

高脂血症兔主动脉内皮剥脱后 *c-myc* 基因的表达

万腊香 张 彤 杨和平

(衡阳医学院分子生物学研究中心, 衡阳 421001)

The Study on *c-myc* Proto-oncogene Expression after Balloon Injury of Rabbit Aorta in HyperlipidemiaWAN La-Xiang, ZHANG Tong and YANG He-Ping  
(Research Center of Molecular Biology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

## ABSTRACT

**Aim** To well understand the molecular events governing smooth muscle cell (SMC) proliferation in development of atherosclerosis (As), We investigated SMC ultrastructure and levels of *c-myc* proto-oncogene transcription in plaque.

**Methods** 25 healthy male Japan big-ear white rabbits were divided control group ( $n=5$ , normal diet) and experimental group ( $n=20$ , high cholesterol diet plus balloon deendothelialization) at random. The experimental group animals were carried balloon-injury to aorta with 3F Fogarty catheter after being fed atherogenic diet for one week. We observed morphological changes of rabbit aorta through microscope and ultrastructure of SMC with transmissive electron-microscope and assessed the levels of *c-myc* mRNA with Northern blot at 1, 2, 4 and 6 weeks postangioplasty.

**Results** Deendothelialization of rabbit aorta induced a large of SMC to migrate from medium to neointimal and proliferate. The changes of SMC pheotype were observed one week after injury. During 2~4 weeks, there were a number of proliferative SMC in thickening neointima. These SMC displayed "synthetic" pheotype which cotained large amounts of rough endoplasmic reticulum, free ribosomes, mitochondria and little contractile appartus. Some lipid-droplet in some synthetic SMC were observed.

Then the typic atheroma plaque in rabbit aorta formed at 6 weeks. The predominant cell type in these plaques were the SMC-derived foam cell which filled with lipid-droplet and contained a few cellular organelae. The levels of *c-myc* mRNA increased significantly at one weeks after injury prior to SMC proliferation. Then *c-myc* expression gradually decreased at 2, 4 and 6 weeks, but the levels of *c-myc* mRNA at 6 weeks was still higher than that of control group.

**Conclusions** Deendothelialization promoted formation of As, *c-myc* gene expression were closely related to SMC proliferation in development of As.

**KEY WORDS** Deendothelialization; Smooth muscle cell proliferation; *c-myc* gene expression; Atherosclerosis.

**摘要** 本实验在喂高胆固醇饲料的基础上行兔主动脉内皮剥脱术,分别于内皮剥脱术后1、2、4和6周处死动物,观察动脉粥样硬化形成过程中兔主动脉形态、平滑肌细胞超微结构的变化和 *c-myc* 基因表达规律。实验结果发现:内皮剥脱加高胆固醇饲料能在6周内形成较典型的粥样斑块,斑块内细胞成分主要为平滑肌细胞源性泡沫细胞,巨噬细胞源性泡沫细胞少见。在动脉粥样硬化斑块形成过程中,平滑肌细胞发生表型改变,术后一周新生内膜的平滑肌细胞中肌丝成分减少,细胞器增多,此时 *c-myc* 基因表达最高,术后2、4周内膜平滑肌细胞内含有大量细胞器,肌丝成分少见,成为典型的合成型细胞,从2周开始合成型细胞内已开始出现数个脂滴,且随时间延长而增加,至6周时这些细胞已充满大量脂滴,细胞器亦减少,成为肌源性泡沫细胞,2周后, *c-myc* 基因表达逐渐降低。这些结果提示:兔主动脉内皮细胞剥脱能诱导 *c-myc* 基因高表达,加速实验性动脉粥样硬化形成。

**关键词** 去内皮; 平滑肌细胞增殖; 基因表达, *c-myc*; 动脉粥样硬化

血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)及再狭窄的主要病理改变之一, *c-myc* 基因表达与 SMC 的迁移和增殖密切相关<sup>[1,2]</sup>。正常情况下, 动脉内皮剥脱能诱导 *c-myc* 基因的快速高表达, 促进内膜增厚和 SMC 大量增殖<sup>[3]</sup>。本实验旨在喂高胆固醇饲料造成高脂血症基础上, 行兔主动脉内皮剥脱, 以探讨高脂血症情况下血管壁细胞对内皮剥脱的反应特点及 *c-myc* 基因表达规律, 为 As 及再狭窄的基因治疗提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物选择及处理

