

不同阶段食饵性动脉粥样硬化兔血管壁核因子 κ B 活化和单核细胞趋化蛋白 1 与蛋白激酶 C α 表达的变化

崔 华, 何作云

(第三军医大学新桥医院心内科, 重庆市 430038)

[主题词] 动脉粥样硬化; 核转录因子; 单核细胞趋化蛋白 1; 蛋白激酶 C

[摘要] 为了解核因子 κ B 活化对单核细胞趋化蛋白 1 与蛋白激酶 C α 表达的调控作用及它们之间的相互关系, 利用电泳迁移率改变分析法、免疫组织化学和原位杂交检测不同阶段动脉粥样硬化血管组织核因子 κ B 活性和单核细胞趋化蛋白 1 与蛋白激酶 C α 表达的变化。结果发现, 动脉粥样硬化模型组核因子 κ B 活性呈逐渐增高趋势, 在 4 周时即有升高, 其峰值出现于 12 周时(与对照组相比 $P < 0.01$); 其三个不同时相点的核因子 κ B 活性有统计学差异($P < 0.05$)。单核细胞趋化蛋白 1 蛋白在动脉粥样硬化血管组织 4 周时可见低水平的表达, 12 周时呈强阳性表达, 表达部位以新生内膜及中膜为主。动脉粥样硬化血管组织 4 周时可见较弱的蛋白激酶 C α 蛋白表达, 主要在新内膜, 12 周时蛋白激酶 C α 蛋白呈强阳性表达, 表达部位以新生内膜及中膜为主。原位杂交检测动脉粥样硬化血管组织 4 周时单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 表达明显上调, 阳性信号主要集中于新生内膜, 12 周时则呈强阳性表达, 表达部位以新生内膜及中膜为主。不同阶段动脉粥样硬化血管组织蛋白激酶 C α mRNA 表达变化其分布和强度与单核细胞趋化蛋白 1 mRNA 相类似。通过上述实验结果, 结合细胞增殖调控的理论基础, 我们推测动脉粥样硬化损伤后, 动脉壁血管细胞受多种因素刺激而激活蛋白激酶 C, 活化的蛋白激酶 C 在细胞浆内磷酸化胞浆内转录因子核因子 κ B, 后者转位于核, 核因子 κ B 核移位启动单核细胞趋化蛋白 1 表达, 从而导致多种细胞的增殖。

[中文分类号] R363.2

[文献标识码] A

Activated Nuclear Factor- κ B and Expression of Monocyte Chemotactic Protein-1 and Protein Kinase C is Present in the Different Stages of Experimental Atherosclerosis

CUI Hua, and HE Zuo-Yun

(Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[MeSH] Atherosclerosis; Nuclear Factor-kappa B; Monocyte Chemotactic Protein-1; Protein Kinase C

[ABSTRACT] **Aim** In order to study the relationship between activity of NF- κ B and the expressions of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and protein kinase C (PKC α) and atherosclerosis (As) plaques of different stages. **Methods** Using electrophoretic mobility shift assay (EMSA), immunohistochemistry and in situ hybridization, We study activity of NF- κ B and the expressions of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and protein kinase C (PKC α) varied in atherosclerosis (As) plaques of different stages. **Results** The results confirmed that the activity of NF- κ B as well as the expressions of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and protein kinase C (PKC α) in As plaque was increased in a time dependent manner as compared with those in control group ($P < 0.05$). Which was consistent with the increasing of activity of NF- κ B and up-regulated in the expressions of MCP-1 and PKC α . **Conclusion** All of these indicated that NF- κ B activation, the up-regulated expressions of MCP-1 and PKC α may take part in pathogenesis and development of As.

