

· 基础研究 ·

三氧化二砷预防家兔血管损伤后再狭窄及其机理的研究

赵智琛 张琳 黄从新 王晶 王晔

【摘要】 目的 探讨应用三氧化二砷(As_2O_3)预防血管损伤后再狭窄的效果及其作用机制。方法 观察 As_2O_3 对培养兔血管平滑肌细胞(VSMC)生长的影响。32 只新西兰白兔随机分为 2、4 周实验组和对照组,应用 10% As_2O_3 $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 或等量生理盐水腹腔注射后 3 d,球囊损伤左颈总动脉。处死动物取血管作形态学和免疫组化检测,检查肝脏、肾脏组织学。结果 细胞形态学和凋亡 DNA 片段电泳证实, As_2O_3 诱导培养 VSMC 凋亡,与药物浓度和作用时间呈依赖性。与对照组相比,2 周实验组血管内膜增殖面积显著减少($P<0.05$),4 周实验组内膜面积无明显差异;但 2 周和 4 周实验组的管腔面积均有明显增大(均 $P<0.05$)。免疫组化检测发现,与对照组相比,实验组 2、4 周 Bcl-2 蛋白表达下调(均 $P<0.05$),bax 蛋白表达上调(分别 $P<0.01$, $P<0.05$),这与相应时间段的血管内膜增生受抑制,血管腔面积扩大相一致。结论 As_2O_3 能有效地预防实验性血管损伤后再狭窄,与抑制 bcl-2 基因和活化 bax 基因而诱导细胞凋亡有关。

【关键词】 再狭窄;血管平滑肌;凋亡;bcl-2 基因;bax 基因;三氧化二砷

Preventive effect of arsenic trioxide on restenosis after rabbit vascular injury and its mechanism

ZHAO Zhichen¹, ZHANG Lin¹, HUANG Congxin², WANG Jing², WANG Xi²¹ Department of Cardiology, Zhengzhou Central Hospital, Zhengzhou 450007, China² Department of Cardiology, Renmin Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the preventive effect of arsenic trioxide on restenosis after vascular injury and its mechanism. **Methods** Effect of arsenic trioxide on vascular smooth muscle cells *in vitro* was observed. Then 32 New Zealand white rabbits were divided randomly into two- and four-week study groups and a control group. Ten percent arsenic trioxide $2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ or same volume of 0.9% sodium chloride was given by intraperitoneal infusion respectively three days before left common carotid arteries were denuded by balloon. Two or four weeks after denudation, the animals were sacrificed for morphological and immunohistochemical studies on carotid arteries, and for histological study on liver and kidney. **Results** It was showed by cellular morphology and DNA fraction in electrophoresis that promoting effect of arsenic trioxide on cultured vascular smooth muscle cell apoptosis was dependent upon its concentration and duration of action. Compared with the control animals, the mean vascular intimal proliferation areas in the study animals after injury were reduced in two-week group ($P<0.05$) and not different in four-week group ($P>0.05$), but the mean vascular lumen areas were significantly enlarged in both two- and four-week groups ($P<0.05$). Compared with control groups, the downregulated Bcl-2 protein expression (all $P<0.05$) and the upregulated Bax protein expression ($P<0.01$ in two-week group; $P<0.05$ in four-week group) were detected by immunohistochemical examination. The protein expression was consistent with the suppression of intimal proliferation and the enlargement of luminal area in the corresponding samples. **Conclusions** Arsenic trioxide can prevent effectively the experimental restenosis after artery injury and induce vascular smooth muscle cell apoptosis, possibly via suppressing bcl-2 and activating bax genes.

