由表4数据看出，取代基对HOMO, LUMO及能隙 ΔE 的影响都不很大. 这也就是说，不对称取代基在大大改善酞菁分子的非线性光学性的同时对酞菁分子的热力学及动力学稳定性没有明显影响.

参 考 文 献

1 Leznoff C C, Lever A B P. Phthalocyanines, Properties and Applications. New York: VSH, 1989. 8
2 Leznoff C C, Greenberh S, Khouw B, et al. The syntheses of mono- and disubstituted phthalocyanines using a dithioimide. Can J Chem, 1987, 65: 1 705
3 Liu Y Q, Xu Y, Zhu D B, et al. Optical second-harmonic generation from Langmuir-Blodgett films of an asymmetrically substituted phthalocyanine. J Phys Chem, 1995, 99(18): 6 957
4 Robertson J M. An X-ray study of the structure of the phthalocyanines. Part I the metal-free, nickel, copper, and platinum compounds. J Chem Soc, 1935: 615
5 Robertson J M. An X-ray study of the phthalocyanines. Part II Quantitative structure determination of the metal-free compound. J Chem Soc, 1936: 1 195
6 Hoskins B F, Mason S A, White J C B. The location of the inner hydrogen atoms of phthalocyanine: a neutron diffraction study. Chem Commun, 1969: 554
7 Orti E, Crespo R, Piqueras M C, et al. Theoretical determination of the molecular and solid-state electronic structures of phthalocyanine and largely extended phthalocyanine macrocycles. J Mater Chem, 1996, 6(11): 1 751
8 李 笃，刘中立. 酞花菁分子结构及其X光电子能谱的CNDO研究. 分子科学学报, 1981, (2): 13
9 Yan J M, Zhao J G. Electronic structure about the n-υ charge-transfer complexes of pyridine with boron trihalides n-$\upsilon C_5H_5N\cdot BX_3$. Chinese Science Bulletin, 1985, 30(4): 475
10 Yan J M, Zhao J G. Electronic structure of π-π the type charge-transfer complexes of pyridine with boron trihalides. Inter J Quantum Chem, 1985, 27: 465

(1998-04-06 收稿, 1998-07-14 收修改稿)

维甲酸对人腹主动脉平滑肌细胞增殖的影响

刘国霞 李存玺 曾灵芳 王永潮*
(北京师范大学细胞增殖及调控生物学开放实验室，北京 100875. * 联系人)

摘要 通过免疫组织化学和电子显微镜的方法鉴定了原代培养的人腹主动脉平滑肌细胞，并且研究全反式维甲酸对其增殖的影响，发现atRA使SMC的增殖速度变慢，经atRA处理的细胞中cyclinD1, CDK4的表达分别降低了39%和38%，c-myc基因的表达水平降低了43.6%，而平滑肌特异的α-actin的表达不受影响. 说明atRA可能通过降低细胞中c-myc, CDK4, cyclinD1的基因表达水平而抑制SMC的生长，但并不引起SMC分化. atRA抑制SMC增殖可能为临床上探索atRA治疗SMC增生性疾病如动脉粥样硬化提供一些理论依据.

关键词 SMC RA 增殖 抑制

维甲酸包括一组天然存在的 V_A 活性代谢物，目前已发现有全反式维甲酸(all-tras retinoic acid, atRA), 9-顺式维甲酸(9-cis RA)以及13-顺式维甲酸(13-cis RA)等同分异构体.

它们在生命过程及胚胎发育过程 中发挥多种生物学效应，临床上曾用于多种皮肤病的治疗，在肿瘤的化学防预和治疗方面也有一定的疗效[1,2]. 正常情况下人腹主动脉平滑肌细胞(Human aorta smooth muscle cells, HASMC)位于人主动脉中膜，受到物理或化学刺激后可通过收缩和舒张来调节血压. 平滑肌细胞(SMC)有 2 种典型的表型：收缩型和合成型. 收缩型细胞肌丝束含量多，成束分布，平滑肌特异的 α-actin 含量丰富，无移行增殖能力. 合成型细胞肌丝束含量少，分布散在，平滑肌特异的 α-actin 含量少，移行增殖能力强. 实验表明培养细胞是合成型的. 还有证据表明平滑肌细胞由收缩型变成合成型，并且恢复增殖是动脉粥样硬化斑块的形成过程的 一个特征[3,4]. RA 作为一种治疗细胞增生性疾病的化疗药物对 SMC 增殖是否有影响？本实验从几个不同的方面研究了 RA 对体外培养的合成型平滑肌细胞的影响，探索 RA 治疗临床 SMC 增生性疾病的可能性.

