

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2001)-01-0034-03

球囊损伤兔主动脉后核因子- κ B活性的动态变化

李建军, 李庚山, 黄从新, 江洪, 许家俐, 唐其柱, 夏豪, 王晶

(武汉大学亚太医院暨湖北省人民医院心内科, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 核因子- κ B; 球囊损伤; 肌, 平滑, 血管; 兔

[摘要] 为探讨经皮球囊损伤兔主动脉内膜后血管组织中核因子- κ B活性的动态变化, 选日本大白兔 18 只, 经股动脉插入 4F Forgarty 导管至主动脉, 充盈球囊, 回拖球囊至髂总动脉, 反复 3 次, 复制球囊损伤主动脉内膜的动物模型。于损伤后 0、12、24、48 和 72 h 处死动物, 提取腹主动脉壁组织胞核蛋白, 电泳流动漂移技术检测核因子- κ B 活性的动态变化。结果表明, 正常主动脉组织中无明显的核因子- κ B 激活现象, 球囊损伤主动脉内膜后即刻在血管组织有一定水平的核因子- κ B 激活, 12 h 达高峰, 持续 48 h, 72 h 逐渐恢复到对照水平。密度扫描结果提示, 核因子- κ B 活性于球囊损伤内膜后 12 h 时较对照(内膜损伤后即刻)增高 3.7 倍, 24 h 增加 2.5 倍, 48 h 增加 1.4 倍, 72 h 逐渐恢复到对照水平。提示球囊损伤兔主动脉内膜后血管组织中核因子- κ B 活性异常激活, 可能是血管平滑肌细胞增殖的启动机制之一。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

Dynamic Changes of NF- κ B Activity in Balloon-Injured Aortic Arteries of Rabbits

LI Jian-Jun, LI Geng-Shan, HUANG Cong-Xin, JIANG Hong, XU Jia-Li, TANG Qi-Zhu, XIA Hao, and WANG Jing
(Department of Cardiology, Asia-Pacific & Hubei Province Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China)**MeSH** NF- κ B; Balloon Dilatation; Muscle, Smooth, Vascular; Rabbit

ABSTRACT **Aim** To investigate the dynamic changes of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity in balloon-injured arteries, rabbit aortas ($n=18$) were subjected to abrasion injury using 4F Forgarty catheter. The arterial tissues were collected and nuclear protein of the tissue was extracted at 0, 12, 24, 48 and 72 h following injury. NF- κ B activity in balloon-injured arteries were examined by electrophoretic mobility shift assay. No detectable NF- κ B activity was found in normal arteries of rabbits, while NF- κ B binding activity in balloon-injured arteries increased apparently, which was detected immediately following injury, peaked at 12 hours, lasted 48 h, returned to baseline at 72 h. The results of density scan for binding blot showed that NF- κ B activity was enhanced more than 3.7 fold at 12 h ($n=4$, $P<0.01$), 2.5 fold at 24 h ($n=4$, $P<0.01$), and 1.4 fold at 48 h ($n=4$, $P<0.05$), compared with baseline activity (0 h) of NF- κ B. The present data showed that balloon injury could trigger NF- κ B activation in arteries, which was likely to be involved in the proliferation of arterial smooth muscle cells.

血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的增殖与游走视为经皮冠状动脉成形术(PTCA)后再狭窄的主要发生机理之一^[1]。既往研究经多种方法干预这一病理生理过程,迄今尚未获得理想结果,究其原因恐与 SMC 增殖与游走的分子生物学机制尚不完全清楚有关。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是调节基因转录的关键因子之一。其有关调节通路最初发现于淋巴细胞中,新近的研究证实在培养血管 SMC 中也存在着 NF- κ B 激活通

路,且是 SMC 增殖时必经的激活通路^[2~4]。我们的初步观察亦表明,在大鼠主动脉 SMC 中确实存在着 NF- κ B 通路,TNF- α 是血管 SMC 中 NF- κ B 激活的刺激因子^[5]。但有关经皮球囊损伤动脉内膜对血管组织中 SMC 的核转录因子 NF- κ B 活性变化影响的国外研究尚不多见,国内则尚未见报道。本文以日本大白兔为研究对象,采用经皮球囊损伤法复制兔主动脉内膜损伤模型,观察血管组织中 NF- κ B 活性的动态变化,现报道如下。

[作者简介] 李建军,男,1957 年出生,留日博士,留美博士后,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事冠心病的临床与研究。李庚山,男,1932 年出生,主任医师,教授,博士生导师,主要从事冠心病的临床与研究。黄从新,男,1952 年出生,主任医师,教授,博士生导师,主要从事介入性心脏病学研究。

1 材料与方法

1.1 兔主动脉球囊损伤模型的复制

选日本大白兔 18 只,雌雄不拘。体重 1 850~2 100 g。经耳缘静脉注射苯巴比妥钠(25 mg/kg)麻

醉, 仰卧位固定。其中 16 只于 X 线透视下, 经右股静脉切开插入 4F Forgarty 导管至胸主动脉, 注入 0.8 ~ 1 mL 气体充盈球囊, 回拖球囊至髂总动脉, 反复 3 次复制兔血管球囊损伤术动物模型。术毕, 结扎股静脉, 缝合切口, 动物送动物中心普食喂养。

