基础研究 文章编号:0253-3626(2011)04-0416-03

VEGF和反义 c-myc 对移植血管狭窄的影响

尹 康[1]，赖月平[2]，姚富丽[3]

（1.泸州医学院附属医院外科；2.泸州市人民医院急诊科；3.泸州医学院生物化学教研室，泸州 646000）

【摘 要】目的：探讨联合应用血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）基因和 c-myc 反义寡核苷酸（Antisense oligodeoxynucleotides，AODN）对移植血管狭窄的影响。方法：选 40 只新西兰雄性白兔随机分为对照组（A 组）、VEGF 组（B 组）、反义 c-myc 组（C 组）、VEGF 加反义 c-myc 组（D 组），每组 10 只；将同一只兔的左、右髂外动脉各 1 cm 对换移植，移植血管用 VEGF 和（或）c-myc-AODN 液浸泡转染；术后 4 周显微镜下测量移植血管的内膜厚度、内膜面积和移植血管狭窄率，并用免疫组化法染色计数 VEGF 和 c-myc 阳性细胞数。结果：D 组移植血管的内膜厚度、内膜面积、管腔狭窄程度和 c-myc 阳性细胞数均明显低于 A、B、C 组，同时 D 组移植血管的 VEGF 阳性细胞数明显高于其它组。结论：联合应用 VEGF 和 c-myc-AODN 基因治疗能有效抑制移植血管平滑肌细胞（Vacular smooth muscle cells，VSMC）增殖，阻止内膜增生，防止移植血管狭窄。

【关键词】血管内皮生长因子；原癌艺因；反义寡核苷酸；移植血管；狭窄

【中国图书分类法分类号】R365.622 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-12-30

The effect of vascular endothelial growth factor and c-myc antisense oligodeoxynueleotides on vein graft stenosis

YIN Kang, et al

(*Department of Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) and c-myc antisense oligodeoxynucleotides (AODN) on vein graft stenosis. *Methods*: Forty male Zelanian rabbits were randomly divided into 4 groups (n=10 in each group): control group (group A), VEGF group (group B), c-myc-AODN group (group C), VEGF adding c-myc-AODN group (group D). The left and right external iliac arteries of rabbits were transplanted reciprocally, and each transplanted vessel was 1 cm long. Then the transplanted vessels were respectively soaked in Lipofectamine, VEGF, c-myc-AODN and VEGF adding c-myc-AODN solution. Four weeks later, the intimal thickness and area, stenosis ratio of transplanted vascular were calculated and analyzed statistically among groups by computer system. The number of positive cells of VEGF and c-myc was counted by immunohistochemistry method. *Results*: The intimal thickness and area, stenosis ratio of the transplanted vessels, the number of c-myc positive cells in group D were significantly decreased as compared with other groups, while the number of VEGF positive cells in group D was markedly increased than other groups. *Conclusion*: Combination application of VEGF and c-myc-AODN could significantly inhibit the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and stenosis of transplanted vessles.

【Key words】vascular endothelial growth factor(VEGF); c-myc; antisense oligodeoxynucleotides(AODN); transplanted vessels; stenosis

移植血管狭窄或闭塞的主要原因是由于血管平滑肌细胞（Vascular smooth muscle cells，VSMC）迁移、增殖和细胞外基质大量生成，进而引起血管内膜增生（Vascular intimal hyperplasia，VIH）[1]。如何防止移植血管内膜增生是近年来国内外血管外科研究的热点问题[2-4]。我们针对血管内皮生长因子（Vascular endothelial growth factor，VEGF）和 c-myc 在 VSMC 增殖和 VIH 中的重要作用，建立兔自体髂外动脉移植模型，在移植血管局部导入 VEGF 和反义 c-myc，观察两者单独或联合作用对防止移植血管狭窄的影响，以期为临床基因治疗移植血管狭窄奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Lipofectamine™ 2000、VEGF165 及 c-myc-AODN 引物购自 Invitrogen 公司；c-myc 及 VEGF 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司；携带 VEGF165 质粒的克隆、pCDNA 3.1^{plus}、大肠杆菌 DH5α 为本实验室保存；分子克隆工具酶和试剂为 BBI 公司产品；琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒和质粒抽提试剂盒均为

