

球囊损伤后猪粥样硬化髂动脉壁原癌蛋白表达的时相

易光辉 韦立新^① 盖鲁粤^① 杨和平 吴孟津 雷小勇

(衡阳医学院分子生物学研究中心, 衡阳 421001)

Studies on Time Course of Expression of Proto-oncoproteins in Miniswine Atherosclerotic Iliac Arteries after Balloon Injury

YI Guang-Hui, WEI Li-Xin^①, GAI Lu-Yue^①, YANG He-Ping, WU Meng-Jin and LEI Xiao-Yong
(Research Center of Molecular Biology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001. ^① Department of Pathology, Chinese PAL General Hospital, Beijing 100853, China)

ABSTRACT

Aim To investigate whether or not the time course of the cellular proliferation and apoptotic cell death is related with expression of some oncoproteins, c-Myc, c-Fos, Bcl-2 and P53, in miniswine atherosclerotic iliac arteries following balloon angioplasty.

Methods Atherosclerotic lesions developed by endothelial denudation combined with atherogenic diet. Balloon angioplasty was performed in the right iliac artery of atherosclerotic miniswines. After 1, 3, 8, 14, 30, and 90 days, respectively, the experimental animals were killed and iliac arteries were removed. Immunohistochemical assays were applied by using primary antibodies against P53, c-Myc, c-Fos, and Bcl-2. With 3-3'-diaminobenzidine (DAB) the sections were stained. Cell proliferation was determined with an antibody to the proliferating cell nuclear antigen (PCNA), combined with SMC-specific antibody. The presence of apoptotic cells was determined by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated

dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL).

Results Percentages of PCNA-positive cells in the intima vs media were 22.4% vs 21.6%, 27.8% vs 27.5%, 30.6% vs 21.2% at 1, 3, and 8 days, respectively, after balloon angioplasty. Percentages of TUNEL-positive cells in the intima vs media were 3.0% vs 0.9%, 4.3% vs 1.4%, 16.0% vs 1.9% at 1, 3, and 8 days, respectively. Coefficients of linear correlation of PCNA with c-Myc and c-Fos were 0.6472 and 0.6362 ($P < 0.05$), and TUNEL with Bcl-2 and P53, -0.7538 and 0.8447 ($P < 0.05$), respectively. Angioplastied and control vessels showed different levels of PCNA and TUNEL, and also different expression levels of c-Myc, c-Fos, Bcl-2, and P53 in cells.

Conclusions Arterial injury may result in the increase of cell proliferation and apoptotic cell death in both intima and media. Cell proliferation and apoptosis in the injured vessels associated with the expression of the immediate-early gene (c-myc, c-fos), proto-oncogene (bcl-2) and relative gene (p53).

KEY WORDS Atherosclerosis; Balloon injury; Cell proliferation; Apoptosis; Oncoprotein

摘要 为探讨球囊损伤动脉后血管壁细胞增殖和凋亡与 P53、Bcl-2、c-Myc 和 c-Fos 等癌蛋白表达时相的关系。将贵州小型猪喂高胆固醇饲料合并球囊损伤诱导动脉粥样硬化病变,然后再行右髂动脉球囊血管成形术。术后 1、3、8、14、30 和 90 天,分别用抗增殖细胞核抗原抗体标记检测细胞增殖;用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP-生物素平移末端标记检测细胞凋亡; p53、Bcl-2、c-Myc 和 c-Fos 蛋白表达的检测用特异性鼠单克隆抗体标记和用亲和素-生物素-过氧化物酶结合过氧化物酶底物 3-3' 二氨基联苯胺对组织切片进行免疫组织化学染色。结果发现,内膜和中膜在损伤后第 1、3 和 8 天时增殖细胞核抗原阳性细胞百分率分别为 22.4% 对 21.6%、27.8% 对 27.5%、30.6% 对 21.

