

大鼠主动脉内皮剥脱后平滑肌细胞增殖与 c-myc 基因表达的研究

万腊香 刘革修 曾 锋 涂玉林 杨和平 杨永宗

(衡阳医学院分子生物学研究中心 衡阳 421001)

c-myc Expression and Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation After Rat Aortic Injury

WAN La-Xiang LIU Ge-Xiu ZENG Feng TU Yu-Lin YANG He-Ping YANG Yong-Zong

(Molecular Biology Center, Hengyang Medical College, Hengyang, 421001 Hunan, P. R. China)

ABSTRACT To understand the molecular events governing smooth muscle cell (SMC) proliferation *in vivo*, SMC proliferation and c-myc expression were assessed in aorta in 25 male rats. Balloon-injury to rat aorta evoked platelet adhesion after 24 h and induced increases of SMC proliferation and intimal thickening after 5, 10 and 15 days. c-myc expression increased significantly 24 h, but decreased gradually 5, 10, 15 and 20 days after the injury. The results indicate that c-myc gene expression corroborates the platelet adhesion and autocrine mode of smooth muscle cells.

KEY WORDS Deendothelialization; Smooth muscle cell proliferation; c-myc gene; Gene expression

摘要 用 Fogarty 导管对 25 只大鼠行主动脉内皮细胞剥脱。在剥脱后的 24 h、5 天、10 天、15 天时观察,发现主动脉平滑肌细胞增殖和内膜增厚随时间延长而降低,20 天接近基础水平。结果表明,c-myc 基因表达可能在启动平滑肌细胞增殖和内膜增厚中起重要作用。

关键词 内皮剥脱; 平滑肌细胞增殖; c-myc 基因; 基因表达

早有报道^[1~3],球囊导管剥脱内皮可致平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增

殖和内膜增厚,而 SMC 增殖在动脉粥样硬化和再狭窄发生中起重要作用。某些原癌基因表达参与 SMC 增殖的调控。本实验通过观察内皮剥脱后主动脉 SMC 增殖与 c-myc 基因表达的动态变化,探讨 c-myc 基因表达与 SMC 增殖的关系。

1 材料和方法

1.1 动物模型和取材

选择体重为 250~300 g 雄性 Wistar 大鼠 35 只。其中 25 只用 Fogarty 导管(购自东方进出口公司)自颈动脉插管至主动脉约达膈水平,插管成功后,在球囊内充以生理盐水,反复回拉 5 次。然后喂以正常饲料,分别在喂养 24 h、5 天、10 天、15 天和 20 天时断头处死 5 只大鼠;对照组在喂养 1 天和 20 天时各处死 5 只。取出一小段主动脉作石蜡切片,HE 染色,其余大部分主动脉组织用作 c-myc 基因表达的研究。

1.2 大鼠主动脉 RNA 提取

RNA 提取操作流程按文献[4]方法。

1.3 c-myc 探针提取

将载有 c-myc (全长)的 pBR322 转化 HB101,在 LB 培养液中扩增,用碱变性法提取质粒,酶切,低熔点凝胶中回收 c-myc 基因片段。

1.4 c-myc 基因的 Northern Blot 分析

以 α -³²P dCTP (北京市亚辉生物医学工程公司)作标记物,按随机引物试剂盒说明书标记 c-myc 基因片段。

2 结果

2.1 形态学观察

正常大鼠主动脉壁分三层:内膜、中膜及外膜。内膜很薄,由一层内皮细胞、内弹力板及少量结缔组织组成,无平滑肌细胞。扫描电镜下见完整的内皮细胞覆盖内膜腔面,

未见弹力纤维。内皮拉伤后,立即取一段主动脉作扫描电镜,可见内皮细胞完全剥脱或附在血管壁上,仅动脉分枝处有正常内皮细胞,内皮剥脱后暴露出弹性纤维纵向成束排列,某些部位内弹力板出现裂痕 (Fig 1)。剥脱内皮 24 h 时,可见血小板、红细胞、白细胞等血液成份粘附内膜,未见内皮细胞 (Fig 2)。5 天时,可见平滑肌细胞穿越内弹力板,其细胞核与内弹力板垂直,开始形成平滑肌细胞“增生灶” (Fig 3)。10 天、15 天和 20 天时,平滑肌细胞增殖相当活跃,病灶较 5 天时严重得多 (Fig 4),内膜明显增厚,有大量平滑肌细胞,内膜/中膜比值增加,腔膜面未见再生的内皮细胞。

2.2 c-myc 基因表达

取每只鼠总 RNA 25 μ g 加至点样孔中电泳、转膜,用 c-myc 探针经膜杂交后显示:内皮剥脱 24 h 时, c-myc mRNA 表达最高,以后随时间延长而降低,但 5 天、10 天、15 天时仍较对照组高,20 天与正常接近 (Fig 5)。

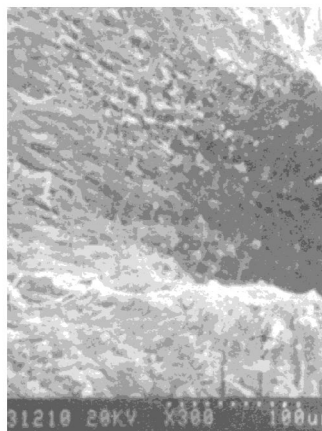


Fig 1. Scanning electron micrograph of the aorta after balloon injury at once, $\times 300$.

