维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)01-0012-04

大鼠颈动脉气囊导管损伤早期原癌基因 c-Fos、c-Jun 的表达研究

蒲庆华，时 德、赵 渝
（重庆医科大学临床学院普外科 重庆 400016）

【摘 要】目的：采用RT-PCR 方法研究动脉损伤早期原癌基因c-fos、c-jun 的表达规律；方法：制备大鼠颈动脉气囊导管扩张损伤模型、采用RT-PCR 方法检测损伤早期不同时相点动脉壁平滑肌细胞（VSMC）c-fos、c-jun 基因的表达丰度，同时采用免疫组化方法观测c-fos 蛋白的表达。结果：c-jun 在损伤后30min 达高峰。术后1h、2h 仍能检测到明显的表达，术后5h 后不能检出。c-fos 在术后30min、1h 均可检测到该基因多量的表达、以后随时间的推移表达逐渐下降，5h 时不能检出。损伤后45 min 中膜残留VSMC c-fos 蛋白表达阳性，阳性率86%。结论：在动脉损伤后极早期即有c-fos、c-jun 的大量表达、RT-PCR 检测原癌基因的表达为研究动脉损伤早期 VSMC 的活化机理提供了一个的敏感方法。

【关键词】再狭窄；动脉成形术；血管平滑肌；原癌基因；大鼠
【中国图书分类法分类号】R654 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-01-16

Proto-oncogene c-fos、c-jun expression in arterial wall early after balloon injury

PU Qinghua, et al
(Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University)

【Abstract】 *Objective*: To study the expression of proto-oncogene c-fos、c-jun in arterial wall during the early period after balloon injury. *Methods*: The balloon catheter injury was performed on left common carotid of rat by imitating the process of angioplasty. Total RNA was isolated from the arterial wall at different time after injury. Expression of c-fos、c-jun mRNA was demonstrated and levels of two mRNA were estimated by the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Meanwhile, presence of c-fos protein in vascular smooth muscle cells (VSMCs) was detected with immunohistochemistry. *Results*: The expression of c-jun reached its maximum 30 min after injury and remained elevated at 1 and 2 hour. c-fos level was maximal at 0.5 h and maintained for 1 hour. Afterwards it gradually declined and returned to basal levels after 5 h. Immunostain of c-fos protein was mostly positive in the remaining VSMCs at 45 min (86%). *Conclusion*: Balloon injury induces high expression of c-fos and c-jun in the very early period. Using RT-PCR to detect proto-oncogene expression provides a sensitive method for studying the principle of VSMCs activition and proliferation during the early period after injury.

【Key words】 Angioplasty; Vascular smooth muscle cell; Proto-oncogene ; Rat

动脉粥样硬化性闭塞导致的心脑缺血是临床常见疾病，经皮腔内冠状动脉成形术、旁路转流术以及血管内膜剥脱术是这类疾病主要的手术治疗方法，但其中有30% - 60% 的病人术后1 年内可因新内膜过度增生而导致血管再度狭窄[1]。因此，认识血管再狭窄的发生机制进而达到控制的目的、成为近年来一个活跃的研究领域。研究发现，动脉损伤后再狭窄的形成是一个复杂的病理生理过程，已证实VSMC 的活化、增殖和迁移是导致动脉壁过度增生的中心环节[1]，动脉损伤后血管壁局部存在多种生长因子，包括PDGF、bFGF、TGF- β 、IGF 等，为VSMC 提供了重要的丝裂原和趋化刺激，是启动和维持损伤动脉壁持续增生的重要因素[2]。因此，控制生长因子的信号级联成为控制再狭窄的一个可能目标。已知生长因子活化信号级联最终导致原癌基因c-fos、c-jun、c-myc 的表达[3]，损伤早期应用反义RNA 阻断局部原癌基因功能可使内膜增生显著降低[4]，说明原癌基因活化后介导的血管平滑肌细胞活化增殖在动脉增生的发生、发展中有重要作用。探明其表达规律，进而控制其活化具有潜在的临床应用前景。本文采用RT-PCR 的方法，在大鼠颈动脉气囊导管损伤动物模型中检测动脉损伤

作者介绍：蒲庆华（1969- ），男，主治医师，博士。
主要研究方向：血管外科。

维普资讯 http://www.cqvip.com

早期c-Fos、c-Jun 的表达情况，同时在动脉损伤早期检测了c-Fos 蛋白的表达。这一检测为了解损伤后 VSMC 活化增殖提供了一个早期的敏感指针。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验动物：健康雄性Wistar 大鼠，体重350~450g，购自第三军医大学创伤外科研究所。主要试剂：Tripure（Roche），TaqDNA 聚合酶，N-MuLV 逆转录酶，dNTP，Oligo（dT），Rnase 抑制剂（上海生工）；主要器材：2F Fogarty 气囊导管（Baxter）；Du-640 紫外分光光度计（美国 Beckman）；PCR 仪（PE 公司），Gel Doc2000 凝胶成像系统（美国 Bio Rad）。

