

· 论 著 ·

冬虫夏草水提取物对慢性低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖及癌基因 c-fos、c-jun 表达的影响*

高宝安, 陈世雄[△], 邓红艳, 向光明, 黄 骥, 崔向军, 杨 俊
(三峡大学第一临床医学院/湖北省宜昌市中心人民医院 443003)

摘要:目的 探讨冬虫夏草水提取物对慢性低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖的影响及其可能的作用机制。方法 用 MTT 法测定不同浓度冬虫夏草水提取物对慢性低氧大鼠 PASMCs 增殖的影响,用流式细胞仪分析冬虫夏草水提取物对慢性低氧大鼠 PASMCs 细胞周期的影响,用免疫细胞化学染色法测定冬虫夏草水提取物对慢性低氧大鼠 PASMCs 增殖细胞核抗原(PCNA)和癌基因 c-fos、c-jun 表达的影响。结果 低氧对照组大鼠 PASMCs 吸光度(A)值明显高于常氧对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),1、10、100 mg/mL 冬虫夏草组 A 值呈明显下降趋势,差异均有统计学意义($P < 0.05$);低氧对照组 S+G₂M 期细胞比例明显高于常氧对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$),冬虫夏草组 S+G₂M 期细胞比例明显低于低氧对照组,但高于常氧对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$);冬虫夏草组 PCNA 阳性表达率明显低于低氧对照组,但高于常氧对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$);冬虫夏草组细胞 c-fos 和 c-jun 蛋白阳性染色平均积分光密度值(AIOD)明显低于低氧对照组,但高于常氧对照组,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结论 冬虫夏草水提取物呈浓度依赖性抑制慢性低氧导致的大鼠 PASMCs 增殖,其抑制作用可能是通过减少细胞内 c-fos、c-jun 基因和 PCNA 的表达、降低 S 期和 G₂/M 期细胞比例来实现的。

关键词:冬虫夏草水提取物;大鼠肺动脉平滑肌细胞;低氧;增殖;癌基因

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.15.008

中图分类号:R541.505;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)15-1957-03

Effects of water extract from *Cordyceps sinensis* on hypoxia-induced proliferation and oncogene expression of rat pulmonary artery smooth muscle cells*

GAO Bao-an, CHEN Shi-xiong[△], DENG Hong-yan, et al.

(The First College of Clinical Medical Science, Three Gorges University

Yichang Central People's Hospital, Yichang, Hubei 443003, China)

Abstract: Objective To investigate effects of water extract from herb *Cordyceps sinensis* on hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells(PASMCs) and its mechanism in vitro. **Methods** Cell growth inhibitions of different concentrations of water extract from *Cordyceps sinensis* on rat PASMCs were analyzed by MTT assay; Cell cycles of rat PASMCs treated with water extract from *Cordyceps sinensis* were analyzed by cytofluorometry; Expressions of proliferating cell nuclear antigen(PCNA), c-fos, and c-jun of rat PASMCs were measured by immunocytochemistry. **Results** MTT assay showed, relative ratio A of absorbance of rat PASMCs in chronic hypoxia group was higher significantly than ratio A in normoxia group($P < 0.01$); Ratio A of different *Cordyceps sinensis* group was decreased when the concentration of *Cordyceps sinensis* was increased(all $P < 0.05$). Percentage of cells in the S+G₂/M phase of chronic hypoxia group was higher significantly than that of normoxia group($P < 0.01$); Percentage of cells in the S+G₂/M phase of *Cordyceps sinensis* group was higher significantly than that of normoxia group, but lower remarkably than that of hypoxia group(all $P < 0.05$). Positive percentage of PCNA in *Cordyceps sinensis* group was lower significantly than that in hypoxia group, but higher remarkably than that in normoxia group(all $P < 0.01$). Average integrated optical density(AIOD) of c-fos and c-jun proteins in *Cordyceps sinensis* group were lower significantly than AIOD in hypoxia group, but higher remarkably than AIOD in normoxia group(all $P < 0.01$). **Conclusion** Water extract from *Cordyceps sinensis* can inhibit rat PASMCs hypoxia-induced proliferation in a concentration-dependant manner; The mechanism could be to suppress expression of PCNA, c-fos, c-jun, and decrease percentage of cell in S and G₂/M phase.

