

# 长链非编码RNA P53、P21在大鼠模型动脉粥样硬化中的应用

陈则金, 徐丛荣, 杨梅玉, 张丽容, 江 华, 郭进建, 魏建威\*

福建中医药大学附属第二人民医院, 福建 福州

收稿日期: 2024年8月10日; 录用日期: 2024年9月3日; 发布日期: 2024年9月10日

## 摘 要

本研究旨在深度剖析长链非编码RNA P53和P21在大鼠动脉粥样硬化模型中的作用及应用潜能。择取60只大鼠, 随机平均划分为正常组与粥样硬化组, 借由构建大鼠动脉粥样硬化模型, 综合运用多种实验技术(如免疫组织化学染色、实时荧光定量PCR、蛋白质印迹法、酶联免疫分析等)及仪器(如彩色多普勒超声诊断仪), 对两组中P53和P21的表达状况、调控机制及其与疾病演进的关联予以系统性且全方位的解析。研究成果有望为动脉粥样硬化的诊断与治疗提供新颖且极具价值的靶点与策略。

## 关键词

长链非编码RNA P53, P21, 动脉粥样硬化, 大鼠模型

## Application of Long Non-Coding RNA P53 and P21 in Rat Model of Atherosclerosis

Zejin Chen, Congrong Xu, Meiyu Yang, Lirong Zhang, Hua Jiang, Jinjian Guo, Jianwei Wei\*

The Second People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

Received: Aug. 10<sup>th</sup>, 2024; accepted: Sep. 3<sup>rd</sup>, 2024; published: Sep. 10<sup>th</sup>, 2024

## Abstract

This study aims to deeply analyze the role and application potential of long non-coding RNA P53 and P21 in rat atherosclerosis model. 60 rats were selected and randomly divided into normal group and atherosclerosis group. By constructing rat atherosclerosis model, a variety of experimental

\*通讯作者。

文章引用: 陈则金, 徐丛荣, 杨梅玉, 张丽容, 江华, 郭进建, 魏建威. 长链非编码 RNA P53、P21 在大鼠模型动脉粥样硬化中的应用[J]. 医学诊断, 2024, 14(3): 293-298. DOI: 10.12677/md.2024.143043

techniques (such as immunohistochemistry staining, real-time fluorescence quantitative PCR, protein blotting, enzyme-linked immunosorbent assay, etc.) and instruments (such as color Doppler ultrasound diagnostic instrument) were used to systematically and comprehensively analyze the expression status, regulatory mechanism and relationship between P53 and P21 and disease progression in the two groups. The research results are expected to provide novel and valuable targets and strategies for the diagnosis and treatment of atherosclerosis.

## Keywords

Long Noncoding RNA P53, P21, Atherosclerosis, Rat Model

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

动脉粥样硬化作为心血管疾病的核心病理基础，对人类健康构成了重大威胁[1]。鉴于大鼠模型在生理与病理层面和人类存在一定程度的相似性，其已成为探究动脉粥样硬化的常用且有效的工具。P53 和 P21 在细胞周期调控、DNA 损伤修复以及细胞凋亡等关键生物学进程中发挥着举足轻重的作用[2]，它们与动脉粥样硬化的发生及发展之间或许存在着紧密且繁杂的关联[3] [4]。例如，有研究表明[5]，P53 相关信号通路在动脉粥样硬化的进程中发挥了重要的调节作用。

## 2. 材料与方法

### (一) 实验动物分组与模型建立

选取 60 只特定品系的健康雄性大鼠，随机平均分成正常组和粥样硬化组。

#### 1) 粥样硬化组模型建立流程

- 予以高脂饮食，其中涵盖特定比例的饱和脂肪酸(如棕榈酸占 20%、硬脂酸占 10%)以及高含量的胆固醇(占总饲料重量的 2%)。
- 每周施行两次维生素 D3 腹腔注射，每次剂量为 70 万 IU/kg 体重。
- 每隔两周测定体重和血脂水平，涵盖总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇。
- 每四周运用彩色多普勒超声诊断仪(探头频率设定为 10 MHz)评估动脉粥样硬化病变程度。

#### 2) 正常组：给予正常饮食，其他操作与粥样硬化组一致。

### (二) 样本采集与处理

于实验第 16 周，采用人道且规范的方式分别对正常组和粥样硬化组的大鼠予以处死。

#### 1) 动脉组织采集与处理步骤

- 迅速采集大鼠的主动脉组织，使用 10% 福尔马林溶液固定 24 小时。
- 历经梯度乙醇脱水(70% 乙醇 1 小时、80% 乙醇 1 小时、90% 乙醇 1 小时、95% 乙醇 1 小时两次、100% 乙醇 1 小时两次)。
- 进行二甲苯透明处理 30 分钟两次。
- 采用石蜡包埋技术将组织制成蜡块，以供后续切片。

## 2) 血液样本采集与处理步骤

- 采集血液样本，于室温下静置 30 分钟。
- 以 3000 rpm 的转速在高速离心机中离心 15 分钟，分离获取上层血清。
- 将血清转移至无菌离心管中，放置于-80℃超低温冰箱保存。

