

# 川芎嗪对培养人脐静脉内皮细胞基因表达谱的影响

吴红金<sup>1</sup>, 吕俊萍<sup>2</sup>, 马增春<sup>2</sup>, 王升启<sup>2</sup>

(1 北京中医药大学附属中西医结合医院, 北京 100039;

2 军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

**摘要:**目的: 研究川芎嗪对培养人脐静脉内皮细胞基因表达谱的影响, 探讨川芎嗪保护内皮细胞的分子机制。方法: 制备包含 500 个心血管疾病相关基因的寡核苷酸芯片; 运用制备的心血管寡核苷酸芯片研究川芎嗪对培养人脐静脉内皮细胞基因表达谱的影响。结果: 川芎嗪(40 微克/毫升)作用培养内皮细胞 24 小时后, 寡核苷酸芯片分析筛选出川芎嗪对内皮细胞的影响基因 25 个, 其中上调基因 7 个, 下调基因 18 个, 包括一些与免疫、血管舒缩、细胞粘附、凝血、抗氧化、细胞生长、信号转导及物质代谢的相关基因。结论: 川芎嗪在基因水平通过多环节调节内皮功能。

**关键词:** 川芎嗪; 内皮细胞; 寡核苷酸芯片; 基因表达谱

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)03-0040-04

## Ligustrazine-induced Alterations in Gene Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

WU Hong-jin<sup>1</sup>, LU Jun-ping<sup>1</sup>, MA Zeng-chun<sup>2</sup>, WANG Sheng-qi<sup>2</sup>

(1. Beijing Hospital of Integrated Traditional and Western Medicine 100039, China;

2. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

**Abstract** To investigate the effect of Ligustrazine on the spectrum of gene expression in the cultured human umbilical vein endothelial cells(HUVECs), and further explore the potential molecule mechanism of endothelial protection by Ligustrazine on HUVECs. Method: A home-made oligonucleotide microarray containing 500 cardiovascular disease-related genes was constructed. The alteration of the spectrum of gene expression induced by Ligustrazine in HUVECs was detected by oligonucleotide microarray analysis. Results: 7 up-regulated and 18 down-regulated genes were obtained after Ligustrazine (40ug/mL) had acted on HUVECs for 24hours. Ligustrazine affected the expression levels of genes involved in immunization, vasomotion, cell adherence, coagulation, antioxidation, cell growth, signal transduction and substance metabolism in HUVECs. Conclusions: Ligustrazine regulated sets of genes in endothelial cells and protected the cells. Microarray analysis provided us valuable insights into the protective mechanism by Ligustrazine.

**Key words:** Ligustrazine; endothelial cells; oligonucleotide arrays; gene expression profile

川芎味辛性温, 功能为活血祛瘀、行气开郁、祛风止痛, 《本草纲目》谓其为: “血中气药”。川芎嗪是川芎的有效成分四甲基吡嗪。具有扩张微血管、改善微循环、降低血黏度、改善血液流变学、降低毛细血管通透性、调节血小板功能和抗凝等作用, 在防治心脑血管疾病等方面具有重要的临床用途<sup>[1]</sup>。DNA 芯片技术是近年来发展起来的能够同时监测大量基因

的相对表达的一项新技术<sup>[2]</sup>, 随着该技术的发展, 寡核苷酸芯片越来越广泛的应用于基因表达谱的研究<sup>[3]</sup>。寡核苷酸芯片技术平台已作为研究基因表达的有力而可靠的工具<sup>[4]</sup>。本研究应用此芯片技术研究了川芎嗪对培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells HUVEC) 基因表达谱的影响。从分子水平探讨川芎嗪的作用机制。

### 1 材料与方法

**1.1 药品和试剂** 川芎嗪为中国药品与生物制品检定所的标准品; I 型胶原酶购自 Sigma 公司; TRIzol 试剂和 M199 培养液购自 Gibco 公司。Superscript II<sup>TM</sup> 反转录试剂盒购自 Gibco 公司; Rnasin

收稿日期: 2005-01-28

基金项目: 北京中医药重点学科项目(No: 京中重 312)

通讯作者: 吴红金, Tel: (010) 68179234, 传真: (010) 68224104, E-mail:

whj@zxyjh.com.cn

核酸酶抑制剂购自 Promega 公司: Cy3-dUTP 和 Cy5-dUTP 购自安法马西亚公司; 其他试剂为国产分析纯试剂。

**1.2 细胞培养** 人脐静脉内皮细胞培养方法参见 Jaffe 方法的改进法<sup>[5]</sup>。

**1.3 细胞的处理** 用胰蛋白酶消化 HUVEC, 转入 96 孔板, 培养至细胞 80% 融合, 用 PBS 洗两遍, 加入 0.1 mL 无血清 M199 培养液, 培养液中含有川芎嗪 (40 微克/毫升)。继续培养 24h 后, 收集每孔的培养液, 用于寡核苷酸芯片分析。

