

洛沙坦对血管平滑肌细胞增殖的干预作用 及 C-myc 基因表达的影响

黄少华¹, 陈敏生², 刘建康³

(广州医学院 1. 第一附属医院心脏病研究室, 2. 第二附属医院 心内科, 3. 组织胚胎学教研室; 广东 广州 510182)

摘要:【目的】探讨血管紧张素 II 受体拮抗剂洛沙坦(losartan)在高血压病血管重塑过程中的作用及作用机制。【方法】①应用 ACAS570 共聚焦激光扫描显微系统, 通过荧光免疫组化方法, 对洛沙坦作用下体外培养的大鼠血管平滑肌细胞中的核细胞增殖抗原(PCNA)及与增殖相关的 C-myc 基因表达产物进行定量检测。②测定洛沙坦作用下的体外培养的大鼠血管平滑肌细胞的增殖活性(MTT)值。【结果】洛沙坦作用下血管平滑肌细胞的增殖活性(MTT)降低; 实验组和对照组分别为 0.2045 ± 0.0013 、 0.2239 ± 0.0010 ($P < 0.05$)。PCNA 及 C-myc 的表达都明显降低; 实验组和对照组 PCNA 分别为 1338.56 ± 232.56 、 1542.71 ± 200.04 ($P < 0.01$)。C-myc 分别为 1528.03 ± 125.14 、 1740.35 ± 205.91 ($P < 0.01$)。【结论】洛沙坦通过影响血管平滑肌细胞的增殖活性而参与血管壁结构的改变。

关键词: 血管紧张素 II/受体, 拮抗剂; 肌, 平滑, 血管/药物作用; 原癌基因蛋白质 C-myc 类/药物作用

中图分类号: R 972.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2000)01-0031-03

Influence of Losartan on Proliferation of Cultured Vascular Smooth Muscle Cells with Correlation to Gene Expression of C-myc

HUAN Shao-hua¹, CHEN Min-sheng², LIU Jian-kang³

(1. Department of Cardiovascular Research, First Affiliated Hospital, 2. Department of Internal medicine, Second Affiliated Hospital, 3. Department of Histology, Guangzhou Medical College; Guangzhou 510182, China)

Abstract:【Objective】To explore the effect of losatan (an angiotensin II receptor blocking agent) on the vascular remoulding in hypertension and its mechanism. 【Method】① Cofocusing laser scanning microscope system (Model ACAS570) was used, and by the method of fluorescent immunochemistry, the proliferative cell nuclear antigen(PCNA) and the proliferation-related expression product of C-myc gene in cultured rat vascular smooth muscle cells treated with losatan were quantitatively assayed. ②The proliferative activity (MTT value) of the vascular smooth muscle cells treated with losartan was analyzed. 【Result】Under the influence of losatan, the vascular smooth muscle cells' proliferative activity (MTT) decreased, the values in the groups of experiment and control were 0.2045 ± 0.0010 and 0.2239 ± 0.0010 ($P < 0.05$), respectively. The cellular PCNA and the expression of C-myc also decreased significantly, PCNA in the groups of experiment and control were 1338.56 ± 232.56 and 1542.71 ± 200.04 ($P < 0.01$); and C-myc expression in the two groups were 1528.03 ± 125.14 and 1740.35 ± 205.91 ($P < 0.01$), respectively. 【Conclusion】Losartan takes part in the changes of the vascular wall structure through effecting on the proliferative activity of vascular smooth muscle cells.

Key words: angiotensin II/receptor blocking agent; muscle, smooth, vascular/drug effects; proto-oncogene proteins c-myc/drug effects

血管局部存在的肾素——血管紧张素系统 (RAS), 其中血管紧张素(angiotensin, AT)对血管平

收稿日期: 1999-10-14

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(980466)

作者简介: 黄少华(1959-), 女, 广东普宁人, 副研究员, 1982年毕业于中山医学院校友。All rights reserved. <http://www.cnki.net>

滑肌细胞的收缩和促增殖作用在高血压的发病过程中具有十分重要的作用^[1]。洛沙坦(losartan)是临床上第一个用于高血压治疗的非肽类血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂,其药理及临床研究表明:losartan通过特异地拮抗ATⅡ受体Ⅰ型使血管舒张而获得良好的降压效果^[2]。近年来对于高血压的治疗不仅要求良好的降压作用,还应当逆转血管壁重塑及重要脏器的病理改变^[3,4]。但losartan在高血压的降压治疗过程中是否可直接作用于血管平滑肌细胞引起血管壁结构重塑的逆转而产生治疗效果,这一点并不十分清楚。我们通过研究losartan对体外平滑肌细胞增殖的影响,以探讨它在血管重塑方面的作用及作用机制。

