

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.07.017 [http://www.crter.org]

王帅, 刘闰男, 王泰然. 生长反应因子与大鼠颈动脉损伤后内膜增生[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(7):1233-1237.

生长反应因子与大鼠颈动脉损伤后内膜增生*★

王 帅, 刘闰男, 王泰然

中国医科大学附属第一医院心内科, 辽宁省沈阳市 110001

文章亮点:

1 实验成功地构建了大鼠颈动脉球囊损伤模型, 并在该模型上稳定的转染了生长反应因子 decoy ODNs。

2 初步证实了生长反应因子 decoy ODNs 通过与生长反应因子特异性结合, 下调 Cyclin D1 的表达, 使细胞周期停滞从而抑制球囊损伤后血管平滑肌细胞增殖、迁移。③早期生长反应因子 decoy ODNs 在今后经皮冠状动脉介入治疗再狭窄的防治中将发挥重要作用。

关键词:

组织构建; 组织构建与生物活性因子; 生长反应因子; 颈动脉; 损伤; 诱骗寡脱氧核苷酸; Cyclin D1; 球囊损伤; 再狭窄; 国家自然科学基金; 组织构建图片文章

摘要

背景: 经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄仍是影响介入治疗远期疗效的严重的临床问题。

目的: 在大鼠颈动脉球囊损伤模型中, 探讨早期生长反应因子诱骗寡脱氧核苷酸对损伤后的血管内膜的影响, 并初步探讨其分子机制。

方法: 利用 2F Fogarty 导管损伤 Wistar 大鼠颈动脉, 构建大鼠球囊损伤模型, 在转染试剂 Fugene 6 介导下经血管腔内转染生长反应因子诱骗寡脱氧核苷酸, 苏木精-伊红染色法观察血管内膜增生情况, 免疫组化法检测 Cyclin D1, 观察其表达情况。

结果与结论: 早期生长反应因子诱骗寡脱氧核苷酸可以显著抑制大鼠颈动脉球囊损伤后血管内膜增生, 同时也可以下调大鼠颈动脉球囊损伤后表达显著增加的 Cyclin D1。说明生长反应因子诱骗寡脱氧核苷酸可能通过抑制 Cyclin D1 的表达, 使细胞周期停滞, 从而抑制损伤后的大鼠颈动脉内膜的增生。

王帅★, 女, 1986年生, 辽宁省铁岭市人, 满族, 中国医科大学在读硕士, 主要从事心血管内科方面的研究。

Wangshuai0424@126.com

通讯作者:刘闰男, 硕士, 博士生导师, 教授, 主任医师, 中国医科大学附属第一医院心内科, 辽宁省沈阳市 110001

Guinanliu@hotmail.com

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344 (2013)07-01233-05

收稿日期:2012-05-25

修回日期:2012-07-14

(20120425013/D·S)

Decoy oligodeoxynucleotides and neointimal hyperplasia following balloon injury of rat common carotid artery

Wang Shuai, Liu Gui-nan, Wang Tai-ran

Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Abstract

BACKGROUND: Restenosis following percutaneous coronary intervention is still a clinically serious problem which negatively affects the long-term therapeutic benefit of percutaneous coronary intervention.

OBJECTIVE: To investigate the effect of Egr-1 decoy oligodeoxynucleotides *via* intracerebroventricular injection on the neointima after carotid balloon injury and to primarily study its mechanism of inhibiting neointimal hyperplasia, thus providing a new prospect to find a new target of vascular remodeling and restenosis.

METHODS: Endothelial denuded carotid models were prepared in rats by balloon withdrawal injury with the help of 2F Fogarty. Then Egr-1 decoy oligodeoxynucleotides were injected into injured vascular subsection which was mediated by Fugene6 transfection reagent. The extent of neointimal hyperplasia and the expression of Cyclin D1 were detected by hematoxylin-eosin staining and immunohistochemistry, respectively.

Wang Shuai★, Studying for master's degree, Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Wangshuai0424@126.com

Corresponding author: Liu Gui-nan, Master, Doctoral supervisor, Professor, Chief physician, Department of Cardiology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China
Guinanliu@hotmail.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30871074*

Received: 2012-05-25
Accepted: 2012-07-14

RESULTS AND CONCLUSION: Neointimal hyperplasia was significantly inhibited by Egr-1 decoy oligodeoxynucleotides. The expression of Cyclin D1, which was dramatically increased after balloon injury of rat common carotid artery, was significantly down-regulated by Egr-1 decoy oligodeoxynucleotides. Egr-1 decoy oligodeoxynucleotides may inhibit neointimal hyperplasia following balloon injury of rat common carotid artery via down-regulation of Cyclin D1.

