

[文章编号] 1000- 4718(2005)05- 0838- 06

转染野生型 p53 基因诱发家兔动脉粥样硬化斑块不稳定性的实验研究*

陈文强¹, 张运^{1△}, 张梅¹, 季晓平¹, 林晨², 朱永锋¹, 桑学东¹(¹ 山东大学齐鲁医院心内科, 山东 济南 250012; ² 中国医学科学院北京肿瘤医院国家肿瘤病理重点实验室, 北京 100015)

[摘要] 目的: 探讨野生型 p53 基因对血管平滑肌细胞(VSMC)的促凋亡作用在构建动脉粥样硬化(As)不稳定斑块动物模型中的价值。方法: 54 只雄性新西兰纯种兔用球囊损伤腹主动脉+ 高脂喂养 10 周, 于 8 周末随机分成 A 组(p53 基因组, 27 只)和 B 组(LacZ 基因组, 27 只), 在腹主动脉斑块形成处分别转染携带野生型 p53 基因或 LacZ 基因的重组腺病毒载体; 2 周后, A 组和 B 组各处死 10 只, 观察斑块的自发破裂情况。然后两组剩余实验兔给予中国斑点蝮蛇毒(CRVV)和组胺药物触发, 比较两组发生斑块破裂的发生率。应用免疫组织化学染色、流式细胞仪、原位末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)及电镜检测基因转染部位的平滑肌细胞的凋亡情况。结果: A 组 TUNEL 测定的凋亡阳性细胞率显著高于 B 组(分别为 $2.5\% \pm 0.8\%$, $1.0\% \pm 0.3\%$, $P < 0.05$), 流式细胞仪测定的细胞凋亡率亦明显高于 B 组(分别为 $20.04\% \pm 6.20\%$, $6.89\% \pm 1.20\%$, $P < 0.01$); 电镜结果显示胞核中异染色体边聚明显, 凋亡小体多见; 斑块中的 VSMC 显著减少, 纤维帽变薄以及纤维帽/ 内中膜厚度明显少于 B 组(纤维帽厚度分别为 132.9 ± 56.7 , 181.8 ± 59.7 , $P < 0.05$; 纤维帽/ 内中膜厚度 0.20 ± 0.18 , 0.21 ± 0.11 , $P < 0.05$), 药物触发后斑块破裂的发生率显著高于 B 组(分别为 85.7% , 23.1% , $P < 0.01$)。结论: 外源性人野生型 p53 基因转染 As 家兔后, 可促进 VSMC 的凋亡的发生, 导致 As 斑块向不稳定方向发展。

[关键词] 细胞凋亡; 基因, p53; 转染; 动脉硬化

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Experimental study on induction of atherosclerotic plaque instability in rabbits after transfer of wild- type p53 gene

CHEN Wen- qiang¹, ZHANG Yun¹, ZHANG Mei¹, JI Xiao- ping¹, LIN Chen², ZHU Yong- feng¹, SANG Xue- dong¹(¹Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, China; ²Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100015, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the apoptotic role of wild- type p53 in induction of plaque instability in atherosclerotic rabbits. **METHODS:** Fifty- four New Zealand White rabbits underwent balloon- induced abdominal aortic wall injury and then were fed on a diet of 1% cholesterol. At the end of the eighth week, the rabbits were randomly divided into two groups: group A and group B. Recombinant adenovirus carrying p53 and β - galactosidase (LacZ) genes were injected in group A and B, respectively. Two weeks later, 10 rabbits each in group A and B was killed and the remaining rabbits all underwent pharmacological triggering with injection of Chinese Russell's viper venom and histamine. **RESULTS:** Compared with group B, p53 gene over- expression in group A resulted in a marked increase in number of positive apoptotic cells ($2.5\% \pm 0.8\%$ vs $1.0\% \pm 0.3\%$, $P < 0.05$) and a significant decrease in vascular smooth muscle cells ($47.5\% \pm 6.8\%$ vs $80.4\% \pm 10.6\%$, $P < 0.01$), the thickness of the fibrous cap [$(132.9 \pm 56.7) \mu\text{m}$ vs $(181.8 \pm 59.7) \mu\text{m}$, $P < 0.05$] and the cap/ intima- media ratio (0.20 ± 0.18 vs 0.21 ± 0.11 , $P < 0.05$). **CONCLUSION:** Transfer of human wild- type p53 genes effectively promotes apoptosis of VSMCs in

[收稿日期] 2003- 10- 07 [修回日期] 2003- 12- 16

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 60271015; No. 30470701); 卫生部临床学科重点项目(No. 20012943)

△通讯作者 Tel: 0531- 6921941- 3139; E- mail: chenwenqiang33@sina.com

atherosclerotic plaques, which makes the plaques vulnerable to rupture.

