基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.007

C型利钠肽在髂动脉球囊成形术后再狭窄发生中的作用

肖　乐，龚昆梅，王昆华，欧阳一鸣，凌　平，李临海，龙亚新
（昆明医学院附属昆华医院云南省第一人民医院普通外科，昆明　650032）

【摘　要】目的：探讨 C 型利钠肽（C-type natriuretic peptide，CNP）在髂动脉球囊成形术后再狭窄发生中的作用。方法：构建兔髂动脉粥样硬化模型，将动物分为球囊成形术（Percutaneous transluminal angioplasty，PTA）组和假手术组，观察 PTA 术后 CNP 表达变化；将 CNP 基因转染髂动脉，观察 CNP 基因过表达对 PTA 术后再狭窄的影响。结果：PTA 术后 2、4 周 RT-PCR、荧光定量 RT-PCR、免疫组化、Western blot 检测显示 CNP 表达明显降低；PTA 术后 8 周 CNP 表达无明显差异。CNP 基因过表达组内膜增生程度、内膜/中膜比及血管狭窄率明显降低。结论：CNP 表达减少可能是 PTA 术后再狭窄发生原因之一，增加 CNP 表达可一定程度预防再狭窄发生。

【关键词】C 型利钠肽；球囊成形术；再狭窄
【中国图书分类法分类号】R654.4　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-05-15

Effect of C-type natriuretic peptide on post-PTA restenosis in iliac artery of atherosclerotic rabbit model

XIAO Le, GONG Kun-mei, WANG Kun-hua, OUYANG Yi-ming, LING Ping, LI Lin-hai, LONG Ya-xin
(*Department of General Surgery, the First People's Hospital of Yun'nan Province, the Affiliated Kunhua Hospital of Kunming Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To discuss the potential role of C-type natriuretic peptide(CNP) on occurrence of vascular restenosis after percutaneous transluminal angioplasty(PTA). *Methods*: CNP expression was detected with RT-PCR, real-time quantitative RT-PCR, Western blot and immunohistochemistry after PTA in iliac artery in rabbit model of atherosclerosis. Reconstructed plasmid pcDNA3.1(+)/hCNP was transfected with polyethylenimine in iliac artery to investigate the effect of CNP over-expression on post-PTA restenosis. *Results*: CNP expression decreased markedly 2 and 4 weeks after PTA. The relative levels of CNP mRNA expression revealed with RT-PCR were 0.38 ± 0.06 vs 0.98 ± 0.15 and 0.43 ± 0.05 vs 1.01 ± 0.12 (P<0.001). With real-time quantitative RT-PCR, Ct value ratios were 2.06 ± 0.17 vs 1.27 ± 0.10 and 2.10±0.11 vs 1.23 ± 0.10 (P<0.001). The relative levels of CNP protein expression detected with Western blot were 0.15 ± 0.03 vs 0.31 ± 0.06 and 0.13 ± 0.04 vs 0.30 ± 0.05 (P<0.001). A lighter dyeing was identified in PTA group in both 2 weeks and 4 weeks with immunohistochemistry. CNP mRNA and protein expressions were not different on 8-week spot between PTA and non-PTA groups. Hyperplasia and restenosis rate after PTA declined significantly in CNP over-expression group compared with non-transfected one(0.29 ± 0.07 vs 0.76 ± 0.06; 0.31 ± 0.02 vs 0.57 ± 0.05, P<0.001). *Conclusion*: CNP down-expression may be one of the reasons to induce post-PTA restenosis. CNP gene transfection is potential to prevent vascular restenosis.

【Key words】C-type natriuretic peptide; percutaneous transluminal angioplasty; restenosis

血管成形术广泛应用于各种心脑血管疾病的治疗，然而，术后再狭窄发生率高达 30%~50%[1,2]。目前大多数观点认为再狭窄的发生主要包括[3]：血管内皮细胞损伤；血栓形成；炎症细胞活化、浸润；平滑肌细胞迁移和增殖，内膜增生；血管负性重塑等。目前进行的大多数预防再狭窄研究均针对其中某一环节，很难发挥整体性效应。