核因子(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是主要参与机体免疫和炎症的分子表达调控的转录因子, 受核因子 κ B 调控的基因表达产物, 囊括了大多数参与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发病的主要细胞因子, 如单核细胞趋化因子(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、粘附分子等。提示核因子 κ B 在 As 的发病中起重要的调控作用^[1,2]。MCP-1 是单核细胞迁移

的主要趋化因子, 而外周血单核细胞迁入内皮下间隙并泡沫化是 As 的主要病理变化。高脂血症是 As 发生的危险因素, 通过氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)刺激巨噬细胞活化核转录因子, 继而上调 MCP-1 的表达^[3]; 而 MCP-1 致血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)增殖可能由蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)介导^[4]。有关不同阶段食饵性 As 血管壁核因子 κ B 调控 MCP-1 和 PKC α 表达的变化国内外尚未见报道, 本课题拟通过复制 As 模型, 研究不同阶段病变 As 血管组织核因子 κ B 活性和 MCP-1 和 PKC

[收稿日期] 2001-12-06 [修回日期] 2002-05-29

[作者简介] 崔华, 女, 1963 年出生, 医学博士, 副主任医师, 主要从事动脉硬化性疾病的基础和临床研究, 现在第一军医大学珠江医院儿科博士后流动站(广州市 510282)工作, 联系电话 020-85143843(家), 85143368(办)。何作云, 男, 教授, 博士研究生导师。

表达的变化,了解核因子 κ B 活化对 MCP-1 和 PKC 表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

胆固醇粉(化学纯,荷兰进口由上海试剂站分装);猪油(自制);干红葡萄酒(烟台张裕红葡萄酒有限公司产,500 mL/瓶,酒精浓度 21%);T4 多核苷酸激酶(德国 B.M 公司);T4 多核苷酸激酶缓冲液(德国 B.M 公司); γ -³²P-ATP(北京亚辉公司);通用 κ B 系列双链核苷酸探针(美国 Promega 公司);核转录因子试剂盒(美国 Promega 公司);鼠抗人 MCP-1 单克隆抗体(英国 Peprotech 公司);PKC α 多克隆抗体(美国 Zymed Corp 北京中山生物工程公司) MCP-1 和 PKC α 原位杂交检测试剂盒(武汉博士德公司)。

1.2 实验分组及动脉粥样硬化动物模型复制方法

5~6 月龄、体重 2.0~3.1 kg 雄性健康新西兰大白兔 52 只(第三军医大学动物中心提供),随机分为 2 组:正常对照组 10 只,喂养基础颗粒饲料。As 模型组 21 只,喂养造模饲料(基础颗粒饲料+3%猪油+1%胆固醇)。As 模型组 21 只,喂养造模饲料(基础颗粒饲料+3%猪油+1%胆固醇)。所有动物单笼喂养,自由饮水。As 模型组在第 5 周、7 周因腹泻死亡 3 只,实验结束时 29 只动物的资料参加统计。两组动物分别在设定的时相点(喂饲 4 周、8 周、12 周)时测体重并处死行血管取材。

1.3 组织学观察

将 10% 中性缓冲福尔马林/PBS 液(pH 7.2)固定 24 h 的血管环,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察照相。

1.4 兔主动脉组织细胞核蛋白的提取

两组动物分别在设定的时间点(喂饲 4 周、8 周和 12 周)时经兔耳中心静脉注入过量的苯巴比妥钠处死动物,开胸迅速分离、离断主动脉。生理盐水反复冲洗组织后,剥离主动脉外膜,将组织剪成小块,按修改的 Dignam 等方法制备组织细胞核提取物。所有操作均在冰浴中进行,Bradford 法测定核蛋白浓度,分装,-70℃贮存待测。

1.5 用电泳流动漂移技术(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)检测核因子 κ B 活性

1.5.1 κ B 系列寡聚核苷酸探针标记 先将通用寡聚核苷酸探针 P1 和 P2 稀释为 10 mmol/L。反应体系中含 T4 多核苷酸激酶 1 μ L, T4 多核苷酸激酶缓冲液 2 μ L,寡核苷酸标记单链(P1.....) 1 μ L, γ -³²

