

文章编号:1005-6947(2008)12-1196-05

· 基础研究 ·

联用 c-myb ASON 与 VEGF 防治血管成形术后再狭窄的研究

张铁民¹, 赵宪琪¹, 杨予川², 史春颖², 陈颖², 郭欣¹, 朴大勋¹, 姜洪池¹

(哈尔滨医科大学第一临床医学院 1. 普通外科 2. 放射科, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:目的 评估联合应用 c-myb 反义寡核苷酸 (ASON) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 对血管成形术后再狭窄的效果。方法 28 只中国长耳白兔随机分成狭窄对照 (I) 组, 狭窄 c-myb ASON 处理 (II) 组, 狭窄 VEGF 处理 (III) 组和狭窄 c-myb ASON + VEGF 处理 (IV) 组。测定治疗后各组血管狭窄程度, 并进行比较分析。结果 处理后各组均呈不同程度的血管内膜及血管平滑肌增生, 以 I 组最重, II, III 组增生情况较 I 组明显减轻, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。IV 组增生情况较 II, III 组更轻, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 但 II, III 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Western blotting 结果显示, 各组间灰度均有明显差别。结论 c-myb ASON 与 VEGF 联合应用能显著减轻血管成形术后的再狭窄, 但两者之间无协同作用。 [中国普通外科杂志, 2008, 17(12):1196-1200]

关键词: 血管成形术; 气囊; 血管内皮生长因子; 反义寡核苷酸; c-myb; 再狭窄

中图分类号: R 654.3

文献标识码: A

The combined use of c-myb antisense oligonucleotide and vascular endothelial growth factor gene for preventment and treatment of restenosis after angioplasty

ZHANG Tiemin¹, ZHAO Xianqi¹, YANG Yuchuan², SHI Chunying², CHEN Ying², GUO Xin¹, PIAO Daxun¹, JIANG Hongchi¹

(1. Department of General Surgery 2. Department of Radiology the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of combined use of antisense oligonucleotide (c-myb ASON) and vascular endothelial growth factor (VEGF) on restenosis after angioplasty. **Methods** China rabbits were randomly divided to control group, VEGF treatment group, c-myb ASON treatment group, c-myb ASON + VEGF treatment group. Each group consisted of 7 rabbits with the same lesion of left common carotid artery. Evaluation on restenosis was done by pathological section and immunohistochemistry, and Western-Blotting for the expression of PCNA. **Results** All groups had varying degrees of vascular endothelial and smooth muscle hyperplasia, especially in control group. The hyperplasia in c-myb ASON and VEGF groups were better than control group ($P < 0.01$), and c-myb ASON + VEGF combination group was better than c-myb ASON or VEGF groups ($P < 0.01$). The results of Western-Blotting were similar to those of pathological section. **Conclusions** Combined use of c-myb ASON and VEGF has definite effect in preventing restenosis after angioplasty, but c-myb ASON and VEGF do not have inter-related synergism.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(12):1196-1200]

Key words: Angioplasty; Balloon; VEGF; Antisense Oligonucleotide; c-myb; Restenosis

CLC number: R 654.3

Document code: A

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D0333); 黑龙江省教育厅科学技术研究项目 (11531173); 哈尔滨市青年科学研究基金项目 (2003AFQXJ044)。

收稿日期: 2008-07-29; **修订日期:** 2008-11-28。

作者简介: 张铁民, 男, 哈尔滨医科大学第一临床医学院副主任医师, 主要从事普外科临床与基础方面的研究。

通讯作者: 赵宪琪 E-mail: ztmgn@163.com

经皮腔内血管成形术(percutaneous transluminal angioplasty, PTA)是目前治疗动脉硬化性闭塞症(arteriosclerosis obliterans, ASO)的安全有效方法之一,但PTA术后较高的血管再狭窄发生率始终对其疗效有一定的影响。动脉内膜增生是血管再狭窄的基础,反义基因治疗作为一种可特异性阻断和调节致病基因表达的一种技术手段,在多学科疾病的治疗方面显示了广阔的前景。本研究拟通过将VEGF基因和c-myb反义寡核苷酸联合应用以抑制血栓形成和血管壁平滑肌细胞(VSMC)的增殖和迁徙,减轻内膜增生,从而达到防治再狭窄的目的,为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

