基础研究 文章编号:0253-3626(2010)11-1650-04

转染 PDGF 和 c-myc 反义寡核苷酸抑制移植血管狭窄研究

向 志,黄德荣,吴忠均
(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨血管移植后联合应用血小板源生长因子(Platelet-derived growth factor,PDGF)和原癌基因 c-myc 反义寡核苷酸(Antisense oligodeoxynucleotides,AODN)抑制血管平滑肌(Vascular smooth muscle cell,VSMC)增殖和防止移植血管狭窄的作用。方法:选 48 只新西兰雄性白兔,随机分为对照组、PDGF-AODN 组、c-myc-AODN 组和 PDGF-AODN+c-myc-AODN 组,每组 12 只;将同一只兔的左、右髂外动脉(各 1.0 cm)对换移植,移植血管用 PDGF-AODN 和 c-myc-AODN 液浸泡,血管吻合口用 AODN 液浸泡过的缝线吻合;取移植血管制片显微镜下观察内膜增生情况,计算机图像分析测量其内膜厚度、内膜面积和移植血管狭窄率,并分别用原位杂交组织化学和免疫组织化学染色计数 PDGF 和 c-myc 阳性细胞数。结果:PDGF-AODN+c-myc-AODN 组的移植血管内膜厚度、内膜面积、管腔狭窄程度和 PDGF 阳性细胞及 c-myc 阳性细胞数均显著低于对照组($P<0.01$),而且亦明显低于单独转染 PDGF-AODN 组或 c-myc-AODN 组($P<0.05$),PDGF-AODN 组和 c-myc-AODN 组间差异无显著意义($P>0.05$)。结论:联合应用 PDGF-AODN 和 c-myc-AODN 能有效抑制 VSMC 增殖,阻止内膜增生,防止移植血管狭窄,为利用反义核酸技术联合调控多个基因防止移植器官内血管狭窄奠定了基础。

【关键词】PDGF;c-myc;反义寡核苷酸;平滑肌细胞增殖;移植血管狭窄
【中国图书分类法分类号】R654.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-09-03

The study on platelet-derived growth factor and c-myc together inhibiting the stenosis of transplanted vascular

XIANG Zhi, et al
(*Departmen of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of platelet-derived growth factor (PDGF)and c-myc antisense oligodeoxynucleotides(AODN) together on inhibiting the proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and the stenosis of transplanted vascular. *Method*: To select 48 male Zelanian rabbits and were randomly divided into four groups (n=12,in each group): control group, PDGF-AODN group, c-myc-AODN group, PDGF-AODN adding c-myc-AODN group. The left and right external iliac arteries (length 1.0cm) of rabbits were transplanted reciprocally. The transplanted vascular were respectively soaked in lipofiction, PDGF-AODN, c-myc-AODN and PDGF-AODN addingj c-myc-AODN solution about 20 minute, the vascular anastomotic were sutured by 8/0 suture of soaked in AODN solution. Four weeks later, the specimens were harvested for microscopy. The pathological morphology of transplanted vascular were observed under microscope(HE). The intimal thickness and area, stenosis ratio(%) of transplanted vascular were calculate and analysed statistically among group by computer system. The number of positive cells of PDGF's mRNA in transplanted vascular wall were counted with in situ hybtidzatian histo-cytochemistry and the number of positive cells of c-myc's protein in transplanted vascular wall were counted by S-P immunochemisty. Result: The intimal thickness and area, stenosis ratio of transplanted vascular, the number of PDGF and c-myc positive cell in PDGF-AODN adding c-myc-AODN group were significantly lower than those in other group ($P<0.01$), and that were lower evidently than PDGF-AODN group and c-myc-AODN group. *Conclusion*:PDGF and c-myc antisense oligodeoxynucleotides together could significantly inhibit the proliferation of VSMC and stenosis of transplanted vascular. The present study lay the foundation for fuetur making use of oligodeoxynucleotides technology to prevent and treat vascular stenosis in transplanted organ.