[KEY WORDS] Apoptosis; Genes, p53; Transfection; Arteriosclerosis

Cockx 等发现细胞凋亡参与了动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块形成和发展过程, 在斑块中已检测出促凋亡基因 bax、Fas 和 p53 等的表达产物^[1,2]。野生型 p53 基因是一种重要的抑癌基因, 主要是通过调节细胞的生长周期而抑制细胞异常增生, 与细胞生长停滞和凋亡关系密切。Bennett 等^[3]报道 As 斑块的血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 对野生型 p53 基因异常敏感, 并且与斑块部位基础的 p53 水平无关。将 p53 基因直接转染斑块局部, 通过它对 VSMC 的促凋亡作用而导致纤维帽变薄, 是探索建立不稳定斑块动物模型的一种很好的尝试。Falk 等研究证明, 斑块不稳定可导致斑块破裂和血栓形成, 临床上表现为急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS)^[4,5]。本研究采用 p53 基因转染技术, 复制不稳定斑块的实验兔模型, 观察 p53 诱发平滑肌细胞凋亡的作用。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 实验动物 雄性纯种新西兰大白兔 54 只, 体重 1.5–2.5 kg, 由山东省农业科学院提供。

1.2 试剂和药品 携带人野生型 p53 基因 (Adv-p53 1.5×10^{13} pfu/L) 和 LacZ 基因 (Adv-LacZ 1.5×10^{13} pfu/L) 的复制缺陷型重组腺病毒载体由中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤国家重点实验室提供。中国斑点蝮蛇毒 (Chinese Russell's viper venom, CRVV) 由广州蛇毒研究所提供, 组胺购自美国 Sigma 公司。PAb1801(p53) 单克隆抗体、 α -actin 单克隆抗体及细胞凋亡试剂盒 MK 1020 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 美国 BD 公司产 FACSscan 型流式细胞仪, 日本 JEM-1200 透射电子显微镜, 日本日立公司生产 7170 型全自动生化分析仪, 荷兰飞利浦 Sonos 5500 型超声心动图仪。

2 方法

2.1 As 模型的复制 54 只兔球囊损伤腹主动脉+高脂饲料 (1% 胆固醇, $120-140 \text{ g} \cdot \text{d}^{-1}$) 喂养 10 周, 8 周末随机分成 A 组 (p53 基因组, 27 只) 和 B 组 (LacZ 基因组, 27 只), 球囊损伤腹主动脉内膜的方法为: 动

物麻醉后穿刺右股动脉, 将内径 3.5 mm、长 15 mm 的球囊导管送入降主动脉约 20 cm, 8 个大气压充盈球囊后回拉至髂动脉, 反复回拉 3 次以造成内膜损伤。

2.2 斑块局部的基因转染 以 30 mg/kg 戊巴比妥钠 (iv) 麻醉动物, 打开腹腔, 暴露腹主动脉。在高频线阵探头的引导下, 寻找右肾动脉与髂总动脉之间血管段中的最大斑块处作为病毒载体的转染部位, 在 A 组和 B 组兔经导管分别向转染部位的管腔中注入 10 μL 滴度为 1.5×10^{13} pfu/L 的 Ad5-p53 重组载体和 10 μL 滴度为 1.5×10^{13} pfu/L 的 Ad5-LacZ 载体, 注射前后结扎转染部位上下两端的血管 10 min, 然后恢复血供, 在结扎部位做缝线标记, 关闭腹腔。给予青霉素 8 万 U (iv) 预防感染。

2.3 药物触发 于 10 周末, 随机抽取 A 组和 B 组各 10 只兔, 给予过量 (160–180 mg) (iv) 的 3% 戊巴比妥钠处死, 进行病理学检查, 观察斑块破裂及细胞的凋亡情况。然后参考 Constantinides 等^[6]的方法对 A、B 两组剩余的实验兔进行药物触发: 中国斑点蝮蛇毒 (Chinese Russell's viper venom, CRVV) 0.15 mg/kg ip, 30 min 后耳缘静脉注射组胺 0.02 mg/kg, 于处死动物前 24 h 和 48 h 给予两次药物触发。

