

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2011)19-07-0570-03

DIM 对兔血管损伤后平滑肌细胞 C-myc 表达的影响

蒋伟¹, 黄佩民², 王书梅¹, 张社兵¹

(1. 韶关市粤北人民医院, 广东省韶关市 512025; 2. 清远市清城区石角医院, 广东省清远市 511545)

[关键词] DIM; 再狭窄; 血管平滑肌细胞; C-myc

[摘要] 目的 探讨 DIM 对血管损伤后血管平滑肌细胞增殖的影响及其可能机制。方法 制备兔血管再狭窄模型, 21 只兔随机分为假手术组、模型组和 DIM 组, 观察各组颈总动脉形态学变化, 采用免疫组织化学技术观察血管内膜 C-myc 的表达。结果 假手术组动脉各层结构正常; 模型组动脉内膜层出现泡沫细胞, 平滑肌细胞增殖, 血管内膜明显增厚, C-myc 表达明显增加; DIM 组血管平滑肌细胞增殖程度降低; 与假手术组比较, 模型组 C-myc 表达显著增强 ($P < 0.05$), 而 DIM 明显降低 C-myc 的表达 ($P < 0.01$)。结论 DIM 通过下调 C-myc 基因的表达而抑制血管内膜增生, 有利于血管再狭窄的防治。

[中图分类号] R32

[文献标识码] A

Effect of 3, 3'-Diindolylmethane on C-myc Expression After Balloon Injury in Rabbit Artery

JIANG Wei¹, HUANG Pei-Min², WANG Shu-Mei¹, and ZHANG She-Bing¹

(1. Yuebei Hospital, Shaoguan, Guangdong, 512025, China; 2. Shijiao Hospital of Qingcheng, Qingyuan, Guangdong 511545, China)

[KEY WORDS] 3, 3'-Diindolylmethane (DIM); Restenosis; Vascular Smooth Muscle Cell (VSMC); C-myc

[ABSTRACT] Aim To observe the effect of 3, 3'-Diindolylmethane (DIM) on C-myc expression in carotid artery injury rabbits. Methods Restenosis model was established by injury of rabbit carotid arteries with balloon catheters.

21 rabbits were randomly divided into 3 groups including sham-operated group, model group and DIM group 40mg/(kg·d) once a day from 3 days before operation to 4 weeks after operation, DIM was orally administered to rabbits, while the other two groups with saline at the same volume. All rabbits were killed after 28 days and carotid arteries were removed. We observed artery morphology and measured the thickness of arterial intima and media, examined C-myc with HE staining, automatic image analysis and immunohistochemistry. Results Compared with sham group, the sections of injured carotid artery showed obviously intimal thickening with large numbers of vascular smooth muscle cells (VSMC) proliferating throughout intima and media, the expression of C-myc was markedly increased ($P < 0.01$) after operation. VSMC proliferating was inhibited and gene expression was significantly decreased by DIM. Conclusion DIM can inhibit neointimal proliferation after carotid endothelium injury through down regulation of C-myc expressions.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 异常增殖是血管再狭窄的重要病理特征^[1]。因此如何减轻血管后再狭窄是心血管领域研究的热点和难点。原癌基因可加速细胞周期, 减少细胞分化, 导致细胞增殖, 在再狭窄的发生发展中起重要作用^[2]。DIM (3, 3'-Diindolylmethane, DIM) 是吲哚-3-甲醇 (indole-3-carbinol, I3C) 的酸性缩合物中的二聚体, 是已被证明能有效的抑制肿瘤细胞增殖

的自然来源药物^[3]。DIM 具有抑制肿瘤细胞增殖与诱导癌细胞凋亡的双重作用^[3]。本试验建立兔颈动脉再狭窄模型, 原位观察 DIM 对血管局部 C-myc mRNA 表达的影响, 探讨 DIM 抗血管再狭窄的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型

健康大白兔 21 只, 雌雄不限, 体重 2.05 ± 0.15 kg, 随机分为假手术组 7 只, 模型组 7 只, DIM [40 mg/(kg·d)] 组 7 只。假手术组与模型组灌等

[收稿日期] 2011-01-05

[基金项目] 广东省韶关市科委资助项目 (No. 2009-07)

[作者简介] 通讯作者蒋伟, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管基础与临床, E-mail 为 simeinv2007@126.com。