Key Words: tissue construction; tissue construction and bioactive factor; growth response factor; carotid artery; injury; oligodeoxynucleotides; Cyclin D1; balloon injury; restenosis; the National Natural Science Foundation of China; tissue construction photographs-containing paper

Wang S, Liu GN, Wang TR. Decoy oligodeoxynucleotides and neointimal hyperplasia following balloon injury of rat common carotid artery. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(7): 1233-1237.

0 引言

近年来,冠心病逐渐成为威胁国民健康的最重要疾病之一,随着经皮冠状动脉介入治疗的广泛临床应用,使冠心病的血管重建成为了可能,但经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄的发生严重影响了其远期疗效。即使应用药物洗脱支架、血管内照射等手段,仍未从根本上解决这一问题,因此,基因治疗受到了人们的广泛关注。生长反应因子是一种锌指结构转录因子,属于即刻早期基因家族成员,在正常血管平滑肌细胞中不表达或低水平表达,而在动脉损伤等刺激下高表达^[1-3]。目前认为血管平滑肌细胞的增生和迁移在血管损伤后再狭窄中起着重要的作用,而血管平滑肌细胞由收缩型向合成型转化是血管平滑肌增殖和迁移的关键起始步骤^[4]。研究发现:生长反应因子不但在血管平滑肌细胞的新生内膜中表达,而且在发生内膜增生之前的中膜中明显表达,但是随着新生内膜增厚,中膜中生长反应因子表达逐渐减少。提示生长反应因子在血管平滑肌细胞表型转化的启动、细胞增殖等方面起重要作用^[5]。

顺式作用元件双链寡脱氧核苷酸,即诱骗寡脱氧核苷酸(decoy oligodeoxynucleotides, decoy ODNs),包含一个增强子元件,后者可以绑定到特定序列的DNA结合蛋白上,从而干扰转录。转录与顺式作用元件序列相似的双链ODNs将导致真正的顺式作用元件-转录因子相互作用的减弱,同时将转录因子从顺式作用元件上移除,从而达到抑制转录因子下游基因表达的作用^[6-8]。实验合成了针对生长反应因子的decoy ODNs,分析其对球囊损伤后大鼠颈动脉内膜的影响和作用机制,期待在分子层面上找到防治血管重塑性疾病及介入后再狭窄等疾病的新靶点。

1 材料和方法

设计: 血管组织构建。

时间及地点: 于2010年10月至2012年3月中国医科大学中心实验室完成。

材料: 共纳入106只健康雄性Wistar大鼠,体质量350-400 g,由中国医科大学实验动物中心提供,许可证号: scxk(辽)2008-0005。其中2只用于转染情况的判定。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

方法:

构建大鼠颈动脉球囊损伤模型: 根据Usui等^[9]的改进方法,所有大鼠用10%的水合氯醛按30 mg/kg腹腔注射给药,麻醉后,沿颈前正中中线切开皮肤,在颈前三角区钝性分离左颈总动脉、左颈内及颈外动脉,暂时阻断左颈总动脉近心及远心端血流,从颈外动脉向颈总动脉插入2F Fogarty球囊导管(购自美国Baxter healthcare corporation)至颈总动脉起始部,向气囊推入0.2 mL生理盐水充盈气囊,缓慢后移至颈内外动脉分叉处,反复球囊3次,退出导管。

术后结扎颈外动脉, 恢复血流, 缝合颈部创口。使用青霉素预防感染, 标准环境饲养。

分组及干预: 取造模成功的96只大鼠随机摸球法均分为4组: 对照组分离出颈总动脉后, 不做球囊拉伤处理; 造模组: 球囊损伤后应用微量注射器局部注入200 μL 含30 μL FuGene6转染试剂(购自Roche公司)的1 mmol/L MgCl_2 稀释液, 这是为稀释液和转染液设计的对照。治疗组: 球囊损伤后, 应用微量注射器局部释放200 μL 含有500 μg FITC标记的生长反应因子decoy ODNs(上海博亚生物技术有限公司合成)、30 μL FuGene6转染试剂和170 μL 1 mmol/L MgCl_2 稀释液, 使其在局部作用20 min。对照治疗组: 球囊损伤后, 应用微量注射器局部释放200 μL 含有500 μg FITC标记的对照decoy ODNs SCR、30 μL FuGene6转染试剂和170 μL 1 mmol/L MgCl_2 稀释液, 使其在局部作用20 min。

