

转导 C 型钠尿肽基因对血管成形术后 血管平滑肌细胞增殖的影响

裴晓阳¹, 冯建章², 徐亚伟¹, 朱梦云¹, 于学靖¹

(1. 上海市第十人民医院, 上海市 200072; 2. 广东省心血管病研究所, 广东省广州市, 510100)

[关键词] 病理学与病理生理学; C 型钠尿肽; 血管成形术; 基因转导; 增殖细胞核抗原

[摘要] 目的 观察局部转导 C 型钠尿肽基因对损伤后血管平滑肌细胞增殖的影响。方法 将 84 只雄性新西兰大白兔随机均分为正常、对照和实验 3 组。后 2 组高脂饮食喂养, 并以球囊损伤兔髂动脉建立再狭窄模型。对照组局部转导逆转录病毒载体携带的碱性磷酸酶基因; 实验组局部转导逆转录病毒载体携带的 C 型钠尿肽基因。于术后第 3 天、第 1 周末、第 2 周末和第 4 周末取损伤段动脉进行氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验和增殖细胞核抗原免疫组织化学检测, 采用计算机图像分析仪测量血管腔面积、内膜厚度、内膜面积、内膜与中膜面积比。结果 对照组和实验组在后 3 天血管内膜面积、内膜厚度、内膜/中膜比值开始逐渐增加, 术后 2 周上述各值显著增加, 但实验组上述指标明显低于对照组(后第 3 天、第 1 周末 $P < 0.05$, 后第 2 周、第 4 周末 $P < 0.01$)。氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验发现, 术后第 3 天, 对照组和实验组氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量开始增加, 但两组无显著差异($P > 0.05$); 术后第 1 周, 实验组氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量明显低于对照组($P < 0.05$), 术后 4 周末, 实验组氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量已降至接近正常水平($P > 0.05$), 而对照组氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入量增加值仍高于正常组($P < 0.01$)。增殖细胞核抗原免疫组织化学显示对照组髂动脉损伤后 2 周在内膜层可见大量增殖细胞核抗原阳性细胞。而实验组增殖细胞核抗原阳性细胞表达不显著。结论 局部转染 C 型钠尿肽基因可有效抑制血管成形术后血管平滑肌细胞增殖及内膜增生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of C-type Natriuretic Peptide Gene Transduction on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation after Angioplasty

PEI Xiao-Yang¹, FENG Jian-Zhang², XU Ya-Wei¹, ZHU Meng-Yun¹, and YU Xue-Jing¹

(1. Department of Cardiology, Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai, 200072; 2. Department of Cardiology, Guangdong Provincial Cardiovascular Institute, Guangzhou, 510100, China)

[KEY WORDS] G-type Natriuretic Peptide; Angioplasty; Gene Transfer; Proliferating Cell Nuclear Antigen

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of C-type natriuretic peptide (CNP) gene transduction on vascular smooth muscle cell proliferation after angioplasty. **Methods** Eighty-four rabbits were divided into 3 groups equally: normal, control and test group. The control and test group had been given high cholesterol diet from 7 d pre-experiment to being killed. All rabbits were fed by high cholesterol diet. Restenosis models were established by injured iliac artery in control group and test group. In control group, alkaline phosphatase gene that retroviral vector carried was transferred at injured site. In test group, CNP gene that retroviral vector carried was transferred at injured site. Iliac arteries injured were harvested for ^3H -TdR incorporation, immunohistochemistry analysis of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Lumen area, neointimal thickness, neointimal area, neointimal area/media area were measured by image analysing system. **Results** Iliac arteries injured by balloon, 3 days later, neointimal thickness, neointimal area and neointimal area/media area were increased in control group and test group, and the index was markedly increased after 2 weeks later. The index of test group was less than control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Incorporation of ^3H -TdR became higher 3 days later after balloon angioplasty in control group and test group, but there was no significant difference in two groups ($P > 0.05$). ^3H -TdR incorporation of test group was less than control group 1 week later after balloon angioplasty ($P < 0.05$). ^3H -TdR incorporation of test group was near to normal level 4 weeks later after balloon angioplasty ($P > 0.05$), but there was still higher in control group ($P < 0.01$). Immunohistochemistry staining of PCNA suggested that large numbers of PCNA-positive cells were seen at intima layer 2 weeks later after balloon angioplasty in control group, but there were no conspicuous express in test group. **Conclusion** Local CNP gene transduction could effectively inhibit vascular smooth muscle cell (VSMC) proliferation and intimal hyperplasia after angioplasty.

