

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2006)14-05-0402-03

普罗布考抑制冠状动脉损伤后 iv 型胶原 和原癌基因 $c-myc$ 表达

岳欣, 潘其兴, 张薇, 李继福, 李贵双, 陈玉国, 许复郁

(山东大学齐鲁医院心内科, 山东省济南市 250012)

[关键词] 病理学与病理生理学; 普罗布考; 血管成形术; 内膜增生; 再狭窄; iv 型胶原; $c-myc$ 基因

[摘要] 目的 建立猪冠状动脉球囊损伤模型, 观察普罗布考对损伤动脉内膜增生的影响及对 iv 型胶原和 $c-myc$ 基因表达的影响。方法 雌性大约克夏猪 19 只, 随机分为对照组和普罗布考组, 两组均行冠状动脉球囊扩张术, 术后 6 周重复冠状动脉造影后处死动物。观察损伤动脉的形态学变化, 计算损伤动脉内膜面积占有率。并检测管壁 iv 型胶原及原癌基因 $c-myc$ mRNA 的表达强度。结果 对照组损伤动脉内膜呈偏心性增厚, 内膜面积占有率为 $56.0\% \pm 17.8\%$, 普罗布考组损伤动脉内膜面积占有率为 $30.3\% \pm 21.0\%$, 普罗布考组较对照组内膜增厚程度明显减低 ($P < 0.05$)。普罗布考组 iv 型胶原表达强度较对照组明显减弱 (0.22 ± 0.06 比 0.41 ± 0.06 , $P < 0.05$)。对照组 $c-myc$ mRNA 相对表达强度明显高于正常动脉 (2.73 ± 0.51 比 0.82 ± 0.09 , $P < 0.05$), 而普罗布考组 (1.44 ± 0.25) 较对照组减弱 ($P < 0.05$), 但仍高于正常动脉 ($P < 0.05$)。结论 普罗布考具有抑制冠状动脉成形术后损伤血管内膜增生的作用, 其机制可能与抑制冠状动脉球囊损伤后 iv 型胶原增生和原癌基因 $c-myc$ 表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Probucol Inhibit the Expression of Collagen Type iv and C-myc Gene in the Injured Artery After Coronary Angioplasty in a Swine Model

YUE Xin, PAN Qi-Xing, ZHANG Wei, LI Ji-Fu, LI Gui-Shuang, CHEN Yu-Guo, and XU Fu-Yu

(Department of Cardiology, the Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Probucol; Angioplasty; Neointimal Hyperplasia; Restenosis; Collagen Type iv; C-myc Gene

[ABSTRACT] Aim To observe the effect of probucol on the neointimal hyperplasia and the expression of collagen type iv and $c-myc$ mRNA after coronary angioplasty in a swine model. Methods 19 female New Yorkshire pigs were randomly assigned to receive 2 g/d of probucol or control therapy for 4 weeks before percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA), then PTCA was undergone in all the pigs, probucol was continued until follow-up angiography 6 weeks after PTCA. Then the animals were killed and taken histopathologic examination, the intima area ratio was measured. Immunohistochemical method was used to detect the expression of collagen type iv in the injured arteries. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to detect the expression of $c-myc$ mRNA in the injured arteries. Results The injured arteries in the control group revealed marked eccentric neointima formation, the intima area ratio was more than that in the probucol group ($56.0\% \pm 17.8\%$ vs $30.3\% \pm 21.0\%$, $P < 0.05$). The expression of collagen type iv in the probucol group was lower than that in the control group (0.22 ± 0.06 vs 0.41 ± 0.06 , $P < 0.05$). The expression of $c-myc$ mRNA in the control group was higher than that in the normal artery (2.73 ± 0.51 vs 0.82 ± 0.09 , $P < 0.05$), and the injured artery of the probucol group had lower expression of $c-myc$ mRNA (1.44 ± 0.25) than the control group ($P < 0.05$), but had higher expression than the normal artery ($P < 0.05$). Conclusions Probucol decreased the neointimal hyperplasia after PTCA, the mechanism may relate to inhibiting the expressions of collagen type iv and $c-myc$ mRNA in the injured artery.