转染情况的判定: 大鼠颈动脉球囊损伤后, 将200 μL 含有FITC标记的500 μg 生长反应因子decoy ODNs或decoy ODNs SCR与30 μL 转染试剂FuGene6、170 μL 的1 mmol/L MgCl_2 液, 应用微量注射器局部释放。转染治疗24 h后处死2只大鼠, 立即取治疗局部的血管放入液氮罐中, 经冰冻切片后, 避光于荧光显微镜下观察, 若470–490 nm光激发可见绿色荧光分布, 证明转染成功, 间接推断其他大鼠转染成功。

结果收集: 分别于治疗后3, 7, 14, 21 d分批处死大鼠, 每组6只。分别取出病变血管石蜡包埋制成腊块, 连续切片备用。苏木精-伊红染色法染色后于光镜下观察血管内膜、中膜的厚度改变, 并分组进行计算机图像分析。颈动脉石蜡切片采用SABC(Strept Avidin-Biotin Complex)法进行Cyclin D1的免疫组织化学染色, 以磷酸缓冲液代替一抗作为阴性对照, 以胞核着棕褐色颗粒为阳性细胞。以CyclinD1细胞核标记指数表示Cyclin D1的表达水平, 即阳性细胞占全部细胞的比例。应用 IPP 5.0 软件的计数功能测量分析。

主要观察指标: 局部转染早期生长反应因子1的decoy ODN对球囊损伤颈总动脉后内膜增生及Cyclin D1表达的影响。

统计学处理: 所有数据采用SPSS 17.0软件包进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采取单因素方差分析, $P < 0.05$ 则认为差异有显著性意义。

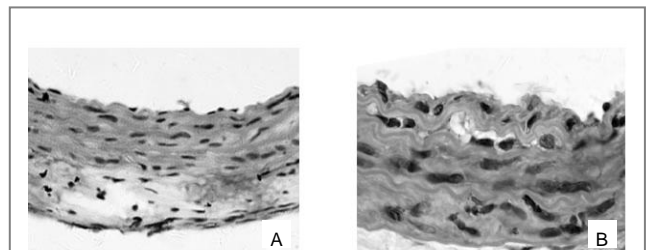
2 结果

2.1 实验动物数量分析 共纳入大鼠106只, 转染后用

免疫荧光镜观察2只。造模成功的96只大鼠进入分组观察, 对照组无脱失, 造模组死亡3只, 治疗组死亡3只, 对照治疗组死亡2只, 死亡大鼠均给予补充, 每组24只进入结果分析。

2.2 体内转染效果观察 转染FITC标记的生长反应因子 decoy ODNs 24 h后, 取治疗局部血管, 制成冰冻切片后于荧光显微镜下观察, 可见残存血管内膜及中膜有大量绿色荧光分布, 证明转染成功。

2.3 大鼠颈动脉形态学观察 大鼠颈动脉球囊损伤后, 可见颈动脉内膜剥脱, 说明大鼠球囊损伤模型构建成功。对照组血管内膜由一层完整的内皮细胞覆盖, 无内膜增生, 见图1A; 造模组随着时间的推移, 内膜逐渐增厚, 内弹力板模糊、断裂, 见图1B; 治疗组内膜增生被显著抑制, 而对照治疗组则无明显的抑制, 见图2。治疗组与同一时间对照治疗组对内膜抑制作用比较, 差异有显著性意义($P < 0.05$), 见表1。



注: A 对照组血管内膜由一层完整的内皮细胞覆盖($\times 200$); B 造模组 3 d 可见血管内膜轻度增生($\times 400$)。

图1 对照组和造模组大鼠颈动脉球囊损伤后血管内膜形态苏木精-伊红染色观察

Figure 1 Intimal morphology after balloon injury of rat common carotid artery observed with hematoxylin-eosin staining in the control and model groups

