

# 心脉通对家兔颈动脉内皮损伤后原癌基因 c-myc 表达的影响<sup>※</sup>

□ 管昌益<sup>1\*</sup> 张文高<sup>2△</sup> 周苏宁<sup>2</sup> 邵念方<sup>2△</sup>

(1. 厦门市中医院 福建 厦门 361001 2. 山东中医药大学 山东 济南 250014)

**摘要** 目的:探讨中药复方制剂心脉通胶囊防治经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)后再狭窄的作用机理。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原癌基因 c-myc 表达的影响。结果:心脉通组基因杂交阳性颗粒表达信号弱,而华法令和手术空白对照组基因表达信号显著增强,杂交阳性细胞数、杂交信号平均光度对比、杂交信号实面积、杂交信号积分光密度,均明显少于华法令和手术空白对照组。结论:心脉通具有抑制家兔动脉内皮损伤后 c-myc 基因高表达的作用,其有效防治 PTCA 后再狭窄的作用机理之一可能是通过抑制动脉内皮损伤后 c-myc 表达,从而间接抑制 PDGF 等生长因子分泌,达到抑制平滑肌细胞增殖的作用。

**关键词** 心脉通 原癌基因 c-myc 组织原位杂交 动脉内皮损伤 动物模型 动物实验

心脉通胶囊系导师邵念方教授治疗冠心病的验方经提取有效成分而制成。主要成分为人参、何首乌、水蛭、丹参等。该药于 1996 年开始用于防治经皮腔内冠状动脉成形术(PTCA)后再狭窄(RS)取得良好疗效。为探讨其作用机理,本研究建立家兔颈动脉内皮损伤模型,以组织原位杂交方法观察其对家兔颈动脉内皮损伤后原癌基因 c-myc 表达影响,结果报告如下。

※基金项目 山东省自然科学基金资助项目(No:Y97C22058)。

\*作者简介 管昌益,男,医学博士,副主任医师。主要从事中西医结合心血管疾病临床研究工作。

△导师

## 1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂、仪器 心脉通胶囊(山东中医药大学制药厂生产);多聚甲醛(北京化学试剂公司生产);甘氨酸(上海政翔化学试剂研究所生产);鲑精 DNA、Dehart(北京经科化学试剂公司产品);蛋白酶 K(华美生物工程公司产品);地高辛-dUIP 标记试剂盒(德国 Boehringer Mannheim 公司产品);C-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产品)。

1.2 动物选择和造模方式 新西兰大白兔 49 只,体

重 2.5 ~ 3.0 kg, 由山东省防疫站实验动物中心提供。喂养一周后随机分为五组: A 组 (心脉通)、B 组 (华法令)、C 组 (手术对照), 每组各 13 只, D 组 (假手术)、E 组 (正常对照组), 每组各 5 只。采用 Fishman 空气干燥法改进, 建立家兔颈动脉内皮损伤模型<sup>[1]</sup>: 正常饲养观察 10 天后用 20% 乌拉坦 5ml/kg 行耳缘静脉麻醉, 剪毛, 显露颈部皮肤, 75% 酒精消毒, 沿颈部正中中线切开约 3 ~ 4cm 切口, 剥离肌层, 暴露左颈总动脉, 用 4.0 丝线分别紧扎两端血管, 两结扎线间距约 2.5 cm, 该段动脉无血管分支, 取 6 号注射器从远端穿刺结扎段动脉腔内, 将生理盐水注入动脉腔内, 改变针头高度, 沿动脉管腔向近端行进, 途中避免接触血管壁, 直至到该段血管之近端, 以针头快速穿透血管近端管壁, 沿管腔将针头退至穿刺处, 以生理盐水将该段血管中之血液冲洗干净后, 去掉注射器, 保留针头在血管中换接上一可调控的压缩空气泵, 以 25ml/min 流速的气流通过该段血管腔, 持续约 10min 后再次将管腔中充以生理盐水, 拔出针头, 用眼科剪剪除结扎线, 以盐水纱布压迫二处穿刺点, 10min 后结扎皮肤, 红汞消毒。术后给予蔬菜喂饲和饮水, 16 小时后分别喂饲饲料和药物。A、B 组分别喂饲心脉通 2.5 g/kg/d、华法令 1.25 mg/kg/d, C、D、E 组不予喂饲药物。

**1.3 标本制备** 每组分别于术后 3、7、14、21、28 天气栓处死动物, 按分子生物学实验操作方法, 严格在无污染条件下迅速取出损伤段颈动脉 1cm, 置于 10% 的福尔马林中固定、石蜡包埋。在无污染条件下将石蜡包埋组织用切片机切成 6mm 厚的切片, 贴于经鲑化的载玻片上, 充分凉干, 4℃ 冰箱保存备测。于造模前和处死前从耳缘静脉抽血 2ml 检测血管内皮素 (ET)。

#### 1.4 组织原位杂交操作过程

**1.4.1 杂交前预处理** 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-5mM MgCl<sub>2</sub> 洗 10min, 0.2 NHCL 于室温下洗 20min, 2 × SSC-5mM EDTA 在室温下洗 30min, 用 PBS 配成蛋白酶 K 1μg/ml 于 37℃ 恒温箱中消化 15min, 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-5mM 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。