中国大耳白兔(体重2.5~3.0 kg)28只,由哈尔滨医科大学第一临床医学院动物试验中心饲养,对其进行严格的人道养护。鼠抗兔PCNA抗体及免疫组化试剂购自武汉中杉试剂公司;脂质体转染试剂Lipofectin购自Invitrogen公司(美国);质粒pUC18/VEGF165由本实验室保存;引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 VEGF165真核表达质粒的构建及寡核苷酸制备 根据GenBank(基因数据库)检索人VEGF165 cDNA序列,设计引物。5'端引物和3'端引物分别引入Hind III和Xho I酶切位点。小量抽提质粒pUC18/VEGF165, EcoR I和Xba I双酶切后电泳回收并纯化VEGF165片段;同样步骤完成pcDNA3.1的质粒抽提和回收。将pcDNA3.1和hVEGF165按0.03 pmol:0.1~0.3 pmol比例混合, T4DNA连接酶连接,反应液转化细菌,摇匀后小量抽提重组质粒,重组质粒行酶切鉴定,PCR鉴定和DNA序列分析。多聚酶链反应(PCR)鉴定引物上游为5'-GTGGAATTCGAGCTCG-GTACCG-3';下游为5'-CCCTCTA-GAAGCTTTCAC-CGCCTCGG-3',扩增目的片段长617 bp。参照脂质体转染试剂(lipofectin reagent)说明书转染操作步骤完成重组质粒对ECV304细胞的转染,转染48 h后换无血清培养基,继续培养24 h后收集培养上清液。实验组、对照组和空白组各取5孔,按照酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明书测定各组上清液VEGF蛋白含量^[1]。

1.2.2 c-myb ASON序列的构建 由Invitrogen合成质粒pcDNA3.1/c-myb ASON,所含ASON为

5'-GTG TCG GGG TCT CCG GGC-3'; ASON 5'和3'端各3个磷酸二酯键经过硫代磷酸修饰。

1.2.3 实验动物及模型制作及分组 28只实验白兔随机分成4组,每组7只。I组(对照组)颈总动脉拉伤后不作处理;II组每只动物给予ASON 5 μg;III组每只动物给予VEGF20 μg;IV组每只动物给予ASON 5 μg + VEGF 20 μg。干预物均溶于lipofectin 20 μL + 磷酸盐缓冲液(PBS)20 μL中,涂布于2.0 cm × 1.5 mm球囊,吹干,待用。

实验动物均在术前给予500 U肝素肌肉注射,氯胺酮(35 mg/kg)和甲苯噻嗪(5 mg/kg)静脉麻醉成功后,暴露左侧颈总动脉。直视下将20.0 mm × 1.5 mm球囊导管送至颈总动脉近胸腔入口处, X线透视下,髂总动脉置入导丝至主动脉分叉处作为标记。用1.5个气压充盈球囊加压,回抽使球囊回缩。按上述方法来回拉伤颈总动脉3次后,不同组别动物按实验要求将不同的干预物以涂药球囊置于内膜损伤处,30 min后撤出,缝合伤口。术后予肝素500 U肌肉注射7 d。清洁环境饲养4周后取实验段颈总动脉保存^[2]。

1.3 观测项目

1.3.1 病理学检查 将上述取材动脉经4%多聚甲醛灌注固定,石蜡包埋切片后,用于苏木素-伊红(HE)染色及增殖核抗原(PCNA)免疫组化染色。显微镜下图像采集,40倍下每标本取对称2点,确定管腔、内弹力层、外弹力层和外膜轮廓,测量相应厚度和面积及检测PCNA抗原阳性表达细胞。每片随机取5视野,按阴性(-),弱阳性(+),阳性(++),强阳性(+++)进行半定量分析,其中阳性细胞数<30%记作(+),30%~60%记作(++),>60%记作(+++)。

1.3.2 免疫印迹杂交(Western blotting) 取实验段血管2 mm经0.25%胰酶消化后,匀浆、离心,取上清液。行10% SDS-PAGE电泳,电转移至PVDF膜(Millipore, 0.45 μm)上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h, TBST(Tris 25 mmol/L, NaCl 0.15 mol/L, Tween-20 0.05%)漂洗3次;加入兔抗PCNA抗体(1:100稀释, Santa Cruz), 4℃反应过夜, TBST漂洗3次;加入羊抗兔IgG-HRP(1:1000稀释, Santa Cruz), 室温反应2 h, PBS漂洗3次后碱性磷酸酶显色,拍照保存^[3]。