本课题得到国家自然科学基金(39670322)和湖南省自然科学基金(湘科计[1995]252#)资助

① 中国人民解放军总医院病理科, 北京 100853

2%;生物素平移末端标记阳性细胞百分率分别为 3.0% 对 0.9%, 4.3% 对 1.4%, 16.0% 对 1.9%。*c-Myc* 和 *c-Fos* 蛋白表达增加,与增殖细胞核抗原的直线相关系数分别为 0.6472 和 0.6362。内膜和中膜的 *Bcl-2* 蛋白表达下调,而 *P53* 蛋白表达上调,与生物素平移末端标记的直线相关系数分别为 -0.7538 和 0.8447。增殖细胞核抗原、生物素平移末端标记、*c-Myc*、*c-Fos*、*Bcl-2* 和 *P53* 阳性细胞百分数在损伤与未损伤血管以及在内膜和中膜的检测结果均有所不同。结论提示,细胞增殖和细胞凋亡均参与损伤后血管壁细胞组成的调节,即刻早期基因和癌相关基因表达产物可能起调节作用。

关键词 动脉粥样硬化; 球囊损伤; 细胞增殖; 细胞凋亡; 癌蛋白

平滑肌细胞增殖是血管对损伤的主要反应之一^[1,2]。并在动脉粥样硬化纤维斑块期和复合病变期细胞增殖并不很旺盛,相反,血管内膜中细胞凋亡往往比较高,并参与血管壁细胞组成的调节^[3~5]。许多基因参与细胞表型的调控,如即刻早期基因 *c-myc* 和 *c-fos*^[6~7]。*c-myc* 的持续表达在 *P53* 蛋白介导下诱导细胞凋亡^[8,9],原癌蛋白 *Bcl-2* 抑制细胞凋亡^[10,11],而肿瘤抑制蛋白 *P53* 诱导细胞凋亡^[12]。*c-myc* 与 *p53* 以及 *c-myc* 与 *bcl-2* 共同对细胞凋亡进行调控^[13,14]。本研究旨在确定喂高脂饲料合并球囊插管内皮剥脱诱导动脉粥样硬化后,再经球囊导管损伤髂动脉后血管内膜和中膜细胞增殖及细胞凋亡的位相和时相变化,并检测原癌蛋白 *Bcl-2*、*c-Myc* 和 *c-Fos* 以及抑癌蛋白 *P53* 表达时相和位相与细胞增殖和细胞凋亡的相关性。

1 材料与方法

1.1 动物模型和标本制备

1.1.1 材料

贵州小型猪为北京农业大学培育,月龄 3.3 ± 0.7 , 体重 10.5 ± 2.5 kg。高胆固醇饲料配方为:基础饲料加 4% 胆固醇、10% 蛋黄粉、8% 猪油、8% 花生油和 1.2% 氯化钠。球囊导管(美国),75% 幻影葡胺、心血管造影机、心电监护器(日本 3A 公司)。

1.1.2 方法 9 只雄性猪喂饲基础饲料 1 周再喂饲高胆固醇饲料 1 个月后,用 15 mg/kg 噻胺酮肌肉注

射麻醉。暴露左颈总动脉,在 X 光透视下插入 7F 球囊插管,使球囊扩张至 6~8 个大气压,维持 30 s,间隔 60 s,在 1~3 个大气压下来回拖拉球囊 5 次,损伤一侧髂动脉内皮;然后进入另一侧髂动脉重复对侧过程。继续喂饲高胆固醇饲料 3 个月。选择 6 只动物用 15 mg/kg 噻胺酮肌肉注射麻醉。暴露右侧颈总动脉,同时使血液肝素化。在 X 光透视下插入 7F 球囊插管至右侧髂外动脉后使球囊扩张至 8~10 个大气压,维持 3 min,间隔 60 s,反复 3 次。分别在术后的第 1、3、8、14、30、90 天用安乐死法处死动物。用 Ringer's 液冲洗髂动脉,再用 10% 中性福尔马林液冲洗 1 h。将髂动脉、主动脉和颈动脉完整取下,置新鲜福尔马林液中浸 3 天,用石蜡包埋。为了保证手术的同一次性,球囊血管成形术由同一个人操作。