近年的研究表明抗氧化剂普罗布考 (probucol, 丙丁酚) 具有抑制冠状动脉血管成形后再狭窄的作用^[1], 但机制尚不清楚。本实验建立了猪的冠状动脉球囊损伤模型, 观察普罗布考对损伤血管壁增

殖的抑制效应及对损伤血管内 iv 型胶原和原癌基因 $c-myc$ 表达的影响, 为其防治再狭窄提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

普罗布考由齐鲁制药厂提供, 高清晰度彩色病理图象分析系统 (HPIAS-1000 型) 为同济医科大学千屏影像工程公司产品。免疫组织化学试剂均购自北京中山生物技术公司。RNA 提取试剂盒、聚合酶链

[收稿日期] 2005-07-01 [修回日期] 2006-05-10

[作者简介] 岳欣, 博士, 主治医师, 主要研究方向为经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄的防治, E-mail 为 dryx@sina.com。潘其兴, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为血脂异常和动脉粥样硬化的发病机制和防治。张薇, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心脏超声、心脏电生理和动脉粥样硬化的防治。

反应(polymerase chain reaction, PCR)引物由上海生物工程技术有限公司生产;逆转录聚合酶链反应(reverse transcription PCR, RT-PCR)试剂均购自美国 Promega 公司。

1.2 动物模型的制备

健康雌性大约克夏良种猪 19 只,体重 64 ± 5 kg,随机分为对照组($n=11$)和普罗布考组($n=8$)。普罗布考组于术前 4 周开始给予普罗布考 1 g,每天 2 次,至实验结束。所有动物均行冠状动脉造影,选用 3.5~4 mm 的球囊置于左冠状动脉前降支中段、回旋支中段或右冠状动脉中远段,于 8~10 个大气压下扩张 30 s,放气 1 min,重复 2~3 次,球囊与管腔直径比约为(1.1~1.3):1,重复冠状动脉造影,使管腔保持通畅。术后 6 周重复行冠状动脉造影后处死动物。切取损伤段血管,选取一部分置 10% 中性福尔马林中固定,常规染色观察形态学变化;剩余部分封入 1.5 mL 冻存管,置液氮中保存。

1.3 计算机图像分析

以 HPIAS1000 病理图像处理软件作图像分析,测定损伤动脉管腔面积和内弹力板围绕面积,根据公式计算:损伤动脉内膜面积占有率=(内弹力板围绕面积-管腔面积)/内弹力板围绕面积 $\times 100\%$ 。

1.4 损伤动脉壁内 iv 型胶原表达强度的检测

采用免疫组织化学 SABC 法检测,HPIAS1000 病理图像处理软件进行分析,高倍镜(200 倍)下在增生的内膜和中膜中随机选取 5 个视野,计算光密度值,以平均光密度值作为表达强度。

1.5 损伤动脉壁内原癌基因 $c-myc$ mRNA 的检测

采用 RT-PCR 方法检测。 $c-myc$ 和 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde phosphate dehydrogenase, GAPDH)的引物序列及扩增片段^[2]分别为 $c-myc$: 上游 5' CCAAGCTCGTCTCAGAGAAG 3', 下游 5' AATTGTGCTGCTGCGTGGAC 3', 扩增片段长度为 398 bp; GAPDH: 上游 5' CATCACCATCTTCCAGGAGCG 3', 下游 5' TGACCTTGCCCACAGCCITG 3', 扩增片段长度为 443 bp。取 PCR 扩增产物行琼脂糖凝胶电泳,紫外透射仪下观察,出现特异性条带为阳性。采用复日 FR-980A 生物电泳图像分析系统进行琼脂糖凝胶的扫描和扩增条带光密度分析,并按照下列公式计算 $c-myc$ 的相对表达强度:被测基因表达强度=被测基因光密度/GAPDH 光密度。

1.6 统计学处理

采用 EXCEL 软件做统计学处理,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

实验中动物死亡 5 只,对照组 4 只,普罗布考组 1 只。1 只死于术后血栓形成,2 只死于麻醉意外,2 只死于术中心室颤动。另 14 只动物术后恢复良好。

2.1 普罗布考对损伤动脉形态学的影响

未损伤段冠状动脉柔软、有弹性,与周围组织无粘连;镜下内弹力板完整,内膜和中膜无增生,平滑肌细胞排列规则,形态一致,细胞外基质少见。对照组损伤段动脉成灰白色、僵硬,与周围组织粘连;镜下可见内膜成偏心性增厚,主要由平滑肌细胞和胶原构成,此外尚可见泡沫细胞和少量的炎性细胞,内弹力板多处断裂,中膜局部变薄,平滑肌细胞大量增生,排列紊乱无序,内膜面积占有率为 $56.0\% \pm 17.8\%$ 。普罗布考组损伤段动脉与周围组织无明显的粘连;镜下损伤动脉内膜面积占有率为 $30.3\% \pm 21.0\%$,内膜增厚程度明显减低($P < 0.05$,图 1)。