1.2 动物模型的建立

动物禁食12h，2% 戊巴比妥钠40mg/Kg 腹腔麻醉。沿颈前正中线切开皮肤，在颈前三角区暴露左颈总动脉及颈内外动脉。自颈外动脉向近心端插入气囊导管至颈总动脉起始部，球囊充水0.1ml，自远心端慢速回拉至颈内外动脉分叉处，重复共三次，完成后结扎颈外动脉。

1.3 PCR 引物的设计

在Oligo 5.0 引物设计辅助软件上进行。按所公布的人c-Fos、c-Jun 基因序列进行引物设计，扩增片段跨越两个外显子以确保以反转录产物为模板进行的PCR 所得产物忠实反映其相应的RNA 模板量。同时设计一对 β-Actin 引物作为内对照。引物序列如下：

Primer1：5'-CGA CCT TCT ACG ACG ATG CC-3'

Primer2：5'-TCG GTG TAG TGG TGA TGT GC -3'

扩增c-jun cDNA 从372 至629 位核苷酸序列，产物长258bp。

Primer3：5'-CAG AAG GGG CAA AGT AGA GCA G-3'

Primer4：5'-CTC GGG GTA GGT GAA GAC AAA G-3'

扩增c-fos cDNA 从506 至1154 位核苷酸序列，产物长670bp。

Primer5：5'-TTG TAA CCA CCT GGG ACG ATA TGG -3'

Primer6：5'-GAT CTT GAT CTT CAT GGT GCT AG -3'

扩增-Actin cDNA 从426 至1246 位核苷酸序列，产物长 821bp。

引物合成由上海生工生物技术有限公司完成。

1.4 TriPureTM 分离组织细胞总 RNA

按试剂盒方法进行，简要步骤如下：于手术后不同时相点分别取手术侧及健侧颈总动脉血管，置0.5ml TriPure 中，剪碎后充分匀浆并于室温放置5min 使核蛋白复合物完全分离。加入0.1ml 氯仿，剧烈震荡15s。室温放置5min 后4 ℃离心12 000 转/min × 15min，将上层无色水相转移至一个新的无RNase 的离心管中，加入0.25ml 异丙醇沉淀RNA。颠倒混匀数次，室温放置5 ~ 10min 使RNA 沉淀充分形成。4 ℃离心12 000 转/min × 10min。乙醇洗RNA 沉淀一次后溶于 DEPC 水中。

1.5 逆转录PCR[5]

取1~5 μg RNA 模板样品，加入Oligo(dT)$_{18}$ 0.5 μg，70 ℃孵育5 min 后，取出置于冰上。按顺序加入以下反应成分：5 × 缓冲液4 μl，10mM dNTP 2 μl，RNAase 抑制剂 20U，去离子水至20 μl。37 ℃孵育5min。加入40U 逆转录酶，37 ℃孵育60min。70 ℃10min，冰上冷却。产物用于PCR 或 -20 ℃贮存备用。

1.6 目的片段的扩增

取适量RT-PCR 产物，进行DNA 片段的扩增[6]。其中 β-Actin 及 c-Fos PCR 循环条件如下：95 ℃ 1min；58 ℃ 1min；72 ℃ 1min。c-Jun 循环条件为：95 ℃30s，63 ℃ 30s，72 ℃ 30s。各PCR 反应均以热启动方式进入循环，即95 ℃ 2min 后再加入Taq 酶。循环次数根据不同引物所测定的 PCR 指数期确定，PCR 在反应进入平台期之前终止。

1.7 PCR 指数期的确定及产物的定量分析

在PCR 进行过程中，分别在第15、20、25、30、35、40、45 个循环时在DNA 变性的高温段暂停PCR 反应，迅速从反应管中吸出12 μl 产物。将不同循环的PCR 产物取等量进行琼脂糖凝胶电泳，特异性扩增片段经光密度值测定，做出靶序列模板数与循环次数的曲线图，找出该对引物PCR 反应的指数期和平台期。定量PCR 应选择在指数期中进行。