2.4 血液生化检查 分别于实验开始及 10 周末处死动物前, 检测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 和低密度脂蛋白 (low density lipoprotein, LDL-C)。

2.5 病理学检查

①大体形态观察 处死动物后, 取出腹主动脉全长, 纵行剖开, 生理盐水冲洗干净后, 观察斑块破裂和血栓形成情况。

②组织病理学检查 截取基因转染部位的腹主动脉斑块破裂段及未破裂段的腹主动脉 1 cm, 以 10% 的甲醛液浸泡固定。24 h 后组织制片, 苏木素-伊红 (HE) 染色及 Masson 3 色染色。应用 MIAS 图像分析系统测量病变部位斑块的纤维帽厚度、血管内-中膜厚度 (intima-media thickness, IMT) 并计算纤维帽厚度/内-中膜厚度的比值。

③免疫组织化学染色 标本以 10% 甲醛液浸泡固定, 石蜡包埋, 切片厚度 5 μm 。应用 PAb 1801 单抗及 α -actin 抗体分别测定 P53 蛋白、 α -平滑肌肌动

蛋白的局部表达水平。

2.6 电镜观盆 标本通过环氧树脂包埋及硬化剂、加速剂、增塑剂的调配,超薄切片机切成 70 nm 的薄切片,以乙酸双氧铀和柠檬酸铅染色,透射电镜观察破裂部位的细胞超微结构的变化。

2.7 细胞凋亡的检测

①以原位末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)测定细胞的凋亡情况,应用细胞凋亡试剂盒检测凋亡的阳性细胞,定量分析斑块基因转染部位的凋亡细胞的阳性率。

②流式细胞仪检测 将在- 80 °C冰箱中冻存的兔血管组织取出,分离出标记有基因转染的血管段 1 cm,仔细剔除血管外膜层,制成细胞团悬液,调整细胞数为 10⁹/L,加碘化丙啶 10 mg/L, RNA 酶 10 mg/L,枸橼酸钠 100 mg/L,制成单细胞悬液,调节射门大小,在鞘液作用下,血管平滑肌细胞排成单列从流动室的喷嘴中喷出,与入射的高度聚焦激光束相交,产生特异性荧光,收集5 000个细胞的荧光信号,荧光强度以对数放大,光散射数据存盘,测试完毕后在 Macintosh 650 计算机上用 Modifit 软件分析数据,得出平滑肌细胞细胞周期变化及细胞凋亡率的结果。

3 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料比较采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验。

结 果

手术过程中因麻醉意外等原因 A 和 B 组各有 3 只和 4 只死亡,结果 A 组存活 24 只, B 组存活 23 只。

1 血脂水平

实验兔喂养 10 周后,血清 TC TG 和 LDL 的水平与基础水平比较均明显升高,差异显著(表 1)。两组间无显著差异。

表 1 两组实验兔的血脂水平
Tab 1 Lipid levels of two groups

Levels of serum lipid	Pre- cholesterol feeding		The tenth week	
	Group A (n= 27)	Group B (n= 27)	Group A (n= 24)	Group B (n= 23)
TC (mmol/L)	2.04 ±0.55	2.00 ±0.45	31.84 ±11.93**	30.99 ±8.87**
TG (mmol/L)	1.09 ±0.30	1.13 ±0.41	2.16 ±2.44*	2.01 ±2.08*
LDL(mmol/L)	0.74 ±0.37	0.70 ±0.29	27.75 ±10.43**	28.31 ±11.02**

* *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs pre- cholesterol feeding.