**1.4 寡核苷酸芯片的制备**

**1.4.1 心血管寡核苷酸芯片的设计** 待检测基因的选择以及芯片的设计和质控见文献<sup>[6]</sup>。

**1.4.2 探针的合成与点样** 寡核苷酸探针合成在 PE8909 DNA 合成仪上完成, 采用标准亚磷酰氨化学方法, 探针 5' 氨基修饰用 N-MMTI-6-氨基-2-氰乙基-N', N'-二异丙基亚磷酰氨 (自制), 在合成后的最后一步引入。合成完毕后浓氨水 55 °C 脱保护/切割 15h, OPC 柱 (PE 公司) 纯化。寡核苷酸探针以 0.5 μg/mL 溶解于 3 × SSC 溶液中, 用 PixSys 7500 点样仪 (Cartesian 公司) 点在本室自制的醛基化玻璃片上, 放置过夜, 分别用 0.2% SDS 和水处理玻片, 凉干备用。

**1.5 HUVEC 总 RNA 的提取** 提取正常 HUVEC 和川芎嗪给药组的 HUVEC 的总 RNA。使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 用紫外分析结合甲醛变性电泳分析总 RNA 的纯度和完整性。

**1.6 荧光标记 cDNA 探针的制备** 反转录荧光标记 cDNA 的方法参见文献<sup>[7]</sup>。每一个反应需要 50~100 μg 总 RNA, 同时加入 0.3 μg 体外转录的萤火虫荧光素酶的 mRNA 作为阳性对照, 对反转录和杂交过程进行监控以及对结果进行定量分析<sup>[8]</sup>。

本研究采用三批细胞重复标记三次, 每次标记都采用了荧光交换标记法。

**1.7 杂交与洗涤** 混合来自两组细胞的 cDNA 荧光探针, 杂交与洗涤方法参见文献<sup>[4]</sup>。

**1.8 扫描与分析** 用 Axon 公司的 Genepix 4000B 扫描芯片。用 GenePix pro 4.0 软件进行数据分析和归一化处理, 分别用看家基因和阳性对照均衡, 对 Cy3 和 Cy5 扫描结果进行校正。用以下 2 个条件找出差异表达基因: (1) CY3 信号值/CY5 信号值 ≥ 1.5 或 CY3 信号值/CY5 信号值 ≤ 0.66; (2) CY3 信号值或 CY5 信号值 > 2 × 阴性对照信号值。

## 2 结果

运用寡核苷酸芯片技术研究川芎嗪对 HUVEC 的基因表达谱的影响, 比较正常对照组 HUVEC 和川芎嗪给药组 HUVEC 的基因表达谱的差异。两组细胞总 RNA 分别用 Cy3-dUTP 及 Cy5-dUTP 标记, 对其差异表达谱进行芯片杂交检测, 用看家基因和定量阳性对照均衡, 对其差异表达进行分析, 实验重复三次。图 1 为其中一次杂交结果图, 图 2 为一次杂交结果的散点图, 表 1 为筛选出的差异基因。显示川芎嗪调节的人内皮细胞基因包括一些与血管舒张, 细胞黏附、抗自由基、免疫、细胞生长和信号转导及脂质等物质代谢相关的基因。

表 1 差异基因表 (给药组/空白组)

差异倍数的均数	基因名称
↑ 1.511	Homo sapiens nitric oxide synthase 2A
↑ 1.595	Homo sapiens elastin (supra vadvurar aortic stenosis, Williams-Beuren Syndrome) (ELN)
↑ 1.505	Homo sapiens 5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH) (MTHFR)
↑ 1.558	(GSTM5) glutathione S-transferase M5
↓ 0.65	(HSP60) heat shock 60kDa protein 1
↓ 0.516	Homo sapiens chemokine (C-C motif) ligand 7 (CCL7)
↑ 1.503	Homo sapiens chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4),
↓ 0.403	(CSF3R) colony stimulating factor 3 receptor
↓ 0.666	Homo sapiens lipin 1 (LPIN1),
↓ 0.576	Homo sapiens lipoprotein, Lp(a) (LPA)
↑ 1.623	Homo sapiens latent transforming growth factor beta binding protein 1 (LTBP1),
↑ 2.057	homo sapiens cytochrome P450, subfamily XXV II B
↓ 0.39	Homo sapiens hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF1A)
↓ 0.661	Homo sapiens cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 2 (CYP11B2), nuclear gene encoding mitochondrial protein
↓ 0.532	Homo sapiens acyl-protein thioesterase mRNA
↓ 0.563	(CYP19) cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1
↓ 0.552	(AY028632) Homo sapiens catalase (CAT)
↓ 0.614	(CYP2C8) cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8
↓ 0.585	(CYP2C18) cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 18
↓ 0.602	(CYP17) cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1
↓ 0.502	(HSPNP) Human mRNA for purine nucleoside phosphorylase
↓ 0.638	HUMTRY Human tryptase
↓ 0.622	M29551 Human calcineurin A2
↓ 0.614	Homo sapiens Bernardinelli-Seip congenital lipodystrophy 2 (seipin) (BSCL2)
↓ 0.606	Homo sapiens iduronidase, alpha-L- (IDUA)