2 结 果

2.1 PCR 反应指数期的确定

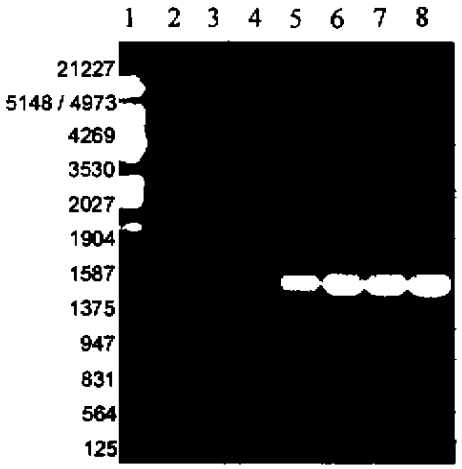


图 1 c-fos 序列 PCR 不同循环数扩增产物电泳分析

1 λ DNA/Hind III +EcoRI（bp）

2~8 分别为 PCR 第 15、20、25、30、35、40、45 循环产物

不同循环数PCR 反应样品行琼脂糖凝胶电泳

维普资讯 http://www.cqvip.com

（图1），经图像分析系统测定各孔特异性扩增产物EB染色光密度值。由于已知当PCR产物聚集达10^{12}数量级时，反应进入平台期，故设第35个循环时产物已达2×10^{12}。代入公式 $Nf=No\ (1+0.7)^n$ 中求出反应的起始模板数，再用同一公式计算出线性时相点的实际模板数[7]。用光密度值对产物分子数进行回归，得到模板数与光密度值的回归方程：$Y=6E+07e^{4.1739X}$（$R^2=0.9889$）。将光密度值代入方程，得到各时相点产物模板数，以之对循环数做图，得到靶序列的累积与循环数的增长曲线如图2。可以看出，在反应的第15至第30循环之间，PCR产物呈指数级扩增，至第30循环后，反应进入平台期，产物不再随循环次数的增加而以指数级累积。因此，该对引物的定量PCR应在第30循环以内进行。以相同方法测定其它引物的PCR反应指数期。

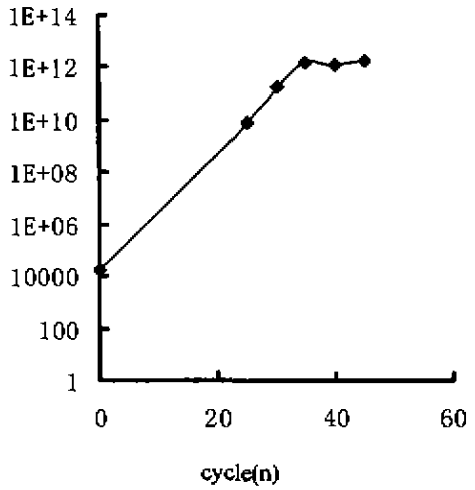


图2 c-fos序列PCR产物的累积与循环的曲线关系

2.2 动脉损伤后原癌基因的表达

在指数期内终止PCR反应，将等量的样品加至凝胶中电泳鉴定术后30min，1h，2h及5h原癌基因c-Fos、c-Jun的表达情况。同时加入用等量模板以β-actin引物进行扩增的PCR产物。不同时相点的电泳结果见图3及图4。可以看到，在动脉损伤后极早期即有原癌基因的大量表达，其中c-Jun表达在损伤后30min达高峰。术后1h、2h仍能检测到明显的表达，术后5h后不能检出。c-Fos的表达规律略有不同。术后30min、1h均可检测到该基因多量的表达，以后随时间的推移表达开始下降，5h时不能检出。

2.3 动脉损伤早期c-Fos蛋白水平的检测

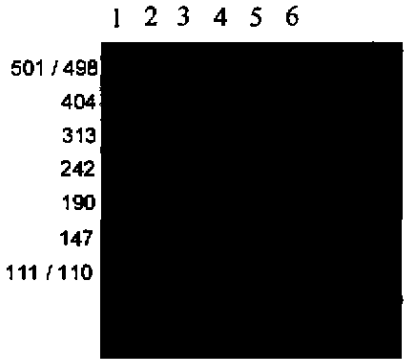


图3 PTA术后动脉壁原癌基因c-Jun表达分析

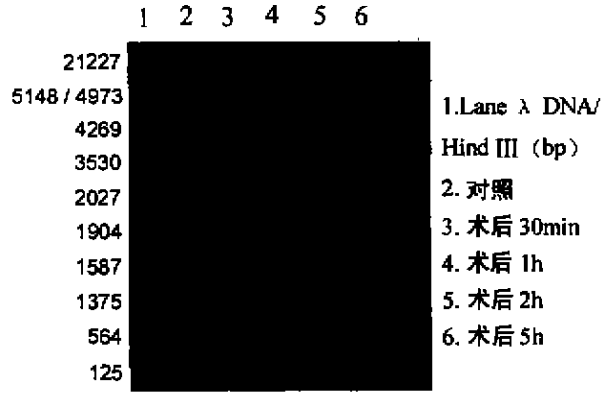


图4 PTA术后动脉壁原癌基因c-fos PCR产物定量分析



图5 动脉损伤后45min，VSMC细胞核c-fos蛋白染色阳性。（SP法 ×400）

为更好地了解原癌基因在动脉损伤后的活化情况，我们检测了c-Fos在组织中的表达情况。结果见图5。正常动脉染色阴性。损伤后45min中膜残留VSMC c-Fos蛋白表达阳性，阳性率86%。