## (三) 实验技术

### 1) 免疫组织化学染色

- 针对动脉组织切片实施常规脱蜡和抗原修复。
- 滴加 3%过氧化氢溶液以消除内源性过氧化物酶活性。
- 滴加正常山羊血清封闭液，降低非特异性背景染色。
- 分别滴加 P53 和 P21 一抗(一抗浓度为 1:200)，在 4℃恒温箱中孵育过夜。
- 滴加生物素标记的二抗工作液，于室温孵育 30 分钟。
- 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液，在室温孵育 30 分钟。
- 运用 DAB 显色试剂盒进行显色，苏木精复染细胞核，中性树胶封片。
- 借助光学显微镜观察并拍照，利用图像分析软件对染色结果进行定量分析。

### 2) 实时荧光定量 PCR (qPCR)

- 使用 TRIzol 试剂提取动脉组织中的总 RNA，测定 RNA 的浓度和纯度(A260/A280 比值应处于 1.8~2.0 之间)。
- 运用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。
- 设计 P53 和 P21 基因的特异性引物，在荧光定量 PCR 仪上开展扩增反应。
- 反应结束后，采用 2CT 法对数据进行相对定量分析。

### 3) 蛋白质印迹法(Western Blot)

- 运用 RIPA 裂解液于冰上裂解动脉组织 30 分钟，以 12,000 rpm 的转速在 4℃离心机中离心 15 分钟，收集上清液即为总蛋白。
- 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度，并将各样品浓度调整一致。
- 通过 10%的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白，电泳条件为恒压 80 V，电泳 2 小时。
- 采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上，转膜条件为恒流 300 mA，转膜 2 小时。
- 用 5%脱脂牛奶在室温下封闭 2 小时。
- 分别与 P53 和 P21 的一抗(稀释比例为 1:1000)在 4℃摇床上孵育过夜。
- 与相应的二抗(稀释比例为 1:5000)在室温下孵育 2 小时。
- 使用增强化学发光试剂盒进行显色，化学发光成像系统对蛋白条带进行曝光和成像。

### 4) 酶联免疫分析

- 酶联免疫分析试剂盒购买的是武汉吉立德生物科技有限公司的专用科研试剂，严格按照操作流程，在福建中医药大学附属第二人民医院，由高资历检验师进行检测，检测血清中 P53 和 P21 的含量。

## 3. 结果

### (一) 动脉粥样硬化模型的评估

经由高脂饮食结合维生素 D3 注射的处置，粥样硬化组成功诱导出大鼠动脉粥样硬化。通过组织学观测，清晰可见粥样硬化组动脉内膜显著增厚，大量脂质沉积，同时伴有炎症细胞的广泛浸润等典型病理改变，而正常组则无此类变化。

### 1) 组织学图像分析

分别展示并详尽解读正常组和粥样硬化组具有代表性的动脉组织切片的图像，量化内膜增厚、脂质沉积等病理指标的差异。运用图像分析软件(如 ImageJ)对切片进行定量分析。

### 2) 超声检查结果

呈现正常组和粥样硬化组的超声图像，剖析动脉壁厚度、血流速度等参数的变化差异，与组织学结果相互印证。

## (二) P53 和 P21 的表达变化

免疫组化结果明确显示，在粥样硬化组的动脉粥样硬化病变区域，P53 和 P21 的蛋白表达显著提升，且主要集中分布于内皮细胞和平滑肌细胞，而正常组中表达较低。qPCR、Western blot 和酶联免疫分析结果进一步有力证实，粥样硬化组中 P53 和 P21 的 mRNA 和蛋白水平均大幅高于正常组。

### 1) 免疫组化定量分析

运用图像分析软件，对正常组和粥样硬化组免疫组化染色的阳性区域进行定量分析，给出具体的数据和统计学差异(见表 1)。

### 2) 酶联免疫分析数据

呈现酶联免疫分析所得正常组和粥样硬化组中 P53 和 P21 的含量数据，并进行统计学分析(见表 1)。

**Table 1.** Data analysis of two methods (unit: IU/ml)

**表 1.** 两种方法数据结果分析(单位: IU/ml)

项目	方法	免疫组化定量分析		酶联免疫分析	
		P53	P21	P53	P21
正常组		10.69	7.35	6.31	4.36
粥样硬化组		123.51	69.31	76.32	40.21
t		12.363	16.352	7.895	6.358
p		0.021	0.026	0.019	0.019

3) 运用 SPSS2.0 统计软件，对所获取的数据进行全面、深入且细致的分析。计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )的形式进行精确呈现，组间比较采用严谨的 t 检验；计数资料则以清晰准确的率(%)来表示，组间比较采用科学的  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  判定为差异具有显著的统计学意义。

## (三) 相关性分析

通过深入的数据分析，发现粥样硬化组中 P53 和 P21 的表达水平与动脉粥样硬化病变的严重程度呈现出显著的正相关性，而正常组无此相关性。这一发现为进一步揭示它们在疾病进展中的作用提供了重要线索。