选择健康状态良好的 25 只雄性日本大耳白兔, 体重 2.5~3.5 kg (购于同济医科大学实验动物中心)。根据血脂、体重随机将动物分为实验组 and 对照组。实验开始后每周测空腹血清总胆固醇、甘油三酯和体重。实验组动物喂高脂、高胆固醇饲料(普通饲料加 2% 胆固醇、3% 猪油, 由本院动物部供应), 一周后行兔主动脉内皮剥脱。用 3% 戊巴比妥钠 0.4 ml/kg 耳缘静脉注射麻醉, 3F Fogarty 导管从右股动脉插入约 30 cm, 经腹主动脉至主动脉弓, 球囊内充以 0.5~0.7 ml 生理盐水, 缓慢回拉导管至主动脉切口处, 重复三次后移出导管, 结扎主动脉, 继续喂高脂饲料, 分别于术后 1、2、4 和 6 周末用空气栓塞法处死动物各 5 只。对照组 5 只不行内皮剥脱术, 一直喂普通饲料, 于实验第 5 周末处死。取主动脉弓部组织依次作光镜及透射电镜切片, 其余大部分组织用于抽提组织 RNA。

### 1.2 光镜及透射电镜样品制备

分别按光镜及透射电镜样品制备常规固定、脱水、包埋、切片、染色等, 然后镜下观察、照相。透射电镜下选择带有核的细胞照相。

### 1.3 兔主动脉组织总 RNA 的提取及 *c-myc* 基因的表达

按文献[4]提取组织总 RNA, 然后作 Northern blot<sup>[5]</sup>。分别取总 RNA 25  $\mu$ g 上样, 1 $\times$  甲醛凝胶电泳缓冲液(电压 3~5 V/cm)电泳 3~5 h, 毛细吸管将 RNA 转移至尼龙膜上, 80 $^{\circ}$ C 烤 2 h。以  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP 作标记物, 按随机引物试剂盒说明书标记 *c-myc* 基因探针。42 $^{\circ}$ C 杂交 24 h 后洗膜, 放射自显影(-20 $^{\circ}$ C)3~7 天。

## 2 结果

### 2.1 兔主动脉形态观察

肉眼下, 对照组胸腹主动脉内膜表面光滑, 无斑块。内皮剥脱后 2 周即见胸腹主动脉内腔面粗糙不平, 且 4~6 周时血管壁变硬, 管径缩小, 整个血管腔面均为弥漫性隆起于内膜表面的脂纹及脂斑。

光镜下, 术后 1 周兔主动脉新生内膜中有局灶性细胞增殖, 内弹力板不完整, 中膜 SMC 核排列紊乱, 腔面无内皮细胞。术后 2~4 周, 内膜呈弥漫性增厚, 以腹侧面为甚, 增厚的内膜中以细胞成分为主, 无明显脂质沉积。病灶深层的 SMC 大多数呈梭形, 浅层者多为短梭形, 或圆形。术后 6 周, 内膜仍有增厚的趋势, 但细胞数减少, 有不连续的内皮细胞, 内皮下 SMC 数目显著增多, 平行于内膜表面排列, 细胞间出现弹力纤维, 其下为粥样病灶, 可见大量泡沫细胞, 间质内脂质沉积(图 1, Figure 1)。