【Key words】PDGF;c-myc;Antisense oligodeoxynucleotides;Proliferation of VSMC;Vascular stenosis

作者介绍:向 志(1964-),男,副主任医师,硕士,
研究方向:血管外科。

器官移植已成为临床治疗器官功能衰竭的有效治疗手段，成功地挽救了许多患者生命，然而遗憾的是器官移植后，除机体对移植物产生免疫排斥外，移植物内血管狭窄业已成为影响器官移植疗效的另一重要因素。移植物内血管狭窄的细胞学基础是血管中膜的血管平滑肌细胞（Vascular smooth muscle cell，VSMC）向内膜迁移并增殖转型，引起血管内膜增生，因此若能控制 VSMC 增殖可实现抑制血管内膜增生，从而阻止移植物内血管狭窄。近年来随着分子生物学技术的飞速发展，反义核酸基因封闭技术作为一种全新的基因表达调控技术已受到高度重视，对于血管狭窄中各种基因的过度表达，可以用此技术进行特异性的基因封闭治疗，达到预防血管狭窄的目的；近年的研究发现，血小板源性生长因子（Platelet-derived growth factor，PDGF）和原癌基因 c-myc 的异常表达与 VSMC 迁移和增殖密切相关，本研究建立了兔髂外动脉移植模型，在移植血管局部联合导入 PDGF 和 c-myc 的反义寡核苷酸（Antisense oligodeoxynucleotide，AODN），观察其阻止移植血管狭窄的作用，旨在为进一步探讨利用反义核酸技术防止移植物内血管狭窄或闭塞奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Lipofectin 脂质体购自 Gibico BRL 公司，抗 c-myc 单克隆抗体、S-P 试剂盒购自福州迈新公司。其余为国产分析醇。

1.1.2 实验动物及分组 健康雄性新西兰纯种兔 48 只，体重 1.8～2.6（平均 2.3）kg，由第三军医大学动物中心提供，实验期间所有动物均喂食普通混合饲料，并分笼饲养；随机分成 4 组（每组 12 只）：对照组、PDGF-AODN 组、c-myc-AODN 组及 PDGF-AODN＋c-myc-AODN 组。

1.2 方法

1.2.1 AODN 和寡核苷酸探针的合成及纯化 从 medline 上的基因文库中查到兔的 PDGF B 链和 c-myc 基因序列，分别选取各自 mRNA 翻译起始位点后 18 个和 15 个碱基，设计出如下 AODN 序列：PDGF-AODN 5'-CGA GTG GTC ACT CAG CAT，c-myc-AODN 5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'，全硫代磷酸修饰。根据兔 PDGF-B 链 cDNA 序列，设计了检测兔 PDGF-B mRNA 探针，其序列为：5'-GAT CGC ACC AAT GCC AAC TTC CGG GTG TGG CCG CCC TGC GTG GAG GTG CAG-3'。AODN 和寡核苷酸探针均由上海生工生物工程公司合成，聚丙稀酰胺凝胶电泳（PAGE）纯化。将合成的 AODN 分别以 1:1（W/V）的比例溶在生理盐水中，然后按 1:2（V/V）比例将 AODN 与脂质体融合，制成各种 AODN 转染液备用。

1.2.2 动脉移植模型的建立和 AODN 转染移植动脉 动物称重后用 3%戊巴比妥纳（30 mg/kg）经耳缘静脉注射麻醉后，无菌条件下暴露兔双侧髂外动脉，无创动脉夹在髂外动脉上、下两端阻断血流，分别取左、右髂外动脉各 1 cm，作好标记，将其浸泡于 1 ml 预先配制好的转染液中 20 min，同时将 8/0 保护薇乔缝线也浸泡在转染液中，对照组用脂质体液浸泡，其余各组用对应的 AODN 转染液浸泡。然后将取下的左侧髂外动脉移植到右侧髂外动脉处，右侧髂外动脉移植到左侧髂外动脉处，8/0 保护薇乔缝线端端外翻吻合，取下无创动脉夹，确定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。以上操作由固定的 2 人完成。

1.2.3 移植血管标本留取 术后 4 周时，将各组兔麻醉后仰卧固定，无菌条件下，用显微外科血管钳、镊子和剪刀轻柔分离移植动脉，血管钳夹闭两端，锐性切下移植处血管约 1.5 cm 左右，在冰块上用肝素盐水冲洗管腔内血液，用 4%多取甲醛固定备用。