1.4 统计学处理

采用SPSS11.0统计软件。对参数数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。单因素采用方差分析;组间采用LSD检验,非参数数据采用秩和检验。

2 结果

2.1 再狭窄的图像观察及分析

所有实验组均呈不同程度的内膜及血管平滑肌增生(表1)(图1-4)。以I组为最重,II,III,IV组增生情况较I组为轻,差异均有统计学

意义。IV组增生情况较II,III组均明显减轻;即II,IV组间及III,IV组间差异均有统计学意义($P < 0.01$),但II,III组间差异无显著性($P > 0.05$)。说明联合应用ASON及VEGF较单独应用ASON或VEGF能更显著地减轻再狭窄。

表1 损伤后血管再狭窄数据分析

测量指标	I组	II组	III组	IV组
内膜厚度(μm)	66.71 \pm 6.19	56.24 \pm 6.60 ¹⁾	50.68 \pm 6.52 ^{1), 2)}	46.26 \pm 3.29 ^{1), 3)}
中膜厚度(μm)	62.61 \pm 5.65	66.03 \pm 5.62	59.20 \pm 7.79	53.79 \pm 5.04
内膜面积(mm^2)	1.10 \pm 0.13	0.79 \pm 0.04 ¹⁾	0.60 \pm 0.06 ^{1), 2)}	0.58 \pm 0.05 ^{1), 3)}
中膜面积(mm^2)	1.01 \pm 0.08	1.02 \pm 0.05	1.03 \pm 0.06	0.68 \pm 0.07

注:1)与I组比较, $P < 0.01$;2)与II组比较, $P > 0.05$;3)与II组和III组比较, $P < 0.01$

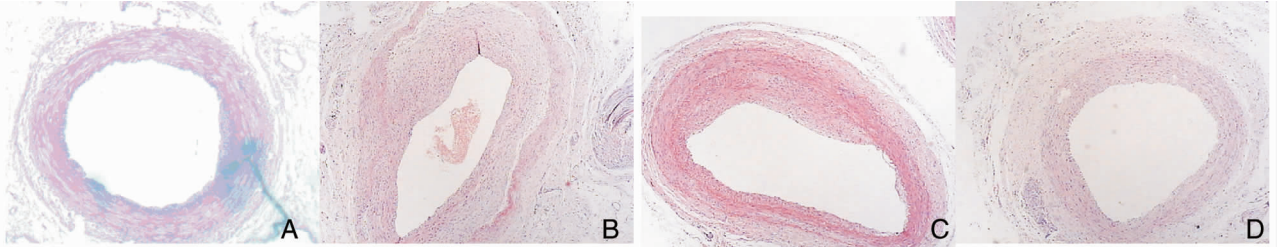


图1 各组血管内膜和中膜(HE $\times 4$)。A:对照(I)组显示内膜及中膜明显增厚;B:III组内膜及中膜增厚,但较I组(A)为轻;C:II组内膜和中膜增厚;D:IV组内膜及中膜仍有增厚,但较II组(C)为轻

2.2 PCNA 免疫组化结果

PCNA表达:I组 $>$ II, III组 $>$ IV组,所有切片未见强阳性反应(图2)(表2)。将联合应用c-myb ASON及VEGF较单独应用c-myb ASON或VEGF实验组进行秩和检验,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 Western-Blotting 检测 PCNA 蛋白的表达

于36kD处出现目标条带。灰度分析显示I~IV组数值分别为9.62 \pm 0.23, 4.93 \pm 1.16, 4.23 \pm 0.36, 0.69 \pm 0.06, ASON + VEGF(IV)组较

ASON(II)组和VEGF(III)组PCNA表达明显下降,各组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)(图3)。

表2 PCNA 免疫组化结果分析

免疫组化结果	I组	II组	III组	IV组
(-)	8	8	4	9
(+)	4	14	17	16
(++)	23	15	14	10
秩和	50	42 ^{1), 2)}	45 ^{1), 2)}	36 ¹⁾