\* mean of ratios from three independent experiments.

结果: 7 个基因上调, 18 个基因下调, 共 25 个基因影响。

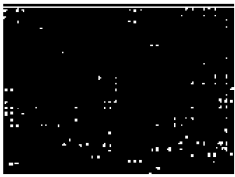


图 1 杂交图 (cy5 给药组; cy3 空白对照组)

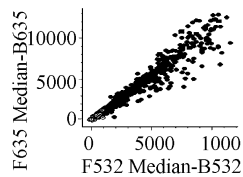


图 2 基因表达谱分析散点图

### 3 讨论

血管内皮是一个旁分泌、内分泌和自分泌器官,它在调节血管张力、维持血管正常功能等方面起着重要的作用。内皮功能失常被认为是动脉硬化的形成、斑块的进展及动脉硬化并发症发生的早期重要征象<sup>[9]</sup>。我们的研究发现,川芎嗪作用于 HUVEC24 小时后,上调的基因包括,一氧化氮合酶 (Nitric oxide synthase NOS)、弹性蛋白 5、10-亚甲基四氢叶酸还原酶 (5, 10-methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR)、谷胱甘肽  $\gamma$ -转移酶基因的表达。下调的基因包括脂蛋白 (a) [lipoprotein (a), LP (a)], 热休克蛋白 (heat shock protein HSP) 60, (HSP60)、细胞趋化因子和细胞色素 P450 系列等基因的表达。其功能涉及到血管舒缩功能、血液凝固、炎症与免疫反应、抗自由基及脂质等物质代谢有关的基因表达。

一氧化氮 (Nitric oxide, NO) 是一种新的血管活性物质及神经递质,具有扩张血管平滑肌、抗血小板聚集及抗平滑肌增殖的能力,NO 是以 L-精氨酸为底物,在 NOS 的作用下合成 NO。NOS 分为神经型 (nNOS) 内皮型 (eNOS) 和诱导型 (iNOS),其中 iNOS 在介导心血管病理生理方面具有更多的争议。在动脉受到伤害时,NO 起到血管保护作用,抑制损伤引起的血小板聚集与黏附,抑制白细胞黏附,抑制平滑肌的增殖与迁移,刺激内皮细胞的生成,而这些作用对于受到伤害时血管维持正常的功能状态起着重要的作用<sup>[10]</sup>。弹性蛋白是动脉壁的主要成分之一,以它为主 (占 90%) 构成的弹性膜或弹性纤维,使动脉具有伸缩性而不需消耗生化能量,在正常压力下支撑血管壁拮抗管壁塌陷,抵制因平滑肌收缩所致的血管闭合倾向,还可以缓冲血流对管壁的冲击力,在弹性动脉中将血流转化为常流,完整的内弹性膜是防止能导致动脉粥样硬化的大分子物质 (如低密度脂蛋白) 通过的屏障。弹性蛋白具有调控平滑肌细胞增生和稳定动脉构筑的功能<sup>[11]</sup>。川芎嗪通过促进 iNOS 和弹性蛋白的表达而发挥扩张血管、抗凝作用,并增加血管的弹性。MTHFR 是叶酸代谢过程的