1 材料与方 法

1.1 血管平滑肌细胞的体外培养

组织贴块法培养血管平滑肌细胞。无菌条件下分离SD大鼠的胸主动脉,剪碎后加入适量含100 mL/L胎牛血清的DMEM(GiBco公司产品)培养液,37℃、5%(v/v)CO₂培养箱中静置培养。用光镜和免疫化学方法进行鉴定。选择生长良好的第6~7代血管平滑肌用于实验。

1.2 实验分组

实验组加入losartan条件培养液,而对照组为无血清DMEM培养液。losartan(MERCK & CO产品)条件培养液以无血清的DMEM培养液配制,终浓度为10⁻⁵g/L。

1.3 血管平滑肌细胞增殖活性的测定

选择第6代生长良好的平滑肌细胞,消化传代至96孔培养板上,传代细胞密度为5.0×10⁷/L。细胞经18h的预培养和6h的预处理后,分别将losartan条件培养液和DMEM培养液加入实验组和对照组,37℃、5%(v/v)CO₂继续培养24h。平滑肌细胞增殖活性以550nm波长下酶标仪检测样本中MTT结晶所形成的吸光度(A值)来表示。检测样本为36个。

1.4 血管平滑肌细胞核增殖抗原(PCNA)和C-myc基因的表 达

选择第6代生长良好的平滑肌细胞,消化传代至24孔培养板上,传代细胞密度为5.0×10⁷/L。细胞经18h的预培养和6h的预处理后,分别将losartan条件培养液和DMEM培养液加入实验组和

对照组,37℃、5%(v/v)CO₂继续培养24h。吸去培养液,pH7.3的PBS洗3次,3mL/L多聚甲醛固定30min,PBS洗3次。

已固定样品按常规免疫组化方法处理。50mL/L山羊血清封闭,室温孵育30min;倾去血清,加入1:50鼠抗大鼠PCNA单克隆抗体和抗C-myc的单克隆抗体(美国Santa Cruz公司产品),4℃过夜。倾去孵育液,PBS洗3次,加1:10FITC荧光标记兔抗鼠抗体(天象人公司产品),室温孵育40min,PBS充分洗板,每待测样品加20μL PBS,置带电脑激光扫描共焦显微细胞仪(ACAS575UVC型,美国MERIDIAN公司制造)下进行样品检测和数据的即时分析处理,预扫描后选最佳细胞扫描参数,对选定视野激光扫描并存储所采集各项实验数据,扫描细胞总数在200个以上。

激光扫描共焦显微细胞仪借助免疫荧光显微技术,对单个粘附式细胞内的各种动态参数图象分析处理,准确定量细胞内核酸、蛋白等被标记物。因此检测细胞内被标记的PCNA、C-myc的平均荧光值即可反映其表达的高低。

1.5 统计学处理

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用t检验。

2 结 果

2.1 血管平滑肌细胞鉴定

倒置显微镜下,细胞生长呈典型的“谷与峰”结构特征,a-actin单克隆抗体免疫细胞化学显示95%为阳性血管平滑肌。

2.2 Losartan对血管平滑肌增殖活性的影响

MTT比色法检测细胞的增殖活性,losartan组和对照组的MTT结晶A值分别为(0.2045±0.0013)和(0.2239±0.0010),两者相比有差异(P<0.05)。

2.3 Losartan对血管平滑肌细胞中PCNA及C-myc表达的影响

在显微镜下,losartan组的荧光强度比对照组明显降低。对照组和losartan组血管平滑肌细胞中PCNA表达的平均荧光值分别为1542.71±200.04和1338.56±232.71,两者比较差异明显(P<0.01)。C-myc表达的平均荧光值分别为1740.35±205.91和1528.03±125.14,两者比较结果差异明显(P<0.01)。结果见图1~4。

3 讨 论

有临床研究资料证明:血中肾素及 AT II 的活性和浓度明显升高与高血压发病过程中血管平滑肌细胞的增殖与肥大而导致血管壁结构的重塑密切相关^[3]。许多研究结果表明血管紧张素 II (Angiotensin II, AT II)通过血管平滑肌上的 AT II 受体,使细胞内游离钙浓度升高,引起血管收缩和血管平滑肌细胞的异常增殖^[5]。为研究 losartan 对血管平滑肌异常增殖的干预作用,我们选用体外培养的平滑肌细胞模型观察 losartan 作用下的血管平滑肌增殖活性和细胞核增殖抗原(PCNA)及 C-myc 的表达。

