

· 论 著 ·

超声联合反义 c-myc 寡核苷酸对移植静脉内膜增生的影响

刘杨东¹, 赵 渝¹, 时 德¹, 彭真年², 廖晓刚³

(1. 重庆医科大学附属第一医院血管外科 400016; 2. 重庆医科大学病理教研室 400016;

3. 重庆医科大学电镜教研室 400016)

摘要:目的 观察超声辐照联合局部应用反义 c-myc 寡核苷酸对移植静脉内膜增生的影响,以期寻找防治内膜增生的新方法。方法 将 24 只兔随机分为 4 组,对照组、超声辐照组、反义核苷酸组、超声辐照加反义核苷酸组,每组 6 只,建立兔自体颈内静脉移植替代颈总动脉模型。超声辐照组术后当天至第 7 天使用超声(2.190 W/cm², 0.8 MHz)辐照移植血管段,反义核苷酸组局部转染反义 c-myc 寡核苷酸。观察移植静脉的组织形态学改变;增殖细胞核抗原(PCNA);反转录 PCR(RT-PCR)检测移植血管段 c-myc 基因的表达。结果 术后第 4 周超声辐照组、反义核苷酸组、超声辐照加反义核苷酸组内膜厚度、PCNA 阳性细胞数、c-myc 基因表达均明显低于对照组($P < 0.01$)。结论 超声辐照和局部转染反义 c-myc 可以降低平滑肌细胞的增殖和减轻内膜增生,可作为静脉移植后再狭窄的防治方法。

关键词:增生;肌,平滑,血管;兔;超声检查;静脉移植,自体;反义 c-myc 寡核苷酸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.26.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)26-2603-03

Effect of ultrasound conjunction with antisense c-myc oligodeoxynucleotides on vein graft intimal hyperplasia

Liu Yangdong¹, Zhao Yu¹, Shi De¹, Peng Zhenian², Liao Xiaogang³

(1. Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016;

2. Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

3. Department of Electron Microscopy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To assess the effect of ultrasound conjunction with antisense c-myc oligodeoxynucleotides treatment on intimal hyperplasia in a vein autograft model which is to find the new method in prevention of intimal hyperplasia. **Methods** 24 rabbits were divided into 4 groups randomly, which including of control group, ultrasound group, antisense c-myc group and ultrasound conjunction with antisense c-myc oligodeoxynucleotides group, and 6 rabbits in each group. Fabricating a common carotid artery interposition model with ipsilateral internal jugular vein. The vein grafts treated by ultrasound (2.190 w/cm², 0.8 MHz) and ultrasound conjunction with antisense c-myc oligodeoxynucleotides. Neointimal thickness was calculated by histomorphometric quantification, expression of PCNA by immunostaining and c-myc expression by RT-PCR. **Results** Compared with the control group, after the fourth week the neointimal thickness, the number of PCNA positive cells and c-myc expression in ultrasound, antisense and ultrasound + antisense other groups were decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** Treatment with ultrasound and antisense c-myc oligodeoxynucleotides seemed to decrease intimal hyperplasia and decelerate SMC proliferation. Therefore, ultrasound conjunction with antisense c-myc oligodeoxynucleotides might be an effective treatment to reduce vein graft restenosis.

Key words: hyperplasia; muscle, smooth, vacula; rabbits; ultrasonography; vein autograft; antisense c-myc oligodeoxynucleotides

有研究发现,超声辐照可以诱导平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的凋亡,抑制 SMC 的增生,超声辐照还可以促进外源基因在培养的血管细胞内表达。而局部应用人工合成的反义寡核苷酸能有效地抑制移植静脉内膜的增生。现将利用超声辐照联合局部应用反义核苷酸影响移植静脉的研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物及分组 新西兰大白兔(重庆医科大学实验动物中心)24 只,雌雄不论,体质量 3.0~3.5 kg,将其随机分为 4 组,每组 6 只。(1)对照组:静脉移植术后仅常规术后处理。(2)超声辐照组:静脉移植术后即日到第 7 天用超声(0.8 MHz, 2.190 W/cm²)辐照 2 min,间隔 1 min,重复 1 次。(3)反义核苷酸组:探头与皮肤间涂超声耦合剂,将溶有吸光值(optical density, OD)为 10(约 300 μg)反义 c-myc 的医用生物蛋白胶均匀涂于移植血管外膜,待蛋白胶充分凝固后,缝合伤口。(4)超声辐照加反义核苷酸组:局部应用 c-myc 加超声辐照。