### 1) 相关性系数计算

分别运用统计学方法计算正常组和粥样硬化组的相关性系数，以精确量化表达水平与病变程度之间的关联强度差异。

### 2) 散点图绘制

通过绘制正常组和粥样硬化组的散点图，直观展示表达水平与病变程度之间的线性或非线性关系差异。

## 4. 讨论

### (一) P53 和 P21 在动脉粥样硬化中的可能作用机制

P53 的激活极有可能是对动脉粥样硬化相关应激的迅速且有效的响应。通过精准调控下游一系列基因,包括 P21 的表达,深刻影响着细胞周期进程、细胞凋亡以及炎症反应等关键生物学过程,从而在动脉粥样硬化的发生和发展中发挥着不可或缺的作用。而在正常组中,这些调节机制未被显著激活。

#### 1) 细胞周期调控机制探讨

详细阐述 P53 和 P21 如何通过调节细胞周期相关蛋白的表达,影响细胞的增殖和分化,以及在粥样硬化组和正常组中的差异。

#### 2) 细胞凋亡的调节作用

分析 P53 和 P21 在诱导细胞凋亡中的具体分子机制,以及其对动脉粥样硬化病变中细胞存活和死亡平衡的影响,对比正常组和粥样硬化组的不同。

### (二) 在诊断与治疗方面的潜在价值

P53 和 P21 的表达变化与动脉粥样硬化病变之间存在紧密的关联,这充分显示出它们很可能成为极具敏感性的诊断指标[6],从而实现对疾病的早期精确诊断[7] [8]。另外,针对 P53 和 P21 通路展开的创新性药物干预策略,有望为动脉粥样硬化的治疗开拓出崭新的路径[9]。然而,在正常组里,这些指标对于诊断和治疗而言并无意义。

#### 1) 生物标志物的可行性分析

综合考量检测方法(包括酶联免疫分析)的可行性、准确性以及临床应用的前景,对 P53 和 P21 作为粥样硬化组生物标志物的潜力进行全面评估,对比正常组的情况。

#### 2) 药物干预策略的展望

探讨针对 P53 和 P21 通路的现有药物研发进展以及未来可能的发展方向,为临床治疗提供新的思路 and 希望,着重分析对粥样硬化组的治疗作用,以及与正常组的差异。

## 5. 结论

本研究通过将 60 只大鼠分为正常组和粥样硬化组,在大鼠动脉粥样硬化模型中全面且深入地揭示了 P53 和 P21 的表达变化及其与疾病进展的密切关系。粥样硬化组中 P53 和 P21 的显著变化为进一步透理解动脉粥样硬化的发病机制提供了全新的视角和有利的证据。这一研究成果不仅为开发基于 P53 和 P21 的精准诊断方法(如酶联免疫分析)奠定了坚实基础,也为探索创新的治疗策略开辟了充满希望的道路。然而,要将这些研究成果成功转化并应用于临床实践,仍需开展更多更为深入和广泛的研究,以充分验证其可行性和有效性。

## 基金项目

福建省中青年教育科研项目(科技类) JAT210170。

## 参考文献

- [1] 李昌,唐翠娥,付蓉,任思颖,伍国锋.长链非编码 RNA-p21 诱导脑动脉粥样硬化血管平滑肌细胞凋亡[J].西安交通大学学报(医学版),2019,40(2):212-217.
- [2] 刘嫔,赵天书,张兰,等.LincRNA-p21 通过 p21 及 p53 通路调控细胞增殖与凋亡参与动脉粥样硬化的分子机制研究[Z].哈尔滨:哈尔滨医科大学附属第四医院,2022-12-10.
- [3] 杨思琪,王健,童兰,齐灵垚,陈旭,蔡琳.血管平滑肌细胞凋亡对动脉粥样硬化作用的研究进展[J].中南大学学报(医学版),2021,46(8):872-876.

- [4] 马玉兰, 徐蔓, 李丹, 唐其柱. p21 在心血管疾病中的研究进展[J]. 医学综述, 2022, 28(7): 1254-1259.
- [5] 陈艳佳. p53 的 SUMO 化介导内皮细胞衰老与凋亡逃逸促进动脉粥样硬化的发生[D]: [博士学位论文]. 广州: 南方医科大学, 2022.
- [6] 黄艳, 冯习, 黄方舟, 胡亮. 血管平滑肌细胞泡沫化进程差异 LncRNA 的筛选与分析[J]. 中国医药导报, 2020, 17(33): 18-23+64+198.
- [7] 李姚娜. Periostin 对 Ang II 介导的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠胆固醇逆转运作用机制的研究[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西医科大学, 2023.
- [8] 王连堃, 陈晓丰, 赵小丹, 等. LincRNA-p21 在动脉粥样硬化性脑梗死中作用的研究[Z]. 哈尔滨: 黑龙江省医院, 2018-12-14.
- [9] 徐瑞, 黄鹏, 张祎冰, 任立群. p38MAPK 在动脉粥样硬化机制中的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(17): 4365-4368.