注:1)与I组比较, $P < 0.01$;2)与IV组比较, $P < 0.01$

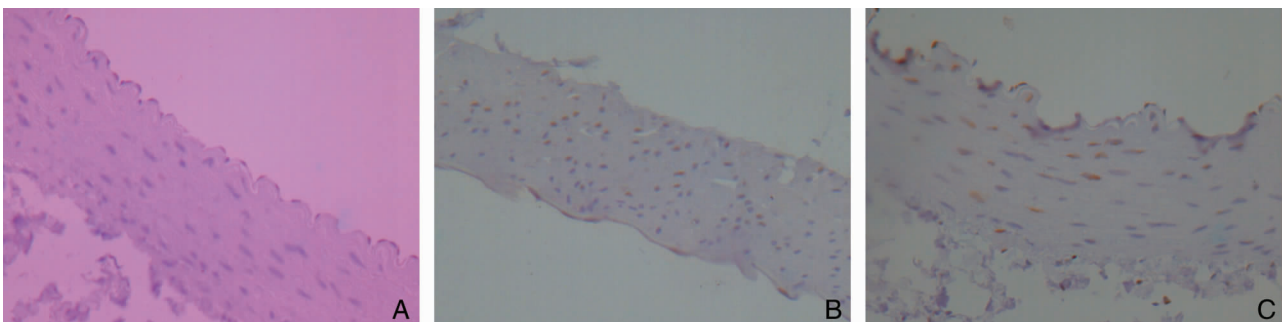


图2 PCNA 的表达(免疫组化法染色 $\times 40$)。A:IV组PCNA表达呈阴性;B:II组PCNA表达呈阳性(+);C:III组PCNA表达呈阳性(+)

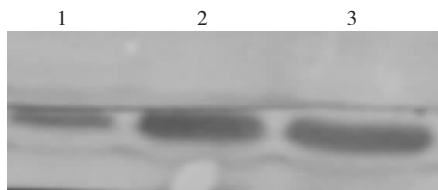


图3 Western Blotting 结果。 1:IV组; 2:II组; 3:I组

3 讨论

血管腔内成形术在临床上被广泛用以治疗周围血管阻塞性疾病,且术后近期效果极佳。但术后半年内再狭窄发生率高达 30% ~ 50%, 使得其远期疗效明显降低。近年来基础研究已证实,血管成形术后血栓形成及血管平滑肌细胞增殖、迁徙和分泌细胞外基质是再狭窄发生的主要病理过程^[4-6]。

目前治疗血管再狭窄主要有两种方法,一是抑制 VSMC 增殖,二是血管再内皮化(reendothelialization)。血管损伤的早期,均有 ras, myc, myb 等原癌基因的过量表达,这与刺激 VSMC 的增殖有关。用这些基因的反义核酸转移可抑制细胞的增殖。Gunn 等^[7]用 c-myb 的反义核酸抑制猪经皮冠状动脉成形术(PTCA)后的内膜增生。Chen 等^[8]选择 c-myc 的反义核酸的药物光辉霉素,能显著降低内膜面积与中膜面积的比值(I/M),同时使 mRNA 转录在术后 2 h 和 6 h 分别下降 66% 和 53%。另外,内皮细胞在保持血管的通畅、防止血栓形成和炎症细胞浸润、抑制再狭窄方面起着重要作用,而 VEGF 对血管内皮细胞的增殖、迁移、水解基膜和血管构建均起作用。其对血管内皮细胞有高度特异性,且无促 VSMC 增殖的不利作用,因而愈来愈受到重视^[9]。实验证明,血管损伤后用 VEGF 治疗,2 周和 4 周内皮化率分别为 80% 和 100%,对照组仅为 44% 和 70%,治疗组 I/M 下降了 34%。VanBelle 等^[10]在兔股动脉置入血管内支架的同时给予 VEGF165 质粒可以加速内皮化,减少附壁血栓和新生内膜形成。

反义寡核苷酸是由 5 ~ 20 个核苷酸构成,可与靶基因 mRNA 形成互补的碱基序列,在细胞内与靶基因杂交后可阻断其翻译过程,抑制靶基因的表达,达到下调靶基因表达的目的。细胞周期调控失调可导致细胞凋亡,c-myb 也控制着细胞周期的调控,应用反义技术使 c-myb 浓度下调可以促进多种细胞系的凋亡^[11]。Schmitt 等^[12]在鼠和兔离体实验中应用反义 c-myb,可以减少 VSMC 的增殖。Lambert 等^[13]在猪血管成形术以及 PTCA 术后应用反义 c-myb 较之用反义 c-myc 更