1.2 建立模型 颈正中切口,取同侧颈内静脉约 2 cm 处置入离断的颈总动脉,9-0 prolene 缝线间断外翻缝合,术后皮下注射肝素 6 250 U。

1.3 仪器 超声辐照仪(重庆医科大学医学超声工程研究所

研制,频率为 0.8 MHz);声功率(武汉中国声学研究所声功率测定仪,声强强度可调范围为 1.512~3.904 W/cm²)。

1.4 反义 C-myc 寡核苷酸序列 根据兔 c-myc cDNA 序列选择相应 mRNA 翻译起始位点 AUG 后 15 和 18 个碱基设计反义序列(表 1)。5'-GAC GTT GAG GGG CAT-3'由上海生工 DNA 自动合成仪上合成,经高压液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)纯化、冻干保存,5'和 3'端各 3 个磷酸二酯键硫代磷酸修饰。PCR 引物的设计根据基因库中兔 c-myc 序列,按 PCR 引物设计要求,经计算机软件分析设计,同时设计 310 bp β-actin 引物作为内对照序列。

表 1 PCR 扩增引物序列

片段名称	扩增片段
c-myc	5'-TGC TGC ATG AAG AGA CAC CC-3' 5'-TTT CAA CTG TTC TCG CGT T-3
β-actin	5'-GAG CAC CCT GTG CTG CTC ACC CTA GC-3' 5'-GTG GTG GTG AAG CTG TAG CCA CGC T-3'

1.5 影像学检查 术后第 2、4 周分别对移植侧颈总动脉及移植静脉作彩色多普勒超声(彩超)和数字减影血管造影(digital subtraction angiography, DSA)检查,了解其通畅情况。并于取

标本前细心解剖出移植血管近端颈总动脉,插入 3F 导管,快速推注碘海醇 10 mL,行 DSA。完毕,导管内注入肝素生理盐水,并保留导管。

1.6 原位灌注固定及标本取材 从造影保留导管注入 4% 多聚甲醛(含 2% 戊二醛),待血管内血液冲洗干净后结扎远心端颈总动脉,保持 100 cm H₂O 压力,充分固定 45 min。取下所需血管段,分别固定于 4% 多聚甲醛和预冷(4℃)的 4% 戊二醛中,以备光镜和电镜制片。

1.7 移植血管 RNA 提取 术后第 14 天,游离出移植的静脉,取含吻合口在内的全部移植血管,每组 4 条血管,置液氮中保存。组织总 RNA 的提取按异硫氰酸胍-酶-氯仿一步法进行。

1.8 反转录 PCR(reverse transcription, RT-PCR) 反应 取 1~5 μg RNA 模板样品加双蒸水(dd H₂O)至 11 μL,按逆转录 PCR 试剂盒说明书步骤加入反应体系进行 PCR 扩增,每一反应体系加入 c-myc 上、下游引物和 β-actin 内参引物各 1 μL(18 μmcc/L)。PCR 仪扩增条件为 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 90 s, 共计 30 次循环,最后 72℃ 延伸 10 min。

1.9 统计学处理 用 SAS 6.12 软件系统对数据进行统计分析。计数资料采用 χ² 检验,计量资料采用 t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

所有实验兔术后均存活,彩超和 DSA 发现除对照组第 4 周有 1 例闭塞外,其余移植血管均通畅。

2.1 组织形态学观察 光镜观察各组移植静脉腔面均有一层内皮细胞覆盖,其下为增生的内膜,主要由大量细胞外基质和 SMC 组成,第 4 周较第 2 周增生明显,且同时段超声辐照组较对照组内膜增生程度轻(插 II 图 1)。电镜下见增生的内膜 SMC 多呈分泌型,富含粗面内质网、高尔基复合体等,而肌丝成分较少,细胞间质为大量胶原纤维和胶原原纤维,而中膜增厚较内膜轻,其内有较多的成纤维细胞和肌成纤维细胞。对照组 SMC 合成、分泌较旺盛。而反义核苷酸组及超声辐照加反义核苷酸组可见 SMC 细胞核固缩、髓样结构,胞质中细胞器含量少等细胞“老化”趋势。

