

C-sis 反义寡脱氧核苷酸抑制兔主动脉平滑肌细胞增殖的时效关系

唐其东 林曙光 林秋雄^①

(广东省心血管病研究所, 广州, 510080)

Time-Effective Relation of Proliferation of Aortic Smooth Muscle Cells after Local Delivery of C-sis Proto-oncogene Antisense Oligodeoxynucleotides in Injured Aorta of Rabbits

TANG Qi-Dong, LIN Shu-Guang and LIN Qiu-Xiong^①

(Guangdong Provincial Cardiovascular Institute; ^①Department of Pathology, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT

Aim To study the inhibitory effect of locally delivered C-sis proto-oncogene antisense oligodeoxynucleotide (ODN) on aortic smooth muscle cells (ASMC) proliferation and neointimal thickening following balloon angioplasty in the rabbit aorta at differential time.

Methods 60 male New Zealand white rabbits were treated with local delivery of C-sis antisense ODN, C-sis sense ODN, or 0.9% salt solution via balloon catheter following aorta balloon injury, ASMC proliferation and area in neointima was assessed with immunohistochemistry and image analyzer at 3, 7, 14, 28 days after local delivery.

Results ASMC proliferation in neointima were reduced 69.8%, 59%, 51.9%, 47.8% in C-sis antisense ODN-treated group compared to C-sis sense ODN-treated group at 3, 7, 14, 28 d following aortic injury respectively; and the inhibitory rate of neointimal hyperplasia was 48.9%, 77.8%, 72.6%, 70.8% at the

same time respectively.

Conclusion The locally delivered C-sis antisense ODN inhibited ASMC proliferation and neointimal thickening following rabbit aortic injury, the inhibitory effect was the highest at 3 d and 7 d, then reduced slowly and caused by antisense mechanism.

KEY WORDS C-sis proto-oncogene; Antisense oligodeoxynucleotide; Local delivery; Smooth muscle cell; Neointima; Proliferation.

摘要 为观察局部处理 C-sis 反义寡脱氧核苷酸对平滑肌细胞增殖及新生内膜肥厚的抑制作用, 球囊导管损伤 60 只新西兰白兔胸主动脉后, 经导管局部处理每只兔 1 mg (2 mL) C-sis 反义或正义寡脱氧核苷酸或 2 mL 生理盐水, 于损伤后第 3、7、14 天和第 28 天, 用免疫组织化学方法结合图象分析, 评价损伤动脉内膜平滑肌细胞增殖及新生内膜改变。结果发现, C-sis 反义寡脱氧核苷酸明显抑制内膜平滑肌细胞增殖, 最高抑制作用出现于损伤后第 3 天, 抑制百分率达 69.8%, 第 7、14 天和第 28 天的抑制率依次降低, 分别为 59%、51.9% 和 47.8%; 而新生内膜面积的抑制百分率分别是 48.9%、77.8%、72.6% 和 70.8%, 与生理盐水处理组相比, 平滑肌细胞数及新生内膜面积均有明显降低。研究结果表明, 局部处理 C-sis 反义寡脱氧核苷酸, 通过反义途径, 可明显抑制球囊损伤主动脉内膜平滑肌细胞增殖, 其抑制作用随时间而降低, 同时, 对新生内膜面积肥厚的最大抑制出现于第 7 天, 随后降低, 提示局部处理 C-sis 反义寡脱氧核苷酸, 有可能降低再狭窄的发生。

关键词 C-sis 原癌基因; 反义寡脱氧核苷酸; 局部处理; 平滑肌细胞; 新生内膜; 增殖

本研究获国家卫生部科研基金资助(批准号 94-1-346)

① 广东省人民医院病理科

粥样硬化的冠状动脉在经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary

angioplasty (PTCA) 后发生的再狭窄, 是影响 PTCA 远期疗效的最主要临床问题^[1]。而动脉平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 的迁移和增殖被认为是 PTCA 后再狭窄发生的关键因素^[2]。对于 PTCA 后再狭窄的高发生率目前, 仍无有效的预防措施。2 项研究中发现, 在动脉损伤引起 SMC 增殖过程中, C-sis 表达明显增高^[3], 同时, C-sis 的表达产物——血小板源生长因子 B (platelet-derived growth factor-B, PDGF-B) 是 SMC 迁移和增殖的强有力的促进因子^[4], 是新生内膜增厚的关键因素^[5]。以前的报道表明, C-sis 反义寡脱氧核苷酸 (antisense oligodeoxynucleotide, AODN) 可显著抑制培养的 SMC 增殖^[5] 及 C-sis 表达^[6], 但对 PTCA 后再狭窄过程中的 SMC 增殖是否具有同样的抑制作用, 是其能否预防 PTCA 后再狭窄的关键所在。我们通过主动脉损伤后局部处理, 评价原癌基因 C-sis AODN 抑制在体 SMC 增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 原癌基因 C-sis 反义寡脱氧核苷酸合成