[收稿日期] 2005-01-27 [修回日期] 2006-02-14

[基金项目] 广东省医学科研基金(A2003056)

[作者简介] 裴晓阳, 博士, 主治医师, 联系电话为 13266533026 或 0755-83982222-8381, E-mail 为 mpwpei@yahoo.com.cn, 现在深圳市第四人民医院工作, 研究方向为心血管病介入基础与临床。冯建章, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事心血管病研究。徐亚伟, 博士研究生, 主任医师, 主要从事心血管病介入临床研究。

血管成形术后再狭窄是血管内膜增生与血管重构的损伤反应过程^[1]。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖被认为是血管成形术后再狭窄的关键因素,血管损伤后细胞表型改变,从收缩型转变为合成型,合成的VSMC迁移,并在内膜增殖导致内膜增厚和再狭窄。C型钠尿肽(C-type natriuretic peptide, CNP)是近年发现的钠尿肽家族新成员,主要由内皮细胞产生,具有舒张血管、抑制VSMC增殖和迁移等作用,以自分泌和旁分泌方式参与血管重塑过程^[2-5]。本实验观察在体局部转CNP基因对血管成形术后VSMC增殖的影响,旨在探讨转CNP基因对血管成形术后再狭窄的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组与动物模型建立

8~10月龄健康雄性新西兰白兔84只,体重 2.7 ± 0.5 kg,由中山大学北校区实验动物中心提供。随机均分为正常组、对照组和实验组。正常组仅饲普通饮食,对照组和实验组用高脂饲料(普通饲料中加入1%胆固醇、7.5%蛋黄粉和8%猪油)喂养,7 d后两组行内膜剥脱术。在无菌条件下,经股动脉逆行插入球囊导管(内径2.5~3.0 mm, Cordis公司),深度15 mm,膨胀后维持6~8个大气压,缓慢回拉至切口处,抽空后重复上述过程3次,以剥脱内皮。然后,对照组插入涂有逆转录病毒载体携带碱性磷酸酶基因(即对照基因)的球囊,维持8个大气压5 min;实验组插入涂有携带CNP基因的逆转录病毒载体(PLXSN-CNP)的球囊,局部转染5 min。缝合切口,继续予以高脂饮食。于术后第3天、第1周、第2周和第4周末各处死家兔7只,正常组亦在相应的时间点处死家兔。

1.2 基因涂布球囊

20 mg左旋多聚赖氨酸溶于10 mL去离子水中,用透析袋(相对分子质量6 000)充分透析,将透析后的多聚赖氨酸冰冻干燥,取5 mg溶解于200 μ L磷酸缓冲液(PBS, pH7.4)中,均匀涂于球囊表面。取500 μ L脂质体(lipofectamine, Gibco)和林格氏液按体积1:1室温孵育5 min后加入500 μ g PLXSN-CNP,均匀涂布于球囊表面,全部过程在无菌台上进行。对照组基因涂布球囊方法同实验组。

1.3 病理标本制作及内膜或中膜增生检测方法

于髂动脉内皮剥脱处截取1.5 cm,用生理盐水冲洗,放入10%甲醛液中固定12~14 h,石蜡包埋切片,HE染色和弹力纤维染色,普通光镜观察。以计

算机图像分析仪分析血管内外径及内弹力层包围面积(IEL)、外弹力层包围面积(EEL)、IEL/EEL、中膜面积(MA)、内膜面积(NEA)/MA等指标。内膜面积=内弹力层包围面积-管腔面积;中膜面积=外弹力层包围面积-内弹力层包围的面积。