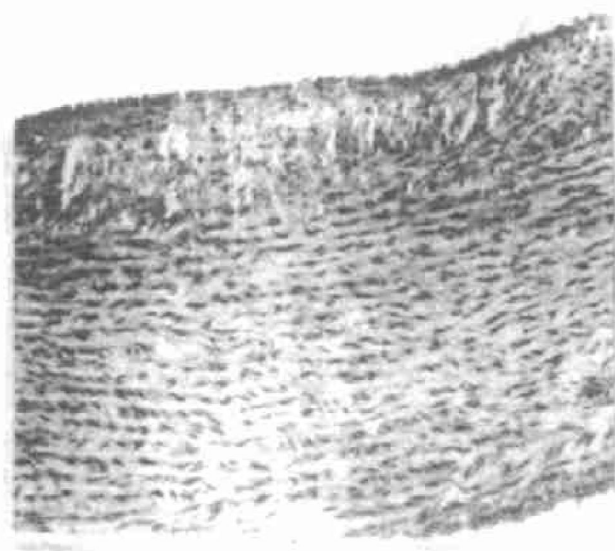


Figure 1. The typical atheroma plaque in rabbit aorta formed at 6 weeks post-angioplasty.

透射电镜下, 术后 1 周, 病灶内 SMC 很容易识别, 深层紧邻弹力板的 SMC 仍保持收缩型的特征, 胞质内大量的肌丝束, 而细胞器较多, 但表层 SMC 已向合成型过渡, 胞质中细胞器增多, 而肌丝减少。术后 2~4 周, 新生内膜中

SMC 已完全失去收缩型的超微结构特点,肌丝很少,或不易检出,但粗面内质网、游离核糖体非常丰富,高尔基复合体发达,符合合成型 SMC 的特征。2 周时少数合成型 SMC 内已可见少量脂滴,而 4 周时大多数合成型 SMC 都有脂滴,脂滴数或体积增加(图 2, Figure 2)。术后 6 周斑块表面 SMC 中仍有较多的细胞器和少量脂滴,但其下 SMC 形态不规则,胞质中充满大量脂滴,细胞器结构模糊,核膜增厚,核膜间隙增宽,出现核固缩。



Figure 2. Ultrastructure of SMC at 4 weeks postangioplasty. There are many synthetic organelles and some lipid-droplet in synthetic phenotype SMC.

## 2.2 *c-myc* 基因表达变化

Northern blot 显示兔主动脉内皮剥脱后 1 周 *c-myc* 基因表达最高,以后随时间延长,*c-myc* mRNA 水平逐渐下降,至 6 周末仍略高于对照组。*c-myc* 表达高峰在 SMC 大量增殖之前,但表达持续较长时间(图 3, Figure 3)。

## 3 讨论

大量资料表明,SMC 表型转变是增殖的关

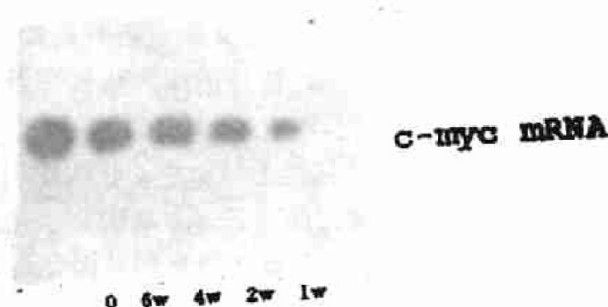


Figure 3. The levels of *c-myc* gene expression in development of experimental rabbit As by fed high cholesterol diet plus balloon catheter injury to rabbit aorta.

键性起始步骤。收缩型转变成合成型才具有游走增殖能力,成为 As 斑块的细胞成分之一。但不同的危险因素引起 SMC 表型转变的时间和增殖程度不同,因此 As 进程不同。喂高胆固醇饲料是复制实验性 As 动物模型最常用的经典方法,造型期为 100 天左右。邱红明等<sup>[4]</sup>用电镜观察到,喂高脂后 2 周方见 SMC 迁移入内膜并增殖,SMC 表型发生改变,8 周才见大量的典型的合成型 SMC,16 周可形成较明显的斑块。在正常情况下,不同种属的动物如大鼠<sup>[1-3]</sup>、兔<sup>[6]</sup>、猪<sup>[10]</sup>等血管对内膜剥脱后的反应相同,2~3 天即可见 SMC 迁移及表型转变,15 天内膜中 SMC 增殖相当旺盛,但 20 天后增殖趋势减弱,增殖的 SMC 表型逐渐逆转,至 4~6 个月时基本处于静止状态。本实验在常规喂胆固醇饲料的基础上行兔主动脉内皮剥脱术,使剥脱后的血管壁细胞处于高脂血症环境,发现新生内膜 SMC 增殖高峰从内皮剥脱后 2 周可持续到 4 周,比正常动脉持续时间长,且比单喂高脂饲料时增殖高峰时间提早,内膜明显增厚,细胞增殖相当活跃。2 周后合成型 SMC 逐渐有脂质积聚,而紧邻中膜收缩型或部分表型转变的 SMC 胞质内却未见脂滴,术后 6 周时已形成很明显的粥样斑块。提示内皮剥脱与高脂饲料联合,能促使 As 斑块的形成,缩短造型期,而且形成的斑块明显,以 SMC 源性泡沫细胞