血胆固醇浓度用日立 7150 自动化分析仪测定。

1.2 免疫组织化学

1.2.1 试剂 鼠抗人平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)、 α -actin、*Bcl-2*、*P53* 蛋白、*c-Myc* 和 *c-Fos* 抗体购自 DAKO 公司。生物素标记马抗鼠和羊抗兔抗体、亲和素-生物素-过氧化物酶(acidin-biotin-peroxidase, ABP)复合物购自 Vector Laboratories。3,3'-二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)购自 Sigma 公司。

1.2.2 免疫染色 组织切片经二甲苯脱蜡和系列酒精脱水后,室温下用 3% 过氧化氢甲醇液浸 5 min。用小牛血清稀释一抗,稀释浓度按产品说明书。加一抗工作液后于 4℃ 过夜。加生物素化二抗工作液于 37℃ 孵育 60 min。加 ABP 后 37℃ 孵育 30 min。最后加含 0.03% 过氧化氢稀释的 DAB 在室温下染色 10 min,再用苏木素轻度复染。

1.2.3 细胞计数 每个动物左右髂外动脉各取 3~4 个血管段切片,在显微镜下分别计数 8 个高倍视野的细胞数和染色阳性细胞数,计算阳性细胞百分率。Olympus-IMT2 倒置显微镜下拍摄显微照片。

1.3 细胞增殖分析

1.3.1 PCNA 标记实验方法 切片经二甲苯脱蜡和系列乙醇脱水处理后用 3% H_2O_2 浸 5 min,封闭内源性过氧化物酶活性,然后依次加抗 PCNA 抗体(DAKO 公司,1:100 稀释)37℃ 孵育 60 min,加二抗(1:50)37℃ 温育 30 min,加 ABP 室温下共育 30 min,加 DAB 染色后,再用苏木素轻度复染。人扁桃腺组织切片作为阳性对照,正常血清作阴性对照。

1.3.2 细胞计数 在 $\times 40$ 物镜下计数 PCNA 阳性细胞数和细胞总数,计算每张切片 8 个高倍视野平均

PCNA 阳性细胞比率。

1.4 细胞凋亡分析

用末端脱氧核苷酸转移酶 (terminal deoxynucleotidyl transferase, TDT) 介导的 dUTP-生物素平末端标记 (biotin nick end labeling, TUNEL) 方法^[4]。石蜡切片经脱蜡和入水处理后用 20 mg/L 蛋白酶 K 室温下消化 15 min, 用 3% H₂O₂ 浸 5 min, 封闭内源性过氧化物酶活性, 双蒸水冲洗切片后, 依次加入 TDT 缓冲液、TDT (0.3 Mu/L) 和 2 μmol/L 生物素-16-dUTP (购自 Promega), 湿盒内 37℃ 孵育 1 h, 用 PBS 浸洗经末端标记的切片, 再加入 ABP 37℃ 孵育 30 min, PBS 浸洗后用 DAB 染色。经 DNA 酶消化的切片作为阳性对照, 正常血清作阴性对照。被染成棕色的细胞核为凋亡阳性细胞, 计数方法与 PCNA 方法相同。

1.5 统计分析

结果为同一动物左侧或右侧髂外动脉血管段的平均值。相关关系用 Pearson's 乘积矩相关分析。两组比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 细胞增殖和凋亡的位相和时相变化

动脉粥样硬化猪经球囊扩张右侧髂动脉后, 内膜和中膜有明显的细胞增殖反应 (图 1 和图 2A, Figure 1 and 2A), PCNA 阳性细胞百分率于血管损伤后第一天明显增加, 至第 8 天达高峰, 第 14 天迅速回落, 接近对照水平。内膜与中膜细胞增殖的时相基本一致, 14 天前内膜细胞增殖水平与中膜接近, 但 14 天后高于中膜。