3 讨 论

原癌基因c-Fos/c-Jun表达产物活化后形成的异二聚体AP-1（Activation Protien-1）是胞内重要的转录因子，可参与调控细胞增殖、分化和转化等重要细胞生物学行为[8]。另外，原癌基因c-fos/c-jun还是早期反应基因，它将细胞接受外界刺激的短暂

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞内活化信号转变为细胞增殖和分化的长时间持续信号[9]。本研究发现，术后极早期（30min）即有大量的原癌基因表达，提示此时动脉壁内存在大量的活化因素，刺激VSMC 活化。此表达活化状态可持续至损伤后2h，5h 后不能检出。损伤早期原癌基因c-fos/c-jun 的表达提示、继损伤即刻产生的活化刺激因素诱导VSMC 早期反应基因c-fos/c-jun 表达，VSMC 功能被活化，细胞可进入增殖周期并发生功能分化，由收缩型转变为合成型。此外，原癌基因c-fos/c-jun 转录产物还可介导多种细胞因子尤其是生长因子的表达。这就启动了损伤血管局部VSMC 活化的自分泌、旁分泌机制，损伤动脉局部将有持续的 VSMC 过度增生和活化。

采用RT-PCR 的方法检测目的基因的转录情况，认为较Northern-blot 直接分析样品中RNA 的丰度更敏感，它可检测那些半衰期短、低拷贝的mRNA 样品[10]。但事实上，要想绝对定量是非常困难的。即使将内对照引入系统，由于扩增的模板数 $N=No\ (1+eff)^n$、其中*No*该是样品中的起始模板数，eff 是反应的效率，n 是循环次数。不同引物引发效率上的微小差异也会带来PCR 产物数量上的明显差异。因此，以相对恒定的内源性分子 β -Actin 作为内对照的研究只能提供一个半定量的结果。由于定量PCR 是通过扩增后产物的量来判断其相应RNA 模板的丰度，因此反应必须控制在PCR 的指数期进行，这样方能准确、敏感地反映不同样品间目的分子 RNA 模板数上的差异。

在计算机软件辅助下进行引物设计，首先限制引物长度在20 ~ 24 碱基之间，在程序提供的多对引物之间依据下列原则作最优选择[7]：1、引物 GC 含量在40% ~ 60% 之间，Tm 值不低于54 ℃，两引物之间相差不超过3 ℃。2. 引物链内二级结构能量 ΔG>0kJ/mol、链间双链体能量 ΔG>- 20.934 kJ/mol，其中两引物3' 末端的稳定互补结构尤其应予避免。3. 引物与模板序列之间3' 末端互补能量应在-29.3 ~ -36.68kJ/mol 之间。过高和过低均将影响PCR 的引发效率。实验中，以反转录物为模板进行PCR 时，获得了高产量的特异性扩增条带，说明引物设计上是成功的。

综上，本文对大鼠颈动脉气囊导管损伤后即刻动脉壁内原癌基因c-Fos/c-Jun 的表达情况进行了检测，建立RT-PCR 的方法为检测VSMC 功能活化状态提供了一个敏感、特异的指标。

参 考 文 献

[1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis:a perspective for the 1990s[J]. Nature, 1990; 362: 801-809.

[2] Crowley ST, Ray CJ, Nawaz D,et al. Multiple growth factors are released from mechanically injured vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol.1995; 269(5 Pt 2): 641-1647.

[3] Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation[J]. Biochim Biophys Acta.1991;1072(2-3).

[4] Bennett MR, Anglin S, McEwann JR, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferatrion in vitro and in vivo by c-myc antisense oligodeoxynucleotides[J]. J Clin Invest, 1994;93:820-828.

[5] J. 萨姆布鲁克，等著. 金冬雁，等译. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版，北京：科学出版社，1996；669-688.

[6] 朱 平. PCR 基因扩增实验操作手册[M]. 北京：中国科学技术出版社，1992：245-268.

[7] 迪芬巴赫CW，德维克斯勒GS. PCR 技术实验指南[M]. 北京：科学出版社，1999；23-33.

[8] Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases[J]. J Biol Chem, 1995;270:16483-16486.

[9] Miano JM, Vlasic N, Tota RR. Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury[J]. Arterioscler Thromb, 1993;13:211-219.

[10] Wang AM, Doylw MV, Mark DF. Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1989;86:9717-9712.