为主。因此在此模型基础上研究再狭窄的形成机理及药物防治不仅可大大缩短研究周期,而且更有利于在体 SMC 源性泡沫细胞机理及靶向性治疗的研究。

在高脂血症的基础上行兔主动脉内皮剥脱促进 As 斑块形成可能与 *c-myc* 基因高表达有密切关系。*c-myc* 基因属即刻早期基因(immediate early gene, IEG),受多种有丝分裂原刺激后,常呈快速诱导方式表达,体内可能受 SMC 自分泌和旁分泌的影响,表达水平可持续一定时间,但表达高峰在 SMC 迁移、增殖之前。Shi 等<sup>[10]</sup>设计的以 *c-myc* mRNA 翻译起始区为靶的反义寡核苷酸不仅能明显降低 c-Myc 蛋白水平,而且还能抑制 SMC 的增殖及 I 型胶原的合成、分泌,从而明显抑制新生内膜的形成。研究还发现对 SMC 增殖、迁移及分泌功能的抑制机制均不相同,提示 *c-myc* 基因表达是促进 SMC 表型转变及增殖、加速新生内膜形成的重要原因。本实验观察到,在 As 形成过程中亦有 *c-myc* 基因的高表达,其表达高峰亦在 SMC 大量增殖之前,随时间变化呈下降趋势,但表达呈现较长时间,提示 *c-myc* 基因表达可促进 As 的形成,抑制 *c-myc* 基因的表达可望阻止 As 斑块的发展。而 *c-myc* 持续表达可能与高脂血症的刺激有密切关系。

#### 参考文献

- 1 Maino JM, Tota RR, Vlasic N, et al. Early proto-oncogene expression in rat aortic smooth muscle cell following endothelial removal. *Am J Pathol*, 1990, 137: 761~765.
- 2 Maino JM, Vlasic N, Tota RR, et al. Smooth muscle cell immediate-early gene and growth factor activation follows vascular injury. *Arterioscler Thromb*, 1993, 13(2): 211~219.
- 3 万腊香,刘革修,曹 锋,等. 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. *中国动脉硬化杂志*, 1994, 2(1): 23~25.
- 4 Sambrook P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol Chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156~159.
- 5 萨姆布鲁克,弗里奇,曼尼阿蒂斯著,杨文刚等译. 第七章第二节, RNA 分析. 见:《分子克隆》实验指南,第二版,科学出版社,1993, 366~372.
- 6 Campbell GR, Campbell JH. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis. Implication for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol*, 1985, 42: 139.
- 7 邱红明,邓仲端,武忠弼,等. 培养的正常及动脉粥样硬化兔主动脉平滑肌细胞的超微结构比较研究. *临床与实验病理学杂志*, 1991, 7: 208.
- 8 邱红明,邓仲端. 平滑肌细胞的表型转变与动脉粥样硬化发生的关系. *中华病理学杂志*, 1988, 17: 115.
- 9 Manderson JA, Mosse PRL, Safstrom JA, et al. Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. I. Changes in smooth muscle phenotype. *Arteriosclerosis*, 1989, 9: 289~296.
- 10 Shi Y, Fard A, Galeo A, et al. Transcatheter delivery of *c-myc* antisense oligomers reduces neointimal formation in a porcine model of coronary artery balloon injury. *Circulation*, 1994, 90: 944~951.

(1997-02-12 收到)