Key words: water extract from herb *Cordyceps sinensis*; rat pulmonary artery smooth muscle cells; hypoxia; proliferation; oncogene

低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)是肺心病发病过程的中心环节,其产生及严重程度明显影响肺心病和慢性阻塞性肺疾病的发生、发展、病程及预后^[1-2]。因此,有关 HPH 发病机制和治疗研究一直是国内外研究的热点。目前认为,HPH 血管病变主要是肺血管收缩反应增强和肺血管结构重塑(pulmonary vascular structural re-

modeling, PVSR)。尽管引起 PVSR 的原因多种多样,并且多环节,然而肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)异常增殖则是 PVSR 的关键环节^[3-5]。冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*)目前在呼吸系统疾病的研究主要集中于慢性阻塞性肺疾病(COPD)气道重塑、免疫功能、COPD 患者肺功能改变及肺癌等^[6-7],冬虫夏草对低氧性

* 基金项目:湖北省卫生厅青年人才基金资助项目(QJX2008-21);湖北省宜昌市医疗卫生科技计划资助项目(A2008302-07)。△ 通讯作者,电话:(0717)6486167;E-mail:222xiaozhao@163.com。

PASMCs 增殖是否存在影响,国内外尚未见报道。作者通过研究冬虫夏草水提取物对慢性低氧大鼠 PASMCs 增殖及相关基因表达的影响,初步探讨冬虫夏草对低氧性 PASMCs 的增殖作用及其可能的作用机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物 冬虫夏草购于湖北省药材公司。用水提醇沉法提取冬虫夏草,取虫草粗粉 50 g,加水 400 mL 煎煮,煮沸后文火煮 30 min 保留提取液,再加水 300 mL 用同样方法煎煮,合并 2 次提取液过滤(滤纸)浓缩至 50 mL,加入 95% 乙醇 140 mL,4 °C 密封放置 24 h,抽滤取上清液,旋转蒸发器回收乙醇,离心取上清液,加入适量 dd H₂O 使总容积为 50 mL(生药浓度为 1 g/mL),0.22 μm 滤膜过滤除菌,4 °C 保存,用前用 DMEM 培养基稀释至所需浓度。

1.1.2 实验动物 健康雄性成年 SD 大鼠 40 只,平均体质量为 200~250 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.1.3 仪器与试剂

1.1.3.1 主要仪器 450 型 ELISA-Reader 酶标仪(Bio-Rad 公司)、恒温恒湿 CO₂ 细胞培养箱(德国 Heraeus 公司)、倒置显微镜(日本 Olympus)、FACSort 流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司)、HMIAS-2000 型高清晰度彩色医学图文分析系统等。

1.1.3.2 主要试剂 鼠单克隆抗 α -actin 抗体、单克隆抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)抗体、抗 c-fos 抗体、抗 c-jun 抗体、链霉卵白素过氧化酶(SP)试剂盒、二氨基联苯胺(DAB)购于美国 Santa Cruz 生物技术公司,DMEM 培养基购于美国 Invitrogen 公司,碘化丙啶(PI)购于美国 BD 公司,其他试剂均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠 PASMCs 培养与鉴定 SD 大鼠麻醉后开胸迅速取出心、肺,在预冷 D-Hanks 液中分离出 3~4 级肺动脉(直径为 300~700 μm)。撕去外膜并擦去内皮,剪碎,在消化液 I(2 mL D-Hanks 中含 2 mg 胰蛋白酶和 3 mg 胶原酶)中 37 °C 温育 10 min。终止反应,1 000 r/min(离心半径 14 cm)离心 10 min,静置片刻后弃上清液。用消化液 II(2 mL 20% 胎牛血清 DMEM 含 2 mg 胶原酶)悬浮,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中消化 1~2 h。镜下可见较多悬浮细胞,轻柔吹打数次后,1 000 r/min(离心半径 14 cm)离心 10 min。弃上清液,细胞用含 20% 胎牛血清 DMEM 悬浮,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中静置培养。约 5~7 d 长满,呈典型峰-谷状重叠生长。用免疫细胞化学 α -actin 鉴定,可见胞浆中棕色肌丝结构,与细胞纵轴平行。原代培养细胞 80%~90% 长满瓶底即可传代培养,取第 2~4 代生长良好的细胞用于实验。