**1.4.2 杂交** 预杂交后取出用 6 × SSC 洗 5min, 分别加 P53、c-myc 地高辛标记探针杂交液 30μg/片 (杂交液中探针浓度为 1μg/ml), 于 6 × SSC 液盒中 42℃ 过夜。

**1.4.3 杂交后处理** 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 后在快速避光下将 NBT-BCIP 显色液加于样本玻片上, 置于缓冲液 III 湿盒中避光反应 8h。取出用缓冲液 IV 洗 5min, 以 80%、95%、100% 乙醇各 5min 递度脱水, 二甲苯洗 5min × 2 次, 树脂胶封片, 镜检, 图像分析紫蓝色和蓝色产物为杂交阳性信号。以上两种探针杂交均设立无标记探针阴性对照。

**1.4.4 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作图像分析, 定量测量阳性反应颗粒的数量、实面积和光密度 (MOD)、积分光密度 (IOD), 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。

**1.5 统计学分析** 图像分析资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计学分析用 *t* 检验。

## 2 结果

**2.1 无标记探针杂交结果** 两种杂交设立的 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。

**2.2 c-myc 基因杂交结果** c-myc 基因杂交是以 c-myc

C-DNA为探针。杂交结果(见表1)表明:华法令和手术对照组 c-myc 基因表达信号显著增强,表达分布在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。心脉通组 c-myc 基因杂交阳性颗粒表达信号弱,在血管中、内膜平滑肌细胞可见散在分布的杂交信号,表达明显低于华法令、手术对照组。心脉通组阳性细胞数及阳性杂交实面积、平均光度、分光密度均明显少于华法令、手术对照组,提示心脉通对血管内皮损伤后原癌基因 c-myc 的高表达有抑制作用。

### 3 讨论

c-myc 基因是最早发现的原癌基因之一,是细胞核内调控基因。myc 蛋白是一种转录因子,具有与 DNA 结合的能力,正常情况下不表达或轻微表达,调节细胞的生长分化,受刺激后可异常表达,促进细胞增殖<sup>[2]</sup>。近年研究发现 c-myc 基因对细胞增殖与凋亡具有双向调节作用,当有致癌因素、生长因子等丝裂原存在时,可促进细胞增殖,当缺少细胞生长因子或有抑癌因子存在时,可促进细胞凋亡<sup>[3]</sup>。c-myc 基因在内皮剥脱后可出现大量表达。有实验表明,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 表达水平逐渐下降,至 6 周末仍略高于对照组。c-myc 表达高峰在血管 SMC 大量增殖之前,但持续大量表达时间较长<sup>[4]</sup>。c-myc 基因可促使血小板衍生生长因子(PDGF)分泌,而 PDGF 是促有丝分裂剂,在再狭窄发生中起重要作用<sup>[2]</sup>。本实验研究用组织原位杂交方法观察心脉通对家兔颈动脉内皮损伤后 c-myc 的表达影响,发现手术空白对照组 c-myc 于内皮损伤后 3 天出现少量阳性信号表达,7 天表达显著增加,14 天表达高峰,21 天后表达水平下降,28 天仍然持续表达,与上述结果不尽一致,其原因有待进一步探讨。本实验结果心脉通 c-myc 阳性信号表达明显弱于华法令和手术空白对照组,表明心脉通能抑制家兔动脉内皮损伤后 c-myc 高表达,提示心脉通防治再狭窄作用机理之一,可能是通过直接抑制

表 1 各组 c-myc 基因杂交结果比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

	n	阳性细胞数	阳性杂交信号实面积	阳性杂交信号平均光度	阳性杂交信号积分光密度
A 组	13	30.75 ± 4.03 *	618.23 ± 49.43 *	2.91 ± 0.98 ***	78.25 ± 41.42 **
B 组	13	55.50 ± 8.19 Δ	1253.00 ± 162.59 ΔΔ	6.80 ± 1.60 Δ	219.55 ± 62.06 Δ
C 组	13	78.50 ± 31.85	2310.93 ± 1162.61	8.02 ± 3.65	332.55 ± 178.40

注:与 C 组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.005$ ,\*\*\*  $P < 0.001$ ;与 A 组比较,Δ  $P < 0.01$ ,ΔΔ  $P < 0.001$ 。

动脉内皮损伤后 c-myc 高表达,间接抑制了 PDGF 等生长因子的大量分泌,达到抑制血管 SMC 增殖,从而有效防治再狭窄。

### 参考资料

- [1] 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. *Lad Invest*, 1975, 32: 339-351.
- [2] 王岚峰, 赵进军, 黄永麟, 等. 原癌基因 c-fos 及 c-myc 在血管成形术后异常表达的实验研究. *中华心血管病杂志*, 1995, 23: 217.
- [3] 张金萍, 寻玉凤, 高英茂. 程序性细胞死亡与癌基因. *济宁医学院学报*, 1997, 20: 68.
- [4] 万腊香, 张 彤, 杨和平. 高血脂症兔主动脉内皮剥脱后 c-myc 基因的表达. *中国动脉硬化杂志*, 1997, 5: 45.

### 【简讯】

## 福建省中西医结合学会男科分会在福州市成立

福建省中西医结合学会男科分会成立暨学术会议于 2002 年 12 月 3 日~5 日在福州市召开。来自全省中医、西医及中西医结合的专家、学者 40 余人出席了会议。福建省中西医结合学会肖钦朗秘书长出席会议并作了讲话。大会推选福建省人民医院张敏建主任医师任主任委员,李启镛、卢太坤、曹林升、戴西湖、戴春福、林应华为副主任委员。周志、曾金雄为秘书。大会交流了 30 余篇学术论文,从基础理论到临床实践,加深了对中西医结合男科内涵的认识,提高了理论和临床水平。

(福建省中西医结合学会男科分会)