



p53、Rb、IGF-I、AT_{1B}基因转移对血管新生内膜增殖的影响

30%~50%的血管再狭窄发生率是影响冠心病介入治疗远期疗效的主要因素[1]。血管平滑肌细胞迁移至内膜并过度增殖所致的新生内膜增厚是发生再狭窄的关键[2]。

野生型p53 基因可调节细胞的生长、复制和死亡[3]；Rb蛋白是细胞周期调控和细胞分化中重要的转录调节因子，处于细胞生长、分化的中心环节；胰岛素样生长因子(Insulin-like growth factor, IGF)是一类具有胰岛素样生长刺激活性及免疫调节作用的多肽分子，在血管平滑肌细胞(VSMC)的迁移和增殖中发挥着关键作用；血管紧张素II(Ang II)是能促进VSMC增殖的一种生长因子[4]，其生物学效应必须通过与细胞膜上的特异性受体结合方能实现。血管紧张素受体根据药理学特性可分I型(AT₁)和II型(AT₂) [5]，而Ang II的生理功能均由AT₁受体介导。动脉血管平滑肌细胞上的Ang II受体全是AT₁受体。大鼠颈动脉球囊损伤后，新生内膜细胞中AT₁受体的表达明显增加，说明AT₁受体在促进VSMC增殖中发挥着重要的作用[6]。

本研究应用SD大鼠颈动脉球囊损伤模型，利用病毒载体体内基因转移的方法分别将人野生型p53基因、Rb基因、反义IGF-I基因和大鼠反义AT_{1B}基因导入损伤的颈动脉血管壁细胞内，旨在从不同的作用层次(生长因子水平、VSMC表面特异性受体水平以及细胞增殖的共同通路——细胞分裂周期的转录因子水平)分别观察和比较4种基因对大鼠颈动脉损伤后新生内膜增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料来源

LXSN逆转录病毒载体为本科实验室保存；重组人野生型p53、野生型Rb基因逆转录病毒载体上清均由作者构建[7][8]；反义IGF-I重组逆转录病毒载体包装细胞株G₂IP由上海第二军医大学东方肝胆外科研究所肿瘤免疫治疗中心郭亚军教授惠赠；AdVE1CMVβ gal 重组腺病毒上清由美国University of Philadelphia 的Dr. J M Wilson 惠赠；反义AdVE1CMVAT_{1B}和正义AdVE1CMVAT_{1B} 重组腺病毒上清由美国University of Colorado Health Science Center的Qingzhong Kong 博士惠赠。SD雄性大鼠由第一军医大学实验动物中心提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 选用36只SD大鼠，均为雄性，体质量400~500 g，分为LXSN 组、Lp53SN(p53基因治疗)组、LRbSN(Rb基因治疗)组、反义IGF-I 组、Advβ gal 组、反义AdvAT_{1B} 组，每组6只。

1.2.2 SD大鼠颈动脉球囊损伤后新生内膜增殖模型的建立 参见文献[9]。

1.2.3 在大鼠颈动脉损伤模型中利用病毒载体分别进行体内基因转移 参见文献[7][8][10][11]。

1.2.4 血管节段的取材和切片 术后未及3周时，LXSN组、IGF-I组和ADVβ gal组各死亡1只大鼠。术后3周，对其余SD大鼠腹腔注射过量的戊巴比妥钠以处死，开胸后，剪开心尖部，从心脏插管，灌注生理盐水肝素液15 min，再用10%福尔马林液灌注固定20 min，取出损伤部位的左颈总动脉约1.0 cm，石蜡包埋后行病理切片，HE染色，在光镜下观察血管内膜增生情况，每份标本非连续取4处切片。

1.2.5 测量血管内膜及中膜横断面的面积，计算血管内膜/中层面积比(Neointima/media ratio, N/MR) 利用Quantiment 520型计算机图像分析仪分别测量血管内膜和中膜横断面的面积，以内弹力膜区别内膜和中膜，测量采用单盲法，测量者为与本实验无关者。

1.2.6 统计分析 数据统计采用SPSS软件，运用ANVOA分析及Student-Newman-Keuls t 检验。

2 结果

大鼠颈动脉损伤21 d后，在光镜下可见LXSN组、AdV β gal组损伤动脉血管新生内膜明显向管腔内增厚，造成管腔狭窄。Lp53SN组、LRbSN组、反义IGF-I组和反义AdVAT_{1B}组损伤动脉血管新生内膜增殖程度均有不同程度的减轻。用图像分析仪分别测量各组的新生内膜和中膜面积，计算N/MR。