【Key words】 restenosis; vascular smooth muscle; apoptosis; bcl-2 gene; bax gene; arsenic trioxide

作者单位:450007 郑州,河南省郑州市中心医院内科(赵智琛,张琳);430060 武汉,武汉大学人民医院内科(黄从新,王晶,王晔)

作者简介:赵智琛,男,医学博士,副主任医师,副院长

通讯作者:赵智琛,电话:0371-7652738

我国人群中冠心病发病率逐年上升,经皮腔内冠状动脉成形术是有效的治疗方法之一。但是,成形术后半年内再狭窄率较高,严重影响远期效果。研究发现,再狭窄主要与血管平滑肌细胞(VSMC)

向内膜下迁移并过度增殖有关^[1]。因此,探索有效预防 VSMC 增殖是防止再狭窄的主要方法。

凋亡是生物进化过程中保守的生理性细胞死亡形式,它可以调节细胞数量和多种组织结构,是由特定基因调控的细胞程序性死亡,并发现了调控细胞凋亡的基因家族。尤其是显性原癌基因 bcl-2 和凋亡基因 bax,具有强大的调节细胞凋亡作用,它们均属于 bcl-2 家族。Bcl-2 蛋白和 Bax 蛋白形成二聚体,共同调节细胞生存。这样,凋亡细胞数量和增殖细胞数量的相对平衡,决定细胞对凋亡诱导作用的反应。

可用于治疗皮肤病和急性早幼粒细胞白血病^[2,3]的三氧化二砷(As_2O_3),发现它通过下调抗凋亡的 bcl-2 基因表达而诱导白血病细胞凋亡^[4]。在再狭窄部位和动脉粥样硬化斑块 均可发现 VSMC 凋亡。所以联想到 As_2O_3 是否能用于诱导 VSMC 凋亡,减少其数量,达到预防再狭窄的目的。本实验观察 As_2O_3 诱导培养家兔 VSMC 凋亡情况,预防模型动物血管损伤后再狭窄,并探讨其可能的作用机理。

1 方法

1.1 VSMC 培养 应用组织块贴壁法培养新西兰白兔胸主动脉平滑肌细胞。第 3 代细胞经抗 α -肌动蛋白(α -actin)抗体免疫组化染色鉴定为 VSMC,实验用 VSMC 为第 6~10 代。实验组 VSMC As_2O_3 (哈尔滨伊达制药厂)浓度为 1.5, 2.0, 3.0, 4.0 $\mu\text{mol/L}$, 分别培养 24, 48, 72 和 96 h, 对照组不加药物。1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 在预实验中不影响 VSMC 凋亡,故最低浓度取 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2 凋亡细胞的制备 用不同药物浓度的 VSMC (约 6×10^6 个)洗脱,固定及脱水,超薄切片,透射电镜观察细胞超微结构(JEM1200 ExII 型, Jeol Ltd, 日本)。

1.3 DNA 提取及电泳 按文献介绍方法^[5]提取 DNA。在紫外灯下观察凋亡 DNA 电泳梯度,摄片。

1.4 流式细胞仪分析 按文献介绍的方法^[5]进行分析,将不同时间、浓度的细胞凋亡率绘成曲线图。

1.5 动物模型 新西兰白兔 2.0~2.5 kg 32 只,称重后随机分为 2, 4 周实验组和对照组(每组雌雄各 4 只)。

1.6 动脉内膜损伤 实验组腹腔注射 10% As_2O_3 2.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 对照组注射等量生理盐水 3 d 后,按文献介绍的方法制作动脉内膜损伤模型。

1.7 形态学检查 动脉内膜损伤 2, 4 周后处死动物,取出双侧颈总动脉, PBS 冲洗血管腔,经固定脱水后,石蜡包埋,每隔 4 mm 作切片, HE 染色,测定内膜面积和管腔面积(HJPAS-1 000 彩色病理成像

系统)。所有血管均分成两段,一段血管横断面切片作形态学测定,另一段血管长轴切片免疫组化检测。观察肝脏、肾脏颜色,测重,分别取肝脏、肾脏 10 mm $\times$ 10 mm 组织块,按前述方法固定、切片,光镜下观察。

1.8 免疫组化 应用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶法检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达。

1.9 统计学分析 数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 t 检验比较组间差异,以 P 值 < 0.05 差别有统计学意义。