血管成形术后, 内膜和中膜细胞凋亡均显著增加, 尤以内膜突出, 并且在高度增生的中央区域细胞凋亡水平高于临近区域 (图 1 和图 2B, Figure 1 and 2B)。内膜中的细胞凋亡集中于近管腔部位。成形术后第 8 天, 内膜细胞凋亡迅速增加, 30 天后开始回落, 至 90 天时已接近对照水平。中膜细胞凋亡的时相与内膜相似, 略早于内膜。观察的 90 天中, 右侧髂动脉内膜和中膜细胞凋亡水平均高于左侧对照。

2.2 原癌蛋白 Bcl-2、c-Myc 和 c-Fos 以及抑癌蛋白 P53 表达的位相和时相

内膜和中膜的原癌蛋白表达水平高于对侧

髂动脉。c-Myc 和 c-Fos 在损伤后第 1 天有一个高峰, 第 8 天出现一个小峰。P53 在内膜有持续高表达。Bcl-2 至第 8 天表达开始下降。P53 在内膜的表达水平高于中膜, 而 Bcl-2 的表达水平则是中膜高于内膜。c-Myc 和 c-Fos 在内膜和中膜的表达水平接近 (图 1, 图 2C, F)。

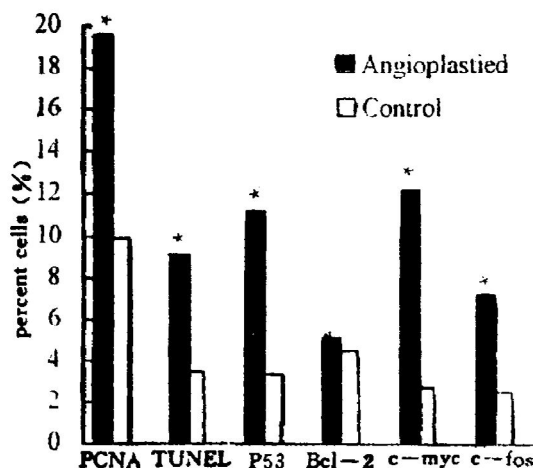


Figure 1. Bar graph showing comparison of percentages of immunohistochemical stained cells in the intima of angioplastied vessels with those of control. b; $P < 0.05$, compared with control.

2.3 Bcl-2、c-Myc、c-Fos 和 P53 表达时相与细胞增殖和凋亡的关系

癌蛋白的持续表达与 PCNA 和 TUNEL 的时相变化呈相关性 (图 2 和附表, Figure 2 and Table)。内膜和中膜 c-Myc 和 c-Fos 的表达时相与细胞增殖呈正相关, P53 蛋白表达时相与细胞凋亡呈正相关, Bcl-2 表达时相与细胞凋亡呈负相关。

3 讨论

球囊损伤血管壁后细胞增殖和凋亡水平均增加, 且呈一定的时相变化, 细胞增殖增加早于细胞凋亡。多种基因参与调节细胞增殖和细胞凋亡^[9-14]。血管损伤后 1 h 内即刻早期基因 c-myc 和 c-fos 表达增加^[15-17], 其表达蛋白 c-Myc 和 c-Fos 促进细胞增殖。但 c-Myc 和 c-Fos 持续表达则可能诱导细胞凋亡。c-Myc 与