2 斑块破裂情况

A 组:未触发家兔 10 只仅 1 只(10%)于基因转

染部位发生自发性破裂;触发后,14 只兔中有 12 只共 20 个病变处发现有斑块破裂和血栓形成,基因转染部位斑块破裂发生率为 85.7%(12/14)。B 组:未触发家兔中未见斑块破裂;触发后,13 只兔中仅 5 只共 7 个病变处发生斑块破裂和血栓形成,基因转染部位斑块破裂发生率为 23.1%(3/13),与 A 组比较,差异显著(*P* < 0.01)。

3 病理学及免疫组织化学检查

p53 在斑块局部的过度表达导致斑块的 VSMC 减少,纤维帽变薄(图 1)。斑块破裂处及血栓内可见大量的炎症细胞浸润,血栓与血管壁附着紧密,斑块破裂处的纤维帽呈现连续性中断,血栓富含血小板、纤维蛋白原及红细胞,偶见斑块内出血。A 和 B 两组纤维帽厚度及纤维帽厚度/内-中膜厚度的比值比较均有显著差异(*P* < 0.05)(见表 2)。

免疫组织化学染色结果显示,α-平滑肌肌动蛋白阳性细胞主要集中于纤维帽及中膜,药物触发前、后 A 组的阳性细胞数与 B 组相比均明显减少,差异显著(均 *P* < 0.01),组内触发前、后无显著差异(表 3)。在 p53 转染部位,药物触发前、后 A 组的 p53 阳性细胞数明显多于 B 组(*P* < 0.01),组内触发前、后无显著差异(表 4 图 2)。

4 透射电镜观察

B 组 VSMC 呈分泌型并大量积聚,排列紊乱,胞浆内充满脂肪空泡,线粒体水肿,高尔基体发达,粗面内质网呈池状扩张,同时可见的溶酶体、糖原颗粒,偶见圆形的凋亡小体,胞核中可见异染色体边聚。A 组 p53 基因转染后, VSMC 数目明显减少,胞体缩小,胞浆中可见较多的溶酶体、糖原颗粒,凋亡小体多见,胞核中异染色体边聚更加明显(图 3)。

表 2 两组斑块厚度测量结果比较

Tab 2 Thickness of plaques in two groups

Group	Thickness of the cap (μm)	Thickness of intima- media (μm)	(Thickness of cap)/(thickness of intima- media)
A	132.9 ±56.7	983.4 ±421.1	0.20 ±0.18
B	181.8 ±59.7*	597.3 ±399.4	0.21 ±0.11*

* *P* < 0.05 vs A group.

5 细胞凋亡检测

A 组 TUNEL 阳性细胞率为 2.5% ±0.8%, B 组为 1.0% ±0.3%, A 组和 B 组差异显著(*P* < 0.05)(图 4)。流式细胞仪结果显示在 p53 转染部位的细胞周期分布为: G₀- G₁ 期,约占 74.20% ±8.20%, G₂

- M 期约占 0.25% ± 0.03%, S 期约占 25.55% ± 3.20%; 细胞凋亡率约为 20.04% ± 6.20%, 与 B 组细胞凋亡率 6.89% ± 1.20% 比较, 显著差异 ($P < 0.01$) (图 5)。

表 3 α -平滑肌肌动蛋白表达的免疫组织化学染色结果

Tab 3 Expressions of α -actin in immunohistochemistry

Group	Pre-triggering (n=10)		Post-triggering (A, n=14; B, n=13)	
	Positive cells	Negative cells	Positive cells	Negative cells
A	564(46.4%)	651(53.6%)	739(43.8%)	947(56.2%)
B	923(75.4%)*	301(24.6%)	1162(76.6%)*	355(23.4%)

* $P < 0.01$ vs A group.