2 结果

2.1 凋亡细胞特征 实验组微绒毛减少,部分消失;胞浆中内质网数量减少,部分扩张成空泡状;核仁消失,核染色质固缩,呈境界分明的团块状聚集于核膜内缘,即核边集现象;部分核膜破裂(图 1A)。上述表现在 4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理 96 h, 凋亡细胞数最多;而 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理 24 h, 凋亡细胞数最少。对照组 VSMC 微绒毛完整且比较丰富,内质网丰富,胞核形态规则,核仁清晰(图 1B)。

2.2 流式细胞仪结果 与对照组相比, VSMC 经过较高浓度和较长时间 As_2O_3 处理,出现明显的二倍体亚 G_1 凋亡峰(图 2)。将不同时间、浓度的 VSMC 亚 G_1 凋亡峰值绘制成曲线图(图 3)。

2.3 凋亡 DNA 琼脂糖凝胶电泳 用各种浓度 As_2O_3 处理细胞 24 h, DNA 凋亡梯形带不明显;而 3.0~4.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度处理 > 48 h, 可见清晰、典型细胞凋亡梯形带 142, 174 bp(图 4)。

2.4 形态学检查结果 与对照组相比,实验组显示, 2 周血管内膜面积明显减少($P < 0.05$),而 4 周减少不明显($P > 0.05$);但 2, 4 周中膜面积也明显减小。因此, 2, 4 周平均血管腔面积均增大(均 $P < 0.05$, 表 1);外弹力板内的总血管面积明显增大($P < 0.05$)。肝脏和肾脏外观及组织学结构均未见明显异常。

2.5 Bcl-2 和 Bax 蛋白免疫组化 Bcl-2、Bax 表达以胞浆出现清晰的黄色沉淀为阳性,分别计数内膜和中膜各自不相连的 5 个 40 倍视野阳性细胞数的比例(表 2)。与对照组相比, 2, 4 周实验组 bcl-2 表达均明显降低(均 $P < 0.05$); Bax 表达显著增加(2 周 $P < 0.01$, 4 周 $P < 0.05$)。

3 讨论

由于 VSMC 引起的内膜增殖在再狭窄过程中发挥关键性作用,本实验应用诱导 VSMC 凋亡的方法,减少其增殖。结果表明 As_2O_3 能够诱导 VSMC 凋亡,减轻内膜、中膜增厚使管腔面积增大,与抑制