量的生理盐水。建模过程参考文献 [4], 以速眠新按 0.3 mL/kg 经兔耳缘静脉注射麻醉, 常规消毒, 暴露并且游离右颈总动脉, 用动脉夹临时夹闭阻断血流, 在右颈外动脉距颈总动脉分叉处约 1 cm 处结扎。用眼科剪剪开颈外动脉, 自颈外动脉结扎处近端插入导丝, 沿导丝逆行送入 PTCA 导管球囊, 使球囊充分膨胀, 使其充盈至回拉时有轻度阻力, 并均匀、缓慢地将球囊退回到切口处, 反复 4 次, 每次 20 min , 间隔 15 s , 使颈总动脉内膜充分剥脱, 后结扎颈外动脉, 充分止血后逐层缝合, 以络合碘纱布覆盖创面, 回笼饲养。DIM 组术前 3 天开始灌胃给药。假手术组不插入球囊导管, 其余步骤均同上。术后连续 3 天肌注青霉素 80 万单位以预防感染。

1.2 组织学研究

28 天兔处死后, 取右侧颈总动脉, 常规固定、包埋、切片、苏木素-伊红染色。

1.3 免疫组织化学染色检测

参照试剂盒说明书进行, 石蜡切片 3 张, 切片厚度为 $4 \mu\text{m}$, 用 SP 法 DAB 显色分别观察 C-myc 的表达。每张切片在 LEICA 全自动图象分析系统上随

机算 5 个 40 倍物镜视野计算 100 个细胞中阳性细胞数, 取平均值计算阳性细胞百分率。

1.4 统计学方法

所有结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组之间比较采用 t 检验, 各组之间两两比较用 q 检验, 统计处理由 SPSS 统计软件包完成, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 形态学观察

假手术组动脉柔软, 有弹性, 血管各层结构正常、清晰, 与周围组织没有粘连, 镜下显示内膜光滑完整, 无 VSMC 增殖, 内弹力板完整, 细胞排列整齐。模型组动脉成灰白色, 僵硬, 血管内腔面粗糙, 中膜 VSMC 大量增殖, 与周围组织粘连, 镜下新生内膜明显增厚, 管腔横切面减少, 内含大量增殖的血管平滑肌细胞。DIM 组内膜比较光滑完整, VSMC 增殖程度降低, 内膜增生减轻, 管腔明显增大 (图 1)。

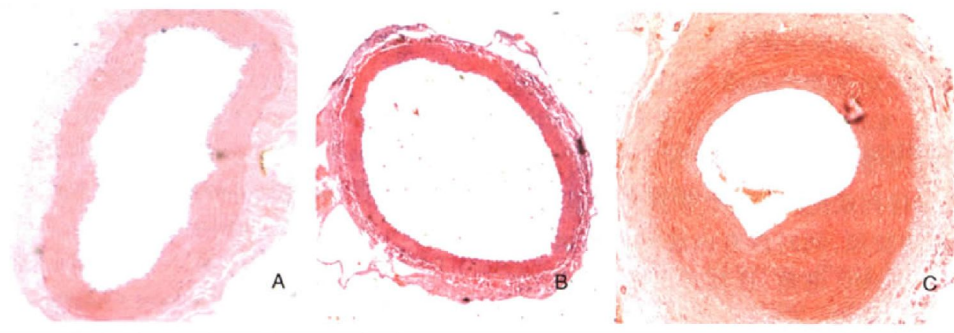


图 1. 各组光镜下 HE 染色 ($\times 40$) A 为假手术组, B 为 DIM 组, C 为模型组。

Figure 1. Morphometric analysis ($\times 40$)

2.2 血管 C-myc 基因的表达

与假手术组相比, 模型组兔血管 C-myc 表达均

显著增强 ($P < 0.05$), DIM 处理后, C-myc 表达显著降低 ($P < 0.01$; 表 1 和图 2)。

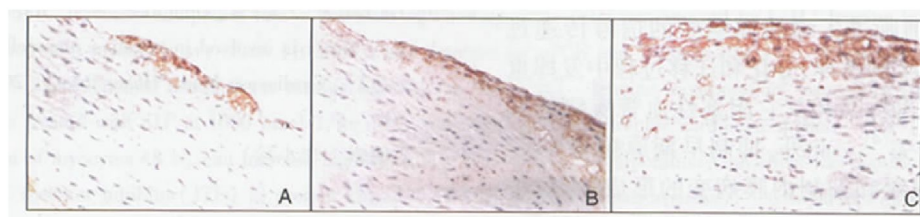


图 2. 各组 C-myc 表达的影响 ($\times 400$) A 为假手术组, B 为 DIM 组, C 为模型组。

Figure 2. Expression of C-myc protein in rabbit carotid artery ($\times 400$)