2.4 大鼠颈动脉免疫组织化学结果 以胞核着棕褐色颗粒为阳性细胞, 对照组无论血管内膜及中膜均未见Cyclin D1阳性颗粒表达; 3 d时造模组及治疗造模组血管壁的Cyclin D1阳性颗粒主要以中膜为主, 而内膜几不可见; 7 d时对照及对照治疗组血管中膜Cyclin D1阳性颗粒表达减少, 而在血管内膜表达增多, 并达到高峰, 此后, Cyclin D1阳性表达颗粒逐渐减少; 同一时间点与造模组及对照治疗组比较, 治疗组Cyclin D1的表达受到明显抑制($P < 0.05$), 见图3。

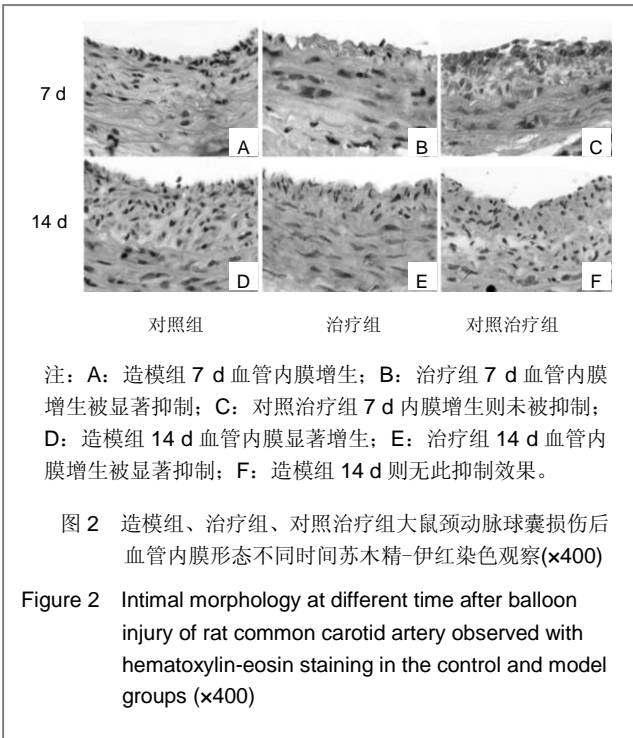


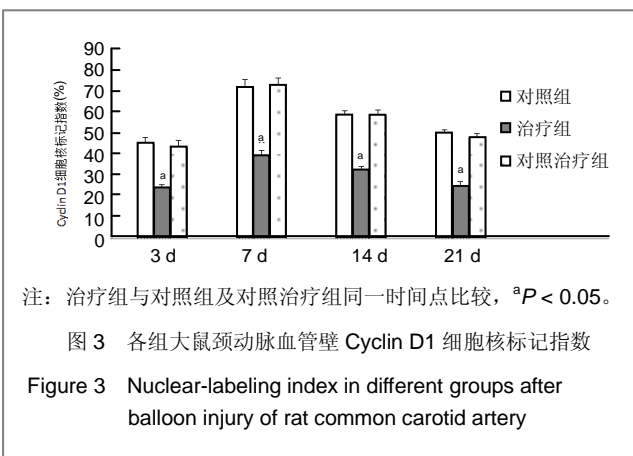
表1 大鼠颈动脉球囊损伤后内膜、中膜厚度的变化

Table 1 Changes in neointimal and medial thickness after balloon injury of rat common carotid artery (x±s, n=6, μm)

组别	部位	治疗后 3 d	治疗后 7 d	治疗后 14 d	治疗后 21 d
造模组	内膜	21.22±3.19	23.86±4.21	24.11±2.99	24.83±2.03
	中膜	53.78±5.38	57.40±6.83	63.19±6.46	63.65±4.93
对照组	内膜	6.64±4.45	49.10±6.89 ^a	72.32±5.49 ^a	89.61±3.37 ^a
	中膜	59.51±8.34	76.45±4.92 ^a	78.27±3.60 ^a	84.18±3.32 ^a
治疗组	内膜	2.02±1.43	27.74±3.98 ^b	41.64±4.22 ^{ab}	54.99±2.25 ^{ab}
	中膜	56.12±7.78	63.17±4.31 ^b	70.28±3.76 ^{ab}	75.86±3.51 ^{ab}
对照 治疗组	内膜	5.64±2.34	50.84±3.93 ^a	71.52±4.30 ^a	90.16±4.80 ^a
	中膜	59.67±4.52	71.85±3.50 ^a	76.42±3.91 ^a	84.38±3.03 ^a