1.2.2 MTT 试验 在 96 孔平底细胞培养板接种浓度约为 1×10^4 /mL 的 PASMCs 100 μL,用含 10% 胎牛血清 DMEM 补至 200 μL,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 24 h。生长成层后换无血清的 DMEM 培养基同步化 24 h。分设常氧对照组、低氧对照组和不同浓度冬虫夏草组(1、10、100 mg/mL),每组设 6 个复孔,每孔溶液总体积均为 200 μL,置于培养箱中培养。常氧对照组条件为 37 °C、5% CO₂、21% O₂、74% N₂,低氧对照组和不同浓度冬虫夏草组条件为 37 °C、5% CO₂、2% O₂、93% N₂。48 h 后加入 MTT(5 mg/mL),每孔 20 μL。置于培养箱中培养 4 h,然后加入二甲基亚砜(DMSO)原液 150 μL/well,将培养板平放在平板振荡器上振摇 10 min,使结晶物溶解,用

酶标仪(570 nm 主波长、630 nm 副波长)检测吸光度值(A 值)以反映活细胞数目。

1.2.3 细胞周期分析 根据 MTT 试验结果,收集常氧对照组、低氧对照组和 10 mg/mL 冬虫夏草组细胞,用磷酸盐缓冲液(PBS 0.01 mol/L,pH 7.2)洗涤 2 次,1 200 r/min(离心半径 14 cm)离心 5 min,然后加入预冷 70% 乙醇固定,4 °C 过夜,再收集细胞,经 PBS 洗涤后,经核糖核酸酶 A(Rnase)消化,依次加入膜穿孔剂(0.1% Triton X-100)、碘化丙啶(PI 终浓度为 100 mg/L),4 °C 避光染色 30 min 后上机检测。应用 FACSort 流式细胞仪进行细胞周期分析检测。

1.2.4 免疫细胞化学染色 收集上述各组 PASMCs 细胞爬片,用 PBS 清洗 3 次后用 4% 多聚甲醛固定 20 min,PBS 清洗后采用 SP(链霉亲和素-过氧化物酶)法进行 PCNA、c-fos 和 c-jun 免疫细胞化学染色。其工作滴度为 1:200。各组均设阴性对照,省略一抗,以 PBS 代替。每组观察 6 张爬片,光镜下每张玻片随机连续观察 200 个细胞,计数 PCNA 阳性百分率。c-fos 和 c-jun 染色结果经医学图文分析系统进行图像分析,以细胞阳性着色的积分光密度值(AIOD 值)表示免疫细胞蛋白阳性表达的相对量。

1.3 统计学方法 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用方差分析,两两比较采用 *q* 检验,率的检验采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 PASMCs 鉴定 在倒置相差显微镜下大鼠 PASMCs 均呈梭形,椭圆形核位于细胞中央,并有核仁;细胞可重叠生长达多层,部分区域较稀疏,生长呈典型的峰-谷状态; α -actin 免疫细胞化学染色可见胞浆内细肌丝沿细胞纵轴分布,鉴定培养的细胞为平滑肌细胞,见图 1、2。

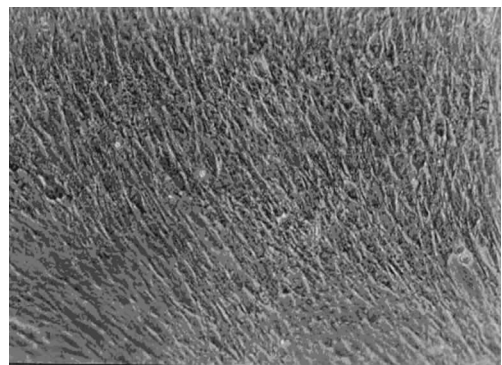


图 1 倒置相差显微镜下大鼠 PASMCs 状态观察

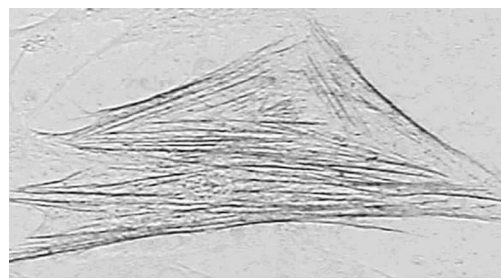


图 2 α -actin 免疫细胞化学染色结果

2.2 冬虫夏草对慢性低氧大鼠 PASMCs 增殖的影响 低氧对照组吸光度(A)值为 $0.467 2 \pm 0.060 0$,明显高于常氧对照组($0.229 7 \pm 0.032 1$),差异有统计学意义($P < 0.01$)。1、10、100 mg/mL 冬虫夏草组的 A 值分别为 $0.419 8 \pm 0.053 6$ 、 $0.352 8 \pm 0.056 7$ 、 $0.284 4 \pm 0.056 1$,呈明显下降趋势,差异