1.4 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验

将血管标本迅速置生理盐水中洗净,去除结缔组织及外膜,纵行切开后制成组织片,放置1.5 mL RPMI1640培养基中,加入37 kBq氚标胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-thymine deoxyriboside, ³H-TdR), 37℃恒温箱内(通95% O₂ + 5% CO₂)温育24 h,取出后用PBS(pH7.2)冲洗3次,滤纸吸干称重。以高氯酸和双氧水各0.5 mL在80℃温箱中温育60 min消化后,加入5 mL闪烁液并用无水酒精调至平衡,用液体闪烁记数仪测定³H-TdR的放射活性,以每分钟计数(counts per minute, CPM)表示。计算每克组织中³H-TdR的掺入量增加值(损伤段血管与正常血管³H-TdR掺入量之间的差值)。

1.5 增殖细胞核抗原免疫组织化学检测

试剂盒购于北京中山生物技术有限公司。采用二步法对病理切片行PCNA免疫组织化学染色。简要步骤为:切片常规脱蜡、水化;3% H₂O₂孵育5 min;PCNA微波抗原修复5 min;PBS冲洗后加PCNA单抗,室温30~60 min, PBS冲洗3×15 min;滴加鼠抗兔IgG抗体-辣根过氧化物酶(HRP)多聚体,孵育30 min;应用DAB溶液显色。染色后对部分切片用苏木紫轻度复染,脱水、封片。

细胞核呈棕色的为PCNA阳性,表明细胞处于增殖期。计算出阳性细胞百分率。其方法为:在光学显微镜下将切片放大40倍,每张随机选择10个视野,分别计数40倍物镜下每个视野中血管PCNA阳性细胞数(P)和观察的细胞总数(A),求出阳性细胞百分率(P/A, %),取平均值。

1.6 统计学处理

以SPSS10.0软件进行统计学分析,实验结果以均数±标准差表示,两组资料间的比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。多组资料间的比较采用方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 普通光镜HE染色检查

对照组术后即刻表现为内膜撕裂,第3天出现新生内皮细胞附着,第7天内膜增厚,VSMC排列紊乱,第14天内膜增厚最为显著,增厚的内膜以VSMC

为主,胞核大小不一,排列紊乱(图 1A)。而实验组内膜无显著增厚(图 1B)。

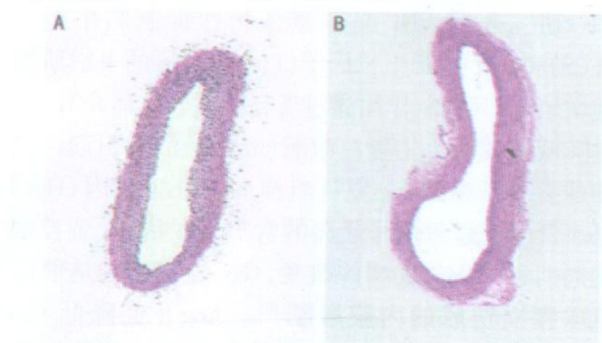


图 1. 光学显微镜下的血管内膜(HE 染色, $\times 40$) A 为对照组, B 为实验组

2.2 损伤血管内膜或中膜增生情况

计算机图像分析仪测量发现,术后第 3 天,对照组血管内膜面积(表 1)、厚度(表 2)、内膜/中膜比值开始逐渐增加;术后 2 周上述指标值显著增加,以后增加幅度变化不大。实验组术后血管内膜面积(表 1)、厚度(表 2)、内膜/中膜比值亦有所增加,但增加幅度不大,与对照组相比,上述指标均有所降低(术后第 3 天和第 1 周时 $P < 0.05$, 术后第 2 周和第 4 周时 $P < 0.01$)。术后 3 天,对照组血管管腔面积(表 3)开始减少,术后 2 周管腔面积显著减少;而实验组血管管腔面积(表 3)减少不明显,与对照组相比有统计学差异(术后第 3 天和第 1 周时 $P < 0.05$, 术后第 2 周和第 4 周时 $P < 0.01$)。