1.2.4 病理学检查 将上述 4%多聚甲醛固定的 1.5 cm 移植血管，每间隔 0.25 cm 长度取材 0.25 cm，石蜡浸蜡包埋，连续切片，厚度为 0.4 μm，每个标本切 18 张组织切片，6 张组织切片用于苏木素－伊红（HE）染色，12 张组织切片铺于用赖氨酸处理的载玻片上，用于原位杂交组织化学和免疫组织化学染色检查。计算机病理图像分析系统下观察、测定和分析以下指标：①内膜厚度；②内膜面积；③管腔狭窄率＝（1－现存管腔面积/内弹力膜以下面积）×100%。

1.2.5 原位杂交组织化学染色检测 PDGF 的 mRNA 表达 按蔡文琴[11]方法进行原位杂交组织化学染色；用 Dig-11-ddUTP（地高辛精）修饰合成好的寡核苷酸探针并纯化。将各组石蜡包埋切片各 2 张，浸入二甲苯 10 min 移除石蜡，预杂交液对每张切片进行预杂交，用 30 μl 0.4ng/μl 的 PDGF mRNA 的寡核苷酸探针液加在切片上，湿盒中 37℃过夜；滴加酶标地高辛抗体（1:500），37℃ 30 min；每张片加 3 μl 显色液，置暗处显色 100 min；梯度酒精脱水，二甲苯透明，DPX 封固；显微镜下观察，阳性信号为紫监色颗粒状沉淀物分布于细胞浆中，计数显微高倍视野（400 倍）下 0.25×0.25mm²×4 面积中阳性细胞数，计算平均数作为实际计数。

1.2.6 免疫组织化学检测 c-myc 蛋白表达 各组石蜡切片脱蜡，3%H_2O_2 室温孵育 10 min（以消除内源性过氧化物酶活性），PBS 浸泡；抗原修复：将 2 000 ml 枸橼酸盐缓冲液加入不锈钢压力锅中加热至沸腾，切片置于金属架上，放入锅内切片位于液面下，盖锅压阀，开始喷气时 2 min 后，打开锅盖，取出切片，蒸馏水冲洗后，PBS 浸泡，5%正常山羊血清（PBS 稀释）封闭，室温孵育 10 min，倾出血清，滴加一抗（c-myc 抗体 1:50 稀释）放入湿盒中 4℃过夜。滴加生物素标记二抗室温孵育 30 min，DAB 显色剂显色，复染、封片，显微镜下（10×40）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（200 个细胞中）。

1.3 统计学处理

所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，差异的显著性用单因素方差分析，$P \leq 0.05$ 者表示差异有统计学意义。统计学处理应用 SPSS12.0 统计分析程序包。

2 结 果

2.1 移植血管壁形态学改变

HE 染色光镜见 4 组移植血管壁均有 1 层内皮细胞覆盖，其下为增生的内膜，增生内膜不规则，内膜中 VSMC 排列紊乱，其间由炎性细胞、泡沫细胞和细胞外基质。对照组移植

血管内膜增生程度较各反义组明显，见图 1。

2.2 移植血管狭窄程度观察

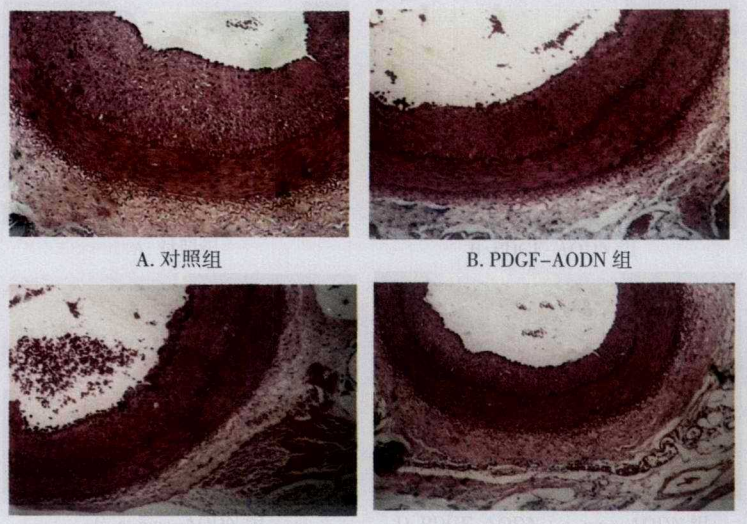
术后 4 周时各组内膜厚度、内膜面积和管腔狭窄率见表 1。PDGF-AODN 组、c-myc-AODN 组和 PDGF-AODN+ c-myc-AODN 组移植血管内膜厚度较对照组分别降低了 25.5%（$P<0.05$）、30.7%（$P<0.05$）和 51.9%（$P<0.01$）；PDGF- AODN 组、c-myc-AODN 组和 PDGF-AODN+c-myc-AODN 组移植血管狭窄率较对照组分别降低了 33.8%（$P<0.05$）、40.1%（$P<0.05$）和59.7%（$P<0.01$）；PDGF-AODN 组和c-myc-AODN 组间移植血管内膜厚度及面积差异无显著性（$P>0.05$），PDGF-AODN 组和 c-myc-AODN 组与 PDGF-AODN+c-myc-AODN 组之间的移植血管内膜厚度及面积差异具有显著性（$P<0.05$）。此结果说明联合应用 PDGF-AODN 与c-myc-AODN 转染移植血管壁对抑制术后移植血管狭窄有明显作用。

