

CBP 基因沉默对大鼠颈动脉球囊损伤后内膜增生的影响

杨简¹, 江洪², 杨俊¹, 丁家望¹, 李松¹, 陈静²

(1. 三峡大学第一临床医学院心内科 三峡大学心血管病研究所, 湖北省宜昌市 443003;

2. 武汉大学人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] CREB 结合蛋白; 基因沉默; 内膜增生; 核因子 κ B; 乙酰化

[摘要] **目的** 观察小干扰 RNA (siRNA) 重组慢病毒介导的 CREB 结合蛋白 (CBP) 基因沉默对大鼠颈动脉球囊损伤后新生内膜增生的影响, 并探讨其作用机制。**方法** 雄性 SD 大鼠 48 只, 随机分为 4 组: 假手术组、PBS 对照组、慢病毒介导 CBP 基因 siRNA 转染组 (CBP-siRNA-Lenti 组) 及慢病毒介导非 CBP 同源序列 siRNA 转染组 (NC-siRNA-Lenti 组), 建立大鼠颈动脉球囊损伤模型, 术后 28 天处死动物。分别用实时定量 PCR、Western Blot 检测大鼠颈动脉 CBP 和乙酰化核因子 κ B p65 (NF- κ B p65) 的表达水平; 病理组织学观察血管内膜增生情况; 免疫组织化学染色对损伤血管壁增殖细胞核抗原 (PCNA) 的表达进行评估。**结果** 术后 28 天, 与 PBS 对照组和 NC-siRNA-Lenti 组比较, CBP-siRNA-Lenti 组 CBP mRNA 和蛋白的表达显著下调 (P 均 < 0.05), CBP 沉默能明显抑制新生内膜面积 ($0.108 \pm 0.008 \text{ mm}^2$ 比 $0.238 \pm 0.022 \text{ mm}^2$ 、 $0.252 \pm 0.016 \text{ mm}^2$, $P < 0.05$)、内膜与中膜面积比 (0.706 ± 0.062 比 1.483 ± 0.136 、 1.497 ± 0.137 , $P < 0.05$) 的增加, 及下调血管壁乙酰化 NF- κ B p65 和 PCNA 的表达水平 (P 均 < 0.05)。**结论** 慢病毒介导的 CBP 基因沉默能有效地抑制颈动脉球囊损伤后新生内膜的形成, 其机制可能与抑制 NF- κ B p65 的过度乙酰化有关。

[中图分类号] R543.3

[文献标识码] A

Effect of CREB Binding Protein Silencing on Neointimal Hyperplasia in Rat Carotid Arteries After Balloon Injury

YANG Jian¹, JIANG Hong², YANG Jun¹, DING Jia-Wang¹, LI Song¹, and CHEN Jing²

(1. Department of Cardiology, The First College of Clinical Medical Sciences & Institute of Cardiovascular Disease, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443003, China; 2. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

[KEY WORDS] CREB Binding Protein; Gene Silencing; Neointimal Hyperplasia; Nuclear Factor KappaB p65; Acetylation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of siRNA recombinant lentivirus targeting CREB binding protein (CBP) gene on neointimal hyperplasia in rat carotid arteries after balloon injury and its possible mechanism. **Methods** Forty-eight male SD rats were randomly divided into four groups: Sham group, PBS group, CBP-siRNA-Lentivirus group and NC-siRNA-Lentivirus group to establish the model of balloon-injury in left common carotid artery, and the rats were sacrificed 28 days after injury and in vivo gene transfer. The expression of CBP and acetylated nuclear factor kappaB p65 (NF- κ B p65) were determined by real-time PCR and Western Blot. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) protein expression was detected by immunohistochemistry. Meanwhile, morphometric analysis was used to measure neointimal hyperplasia. **Results** 28 days after operations, lentivirus siRNA targeting CBP markedly decreased CBP mRNA and protein expression compared with PBS and NC-siRNA-Lentivirus groups ($P < 0.05$). CBP gene silencing significantly reduced the neointimal area ($0.108 \pm 0.008 \text{ mm}^2$ vs $0.238 \pm 0.022 \text{ mm}^2$ and $0.252 \pm 0.016 \text{ mm}^2$, $P < 0.05$) and intima / media ratio (0.706 ± 0.062 vs 1.483 ± 0.136 and 1.497 ± 0.137 , $P < 0.05$). Furthermore, compared with PBS and NC-