1.2 兔主动脉组织细胞核抽提物的制备

以正常假手术兔主动脉组织作为正常对照组 ($n=2$), 随机于球囊损伤兔主动脉 0 h ($n=2$)、12 h ($n=4$)、24 h ($n=4$)、48 h ($n=4$) 和 72 h ($n=2$) 后, 经腹腔注入过量苯巴比妥钠处死动物, 开胸迅速取出主动脉。经 4℃ 生理盐水冲洗组织 3 次后, 剥离主动脉外膜, 利剪将主动脉剪成小块。然后, 按修改的 Dignam 等^[6]方法制备组织细胞核抽提物。即用冷生理盐水冲洗组织 3 次, 加入 1.5 mL 0℃ 缓冲液 A (10 mmol/L Hepes pH 7.9、1.5 mmol/L 氯化镁、10 mmol/L 氯化钾、1 mmol/L DTT 和 1 mmol/L PMSF), 收集组织细胞, 匀浆器破碎细胞, 冰浴 10 min, 1 850 g 于 4℃ 离心 10 min。沉淀物用 1.5 mL 0℃ 缓冲液 B (缓冲液 A + 0.1% Triton-100) 混匀后, 冰浴 10 min, 1 850 g 于 4℃ 离心 10 min。沉淀物用 0.2 mL 0℃ 缓冲液 C (20 mmol/L Hepes pH 7.9、25% Glycerol、0.42 mol/L 氯化钠、1.5 mmol/L 氯化镁、0.2 mmol/L EDTA、0.5 mmol/L DTT 和 1 mmol/L PMSF) 混匀后冰浴 30 min。然后 25 000 g 离心 30 min, 收集核抽提物。最后, 将核抽提物溶于 20~40 μ L 缓冲液 (20 mmol/L Hepes pH 7.9、4% Glycerol、50 mmol/L 氯化钠、0.5 mol/L EDTA、1 mmol/L 氯化镁、0.5 mmol/L DTT 和 0.5 mmol/L PMSF) 中。核蛋白浓度用 DC 蛋白检测试剂盒 (Bio-Rad) 测定。标本储于 -70℃ 备用。

1.3 电泳流动漂移技术 (electrophoretic mobility shift assay, EMSA)

电泳流动漂移技术是检测 DNA 与蛋白结合的经典方法, 其操作按文献 [5, 7] 报道及试剂盒 (Promega) 说明书进行。3.5 pmol 含有 NF- κ B 结合位点 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3' 的 22mer 双链寡核苷酸用 γ -³²P-ATP (10 ci/L, Amersham) 进行末端标记。将主动脉组织细胞核抽提物 (6 μ g) 置入含 0.25 g/L Poly (dI-dC)、20% Glycerol、250 mmol/L 氯化钠、2.5 mmol/L EDTA、5 mmol/L 氯化镁、2.5 mmol/L DTT 和 50 mmol/L Tris 液中冰孵 10 min, 加入 100 000 cpm 用 γ -³²P-ATP 标记的 NF- κ B 双链寡核苷酸入反应液中 (总容量 9 μ L) 冰孵 30 min。反应结束后, 加入 1 μ L 10 \times 上样缓冲液, 于 4% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳 2 h 左右。将凝

胶转移至 Whatman 3 mm 滤纸上于 80℃ 抽真空干燥 30 min 后, -70℃ 冰箱曝光 12~24 h。显影带经密度扫描仪半定量分析。

1.4 统计学处理

所得数据用均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并用非配对 t 检验处理。

2 结果

应用 EMSA 检测技术观察发现, 经皮球囊损伤主动脉内膜后, 动脉组织中即可检测到 NF- κ B 激活现象。12 h 时其活性增至高峰, 随后持续至 48 h 均有明显增高, 72 h 后逐渐恢复到内膜损伤后即刻水平。密度扫描结果提示, NF- κ B 活性于球囊损伤主动脉内膜后 12 h 较损伤后即刻增高 3.7 倍, 24 h 时增加 2.5 倍, 48 h 时增加 1.4 倍, 72 h 渐恢复到内膜损伤后即刻水平 (图 1, Figure 1)。对照组未加标记探针反应液的阴性对照, 未出现任何条带, 表明本实验 NF- κ B 活性的检测具有特异性。此外, 正常假手术兔主动脉组织的正常阴性对照亦未出现任何条带 (图中未显示)。

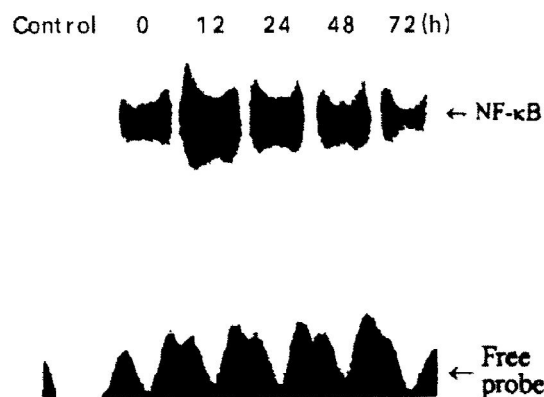


图 1 电泳流动漂移技术法检测经皮球囊损伤兔主动脉内膜后 NF- κ B 活性的动态变化

Figure 1 Dynamic changes of NF- κ B activity in balloon-injured aortic arteries of rabbits

