

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0173-04

• 实验研究 •

全反式维甲酸对球囊损伤大鼠胸主动脉内皮后 P16 及增殖细胞核抗原表达的影响

张先明¹, 董果雄¹, 张社华², 褚现明¹, 张 斌¹, 李 宁¹

(青岛大学医学院 1. 附属医院心内科, 山东省青岛市 266003; 2. 中心实验室, 山东省青岛市 266021)

[关键词] 药理学; 全反式维甲酸对 P16 及增殖细胞核抗原表达的影响; 免疫组织化学法; 球囊损伤; 内膜增生; 血管再狭窄; 大鼠

[摘要] 为研究全反式维甲酸对球囊损伤大鼠胸主动脉内皮后内膜增生过程、P16 及增殖细胞核抗原表达的影响, 球囊剥脱大鼠胸主动脉内皮, 并随机将大鼠分为手术组、全反式维甲酸治疗组及对照组, 各组均于术前 4 天灌胃至实验结束, 除对照组于术后 14 天处死大鼠外, 全反式维甲酸治疗组和手术组分别在术后 2 天、7 天、14 天和 28 天处死大鼠并摘除大鼠胸主动脉, 通过组织学检查和免疫组织化学技术检测术后 14 天和 28 天的内膜增生情况及术后 2 天、7 天、14 天和 28 天 P16 和增殖细胞核抗原的表达及全反式维甲酸(每天 30 mg/kg)灌胃对它们的影响。结果发现, 对照组及内皮损伤后 2 天均无血管内膜增厚, 7 天内膜开始增生, 28 天血管平滑肌细胞增殖减弱, 但细胞外基质增加。在手术组各时间点 P16 的表达变化不显著, 增殖细胞核抗原于球囊损伤后 2 天在中膜明显表达, 术后 7 天表达达到高峰, 且主要在内膜表达, 14 天后逐渐下降。使用全反式维甲酸治疗后, 内膜增生程度及增殖细胞核抗原的表达明显降低, 而 P16 的表达在术后 2 天开始升高, 14 天达高峰。以上结果提示, 全反式维甲酸可有效抑制血管内皮损伤后内膜的增生, 其机制可能与促进 P16 表达和抑制增殖细胞核抗原表达, 从而抑制血管平滑肌细胞的增殖有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of All-trans Retinoic Acid on Expression of P16 and Proliferation Cell Nuclear Antigen after Thoracic Aorta Balloon Injury in Rats

ZHANG XianMing, DONG GuoXiong, ZHANG SheHua, CHU XianMing, ZHANG Bin, and LI Ning

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003; Central Laboratory of Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, China)

[KEY WORDS] Balloon Injury; Blood Vessel Restenosis; Intimal Proliferation; Rats; Retinoic Acid; P16; Proliferation Cell Nuclear Antigen

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of all-trans retinoic acid (ATRA) on intimal proliferation, expression of suppressor gene P16 and proliferation cell nuclear antigen (PCNA) after vascular injury in rats. **Methods** Rats were randomly divided into three groups: Group 1 ($n=24$) were given vascular balloon injury, Group 2 ($n=24$) were given 30 mg/(kg·d) ATRA into stomach from 4 days before injury to 28 days after injury, Group 3 ($n=6$) served as controls were killed at 14th day after operation. Neointima area were calculated morphologically at day 14, 28 after injury. The expression of P16 and PCNA were measured by means of immunohistochemical technique and image analyzer at day 2, 7, 14, and 28 after injury. **Results** The migration and proliferation of vascular smooth muscle cells (VSMC) had not existed at day 2 after balloon injury in control group. The thickening of intima had begun at day 7 after injury, and they were more significant at day 14. The proliferation of vascular smooth muscle cells decreased at day 28, but extracellular matrix increased and the intimal thickening continued. The positive expression of PCNA were found at day 2 and reached maximum at day 7 and begun decreasing at day 14 after balloon injury, but the expression changes of P16 was inapparent when given ATRA, the neointimal area and the index of PCNA expression reduced at every time point, but the expression of P16 begun increasing at day 2 and reached maximum at day 14 after vascular balloon injury. **Conclusion** ATRA can effectively repress intimal proliferation after vascular injury, which may be associated with inhibiting the proliferation of vascular smooth muscle cells through down-regulating the expression of PCNA and up-regulating that of P16.