统计分析结果表明，与LXSN组相比，Lp53SN组的动脉血管N/MR降低了约44%($P < 0.01$)；Rb基因治疗组的动脉血管N/MR降低了约49%($P < 0.01$)。反义IGF-I基因组的动脉血管N/MR降低了约41%($P < 0.01$)。与AdV β gal组相比，反义AdVAT_{1B}基因组的动脉血管N/MR降低了约47%($P < 0.01$)。而p53基因治疗组、Rb基因治疗组、反义IGF-I基因组及反义AdVAT_{1B}基因组之间互相比较，无显著性差异($P > 0.05$) (表1)。

表 1 各组颈动脉损伤后 21 d 血管内膜 / 中层面积比($\bar{x} \pm Sx$)
Tab.1 The neointima/media ratio of the carotid artery at day
21 after injury(Mean \pm SE)

Group	n	Neointima/media ratio
LXSN	5	1.134 0 \pm 0.128 9
Wild-type p53	6	0.636 7 \pm 0.028 6* [@]
Wild-type Rb	6	0.571 7 \pm 0.089 6* [@]
Antisense IGF-I	5	0.666 0 \pm 0.039 1* [@]
AdV β gal	5	1.004 0 \pm 0.051 9
Antisense AT _{1B}	6	0.555 0 \pm 0.078 2* [@]

* $P < 0.01$ vs LXSN group; * $P < 0.01$ vs ADV β gal group; [@] $P > 0.05$ between every 2 groups marked with[@]

3 讨论

血管成形术后再狭窄是机体对机械损伤的一种特殊反应，VSMC迁移至内膜并过度增殖所致的新生内膜增厚是再狭窄发生的关键因素之一。目前的研究证实，细胞生长和细胞死亡的调节障碍是细胞增殖的根本原因，也是生长因子和细胞因子作用的共同通路[12]。对细胞周期调控的研究表明，肿瘤抑制基因p53编码的蛋白质可抑制G1期细胞通过G1/S的 check point进入S期使细胞终止于G1期或产生细胞凋亡。只有在p53去磷酸化改变了它的抑制活性后，细胞方可从G1期进入S期。p53通过阻断G1/S期的过渡来抑制细胞增殖的效应，正是由于激活p21的转录实现的。p21蛋白是一种CDKs的抑制剂，p21与CDK、cyclin、PCNA形成复合物，抑制了cyclin/CDK复合物对Rb的磷酸化[13]。在细胞周期的G0或G1早期，Rb蛋白处于非磷酸化的活性状态，它与转录活化因子E2F结合而使之灭活，非磷酸化的Rb与E2F结合后，E2F不能激活与DNA合成有关的基因转录。Rb通过以上机制，从而使细胞终止于G1期，维持细胞在静止状态。当促进细胞增殖的生理信号传递到核内后，经G1期的cyclins-CDKs作用使Rb被磷酸化，其功能失活，释放出转录因子E2Fs，从而使参与细胞DNA合成及细

细胞分裂的基因转录激活,细胞进入S期,进行DNA复制及随后的有丝分裂[14]。Yonemitsu[15]和Katayose [16]先后报道,用真核表达载体和重组腺病毒载体将野生型p53基因转移至体外培养的牛和大鼠的主动脉VSMC中,结果显示VSMC分裂终止于G₁期,且未发现有细胞凋亡现象。Chang等[17]用腺病毒载体将突变且只表达非磷酸化的Rb基因导入大鼠颈动脉损伤后的动脉壁细胞中,结果显示Rb基因可使血管新生内膜/中层面积比降低50%。

20世纪90年代中期对细胞周期调控的研究表明,血管平滑肌细胞分裂要通过G₁期的“限制点”则需要IGF-I的存在和参与,限制点是细胞增殖的关键,故IGF-I是细胞周期的前进因子[18]。IGF-I也可以阻断细胞的凋亡。尽管IGF-I在无其它生长因子存在时,其促有丝分裂的作用较弱,但IGF-I可与其它生长因子相互作用,加强IGF-I的促有丝分裂作用或使其它生长因子的促有丝分裂作用加强。目前的研究表明,IGF-I可增加由PDGF诱导的DNA合成,没有IGF-I存在,由PDGF刺激的VSMC不易进入S期,IGF-I可使PDGF在较低浓度时即可触发平滑肌细胞的分裂;IGF-I通过上调bFGFR-1 mRNA和蛋白质来增加bFGF的促有丝分裂效应。有报道用球囊损伤大鼠主动脉后,IGF-I mRNA明显增加,表明IGF-I参与了血管成形术后再狭窄的过程,动脉损伤后,局部分泌的IGF-I能明显地促进VSMC的增殖[19]。