与对照组同一时间点比较, ^aP < 0.05; 与造模组及对照治疗组比较, ^bP < 0.05。

注: 治疗组内膜增生被显著抑制, 而对照治疗组则无明显的抑制。



3 讨论

经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄是一个多转录因子、生长因子参与的, 血管平滑肌细胞表型转化后增殖、迁移至血管内膜, 并释放细胞外基质的复杂过程。正常血管壁中膜是由收缩型的血管平滑肌细胞构成, 这些血管平滑肌细胞分化成熟, 保持着较高的稳定性, 即处于G₀期, 通过舒-缩调节血管张力。在血管损伤等刺激下, 受损部位细胞释放过多的炎性介质及细胞因子等, 使分化成熟的血管平滑肌细胞去分化, 即从收缩型回到合成型, 获得再增殖的能力, 退出G₀期经由G₁期进入G₁/S期, 从血管中膜迁移到血管内膜, 并在内膜大量增殖, 引起血管重塑及再狭窄^[10-11], 而细胞增殖的最终共同通路是细胞周期。细胞周期调控蛋白Cyclin D1作为周期素的一员, 可与CDK4形成复合体, 在G₁早期及中期表达达高峰, 促进细胞进入S期, 是G₁/S转折点的调节因子^[12]。当血管受到外来刺激后引起血管平滑肌细胞增殖迁移的同时, 可以检测到Cyclin D1的高表达^[13]。因此抑制Cyclin D1的表达, 可能为防治经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄提供新靶点。同时研究表明: 生长反应因子可以激活Cyclin D1的表达^[14-15]。生长反应因子是一种锌指结构转录因子, 在正常血管平滑肌细胞中不表达或低水平表达, 而在动脉损伤等刺激下高表达, 参与大量基因的调控。研究表明, 生长反应因子在介导血管平滑肌细胞表型转化、增殖迁移的过程发挥着重要作用^[16-17]。调控生长反应因子的表达即可以从上游调控下游多种靶基因的表达, 可能对防治经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄等疾病的作用更为明确。

实验利用针对生长反应因子的诱骗寡脱氧核苷酸, 旨在研究其在防治经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄中的作用。Han等^[18]在培养的血管平滑肌细胞中证实生长反应因子 decoy ODNs能够有效诱骗游离的生长反应因子与其结合, 特异性抑制血清刺激下高表达的生长反应因子结合活性, 而decoy ODNs SCR并无上述作用。实验发现在大鼠颈动脉球囊损伤模型中, 球囊损伤后与造模组及对照治疗组血管内膜明显增生及血管内弹力板断裂相比, 生长反应因子 decoy ODNs治疗组血管内膜的增生被明显的抑制(P < 0.05)。说明生长反应因子诱骗寡脱氧核苷酸可以显著抑制由球囊损伤造成的血管内膜增生过程。免疫组织化学结果表明, 对照组, 即正常血管中膜及内膜均无Cyclin D1的表达, 而球囊损伤

后, 3 d时Cyclin D1主要在血管中膜表达, 而7 d时主要在血管内膜表达, 并达高峰。这也从侧面说明了增殖的血管平滑肌细胞从断裂的内弹力板爬行至血管内膜导致了再狭窄的发生。此后Cyclin D1的表达逐渐降低。而转染生长反应因子 decoy ODNs可以显著降低Cyclin D1的表达水平。因此相信生长反应因子 decoy ODNs可以特异的与生长反应因子结合, 通过降低Cyclin D1的表达, 使细胞周期停滞从而抑制球囊损伤后血管平滑肌细胞的增殖、迁移、血管内膜的增厚, 从而达到防治血管再狭窄的目的。

综上所述, 实验成功地构建了大鼠颈动脉球囊损伤模型, 并在该模型上稳定的转染了生长反应因子 decoy ODNs。初步证实了生长反应因子 decoy ODNs通过与生长反应因子特异性结合, 下调Cyclin D1的表达, 使细胞周期停滞从而抑制球囊损伤后血管平滑肌细胞增殖、迁移。我们相信生长反应因子 decoy ODNs在今后经皮冠状动脉介入治疗再狭窄的防治中将发挥重要作用。