有利于预防血管的再狭窄。笔者等在更接近临床实际病变情况的动物实验模型上,观察了经微孔球囊导管局部转运 c-myc 反义寡核苷酸对血管成形术后内膜增殖的影响。结果显示,在术后即刻进行血管内局部转运 c-myc 反义寡核苷酸,使相应的基因表达下调,进而抑制血管平滑肌细胞的再生和迁移,减轻血管腔内的增生,4 周后反义治疗组血管新生内膜面积及其与中膜面积的比值均小于对照组。说明反义寡核苷酸可进入以细胞外基质为主的病变处的 SMC 内,并发挥其抑制 SMC 反应性增生的作用。

本实验显示,各干预组内的全部动脉管腔的再狭窄程度比对照组显著减轻,反义寡核苷酸与血管内皮生长因子联合应用较两者单用更能显著减轻再狭窄。血管再狭窄防治过程中,单独选择 ASON 或 VEGF 虽均减轻再狭窄,但都存在剂量依赖性,且易发生不良反应。如大剂量 ASON 易导致脾大、血小板减少、凝血机制异常^[14];而大剂量 VEGF 在体内的过度表达,则可造成血管内膜过度增生,血管粥样斑块形成,诱发肿瘤、关节、视网膜等部位新生血管生成增多及血管通透性增加,出现出血、潜在肿瘤生长等^[15]。联合应用反义技术和 VEGF,在内皮修复和血管平滑肌细胞增殖两个靶点上对血管再狭窄进行干预,具有疗效佳、剂量小、不良反应少的优点,为临床多基因靶点联合干预再狭窄奠定了基础。

参考文献:

- [1] Beatt KJ, Serruys PW, Luijten HE, *et al.* Restenosis after coronary angioplasty: the paradox of increased lumen diameter and restenosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1992, 19(2): 258 - 266.
- [2] Nirat B, James D, Charles J, *et al.* Antirestenotic Effects of a Locally Delivered Caspase Inhibitor in a Balloon Injury Model [J]. *J Circulation*, 2004, 109(1): 108 - 113.
- [3] West NE, Ruygrok PN, Disco CM, *et al.* Clinical and angiographic predictors of restenosis after stent deployment in diabetic patients [J]. *Circulation*, 2004, 109(7): 867 - 873.
- [4] Tomita N, Horiuchi M, Tomita S, *et al.* An oligonucleotide decoy for transcription factor E2F inhibits mesangial cell proliferation in vitro [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(2pt2): 278 - 284.
- [5] Chappell LT. Should EDTA chelation therapy be used instead of long-term clopidogrel plus aspirin to treat patients at risk from drug-eluting stents? [J]. *Altern Med Rev*, 2007, 12(2): 152 - 158.
- [6] Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, *et al.* A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization [J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(23): 1773 - 1780.
- [7] Gunn J, Holt CM, Francis SE, *et al.* The effect of oligonucleotides to c-myb on vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after porcine coronary angioplasty

- [J]. *Circ Res*, 1997, 80(4): 520 - 531.
- [8] Chen SJ, Chen YF, Miller DM, *et al.* Mithramycin inhibits myointimal proliferation after balloon injury of the rat carotid artery in vivo[J]. *Circulation*, 1994, 90(5): 2468 - 2473.
- [9] 涂兵, 金立人. 血管内皮细胞生长因子及有关肢体缺血基因治疗的研究进展[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2000, 7(3): 202 - 204.
- [10] Van Belle E, Maillard L, Tio FO, *et al.* Accelerated endothelialization by local delivery of recombinant human vascular endothelial growth factor reduces in-stent intimal formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 235(2): 311 - 316.
- [11] Salomoni P, Perrotti D, Martinez R, *et al.* Resistance to apoptosis in CTLL-2 cells constitutively expressing c-myc is associated with induction of BCL-2 expression and Myb-dependent regulation of bcl-2 promoter activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(7): 3296 - 3301.
- [12] Schmitt JF, Keogh MC, Dennehey U, *et al.* Tissue-selective expression of dominant-negative proteins for the regulation of vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Gene Ther*, 1999, 6(6): 1184 - 1191.
- [13] Lambert DL, Malik N, Shepherd L, *et al.* Localization of c-myc and induction of apoptosis by antisense oligonucleotide c-myc after angioplasty of porcine coronary arteries [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(11): 1727 - 1732.
- [14] Yamanaka K, Gleave ME, Hara I, *et al.* Synergistic antitumor effect of combined use of adenoviral-mediated p53 gene transfer and antisense oligodeoxynucleotide targeting clustering gene in an androgen-independent human prostate cancer model [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(2): 187 - 195.
- [15] Saaristo A, Veikkola T, Tammela T, *et al.* Lymphangiogenic gene therapy with minimal blood vascular side effects [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(6): 719 - 730.

