

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0131-04

• 实验研究 •

单核细胞趋化蛋白 1 反义寡核苷酸抑制大鼠腹主动脉瘤的形成

杨 军¹, 胡新华², 张 强²

(中国医科大学附属第一医院 1. 骨科, 2. 血管外科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 外科学; 单核细胞趋化蛋白 1 能抑制腹主动脉瘤; 基因转染; 反义寡核苷酸; 巨噬细胞; 动物模型

[摘要] 为了观察单核细胞趋化蛋白-1 对腹主动脉瘤形成的影响, 建立大鼠腹主动脉瘤模型, 局部转染单核细胞趋化蛋白 1 基因的反义寡核苷酸。结果表明: 动脉灌注 3 d, 苏木素—伊红染色即可见明显的炎性细胞浸润, 逆转录聚合酶链反应提示单核细胞趋化蛋白 1 的 mRNA 表达在灌注 14 d 达高峰, 蛋白印迹及免疫组织化学染色提示蛋白产物均在 14 d 达到高峰, 并且与动脉瘤的形成呈平行关系。反义寡核苷酸可以抑制单核细胞趋化蛋白 1 基因的 mRNA 及蛋白产物表达 ($P < 0.01$), 延缓腹主动脉瘤形成, 抑制率为 92%~125%, 并存在一定的量效关系。本研究提示单核细胞趋化蛋白 1 参与腹主动脉瘤的形成, 反义技术可以减少单核巨噬细胞浸润并抑制腹主动脉瘤的形成和发展。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

The Effect of Antisense Oligodeoxynucleotides of Monocyte Chemoattractant Protein-1 on the Formation of Abdominal Aortic Aneurysm in Rats

YANG Jun¹, HU XirHua², and ZHANG Qiang²

(1. Department of Orthopaedics, 2. Department of Vascular Surgery, First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Abdominal Aortic Aneurysm; Gene Transfer, Monocyte Chemoattractant Protein-1; Antisense Oligodeoxynucleotides; Macrophage; Animal Model

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 on the formation of abdominal aorta aneurysm (AAA). **Methods** AAA model was established by perfusion of pancreas elasticity proteinase in 66 rats, which were divided into control team, Oligodeoxynucleotides (ODNs) team and Lipofectin team. ODNs teams were treated by local application of ODNs, antisense ODNs or scramble ODNs in dosage of 50 μ g or 100 μ g. Lipofectin and pluronic gel were used. The specimen were harvested on 14 d after operation. **Results** Prominently infiltration of inflammatory cell was evident in aortic tissue 3 d after operation. MCP-1 mRNA was detected by RT-PCR which increased and reached the peak on 14 d after operation. The expression of MCP-1 and CD68 were measured by immunohistochemistry and Western blotting, and reached the peak on 14 d after surgery. Antisense ODNs could inhibit the expression of MCP-1 mRNA prominently. Antisense ODNs could prevent AAA formation and had a dosage dependent relationship. **Conclusions** MCP-1 took part in the formation of AAA. Inhibiting the expression of MCP-1 mRNA by antisense technology could reduce the infiltration of macrophage and AAA formation.

既往的研究结果证实, 炎性细胞参与腹主动脉瘤(abdominal aorta aneurysm, AAA)的形成过程并起重要作用^[1]。文献[2]报道, AAA 中单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 表达明显增多。MCP-1 表达增多可以促进单核巨噬细胞

浸润。为此, 我们建立大鼠 AAA 模型, 观察局部缓释反义寡脱氧核苷酸(oligodeoxynucleotides, ODN)封闭 MCP-1 基因表达对动脉瘤形成过程的影响, 探讨 AAA 的发病机制及防治措施。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

Wistar 大鼠 66 只(中国医科大学实验动物部提供), 雌雄不拘, 体重 250~300 g, 随机分为三大组 11 小组: ①对照组 24 只, 分为术后 3 d、7 d、14 d 和 28 d 四小组; ②脂质体组 6 只, 作为阴性对照; ③寡核苷酸组(ODN) 36 只, 分为正义、反义及错配组, 然后再