1 材料与方法

胎儿腹主动脉平滑肌(20 周龄胎儿)，体外传代 7～10 代的平滑肌细胞，全反式维甲酸，anti-α-SM-actin 单克隆抗体(1A4, DAKO)，cyclinD1 单克隆抗体(sc-450, promega 公司)，CDK4 多克隆抗体(sc-601, promega 公司)，FITC 标记羊抗鼠 IgG(中山公司)，HRP 标记羊抗兔 IgG(中山公司)，c-myc cDNA 片段(1.4 kb, 中山公司)，四甲基偶氮唑盐(MTT, Fluka 公司)，Hochest33342，碘化丙啶(PI)

依汪浩川等人[5]方法，即将水囊引产胎儿腹主动脉取出(3 h 内取材)，用含有青链霉素的培养基洗涤数遍，剔除主动脉外膜及内膜，将中膜剪成碎块，将小块置入培养瓶中使其贴壁. 然后向瓶中加入含脐带血血清和小牛血清各 10%，青霉素 100 IU/mL，链霉素 100 μg/mL 的 DMEM 培养液，放在 5% 的 CO_2 培养箱中，37℃ 静置培养. 待细胞长满瓶后可传代培养.

取培养的细胞用橡皮刮子刮下，PBS(pH7.2)洗 1 次，800 r/min 离心 2 min，收集细胞. 3% 戊二醛 4℃ 固定 2 h. 离心收集细胞. 加融化的 3% 琼脂约 200 μL，搅匀离心. 用刀片将包有细胞的琼脂块切成小块，锇酸固定 1 h. 常规脱水、渗透、包埋、修块、超薄切片、先用 UA 染色液室温下染色 1 h，清水洗，晾干，再用硝酸铅染色液染色 15 min，清水洗，晾干后电子显微镜镜检、拍照.

将细胞接种于盖玻片上，待细胞长到盖片的 70%～80% 的密度后，取出用 PBS(pH7.2)漂洗 3 次，用冷丙酮 −20℃ 固定 20 min，室温干燥. 加一抗于 37℃ 孵育 45 min，取出用 PBS 漂洗 3 次，加 FITC 标记的二抗于 37℃ 避光孵育 45 min，取出用 PBS 漂洗 3 次，蒸溜水冲洗，空气干燥. 用甘油:PBS(9:1 pH8.5)封片，荧光显微镜下观察拍照.

将培养的平滑肌细胞以每孔 8×10^3 个细胞接种于 24 孔培养板中，待细胞贴壁后将培养液吸出，用 Hanks 液洗 1 次，然后加入含 10% 血清的 DMEM 培养基，再加入 10^{-7} mol/L 的全反式维甲酸，37℃，5% CO_2 培养，每 3 d 换 1 次液，以不加维甲酸的培养细胞作对照. 每隔 24 h 取样，每点取 3 个平行孔，MTT 法测量取平均值，绘生长曲线.

贴壁细胞用冷的 PBS 洗 2 次，加入细胞裂解液，使细胞裂解，煮 5～10 min，12 000 r/min 离心 10 min，取上清作为蛋白电泳样品，12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，石墨电转移仪转移到硝酸纤维素膜上. 将膜用含 3% BSA 的 TBS 封闭 1 h. 加一抗室温下孵育 2～4 h，TBST 洗 3 次，共 30 min，再用 HRP 标记二抗溶液室温下孵育 1 h，TBST 洗 3 次，按照 BCL 免疫检测试

剂盒说明进行显色曝光、将结果进行灰度扫描比较.

细胞总 RNA 的提取采用盐酸胍-苯酚-氯仿一步法,1%琼脂糖变性胶电泳. 用 Model 785 真空印迹装置转膜,80℃烤膜 2 h. 预杂交、42℃水浴杂交 22～24 h. 洗膜－70℃曝光 7 d,常规显影、定影. 将结果进行灰度扫描比较.

2 结果

2.1 平滑肌细胞的原代培养及鉴定

胎儿腹主动脉中膜组织块经贴壁静置培养后,到第 3 天,有部分细胞从组织块中迁出,第 4 天,大量细胞从组织块周围迁出,细胞呈纤维样生长(图 1). 一周后细胞可传代培养. 用抗 SMC 中特异表达蛋白 α-actin 的抗体检测培养细胞中的 α-actin 的表达,免疫荧光染色发现细胞染色阳性. 电镜下细胞中可见散在的肌丝束.

2.2 atRA 对 SMC 增殖的抑制

atRA 处理传代培养的 SMC(RA 浓度为 10^{-7} mol/L,以下同),生长曲线的结果表明 atRA 能显著抑制 SMC 的增殖,在 atRA 处理 8 d 后,细胞生长趋于恒定(图 2).