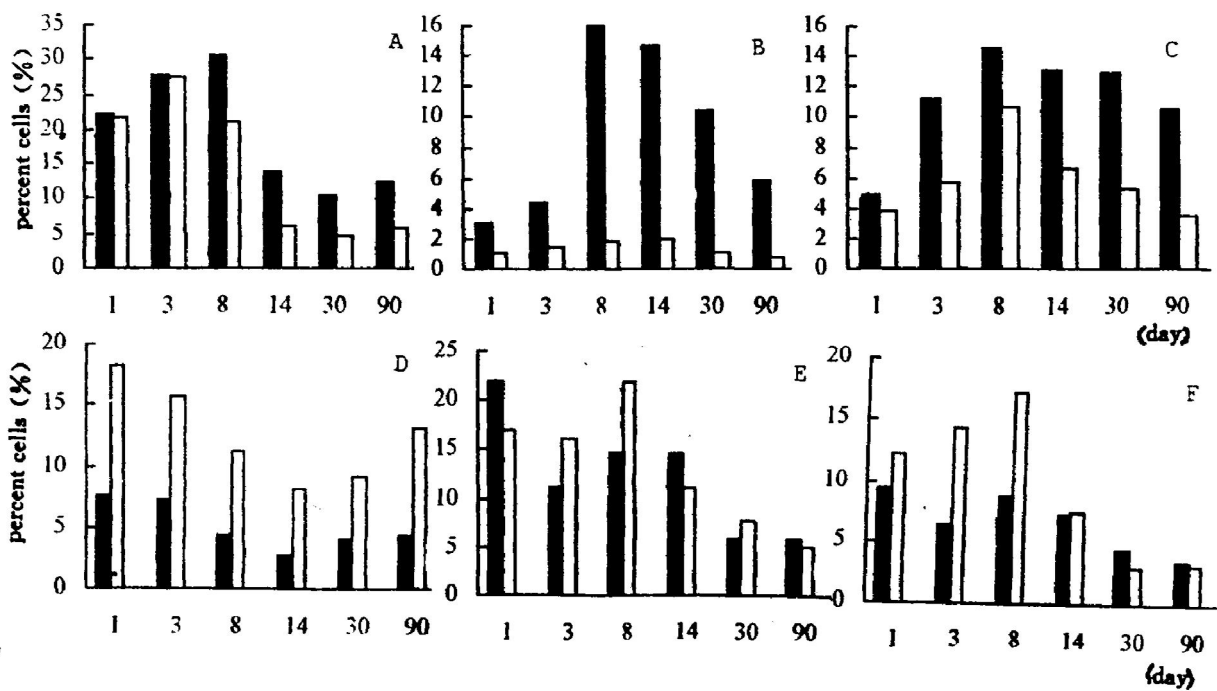


Figure 2. Bar graphs show time course of A proliferation represented by PCNA; B, apoptosis represented by TUNEL, and expression of oncoproteins; C, P53; D, Bcl-2 和 E, c-Myc; and F, c-Fos. □: Media, ■: Intima.

Table. Relation of Cellular Porliferation and Apoptosis with Expression of P53, Bcl-2, c-myc, and c-Fos in the Intima and Media of Atherosclerotic Iliac Arteries after Unilateral Balloon Angioplasty.

	P53	Bcl-2	c-Myc	c-Fos
Intima	(6)	(6)	(6)	(6)
PCNA	-0.0375	0.5595	0.5249	0.6952
TUNEL	0.1828 ^b	-0.8060	-0.0534	0.1729
Media	(6)	(6)	(6)	(6)
PCNA	0.2610	0.6684	0.8393 ^b	0.8975 ^b
TUNEL	0.8337 ^b	-0.5356	0.1453	0.5191
total	(12)	(12)	(12)	(12)
PCNA	0.3109	0.1204	0.6472 ^b	0.6362 ^b
TUNEL	0.8447 ^b	-0.7538 ^b	-0.1403	-0.1698

b: $P<0.05$. Values are presented as coefficients of linear correlation between two variables. The numbers in parentheses indicate the size of sample.

c-Fos 间的正相关关系提示 c-Myc 和 c-Fos 在血管壁细胞的增殖和凋亡中具有一定的调节作用。c-Myc 诱导细胞凋亡是由 P53 介导的^[8,12],