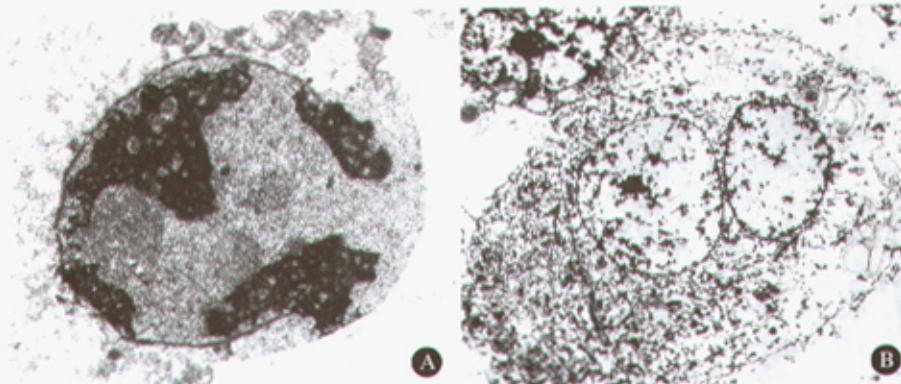


图 1 凋亡细胞特征. A: 实验组; B: 对照组

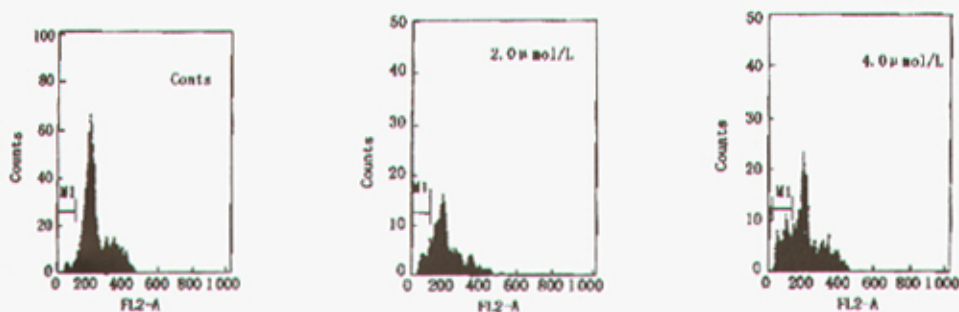


图 2 不同药物浓度细胞凋亡峰. A: 对照组; B: 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组; C: 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 组

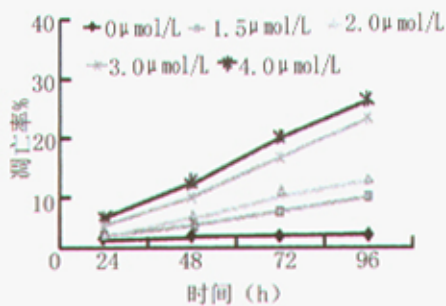


图 3 细胞凋亡图

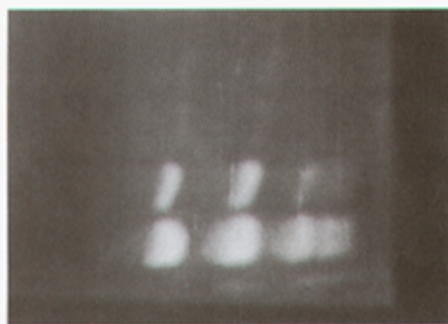


图 4 凋亡细胞电泳梯形带

1.0 $\mu\text{mol/L}$ 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 3.0 $\mu\text{mol/L}$ 4.0 $\mu\text{mol/L}$

表 1 血管形态学结果 ($\text{mm}^2, \bar{x} \pm s$)

面 积	2 周		4 周	
	实验组	对照组	实验组	对照组
管腔面积	$7.24 \pm 0.56^*$	4.78 ± 0.63	$3.12 \pm 0.70^*$	2.91 ± 0.43
内膜面积	$0.53 \pm 0.12^*$	0.76 ± 0.19	0.28 ± 0.17	0.37 ± 0.15

* $P < 0.05$, 与对照组比较

表 2 Bcl-2、Bax 表达免疫组化检测阳性结果(%, $\bar{x} \pm s$)

时 间	Bcl-2		Bax	
	实验组	对照组	实验组	对照组
2 周	36.3 ± 6.8*	70.2 ± 15.4	68.9 ± 15.1**	21.6 ± 7.3
4 周	29.8 ± 7.5*	60.7 ± 14.8	47.4 ± 10.2*	26.7 ± 6.1

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较

bcl-2 基因表达和上调 bax 基因表达有关。

3.1 As₂O₃ 诱导 VSMC 凋亡作用 抑制 VSMC 增生或促使其死亡, 据认为是有效预防再狭窄的具有前景的方法之一。本实验结果支持应用 As₂O₃ 处理引起 VSMC 死亡。体外 1.5~4.0 μmol/L As₂O₃ 促进 VSMC 凋亡, 随着药物浓度增加和作用时间的延长, 这种作用更明显, 最高凋亡率 > 30%, 与文献报道的结果相一致^[6]。142, 174bp 凋亡 DNA 片段清晰可见, 它们均属于低分子 DNA 片段, 前者系核小体 DNA 片段的长度, 表明在 As₂O₃ 诱导下, 细胞染色质在核小体之间被内源性核酸酶切断。174bp 为核小体亚单位 DNA 片段长度, 代表典型的凋亡 DNA 片段长度^[7]。当 As₂O₃ 处理细胞 > 48 h, 174 bpDNA 片段更清晰。提示在 As₂O₃ 作用下, DNA 长链被切成典型的凋亡 DNA 长度。流式细胞仪结果亦显示, 与 24 h 相比, 处理 48~96 h 出现较为明显的亚 G₁ 二倍体凋亡峰。总之, 细胞形态学和分子生物学结果均表明 As₂O₃ 诱导 VSMC 凋亡, 与其浓度、时间有关。