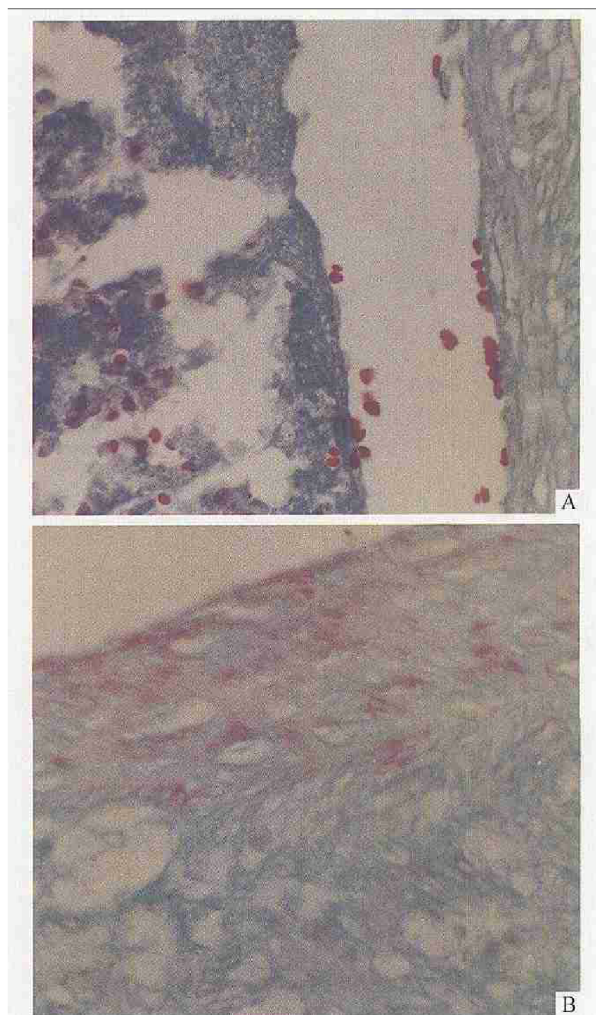


Fig 1 Vascular smooth muscle cells (VSMCs) become less and the cap of the plaque becomes thinner after transfer of p53 genes for two weeks. A: shows VSMCs and the cap of the plaque at the position of plaque rupture and thrombus after pharmacological triggering in group A. The left part in figure A shows a thrombus. B: shows VSMCs and the cap of the plaque in group B after ten-weeks cholesterol feeding (Masson's staining, $\times 40$).

图 1 经过高脂喂养 10 周、转染 p53 基因 2 周后, 平滑肌细胞逐渐减少, 纤维帽变薄

表 4 p53 基因表达的免疫组织化学染色结果

Tab 4 Expressions of p53 in immunohistochemistry

Group	Pre-triggering (n=10)		Post-triggering (A, n=14; B, n=13)	
	Positive cells	Negative cells	Positive cells	Negative cells
A	348(36.5%)	605(63.5%)	452(38.1%)	734(61.9%)
B	190(20.7%)	730(79.3%)	203(19.6%)	834(80.4%)

$P < 0.01$ vs A group.

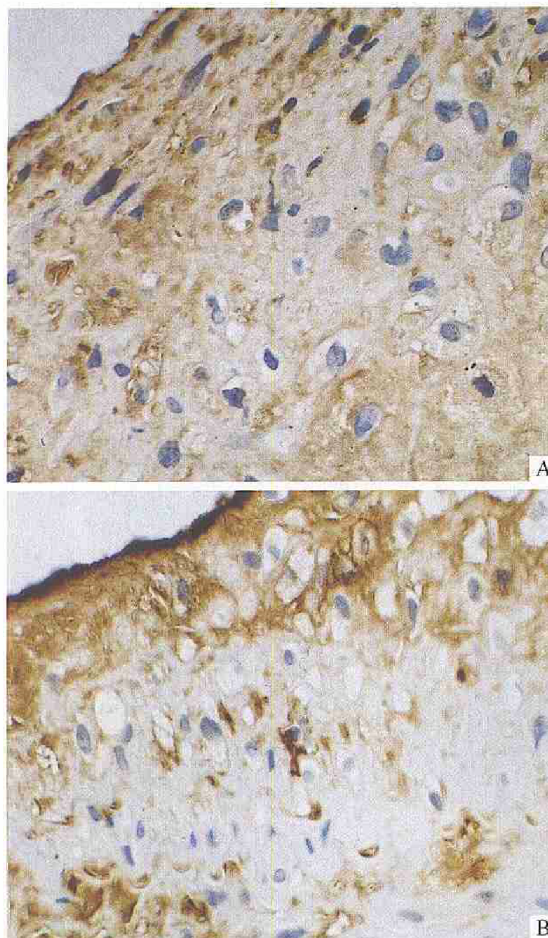


Fig 2 The p53 positive cells are significantly more in group A than in group B. A: shows p53 positive cells in group A. B: shows p53 positive cells in group B (Immunohistochemistry staining, $\times 400$).