文章编号:1005-6947(2008)12-1200-01

· 病案报告 ·

胆道结石合并多发性肝结核 1 例

易新华

(湖南省常德市西湖区人民医院 外科, 湖南 常德 415921)

关键词:胆结石;结核,肝;病例报告

中图分类号:R 657.4

文献标识码:D

患者 女, 38岁。因反复上腹部不适10年, 于2008年1月11日入院。既往体健, 无结核病史及结核家族史, 预防接种史不详。体检: 体温36℃, 脉搏90次/min, 血压100/70 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。营养中等, 皮肤巩膜无黄染, 浅表淋巴结无肿大, 胸廓无畸形, 两肺(一)。腹平软, 全腹无压痛及反跳痛, 肝脾肋下未触及, 肝区无叩痛, murphy's 阳性, 移动性浊音阴性。胸部平片: 两肺纹理增多, 未见实质病变。MRI及MRCP提示胆总管、左右肝管及肝内胆管多发性结石, 胆囊炎, 胆囊结石, 肝实质内异常信号占位, 考虑为肝血管瘤可能性大; 脾

大。肝功能: 总蛋白65.85 g/L, 白/球1.0, 总胆红素24.6 μmol/L, 谷草转氨酶49 U/L, 乙型病毒性肝炎标记物阴性。Hb110 g/L; 白细胞 $5.1 \times 10^9/L$; 中性0.69, 淋巴0.31。ESR 20 mm/h。诊断为肝内胆管多发性结石; 肝内占位性质待查。行手术治疗。术中见肝脏质软, 肝左叶表面有5个直径约2.0 cm大小灰白色肿块, 稍高出肝脏表面, 呈散在分布, 质中等, 边界清楚, 胆囊萎缩, 纤维化, 胆总管直径约3.0 cm, 腹腔内未见腹水及肿大的淋巴结, 楔形切除一小块肝脏并快速送病检示肝结核, 创面予以缝合止血; 行胆囊切除、胆总管切开取石、胆总管与空肠行Roux-en-Y吻合。只做一个结节的肝脏肿块局部切除, 结束手术, 术后予以抗炎、抗结核、护肝及对症支持治疗, 住院12 d后康复出院。胆囊病理报告为慢性炎症。出院后继续予以口服抗结核药物治疗6个月, 随访患者未诉不适, 每月复查肝功能均在正常范围。

讨论 多发性肝结核在临床上非常少见, 结核杆菌入肝途径为肝动脉和门静脉, 以肝动脉为多, 病理类型以粟粒型结核最常见, 只有数个结核结节融合在一起才肉眼可辨。本例有5个直径2.0 cm的肝结核。粟粒型肝结核按发生可分为两类, 一是结核杆菌血行播散到许多器官, 其中包括肝脏, 二是原发性粟粒性肝结核[黄洁夫. 腹部外科学(M). 北京: 人民卫生出版社, 2003. 1104 - 1110.]。本例其它部位无结核, 故考虑原发性结核的可能性大。肝结核起病隐匿, 症状无特异性, 本例虽有肝功能损害, 但与胆道结石损害混着在一起, 临床上很容易漏诊, 此次病例也是在手术中才得以确诊。故在临床上遇到不明原因的脾肿大及肝脏占位的患者, 除考虑常见病、多发病外, 还要考虑肝结核的可能。

收稿日期:2008-08-25。

作者简介:易新华, 男, 湖南省常德市西湖区人民医院主治医师, 主要从事肝胆方面的研究。

通讯作者:易新华 E-mail: 359796742@QQ.com