研究证实,Ang II促进血管平滑肌细胞增殖的机制有两条路径,一是Ang II与VSMC上的特异性的受体结合后,经过一系列信号转导,激活MAP激酶通路,导致细胞增殖[20]。二是发现Ang II与VSMC上的特异性受体结合,在多个水平上与VSMC自分泌的IGF-I系统相互作用,导致VSMC的增殖,这其中包括增加VSMC中IGF-I的表达,在转录水平上介导,明显增加VSMC膜上IGF-I受体的密度,通过降低VSMC分泌的IGFBP4增加游离IGF-I的浓度,而且,目前已发现血管紧张素II的G蛋白偶联受体与IGF-I的酪氨酸激酶受体之间存在cross-talk信号机制,即当Ang II与VSMC上的Ang II受体结合后,Ang II受体通过cross-talk机制,迅速引起IGF-I受体β链的酪氨酸磷酸化,从而触发细胞的有丝分裂反应[21][22]。因此,VSMC上的Ang II AT1受体在介导血管紧张素II所致的VSMC增殖中起着关键的作用。

本研究利用病毒载体体内基因转移的方法分别将人野生型p53基因、野生型Rb基因、反义IGF-I基因和大鼠反义AT_{1B}基因导入损伤的颈动脉血管壁细胞内,结果表明,与对照病毒组相比,4种基因均可有效地抑制动脉损伤后血管平滑肌细胞的增殖,降低新生内膜/中层面积比,减少新生内膜的形成。尽管本研究所选择的4种基因是在不同的层次上发挥作用,但它们对VSMC增殖的共同通路均起关键性的作用。结果表明,它们的作用效果是相似的。

参考文献:

- [1]Levine GN, Chodos AP, Loscalzo J. Restenosis following coronary angioplasty: clinical presentations and therapeutic options[J]. Clin Cardiol,1995,18: 693-703.
- [2]Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular disease[J]. Science,1996, 272: 689-93.
- [3]Elledge RM, Lee WH. Life and death by p53[J]. Bioessays,1995, 17: 923-30.
- [4]Huckle WR, Earp HS. Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II [J]. Prog Growth Factor Res,1994, 5(1):177-94.
- [5]Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists[J]. Pharmacol Rev, 1993, 45(1): 205-51.
- [6]Viswanathan M, Stromberg C, Seltzer A, et al. Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensin II AT1 receptor in neointima of rat aorta[J]. J Clin Invest, 1992, 90(11):1707-12.
- [7]欧阳平,许顶立,刘伊丽,等. 野生型p53基因转移预防血管成形术后再狭窄的实验研究[J]. 第一军医大学学报,1998, 18(3):190-5.
- [8]欧阳平,刘伊丽,许顶立,等. 野生型Rb基因转移预防血管成形术后再狭窄的实验研究[J]. 第一军医大学学报,1998, 18(2):32-6.4
- [9]欧阳平,刘伊丽,许顶立,等. 应用PTCA导管制作大鼠颈总动脉新生内膜增殖模型[J]. 第一军医大学学报,1999, 19(4):306-7.

[10] 欧阳平, 黄洪莲, 刘伊丽, 等. 反义IGF-I基因转移对大鼠颈动脉新生内膜增殖的影响[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18 (2):37-9.

[11] 欧阳平, 许顶立, 黄洪莲, 等. 反义血管紧张素受体 I B基因转移对大鼠颈动脉新生内膜的影响[J]. 中华心血管病杂志, 1999, 27(5):381-3.

[12] Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular disease[J]. Science, 1996, 272:689-93.

[13] Zhang H, Hannon GJ, Casso D, et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases[J]. Nature, 1994, 366:701-7.

[14] Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control[J]. Cell, 1995, 81:323-30.

[15] Yonemitsu Y, Kaneda Y, Hata Y, et al. Intentional induction of cell cycle arrest on vascular smooth muscle cells mediated by the wild-type p53 gene transfer[J]. Circulation, 1995, 92:531-4.

[16] Katayose D, Wersto R, Cowan K, et al. Consequences of p53 gene expression by adenovirus vector on cell cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 215:446-51.

[17] Chang MW, Barr E, Seltzer J, et al. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product[J]. Science, 1995, 267:518-22.