以人原癌基因 C-sis 翻译起始区 18 个碱基序列为模板, 用 DNA 合成仪 (Pharmacia), 合成 C-sis 原癌基因 AODN、正义寡脱氧核苷酸 (sense-oligodeoxynucleotide, SODN), 在合成过程中, 以硫取代碘进行氧化, 对每个碱基均进行硫化修饰, 可明显提高寡脱氧核苷酸对血清核酸酶降解的抵抗力, 提高 AODN 和 SODN 的稳定性^[7]。反义寡脱氧核苷酸 (AODN) 序列如下: 3'TACTTAGCGACGACCCGC5', SODN 序列: 3'GCGGGTCGTCGCTAAGTA5'。寡脱氧核苷酸溶解于生理盐水中, 用紫外分光光度仪进行浓度测定。

1.2 动物胸主动脉球囊损伤及反义寡脱氧核苷酸局部处理

新西兰白兔 60 只, 雄性, 2.5 ± 0.1 kg, 购自中山大学医科大学实验动物中心。动物随机分为 AODN、SODN 及空白生理盐水处理三组, 每组 20 只动物; 每一组每只动物的处理量分别是 AODN 1 mg/2 mL, SODN 1 mg/2 mL 及生理盐水 2 mL。耳缘静脉注射氯胺酮 (50 mg/kg 体重) 进行麻醉, 导丝引导下, 从股浅动脉插入 3F 球囊扩张管 (Cordis, USA) 20 cm 至胸主动脉, 抽出

导丝, 如压力 10^3 kPa, 扩张 30 s, 排空球囊内压力 (30 s) 再加压 10^3 kPa, 如此连续扩张三次, 完成损伤; 然后排空球囊内压力, 球囊后退 3 cm 再加压至 0.5×10^3 kPa, 从导管侧孔分别给予三种处理: 维持 0.5×10^3 kPa 以阻断血流 8 min, 以延长药物局部作用时间, 提高药物的局部浓度; 排空大气压, 退出球囊扩张管, 结扎股浅动脉, 缝合切口, 消毒包扎。于术后第 3 天、第 7 天和第 28 天处死动物, 每个处理组每次处死动物 5 只。游离全长胸、腹主动脉、髂总动脉至股动脉, 从垂悬挂扎的股浅动脉处, 量至近心端 20 cm 处, 向远心端切取胸主动脉 2 cm (相当于球囊长度), 所取标本每间隔 2.5 mm 取材 2.5 mm 进行石蜡包埋, 即每动物切取 4 个石蜡包埋块; 每石蜡包埋组织块进行连续切片, 切片厚 4 μ m, 每间隔 5 张切片 (20 μ m) 选取 1 张切片, 每组织块取切片 3 张, 每兔共取切片 12 张, 进行 SMC α -actin 免疫组织化学染色。

1.3 损伤的组织中平滑肌细胞的免疫组织化学分析

动脉平滑肌细胞的单克隆抗体为 α -actin, 免疫组织化学染色用 S-P 试剂盒 (迈新公司), 按照公司提供方法修改进行, 简要如下: 石蜡切片脱蜡和水化后, 用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS) (pH 7.4) 冲洗三次, 每次 3~5 min (3 \times 5 min); 每张切片加 1 滴 (50 μ L) 过氧化氢酶液 (A 液), 以阻断内源性过氧化物酶的活性, 室温下孵育 10 min, PBS 冲洗三次; 每张切片加 1 滴 (50 μ L) 鼠抗兔动物血清 (B 液), 室温 (15~28 $^{\circ}$ C) 下孵育 10 min, 吸去多余的液体; 每张切片加 1 滴 (50 μ L) 的第一抗体, 室温下孵育 60 min, PBS 冲洗三次; 每张切片加 1 滴 (50 μ L) 生物素标记的第二抗体 (C 液), 室温下孵育 40 min, PBS 冲洗三次; 每张切片加 1 滴 (50 μ L) 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液 (D 液), 室温下孵育 10 min, PBS 冲洗三次; 每张切片加 2 滴 (100 μ L) 新鲜配制的 DAB 溶液, 显微镜下观察 3~10 min, 自来水冲洗, 苏木素复染, 中性胶封固, 进行新生内膜平滑肌细胞计数。