作者介绍：尹 康（1974-），男，实验师，硕士，研究方向：外科手术技能。

通信作者：赖月平，女，副主任医师，Email：a3112604@163.com。

基金项目：泸州医学院科研课题资助项目（编号：20070109）；泸州医学院附属医院科研课题资助项目（编号：2008068）。

北京天根生化科技有限公司产品；SP 试剂盒购自福州迈新公司，其余试剂为国产分析纯级。健康雄性新西兰纯种兔 40 只，体重 2.0~2.8 kg（平均 2.4 kg），由泸州医学院实验动物中心提供（许可证号：川动 04-17）。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 将实验动物随机分为对照组（A 组）、VEGF 组（B 组）、反义 c-myc 组（C 组）、VEGF 加反义 c-myc 组（D 组），实验期间分笼饲养，并均喂食普通混合饲料。实验过程中对动物的处置参照国家科学技术部 2006 年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2.2 VEGF基因转染液的制备 参考GenBank的AF486837.1序列设计上游引物为5'-GGATCCATGAACTTTCTGCTGTCT-TGG-3'，下游引物为5'-GAATTCTCACCGCCTCGGCTTG-TC-3'，上下游引物在 5'端分别加入 *Bam H* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ酶切位点，以 PUC19-VEGF165 质粒为模板扩增 VEGF165；回收并纯化 PCR 产物，用 *Bam H* Ⅰ、*EcoR* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ分别对 PCR 产物、质粒 pCDNA 3.1^{plus} 双酶切，连接产物转化入 DH5a 感受态细菌，挑取阳性克隆，提取重组质粒并进行鉴定，送 Invitrogen 公司测序；测序证实克隆成功后，大量扩增、纯化；将 VEGF 500 μg 溶于 500 μl Lipofectamine 和 500 μl PBS 混合液中，制成转染液备用。

1.2.3 反义 c-myc 转染液的制备 设计 c-myc-AODN 序列 5'-CACGTTGAGGGGCAT-3'，5'端和 3'端各 3 个磷酸二酯键经过硫代磷酸修饰；将 c-myc-AODN 125 μg 溶在 500 μl Lipofectamine 和 500 μl PBS 中，制成转染液备用。

1.2.4 动物移植模型的建立 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)经耳缘静脉注射麻醉动物，无菌条件下分别取左、右髂外动脉各 1 cm；将左、右髂外动脉分别与 8/0 保护薇乔缝线浸泡于 1 ml 预先配制好的各组转染液中 20 min，然后将左、右侧髂外动脉对换移植，8/0 保护薇乔缝线端端外翻吻合，确保血流通畅后缝合切口，术毕肌肉注射 80 万 U 青霉素和皮下注射肝素 6 250 U[5]。

1.2.5 移植血管标本制备 术后 4 周，麻醉实验动物后在无菌条件下锐性切下移植处血管约 1.5 cm，置冰上用肝素盐水冲洗管腔内血液，4%多聚甲醛固定备用。

1.2.6 病理学检查 将上述多聚甲醛固定的移植血管，每间隔 0.25 cm 长度取材 0.25 cm，石蜡包埋后连续切片，每个标本切 24 张组织切片，8 张切片用于 HE 染色，16 张切片铺于用赖氨酸处理的载玻片上，行免疫组织化学染色检查。采用 Micro-opti 公司 Motic Advanced 3.0 病理分析系统检测内膜厚度、内膜面积、管腔狭窄率 =（1- 现存管腔面积/内弹力膜以下面积）×100%。

1.2.7 免疫组化法检测 VEGF 和 c-myc 蛋白表达 将各组石蜡切片脱蜡，3%H_2O_2 孵育 10 min，PBS 浸泡，抗原修复。室温下用 5%山羊血清封闭 10 min，弃血清，加入Ⅰ抗稀释液（c-myc 抗体 1:200 稀释，VEGF 抗体 1:250 稀释），4℃反应过夜，PBS 洗涤后与生物素标记的Ⅱ抗室温孵育 30 min，DAB 显色剂显色，苏木精复染、封片，显微镜下（×400）观察摄片，计算机图像分析系统计算血管壁阳性细胞百分率。