P-ATP 5 μ L,去离子双蒸馏水 4 μ L, P1 和 P2 总体积 40 μ L, 37℃反应 1 h 结合成双链 DNA(已标记)。

1.5.2 动脉粥样硬化血管组织核蛋白中核因子 κ B 活性测定 DNA 结合反应缓冲液、已标记 κ B 系列、待测标本样品(核提取物), 25~30℃水浴后加上样缓冲液混匀。与 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,置干燥机中烤干。随后置-70℃中自显影,显影后见密度强度不一的显影条带。电泳滞后带经 Bio210 图像扫描仪进行密度扫描,采用 Photoshop 软件测定其灰度值和滞后带面积,两者的乘积表示核提取物中核因子 κ B 与标记探针结合的活性。

1.6 动脉粥样硬化血管组织单核细胞趋化蛋白 1 与蛋白激酶 Ca 免疫组织化学检测

单核细胞趋化蛋白 1 免疫组织化学染色采用 ABC 法按说明书进行,其鼠抗人 MCP-1 单克隆抗体工作浓度为 1:500;兔和人具有相同的同源性(英国 Peprotech 公司);PKC α 免疫组织化学染色采用 SP 法按操作说明书进行,其 PKC α 多克隆抗体为即用型,工作浓度 1:200(美国 Zymed Corp 北京中山生物工程公司)。信号表达强弱分为 5 级:- 为阴性, + 为微弱, 2+ 为弱阳性, 3+ 为中等阳性, 4+ 为强阳性。

1.7 动脉粥样硬化血管组织单核细胞趋化蛋白 1 与蛋白激酶 Ca 原位杂交检测

由武汉博士德公司提供的 MCP-1 和 PKC α 原位杂交检测试剂盒采用的寡核苷酸探针,经地高辛标记。针对人的寡核苷酸探针序列分别是, MCP-1 为: (1) 5'-TGAGT GGGGC GTTGA TTGCA TCTGG CTGAG-3' (2) 5'-AGCTT CTTTG GGACA CTTGC TGCTG GTGAT-3'; PKC α 为: (1) 5'-CCGTG GAGTC GTTGC CCGGG AAAAC GTCAG -3' (2) 5'-TTGGC ACTGG AAGCC TTGTT TCCCA AACCC-3'。该序列和大鼠、小鼠有 99% 的同源性,适用于人、大鼠及小鼠。而兔与人的寡核苷酸序列基本相同。按原位杂交检测试剂盒 MCP-1 和 PKC α 说明书操作步骤进行。信号表达强弱分为 5 级:- 为阴性, + 为微弱, 2+ 为弱阳性, 3+ 为中等阳性, 4+ 为强阳性。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 医用统计软件包进行数据资料的统计学处理;采用 ANOVA 方差分析并行方差齐性检验;结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并计算 P 值, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 食饵性动脉粥样硬化病理形态学改变

大体观察,正常对照组动物主动脉未发现粥样硬化病变,模型组动物的斑块面积随着喂饲时间的延长,病变渐加重。HE染色后光镜下,正常对照组动物主动脉内膜形态正常,As模型组4周、8周、12周动物主动脉壁均见到程度不同的脂质浸润,重者深达中膜的2/3;其病变弥漫,多数斑块较厚,泡沫细胞可达5~6层。

2.2 不同阶段动脉粥样硬化血管组织中核因子 κ B活性变化

应用EMSA检测技术发现,As模型动物血管组织中核因子 κ B活性呈逐渐增高趋势,在4周时即有升高,增加6.11倍,其峰值出现于12周,达13.3倍。与同时间点对照组相比,差异显著($P < 0.01$,表1,Table 1);核因子 κ B在三个不同时间点的活性也有统计学差异($P < 0.05$)。

表1. 不同阶段动脉粥样硬化血管组织核蛋白核因子 κ B活性变化。

Table 1. Changes of activity of NF- κ B in atherosclerosis (As) plaques of different stages ($\bar{x} \pm s$).