2.3 原位杂交组织化学染色检测 PDGF 的 mRNA 表达结果

PDGF 的 mRNA 表达表现为细胞浆或少数细胞核出现蓝色颗粒状，阳性细胞主要分布于内膜全层，靠近管腔处分布较多，PDGF 的阳性细胞数计数结果见图 2。PDGF-AODN 组阳性细胞显著少于对照组（$P<0.05$），c-myc-AODN 组阳性细胞数亦比对照组少，但无明显差异（$P>0.05$）。PDGF-AODN+ c-myc-AODN 组阳性细数比对照组显著性减少（$P<0.01$）。

2.4 免疫组织化学染色检测结果

c-myc 蛋白表达均呈黄褐色颗粒，大多定位于细胞浆；阳性细胞在移植血管中膜和新生内膜出现，且有向管腔表面聚集的趋势；c-myc 的阳性细胞数计数结果见图 3。c-myc-AODN 组 c-myc 阳性细胞数比对照组少显著减少（$P<0.05$）；而 PDGF-AODN 组的 c-myc 阳性细胞数与对照组差异无显著性（$P>0.05$）；在 PDGF-AODN+c-myc-AODN 组中，c-myc 阳性细胞数极显著少于对照组（$P<0.01$），显著少于 PDGF-AODN 组和 c-myc-AODN 组（$P<0.05$）。说明 c-myc-AODN对 c-myc 蛋白的表达有抑制作用，且二者联合转染移植血管后对 c-myc 蛋白表达抑制作用有叠加效应。



A. 对照组　B. PDGF-AODN 组

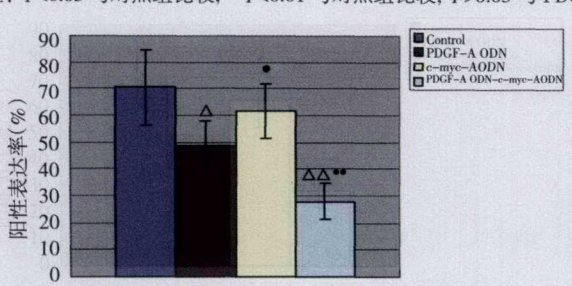
C. c-myc-AODN 组　D. PDGF-AODN + c-myc-AODN 组

图 1　移植血管术后 4 周内膜改变（HE × 100）

表 1　各组移植血管内膜厚度、内膜面积和狭窄率比较（n=24，$\bar{x} \pm s$）

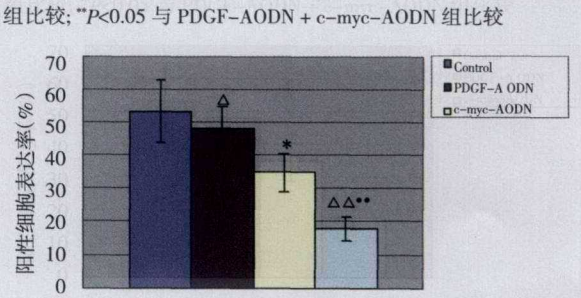
分组	内膜厚度（μm）	内膜面积（mm²）	狭窄率（%）
对照组	59.3 ± 8.4	0.90 ± 0.14	68.3 ± 12.8
PDGF-AODN	44.2 ± 5.9$^{\triangle}$	0.78 ± 0.07$^{\triangle}$	45.2 ± 7.9$^{\triangle}$
c-myc-AODN	41.1 ± 4.7$^{\triangle *}$	0.73 ± 0.07$^{\triangle *}$	40.9 ± 8.8$^{\triangle *}$
PDGF-AO+c-myc-AODN	28.5 ± 3.9$^{\triangle\triangle **}$	0.52 ± 0.04$^{\triangle\triangle **}$	27.5 ± 6.3$^{\triangle\triangle **}$