[收稿日期] 2003-08-21 [修回日期] 2004-02-15

[基金项目] 国家自然科学基金(30371401)资助

[作者简介] 杨军, 讲师, 血管外科学博士, 现从事血管外科方面的研究, 联系电话为 024-23256666-6231, E-mail 为 yangjun35@hotmail.com。胡新华, 讲师, 血管外科学博士, 主要从事血管外科方面的研究, 联系电话为 024-23256666-6239, E-mail 为 huxinhua@cmu@hotmail.com, 为本文通讯作者。张强, 教授, 博士研究生导师, 血管外科主任, 中华医学会外科学会血管外科学组委员, 主要从事血管外科的基础和临床研究, 发表论文 90 余篇。

分别分为 50 μg 和 200 μg 共 6 小组;第 ④和第 ④大组均在术后 14 d 取材。

1.2 建立动物模型及标本收集

Wistar 大鼠用 2% 戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 腹腔注射麻醉,手术显微镜下游离腹主动脉 1 cm,于左髂总动脉游离段剪口,将 PE10 导管插至腹主动脉分叉,结扎该处腹主动脉(包括导管),用 0.5 mL 包含 15 u iv 型胰弹力蛋白酶(美国 Sigma 公司),灌注时间为 1 h。分别于灌注前后测量动脉直径。寡核苷酸组以脂质体(Lipofectin, GIBCO/BRL)作为携带系统(100 mg/L)并按文献[3]方法用 30% pluronic 胶(Sigma)包埋后涂抹于局部动脉。脂质体组仅涂以等量的脂质体和 pluronic 胶。动物在预定时间重新剖腹,测动脉直径,计算动脉直径变化率=[增加直径(实测直径-灌注前直径)]/灌注前直径。直径变化率等于或大于 100% 定义为 AAA。获取腹主动脉,取部分标本用苏木素-伊红(HE)染色及抗巨噬细胞单克隆抗体 CD68 染色,其余标本置-70℃冰箱待行逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白印迹(Western blot)检测。MCP-1 寡核苷酸反义链序列为 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGA-3',正义链序列为 5'-TCCTGCTGACTCCGCCCTGA-3',错配链序列为 AGCCACGTAACCTTCAGGTAC(均由上海生物工程公司合成,硫代修饰)。

1.3 逆转录聚合酶链反应法检测

单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)正义链为 5'-TGT-TACAGTTGCTGCTGT-3',反义链为 5'-TTCCTAT-TGGGTCAGCAG-3',产物长度 212 bp;β-肌动蛋白正义链为 5'-CTGTGCCATCTATGAGGGT-3',反义链为 5'-CAGTGAGGCCAGGATAGAGC-3',产物长度 563 bp。聚合酶链反应条件为 94℃变性 2 min → 94℃30 s → 55℃30 s → 72℃45 s,共 30 个循环,72℃延伸 5 min。2% 琼脂糖电泳,凝胶成像系统上摄像并分析各条带吸光度值。

1.4 蛋白印迹法检测

按文献[4]配制蛋白提取用细胞裂解液,剪碎动脉瘤组织后机械匀浆,4℃低温 12 kr/min 离心 10 min。考马氏亮蓝 R250 染色测总蛋白浓度,将各组蛋白调到同一浓度,置-70℃冻存。制备 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶,样品加热变性后每孔加蛋白样品 50 μg ,电泳后将蛋白转到硝酸纤维素滤膜。丽春红 S 染色确定转膜情况并标记蛋白 Marker 位置。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,抗 MCP-1 及 CD68 抗体 1:1 000 稀释,室温下摇 2 h 后洗膜 3 次,按 1:1 000 加过氧化物酶标记的马抗小鼠 IgG,

洗 3 次后加化学发光剂 2~3 min,暗室显影 2 min 后冲洗胶片。凝胶成像分析系统分析,计算吸光度值。

1.5 免疫组织化学染色

单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1, sc-1784)及巨噬细胞 CD68(sc-7084)单克隆抗体均为 Santa Cruz 公司产品(小鼠 IgG 单抗,工作浓度为 1:100),购于北京中山生物技术有限公司。按试剂盒说明书染色,二氨基联苯胺显色。正常腹主动脉作为自身对照。400 倍光镜下观察胞浆或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性细胞,计数单位视野内阳性细胞数占总细胞数的百分比,辅以计算机图像分析仪分析结果。

1.6 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验和方差分析及 *Q* 检验比较组内和组间差异。