C 型利钠肽（C-type natriuretic peptide，CNP）是一种新型的利钠肽[4,5]，其生物学作用包括促进血管内皮细胞修复，抑制血栓形成和血管平滑肌细胞增殖，舒张血管和抑制炎症反应等。因此，CNP 有望从多个靶点抑制再狭窄的发生。本研究旨在观察 CNP 在球囊成形术（Percutaneous transluminal angioplasty，PTA）后再狭窄发生中的作用，探讨 CNP 在防治血管再狭窄中的应用价值。

作者介绍：肖　乐（1975-），男，讲师，博士，
研究方向：血管外科的基础和临床研究。

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30860276）；云南省应用基础研究计划资助项目（编号：2007M272）；云南省科技厅-昆明医学院联合专项基金资助项目（编号：2008CD042）。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与试剂 真核表达质粒 pcDNA3.1(+)/hCNP 由本室构建[6]，绿色荧光蛋白真核表达质粒 pEGFP-N1（美国 Clonetech）和大肠杆菌 DH5α 为本室保存，多聚乙酰亚胺（Polyethylenimine，PEI），分子量为 60 kD，分枝状。购自美国 Sigma 公司；羊抗人 CNP 多克隆抗体购自美国 Santa-Cruz 公司。

1.1.2 实验动物 成年雄性新西兰大耳白兔购自昆明医学院实验动物中心，分组如下。

1.1.2.1 取 36 只动物用于检测 CNP 的表达，随机分为 2 组，A 组为球囊成形组，B 组为假手术组；各组按 3 个时间点（2，4，8 周）分为 3 个亚组，每组 6 只。

1.1.2.2 取 12 只动物用于检测多聚乙酰亚胺腔内转染效率，随机分为 4 组，每组 3 只：C、D、E 组转染 pEGFP-N1，转染时间为 15、30、60 min；F 组转染空质粒 pcDNA3.1(+)/neo，转染时间 60 min。

1.1.2.3 取 12 只动物用于球囊成形并基因转染，随机分为 2 组：G 组为转染 pcDNA3.1(+)/hCNP 组；H 组为转染空质粒 pcDNA3.1(+)/neo 组，每组 6 只。转染后 4 周用于检测。

1.2 方法

1.2.1 兔髂动脉粥样硬化模型的构建 所有动物均构建髂动脉粥样硬化模型，戊巴比妥静脉注射麻醉（1 ml/kg），游离左后肢隐动脉，用血管夹阻断后，用 20 G 注射针穿刺隐动脉，扩大穿刺点约 1 mm，导入 3F Fogarty 取栓球囊导管，伸入 20 cm 到达腹主动脉，注入 0.2 ml 肝素盐水充盈球囊，外拉导管约 6 cm 处有阻力时提示进入髂动脉，缩小球囊进入髂动脉，保持阻力行内皮剥脱，重复 3 次，结扎隐动脉穿刺点。术前予青霉素 80 万单位、庆大霉素 8 万单位肌注，术后第 1 日重复注射青霉素、庆大霉素各 1 次，术后 2 周成模。

1.2.2 兔髂动脉球囊成形术模型的构建 取兔髂动脉粥样硬化模型，戊巴比妥静脉注射麻醉（1 ml/kg），游离左后肢股动脉，全身肝素化（105 U/kg），用血管夹阻断后，用 20 G 注射针穿刺股动脉，扩大穿刺点约 2 mm，导入 2.5 mm × 20 mm 球囊，伸入 14 cm 到达腹主动脉，充盈球囊保持压力为 6 atm，外拉导管约 4 cm 处有阻力时提示进入髂动脉，缩小球囊进入髂动脉，用压力泵保持压力为 6 atm 行球囊成形，维持 3 min；外拉球囊 2 cm 后再次行球囊成形。用 7-0 Prolene 缝合穿刺点，抗菌素使用同前。对照组行假手术。成形术后 2、4、8 周用于检测。

1.2.3 免疫组化检测血管壁 rCNP 蛋白的表达 取髂动脉石蜡切片用免疫组化（SP 法）检测 rCNP 表达。羊抗人 CNP 一抗（1:200）4℃过夜，DAB 显色，以位于细胞浆中明显的棕黄色为阳性。

