

# 心脉通对家兔颈动脉内皮损伤后野生型 p53 基因表达的影响\*

管昌益<sup>△</sup> 张文高 周苏宁 邵念方

**摘要** 目的:探讨中药复方制剂心脉通防治经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄作用机理。方法:用 Fishman 空气干燥法,建立家兔颈动脉内皮损伤模型,以组织原位杂交方法观察心脉通对家兔颈动脉内皮损伤后 p53 基因表达的影响。结果:术后 3 天出现表达,7 天表达增强,14 天表达高峰,21 天表达减弱,28 天仍然持续表达。其中 A 组(心脉通组)表达信号最强,B 组(华法令组)弱于 A 组,C 组(手术对照组)显著弱于 A、B 组。结论:心脉通能促进家兔颈动脉内皮损伤后野生型 p53 基因高表达,这可能是心脉通防治再狭窄的重要机理之一。

**关键词** 心脉通胶囊 野生型 p53 基因 再狭窄

**Effect of Xinmaitong on Wild-type p53 Gene Expression in Rabbits with Carotid Endothelial Injury** GUAN Chang-yi, ZHANG Wen-gao, ZHOU Su-ning, et al *Xiamen Hospital of TCM, Fujian (361000)*

**Objective:** To explore the mechanism of prevention and treatment of post-PTCA restenosis with Xinmaitong (XMT). **Methods:** Rabbit carotid endothelial injury model was established using Fishman air drying method. Effect of XMT on model rabbits wild-type p53 gene expression was observed by tissue in situ hybridization. **Results:** p53 gene expression appeared on the 3 days after operation, enhanced on the 7 days, reached the peak on the 14th day, weakened on the 21th, and still showed on the 28th day. The strongest expression was shown in rabbits treated by XMT, second in those treated by Warfarin, and the weakest in the operated control group. **Conclusion:** XMT could promote the high expression of wild-type p53 gene expression in rabbit with carotid endothelial injury, which is possibly one of the important mechanism of XMT in preventing and treating arterial restenosis.

**Key words** Xinmaitong capsule, wild-type p53 gene, restenosis

心脉通胶囊于 1996 年开始用于防治经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)后再狭窄取得较好疗效<sup>[1]</sup>。为探讨其作用机理,建立家兔颈动脉内皮损伤模型,以组织原位杂交方法观察心脉通对家兔颈动脉内皮损伤后 p53 基因表达的影响,结果报告如下。

## 材料与方法

1 药物及主要试剂、仪器 心脉通胶囊(主要成分:人参、何首乌、水蛭、丹参等,0.5g/粒,由山东中医药大学制药厂生产,实验用药);华法令(茚丙酮香豆素钠,由山东省千佛山医院药局提供);多聚甲醛(北京化学试剂公司产品);甘氨酸(上海政翔化学试剂研究所

出品);鲑精 DNA、Dehart(北京经科化学试剂公司出品);蛋白酶 K(华美生物工程公司出品);地高辛-duip 标记试剂盒(德国 Boehringer Mannheim 公司出品);<sup>32</sup>P-DNA 探针(北京医科大学分子病理研究室合成);MPI-500 多媒体彩色病理图文分析系统(武汉同济医科大学清平公司生产)。

2 动物和造模方法 新西兰大白兔 39 只,体重 2.5~3.0kg,山东省防疫站实验动物中心提供。喂养 1 周后随机分为 A 组(心脉通组)、B 组(华法令组)、C 组(手术对照组),每组各 13 只。采用 Fishman 空气干燥法<sup>[2]</sup>,建立家兔颈动脉损伤模型。术后 16h 给予蔬菜喂饲和饮水,A、B 组分别加心脉通 2.5g/(kg·d)、华法令 1.25mg/(kg·d),C 组不加药物。

3 标本制备 各组分别于术后 3、7、14、21、28 天气栓处死家兔,每次每组 2~3 只。严格在无污染条件下迅速取出损伤段颈动脉 1cm,置于 10% 的福乐马林固定、石蜡包埋。在无污染条件下将石蜡包埋组织用

\* 山东省自然科学基金资助项目(No. 971226215)

山东中医药大学(山东 250014)

<sup>△</sup>现在厦门市中医院心内科(福建 361000)