[收稿日期] 2012-06-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81200088 和 30770849); 湖北省自然科学基金资助项目(2011CDB179)

[作者简介] 杨简, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 ycyj@medmail.com.cn。江洪, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为介入心脏病学, E-mail 为 jianghong_rm@163.com。杨俊, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病基础与临床, E-mail 为 yangjun@medmail.com.cn。

siRNA-Lentivirus groups, PCNA and acetylation of NF- κ B p65 expression were both obviously downregulated in CBP-siRNA-Lentivirus group ($P < 0.05$). **Conclusions** Lentivirus-mediated CBP gene silencing could efficiently suppress neointimal formation in balloon injured rat carotid artery, and the mechanism was involved with downregulation of NF- κ B p65 acetylation.

经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)是临床治疗冠心病的重要手段,但术后再狭窄(restenosis, RS)的形成严重影响了其远期疗效^[1]。大量研究证实,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)的增殖、迁移而引起的内膜增生是RS发生发展的关键因素^[2]。CREB结合蛋白(CREB binding protein, CBP)是一种重要的转录辅激活子,能够调节多种转录因子,对细胞增殖、分化和凋亡等生理过程进行调控^[3,4]。本室前期研究发现,CBP参与了凝血酶诱导的VSMC增殖,且其表达与VSMC增殖能力呈正相关,提示CBP可能为防治RS的新靶点^[5]。因此,本研究在前期研究[通过RNA干扰技术,将CBP基因小干扰RNA的重组慢病毒(CBP-siRNA-Lentivirus)转染至大鼠球囊损伤的颈动脉]^[6]基础上,观察CBP沉默对球囊损伤诱导内膜增生的影响,并探讨其分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记的CBP小干扰RNA重组慢病毒(CBP-siRNA-Lentivirus)及非CBP同源序列小干扰RNA重组慢病毒(NC-siRNA-Lentivirus)由上海吉凯基因技术有限公司协助构建、筛选,滴度为 2×10^{12} TU/L。CBP的shRNA靶向序列为5'-GCAAACAGAGCATGGTCAA-3';非CBP同源序列的shRNA靶向序列为5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。Trizol购自美国Invitrogen公司;实时定量PCR试剂盒购自日本TaKaRa公司;CBP单克隆抗体、兔抗增殖细胞核抗原(PCNA)多克隆抗体及Protein A/G PLUS-Agarose均购自美国Santa Cruz公司;兔抗乙酰化核因子 κ B(NF- κ B)p65多克隆抗体购自美国Cell Signalling公司;1.5 mm \times 20.0 mm球囊导管由Medtronic公司提供。

1.2 实验动物和分组处理

健康雄性SD大鼠48只,体重350~400 g,由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供(SCXK[鄂]2004-0007),随机分为4组:假手术组、PBS对

照组、NC-siRNA-Lenti转染组和CBP-siRNA-Lenti转染组。按照参考文献[7]的方法,3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,取颈正中中线切口,暴露并游离左侧颈总动脉、颈外动静脉和颈内动脉。经颈外静脉给予100 U/kg肝素钠抗凝,夹闭颈总动脉近心端和颈内动脉远心端,临时阻断血流。另在颈外动脉远心端剪一斜形切口,将球囊导管从颈外动脉切口逆行插入颈总动脉,直至距颈外动脉分叉处2.5 cm,向球囊内注入生理盐水充盈球囊,将球囊旋转并来回抽动,重复操作3次,以剥脱内膜。退出球囊,生理盐水冲洗管腔后100 μ L CBP-siRNA-Lenti、NC-siRNA-Lenti病毒稀释液(1×10^{11} TU/L)或PBS缓慢注入损伤动脉节段,局部作用30 min,结扎颈外动脉,恢复颈总至颈内动脉血流,缝合颈部切口。假手术组除不插入球囊导管外,其余操作同手术组。球囊损伤及慢病毒转染28天后处死动物,分离左颈总动脉标本,进行相关指标检测。