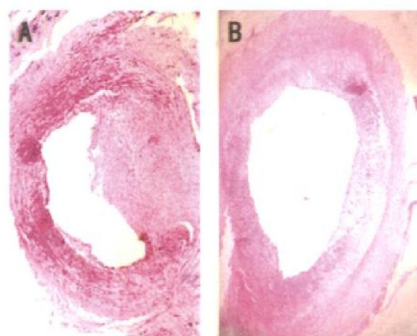


图 1. 对照组和普罗布考组损伤段冠状动脉 HE 染色 ($\times 10$)
A 为对照组, B 为普罗布考组。

2.2 普罗布考对损伤动脉壁 iv 型胶原表达的影响

对照组损伤动脉增生的内膜和中膜可见 iv 型胶原阳性表达,阳性颗粒位于平滑肌细胞的胞质及细胞外基质中,排列紊乱无序。普罗布考组 iv 型胶原的表达特点与对照组类似,但表达强度较对照组减低(0.22 ± 0.06 比 0.41 ± 0.06 , $P < 0.05$; 图 2)。

2.3 普罗布考对损伤动脉 $c-myc$ mRNA 表达的影响

对照组 $c-myc$ mRNA 的表达明显高于正常动脉(2.73 ± 0.51 比 0.82 ± 0.09 , $P < 0.05$),普罗布考组 $c-myc$ mRNA 表达(1.44 ± 0.25)较对照组减弱($P < 0.05$),但仍高于正常动脉($P < 0.05$; 图 3)。

3 讨论

研究表明,普罗布考可以抑制平滑肌细胞的增殖和 PTCA 术后再狭窄的发生。Miyachi 等^[3]发现

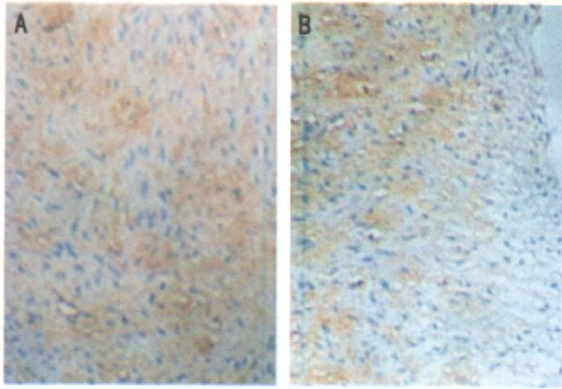


图 2. 对照组和普罗布考组损伤段冠状动脉 iv 型胶原的表达
A 为对照组, B 为普罗布考组。

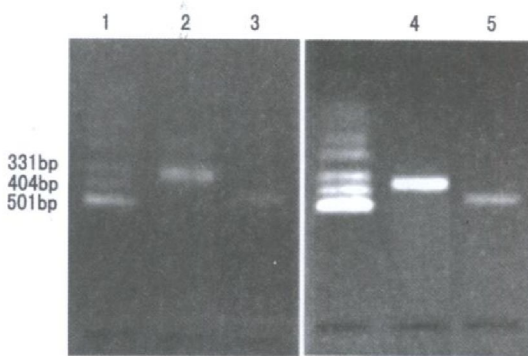


图 3. 对照组和普罗布考组损伤段冠状动脉 $c\text{-myc}$ 基因的表达
1 为相对分子质量 Marker, 2 为治疗组 $c\text{-myc}$, 3 为治疗组 GAPDH, 4 为对照组 $c\text{-myc}$, 5 为对照组 GAPDH。

普罗布考可使球囊损伤的兔颈动脉内膜面积减少 20%, 内膜中血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的数目及增殖细胞核抗原阳性细胞显著减少, 并降低血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 的表达, 表明普罗布考抑制平滑肌细胞的增生及生长因子的表达。Watanabe 等^[4] 研究发现, 行 PTCA 术的患者术前 7 天开始服用普罗布考 0.5 g/d, 其残余管腔内径增加, 再狭窄发生率下降。维生素和普罗布考抑制再狭窄试验和普罗布考抑制血管成形术后再狭窄试验也得到了相似的结果^[1,5]。涂永生等^[6] 证实普罗布考显著抑制氧化型低密度脂蛋白所诱导的平滑肌细胞增殖, 杨云波等^[7] 发现普罗布考能提高扩张性血管重塑, 抑制收缩性血管重塑, 防止再狭窄的发生。本实验证实普罗布考抑制冠状动脉球囊损伤后 VSMC 的增殖和表型转化, 减少细胞外基质的分泌, 抑制内膜增生。