通讯作者:管昌益, Tel: 0592-8287695

万方数据

切片机切成 6μm 厚的切片,贴于经硅化的载玻片上,充分晾干 4℃ 冰箱保存备用。

4 组织原位杂交方法 将样本玻片置于 60℃ 恒温箱中 30min,二甲苯依次 5min、3min×2 次脱蜡,用 100%、90%、70% 乙醇 5min×3 次梯度水化,入 PBS-5mmol/L MgCl<sub>2</sub> 洗 10min,0.2mol/L HCl 于室温下洗 20min,2×SSC 5mmol/L MEDTA15min,再用 PBS 配成 0.2% 甘氨酸室温下固定 10min,4% 多聚甲醛-PBS 室温下继续固定 15min,PBS 5mmol/L MgCl<sub>2</sub> 室温下洗 15min 后加预杂交液(6×SSC、45% 甲酰胺、5×Dehart's 液、100μg/ml 变性鲑精 DNA)50μl/片,于 42℃ 恒温箱中预杂交反应 15min。预杂交后取出用 6×SSC 洗 5min,加 p53 地高辛标记探针杂交液 30μl/片(杂交液中探针浓度为 1μg/ml),于 6×SSC 液盒中 42℃ 过夜。次日取出 6×SSC-4% 甲酰胺 42℃ 恒温箱中洗 15min×2 次,2×SSC 洗 5min×2 次,入缓冲液 I 浸泡,1min 缓冲液 II 中浸泡 30min 后取出,再入缓冲液 I 洗 30min。用缓冲液 I 稀释成 1:250 浓度的抗体结合物滴在切片上反应 30min,继续用缓冲液 I 洗 15min×2 次,缓冲液 III 平衡 2min 后快速避光下将 NBT-BCIP 显色液加于样本玻片上,置于缓冲 III 湿盒中避光反应 8h。取出用缓冲液 IV 洗 5min,80%、95%、100% 乙醇各 5min 梯度脱水,二甲苯洗 5min×2 次,树脂封片,镜检,图像分析。紫蓝色和蓝色产物为杂交阳性信号。另设立无标记探针阴性对照。

5 图像分析 采用武汉同济医科大学清平公司软件 MPI-500 多媒体彩色病理图文分析系统。本图像软件中将颜色最深级别定为 0 级,无颜色定为 256 级。操作方法 将多功能显微镜下颈动脉原位杂交切片图像直接输入电子计算机图像分析,定量测量阳性反应颗粒的面积及细胞数,定量分析确定定标 20 倍,灰度值 235 级,在这同一阈值下把所有样本全部测完,每张切片放大 200 倍,随机测 5 个视野,每张组织切片取一均值。

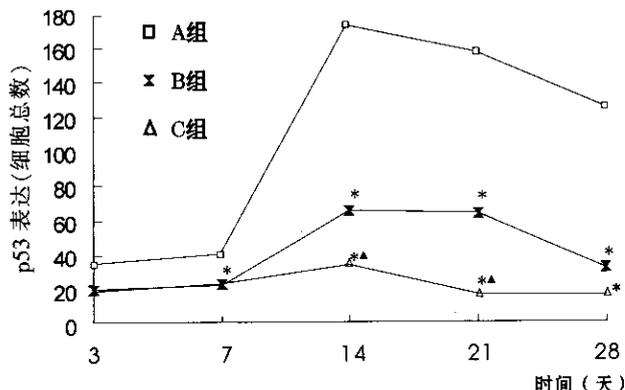
6 统计学方法 图像分析资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,统计学分析用方差分析。

### 结 果

1 无标记探针杂交结果 3 个无标记探针阴性对照片,在镜下仅见本底水平的颗粒,无阳性信号表达,说明本实验原位杂交是特异的。

2 p53 基因杂交结果 野生型 p53 基因杂交是以 Dig-p53DNA 为探针,长度为 199bp。杂交结果见图 1。表返芬帮裡中膜平滑肌细胞内和新生内膜细胞

内,呈星点状或片状分布。各组于术后第 3 天出现表达。A 组表达信号较 B、C 组强,但 3 组间比较差异无显著性。7 天后 3 组表达均有增强趋势,A 组与 B、C 组比较差异有显著性( $P < 0.05$ )。B、C 组比较,差异无显著性。第 14 天时各组表达达高峰,A 组与 B、C 组比较差异有显著性( $P < 0.01$ )。B、C 组间比较,差异有显著性( $P < 0.05$ )。21 天时 A、B、C 组表达呈下降趋势,B 组自身比较下降趋势不明显。A 与 B、C 组比较,差异有显著性( $P < 0.01$ )。B 组与 C 组比较,差异亦有显著性( $P < 0.05$ )。28 天时 A 组表达虽呈继续下降趋势,但仍然呈高表达状态。B 组下降至低表达状态,C 组处于持续低表达。但 A 组与 B、C 组之间比较差异亦有显著性( $P < 0.05$ )。从上述实验结果可见,各组表达虽均出现时相变化,但 A 组表达信号最强,表达可见于中内膜,以内膜最强,始终处于较高和高表达状态。C 组一直处于持续低表达,呈少量散在性分布。提示心脉通能促进家兔颈动脉内皮损伤后野生型 p53 基因高表达。



注:与 A 组比较,\* $P < 0.01$ ;与 B 组比较,▲ $P < 0.05$

图 1 3 组家兔颈动脉损伤后 p53 表达比较

### 讨 论

p53 基因是一种重要的抑癌基因,有野生型和突变型两种。野生型 p53 基因促进细胞凋亡,突变型 p53 基因抑制细胞凋亡<sup>[3]</sup>,野生型 p53 基因以序列专一的方式与 DNA 结合,激活 WAG<sub>1</sub>/CTP<sub>1</sub>/AD II 基因,使基因产物 p53 抑制了周期蛋白依赖性激酶<sup>[4]</sup>,关闭复制过程,启动修复过程,因此可将 DNA 受损的细胞封闭在 G<sub>1</sub> 期,待损伤修复后再进入细胞周期。研究表明,野生型 p53 基因能诱导转染有 c-myc 和 E1A 基因的平滑肌细胞(SMC)发生凋亡,而对正常的 SMC 无此作用<sup>[5]</sup>。再狭窄的形成与细胞凋亡有密切关系,

(下转第 454 页)

3 步宏, 陈卫国, 刘于宾, 等. 益生注射液抗大鼠腹主动脉移植硬化的实验研究. 华西药理学杂志 2000; 15(3): 185—187.