2 结果

2.1 腹主动脉直径变化

大鼠腹主动脉经胰弹力酶灌注后 3 d 直径平均增加 31%,尚未形成动脉瘤;7 d 直径平均增加 126%,14 d 增加 208%,28 d 增加 245%,均发生了 AAA。反义寡核苷酸组在术后 14 d 仅分别增加 115% (50 μg) 和 82% (200 μg),可见 AAA 的形成明显受到抑制,抑制率为 93%~126%。而正义、错配组及脂质体组没有明显变化(表 1, Table 1)。

表 1. 大鼠腹主动脉灌注前后动脉直径变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The changes of diameter of abdominal aorta pre- or postperfusion

分 组	实测直径 (mm)	增加直径 (mm)	直径变化率
对照灌注前	1.42 ± 0.20		
对照灌注后立刻	1.86 ± 0.31	0.44 ± 0.12	31%
对照灌注后 3 d	2.20 ± 0.33	0.78 ± 0.18	35%
对照灌注后 7 d	3.21 ± 0.39	1.79 ± 0.22	126% ^{ac}
对照灌注后 14 d	4.38 ± 0.48	2.96 ± 0.32	208% ^{ac}
对照灌注后 28 d	4.68 ± 0.72	3.26 ± 0.40	230% ^{ac}
脂质体 (14 d)	4.36 ± 0.40	2.94 ± 0.23	207% ^a
反义 (14 d) 50 μg	3.06 ± 0.30	1.64 ± 0.18	115% ^b
反义 (14 d) 200 μg	2.59 ± 0.28	1.17 ± 0.24	82% ^{bc}
正义 (14 d) 50 μg	4.33 ± 0.59	2.91 ± 0.20	204% ^a
正义 (14 d) 200 μg	4.36 ± 0.44	2.94 ± 0.32	207% ^a
错配 (14 d) 50 μg	4.50 ± 0.68	3.08 ± 0.20	210% ^a
错配 (14 d) 200 μg	4.48 ± 0.55	3.06 ± 0.32	205% ^a

a: $P < 0.01$, 与对照灌注前组比较; b: $P < 0.01$, 与对照灌注后 14 d 组比较; c: $P < 0.01$, 与表中上一组比较。

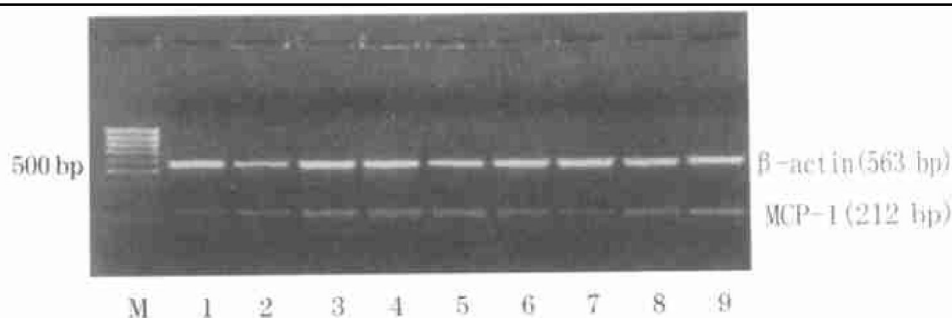


图 1. 逆转录聚合酶链反应检测单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 结果 M 为 100 bp 标记物, 1 为正常动脉, 2~5 分别为灌注后 3 d、7 d、14 d 和 28 d 动脉, 6 和 7 分别为反义 ODN 50 μ g 和 200 μ g 动脉, 8 和 9 分别为正义 50 μ g 和错配 200 μ g 动脉。

Figure 1. The result of MCP-1 mRNA detected by RT-PCR

2.2 光学显微镜观察结果

对照灌注后 3 d 即出现明显的炎性细胞浸润, 并逐渐加重, 弹力纤维染色可见弹力纤维有微小损害, 7~14 d 弹力纤维的破坏逐渐加强。

2.3 单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 的表达

单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) mRNA 在正常动脉表达很少, 动脉瘤模型建立 3 d 后表达增强, 在术后 14 d 达到高峰。应用反义 ODN 后 MCP-1 基因表达受到明显抑制, 而正义、错配组及脂质体组 MCP-1 mRNA 表达没有明显影响(图 1, Figure 1)。