1.4 损伤动脉新生内膜平滑肌细胞计数及面积分析

应用 CMIAS 图象分析仪 (北京航空航天大学) 对新生内膜 SMC 数及横切面积进行分析, 以内弹性膜与血管腔内膜面之间的组织为新生内膜, 以细胞质染有棕褐色 α -actin 及细胞核的细胞作为 SMC 计数的标准, 每切片计数新生内膜横切面内的 SMC, 同时用图象分析仪计算每张切片新生内膜的横切面积, 并按下式计算

C-sis 原癌基因 AODN 对 SMC 增殖及新生内膜肥厚的抑制百分率。

$$\text{抑制百分率} = \left(1 - \frac{C-sisAODN \text{ 处理组 SMC 数或新生内膜面积}}{\text{生理盐水对照组 SMC 数或新生内膜面积}}\right) \times 100\%$$

1.5 统计学定量分析

所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 ANOVA 的 Q 检验进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 作为有显著性差异的标准。

2 结果

2.1 球囊损伤后不同时间胸主动脉新生内膜平滑肌细胞变化

C-sis 原癌基因 AODN、SODN 和生理盐水局部处理后胸主动脉球囊损伤切片经免疫组织

化学染色后,见新生内膜及中膜有大量 α -actin 阳性 SMC,而外膜未见 α -actin 阳性细胞(附图, Figure)。新生内膜 SMC 数于损伤后 3 天增殖,14 天达最高峰,28 天后开始降低,*C-sis* 原癌基因 AODN 局部处理组,各时间点的 SMC 数较 *C-sis* 原癌基因 SODN、生理盐水局部处理组明显降低,而 *C-sis* 原癌基因 SODN、生理盐水局部处理组间无明显差别(表 1, Table 1)。*C-sis* 癌因 AODN 于主动脉损伤后局部处理,在第 3 天、7 天、14 天和第 28 天对 SMC 增殖的抑制百分率分别为:69.8%、59%、51.9%和 47.8%,获得了良好的抑制效果。

Table 1. The numbers of SMC in neointima following aortic balloon injury at differential time ($\bar{x} \pm s$, $n=5$).

Groups	3rd d	7th d	14th d	28th d
Salt-solution	295 ± 105	588 ± 303	3084 ± 832	2405 ± 467
SODN	265 ± 88 ^a	615 ± 230 ^a	3197 ± 855 ^a	2597 ± 716 ^a
AODN	89 ± 25 ^c	241 ± 48 ^b	1484 ± 398 ^a	1255 ± 489 ^a

a, $P > 0.05$. b, $P < 0.05$. c, $P < 0.01$. compared with 0.9% salt-solution-treated group.

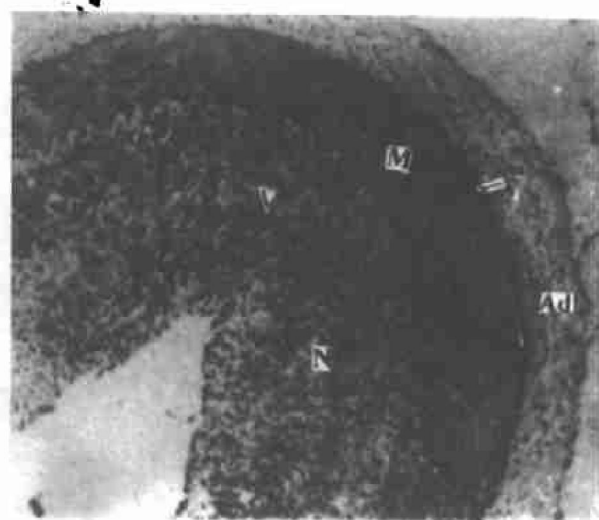


Figure. A large number of cells were positively stained for α -actin immunohistochemistry in neointima and media, there wasn't positive cell in adventitia. \uparrow , indicate intimal elastic lamina. \leftarrow , indicate external elastic lamina. ∇ , indicate positive cell. N, neointima. M, media. Ad, adventitia.

