SIMONS M, EDELMAN E R, ROSENBERG R D. Antisense proliferating cell nuclear antigen oligonucleotides inhibit intimal hyperplasia in a rat carotid artery injury model [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(6): 2351-2356.
- [11] GOSWAMI P C, ALBEE L D, SPITZ D R, et al. A polymerase chain reaction assay for simultaneous detection and quantitation of proto-oncogene and GAPD mRNAs in different cell growth rates [J]. *Cell Prolif*, 1997, 30(6-7): 271-282.

(编辑 张恩健)