[收稿日期] 2003-11-17

[修回日期] 2004-03-20

[作者简介] 张先明, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事冠心病的临床与研究, 联系电话为 013061318287, E-mail 为 zhangxm0225@sohu.com。董果雄, 硕士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病、心功能不全、心律失常的临床与研究, 联系电话为 0532-2911308。张社华, 副教授, 主要从事临床检验的教学与研究, 联系电话为 0532-2991502。

对大血管壁的机械损伤可引起一系列的变化, 包括基因表达的突变和新生内膜的形成^[1]。冠状动脉内血管成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后再狭窄的主要机制为血管平滑肌细胞增殖及迁移所致的新生内膜适度增生, 局部血

栓形成,细胞外基质形成,早期血管弹性回缩及晚期负性重塑^[2]。冠状动脉内血管成形术后再狭窄是制约冠状动脉内血管成形术远期疗效的重要因素,探讨有效地抑制血管再狭窄的药物是当前研究的热门课题。近来研究发现,全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)可明显地抑制体外培养的血管平滑肌细胞的增殖,抑制动物模型的动脉内皮损伤后内膜增生,促进有益的血管重塑^[3]。本研究利用球囊损伤大鼠胸主动脉内皮后,给予全反式维甲酸治疗,观察其对血管内膜增生过程、P16及增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)表达的影响,探讨全反式维甲酸防治冠状动脉内血管成形术后再狭窄的可能机制。

1 材料和方法

1.1 模型建立和实验分组

本实验选用雄性SD大鼠(北京大学实验动物中心提供),体重250~300 g,3%戊巴比妥钠(1.5 mL/kg, ip)麻醉,由左颈总动脉插入自制的2F球囊导管至肾动脉分叉处,充水0.1~0.2 mL,回拉至颈总动脉开口处,反复抽拉5次,拔除导管,缝合伤口,常规饲养。3只大鼠术后即刻从左颈静脉注入0.5%伊文思蓝(2 mL/kg),1 h后处死动物,观察内皮剥脱情况,证明主动脉内皮剥脱完全。

大鼠随机分为3组,所有动物均于术前4天灌胃至实验结束。手术组为球囊损伤+植物油组,共24只大鼠,每只每天给予1 mL植物油灌胃,按术后处死时间分为术后2天、7天、14天和28天亚组,每组各6只大鼠。治疗组为球囊损伤+ATRA组,共24只大鼠,全反式维甲酸每天30 mg/kg溶于1 mL植物油灌胃^[4],按术后处死时间分为2天、7天、14天和28天亚组,每组各6只大鼠。对照组共6只大鼠,除不插入球囊导管外,余操作同手术组,术后14天处死。

1.2 形态学观察

处死各组大鼠,摘除胸主动脉,截取动脉上、中、下3段,每段长约0.5 cm,10%中性甲醛固定24 h,石蜡包埋,从每段血管的横截面随机切3张切片,HE染色。光学显微镜下观察血管内膜增生情况,并用图像分析仪测定内膜面积,并计算内膜面积与中膜面积比。

内膜面积=内弹力板包绕面积-管腔面积。

1.3 免疫组织化学法

将胸主动脉蜡块切片后,进行PCNA及P16的

免疫组织化学染色,DAB H₂O₂显色,苏木素复染,胞核呈棕色为阳性,每例动物每个指标观察3张切片。图像分析仪随机测量每张切片中6~8个视野的阳性细胞平均吸光度及阳性细胞百分率,取其均数,用两者乘积再乘以100,作为阳性表达指数来表示蛋白质的表达水平^[5]。

1.4 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较用方差分析,2组间比较用 q 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 形态学观察

对照组及球囊损伤大鼠主动脉内皮后2天尚无新生内膜形成,但术后7天内膜开始增生;14天及28天内膜增生非常显著,且新生内膜细胞排列紊乱。使用ATRA后治疗组动脉中这些现象明显轻于手术组,图像分析显示术后14天和28天治疗组的新生内膜面积及内膜/中膜面积与手术组相比明显减少(表1, Table 1)。

表1. 全反式维甲酸对球囊损伤大鼠胸主动脉内皮后主动脉内膜增生的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1. Effects of ATRA on intimal proliferation at day 14, 28 after balloon injury

分 组		内膜面积 (mm ²)	内膜与中膜面积比
对照组		—	—
手术组	14 天	0.145 ± 0.032	0.265 ± 0.056
	28 天	0.173 ± 0.030	0.284 ± 0.050
治疗组	14 天	0.057 ± 0.015 ^a	0.108 ± 0.033 ^a
	28 天	0.075 ± 0.017 ^a	0.107 ± 0.035 ^a

a: $P < 0.01$, 与手术组比较。

2.2 全反式维甲酸对P16表达的影响

在手术组,球囊损伤血管内皮后各时间点P16的表达无明显差异;而在治疗组,球囊损伤后2天P16的阳性表达指数与手术组相比无明显差异(9.8 ± 1.9比8.9 ± 1.4),而损伤后7天明显升高(17.6 ± 1.3比8.9 ± 1.7, $P < 0.01$),14天达高峰(22.1 ± 3.1比9.0 ± 1.6, $P < 0.01$),28天时降低但仍高于手术组(15.2 ± 1.7比8.5 ± 1.5, $P < 0.01$)。对照组表达阴性(图1, Figure 1)。