2.2 球囊损伤后不同时间胸主动脉新生内膜面积

胸主动脉球囊损伤后,损伤局部经 *C-sis* 原癌基因 AODN、SODN 和生理盐水处理,在第 3 天、7 天、14 天和第 28 天后,新生内膜面积见表 2(Table 2)。从表 2 可见,新生内膜面积在各时间点的抑制百分率分别为 48.9%、77.8%、72.6%和 70.8%;各时间点的 *C-sis* 原癌基因 AODN 处理组与相应生理盐水对照组比较,均有极显著差异($P < 0.01$);而各时间点 *C-sis* 原癌基因 SODN 处理组与相应生理盐水对照组比较,没有发现差异($P > 0.05$)。

3 讨论

C-sis 原癌基因表达的 血小板源生长因子-B 是血管损伤后平滑肌细胞迁移和增殖的强烈促进因子,是新生内膜肥厚的关键所在^[4]。因而,通过干预 *C-sis* 原癌基因表达,对于预防经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄,是一种从分子水平进行的全新探讨。近年来,反义寡脱氧核苷酸基因治疗技术得到大力发展,其在经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄中的预防作用,也

Table 2. The neointimal area following aortic balloon angioplasty at differential time ($\bar{x} \pm s$, $n=5$).

Groups	3rd d	7th d	14th d	28th d
Salt solution	0.168±0.056	0.167±0.032	0.299±0.046	0.417±0.088
SODN	0.182±0.035 ^a	0.192±0.040 ^a	0.269±0.053 ^a	0.385±0.121 ^a
AODN	0.059±0.018 ^c	0.037±0.012 ^c	0.082±0.025 ^c	0.122±0.042 ^c

a, $P>0.05$, c, $P<0.01$, compared with salt solution-treated group.

受到广泛重视。在我们的研究中,损伤主动脉局部处理 *C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸,可以明显抑制新生内膜平滑肌细胞的增殖,减少新生内膜面积。在研究中,采用 *C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸局部处理以提高局部浓度的特殊方法,获得了抑制 47.9%~69.7% 的新生内膜平滑肌细胞增殖的效果。传统的全身给药途径,为了获得局部较高的浓度,多通过加大处理剂量或增加处理次数,但 *C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸合成费用昂贵,限制了其体内应用;而目前的局部处理方法,为其体内应用,防治经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄提供一种新的给药途径。球囊导管损伤主动脉后,将导管后退 3 cm,加压至 0.5×10^3 kPa,经导管注入 *C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸。这样做,首先因扩张球囊长度为 2 cm,导管向远心端后退 3 cm,可以完全暴露损伤动脉壁,将 *C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸注入后,能够更好地与受损血管壁接触;因为,正常血管对反义寡脱氧核苷酸很少吸收,只有球囊损伤的动脉壁,可以显著吸收反义寡脱氧核苷酸并大量进入中膜平滑肌细胞,然后缓慢释放而游离出来,且损伤程度与反义寡脱氧核苷酸吸收量具有正相关^[9]。其次,阻断血流,能够防止注射后 *C-sis* 原癌基因 AODN 很快随血流扩散,提高反义寡脱氧核苷酸损伤局部存留时间,同时也提高损伤血管壁内浓度,从而,以较小剂量发挥出更好的抑制效果。

反义寡脱氧核苷酸抑制血管平滑肌细胞增殖,选用的靶基因多为 *c-myc*、*c-myb*、*cdc2* 和增殖细胞核抗原等,这些基因属于细胞周期调节基因,所表达的蛋白为核内蛋白^[9],这类基因在其它细胞的正常细胞周期中广泛表达,而不只

是在增殖的平滑肌细胞,但针对于表达生长因子的原癌基因反义寡脱氧核苷酸抑制平滑肌细胞增殖的基因治疗,目前国内外仍然未见报道^[9],我们的研究属第一次。*C-sis* 原癌基因在损伤动脉平滑肌细胞中表达增高 6 倍^[3],注射血小板源生长因子-B 可增加血管平滑肌细胞迁移和增殖 2~20 倍^[9];Robinson 等^[7]研究指出,硫化修饰的反义寡脱氧核苷酸在体内不易被降解,7 天后,还可检测出反义寡脱氧核苷酸;而兔动脉损伤后,平滑肌细胞增殖高峰出现于损伤后 3~7 天^[10]。在这个研究中,体内局部处理 *C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸后,3 天中可抑制 69.8% 的平滑肌细胞增殖,随后逐渐降低至 28 天的 47.8%。可能的原因有:首先,随着时间的增长,*C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸降解增多,浓度降低,抑制作用减弱^[5],平滑肌细胞迁移和增殖增加;其次,动脉损伤后,*C-sis* 原癌基因表达会随着时间延续而降低,血小板源生长因子-B 减少^[3],即实际上促进平滑肌细胞增殖的因素减弱。虽然,*C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸抑制平滑肌细胞增殖机理仍未完全明了,我们以前的研究显示,*C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸通过下调 *C-sis* 原癌基因表达而抑制培养平滑肌细胞增殖^[6,8]。使用研究中的局部给药方法,具有快速提高局部 *C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸浓度的优点,从而发挥良好的抑制效率,但需要阻断血流,是其最大的不足,研究一种既能让血流通过,又不会引起局部处理的 *C-sis* 原癌基因反义寡脱氧核苷酸被血流稀释的导管是必要的。