表 1. 3 组动物在不同时间的血管内膜面积 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	实验前 (n=28)	术后第 3 天 (n=7)	术后 1 周 (n=7)	术后 2 周 (n=7)	术后 4 周 (n=7)
正常组	2.61 \pm 0.43	2.71 \pm 0.51	2.54 \pm 0.49	2.70 \pm 0.65	2.65 \pm 0.54
对照组	2.59 \pm 0.58	3.65 \pm 0.62 ^d	4.02 \pm 0.78 ^d	5.28 \pm 1.63 ^d	5.65 \pm 1.70 ^d
实验组	2.63 \pm 0.52	2.87 \pm 0.65 ^a	2.95 \pm 0.71 ^a	3.03 \pm 0.79 ^b	3.32 \pm 0.78 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; d 为 $P < 0.01$, 与实验前比较。

表 2. 3 组动物在不同时间的血管内膜厚度 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	实验前 (n=28)	术后第 3 天 (n=7)	术后 1 周 (n=7)	术后 2 周 (n=7)	术后 4 周 (n=7)
正常组	0.30 \pm 0.01	0.28 \pm 0.04	0.27 \pm 0.02	0.33 \pm 0.05	0.32 \pm 0.03
对照组	0.29 \pm 0.02	0.59 \pm 0.14 ^d	0.69 \pm 0.23 ^d	1.23 \pm 0.25 ^d	1.31 \pm 0.24 ^d
实验组	0.33 \pm 0.07	0.36 \pm 0.17 ^a	0.38 \pm 0.18 ^a	0.39 \pm 0.11 ^b	0.41 \pm 0.21 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; d 为 $P < 0.01$, 与实验前比较。

2.3 氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验结果

内皮剥脱术后 3 天,对照组和实验组³H-TdR 掺

入量增加值开始增加,但两组无显著差异($P > 0.05$);术后第 1 周,实验组增加值明显低于对照组($P < 0.05$),术后 4 周时,增加值已降至接近正常水平($P > 0.05$),而对照组³H-TdR 掺入量增加值仍高于正常值($P < 0.01$, 表 4)。

表 3. 3 组动物在不同时间的管腔面积 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	实验前 (n=28)	术后第 3 天 (n=7)	术后 1 周 (n=7)	术后 2 周 (n=7)	术后 4 周 (n=7)
正常组	9.23 \pm 0.95	9.45 \pm 1.09	9.68 \pm 1.41	9.78 \pm 1.23	9.13 \pm 1.35
对照组	9.59 \pm 1.37	7.45 \pm 1.29 ^d	6.95 \pm 1.31 ^d	5.18 \pm 1.09 ^d	5.04 \pm 0.97 ^d
实验组	9.57 \pm 1.32	9.08 \pm 1.25 ^a	8.87 \pm 1.34 ^a	8.13 \pm 1.15 ^b	8.24 \pm 1.07 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; d 为 $P < 0.01$, 与实验前比较。

表 4. 3 组动物氚标胸腺嘧啶脱氧核苷掺入实验结果 (CPM/g $\times 10^5$, $\bar{x} \pm s$)

分 组	术后第 3 天 (n=7)	术后 1 周 (n=7)	术后 2 周 (n=7)	术后 4 周 (n=7)
正常组	28.9 \pm 9.1	30.6 \pm 7.9	29.7 \pm 8.4	31.3 \pm 9.2
对照组	43.9 \pm 12.2	66.3 \pm 12.3	79.2 \pm 13.3	56.4 \pm 10.6 ^f
实验组	42.3 \pm 10.3	49.5 \pm 14.3 ^a	55.3 \pm 11.5	40.2 \pm 14.4