1.3 实时定量PCR检测血管中CBP mRNA的表达

液氮保存标本总RNA的提取与互补DNA(cDNA)的合成按照试剂盒说明书进行。本实验设定GAPDH为管家基因,CBP和GAPDH引物参考Gene Bank(NM_133381, NM_017008),采用Primer 5.0引物分析软件设计相应引物。CBP上游引物为5'-TG-GAGAAGCACAAGGAGGTC-3',下游引物为5'-GCG-GCGTAAGGAAGAGAAC-3',扩增片长176 bp;GAPDH上游引物为5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3',下游引物为5'-CTCAGCACCAGCATCACC-3',扩增片长114 bp。实时定量PCR总反应体系20 μ L,反应条件为95 $^{\circ}$ C预变性15 s后进入PCR循环,95 $^{\circ}$ C变性5 s,60 $^{\circ}$ C退火延伸30 s,共45个循环,在ABI-Prism 7500荧光定量PCR仪进行扩增及定量分析,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算和统计。

1.4 免疫组织化学检测血管组织PCNA的表达

标本经4%多聚甲醛固定、脱水、石蜡包埋,切成厚4 μ m切片。3%过氧化氢甲醇溶液灭活内源性过氧化物酶,抗原修复,正常山羊血清中孵育10 min。一抗兔抗PCNA多克隆抗体37 $^{\circ}$ C孵育1 h后4 $^{\circ}$ C过夜,辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h,氨基联苯胺显色,苏木素复染。以PBS代替一抗作为阴性对照。每张切片随机选取3个不同视野,分

别计数每个高倍镜下内膜及中膜细胞总数及相应区域 PCNA 阳性细胞数,求百分比即细胞增殖指数,3 次记数取平均值。

1.5 组织形态学分析

石蜡切片常规 HE 染色,光镜下观察血管横切面新生内膜增生情况。每份标本非连续切片 5 张,利用 Image-Pro Plus5.0 专业图像分析软件,以内弹力膜为界,分别测量血管内膜和中膜面积,并计算内膜与中膜面积比(intima/media, I/M)。

1.6 免疫沉淀和 Western Blot 检测血管中 CBP、乙酰化 NF- κ B p65 的表达

参照文献[5]提取血管总蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量蛋白浓度。各组取等量蛋白分别加入 CBP/NF- κ B p65 的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。再加入 20 μ L Protein A/G PLUS-Agarose,4 $^{\circ}$ C 振荡 3 h,2500 r/min 离心 5 min,吸出上清。细胞裂解液洗涤沉淀 5 次,2 \times SDS 上样缓冲液悬浮沉淀。经聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至硝酸纤维素膜上,封闭洗涤后,加入 CBP、NF- κ B p65 或乙酰化 NF- κ B p65 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日加入相应辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h。洗膜后采用增强化学发光检测系统进行观察。

1.7 统计学方法

采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据比较采用单因素方差分析,各组间的两两比较采用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠颈动脉 CBP 的表达

假手术组动脉壁有少量的 CBP mRNA 表达。PBS 对照组和 NC-siRNA-Lenti 转染组在球囊损伤后 28 天,CBP mRNA 的表达明显升高,分别是假手术组的 2.62 和 2.58 倍。而 CBP-siRNA-Lenti 转染组 CBP mRNA 的表达水平显著低于 PBS 对照组及 NC-siRNA-Lenti 转染组($P < 0.05$)。同时 Western Blot 检测结果显示 CBP 蛋白的表达情况与上述结果一致(图 1)。