P53 自第 3 天开始持续高表达,比 TUNEL 标记阳性细胞百分数变化时相早几天,这种时相关系可以解释为 P53 诱导细胞凋亡。Bcl-2 与 TUNEL 间的负相关关系,以及 Bcl-2 在中膜表达水平高于内膜,而 TUNEL 阳性细胞百分数则是内膜高于中膜,说明 Bcl-2 可能与抑制细胞凋亡有关^[11,13]。细胞增殖与细胞凋亡的时相,提示两者有共同的调节通路。c-Myc 可能为细胞增殖和细胞凋亡的共同调节因子。尽管人们对细胞凋亡的机制还不十分了解,但已明确细胞凋亡有利于组织损伤修复中减弱因巨噬细胞吞噬死亡细胞而释放炎性介质,从而减弱炎症反应。凋亡是细胞的自我消化,以核固缩、核碎片形成和细胞收缩等为形态学表现。内膜损伤后,c-Fos 和 c-Myc 表达诱导细胞增殖,而细胞的过度增殖则启动细胞凋亡机制。业已明确,癌蛋白 Bcl-2 抑制细胞凋亡的机制是抗氧化作用^[10]。在高脂血症情况下,脂质过氧化物水平升高,不利于 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制,因而,粥样硬化动脉壁细胞凋亡水平相对较高。研究

结果表明,动脉壁损伤后,细胞增殖和细胞凋亡的变化与多种即刻早期基因和相关基因的表达上调有关。抑癌蛋白 P53 表达增加可能与其介导 c-Myc 诱导的细胞凋亡有关,而癌蛋白 Bcl-2 则与其抑制细胞凋亡有关。血管损伤后早期, c-Myc 和 c-Fos 的高表达可能与其诱导细胞增殖有关。

参考文献

- Pickering JR, Weir L, Rosenfield K, et al. Smooth muscle cell out growth from human atherosclerotic plaque; implication for the assessment of lesion biology. *J Am Coll Cardiol*, 1992, **20**: 1 430~439.
- Pickering JG, Weir L, Jekanowski J, et al. Proliferative activity in peripheral and coronary atherosclerotic plaque among patients undergoing percutaneous revascularization. *J Clin Invest*, 1993, **91**: 1 469~480.
- Bochaton-Piallat M-L, Gabbiani F, Redard M, et al. Apoptosis participates in cellular regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol*, 1995, **146**: 1 059~64.
- Han DK, Handenschild CC, Hong MK, et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol*, 1995, **147**: 267~277.
- Isner JM, Kearney M, Bortman S, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*, 1995, **91**: 2 703~711.
- Miano JM, Tota RR, Vlasic N, et al. Early proto-oncogene expression in rat aortic smooth muscle cells following endothelial removal. *Am J Pathol*, 1990, **137**: 761~765.
- Miano JM, Vlasic N, Tota RR, et al. Smooth muscle immediate-early gene and growth factor activation follows 'vascular injury; a putative in vivo mechanism for autocrine growth. *Arterioscler Thromb*, 1993, **13**: 211~219.
- Hermeking H, Eick D. Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science*, 1994, **265**: 2 091~93.
- Bennett MR, Evan GI, Newby AC. Deregulated c-myc oncogene expression blocks vascular smooth muscle cell inhibition mediated by heparin, interferon- γ , mitogen depletion and cyclic nucleotide analogues and induce apoptotic cell death. *Circ Res*, 1994, **74**: 526~536.
- Hockenbery D, Oltvai ZN, Yin XM, et al. Bcl-2 function in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 1993, **75**: 241~251.
- Bissonnette RP, Echeverri F, Mabbioni A, et al. Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* 1992, **359**: 552~554.
- Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and-independent pathways. *Circ Res*, 1995, **77**: 266~273.
- Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. Cooperative interaction between c-Myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*, 1992, **359**: 554~555.
- Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 2 266~274.
- 杨和平, 张敏, 刘革修, 等. 动脉粥样硬化斑块旁中膜 c-cis、c-myc 基因检测和细胞表型的比较研究. *中华病理学杂志*, 1992, **21**: 349~351.
- 杨和平, 刘革修, 张新华, 等. 家兔髂动脉腔内血管成形术后 c-fos 基因表达的研究. *北京医科大学学报*, 1994, **26** (增刊): 262~363.
- 杨和平, 杨永宗, 唐朝枢, 等. 动脉硬化平滑肌细胞增殖中即刻早期基因与 c-cis 基因表达的调控. *新乡医学院学报*, 1994, **22** (增刊): 89~129.

(1996-11-01 收到, 1997-03-02 修回)