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; f 为 $P < 0.01$, 与正常组比较。

2.4 增殖细胞核抗原表达的免疫组织化学分析

增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组织化学染色发现,术后第 3 天,对照组有较多 PCNA 阳性细胞出现;术后第 1 周,内膜层大量阳性细胞增加;术后第 2 周时,内膜层可见大量阳性细胞(图 2A),内膜增生达高峰。术后第 4 周时血管内膜仍继续增厚,但增生速度减慢,仅靠近管腔面有少量阳性细胞。而实验组 PCNA 在上述各时间点表达不明显(图 2B),PCNA 阳性细胞数在各时间点较对照组均明显减少($P < 0.01$, 表 5)。

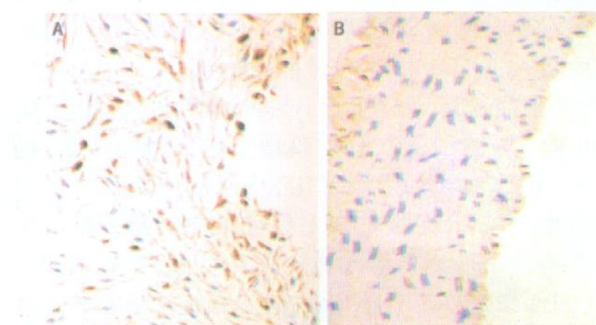


图 2. 血管内膜免疫组织化学染色结果图($\times 200$) A 为对照组, B 为实验组。

表 5. 对照组和实验组术后不同时间增殖细胞核抗原阳性细胞数的比较

分 组	术后第 3 天	术后 1 周	术后 2 周	术后 4 周
对照组	24.6±3.3	33.5±2.6	39.5±5.2	11.6±1.7
实验组	12.8±3.6 ^b	20.3±2.0 ^b	23.2±2.5 ^b	8.4±1.0 ^b

b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

再狭窄是影响血管成形术后远期疗效的一大难题,多年来人们围绕再狭窄的机制展开了大量的研究。这些研究结果表明,再狭窄是血管损伤的一种修复反应,是多种细胞因子和生长因子介导的局部血管重建和再塑,是 VSMC 增殖、迁移,血管内膜过度增生以及细胞外的基质分泌和堆积的结果。其中血管损伤后细胞表型从收缩型转变为合成型,合成型的 VSMC 迁移,并在内膜增殖是血管成形术后再次狭窄的关键因素^[5,6]。

研究结果发现,实验组和对照组在术后 3 天³H-TdR 掺入量增加,提示 VSMC 呈反应性增殖。但实验组在一周时血管³H-TdR 掺入量增加值明显低于对照组,且第 4 周时,³H-TdR 掺入量已降至正常水平,而对照组仍然增高,提示转 CNP 基因可抑制 VSMC 的 DNA 合成,阻止 VSMC 的增殖。Segawa 等^[7]观察了 CNP 对培养大鼠系膜细胞增殖的影响,研究表明 CNP 呈剂量依赖性抑制系膜细胞³H-TdR 掺入,CNP 和心房钠尿肽(ANP)均能减少白细胞介素 1、白细胞介素 6、血小板源生长因子(PDGF)及血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 诱导的³H-TdR 掺入,且 CNP 抑制系膜细胞的增殖依赖于蛋白磷酸化途径。

增殖细胞核抗原(PCNA)又称细胞周期蛋白,其免疫活性能较好的反映 VSMC 增殖及内膜增生,PCNA 增多提示细胞增殖活跃。因此,已广泛应用于血管成形术后再次狭窄的研究^[8]。本研究发现,在髂动脉内皮剥脱第 14 天时,对照组内膜层可见大量的 PCNA 阳性细胞,说明此时 VSMC 增殖明显,此与³H-TdR 掺入量增加值以及内膜增生达高峰相一致,提示 VSMC 增殖参与内膜增生,从而促使血管再狭窄的发生、发展。而转 CNP 基因组³H-TdR 掺入量增加值在内皮损伤第二周时较对照组明显降低,且 PCNA 阳性细胞数亦明显降低,两者有统计学差异。这说明在体局部转 CNP 基因可抑制血管损伤后的