研究结果显示:losartan 作用下,体外培养的血管平滑肌细胞增殖活性即 MTT 降低,PCNA 及 C-myc 表达有一定程度的降低,PCNA 和 C-myc 表达降低的差异较明显($P < 0.001$)。MTT 通过显示细胞线粒体代谢酶活性的高低间接反映细胞的增殖活性^[6],而 PCNA 则是细胞核中 DNA 聚合酶的附属蛋白,其主要生物学作用是促进细胞核中 DNA 链的合成与延伸,促进细胞的生长和增殖。MTT 值和 PCNA 表达可充分反映细胞增殖能力^[7]。C-myc 原癌基因在胚胎发育、细胞控制、细胞分化和组织损伤修复过程中发挥重要的调控作用^[8]。一些心血管疾病细胞的增殖是由于 C-myc 异常表达所导致的^[9]。其机理是 C-myc 基因蛋白产物与 DNA 的合成密切相关。因此,根据这一研究结果推断,属于 AT II 受体选择性拮抗剂的 losartan,不但有抑制 VSMC 收缩、舒张血管的作用,而且可抑制 VSMC 的增殖活性,其作用机理可能是通过影响 C-myc 基因的表达阻滞细胞中的 PCNA 的合成,从而影响 DNA 和蛋白质的合成,重塑血管壁结构,达到有效地降低血压。

losartan 是 90 年代以来新合成的 AT 受体阻断剂,它与其他非肽类受体阻断剂如 Saralasin 相比,其显著特点是没有部分激动作用,与 AT 受体具有较高的亲和力,低浓度时仍不与其他受体发生亲合作用,特异性强^[10]。在我们的实验中,losartan 对 VSMC 的作用浓度为 10^{-5} g/L,相对于正常用药的血药浓度是比较低的,说明低浓度药物抗 VSMC 增殖作用仍较明显,对高血压的血管壁重塑作用是有效的。losartan 对血管平滑肌的这一效应可能与许

多因素有关,但可能与阻断平滑肌细胞的 AT II 受体密切相关,其机理有待进一步证实。值得注意的是,有文献报道 Losartan 在高血压临床治疗的过程中,除具有明显的降压效果外,还表现出一定的神经激素效应^[11]。我们的系列试验中也发现了有关现象。losartan 与神经内分泌系统间的相互作用,以及这种作用对高血压治疗过程中血管重塑的影响值得进一步深入的研究和探讨。

(本文图见插图 2)

参考文献:

- [1] Dzau V J, Gibbons G H, Pratt R Z. Molecular mechanisms of vascular renin-angiotensin system in myointimal hyperplasia [J]. *Hypertension*, 1991, 18(suppl II): 100.
- [2] John H, Bauer, Garry P R. The angiotensin II type I receptor antagonists: a new class of antihypertensive drugs [J]. *ARCH Intern Med*, 1995, 56(155): 1361.
- [3] 黄少华, 曾昭华, 苏诚坚, 等. 西拉普利对自发性高血压大鼠心肌超微结构损害的逆转作用 [J]. *中国高血压杂志*, 1995, 3(2): 101.
- [4] 黄少华, 曾昭华, 苏诚坚, 等. 西拉普利对自发性高血压大鼠动脉内膜损害的逆转作用 [J]. *广东药学院学报*, 1995, 11(2): 85.
- [5] Rhian M, Touyz Ernesto L. Schiffrin angiotensin II regulates vascular smooth muscle cell PH, contraction and growth via tyrosine kinase-dependent signaling pathways [J]. *Hypertension*, 1997, 2(30): 224.
- [6] 郑永唐, 贲昆龙. 测定细胞存活和增殖的 MTT 方法的建立 [J]. *免疫学杂志*, 1992, 8(4): 266.
- [7] Siitonen S M, Isola J J, Rantala I S, *et al*. Intratumor variation in cell proliferation in breast carcinoma as determined by antiproliferating cell nuclear antigen monoclonal antibody and automated image analysis [J]. *Am J Clin Pathol*, 1993, 99(3): 226.
- [8] 李志远. C-myc 和 P⁵³ 基因在心血管病中的研究 [J]. *心血管病学进展*, 1996, 3(17): 158.
- [9] 汤 健, 周爱儒. 原癌基因与心血管病 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1990. 130 ~ 168.
- [10] Smith R D, Chiu A T, Wong P C, *et al*. Pharmacology of nonpeptide angiotensin II antagonists [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1992, 32(2): 135.
- [11] Gottlieb S S, Dickstein K, Fleck E, *et al*. Hemodynamic and neurohormonal effects of the angiotensin II antagonist losartan in patients with congestive heart failure [J]. *Circulation*, 1993, 88(4 part 1): 1602.