那么, 在体内 As₂O₃ 是否对 VSMC 也有效? 与对照组相比, 2 周组模型动物血管内膜增生面积明显减少($P < 0.05$), 4 周时减少不明显($P > 0.05$); 2, 4 周 血管中膜面积均减小(均 $P < 0.05$), 所以, 平均管腔面积明显扩大(2, 4 周均 $P < 0.05$)。提示 As₂O₃ 不仅诱导血管内膜细胞凋亡, 也影响血管中膜细胞; 中膜 VSMC 凋亡也有助于血管腔面积的扩大。有报道血管损伤后内膜增生在 2 周时最明显, 而中膜 VSMC 凋亡在损伤后 18 h 高峰, 14 d 凋亡停止^[8]。本实验发现, As₂O₃ 诱导内膜细胞凋亡至少持续 2 周, 在血管中膜持续 4 周。结果明确支持, As₂O₃ 通过诱导 VSMC 凋亡, 减轻内膜增生和中膜形成, 预防模型动物血管损伤后再狭窄。

3.2 As₂O₃ 作用机制 As₂O₃ 是目前缓解难治性急性早幼粒白血病最有效的药物之一^[2,3], 发现与 As₂O₃ 抑制增生性 bcl-2 基因表达有关^[4]。本实验显示 As₂O₃ 预防实验性再狭窄, 是否亦与抑制 bcl-2 基因有关?

与对照组相比, 血管壁 Bcl-2 蛋白表达在 2, 4 周均明显下调(均 $P < 0.05$); 但是, Bax 蛋白表达上调更显著(2 周 $P < 0.01$, 4 周 $P < 0.05$)。这些结果表明, As₂O₃ 下调 Bcl-2 蛋白所产生的抗凋亡作用, 相应地上调 Bax 表达, 最终诱导细胞凋亡。Bcl-2 蛋白高水平表达, 保护细胞 DNA 链免受各种因子诱发的降解^[9,10]。bcl-2 基因使肿瘤细胞无限制生长, 主要是延长细胞寿命, 而非增加细胞增殖率; 当 Bax 蛋白与 Bcl-2 蛋白相结合形成二聚体, 则阻断后者的抗凋亡效应^[11]。As₂O₃ 诱导凋亡与 Bcl-2 明显下调及 Bax 显著上调相吻合。bcl-2 基因抑制凋亡与延长 VSMC 寿命也有关^[12]。当细胞 Bcl-2 蛋白过度表达, 能部分抵消 As₂O₃ 诱导细胞凋亡作用^[10]。人动脉粥样硬化斑块中 VSMC Bax 蛋白表达升高, 该部位发生凋亡的频率也高^[12], 提示细胞凋亡与 VSMC Bax 蛋白表达上调相关。本实验结果显示, 2, 4 周时 Bax 蛋白表达上升及 Bcl-2 蛋白表达下降, 与管腔面积扩大相吻合。总之, As₂O₃ 预防模型动物的再狭窄, 与 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的改变有关, 诱导细胞凋亡, 最终抑制 VSMC 过度增殖。

3.3 安全性评价 接受 As₂O₃ 2.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 17, 31 d 的动物肝、肾组织标本显示了其安全性。肝、肾外观, 大小和重量与对照组相比无差异。肝小叶结构完整, 细胞排列规则, 汇管区未见炎性细胞。肾小球形态正常, Bowman 囊未见粘连, 肾小管完整, 未见小管上皮细胞变性和坏死。因此, 该剂量的 As₂O₃ 对再狭窄动物模型是安全的。

参 考 文 献

- 1 Lincoff MI, Topol EJ. Interventional catheterization techniques. In: Braunwald E, eds. Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine, 5th ed. Harcourt Publisher, 1999. 1372-1375.
- 2 孙鸿德, 马玲, 胡晨, 等. 癌灵 I 号结合中西医辨证治疗急性早幼粒白血病 32 例. 中国中西医结合杂志, 1992, 12:170-171.
- 3 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷注射液治疗 72 例急性早幼粒白血病. 中华血液杂志, 1996, 17:58-60.