注：$^{\triangle}P<0.05$ 与对照组比较；$^{\triangle\triangle}P<0.01$ 与对照组比较；$^{*}P>0.05$ 与 PDGF-AODN 组比较；$^{**}P<0.05$ 与 PDGF-AODN + c-myc-AODN 组比较



$^{\triangle}P<0.05$ 与对照组比较；$^{*}P>0.05$ 与对照组比较；$^{\triangle\triangle}P<0.01$ 与对照组比较；$^{**}P<0.05$ 与 PDGF-AODN + c-myc-AODN 组比较

图 2　术后 4 周移植血管 PDGF mRNA 表达阳性细胞率



$^{\triangle}P<0.05$ 与对照组比较；$^{*}P>0.05$ 与对照组比较；$^{\triangle\triangle}P<0.01$ 与对照组比较；$^{**}P<0.05$ 与 PDGF-AODN + c-myc-AODN 组比较

图 3　术后 4 周移植血管 c-myc 蛋白表达阳性细胞率

3 讨 论

大量研究发现,移植器官慢性失功的发生发展过程中,除免疫排斥反应外,移植器官内血管狭窄或闭塞起着重要作用。其发生机制是:各种器官移植过程中,由于非免疫因素(手术对血管的机械作用、缺血/再灌注损伤等)和免疫因素的作用,使血管内皮细胞(Vascalar endothelial cell,VEC)不可避免地受到损伤,VEC 损伤后,内皮下组织暴露,血小板、白细胞粘附聚集,继而形成富含血小板和白细胞的血栓;血栓中大量聚集的血小板和白细胞活化后,分泌释放大量细胞生长因子(PDGF、bFGF 等)和细胞因子(MCP-1、ICAM-1 等),促使血管壁 VSMC 细胞增殖并向内膜迁移,引起内膜增生,VSMC 由收缩型转化为合成型,分泌大量细胞外基质沉积于血管壁,进而导致血管狭窄或闭塞[2-4]。尽管近年来强效免疫抑制剂的合理使用,急性免疫排斥反应的发生已能得到良好的控制,然而随着术后长期存活者的大量涌现,移植器官中血管狭窄或闭塞仍成为阻碍移植器官长期存活的重要原因,因此在进行器官移植过程中除有效控制免疫排斥反应外,设法减少对移植器官的机械和缺血/再灌注损伤,阻止 VSMC 细胞增殖和转型,有望防止移植器官中血管发生慢性狭窄,从而控制移植器官慢性失功。

由于移植器官内的血管狭窄的多基因性,单基因治疗具有较大的局限性,因此,从不同角度、不同环节或不同侧面调控多个基因似乎能够阻止血管狭窄,目前针对 VSMC 增殖的反义核酸技术越来越受到重视。许多学者在研究中发现 PDGF 是一种重要的促细胞分裂剂,可刺激 VSMC 和成纤维细胞等增殖;损伤的 VEC、激活的血小板及移行于 VEC 下的单核巨噬细胞均能以自分泌、旁分泌释放大量的 PDGF,促进 VSMC 生长、增殖、迁移和转型[5,6]。原癌基因 c-myc 是细胞完成生长和分化调控的必需基因,表达的 c-myc 蛋白与 DNA 结合后激活增殖基因,引起细胞增殖,在损伤等始动因素作用下 c-myc 基因迅速出现扩增,转录的 mRNA 和释放的蛋白质大量增加,不断激活增殖基因,使细胞过度增生,c-myc 起着启动和维持细胞增殖的双重作用[7]。因此如能控制 PDGF 基因和 c-myc 基因表达有望阻止 VSMC 增殖。有学者在血管局部单独给予 PDGF-AODN 或 c-myc-AODN 以抑制 VSMC 增殖,收到了一定的疗效[8-11],但还不能完全阻止血管狭窄的发生。本研究设想通过同体移植血管(排除免疫排斥反应干扰)建立动脉损伤模型,用"鸡尾酒"的方法,在移植血管局部联合应用 PDGF-AODN 和 c-myc-AODN,期望二者能协同作用,抑制 PDGF 和 c-myc 的表达,从而阻止 VSMC 的增殖、迁移和转型,防止血管内膜增生,企图达到控制血管狭窄发生的目的。研究结果显示:移植血管局部联合转染 PDGF-AODN 和 c-myc-AODN 后,血管内膜厚度、内膜面积、管腔狭窄程度和 PDGF 阳性细胞及 c-myc 阳性细胞数均显著低于对照组($P<0.01$),而且联合转染 PDGF-AODN 和 c-myc-AODN 组血管内膜厚度、内膜面积、管腔狭窄程度和 PDGF 阳性细胞及 c-myc 阳性细胞数亦明显低于单独转染 PDGF-AODN 组或 c-myc-AODN 组($P<0.05$),说明联合转染 PDGF-AODN 和 c-myc-AODN 比单独转染 PDGF-AODN 或 c-myc-AODN 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展发生的目的,这为针对血管狭窄发生涉及的不同病因和病程发展的不同阶段,联合调控多个基因防止血管狭窄奠定了基础。