VSMC 增殖,进一步证实转导 CNP 基因抑制动脉粥样硬化兔髂动脉损伤后内膜增生的效应可能与抑制 VSMC 增殖有关。

研究表明 CNP 呈剂量依赖性抑制胎牛血清(FCS)和血小板源生长因子(PDGF)诱导的平滑肌细胞增殖^[9],其抑制作用通过鸟苷酸偶联受体介导,经过降低丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)活性引起。已知球囊损伤模型上,生长阻抑 homeobox 基因(Gax)是血管生长过程信号通路的常见转录因子,调控细胞周期和 VSMC 表型的改变,Gax 的过度表达能降低球囊损伤后的内膜增厚^[10]。Ang $\text{I}(\text{I})$ 能降低 Gax mRNA 的表达,而 CNP 可通过生成环一磷酸鸟苷(cGMP)促进 VSMC GaxmRNA 的表达,表明 CNP 具有促进 Gax 基因表达,抑制内膜增厚作用^[11]。Doi 等^[12]在培养的血管平滑肌细胞转导腺病毒介导的 CNP 基因,可引起细胞在细胞周期 G1 期生长的抑制,且可以引起血管平滑肌细胞表型的转变。

[参考文献]

- [1] Casscells W, Engler D, Willerson JT. Mechanisms of restenosis [J]. *Tex Heart Inst J*, 1994, **21** (1): 68-77
- [2] Barr CS, Rhodes P, Struthers AD. C-type natriuretic peptide [J]. *Peptides*, 1996, **17** (7): 1 243-251
- [3] Shinomiya M, Tashiro J, Saito Y, Yoshida S, Furuya M, Oka N, et al. C-type natriuretic peptide inhibits intimal thickening of rabbit carotid artery after balloon catheter injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, **205** (2): 1 051-056
- [4] Matuo H, Furuya M. C-type natriuretic protein inhibits intimal thickening after vascular injury [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1997, **81** (1): 45-47
- [5] 秦旭平,廖端芳,李元建. 血管平滑肌细胞增殖及其调控[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** (5): 450-454
- [6] 周秀霞,温进坤,韩梅. 血管再狭窄发生过程中血浆组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂活性与胶原转换的变化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2000, **8** (2): 96-98
- [7] Segawa K, Minami K, Jimi N, Nakashima Y, Shigematsu A. C-type natriuretic peptide inhibits rat mesangial cell proliferation by a phosphorylation-dependent mechanism [J]. *Nau Schm Arch Pharmacol*, 1998, **357** (1): 70-76
- [8] Stadus ML, Gown AM, Kernoff R, Collins CL. Cell proliferation after balloon injury of iliac arteries in the cholesterol-fed New Zealand white rabbit [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14** (5): 727-733
- [9] Ikeda M, Kohno M, Yasunari K, Yokokawa K, Horio T, Ueda M, et al. Natriuretic peptide family as a novel antimigration factor of vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (4): 731-736
- [10] Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular diseases [J]. *Science*, 1996, **272** (5262): 689-693
- [12] Yamashita J, Itoh H, Ogawa Y, Tamura N, Takaya K, Igaki T, et al. Opposite regulation of Gax homeobox expression by angiotensin II and C-type natriuretic peptide [J]. *Hypertension*, 1997, **29** (1 Pt 2): 381-387
- [13] Doi K, Itoh H, Ikeda T, Hosoda K, Ogawa Y, Igaki T, et al. Adenovirus-mediated gene transfer of C-type natriuretic peptide causes G1 growth inhibition of cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **239** (3): 889-894

(此文编辑 胡必利)