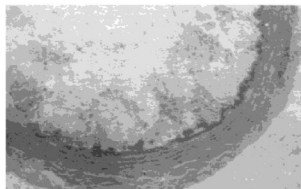


Fig 2. Photomicrograph of the rat aorta one day after balloon injury. A lot of platelets adhered to intimal, $\times 10$.



Fig 3. Five days after balloon injury, some platelets adhered to intima and smooth muscle cell migrated through intimal elastica to neointima, $\times 20$.

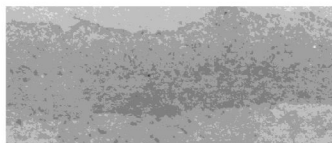


Fig 4. Fifteen days after balloon injury, intimal thickening and a lot of smooth muscle cell proliferation, $\times 20$.

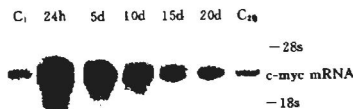


Fig 5. c-myc mRNA expression of aorta 24 h, 5, 10, 15 and 20 days after balloon injury. c_1 = control group in one day, c_{20} = control group in 20 days.

3 讨论

球囊导管损伤能快速诱导某些癌基因的表达^[2], c-fos 和 c-jun mRNA 能在损伤后 30 min 内上升, 90 min 后又降至基础水平。本实验研究了损伤内皮后 c-myc mRNA 的动态变化, 观察到在内皮剥脱后 24 h, c-myc 基因表达高, 同时可见血小板粘附血管内膜。粘附的血小板可释放一些生长因子如 PDGF, 促进 SMC c-myc 基因表达, 这是通过旁分泌机制实现的。而 c-myc 蛋白产物具有激活 DNA 转录的作用。本室以前的研究^[5]发现内皮素诱导增殖的 SMC 中 c-myc 基因和 hsp70 基因表达均增加, 反义 myc 寡核苷酸抑制 c-myc 基因的表达, 同样也抑制 hsp70 基因的表达, 说明 c-Myc 蛋白可激活 hsp70 基因, 起着细胞 DNA 复制起始和转录增强子的作用。Hsp 蛋白可通过伴侣与细胞增殖相关的蛋白而影响细胞的增殖活性^[6]。因此内皮拉伤后平滑肌细胞的增殖可能与 c-myc 激活 hsp70 有关。另一方面, c-myc 基因产物也可激活生长因子基因而促使 SMC 增殖。因此, 在内皮剥脱、c-myc 基因高表达之后, 即有 SMC 由中膜迁入内膜, 并增殖。

在损伤后 5 天、10 天和 15 天, 平滑肌细胞增殖活跃。并有 c-myc 基因持续表达, 这可能是因为增殖旺盛的平滑肌细胞本身可释放多种生长因子, 通过自分泌机制促进 c-myc 的表达^[7]。Miano 等人的实验观察到 c-myc 基因在动脉内皮剥脱 7 天后又重新被激活, 并持续至 14 天, 而某些生长因子基因如 PDGF-A 链、bFGF 的转录分别在内皮剥脱后 2 h、6 h 升高 3 倍, TGF- β_1 亦有表达, 其相应的受体基因在内皮剥脱后 2~12 h 转录

亦增加, 由此可知 c-myc 的重新激活是在生长因子基因及其受体基因表达之后。本实验结果与此不完全相同, 可能是由于实验选择时间点不同所造成的。在 20 天时 SMC 增殖相对稳定, 无继续增长趋势, 此时 c-myc 基因表达水平也趋于对照组水平。因此, c-myc 基因在内皮剥脱后 24 h~15 天时持续表达是 SMC 增殖所必需的。由于 c-myc 基因在 SMC 增殖中起着重要作用, 因此阻断 c-myc 基因的表达, 可能阻止动脉粥样硬化及再狭窄的形成。

4 参考文献

- 1 Stemerman MB, Ross R. Experimental atherosclerosis. I. Fibrous plaque formation in primates an electron microscopic study. *J Exp Med*, 1972, 136: 769
- 2 Miano JM, Tota RR, Vlasic N et al. Early protooncogene expression in rat aortic smooth muscle cells following endothelial removal. *Am J Pathol*, 1990, 137: 761
- 3 杨和平, 刘革修, 万腊香 et al. 大鼠主动脉内皮剥脱后平滑肌细胞增殖与 c-sis 基因表达的关系. *临床与实验病理学杂志*, 1994, 10 (2): 152~153.
- 4 Chomzynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156
- 5 杨永宗, 杨和平, 万腊香 et al. 表达核内产物的癌基因与动脉粥样硬化. *北京医科大学学报*, 1994, 26 (增刊): 262~263.
- 6 Pechan PM. Heat shock proteins and cell proliferation. *FEBS*, 1991, 280 (1): 1
- 7 Miano JM, Vlasic N, Tota RR et al. Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. A putative in vivo mechanism for autocrine growth. *Arterios Throm*, 1993, 13 (2): 211~219.