2.2 血管病理形态学检查

光镜下假手术组血管内膜光滑,仅见单层内皮细胞,内弹力板连续完整,中膜平滑肌细胞走行一致,呈长梭形;PBS 对照组和 NC-siRNA-Lenti 转染组内膜增生严重,血管腔呈向心或偏心性狭窄,新生内膜平滑肌细胞排列紊乱;CBP-siRNA-Lenti 转染组

内膜增生程度明显减轻,管腔狭窄不明显。与 PBS 对照组和 NC-siRNA-Lenti 转染组比较,CBP-siRNA-Lenti 转染组颈总动脉新生内膜面积、内膜与中膜面积比(I/M)均显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$;图 2 和表 1)。

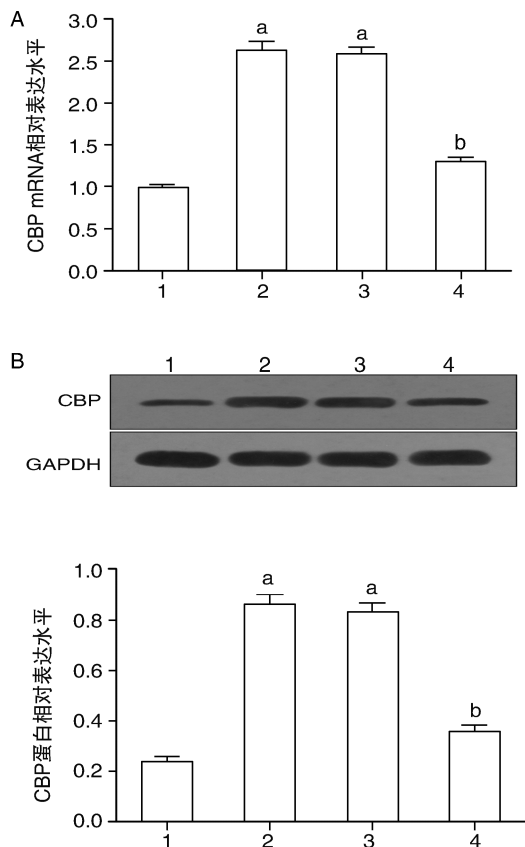


图 1. 大鼠颈动脉 CBP mRNA (A) 及蛋白 (B) 的表达水平

1 为假手术组,2 为 PBS 对照组,3 为 NC-siRNA-Lenti 转染组,4 为 CBP-siRNA-Lenti 转染组。a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与 PBS 对照组及 NC-siRNA-Lenti 转染组比较。

Figure 1. CBP mRNA and protein level in carotid arteries

表 1. 各组血管内膜面积、中膜面积及其面积比值的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1. Comparison of intimal area, medial area and ratio of intima to media in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	内膜面积(mm ²)	中膜面积(mm ²)	内膜/中膜面积比
假手术组	0.008 ± 0.003	0.168 ± 0.014	0.049 ± 0.023
PBS 对照组	0.238 ± 0.022 ^a	0.161 ± 0.017	1.483 ± 0.136 ^a
NC-siRNA-Lenti 转染组	0.252 ± 0.016 ^a	0.169 ± 0.020	1.497 ± 0.137 ^a
CBP-siRNA-Lenti 转染组	0.108 ± 0.008 ^{ab}	0.154 ± 0.017	0.706 ± 0.062 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较;b 为 $P < 0.05$,与 PBS 对照组及 NC-siRNA-Lenti 转染组比较。