(编辑 黄小延)

尿激酶型纤溶酶原激活系统与肺癌转移的关系 (正文见第 14 页)

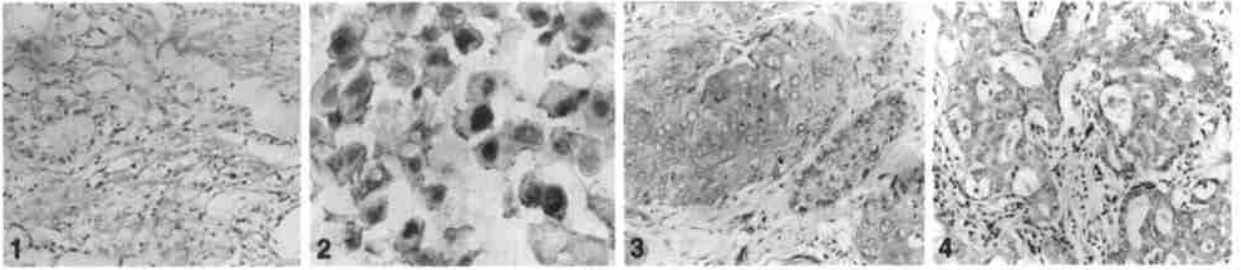


图 1 肺腺癌中 PAI-1 蛋白阳性表达

图 2 肺大细胞癌中 UPAR 蛋白阳性表达

图 3 肺鳞癌中 UPA 蛋白阳性表达

图 4 肺腺癌中 PAI-2 蛋白阳性表达

Fig. 1 PAI-1 protein positive staining in lung adenocarcinoma (LSAB × 200)

Fig. 2 UPAR protein positive staining in large cell lung (LSAB × 400)

Fig. 3 UPA protein positive staining in lung squamous cell carcinoma (LSAB × 200)

Fig. 4 PAI-2 protein positive staining in lung adenocarcinoma (LSAB × 200)

洛沙坦对血管平滑肌细胞增殖的干预作用及 C-myc 基因表达的影响 (正文见第 31 页)

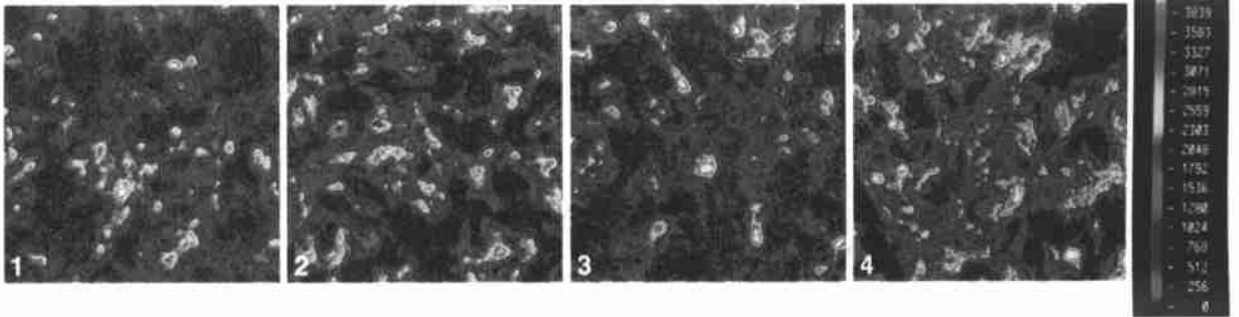


图 1 Losartan 对外培养 VSMC PCNA 表达的影响

图 2 对照组 VSMC 中 PCNA 表达

图 3 Losartan 对外培养 VSMC C-myc 基因的表达

图 4 对照组 C-myc 基因表达

Fig. 1 The effect of Losartan on the expression of PCNA in VSMC (fluorescence immunochemistry method)

Fig. 2 The expression of PCNA in vascular smooth muscle cell in control group (fluorescence immunochemistry method)

Fig. 3 The effect of losartan on the expression of C-myc in VSMC (fluorescence immunochemistry method)

Fig. 4 The expression of C-myc in vascular smooth muscle cells in control group (fluorescence immunochemistry method)