2.3 全反式维甲酸对增殖细胞核抗原表达的影响

球囊损伤后2天中膜即有增殖细胞核抗原表达,7天表达达到高峰,阳性细胞主要聚集在新生内

膜, 14 天开始表达明显下降, 中膜表达极少或没有表达, 只有内膜可见阳性表达细胞, 且各时间点 PCNA 表达的阳性指数治疗组均明显低于手术组 ($P < 0.01$)。对照组无阳性表达(表 2 和图 2, Table 2 和 Figure 2)。

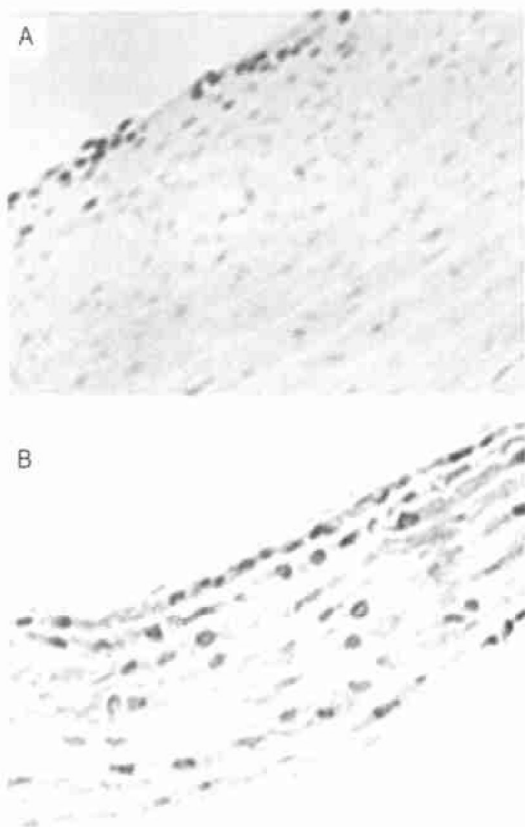


图 1. 球囊损伤后 14 天 P16 表达 ($\times 400$) A 为手术组; B 为全反式维甲酸治疗组。

Figure 1. Expression of P16 at day 14 after operation ($\times 400$)

表 2. 全反式维甲酸对球囊损伤大鼠胸主动脉内皮后增殖细胞核抗原表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2. Effects of ATRA on expression of PCNA after balloon injury in rats

组 别	2 天	7 天	14 天	28 天
对照组	—	—	—	—
手术组 内膜	—	35.3 ± 3.5	21.5 ± 2.6	3.1 ± 0.6
中膜	24.1 ± 2.3	9.5 ± 1.6	—	—
治疗组 内膜	—	16.9 ± 1.0^a	8.7 ± 0.9^a	2.1 ± 0.3^a
中膜	12.1 ± 1.8^a	4.7 ± 0.6^a	—	—

a: $P < 0.01$, 与手术组比较。

3 讨论

大量研究表明, ATRA 能通过维甲酸受体抑制血管损伤后平滑肌细胞增殖、迁移和新生内膜的形成, ATRA 被摄入机体后, 与维甲酸受体结合, 并通



图 2. 球囊损伤后 7 天增殖细胞核抗原表达 ($\times 400$) A 为手术组; B 为全反式维甲酸治疗组。

Figure 2. Expression of PCNA at day 7 after operation ($\times 400$)

过受体与启动子上特异性的反应元件结合, 进而调节特异基因的转录^[6]。本实验也证明: 术后 7 天 PCNA 增殖达高峰, 说明此时期细胞增殖最活跃; 应用 ATRA 后, 作为细胞增殖标志的 PCNA 表达也受到明显抑制, 术后 14 天手术组新生内膜的面积明显大于治疗组。