- 4 Chen GQ, Zhu J, Shi XG, et al. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanism of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB cell apoptosis with down regulation of bcl-2 expression and modulation PML-RAR α /PML proteins. *Blood*, 1996, 88: 1052-1061
 - 5 彭黎明, 江虹. 细胞凋亡的检测. 见: 彭黎明, 王增礼, 主编. 细胞凋亡的基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 171, 184-186.
 - 6 邵建伟, 吴宗贵, 李莉, 等. 三氧化二砷诱导血管平滑肌细胞凋亡的实验研究. 第二军医大学学报, 2000, 21: 330-331.
 - 7 李甘地. 细胞凋亡的形态学改变、生理病理意义及调控. 见: 彭黎明, 王增礼, 主编. 细胞凋亡的基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 19-20.
 - 8 Malik N, Francis SE, Holt CM, et al. Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. *Circulation*, 1998, 98: 1657-1665.
 - 9 尹海林. 细胞凋亡的调控. 见: 彭黎明, 王增礼, 主编. 细胞凋亡的基础与临床. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 125-130.
 - 10 Deng YP, Lin C, Zhang J, et al. Overexpression of bcl-2 partly inhibit apoptosis of human cervical SiHa cells induced by arsenic trioxide. *Chin Med J*, 2000, 113: 84-88.
 - 11 Krajewski S, Tanaka S, Takayama S, et al. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondria. *Cancer Res*, 1993, 53: 4701-4714.
 - 12 Kockx MM, de Meyer GR, Muhring J, et al. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 1998, 97: 2307-2315.
- (收稿日期: 2002-12-31)
(本文编辑 缪其宏)

· 消 息 ·

医学科研(临床)实验设计与统计分析培训班通知

我国医药卫生科研及其期刊中统计学误用率约为 80%, 有些错误产生于统计研究设计阶段, 其性质是致命性的, 往往导致结论错误; 而统计描述和统计分析方法选择方面的错误, 几乎俯拾即是, 充分说明我国医药卫生科研工作的科学性和严谨性令人忧思。军事医学科学院胡良平教授, 经过 20 余年的潜心钻研, 其研究出的“逆向统计教学法”对帮助医学科研工作者克服科研设计和统计分析弱点提出了有效的对策和方案。

为了提高医学科研人员和临床工作者从事科研工作的质量, 提高他们撰写医学论文的水平 and 向名牌医学期刊投稿的刊出率, 中华医学会《中华医学杂志》编辑部与军事医学科学院生物医学统计咨询中心将于 2003 年 11 月 3~8 日(共 6 天)联合举办“医学科研(临床)实验设计与统计分析培训班”, 11 月 2 日报到。课程设置: (1) 实验设计的理论与方法、医药科研与期刊论文中实验设计错误辨析; (2) 实验设计类型的辨析、定量资料统计分析方法的合理选择及其常见错误辨析; (3) 各种列联表的识别、定性资料统计分析方法的合理选择及其常见错误辨析、多元统计分析简介; (4) 资料综合分析的理论与方法及其常见错误辨析、结果的正确表述和结论的正确陈述; (5) SAS 软件应用技巧以及相关新知识介绍。

每人交培训费和资料费共计 1 500 元, 差旅费和住宿费自理。办班地点在北京市太平路 27 号。请拟参加培训班的同志打电话或发传真报名, 报名截止日期为 2003 年 10 月 10 日。联系方式: 地址: 100850 北京市太平路 27 号军事医学科学院生物医学统计咨询中心李子健收; 电话及传真: (010) 66931130(李子健); E-mail: lizj@nic.bmi.ac.cn.; 更多信息, 欢迎访问生物医学统计咨询网站: WWW.stathlp.com.