均有统计学意义 ($P < 0.05$), 其中 1 mg/mL 冬虫夏草组与低氧对照组、100 mg/mL 冬虫夏草组与常氧对照组 A 值比较, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 冬虫夏草对慢性缺氧大鼠 PSMCs 细胞周期的影响
慢性低氧时 S+G₂M 期细胞所占比例为 (29.88 ± 4.47)%, 明显高于常氧对照组 [(13.65 ± 2.72)%], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 冬虫夏草组 S+G₂M 期细胞比例为 (21.81 ± 3.11)%, 明显低于低氧对照组, 但高于常氧对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3。

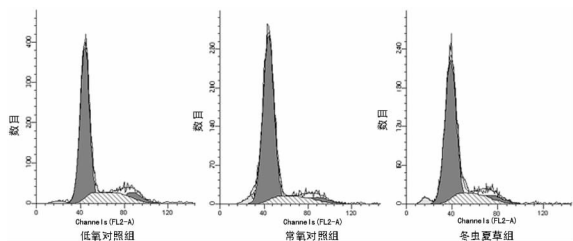


图 3 冬虫夏草对慢性缺氧大鼠 PSMCs 细胞周期的影响

2.4 冬虫夏草对慢性缺氧大鼠 PSMCs PCNA 表达的影响
PCNA 阳性表达者染色为棕黄色, 位于胞核。慢性低氧时 PCNA 阳性表达率为 (80.17 ± 6.64)%, 明显高于常氧对照组 [(29.75 ± 5.60)%], 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 10 mg/mL 冬虫夏草组 PCNA 阳性表达率为 (43.50 ± 4.49)%, 明显低于低氧对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 4。

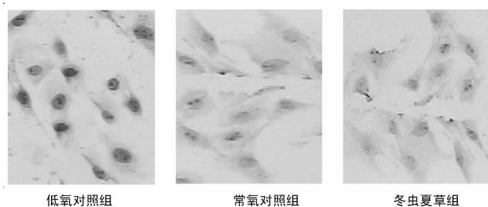


图 4 冬虫夏草对慢性缺氧大鼠 PSMCs PCNA 表达的影响 (免疫细胞化学染色, ×400)

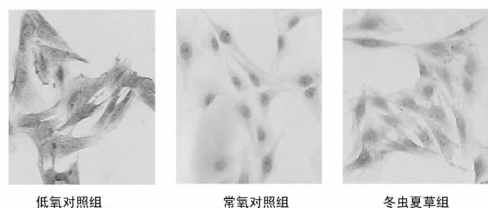


图 5 冬虫夏草对慢性缺氧大鼠 PSMCs c-fos 表达的影响 (免疫细胞化学染色, ×400)

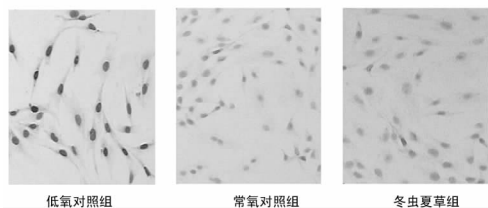


图 6 冬虫夏草对慢性缺氧大鼠 PSMCs c-jun 表达的影响 (免疫细胞化学染色, ×200)

2.5 冬虫夏草对慢性缺氧大鼠 PSMCs c-fos、c-jun 蛋白表达的影响
c-fos 阳性表达为细胞胞浆明显棕黄色染色, c-jun 阳性表达为细胞核呈明显棕黄色染色。慢性低氧大鼠 PSMCs c-fos、c-jun IOD 分别为 0.160 ± 0.019、0.326 ±

0.048, 明显高于常氧对照组 (0.044 ± 0.009、0.126 ± 0.033), 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 10 mg/mL 冬虫夏草组 c-fos、c-jun AIOD 分别为 0.112 ± 0.016、0.188 ± 0.036, 明显低于低氧对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 5、6。