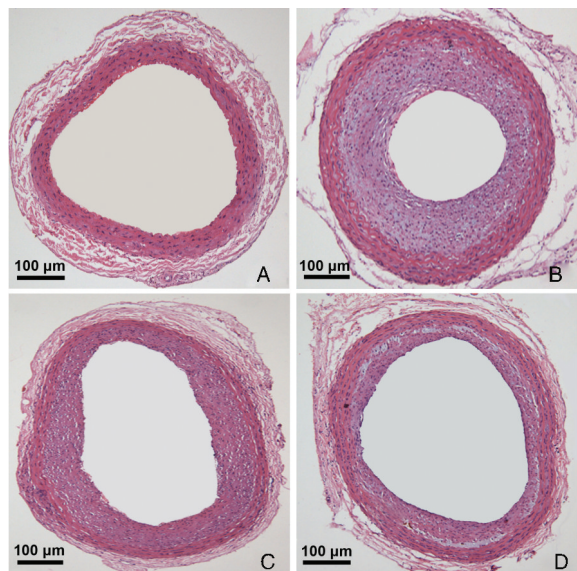


图 2. 大鼠颈动脉 HE 染色 A 为假手术组, B 为 PBS 对照组, C 为 NC-siRNA-Lenti 转染组, D 为 CBP-siRNA-Lenti 转染组。

Figure 2. Carotid arteries HE staining in different groups

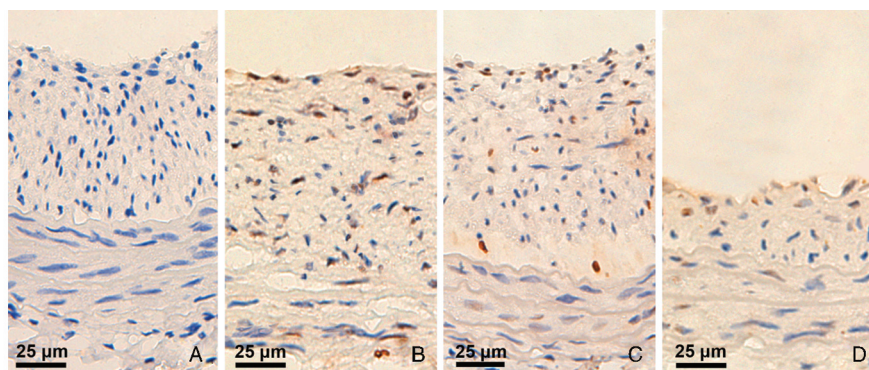


图 3. 免疫组织化学染色法检测大鼠颈动脉 PCNA 表达 A 为阴性对照, B 为 PBS 对照组, C 为 NC-siRNA-Lenti 转染组, D 为 CBP-siRNA-Lenti 转染组。a 为 $P < 0.05$, 与 PBS 对照组及 NC-siRNA-Lenti 转染组比较。

Figure 3. PCNA expression in carotid arteries by immunohistochemical staining

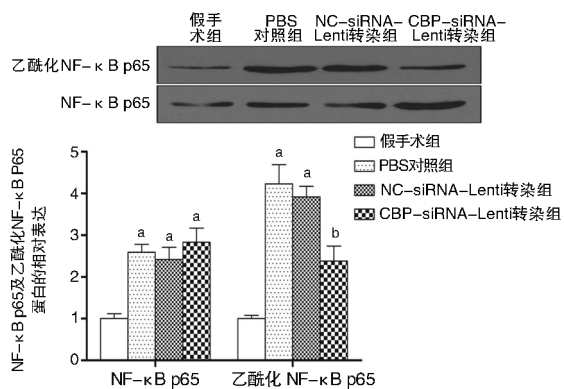


图 4. 大鼠颈动脉 NF-κB p65 及乙酰化 NF-κB p65 蛋白的表达水平 a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 PBS 对照组及 NC-siRNA-Lenti 转染组比较。