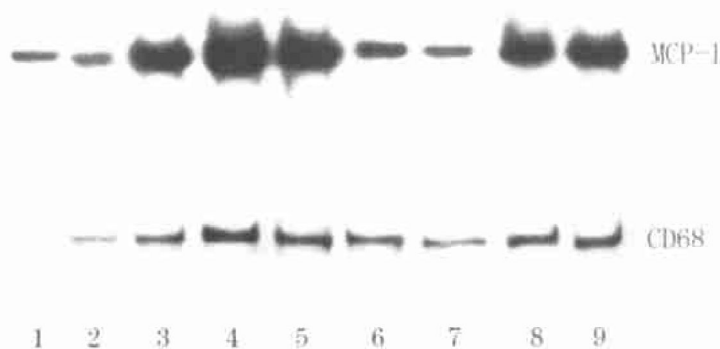


图 2. 蛋白印迹法检测单核细胞趋化蛋白 1 和 CD68 蛋白表达结果 1 为正常动脉, 2~5 分别为灌注后 3 d、7 d、14 d 和 28 d 的动脉, 6 和 7 分别为反义 ODN 50 μ g 和 200 μ g 动脉, 8 和 9 分别为正义 50 μ g 和错配 200 μ g 动脉。

Figure 2. The result of MCP-1 and CD68 detected by western blot

2.4 单核细胞趋化蛋白 1 和 CD68 蛋白的表达

单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 及 CD68 蛋白产物表达均于术后 14 d 达到高峰; 反义 ODN 明显抑制 MCP-1 及 CD68 蛋白产物表达(图 2, Figure 2)。

2.5 免疫组织化学染色结果

正常动脉罕有 MCP-1 或 CD68 阳性细胞表达, 对照组 3 d 即出现 MCP-1 阳性表达, 多位于动脉内膜附近, 14 d 达到高峰, 中层及外膜附近也可见较多阳性细胞; CD68 阳性巨噬细胞在术后 7 d 明显增多, 多位于动脉瘤中层, 14 d 达到高峰, 可见较多强阳性表达的巨噬细胞。反义 MCP-1 ODN 组 MCP-1 及 CD68 阳性细胞较对照组明显减少, 200 μ g 组更加明显; 正义、错配组及脂质体组没有显著变化(表 2,

Table 2)。

3 讨论

炎性细胞在 AAA 形成中非常重要, 并且 AAA 组织中 MCP-1 表达显著增多^[2]。MCP-1 是一种作用很强的趋化蛋白, 调节单核巨噬细胞黏附及迁移。实验证明动脉粥样硬化斑块、内膜损伤及血管重建的移植血管段中均有 MCP-1 强阳性表达, 正常动静脉壁中则表达很低^[5,6]。大鼠腹主动脉节段性胰腺弹力蛋白酶灌注是研究 AAA 最常用的动物模型^[7]。实验中, 我们成功的建立了该模型。炎性细胞中以单核巨噬细胞最为重要, 它的一个重要特性是分泌

表 2. 大鼠腹主动脉瘤 MCP-1 和 CD68 免疫组织化学染色结果 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The results of immunohistochemistry stain of MCP-1 and CD68 in AAA

分 组	MCP-1	CD68
对照灌注前	-	-
对照灌注后 3 d	5.8% $\pm$ 2.3%	9.8% $\pm$ 3.8%
对照灌注后 7 d	18.2% $\pm$ 8.8% ^e	21.8% $\pm$ 4.2% ^e
对照灌注后 14 d	32.6% $\pm$ 12.6% ^c	32.9% $\pm$ 13.2% ^c
对照灌注后 28 d	20.6% $\pm$ 8.6% ^c	23.7% $\pm$ 10.8% ^c
脂质体 (14 d)	33.4% $\pm$ 10.2%	31.2% $\pm$ 12.6%
反义 (14 d) 50 μ g	12.2% $\pm$ 5.8% ^b	17.6% $\pm$ 6.1% ^b
反义 (14 d) 200 μ g	9.2% $\pm$ 4.8% ^{bc}	10.4% $\pm$ 4.2% ^{bc}
正义 (14 d) 50 μ g	32.4% $\pm$ 6.4%	29.8% $\pm$ 10.2%
正义 (14 d) 200 μ g	34.2% $\pm$ 5.8%	31.2% $\pm$ 11.3%
错配 (14 d) 50 μ g	33.0% $\pm$ 4.4%	29.2% $\pm$ 7.4%
错配 (14 d) 200 μ g	34.6% $\pm$ 6.6%	29.8% $\pm$ 10.4%