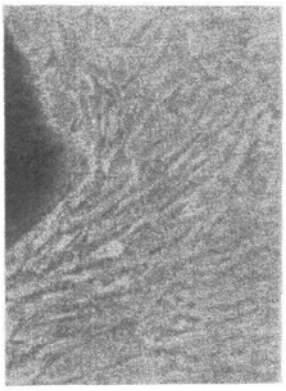


图 1 SMC 原代培养照片
示细胞从组织块迁出,×200

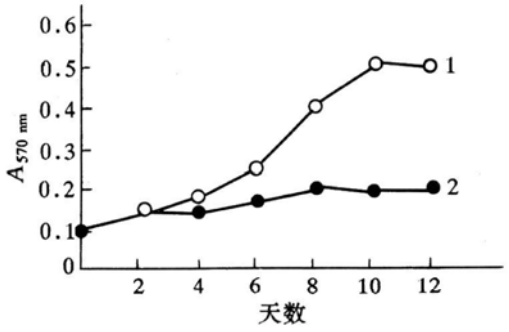


图 2 SMC 生长曲线
1——对照组 SMC, 2——RA 处理的 SMC

2.3 atRA 对 cyclinD1, CDK4 以及 α-actin 基因表达的影响

cyclinD1 是生长因子的晚期应答基因,它和 CDK4 组成的激酶复合物在细胞周期的 G1 晚期起重要的调控作用,它的过表达可以加快细胞周期的进程. 而它的低表达可以使细胞周期停滞在 G1 期. 本实验用 Western blotting 的方法检测了 SMC 中 cyclinD1, CDK4 和 α-actin 的蛋白表达状况,结果表明,atRA 处理的 SMC 中 cyclinD1 和 CDK4 的蛋白表达水平分别降低了 39%和 38%. 但 SMC 特异蛋白 α-actin 的表达不受影响(图 3).

2.4 atRA 对 SMC 中 c-myc 基因的表达的影响

c-myc 是真核细胞中的即刻早期应答基因,目前发现它在细胞周期的调控中起着重要的作用. 它的过表达可以使细胞通过生长检验点,而它的低表达可以阻止细胞通过生长检验点,使细胞入进 G0 期. 本实验用 Northern blotting 的方法检测了 atRA 处理前后细胞中 c-myc 基因 mRNA 的表达水平,结果表明 atRA 处理后 SMC 中的 c-myc 的 mRNA 的表达水平降低了

43.6%(图 4).

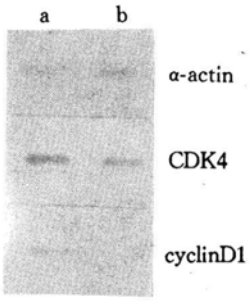


图 3 RA 处理后 SMC 中 α-actin, cyclinD1, CDK4 的表达
a——对照;b——RA 处理 9 d

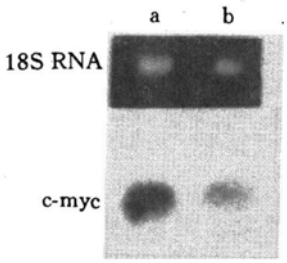


图 4 RA 处理后 SMC 中 c-myc 基因的表达
a——对照 SMC;b——RA 处理 SMC

3 讨论

原代培养时, 由于细胞来源于组织块, 在生长时可能会有一些其他的细胞如成纤维细胞的生长, 因而对原代培养的细胞进行鉴定就十分必要. 目前, 鉴定平滑肌细胞的方法主要采用电子显微镜和免疫组化的方法. α-actin 是 SMC 特异的 actin[6], 它只在 SMC 中表达. 我们用特异的抗 SM-α-actin 的抗体为探针, 用间接免疫荧光法检测原代培养细胞中 α-actin 的表达, 结果显示培养的细胞染色阳性. 电子显微镜结果清晰地显示了散在肌丝束, 这正是合成型平滑肌细胞的特征. 我们从免疫组化和电子显微镜两方面证明了原代培养的细胞是平滑肌细胞.

用 atRA 处理 SMC 细胞, 测定 SMC 的生长情况, 生长曲线的结果显示atRA显著抑制 SMC 的增殖. 用 Hochest33342 和 PI 对 atRA 处理的 SMC 和对照组的 SMC 染色, 结果未显示 atRA 处理的细胞核形态的异常, 说明在本实验条件下 atRA 未见诱导 SMC 凋亡. 另外, 检测 SMC 中 α-actin 蛋白的表达, 结果未显示 atRA 处理前后这个 SMC 特异蛋白表达的差别. α-actin 作为 SMC 的一个分化指标, 它在分化型的 SMC 中表达量高, 而在合成型的 SMC 中表达量少. 本实验中电子显微镜的结果已经证明了培养的细胞是合成型的, 而在 atRA 处理后 α-actin 表达不受影响, 说明在本实验条件下 atRA 不能诱导 SMC 分化. 那么 atRA 是通过什么途径抑制 SMC 增殖的呢?