Figure 4. NF-κB p65 and acetylated NF-κB p65 level in carotid arteries

2.3 大鼠颈动脉 PCNA 蛋白表达变化

PBS 对照组及 NC-siRNA-Lenti 转染组在球囊损伤后第 28 天, 新生内膜可见大量的阳性表达细胞 (棕黄色颗粒), 中膜层表达较少。CBP-siRNA-Lenti 转染组, 新生内膜中 PCNA 阳性细胞数较少, 中膜偶见阳性染色细胞。与 PBS 对照组和 NC-siRNA-Lenti 转染组比较, CBP 沉默可明显抑制新生内膜 PCNA 阳性表达指数 ($P < 0.05$, 图 3)。

2.4 CBP 沉默对大鼠颈动脉乙酰化 NF-κB p65 表达的影响

假手术组乙酰化 NF-κB p65 有微弱的蛋白条带; PBS 对照组及 NC-siRNA-Lenti 转染组球囊损伤后 28 天, 蛋白条带明显增强, 其表达水平均高于假手术组 ($P < 0.05$)。CBP-siRNA-Lenti 转染组中, CBP 沉默能显著抑制 NF-κB p65 乙酰化 ($P < 0.05$), 但对总的 NF-κB p65 蛋白表达并没有明显影响 ($P > 0.05$; 图 4)。

3 讨论

近年来, 随着药物涂层支架及抗增殖生物制剂的广泛应用使 PCI 术后 RS 的发生率极大的降低^[8,9]。但伴随的内皮愈合延迟、高敏反应、支架内晚期血栓形成等严重并发症, 一直备受关注^[10]。基因治疗作为一种全新的治疗策略, 已逐步应用于心血管疾病的防治^[11,12]。在本研究中, 我们以慢病毒为载体介导 CBP shRNA 沉默 CBP 基因, 发现 CBP 沉默能显著下调大鼠颈动脉 CBP 及乙酰化 NF-κB p65 的表达水平, 可明显抑制球囊损伤诱导的新生内膜增生, 从而推测 CBP 可能参与调控新生内膜的形成。

CBP 是一种广泛表达的转录辅激活子, 其既可

以作为连接众多转录因子和基本转录复合物的蛋白质桥梁,又能通过乙酰化组蛋白及相关转录因子参与基因的转录调控^[4,13]。NF- κ B 是参与血管 RS 的一类重要转录因子。生理情况下,NF- κ B 主要与抑制蛋白 I κ B 结合形成无活性的三聚体存留于细胞质中^[14]。当受到球囊扩张而引起的各种刺激信号时,I κ B 会快速的磷酸化进而降解,使得 NF- κ B p65 亚基核转位,与靶基因启动子区域 NF- κ B 识别序列结合,调节下游与 VSMC 增殖相关基因的表达,从而促进 VSMC 向血管内膜的迁移、增殖^[15]。因此,是否可以通过 CBP 沉默,改变 NF- κ B p65 的活性来减轻血管 RS? 本实验结果显示,大鼠颈动脉球囊损伤后,PBS 对照组和 NC-siRNA-Lenti 转染组 CBP 明显上调、NF- κ B p65 乙酰化水平增加、血管内膜增厚;而 CBP 沉默能有效抑制球囊损伤诱导的 CBP 高表达、NF- κ B p65 乙酰化及新生内膜增生。这些现象提示,动脉球囊损伤后 CBP 对 NF- κ B p65 的乙酰化,可能是血管 RS 发生发展的重要分子机制。

临床和基础研究表明,血管成形术后损伤血管段 VSMC 迁移、增殖而引起的 RS 是一个长期渐进的病理生理过程^[16]。因此,挑选一种稳定、高效、持久的基因转染载体是基因治疗成功的关键。本研究采用的慢病毒载体系统是一种复制缺陷型逆转录病毒载体,能够转染分裂期与非分裂期细胞,而且病毒的遗传物质能够整合到宿主的基因组,使得慢病毒载体 RNAi 作用更持久^[17]。我们的实验结果显示,颈动脉球囊损伤后 28 天,NC-siRNA-Lenti 转染组与 CBP-siRNA-Lenti 转染组损伤动脉壁全层仍然可见较强的绿色荧光分布,同时 CBP-siRNA-Lenti 转染组显示出较强的 CBP 沉默效应,这说明慢病毒载体介导的 CBP 基因沉默稳定、高效,是血管 RS 基因防治的理想载体。