致谢: 感谢本课题组全体人员对本次实验的帮助。

基金资助: 国家自然科学基金项目(30871074)。

作者贡献: 通讯作者进行实验设计, 实验实施与资料收集为第一作者及第三作者, 实验评估为通讯作者, 第一作者成文, 通讯作者审核。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Rupp J, Hellwig-Burgel T, Wobbe V, et al. Chlamydia pneumonia infection promotes a Proliferative phenotype in the vasculature through Egr-1 activation in vitro and in vivo. J Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102(9):3447-3452.
- [2] Khachigian LM. Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. J Circ Res. 2006;98(2):186-191.
- [3] Khachigian LM. Early growth response-1: blocking angiogenesis by shooting the messenger. J Cell Cycle. 2004;3(1):10-11.
- [4] Wang L, Zheng J, Du Y, et al. Cartilage oligomeric matrix protein maintains the contractile phenotype of vascular smooth muscle cells by interacting with alpha(7)beta(1) integrin. J Circ Res. 2010;106(3):514-525.
- [5] Wada Y, Suzuli J, Kawachi M, et al. Ealy growth response factor-1 and basic transcriptional element-binding Protein 2 expression in cardiac allografts. J Heart Lung Transplant. 2001;20(5):590-594.
- [6] Tomita N, Azuma H, Kaneda Y, et al. Application of decoy oligodeoxynucleotides-based approach to renal diseases. J Curr Drug Targets. 2004;5(8):717-733.
- [7] Ohtani K, Egashira K, Usui M, et al. Inhibition of neointimal haperplasia after balloon injury by cis-element 'decoy' of early growth response gene-1 in hapercholesterolemic rabbits. J Gene Therpy. 2004;11(2):126-132.
- [8] Tomita N, Kashihara N, Morishita R. Transcription factor decoy oligonucleotide-based therapeutic strategy for renal disease. J Clin Exp Nephrol. 2007;11(1):7-17.
- [9] Usui M, Egashira K, Ohtani K, et al. Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy inhibits restenotic changes(neointimal hyperplasia) after balloon injury in rat and monkeys. J FASEB J. 2002;16(13):1838-1840.
- [10] Bonta PI, Pols TW, van Tiel CM, et al. Nuclear receptor Nurr1 is expressed in and is associated with human restenosis and inhibits vascular lesion formation in mice involving inhibition of smooth muscle cell proliferation and inflammation. J Circulation. 2010;121(18):2023-2032.
- [11] Osheroov AB, Gotha L, Cheema AN, et al. Proteins mediating collagen biosynthesis and accumulation in arterial repair: novel targets for anti-restenosis therapy. J Cardiovasc Res. 2011;91(1):16-26.
- [12] Xiang M, Xu YJ, Liu XS, et al. Cigarette smoke extract promotes human pulmonary artery smooth muscle cells proliferation through protein kinase C alpha-dependent induction of Cyclin D1. J Chin Med J (Engl). 2010;123(24):3663-3670.
- [13] Nakagawa M, Ohno T, Maruyama R, et al. Sesquiterpene lactone suppresses vascular smooth muscle cell proliferation and migration via inhibition of cell cycle progression. J Biol Pharm Bull. 2007;30(9):1754-1757.
- [14] Li F, Duman-Scheel M, Yang D, et al. Sonic hedgehog signaling induces vascular smooth muscle cell proliferation via induction of the G1 cyclin-retinoblastoma axis. J Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010;30(9):1787-1794.
- [15] Kavurma MM, Khachigian LM. Sp1 inhibits proliferation and induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by repressing p21WAF1/Cip1 transcription and Cyclin D1-Cdk4-p21WAF1/Cip1 complex formation. J Biol Chem. 2003;278(35):32537-32543.
- [16] Wu Y, Han W, Liu GN. A DNA enzyme targeting Egr-1 inhibits rat vascular smooth muscle cell proliferation by down-regulation of Cyclin D1 and TGF-beta1. J Braz J Med Biol Res. 2010;43(1):17-24.
- [17] Zhang LS, Ma HW, Greyner HJ, et al. Inhibition of cell proliferation by CD44: Akt is inactivated and EGR-1 is down-regulated. J Cell Prolif. 2010;43(4):385-395.
- [18] Han W, Liu GN. EGR-1 decoy ODNs inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia of balloon-injured arteries in rat. J Life Sciences. 2010;86(7-8): 234-243.