1.2.4 RT-PCR、实时荧光定量 RT-PCR 检测血管壁 rCNP mRNA 的表达 取髂动脉组织用于 mRNA 检测，引物及探针利用在线 Primer 3 设计，由上海超世生物技术公司合成。rCNP 引物序列如下：上游引物 5'-GCT GCT CAC GCT GCT TTC-3'，下游引物 5'-CTT GTC GCC CTT CTT CTG C-3'，Taqman 探针 FAM-AGG TGC CCG AGC CCC AGA CT-BHQ1，产物长度为 133 bp。内参 rβ-actin 引物序列如下：上游引物 5'-AAG TGC TTC TAG GCG GAC TGT T-3'，下游引物：5'-TGC GCC GTT AGG TTT CGT-3'，Taqman 探针 FAM-AGC CAG TGG CGG GAC ACC CTC-BHQ1，产物长度 68 bp。

RT-PCR 反应体系（50 μl）为：cDNA 模板 6 μl，dNTP（10 mmol/L）2 μl，Taq buffer（10 ×）5 μl，HS Taq 2 μl，二甲亚砜 2.5 μl，甘油 2.5 μl，上游引物（10 μmol/L）各 1 μl，下游引物（10 μmol/L）各 1 μl，ddH_2O 26 μl。循环条件为：95℃ 5 min，95℃ 15 s，58℃ 30 s，72℃ 30 s（共 40 个循环），72℃ 5 min。PCR 条带用 Quantity one 分析。实时荧光定量 RT-PCR 反应体系为（25 μl）为：cDNA 模板 6 μl，上游引物（10 μmol/L）各 1 μl，下游引物（10 μmol/L）各 1 μl，探针（10 μmol/L）0.5 μl，Maxium Probe mix 12.5 μl，ddH_2O 4 μl。循环条件为：95℃ 10 min，95℃ 15 s，58℃ 30 s，72℃ 15 s（共35个循环），72℃ 5 min。

1.2.5 Western blot 检测血管壁 rCNP 的表达 取髂动脉组织用于 Western blot 检测。因 rCNP 蛋白分子量仅为 12.8 KD，故采用 Tris-Tricine 缓冲系统进行蛋白电泳[7]，概括如下：分离胶（15%），浓缩胶（5%）。浓缩胶电泳 40 min，电压 40 V；分离胶电泳 1.5 h，电压 60 V。半干转印仪转膜，100 mA 恒流，1 h。常温封闭 1 h，一抗（1:200）4℃过夜，辣根过氧化物酶标记兔抗羊二抗（1:5 000）常温孵育 1 h，DAB 显色。条带用 Quantity one 分析。

1.2.6 PEI 腔内局部基因转染 配制转染混合液：质粒 4 μg，PEI（10 mmol/L）9 μl 分别加入 1 ml 生理盐水中静置 5 min，混合后备用。游离左后肢股动脉，结扎小分支，阻断股深动脉，将 2.5 mm × 20 mm 球囊按照 1.2.2 方法导入腹主动脉，进入髂动脉 3 cm 后以 6 atm 充盈球囊阻断血流，用留置针穿刺股动脉，抽空血液，用生理盐水冲洗后，将 PEI-质粒转染混合液注入股动脉及髂外动脉，维持压力 6 atm。C~F 组动物于术后 3 d 处死取髂动脉行冰冻切片，用荧光显微镜检测绿色荧光信号强度，确定最佳转染时间。G、H 组按照 1.2.2 行髂动脉球囊成形后即刻行局部基因转染，于转染后 4 周处死检测再狭窄程度。

1.2.7 血管弹力纤维染色（Verhoeff 染色）检测再狭窄程度 将髂动脉石蜡切片行 Verhoeff 染色，用病理图像分析系统测量以下指标：①现存管腔面积（即内膜下管腔总面积）；②内弹力膜下面积；③外弹力膜下面积；④血管内膜面积=内弹力膜下面积-现存管腔面积；⑤血管中膜面积=外弹力膜下面积-内弹力膜下面积；⑥血管内膜面积与血管中膜面积比率；⑦血管再狭窄率=血管内膜面积/内弹力膜下面积×100%。