在增殖的细胞中, 细胞依赖由一系列 CDKs-cyclins 组成的激酶复合物作为细胞周期引擎分子推动细胞周期正常运转, 尤其在 G1 晚期的检验点(checkpoint)受到复杂精细的调控. 细胞在此时感受不同时空生长因子和分化因子所发出的信号, 或者开始新一轮增殖, 或者退出细胞周期. 如果在生长因子的作用下, 细胞通过了检验点, 细胞就不再依赖生长因子而在细胞周期引擎分子的推动下完成细胞周期. 如果细胞未通过 G1/S 期检验点, 此时撤除生长因子, 就会使细胞周期停滞或退回到 G0 期[7]. 因此, G1/S 期检验点就成为研究细胞增殖调控的靶点. 在这个点起作用的引擎分子就是 CDK4 或 CDK2 和 cyclinD 组成的激酶复合物. 目前研究最清楚的是 CDK4 和 cyclinD1. cyclinD1 作为生长因子的晚期应答基因, 是外界因子和细胞周期之间的一个连接子(linker). 已有证据表明, 细胞一直在含生长因子的培养基中培养时,

cyclinD1 的表达是稳定的，一旦撤除生长因子，cyclinD1 的表达就下降. cyclinD1 表达的停止导致细胞周期停滞在 G1 期，而不能进入 S 期，cyclinD1 过表达则 G1 期可缩短[7]. 因此，细胞中 cyclinD1 和 CDK4 在蛋白水平上的变化是其调节细胞周期的一种途径. atRA 处理后 SMC 中 cyclinD1 和 CDK4 的表达量都降低，表明 atRA 可能是通过影响细胞周期调控蛋白而抑制细胞的增殖. 最近报道[8]RA 对 SMC 的作用有周期依赖的特性，并推测了 RA 影响细胞周期依赖激酶的可能性，我们的结果证实了这一推论.

RA 是怎样降低 cyclinD1 和 CDK4 的表达？已知 RA 是通过 RA 依赖的受体 RARs 和 RXRs 与特定的基因序列结合，开启或关闭一些基因的表达. 已有证据表明，作为 RA 与其受体复合物的靶基因，RA 负调 c-myc 基因的表达. Myc 蛋白是 cyclinD1 的正调控因子，它的表达可以激活 cyclinD1 基因的表达. 而 myc 基因的关闭使 cyclinD1 的表达下降. 本实验中用 c-myc基因片段为探针，Northern blotting 的结果显示 atRA 处理后 SMC 中 c-myc 表达下降，说明 RA 可能通过负调 cyclinD1 的上游 c-myc 基因的表达来降低 cylinD1 的表达. 这是一种可能的途径，是间接的调节方式. 另外，atRA 在 SMC 中发挥作用可能有直接的方式：即 cyclinD1，CDK4 作为 atRA 与其受体复合物的负调靶基因，它的表达直接受 RA 与其受体复合物的调节. 在 RA 存在时，它的表达就会降低. SMC 的生长受到抑制.

综上所述，RA 可能通过直接或间接降低 SMC 中 cyclinD1 和 CDK4 的表达来抑制 SMC 的增殖. 关于 RA 抑制 SMC 增殖机理的研究对于我们探索临床应用 RA 治疗和预防 SMC 增生性疾病提供一些理论依据.

参 考 文 献

1 陈 竺，陈赛娟，朱 军，等. 细胞生物学动态，第一卷. 见：翟中和，郝 水，王永潮等编. 北京：北京师范大学出版社，1996. 1～6

2 Tallman M S, Wiernik P H. Retinoids in cancer treatment. J Clin pharmacol, 1992, 32: 868～888

3 Russell R. The pathigenesis of atherosclerosis. Nature, 1993, 362(6423): 801～809

4 Pauletto P, Sartore S, Pessina A C, et al. Smooth-muscle-cell proliferation and differentiation in neointima formation and vascular restenosis. Clinical Science, 1994, 87: 467～479

5 汪浩川，刘秉文，付明德. 人动脉平滑肌细胞贴块培养法. 华西医科大学学报，1995，26(1)：105～108

6 Skalli O, Ropraz P, Trzeciak A, et al. A monocolonal antibody against-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. The Journal of Cell Biology, 1986, 103(6): 2 787～2 796

7 张四清，王永潮. 细胞生物学动态，第一卷. 见：翟中和，郝 水，王永潮等编. 北京：北京师范大学出版社，1996. 46～60

8 Miano J M, Topouis S, Majesky M W, et al. Retinoid receptor expression and all-trans retinoic acid-mediated growth inhibition in vascular smooth muscle cells. Circulation, 1996, 93(10): 1 886～1 895

(1998-03-09 收稿，1998-06-05 收修改稿)