2.2 图像分析结果 超声辐照组、反义核苷酸组、超声辐照加反义核苷酸组与对照组比较,内膜厚度显著降低,分别减少 35%、30% 和 55%(P<0.01),见表 2。

表 2 各组内膜、中膜厚度,内/中膜厚度比值($\bar{x}\pm s, \mu\text{m}, n=4$)

组别	内膜厚度	中膜厚度	内/中膜厚度比值
对照组	63±12	75±8	0.84±0.15
超声辐照组	41±6 [△]	64±7	0.64±0.10
反义核苷酸组	44±5 [△]	68±10	0.65±0.05
反义核苷酸加超声辐照组	27±7 ^{△▲}	60±3	0.45±0.23

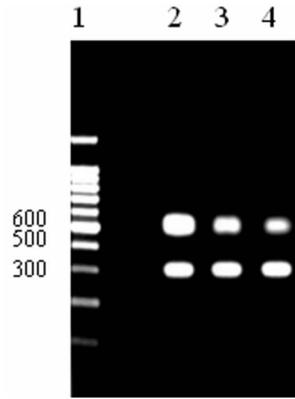
△: P<0.01, 与对照组比较; ▲: P<0.01, 与反义核苷酸组比较。

2.3 移植静脉(增殖细胞核抗原, proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的表达 见表 3。

2.4 RT-PCR 结果(图 2) 可见 500~600 bp 之间和 300~400 bp 之间分别有一条清晰的条带,符合 PCR 扩增引物设计的 569 bp 的 c-myc 基因片段和 310 bp 的 β-actin 基因片段,3 组(对照组、反义核苷酸组、超声辐照加反义核苷酸组)β-actin 扩增产物量相似,但反义核苷酸组,超声辐照加反义核苷酸组明显低于对照组,且超声辐照加反义核苷酸组明显低于反义核苷酸组。

2.5 基因表达结果 见表 3。术后第 2 周,与对照组比较,反义核苷酸组基因表达减少了 47%(P<0.05),超声辐照加反义核

苷酸组减少 74%(P<0.01)。



1: Maker; 2: 对照组; 3: 反义核苷酸组; 4: 超声辐照加反义核苷酸组。

图 2 RT-PCR 扩增产物电泳图

表 3 第 4 周 PCNA 阳性细胞数比较及免疫组织化学分析($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	PCNA 阳性细胞数	OD/ \bar{x}
对照组	51.2±5.7	1.180±0.073
超声辐照组	15.1±2.6 [△]	0.783±0.156 [△]
反义核苷酸组	28.6±1.9 [△]	0.626±0.144 [△]
超声辐照加反义核苷酸组	13.4±0.8 ^{△▲}	0.308±0.175 ^{△▲}

△: P<0.05, 与对照组比较; ▲: P<0.05, 与反义核苷酸组比较。

3 讨论

自体静脉作为移植材料的远期通畅率仍不理想,旁路移植术后失败率约 20%~50%^[1-2],而冠状动脉搭桥术后 10 年仅有约 60% 仍通畅。与人工血管动脉移植后再狭窄的原因相似^[3],移植静脉狭窄、闭塞的主要原因仍为内膜增生导致,SMC 由中膜向内膜移行并大量增殖,伴有胞外基质的分泌和沉积,是移植静脉内膜增生的核心病理生理机制^[4]。近年来采用全身、局部药物治疗、基因治疗、激光照射、血管内放射等治疗方法,但效果均不理想。张俊霞等^[5]研究发现,超声辐照在无明显杀伤细胞的情况下可以诱导 SMC 凋亡,阻止 SMC S 期 DNA 复制。本研究前期发现,超声辐照可以降低移植静脉 SMC 的增殖,减轻内膜的增生^[6]。