1.2.8 统计学处理 统计数据用均数±标准差表示，用 SPSS 11.0 统计软件分析。组间比较采取 t 检验。

2 结 果

2.1 免疫组化检测血管壁 rCNP 蛋白的表达

hCNP 蛋白在各组均有表达，主要分布于血管内膜和部分中膜。在 2、4 周时间点 A 组表达强度明显低于 B 组，在 8 周时间点无明显区别，见图 1~6。

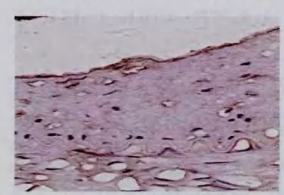


图 1 A 组球囊成形组（2 周），内膜有较弱 CNP 表达（×400）

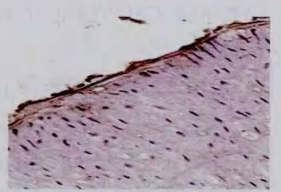


图 2 B 组非球囊成形组（2 周），内膜有较强 CNP 表达（×400）

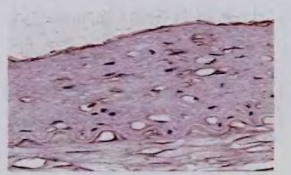


图 3 A 组球囊成形组（4 周），内膜有较弱 CNP 表达（×400）

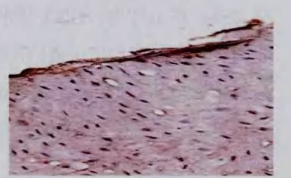


图 4 B 组非球囊成形组（4 周），内膜有较强 CNP 表达（×400）

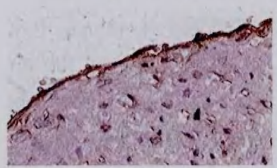


图 5 A 组球囊成形组（8 周），内膜有较强 CNP 表达（×400）

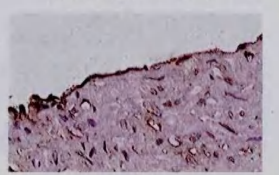


图 6 B 组非球囊成形组（8 周），内膜有较强 CNP 表达（×400）

2.2 RT-PCR 检测血管壁 rCNP mRNA 的表达

2、4 周时间点 A 组表达强度明显低于 B 组，在 8 周时间点无明显区别（t=0.44，P=0.68），见图 7，表 1。



图 7 2、4、8 周时间点 A 组、B 组 CNP RT-PCR 电泳图

2.3 荧光定量 RT-PCR 检测血管壁 rCNP mRNA 的表达

2、4 周时间点 A 组表达强度明显低于 B 组，在 8 周时间点无明显区别（t=0.29，P=0.79），见表 1。

2.4 Western blot 检测血管壁 rCNP 的表达

2、4 周时间点 A 组表达强度明显低于 B 组，在 8 周时间点无明显区别（t=0.12，P=0.91），见图 8，表 1。

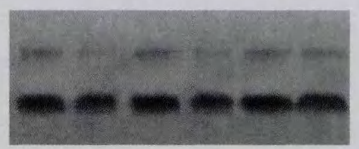


图 8 2、4、8 周时间点 B 组、A 组 CNP Western blot 染色图

2.5 荧光显微镜检测 PEI 腔内转染效率

荧光显微镜检测显示，D、E 组可见明亮的绿色荧光，分布范围包括内膜和部分中膜，荧光信号强度无显著差别；C 组有微弱绿色荧光。而 F 组几乎未见绿色荧光。说明 PEI 腔内转染法对活体动物血管壁有良好的转染效果，最佳转染时间为 30 min；见图 9~12。



图 9 D 组转染 pEGFP-N1 30 min 可见明亮绿色荧光表达（×100）



图 10 E 组转染 pEGFP-N1 60 min 可见明亮绿色荧光表达（×100）

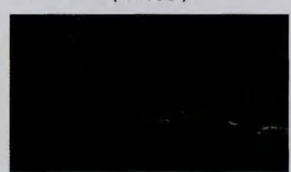


图 11 C 组转染 pEGFP-N1 15 min 可见较弱绿色荧光表达（×100）

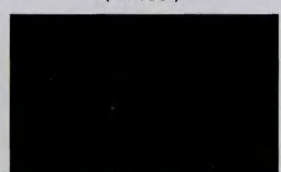


图 12 F 组转染 pcDNA3.1（+）/neo 60 min，未见绿色荧光表达（×100）

2.6 血管壁内膜增生及再狭窄率

各组内膜均有增生，其中 G 组增生程度明显低于 H 组（0.29 ± 0.07，0.76 ± 0.06，t=11.47，P<0.001）。G 组内膜/中膜比明显低于 H 组（0.47 ± 0.05，1.02 ± 0.12，t=10.18，P<0.001）。血管再狭窄率同样低于 H 组（0.31 ± 0.02，0.57 ± 0.05，t=16.81，P<0.001），见图 13~14。