参考文献

- 1 Popma JJ, Califf RM, Topol EJ. Clinical trails of restenosis after coronary angioplasty. *Circulation*.

1991, 84: 1427~1436

2 Dartsch PC, Bauriedel G, Schinko I, et al. Cell constitution and characteristics of human atherosclerotic plaques selectively removed by percutaneous atherectomy. *Atherosclerosis*, 1989, 80: 49~53.

3 Lindner V, Guachelli CM, Schwartz SM, et al. A subpopulation of smooth muscle cells in injured rat arteries expresses platelet-derived growth factor-B chain mRNA. *Circ Res*, 1995, 76 (6): 951~954.

4 唐其东, 林曙光, 孙家珍. C-sis, C-myc 癌基因反义寡核苷酸抑制动脉平滑肌细胞增殖. *中国动脉硬化杂志* 1996, 4(3): 139~142.

5 唐其东, 林曙光. C-sis 反义寡核苷酸抑制血管平滑肌细胞增殖, 下调 C-sis 表达. *中国药理学报*, 1998 (论丛集) 1183

7 Robinson KA, Chronos NAF, Schieffer E, et al. Pharmacokinetics and tissue localization of antisense oligonucleotides in balloon-inflated pig coronary arteries after local delivery with an iontophoretic balloon catheter. *Catheter Cardiovasc Diagn*, 1997, 41 (3): 354~359.

8 Farrell CE, Bready JV, Kaufman SA, et al. The uptake and distribution of phosphorothioate oligonucleotides into vascular smooth muscle cells in vivo in rabbit arteries. *Arterioscler Thromb*, 1995, 15 (9): 175~183.

9 Sirois MG, Simons M, Edelman ER. Antisense oligonucleotide inhibition of PDGF- β receptor subunit expression directs suppression of intimal thickening. *Circulation*, 1997, 95: 869~876.

10 Hanka H, Strohschneider W, Oberhoff M. 动脉粥样硬化过程中平滑肌细胞增殖和分化在血管壁和动脉中. *Circ Res*, 1990, 67: 651~659.

(1998-06-19 收到, 1998-08-19 修回. 编辑: 胡必利)

关于征集封面设计样稿的启示

为适应中国科技期刊发展的需要,将我国唯一的防治动脉硬化性疾病的专刊——《中国动脉硬化杂志》(以下简称本刊)推向世界,顺利进入二十一世纪,编辑部决定在1999年变更本刊开本,将原来的16开本改为国际通用的A4开本(即大16开本)。开本尺寸为297mm×210mm。开本变更后,原有的封面已不适应,需要重新设计。为使本刊封面更能体现本刊特色、反映时代要求,吸引读者,编辑部决定在编委、作者和广大读者中公开征集封面设计样稿。

1 封面设计样稿要求

- 1.1 刊名字体不变,此系前卫生部部长陈敏章教授所题
- 1.2 封面内容不变,此系国家标准所规定。
- 1.3 除上述二项外,字体和序号及排列、封面颜色等均可变更。
- 1.4 整个封面要体现出本刊既是学术性期刊,又是专业性期刊的特色。

2 评价及奖励办法

- 2.1 凡设计样稿中尺寸符合、内容齐全,并已着色的为合格样稿,对于每件合格样稿,编辑部将赠送本刊1999年全年杂志一份。
- 2.2 经有关专家评选录用的样稿,除赠送1999年杂志外,再一次性奖励酬金300元。
- 3 封面设计样稿请寄湖南省衡阳市衡阳医学院中国动脉硬化杂志编辑部。
- 4 征稿截止日期为1999年1月31日。

编辑部