1.2.8 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件分析实验数据，所有数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，应用方差分析及 Tukey 法进行多重比较，$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 移植血管壁形态学改变

HE 染色光镜见各组移植血管壁均有一层内皮细胞覆盖，其下为不规则增生的内膜，内膜中 VSMC 排列紊乱，其间可见泡沫细胞、炎性细胞和细胞外基质。对照组移植血管内膜增生程度较其余各组明显。

2.2 移植血管狭窄程度的观察

表 1 显示术后 4 周，B 组、C 组及 D 组移植血管内膜厚度较 A 组分别降低了 21.6%（$P<0.05$）、27.6%（$P<0.05$）和38.2%（$P<0.01$）；B 组、C 组和 D 组移植血管狭窄率较 A 组分别降低了 28%（$P<0.05$）、33.8%（$P<0.05$）和 54.4%（$P<0.01$）；B 组与 C 组移植血管内膜厚度和血管狭窄率差异无统计学意义（$P>0.05$）；B 组、C 组与 D 组之间的移植血管内膜厚度和血管狭窄率差异有统计学意义（$P>0.05$）。

表 1 各组移植血管内膜厚度、内膜面积和狭窄率比较（$n=20, \bar{x} \pm s$）

组别	内膜厚度（μm）	内膜面积（mm^2）	狭窄率（%）
A	62.6 ± 5.9	1.30 ± 0.18	67.9 ± 9.9
B	48.7 ± 6.4	0.97 ± 0.07	48.2 ± 6.8
C	45.3 ± 5.2	0.91 ± 0.08	44.3 ± 7.5
D	34.5 ± 3.8	0.78 ± 0.10	30.5 ± 4.2

注：内膜厚度（$F=13.2, P=0.001$）；内膜面积（$F=13.8, P=0.0015$）；狭窄率（$F=14.8, P=0.005$）

2.3 免疫组织化学染色检测结果

在移植血管中膜和新生内膜中可见 c-myc 和 VEGF 阳性蛋白细胞，且有向管腔表面聚集的趋势。c-myc 和 VEGF 阳性蛋白主要定位于细胞质内，c-myc 阳性蛋白呈黄褐色颗粒，VEGF 阳性蛋白呈棕黄色颗粒。表 2 显示术后 4 周，B 组 c-myc 阳性细胞数和 C 组 VEGF 阳性细胞数较 A 组明显减少（$P<0.05$），D 组 c-myc 阳性细胞数和 VEGF 阳性细胞数与 A 组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

表 2 移植血管 c-myc 和 VEGF 阳性细胞率（%，$n=20, \bar{x} \pm s$）

组别	c-myc阳性细胞	VEGF阳性细胞
A	58.5 ± 8.6	25.9 ± 4.3
B	52.1 ± 6.8	40.6 ± 5.1
C	38.4 ± 4.9	30.0 ± 5.6
D	18.9 ± 3.6	55.1 ± 6.3

注：c-myc 阳性细胞（$F=24.5, P=0.000\,3$）；VEGF 阳性细胞（$F=17.8, P=0.000\,7$）

3 讨 论

移植血管狭窄特别是中小血管移植后狭窄是影响移植血管远期通畅率的最主要的因素，是血管外科界的难题与研究热点。由于移植血管狭窄是一多基因、多因素参与的复杂

过程，因此如何从不同角度和不同环节、多基因联合防治移植血管内膜增生，是国内外血管外科工作者努力探讨的研究方向。

内皮损伤和功能障碍对许多急慢性血管疾病的发生、发展而言至关重要。增强血管内皮功能并促进再内皮化，有助于血管重建[6]。VEGF是一种内皮细胞特异性有丝分裂原，VEGF的表达可引发多种生物活性，包括内皮细胞的分化、增殖、迁移和存活等[7]。VEGF在血管重建中的作用具有两面性，可增强或抑制新内膜形成，这取决于物种和VEGF来源的不同[8]。本研究表明在移植血管局部单独应用VEGF基因，能够加速受损血管内皮的修复，抑制内膜增生及预防再狭窄，这与文献报道在血管成形术中应用VEGF基因的作用一致[9]。

c-myc癌基因与血管平滑肌细胞的增殖和迁移密切相关。在损伤等始动因素作用下，c-myc基因表达增加，其编码蛋白与DNA结合，可促进与细胞增殖有关的基因开放，从而产生细胞增殖效应[10]。c-myc癌基因还可诱导丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶P34cdc2产生，使细胞迁移[11]。本研究表明在移植血管局部单独应用反义寡核苷酸技术能够阻断c-myc基因的表达，抑制VSMC的增生，降低移植血管狭窄率。