4 杨华蓉, 陈嘉钰, 蔡绍晖, 等. YMB 注射液对大鼠血液流变学的影响. 华西医科大学学报 2000; 31(2): 230—233.

5 蒋红梅, 李明, 李幼平, 等. 人离体睾丸缺氧再给氧损伤实验观察及干预研究. 中国修复重建外科杂志 2001; 15(6): 377—380.

6 李胜富, 蒋红梅, 李幼平, 等. 人内皮细胞缺氧再给氧损伤及益生注射液对其拮抗机理研究. 华西医科大学学报 2002; 33(2): 215—219.

7 谢锦玉主编. 现代细胞化学技术及其在中西医药中的应用. 北京: 中医古籍出版社, 1998: 113—115.

8 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社 2000: 120—189, 278—314, 342—398, 431—441.

9 金晶. NFκB 的研究进展. 国外医学药学分册 2000; 27(3): 133—135.

10 李幼生, 黎介寿, 李宁, 等. 丹参对低温保存小肠的保护作用. 中华实验外科杂志 1997; 14(3): 178—180.

11 Goes N, Urmson J, Ramassar V, et al. Ischemia acute tubular necrosis induces an extensive local cytokine response evidence for induction of interferon-gamma, transforming growth factor-beta 1, granulocytemacrophage colony-stimulating factor, interleukin-2 and interleukin-10. Transplantation 1995; 59: 565—571.

12 Duquesnoy RJ, 李幼平, 主编. 移植免疫生物学. 北京: 科学出版社 2000: 269—281.

(收稿 2002-03-24 修回 2003-03-10)

(上接第 448 页)

晚近研究发现 38% 的再狭窄病变中 p53 蛋白失活<sup>[6]</sup>, 这说明再狭窄的形成与 PTCA 术后 p53 蛋白失活, 导致 SMC 凋亡障碍而过度增殖有关. 本实验的上述结果说明心脉通能促进家兔颈动脉内皮损伤后野生型 p53 基因高表达. 有研究表明用野生型 p53 基因导入体外培养的兔血管 SMC, 表达后使 SMC 的 S 期细胞数下降, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增加, 提示野生型 p53 基因能有效地通过阻止细胞进入 S 期而抑制细胞过度增殖<sup>[7]</sup>. 本文作者的另一研究从细胞凋亡时相中亦发现细胞凋亡出现于野生型 p53 基因高表达之后, 这提示细胞凋亡可能与野生型 p53 基因高表达有关. 心脉通能有效防治再狭窄, 其作用机理可能是促进野生型 p53 基因高表达之后, 将细胞封闭在 G<sub>1</sub> 期, 诱导 SMC 凋亡, 使 S 期细胞数减少, 从而使 SMC 增殖速度减慢, 达到抑制 SMC 过度增殖, 减少再狭窄的发生.

(对崔连群、段文昌、李国华、胡维城、阎晓梅、高梅、宁美芳、蔡卫东、徐希云、史大卓、徐浩在实验中给予的支持和热情帮助, 致以衷心感谢)

### 参 考 文 献

1 张文高, 邵念方, 管昌益, 等. 中医药防治经皮腔内冠状动脉

成形术后再狭窄的现状和思路. 山东中医药大学学报 2000; (1): 7—9.

2 Fishman JA, Ryan GB, Karnovsky MJ. Endothelial regeneration in the rat carotid artery and the significance of endothelial denudation in the pathogenesis of myointimal thickening. Lab Invest 1975; 32: 339—351.

3 张金萍, 寻玉凤, 高英茂. 程序性细胞死亡与基因. 济宁医学院学报 1997; 20(3): 68—70.

4 唐蔚青, 王抒, 黎健. 野生型 p53 基因导入诱导血管平滑肌细胞凋亡. 中国动脉硬化杂志 1997; 9(3): 194—198.

5 邹飞雁, 杨和平, 涂玉林, 等. 动脉粥样硬化的平滑肌细胞凋亡的研究进展. 中国动脉硬化杂志 1997; 9(1): 75—79.

6 刘凡光, 祝善俊, 李天德. 血管成型术后平滑肌细胞增殖的机制. 国外医学心血管疾病分册 1997; 24(6): 10—12.

7 蒋雷, 夏永静, 黎健. 野生型 p53 基因导入对培养的兔血管平滑肌细胞生长的抑制作用. 中华心血管病杂志 1997; 25(4): 301—304.

(收稿 2002-01-08 修回 2003-03-10)