本研究模拟器官移植过程,建立动脉血管移植模型,并在离体情况下用反义寡核苷酸灌注、浸泡移植血管和用携带有反义寡核苷酸的缝线吻合血管,增加了转染效率,目的是为在各种器官移植过程中,利用体外保存被移植器官的这段时间,用目的基因转染被移植器官,提高其转染率提供思路和线索。反义核酸技术是基因治疗疾病的核心之一,利用反义核酸封闭与 VSMC 生长有关的靶基因具有专一性强、作用范围广、设计制备简单、人为控制好和安全性高等优点,具有潜在的临床应用价值。联合应用多个反义核酸防止同种异体移植器官内血管狭窄是我们下一步将开展的工作。

参 考 文 献

[1] 蔡文琴.现代实用细胞与分子生物学实验技术[M].第 1 版.北京,人民军医出版社,2003.177-220.

[2] Mitchell, Richard N. Allograft arteriopathy: Pathogenesis update[J]. Cardiovascular Pathology, 2004, 13(1): 33-40.

[3] Potena L, Magnani G, Sorbello S, et al. Effect of folate administration on heart allograft atherosclerosis one year after transplant: a prospective randomized study[J]. Heart and Lung Transplantation, 2003, 22(1): S75-79.

[4] Buturovic-Ponikvar J. Renal transplant artery stenosis[J]. Neprol Dial Transplant, 2003, 18(1): 74-77.

[5] Moon S K, Kim H M, Kim C H, et al. PTEN induces G1 cell cycle arrest and inhibits MMP-9 expression via the regulation of NF-κB and AP-1 in vascular smooth muscle cells[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2004, 421(4): 267-276.

[6] Kingsley K, Huff J L, Rust W L, et al. ERK1/2 mediates PDGF-BB stimulated vascular smooth muscle cell proliferation and migration on laminin-5[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002, 293(17): 1000-1006.

[7] Pelengaris S, Khan M. The many faces of c-myc[J]. Archives of Biochemistry & Biophysics, 2003, 416(2): 129-136.

[8] 曲乐丰,景在平,曹贵松.手术缝线携带反义基因预防血管吻合口内膜增生的实验研究[J].中华普外科杂志, 2002, 17(1): 36-37.

[9] Kutryk M J, Foley D P, van den Brand M, et al. Local intracoronary administration of antisense oligonucleotide against c-myc for the prevention of in-stent restenosis: results of the randomized investigation by the Thoraxcenter of antisense DNA using local delivery and IVUS after coronary stenting (ITALICS) trial[J]. Am Coll Cardiol, 2002, 39(3): 281-287.

[10] Kishioka H, Fukuda N, Nakayama M, et al. Effect of methylene methylimino linkage of antisense oligonucleotide to the platelet-derived growth factor A-chain on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats[J]. European Journal of Pharmacology, 2000, 392(2): 129-132.

[11] Suzuki J, Isobe M, Morishita R, et al. Prevention of cardiac allograft arteriosclerosis using antisense proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotide[J]. Transplantation, 2000, 70(6): 398-400.

(责任编辑:冉明会)