[18] Epstein SE, Speir E, Guzman RJ, et al. The basis of molecular strategies for treating coronary restenosis after angioplasty[J]. J Am Coll Cardiol, 1994, 23:1278-8.

[19] Khorsandi MJ, Fagin JA, Glanella Neto D, et al. Regulation of insulin-like growth factor-1 and its receptor in rat aorta after balloon denudation[J]. J Clin Invest, 1992, 90:1926-31.

[20] Delafontaine P, Lou H. Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 1993, 268(22):16866-70.

[21] Du J, Meng XP, Delafontaine P. Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene: evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways[J]. Endocrinology, 1996, 137(4):1378-84.

[22] Du J, Sperling LS, Marrero MB, et al. G-protein and tyrosine kinase receptor cross talk in rat aortic smooth muscle cells: thrombin- and angiotensin II- induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and insulin-like growth factor I receptor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 218(3):934-9.

参考文献:

[1] Levine GN, Chodos AP, Loscalzo J. Restenosis following coronary angioplasty: clinical presentations and therapeutic options[J]. Clin Cardiol, 1995, 18: 693-703.

[2] Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular disease[J]. Science, 1996, 272: 689-93.

[3] Elledge RM, Lee WH. Life and death by p53[J]. Bioessays, 1995, 17: 923-30.

[4] Huckle WR, Earp HS. Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II [J]. Prog Growth Factor Res, 1994, 5(1):177-94.

[5] Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists[J]. Pharmacol Rev, 1993, 45(1): 205-51.

- [6]Viswanathan M, Stromberg C, Seltzer A, et al. Balloon angioplasty enhances the expression of angiotensin II AT1 receptor in neointima of rat aorta[J]. J Clin Invest, 1992, 90(11):1707-12.
- [7]欧阳平,许顶立,刘伊丽,等. 野生型p53基因转移预防血管成形术后再狭窄的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(3):190-5.
- [8]欧阳平,刘伊丽,许顶立,等. 野生型Rb基因转移预防血管成形术后再狭窄的实验研究[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(2):32-6.4
- [9]欧阳平,刘伊丽,许顶立,等. 应用PTCA导管制作大鼠颈总动脉新生内膜增殖模型[J]. 第一军医大学学报, 1999, 19(4):306-7.
- [10]欧阳平,黄洪莲,刘伊丽,等. 反义IGF-I基因转移对大鼠颈动脉新生内膜增殖的影响[J]. 第一军医大学学报, 1998, 18(2):37-9.
- [11]欧阳平,许顶立,黄洪莲,等. 反义血管紧张素受体 I B基因转移对大鼠颈动脉新生内膜的影响[J]. 中华心血管病杂志, 1999, 27(5):381-3.
- [12]Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapies for vascular disease[J]. Science, 1996, 272:689-93.
- [13]Zhang H, Hannon GJ, Casso D, et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases[J]. Nature, 1994, 366:701-7.
- [14]Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control[J]. Cell, 1995, 81:323-30.
- [15]Yonemitsu Y, Kaneda Y, Hata Y, et al. Intentional induction of cell cycle arrest on vascular smooth muscle cells mediated by the wild-type p53 gene transfer[J]. Circulation, 1995, 92:531-4.
- [16]Katayose D, Wersto R, Cowan K, et al. Consequences of p53 gene expression by adenovirus vector on cell cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 215:446-51.
- [17]Chang MW, Barr E, Seltzer J, et al. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product[J]. Science, 1995, 267:518-22.
- [18]Epstein SE, Speir E, Guzman RJ, et al. The basis of molecular strategies for treating coronary restenosis after angioplasty[J]. J Am Coll Cardiol, 1994, 23:1278-8.
- [19]Khorsandi MJ, Fagin JA, Glannella Neto D, et al. Regulation of insulin-like growth factor-1 and its receptor in rat aorta after balloon denudation[J]. J Clin Invest, 1992, 90:1926-31.
- [20]Delafontaine P, Lou H. Angiotensin II regulates insulin-like growth factor I gene expression in vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 1993, 268(22):16866-70.
- [21]Du J, Meng XP, Delafontaine P. Transcriptional regulation of the insulin-like growth factor-I receptor gene: evidence for protein kinase C-dependent and -independent pathways[J]. Endocrinology, 1996, 137(4):1378-84.
- [22]Du J, Sperling LS, Marrero MB, et al. G-protein and tyrosine kinase receptor cross talk in rat aortic smooth muscle cells: thrombin- and angiotensin II- induced tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and insulin-like growth factor I receptor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 218(3):934-9.