全反式维甲酸能阻止细胞周期的进程, 并抑制成视网膜细胞瘤蛋白 (pRb) 磷酸化, 上调细胞周期蛋白依赖性激酶 (Cyclin-dependent kinase, CDK) 抑制蛋白 P27 基因表达, 通过调整 G₁-S 期细胞周期调节因子抑制细胞分化活性^[7]。细胞周期进程受细胞因子、周期调控蛋白、癌基因及抑癌基因表达产物等多因素调控, 各因素之间相互协调, 构成网络调控机制。P27-P16 融合基因, 被命名为 W9, 在体外能明显抑制新生内膜的增殖^[8-10]。P16 可直接作用于细胞周期, 与细胞周期蛋白 (Cyclin) D 竞争结合 CDK4, 并抑制其活性, 使 pRb 持续去磷酸化状态, 导致 G₁ 期阻滞^[11]。目前研究认为, CyclinD1-CDK4-P16-pRb 环路为调控细胞 G₁ 期的最重要途径, 并且 P16、CDK 和 pRb 间可能为一负反馈调节环路^[12]。本研究发现, 在手术组球囊损伤大鼠胸主动脉内皮后各

时间点 P16 表达的阳性指数变化不大, 在治疗组 PCNA 的表达受到抑制, 而 P16 的表达明显升高。这可能是由于 ATRA 能抑制 pRb 的磷酸化, 提高 P16 的表达水平, P16 与 CDK4 结合, 抑制 CDK4 的激酶活性, 使细胞周期阻滞在 G₁ 期, 从而抑制血管新生内膜的增殖。术后 14 天, 治疗组新生内膜的面积明显小于手术组也说明了这一点。

本实验结果表明: ATRA 抑制血管内皮损伤后内膜增生的机制可能与上调 P16 和下调 PCNA 的表达有关, 但平滑肌细胞增殖的途径呈网络状交叉分布, 单纯抑制一条途径难以奏效。ATRA 使我们对 PTCA 术后再狭窄的药物防治看到了希望, 但其临床有效性和作用机制尚须进一步探索。

[参考文献]

- [1] Schwartz SM, de Blois D, O'Brien ERM. The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. *Circulation Research*, 1995, **77** (4): 445-465
- [2] 顾水明, 魏盟, 张昀昀, 潘晔生, 葛兆莺, 金立仁. 水飞蓟宾对实验兔球囊血管损伤后内膜增生的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (6): 526-528
- [3] 党书毅, 王家宁, 王卫民, 黄永章, 张群林. 全反式维甲酸对大鼠腹主动脉球囊损伤后新生内膜形成和内皮再生的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (1): 16-18
- [4] Miano JM, Kelly LA, Artacno CA, Nuckolls TA, Piantedosi R, Blaner WS. All trans-retinoic acid reduces neointimal formation and promotes favorable geometric remodeling of the rat carotid after balloon withdrawal injury. *Circulation*, 1998, **98** (12): 1 219-227
- [5] 聂晓敏, 刘瑞云, 黄振文, 张金盈, 董建增, 崔天祥. L-精氨酸对大鼠血管损伤后内膜增生及相关细胞周期调控基因表达的影响. *中国病理生理杂志*, 2001, **17** (3): 248-250
- [6] Kizki M, Dawson MI, Heyman R. Effect of novel retinoid X receptor selective ligands on myeloid leukemic differentiation and proliferation in vitro. *Blood*, 1996, **87** (16): 1 977-983
- [7] Tanner FC, Boehm M, Akyrek LM, San H, ZhiYong, Tashiro J, et al. Differential effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27Kip1, p21Cip1, and p16Ink4 on vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation*, 2000, **101** (17): 2 022-025
- [8] McArthur JG, Qiang H, Citron D, Gautam G, Lamphere BL, Gyuris J, et al. p27-p16 Chimera: A superior antiproliferative for the prevention of neointimal hyperplasia. *Molecular Therapy*, 2001, **3** (1): 8-13
- [9] Tsui LV, Camrud A, Mondesire J, Carlson P, Zayek N, Camrud L, et al. p27-p16 Fusion gene inhibits angioplasty-induced neointimal hyperplasia and coronary artery occlusion. *Circulation Research*, 2001, **89** (4): 323-328
- [10] Lamphere L, Tsui L, Wick S, Nakano T, Kilinski L, Finer M, et al. Novel chimeric p16 and p27 molecules with increased antiproliferative activity for vascular disease gene therapy. *J Molecular Medicine*, 2000, **78** (8): 451-459
- [11] 白明, 张晓菊, 金阳, 陶晓南. 抑癌基因 p16 对维 A 酸诱导肺癌细胞分化的作用. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, **24** (9): 534-537
- [12] 杨志祥, 糜漫天, 张乾勇, 郎海滨, 韦娜. CyclinD1 在视黄醇类化合物诱导骨髓细胞分化中的作用研究. *白血病杂志*, 2000, **9** (2): 79-82

(此文编辑 朱雯霞)