血管 SMC 受到外界因素刺激后,细胞内通过一系列信号转导作用,启动细胞的内调节增殖的基因表达,其中原癌基因在启动细胞增殖过程中起着重要作用。C-myc 原癌基因编码一种短暂的,与核磷蛋白结合的特异 DNA 序列来调节 DNA 转录。起着启动和维持细胞增殖的双重作用。转染反义 c-myc 寡核苷酸进入细胞,通过碱基互补的原则与靶 RNA 结合,形成 DNA:RNA 杂交体,从而启动细胞内 RNA 酶,迅速将 mRNA 降解,使 mRNA 的翻译功能减弱或消失,不能产生有效的作用蛋白,由此来抑制靶基因的表达,进而抑制细胞增殖。有研究发现,局部应用生物蛋白胶和多聚凝胶携带反义 c-myc ODN,可以显著抑制移植静脉内膜的增生。本研究中发现,术后第 4 周反义 c-myc 组内膜厚度较对照组降低了 30%(P<0.05)。

基因表达是由 DNA 转录产生 mRNA,再经修饰形成成熟的 mRNA。成熟的 mRNA 经翻译表达相应蛋白质和多肽而发挥作用。因此,对细胞内相关 mRNA 表达水平的检测,能了解该基因在细胞活动中的作用是否活跃。RT-PCR 是对细胞内某一特定基因序列进行大量扩增后,检测该基因 mRNA 在细胞中的表达水平,在实验条件控制一致时,可半定量对比细胞

mRNA 含量的多寡,从而判断细胞基因的表达水平。本实验结果表明,术后第 2 周,反义核苷酸组和反义核苷酸加超声辐照 c-myc 基因表达与对照组比较,减少了 47% 和 74% ($P < 0.01$),说明反义 c-myc 寡核苷酸能有效抑制 c-myc 靶基因的表达,进而抑制细胞的增殖和内膜增厚。局部超声辐照能促进反义 c-myc 向细胞内转化,进一步加强对 c-myc 基因表达的抑制作用,加之超声本身对内膜增生的抑制作用使内膜增厚进一步减轻。本研究中观察到内膜厚度减轻了 55% ($P < 0.01$),说明局部应用反义 c-myc 与超声辐照的协同作用。

超声辐照促进外源基因转化的机制尚不清楚,可能与细胞膜的通透性改变有关。在合理控制超声辐照条件下,超声既能使膜通透性增加,又不致使细胞明显受损,而细胞膜通透性改变是基因转化的前提。Wybex 等^[7]报道,20 kHz,20 w/cm² 的超声辐照 30 s 使质粒转入酵母为对照的 20 倍。Miller 等^[8]应用超声 1 MHz,0.4 w/cm² 辐照 60 s 或 30 min,48 h 后显示,血管平滑肌细胞荧光素酶活力分别增加 7.5 倍和 2.4 倍。超声通过机械作用和空化效应也可影响细胞膜通透性。但主要源于空化效应,压力波作用于细胞,仍是通过引起惯性空化(inertial cavitation)而致细胞结构和(或)功能变化。Kim 等^[9]和 Bao 等^[10]证实,空化效应是影响细胞膜通透性的主要因素。用超声行基因转化和表达,学者们的报道结果不尽相同。如连续波和非连续波的转化率在不同报道中差异甚大。造成差异的原因除目的基因和受体细胞外,超声系统及辐照条件也是重要影响因素。由于声强表示方法和辐照剂量测量方法的多样性,以及辐照过程中采用的透声介质、溶液组成、有无增强空化的因素存在等,给检测结果比较带来困难。Bao 等^[10]报道,辐照过程中旋转试管与否转化结果差异大,认为旋转有利于产生空化。即使细胞膜的通透性增加以利基因导入,又不致因超声辐照而使细胞发生不可逆的损伤是达到满意转化率和表达率的前提。

本研究选择的超声参数源于细胞实验时探索的理想参数,与 Lawrie^[11]等和 Fitzgerald 等^[12]研究接近。但与 Arakawa 等^[13]相差较大。由于体内实验存在组织对超声能量的吸收,采用更高声强、其他频率和作用时间的超声是否对内膜增生抑制和基因转化更有利还不清楚,有待进一步探明。