关键酶,也是同型半胱氨酸 (homocysteine, Hcy) 重新甲基化为蛋氨酸所需要的关键酶。Hcy 是心脑血管疾病的独立危险因素,血浆 Hcy 水平升高可通过以下途径促进动脉硬化的形成, (1) 促进氧自由基的生成,促进内皮细胞的凋亡,引起血管内皮细胞的损伤, (2) 抑制内皮细胞的生长。 (3) 促使动脉平滑肌细胞的增生,加速低密度脂蛋白 (LDL) 胆固醇的氧化,削弱高密度脂蛋白 (HDL) 胆固醇的保护作用,从而增加泡沫细胞的形成,致使血管壁增厚,导致闭塞性血管病的发生<sup>[12]</sup>。川芎嗪通过增加 MTHFR 的表达,从而降低 Hcy 水平,而保护内皮细胞,防治动脉硬化。HSP 存在于大多数细胞,起到分子伴侣作用,热休克蛋白是一个家族,分子量在 10~ 150kDa,分为 HSP10, HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP110。HSP 的生理作用是细胞或组织免受损伤性刺激所引起的凋亡,而对心血管起到保护性作用,然而许多研究已经证明 HSP 与动脉硬化发病机制有关。研究发现,人类动脉粥样硬化病变处动脉的内皮细胞、平滑肌细胞和单核细胞有 HSP60 的过度表达, HSP60 的浓度与病变程度正相关。动脉硬化的危险因子包括感染、氧化低密度脂蛋白、高血压、氧化应激、生化刺激都可通过热休克蛋白转录因子 1 引起 HSP 在内皮细胞、巨噬细胞及平滑肌细胞的过度表达,从而产生一系列的病理生理作用。细胞内的 HSP60 释放到细胞间形成可溶性的 HSP60 (sHSP60),后者与 HSP 受体 TLR4/CD14 结合,导致内皮细胞表达黏附分子、平滑肌细胞增殖及巨噬细胞产生系列的致炎因子,同时对 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞进行抗原提呈,产生抗 HSP 的自身抗体及自身免疫细胞。所有这些过程都促使动脉硬化的形成<sup>[13, 14]</sup>。川芎嗪通过影响 HSP60 基因表达,从而调节免疫功能,发挥保护内皮与抗动脉硬化的作用。

另外,芯片筛选出来的其他一些调控基因,如: LP (a), IDUA, HSPNP 等,这些基因与川芎嗪的作用机制之间的关系还有待进一步研究和探讨。

通过川芎嗪对 HUVECs 基因表达谱的影响,我们分析认为,川芎嗪通过调节血管张力、免疫功能、抗血小板聚集、抗氧化和影响物质代谢等多种途径发挥心脑血管保护作用,从分子水平探讨了川芎嗪的多靶点作用。

#### 参考文献:

- [1] 胡发明, 胡红丁. 川芎嗪的实验研究及临床应用[J]. 中医研究, 2004, 17(3): 57-60.

- [ 2 ] Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays[ J ]. Nature Genet, 1999, 21: 33-37.
- [ 3 ] Angela R, Christian S, Alexandra R. Optimization of oligonucleotide-based DNA microarrays[ J ]. Nucliec Acids Res, 2002, 11: e51.
- [ 4 ] Huang J, Chen SH, Wang SQ. Preparation and analysis of oligonucleotide microaraay for expression detection of mouse cytokine-associated genes[ J ]. Chin J Biotech( Chin ), 2002, 18: 501-504.
- [ 5 ] Ren DC, Geng MY, Du GH, et al. Polysaccharide sulfate 916 inhibits neutrophil-endothelial adhesion[ J ]. Chin Med J, 2002, 115: 1855-1858.
- [ 6 ] Junping Lv, Zengchen Ma, Shengqi, Wang, etc. Ginsenoside RgI-induced alterations in gene expression in TNF- $\alpha$  stimulated endothelial cells[ J ]. Chin Med J, 2004, 117( 6 ) : 871-876.
- [ 7 ] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[ J ]. Science, 1995, 270: 567-570.
- [ 8 ] Chen ZB, Yang J, Wang SQ. Preparation of an universe normalization control for cDNA microarray and its application in the sensitivity analysis of cDNA microarray [ J ]. Lett Biotech( Chin ), 2002, 15: 103-107.
- [ 9 ] Piero O, Bonetti; Lilach O, Lerman, et al. Endothelial Dysfunction A Marker of Atherosclerotic Risk [ J ]. Arterioscleroti Thrombosis, and Vascular Biology, 2003, 23: 168-175.
- [ 10 ] Kibbe M, Billiar T, Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury[ J ]. Cardiovasc Res, 1999, 43( 3 ) : 650-657.
- [ 11 ] 文灿, 朱星红. 弹性蛋白的研究进展[ J ]. 中国病理生理杂志, 2001, 17( 10 ) : 1029-1033.
- [ 12 ] 王浩, 李佩珍. 5, 10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因的研究进展[ J ]. 中国药物与临床, 2004, 4( 2 ) : 133-134.
- [ 13 ] Yamazaki K, Ohsawa Y, Itoh H. T-cell clonality to Porphyromonas gingivalis and human heat shock protein 60s in patients with atherosclerosis and periodontitis [ J ]. Oral Microbiol Immunol, 2004, 19( 3 ) : 160-167.
- [ 14 ] Qingbo, Xu. Role of Heat Shock Proteins in Atherosclerosis Arteriosclerosis[ J ]. Thrombosis, and Vascular Biology, 2002, 22: 1547-1559.