表 1. 各组原癌基因 C-myc 表达

Table1. The effect of DIM on the expression of C-myc

分 组	n	C-myc
假手术组	7	1.31 ± 0.67
模型组	7	9.66 ± 3.05 ^{ab}
DIM 组	7	1.23 ± 0.58

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 DIM 组比较。

3 讨 论

DIM 是一种对多种肿瘤细胞、免疫细胞的生长具有抑制作用的药物。DIM 因具有抗氧化和免疫调节功能而被应用于临床治疗某些肿瘤疾病。如乳腺癌、前列腺癌等^[5]。有研究发现 DIM 具有抑制肿瘤细胞的增殖与扩散^[6]。目前 DIM 抑制 VSMC 增殖的机制并不清楚,而再狭窄与肿瘤细胞在细胞增殖上有相似之处^[7],故推测 DIM 也可通过抑制 VSMC 增殖的作用来减轻内膜增生。

正常成人 VSMC 受生长刺激因子和生长抑制因子相互作用表现为收缩型细胞形态,病理状态下受某些刺激因子如 Ang II 作用转变为合成型,并增殖,向内膜下迁移并分泌细胞外基质,导致内膜过度增生,管腔狭窄^[8]。本研究结果发现正常兔颈总动脉内膜没有 VSMC,中膜 VSMC 排列整齐;球囊损伤后内膜下出现大量排列紊乱的 VSMC 并且向内膜下迁移,周围有较多的胶原,同时伴有内膜和中膜增厚,面积增加。提示 VSMC 增殖、迁移是血管受损后管腔狭窄的重要病理过程。同时本实验显示,颈动脉损伤后,血管 VSMC 大量增殖,血管 C-myc 表达显著增强;治疗组血管 VSMC 增殖程度减轻,C-myc 表达也显著降低。C-myc 是一种重要的核蛋白调控基因,它参与正常心肌细胞的生长,发育,也在心血管疾病细胞增殖过程中起重要的调控作用,由各种有丝分裂原刺激后诱导的一种早期即刻反应基因,它编码的 C-myc 肿瘤蛋白参与生长因子与其受体相互作用后诱导细胞进入增殖周期中的信号传递过程,在 VSMC 增生的诱导、分化和迁移过程中发挥重要作用,与血管再狭窄和其它阻塞性血管疾病的发生、发展密切相关^[9]。此外,抑制早期原癌基因 C-myc 的表达可减缓和抑制内膜病变的形成,有利于

再狭窄的防治。本研究结果表明使用 40 mg/(kg · d) DIM 可显著抑制内膜 C-myc 的表达,这种作用有重要的临床意义,同时,也为抗肿瘤类药品的新开发应用提供了理论依据。本实验提示,原癌基因 C-myc 参与了血管再狭窄的发生、发展,而 DIM 能够抑制再狭窄后 VSMC DNA 合成,减少内膜增殖,这可能是其防治再狭窄的机制之一。

[参考文献]

[1] Kim JE, Choi HC. Losartan inhibits vascular smooth muscle cell proliferation through activation of AMP-activated protein kinase [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2010, 14 (5): 299-304.

[2] Urata Y, Goto S, Kawakatsu M, et al. DHEA attenuates PDGF-induced phenotypic proliferation of vascular smooth muscle A7r5 cells through redox regulation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396 (2): 489-494.

[3] Nachshon-Kedmi M, Fares FA, Yannai S. Therapeutic activity of 3, 3'-diindolylmethane on prostate cancer in an in vivo model [J]. Prostate, 2004, 61 (2): 153-160.

[4] Ward MR, Agrotis A, Kanellakis P, et al. Inhibition of protein tyrosine kinases attenuates increases in expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors following arterial injury [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17 (11): 2 461-470.

[5] Ahmad A, Ali S, Wang Z, et al. 3, 3'-Diindolylmethane enhances taxotere-induced growth inhibition of breast cancer cells through down-regulation of FoxM1 [J]. Int J Cancer, 2010, [Epub ahead of print]

[6] Jin Y, Zou X, Feng X. 3, 3'-Diindolylmethane negatively regulates Cdc25A and induces a G2/M arrest by modulation of microRNA 21 in human breast cancer cells [J]. Anticancer Drug, 2010, 21 (9): 814-822.

[7] Isner JM. Cancer and atherosclerosis: the broad mandate of angiogenesis [J]. Circulation, 1999, 99 (13): 1 653-655.

[8] Castoldi G, Gioia RT, Pieruzzi F, et al. ANG-increase-TIM-4 expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2003, 284: H635-H643.

[9] De Feo M, Forte A, Onorati F, et al. Rat carotid arteriotomy: c-myc is involved in negative remodelling and apoptosis [J]. Cardiovasc Med (Hagerstown), 2006, 7 (1): 61-67.

(此文编辑 李小玲)