参考文献:

[1] Bourassa MG. Fate of venous grafts: the past, the present and the future[J]. J Am coll cardiol, 1991, 17(5): 1081-1083.
 [2] Veith FJ, Gupta SK, Ascer E, et al. Six-year prospective multicenter randomized comparison of autologous sapher-

nous vein and expanded polytetrafluoroethylene grafts in infrainguinal arterial reconstruction [J]. J Vasc Surg, 1986, 3(1): 104-114.

- [3] 刘杨东,时德,彭真年,等. Cilostazol 对犬股动脉人工血管移植吻合处组织形态学影响的实验研究[J]. 西南大学学报:自然科学版,2011,33(4):99-103.
 [4] 马小干,时德. 丹参对自体静脉移植替代动脉后早、中期通畅率及增殖病变的影响[J]. 中国普外基础与临床杂志,2002,9(4):232-234.
 [5] 张俊霞,黄晶,王新,等. 超声辐照对血管平滑肌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 重庆医科大学学报,2005,30(50):636-639.
 [6] 刘杨东,赵渝,时德,等. 超声辐照对兔移植静脉内膜增生的影响[J]. 临床超声医学杂志,2011,13(4):217-219.
 [7] Wybex JA, Andrews J, D'Emanuele A. The use of sonication for the efficient delivery of plasmid DNA into cells [J]. Pharm Res, 1997, 14(6): 750-756.
 [8] Miller MW, Milleo DL, Brayman AA. A review of in vitro bioeffects of inertial ultrasonic cavitation from a mechanistic perspective[J]. Ultrasound Med Biol, 1996, 22(9): 1131-1154.
 [9] Kim HJ, Greenleaf JF, Kinnick RR, et al. Ultrasound-mediated transfection of mammalian cells [J]. Hum Gene Ther, 1996, 7(11): 1339-1346.
 [10] Bao S, Thrall BD, Millex DL. Transfection of ureporter plasmid into cultured cells by sonoporation in vitro [J]. Ultrasound Med Biol, 1997, 23(6): 953-959.
 [11] Lawrie A, Brisken AF, Francis SH, et al. Ultrasound enhances reporter gene expression after transfection of vascular cells in vitro [J]. Circulation, 1999, 99(20): 2617-2620.
 [12] Fitzgerald PJ, Takagi A, Moore P, et al. Intravascular sonotherapy decrease neointimal hyperplasia after stent implantation in swine [J]. Circulation, 2001, 103(14): 1828-1831.
 [13] Arakawa K, Hagsawa K, Kusano H, et al. Sonodynamic therapy decrease, de neointimal hyperplasia after stenting in the rabbit ilio artery [J]. Circulation, 2002, 105(2): 149-151.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-05-22)

(上接第 2602 页)

[10] 孙勇,孙曙光,王良喜,等. 谷氨酰胺联合乌司他丁对严重烧伤患者炎症因子的影响[J]. 山东医药,2011,51(8):71-71.
 [11] 王少龙,姜鹤群,何依群,等. 食管癌术后早期空肠管饲营养的临床评价[J]. 重庆医学,2007,36(16):1644-1645.
 [12] Sun Z, Wang X, Wallen R, et al. The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats [J]. Scand J Gastroenterol, 1998, 33(4): 415-422.
 [13] 周莎,许春娣,陈舜年,等. 幼鼠结肠炎模型肠黏膜损伤与

DAO 的关系[J]. 中华儿科杂志,2006,42(2):93-95.

- [14] 吴彬,但伶. CD40/CD40L 与肿瘤坏死因子- α 、白细胞介素-10 在炎症中的作用 [J]. 重庆医学,2007, 36(17): 1771-1773.
 [15] 王和贤,杨军,姜波健,等. 严重多发伤患者血清 TNF α 、IL-6、IL-8 的变化及意义 [J]. 重庆医学,2004, 33(8): 1198-1199.

(收稿日期:2011-02-21 修回日期:2011-04-15)