细胞外基质的过量分泌和蓄积是再狭窄的重要原因之一。介入性治疗后 1~2 周, 即开始有基质的

形成, 3 个月后达高峰, 可持续约 1 年以上。胶原是细胞外基质的主要成分, 与动脉损伤后内膜增殖关系密切。Nagler 等^[8] 报道细胞外基质与新生内膜的形成密切相关, 特别是 iv 型胶原。Coats 等^[9] 研究也发现血管成形术后 4 周, 动脉壁内 iv 型胶原含量增加, 促进了 VSMC 增殖和再狭窄的发生。本研究结果发现, 对照组损伤段动脉内膜和中膜中 iv 型胶原表达量明显增加, 主要分布在细胞外间质中, 呈条索状, 排列紊乱无规则, 平滑肌细胞胞质中也可见阳性颗粒, 证实了胶原在再狭窄中的作用。普罗布考可抑制冠状动脉球囊损伤后 iv 型胶原的表达, 从而抑制细胞外基质合成和内膜增生, 这可能是其防治再狭窄的机制之一。

血管平滑肌细胞增殖与原癌基因 $c\text{-myc}$ 密切相关。 $c\text{-myc}$ 基因表达增加, 其编码蛋白与 DNA 结合, 可促进与细胞增殖有关的基因开放, 从而产生细胞增殖效应, 提示 $c\text{-myc}$ 基因的激活可能是 VSMC 增殖的始动因素。本研究发现, 球囊损伤后 6 周, 动脉壁 $c\text{-myc}$ 表达强度明显高于正常动脉, 证实了 $c\text{-myc}$ 在再狭窄中的作用。普罗布考在一定程度上可抑制 $c\text{-myc}$ 表达, 这可能是其防治再狭窄的机制之一。

[参考文献]

- [1] Tarif JC, Cote G, Lesperance J, Bourassa M, Lambert J, Doucet S, et al. Probucol and multivitamins in the prevention of restenosis after coronary angioplasty [J]. *N Engl J Med*, 1997, **337** (6): 365-372
- [2] Bartling B, Hoffmann J, Holtz J, Schulz R, Heusch G, Damer D. Quantification of cardioprotective gene expression in porcine short-term hibernating myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, **31** (1): 147-158
- [3] Miyauchi K, Aikawa M, Tani T, Nakahara K, Kawai S, Nagai R, et al. Effect of probucol on smooth muscle cell proliferation and dedifferentiation after vascular injury in rabbits: possible role of PDGF [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1998, **12** (3): 251-260
- [4] Watanabe K, Sekiya M, Ikeda S, Miyagawa M, Hashida K. Prevention effects of probucol on restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty [J]. *Am Heart J*, 1996, **132** (1 Pt 1): 23-29
- [5] Yokoi H, Daida H, Kuwabara Y, Nishikawa H, Takatsu F, Tomihara H, et al. Effectiveness of antioxidant in preventing restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty: the probucol angioplasty restenosis trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1997, **30** (4): 855-862
- [6] 涂永生, 严鹏科, 朱炳阳, 黄红林, 廖端芳. 普罗布考抑制大鼠血管平滑肌细胞周期素 D1 蛋白表达和 G1→S 转换 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (6): 676-680
- [7] 杨云波, 廖端芳, 谢志忠, 黄红林. 普罗布考抑制再狭窄与其调节功能性血管重构的关系 [J]. *中国药理学通报*, 2003, **19** (4): 388-392
- [8] Nagler A, Miao HQ, Aingorn H, Pines M, Gemina O, Vlodavsky I. Inhibition of collagen synthesis, smooth muscle cell proliferation, and injury-induced intimal hyperplasia by halofuginone [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (1): 194-202
- [9] Coats WD, Cheung DT, Han B, Currier JW, Faxon DP. Balloon angioplasty significantly increases collagen content but does not alter collagen subtype iv/α1 ratios in the atherosclerotic rabbit iliac model [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **28** (2): 441-446

(此文编辑 许雪梅)