表 1 PTA 术后 CNP 表达变化

指标	A组（球囊成形组）			B组（非球囊成形组）		
	2周（n=6）	4周（n=6）	8周（n=6）	2周（n=6）	4周（n=6）	8周（n=6）
mRNA相对表达量（灰度值比）	0.38 ± 0.06 [a]	0.43 ± 0.05 [b]	1.08 ± 0.15	0.98 ± 0.15	1.01 ± 0.12	1.03 ± 0.15
mRNA相对表达量（Ct 值比）	2.06 ± 0.17 [c]	2.10 ± 0.11 [d]	1.30 ± 0.13	1.27 ± 0.10	1.23 ± 0.10	1.32 ± 0.08
蛋白相对表达量	0.15 ± 0.03 [e]	0.13 ± 0.04 [f]	0.30 ± 0.06	0.31 ± 0.06	0.30 ± 0.05	0.30 ± 0.04

注：a，t=8.00，P<0.001；b，t=9.16，P<0.001；c，t=12.24，P<0.001；d，t=11.99，P<0.001；e，t=8.72，P<0.001；f，t=7.00，P<0.001；a、c、e 表示术后 2 周 A 组与 B 组相比较；b、d、f 表示术后 4 周 A 组与 B 组相比较

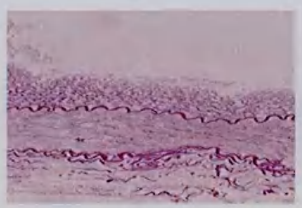


图 13 G 组转染 pcDNA3.1（+）/hCNP，4 周，弹力纤维染色（×200）

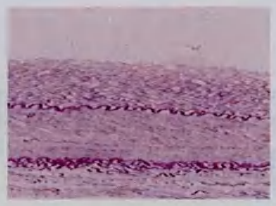


图 14 H 组转染 pcDNA3.1（+）/neo，4 周，弹力纤维染色（×200）

3 讨 论

利钠肽家族在调节血管自身平衡中具有重要作用，包括 A 型利钠肽（Atrial natriuretic peptide，ANP）、B 型利钠肽（brain natriuretic peptide，BNP）、CNP、尿道舒张素和树眼镜蛇利钠肽[8]。CNP 表达于脑组织和血管内皮细胞，而 ANP 和 BNP 则分别表达于心房和心室。

本研究发现，球囊成形术后 2、4 周 CNP 表达明显降低，其机制可能是球囊成形术造成内皮细胞损伤，导致内皮细胞产生 CNP 减少；或者因为再生的内皮不完全具备正常内皮细胞的功能，合成产生 CNP 减少。球囊成形术后 8 周 CNP 表达与非球囊成形组没有显著差别，可能是随着内皮细胞的修复，CNP 合成分泌逐渐增加。

内皮细胞可产生多种血管活性物质，通过旁分泌和自分泌等方式发挥抑制血管再狭窄作用[9]。内皮细胞损伤导致CNP、凝血酶调节蛋白、前列环素、组织型纤溶酶原激活剂、一氧化氮、肝素样分子和二磷酸腺苷酶等因子的产生降低或丧失，促进再狭窄发生。血管再狭窄发生的几个过程中，内皮细胞损伤是其始动因素，对再狭窄发生的各个方面都具有重要作用。内皮损伤严重的病例，其再狭窄发生率明显升高[10]。而内皮细胞修复明显的病例，其再狭窄的发生率和严重程度明显降低[11]。