3 讨论

血管平滑肌细胞在心血管疾病发生与发展中的作用引人注目, 其增殖机制的探讨为研究热点之一。新近研究发现在血管平滑肌细胞中亦存在着 NF- κ B 通路, 且是平滑肌细胞增殖时必经的激活通路^[3]。我们的初步观察表明, 在培养的大鼠主动脉平滑肌细胞中确实存在着 NF- κ B 通路, TNF- α 是

血管平滑肌细胞中 NF- κ B 激活的刺激因子^[5]。由于平滑肌细胞的增殖与游走为经皮冠状动脉成形术 (PTCA) 后再狭窄的主要发生机理, 我们推测 NF- κ B 的激活可能是球囊损伤动脉后血管狭窄发生的重要机制之一。既往动物实验研究表明, 球囊损伤动脉内膜后 24 h~ 3 d, 血管中层平滑肌细胞由正常的收缩型细胞转化为合成型细胞并发生明显的增殖^[8]。本文采用经典的 EMSA 方法证实, 经球囊损伤主动脉内膜后, 动脉组织中即可见 NF- κ B 激活, 12 h 活性达高峰, 持续 48 h, 72 h 渐恢复到对照水平。本研究虽无直接证据证实 NF- κ B 激活是平滑肌细胞增殖的前提, 但结合有关文献、时间动态关系及我们的观察认为, 经球囊损伤主动脉内膜后, NF- κ B 的激活并经活性因子介导启动平滑肌细胞增殖可能是血管平滑肌细胞生物学调节的重要通路。此外, 本方法所检测 NF- κ B 活性经正常阴性对照和未加标记探针反应液的阴性对照证实了所检测的 NF- κ B 活性具有特异性。

业已证实, 多种细胞因子与平滑肌细胞增殖有关。有关 NF- κ B 激活后诱导平滑肌细胞增殖的机制尚不十分清楚。Cercek 等^[7]研究提示, NF- κ B 的激活可促进平滑肌细胞中细胞间粘附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 的表达, 而 ICAM-1 经离体及活体研究证实与平滑肌细胞增殖有关, 使用抗 ICAM-1 抗体可明显抑制球囊损伤动脉后新生内膜的形成。也有学者证实, 在培养的内皮细胞中阿斯匹林可同时抑制 NF- κ B 的激活与 ICAM-1 的表达水平^[9]。因此, 目前认为 NF- κ B 激活后可启动多种生长因子与细胞因子的表达, 进而诱导平滑肌细胞增殖, 并与多种心血管疾病的发生发展有关, 其相关研究成为分子心脏病学研究热点之一。由于 NF- κ B 可能是血管病理生理学干预

的靶环节之一, 本研究的重要发现是阐明了经球囊损伤主动脉内膜后, NF- κ B 的激活在活体 (in vivo) 大动物模型血管平滑肌细胞中具有迅速而短暂的生物学特性, 其活性增高的水平以 12 h 最为明显, 72 h 逐渐恢复到对照水平, 从而为进一步研究其可能的防治方法提供了理论依据。

参考文献

- [1] 上野光, 李建军, 竹下彰. 动脉硬化と增殖因子 [J]. 血管と内皮, 1994, 4: 487-495
- [2] Baeuerle PA, Baltimore D. NF- κ B: ten years after [J]. Cell, 1996, 87: 13-20
- [3] Eellas RE, Lee JS, Sonenshein GE. Expression of a constitutive NF- κ B-like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells [J]. J Clin Invest, 1995, 96: 2521-527
- [4] Lawrence R, Chang IJ, Siebenlist U, et al. Vascular smooth muscle cells express a constitutive NF- κ B-like activity [J]. J Bio Chem, 1994, 269: 28913-918
- [5] 李建军, 李庚山. NF- κ B 与冠心病 [J]. 现代诊断与治疗, 2000, 11: 204-207
- [6] Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription by RNA polymerase σ in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res, 1983, 11: 1475-483
- [7] Cercek B, Yamashita M, Dimayuga P, et al. Nuclear factor- κ B activity and arterial response to balloon injury [J]. Atherosclerosis, 1997, 131: 59-66
- [8] Schwartz RS, Holmes DR, Topol EJ, et al. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms [J]. J Am Coll Cardiol, 1992, 20: 1284-293
- [9] Weber C, Erl W, Pietsch A, et al. Aspirin inhibits nuclear factor- κ B mobilization and monocyte adhesion in stimulated human endothelial cells [J]. Circulation, 1995, 91: 1914-919

(此文 2000-05-22 收到, 2000-11-10 修回)

(此文编辑 朱雯霞)