图 2 显示 A 组 p53 基因转染部位 p53 阳性细胞数明显多于 B 组

讨 论

细胞凋亡在 As 过程中的作用已越来越引起人们的重视。在 As 斑块中存在突变型 p53 基因, 而野生型 p53 的基因表达较低, 故认为 VSMC 的异常增殖与 p53 基因突变的调节有关, 但二者的作用不同, 野生型 p53 基因对凋亡有促进作用, 而突变型 p53 基因则有抑制作用。Bennett 等^[3]发现导入的野生型 p53

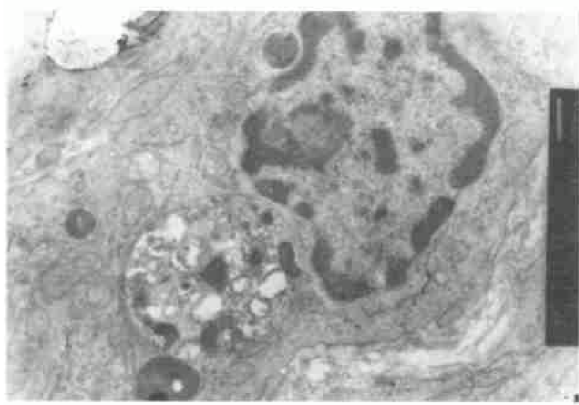


Fig 3 Scanning electron microscopy shows heterochromosomes spreading around the nucleus membrane and an apoptotic body diffusing in the plasm of a smooth muscle cell in the location of plaque rupture in group A after pharmacological triggering (× 3 500).

图 3 透射电镜显示 A 组斑块破裂部位平滑肌细胞胞核中可见异染色体边聚,胞浆中可见凋亡小体

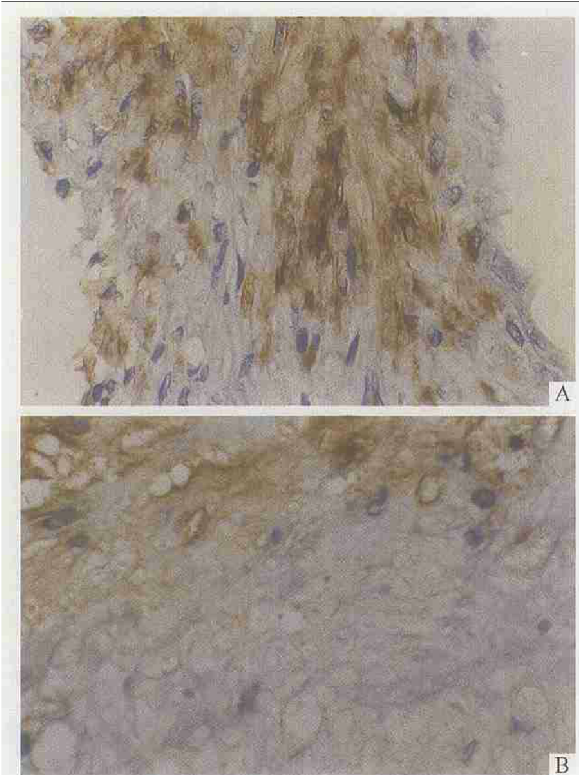


Fig 4 Apoptotic cells in the position of gene injection in group A are significantly more than in group B after pharmacological triggering. A: shows apoptotic cells in group A; B: shows apoptotic cells in group B (TUNEL, × 400).

图 4 原位末端标记 (TUNEL) 结果显示 A 组 p53 转染部位阳性凋亡细胞数明显多于 B 组

常敏感。Johnson 等^[7]证实外源性 p53 基因能诱导人 VSMC 的大量凋亡,而对小鼠的 VSMC 无此作用。Yonemitsu 等^[8]对球囊损伤后的家兔的在体研究发现,野生型 p53 可有效地抑制血管平滑肌细胞的增殖,促进 VSMC 凋亡的发生。最近 von der Thüsen 等^[9]通过转染野生型 p53 基因成功地在 ApoE 基因缺失小鼠中复制出斑块破裂的动物模型。

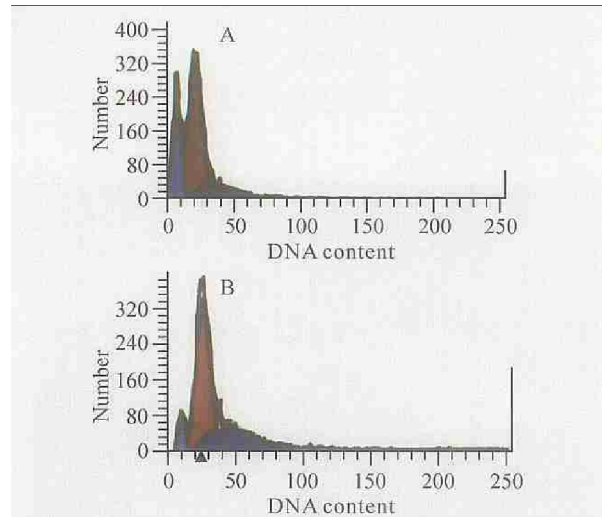


Fig 5 Flow cytometry shows apoptosis rate of vascular smooth muscle cells in group A is significantly higher than that in group B. A: shows cell cycles and apoptosis rate in group A. B: shows cell cycles and apoptosis rate in group B.