CNP 选择性激动利钠肽受体 B，而 ANP 和 BNP 选择性激动利钠肽受体 A。利钠肽受体 B 主要分布于血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和炎症细胞[12]。利钠肽与第二信使-鸟苷酸环化酶（Guanylate cyclase，GC）偶联的细胞膜受体结合后，催化 GTP 转换为 cGMP，然后活化 cGMP 依赖的蛋白激酶，即而激活下游通路 Akt/PKB 和 Erk1/2 从而发挥促进血管内皮修复[13]，抑制血栓形成和血管平滑肌细胞增殖，舒张血管和抑制炎症反应等生物学效应[14]。

本研究显示，通过转染 CNP 基因造成 CNP 过表达可以减轻再狭窄的严重程度，进一步说明 CNP 在再狭窄发生中的重要作用。这提示增加内源性 CNP 表达或者补充外源性 CNP 可能抑制再狭窄，但是由于 CNP 蛋白在体内很快降解，因而目前尚不能直接利用 CNP 蛋白治疗再狭窄[15]，可以通过转染 CNP 基因的方式进行再狭窄的预防[6,16]。

参 考 文 献

[1] Schiele T M，Krotz F，Klauss V.Vascular restenosis-striving for therapy[J].Expert Opin Pharmacother，2004，5(11)：2221-2232.

[2] Tsigkas G G，Karantalis V，Hahalis G，et al.Stent restenosis，pathophysiology and treatment options：a 2010 update[J].Hellenic J Cardiol，2011，52(2)：149-157.

[3] Cooke J P，Ghebremariam Y T.Dietary nitrate，nitric oxide，and restenosis[J].J Clin Invest，2011，121(4)：1258-1260.

[4] Lumsden N G，Khambata R S，Hobbs A J.C-type natriuretic peptide (CNP)：cardiovascular roles and potential as a therapeutic target[J].Curr Pharm Des，2010，16(37)：4080-4088.

[5] Federico C.Natriuretic Peptide system and cardiovascular disease [J].Heart Views，2010，11(1)：10-15.

[6] 肖 乐，赵 渝，时 德.人 C 型利钠肽基因的克隆及其真核表达载体的构建[J].重庆医科大学学报，2006，31(4)：474-477.

[7] Schgger H，Jagow G.Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa [J].Anal Biochem，1987，166(2)：368-379.

[8] Nishikimi T，Kuwahara K，Nakao K.Current biochemistry，molecular biology，and clinical relevance of natriuretic peptides[J].J Cardiol，2011，57(2)：131-140.

[9] Edwards G，Feletou M，Weston A H.Endothelium-derived hyperpolarizing fact-ors and associated pathways：a synopsis[J].Pflugers Arch，2010，459(6)：863-879.

[10] Eshtehardi P，Cook S，Wandel S，et al.Impact of arterial injury on neointimal hyperplasia after implantation of drug-eluting stents in coronary arteries：an intravascular ultrasound study[J].Euro Intervention，2010，6(4)：467-474.

[11] Chemnitz J，Christensen B C.Repair in arterial tissue 2 years after a severe single dilatation injury：the regenerative capacity of the rabbit aortic wall.The importance of endothelium and of the state of subendothelial connective tissue to reconstitution of the intimal barrier[J].Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol，1991，418(6)：523-530.

[12] Del Ry S，Cabiati M，Lionetti V，et al.NPR-B，the C-type natriuretice peptide specific receptor，is the predominant biological receptor in mouse and pig myocardial tissue[J].Minerva Endocrinol，2010，35(2)：37-46.

[13] 肖 乐，党永明，时 德.C 型利钠肽对血管内皮细胞株增殖能力的影响[J].中华烧伤杂志，2007，23(3)：191-194.

[14] Potter L R.Regulation and therapeutic targeting of peptide-activated receptor guanylyl cyclases[J].Pharmacol Ther，2011，130(1)：71-82.

[15] Fujii T，Komatsu Y，Yasoda A，et al.Circulating C-type natriuretic peptide (CNP)rescues chondrodysplastic CNP knockout mice from their impaired skeletal growth and early death[J].Endocrinology，2010，151(9)：4381-4388.

[16] 裴晓阳，冯建章，徐亚伟，等.转导 C 型钠尿肽基因对血管成形术后血管平滑肌细胞增殖的影响[J].中国动脉硬化杂志，2006，14(3)：201-204.

（责任编辑：关蕴良）