b: $P < 0.01$, 与对照灌注 14 d 比较; c: $P < 0.01$, 与表中同列上一组比较。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)^[8]。MMP 在 AAA 形成中起关键作用。这些酶除具有降解弹力纤维和胶原纤维的作用外,还可降解层粘连蛋白、纤维连接蛋白及蛋白聚糖等基质。本研究中我们应用免疫组织化学和蛋白印迹定量分析巨噬细胞相关抗原 CD68 的变化规律,证实单核巨噬细胞的浸润与 AAA 的形成和发展呈正相关。

近年来,寻求药物途径通过抑制 MMP 阻止 AAA 的发展已成为热点。有人研究了四环素类药物如强力霉素对 AAA 中 MMP 的抑制作用,取得了一定的效果,但是针对炎性细胞浸润过程的研究较少。单克隆抗体生产及全身应用有一定困难并且会影响机体的正常应激反应,所以我们选择反义技术局部封闭 MCP-1 基因的表达,减少由其介导的炎性细胞与血管壁的粘附及进一步的浸润过程。我们动态观察 AAA 的形成过程与 MCP-1 基因的表达密切相关并呈平行关系。反义 ODNs 的应用能够明显降低该时段的 MCP-1 mRNA 及蛋白产物的表达,巨噬细胞浸

润也相应减少。反义 MCP-1 ODNs 的作用机制可能是干扰 mRNA 的翻译、与 mRNA 结合促进 RNA 酶对其降解、进入细胞核内干扰 DNA 转录及 mRNA 的剪切、修饰及运输,还可能非特异地与其它 mRNA 或蛋白质结合而起作用^[9]。为了避免在体内被核酸酶降解,我们对寡核苷酸进行了常规硫代修饰,并且应用脂质体作为携带系统、pluronic 胶作为缓释系统以提高转染效率并延长作用时间。

目前公认腹主动脉基质(主要为弹力纤维和胶原纤维)的损伤是 AAA 形成与扩张的关键环节。我们发现随着 AAA 的形成和发展,炎性细胞浸润逐渐加重,两者的变化趋势基本一致。随着炎性细胞浸润程度的逐渐加重, MMP 种类增加、活性逐渐增高,弹力纤维和胶原纤维损伤加重、腹主动脉的扩张程度逐渐加重。所以,选择阻断炎性细胞浸润这一环节来防治 AAA 的形成和发展可能为一种新的思路。巨噬细胞浸润的减少能相应减少 MMP 的分泌,从而减轻弹力纤维和胶原纤维损伤的程度,这可能是反义 ODN 作用的最终途径。

[参考文献]

- [1] 张健,王新文,王斌,辛世杰,张强,段志泉. 炎性细胞在腹主动脉瘤形成中的作用. 中华外科杂志, 1999, 37: 177-179
- [2] Koch AE, Kunkel SL, Pearce WH, et al. Enhanced production of the chemotactic cytokines interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein 1 in human abdominal aortic aneurysms. Am J Pathol, 1993, 142: 1423-431
- [3] 胡新华,孙达欣,张强,王新文,段志泉. 反义 ICAM-1 寡脱氧核苷酸抑制大鼠腹主动脉瘤形成的实验研究. 中华普通外科杂志, 2003, 18: 564-565
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 克隆化基因所表达蛋白质的检测与分析. 金冬雁,黎孟枫,译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京: 科学出版社, 1992; 852-898
- [5] Stark VK, Hoch JR, Warner TF, Hullett DA. Monocyte chemotactic protein 1 expression is associated with the development of vein graft intimal hyperplasia. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17: 1614-620
- [6] 孟峰,邓仲端. 凝血酶和脂多糖诱导小鼠主动脉平滑肌细胞表达单核细胞趋化蛋白-1. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7 (3): 189-192
- [7] 吴建秋,景在平. 两种实验性腹主动脉瘤大鼠模型的比较. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10: 277-280
- [8] 吴建秋,景在平. 细胞外基质中的蛋白多糖与腹主动脉瘤. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9: 74-77
- [9] Newman KM, Jear-Claude J, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, et al. Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. J Vasc Surg, 1994, 20: 814-820

(此文编辑 胡必利)