综上所述,本研究初步证实了慢病毒介导的 CBP 基因沉默能显著抑制球囊损伤诱导的血管内膜增生及 NF- κ B p65 乙酰化,提示 NF- κ B p65 过度乙酰化可能是 CBP 参与调控新生内膜形成的重要分子机制。CBP 基因有可能成为防治血管 RS 的一个新靶点,但由于其调控机制的复杂性,故在临床应用推广之前,尚有待于更深入的研究。

[参考文献]

[1] Bermejo J, Botas J, García E, et al. Mechanisms of residual lumen stenosis after high-pressure stent implantation; a quantitative coronary angiography and intravascular ultrasound study [J]. *Circulation*, 1998, 98(2): 112-118.

- [2] Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(9): 1510-520.
- [3] Goodman RH, Smolik S. CBP/p300 in cell growth, transformation, and development [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(13): 1553-577.
- [4] Warner DR, Pisano MM, Greene RM. Functional analysis of CBP/p300 in embryonic orofacial mesenchymal cells [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99(5): 1374-379.
- [5] Chen J, Jiang H, Xu L, et al. Dysregulation of CREB binding protein triggers thrombin-induced proliferation of vascular smooth muscle cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2008, 315(1-2): 123-130.
- [6] 杨简, 江洪, 李万强, 等. 慢病毒载体在大鼠颈动脉球囊损伤模型中的应用及观察 [J]. *心肺血管病杂志*, 2010, 29(2): 145-147.
- [7] Liu Z, Zhang C, Dronadula N, et al. Blockade of nuclear factor of activated T cells activation signaling suppresses balloon injury-induced neointima formation in a rat carotid artery model. [J] *J Biol Chem*, 2005, 280(15): 14700-708.
- [8] Daemen J, Serruys PW. Drug-eluting stent update 2007: part I. A survey of current and future generation drug-eluting stents; meaningful advances or more of the same [J]? *Circulation*, 2007, 116(3): 316-328.
- [9] Kraitzer A, Kloog Y, Zilberman M. Approaches for prevention of restenosis [J]. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 2008, 85(2): 583-603.
- [10] Togni M, Räber L, Cocchia R, et al. Local vascular dysfunction after coronary paclitaxel-eluting stent implantation [J]. *Int J Cardiol*, 2007, 120(2): 212-220.
- [11] Gaffney MM, Hynes SO, Barry F, et al. Cardiovascular gene therapy: current status and therapeutic potential [J]. *Br J Pharmacol*, 2007, 152(2): 175-188.
- [12] 程明, 仲崇俊. 基因治疗缺血性心脏病的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(10): 797-800.
- [13] McManus KJ, Hendzel MJ. CBP, a transcriptional coactivator and acetyltransferase [J]. *Biochem Cell Biol*, 2001, 79(3): 253-266.
- [14] Schmitz ML, Mattioli I, Buss H, et al. NF-kappaB: a multifaceted transcription factor regulated at several levels [J]. *ChemBiochem*, 2004, 5(10): 1348-358.
- [15] Zahradka P, Werner JP, Buhay S, et al. NF-kappaB activation is essential for angiotensin II-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34(12): 1609-621.
- [16] 樊健, 叶猛, 张皓, 等. 通过损伤动脉外膜建立兔颈动脉粥样硬化狭窄和再狭窄模型 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17(10): 863-866.
- [17] Bartosch B, Cosset FL. Strategies for retargeted gene delivery using vectors derived from lentiviruses [J]. *Curr Gene Ther*, 2004, 4(4): 427-443.

(此文编辑 许雪梅)