在移植血管狭窄防治过程中，单独选择VEGF或反义c-myc虽然取得了一定的疗效，但均存在剂量依赖性，且易发生不良反应。如大剂量VEGF在体内的过度表达可造成血管内膜过度增生、粥样斑块形成，诱发出血、肿瘤生长等。本研究在移植血管局部联合应用VEGF和反义c-myc，从内皮修复和VSMC两个靶点入手，抑制c-myc的表达，阻止VSMC的增殖和转型。研究结果显示：移植血管局部联合转染VEGF和反义c-myc后，血管内膜厚度、内膜面积、管腔狭窄程度和c-myc阳性细胞数均显著低于对照组及单独转染组；同时联合转染组移植血管的VEGF表达增强，明显高于其它组，移植血管内径大，管腔通畅，无动脉瘤形成。说明联合转染基因治疗比单基因治疗效果更好，对抑制VSMC增殖，阻止内膜增生有明显的协同作用，呈部分叠加效应，达到了控制移植血管狭窄发生发展的目的。并且，本研究在移植血管局部利用手术缝线携带目的基因的方法简便易行，避免了全身用药特异性差、剂量大、副作用多等缺点，具有潜在的临床应用价值，为临床多基因治疗移植血管狭窄提供了有益的实验参考。

参 考 文 献

[1] Mitchell, Richard N. Allograft arteriopathy: pathogenesis update[J]. Cardiovasc Pathol, 2004, 13(1): 33-40.

[2] Goube P, Hammoudi N, Pagny J Y, et al. Radial artery graft stenosis treated by percutaneous intervention[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2010, 37(3): 697-703.

[3] Tinder C N, Chavanpun J P, Bandyk D F, et al. Efficacy of duplex ultrasound surveillance after infrainguinal vein bypass may be enhanced by identification of characteristics predictive of graft stenosis development[J]. J Vasc Surg, 2008, 48(3): 613-618.

[4] Ni J, Waldman A, Khachigian L M. c-Jun regulates shear-and injury-inducible Egr-1 expression, vein graft stenosis after autologous end-to-side transplantation in rabbits, and intimal hyperplasia in human saphenous veins[J]. J Biol Chem, 2010, 285(6): 4038-4048.

[5] Wu Z J, Zhu Y, Shi D, et al. The study on platelet-derived growth factor and proliferating cell nuclear antigen antisense oligodeoxynucleotides together inhibiting the stenosis of transplanted vascular[J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2005, 43(7): 426-429.

[6] Froehlich H, Gulati R, Boilson B, et al. Carotid repair using autologous adipose-derived endothelial cells[J]. Stroke, 2009, 40(5): 1886-1891.

[7] Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress[J]. Endocr Rev, 2004, 25(4): 581-611.

[8] Zhang J, Silva T, Yarovinsky T, et al. VEGF blockade inhibits lymphocyte recruitment and ameliorates immune-mediated vascular remodeling[J]. Circ. Res., 2010, 107(3): 408-417.

[9] Walter D H, Cejna M, Diaz-Sandoval L, et al. Local gene transfer of phVEGF-2 plasmid by gene-eluting stents: an alternative strategy for inhibition of restenosis[J]. Circulation, 2004, 110(1): 36-45.

[10] Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-MYC[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 416(2): 129-136.

[11] Furukawa Y, Piwnica-Worms H, Ernst T J, et al. Cdc2 gene expression at the G_1 to S transition in human T lymphocytes[J]. Science, 1990, 250(4982): 805-808.

（责任编辑：关蕴良）

读者·作者·编者

更 正

本刊2011年第2期刊登的《我国6城市小学生肥胖相关知识、态度及行为调查》一文中，通信作者应增加重庆医科大学附属儿童医院的李廷玉教授。

本刊编辑部