图 5 流式细胞仪结果显示 A 组基因转染部位的 VSMC 的凋亡率明显高于 B 组

我们在本研究中采用了复制缺陷型腺病毒 5 型载体,因其具有感染宿主范围广、包容量大、性质比较稳定及对人类相对安全等优点,是目前基因治疗研究中最有前途的载体之一。应用 LacZ 对照基因主要为排除腺病毒对 As 斑块的影响。p53 基因转染后,其在局部的表达明显增加,斑块部位 VSMC 的生长周期主要集中在 G₁-G₂ 期,并且凋亡率显著增加,说明 p53 对 VSMC 具有抗增殖和促凋亡的双重作用。同时发现平滑肌肌动蛋白阳性细胞数明显减少,导致了斑块的纤维帽明显变薄,斑块的纤维帽/内-中膜厚度比值减少,促使斑块向不稳定方向发展。为形成较大的脂质核,我们采用球囊损伤后高胆固醇喂养的方法。本实验中所形成的斑块与人类的不稳定斑块较为相似,虽然斑块的自发性破裂较少,但经给予内源性促凝剂蝮蛇毒及血管收缩剂组胺触发后,斑块破裂的发生率明显增加,进一步证实了基因转染后斑块的不稳定性是由 p53 的促凋亡作用所致,从而成功地建立了不稳定斑块的动物模型。

基因对 As 斑块部位的 VSMC 具有明显的促凋亡作用,与正常血管相比较,斑块部位的 VSMC 对 p53 异

von der Thüsen 等^[9]分析认为 p53 主要是通过促进 As 斑块中 VSMC 的凋亡,从而减少了纤维帽中胶原的生成;同时,p53 能选择性消除合成型 VSMC 或促使 VSMC 由合成型向收缩型转化,从而使斑块向不稳定方向发展。

近年的研究显示,As 斑块破裂和血栓形成是 ACS 的主要发病机制,而斑块的不稳定性是造成 ACS 的始动因素。然而,目前国内外尚缺乏理想的不稳定性斑块的动物模型,对 As 发生的分子生物学机制及不稳定斑块的早期识别和预防性干预的进一步研究造成了较大的困难。应用野生型 p53 的促凋亡作用构建了不稳定斑块的兔动物模型,可以为 AS 的基础和临床研究打下坚实的实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] Kockx MM. Apoptosis in the atherosclerotic plaque: quantitative and qualitative aspects[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, 18(10): 1519– 1522.
- [2] Isner JM, Kearney M, Bortman S, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis [J]. *Circulation*, 1995, 91(11): 2703– 2711.
- [3] Bennett MR, Littlewood TD, Schwartz SM, et al. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53– mediated apoptosis[J]. *Circ Res*, 1997, 81(4): 591– 599.
- [4] Falk E. Why do plaques rupture? [J]. *Circulation*, 1992, 86(6 Suppl): III30– III42.
- [5] Burke AP, Farb A, Malcom GT, et al. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly[J]. *N Engl J Med*, 1997, 336(18): 1276– 1282.
- [6] Constantinides P, Chakravarti RN. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures[J]. *Arch Pathol*, 1961, 72(8): 197– 208.
- [7] Johnson JL, Jackson CL. Atherosclerotic plaque rupture in the apolipoprotein E knockout mouse [J]. *Atherosclerosis*, 2000, 154(2): 399– 406.
- [8] Yonemitsu Y, Kaneda Y, Tanaka S, et al. Transfer of wild– type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation *in vitro* and *in vivo*[J]. *Circ Res*, 1998, 82(2): 147– 156.
- [9] von der Thüsen JH, van Vlijmen BJM, Hoeben RC, et al. Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E – /– mice after adenovirus– mediated transfer of p53[J]. *Circulation*, 2002, 105(17): 2064– 2070.