3 讨 论

众多研究表明, 慢性低氧导致肺动脉高压的中心环节是肺血管重塑, 主要表现为肺动脉平滑肌的异常增殖。在细胞增殖周期中, 一些蛋白的合成对于细胞由 G₀ 期进入 G₁、S 期是必需的, 如降钙素、非组蛋白染色体蛋白、DNA 复制有关酶系及 PCNA 等, 其中 PCNA 与细胞增殖明显相关 [8-9]。PCNA 是相对分子质量为 33~36 × 10⁹ 的核蛋白, 作为 DNA 聚合酶 δ 的辅助因子在 DNA 合成中发挥作用, 是评价细胞增殖状态的一个重要指标。PCNA 过度表达预示着细胞增生活跃, 反之则表明细胞增生处于抑制状态。

整个细胞周期要经历两个时期, 即分裂间期和有丝分裂期 (M 期)。分裂间期也叫生长期, 此期又可分为 3 期, 即生长期前期 (G₁ 期)、DNA 合成期 (S 期) 和生长期后期 (G₂ 期)。一般以 S 期和 G₂/M 期所占比例来反映细胞增殖状态。

c-fos 和 c-jun 属于原癌基因家族中能被第 2 信使诱导的即刻早期基因, 其表达产物参与细胞内信息传递、能量代谢和细胞的生长分化 [10-11]。细胞外刺激通过受体等途径激活第 2 信使, 第 2 信使进入细胞核内, 诱导 c-fos、c-jun 等基因转录 mRNA, c-fos 在细胞浆内表达的核蛋白 FOS 经过广泛修饰后, 进入细胞核与 c-jun 表达产物核蛋白 JUN 形成异源二聚体复合物, 即转录激活蛋白 1 (activator protein 1, AP-1) [12-13]。AP-1 是能与 DNA 调节序列相结合的蛋白质复合物, 可被基因启动子或增强子序列识别并结合, 从而参与细胞生长、分化等一系列病理生理过程。

冬虫夏草是子囊菌纲肉座菌目麦角菌属虫草菌寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫体上的子座和幼虫尸体, 属中国国家二级保护的名贵药材, 与人参、鹿茸并列为中国的三大补品。冬虫夏草主要成分包括核苷类、氨基酸多肽、多糖、甾醇糖醇、脂肪酸、维生素、微量元素等。现代医学研究发现, 冬虫夏草具有降血糖、抑制肿瘤、抗氧化、抗衰老、抗纤维化、提高人体免疫功能等功效 [14-15]。

本实验成功分离并培养了大鼠 PSMCs, 再次证实慢性低氧能够促使大鼠 PSMCs 增殖。与常氧对照组比较, 慢性低氧可能导致 PSMCs c-fos、c-jun 基因和 PCNA 高表达, 加速 DNA 合成, 促使进入 S 期和 G₂/M 期细胞增多。MTT 试验显示, 冬虫夏草水提取物能够抑制慢性低氧导致的大鼠 PSMCs 增殖, 并且此种抑制作用呈浓度依赖性, 在高浓度冬虫夏草水提取物 (100 mg/mL) 作用下, 慢性低氧大鼠 PSMCs 的增殖与常氧对照组比较, 差异无统计学意义 ($P = 0.084$)。流式细胞术和免疫细胞化学染色显示, 与低氧对照组比较, 冬虫夏草水提取物 (10 mg/mL) 能够降低 S 期 + G₂/M 期细胞比例 [(29.88 ± 4.47)%、(21.81 ± 3.11)%], $P < 0.01$, 减少大鼠 PSMCs 细胞核内 PCNA 阳性率 [(80.17 ± 6.64)%、(43.50 ± 4.49)%], $P < 0.01$, 使大鼠 PSMCs c-fos、c-jun 基因表达减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。作者推测, 冬虫夏草水提取物部分阻断了慢性低氧对大鼠 PSMCs c-fos、c-jun 基因和 PCNA 表达的影响, 抑制了大鼠 PSMCs 的增殖, 从而可能降低肺动脉压力和延缓肺动脉高压的进程。

综上所述, 慢性低氧能够促使大鼠 PSMCs 的增殖, 而冬虫夏草水提取物可能通过减少 c-fos、c-jun 基因和 PCNA 的表达, 降低 S 期和 G₂/M 期细胞比例, 以此抑制 (下转第 1962 页)