Groups	4 weeks	8 weeks	12 weeks
Control	3.0 \pm 0.1	3.1 \pm 0.1	2.9 \pm 0.1
As	18.5 \pm 0.6 ^a	26 \pm 0.9 ^a	39.9 \pm 1.2 ^{ab}

a: $P < 0.01$ compared with control group, b: $P < 0.05$ compared with 4 weeks and 8 weeks in the same group.

2.3 不同阶段动脉粥样硬化血管组织单核细胞趋化蛋白1与蛋白激酶C α 表达的变化

动脉粥样硬化(As)血管组织MCP-1和PKC α 蛋白表达的检测结果见表2(Table 2)。免疫组织化学染色后,MCP-1和PKC α 蛋白阳性信号呈棕黄色片状颗粒,位于胞膜及胞浆内;4周时可见低水平的表达,主要在新生内膜;12周时呈强阳性表达,以新生内膜和中膜为主。

表2. 不同阶段As血管组织单核细胞趋化蛋白1与蛋白激酶C α 蛋白表达的变化。

Table 2. Immunohistochemistry staining of MCP-1 and PKC α protein in As plaques of different stages.

Groups	MCP-1 protein	PKC α protein
Control	+ (- ~ +)	+ (- ~ +)
As 4 weeks	2+ (2+ ~ 3+)	3+ (2+ ~ 3+)
As 8 weeks	3+ (2+ ~ 3+)	3+ (2+ ~ 3+)
As 12 weeks	4+ (3+ ~ 4+)	4+ (3+ ~ 4+)

2.4 不同阶段动脉粥样硬化血管组织单核细胞趋化蛋白1和蛋白激酶C α mRNA表达的变化

不同阶段As血管组织MCP-1和PKC α 的mRNA表达的检测结果见表3(Table 3)。原位杂交后两种mRNA阳性信号都呈紫蓝色颗粒状,位于胞浆,分散于内皮细胞和平滑肌细胞间或胞膜下;4周时表达明显上调,阳性信号主要集中于新生内膜,12周时呈强阳性表达,以新生内膜及中膜为主。

表3. 不同阶段动脉粥样硬化血管组织单核细胞趋化蛋白1与蛋白激酶C α mRNA表达的变化。

Table 3. In situ hybridization staining of MCP-1 and PKC α mRNA in As plaques of different stages.

Groups	MCP-1 mRNA	PKC α mRNA
Control	-	-
As 4 weeks	+ (- ~ +)	+ (- ~ +)
As 8 weeks	3+ (2+ ~ 3+)	2+ (+ ~ 2+)
As 12 weeks	4+ (3+ ~ 4+)	3+ (2+ ~ 3+)

3 讨论

通过对人和动物As病变的研究发现,动脉壁的各种正常或病理细胞均可分泌MCP-1^[6],有关As斑块内MCP-1的阳性表达与As病程的时间关系,目前其相关研究结果各不相同。Yuh等^[7]系统观察了As兔在高脂饮食的第1天、3天、第1周、3周和第6周的血脂水平及As血管壁MCP-1的表达,结果显示,高脂饮食的第3天,其血浆甘油三酯和胆固醇水平开始升高,而1周后才在As血管壁内膜检测到MCP-1的表达。而Yu等^[8]在第6、11和16个月的食饵性As猿的主动脉粥样硬化斑块内仍可检测到MCP-1的表达。

实验发现,不同阶段As病变组织中均有大量MCP-1 mRNA表达;并且随着喂饲时间的延长,病变程度加重,MCP-1的蛋白及其mRNA的表达均逐渐增强。提示在食饵性As时,参与As斑块形成的动脉壁细胞处于相当活跃的状态,它们可能不同程度地产生和分泌MCP-1。

在As的发生和发展中,血管平滑肌细胞的增殖和向内膜下迁移是As发病的主要环节,而蛋白激酶C(PKC)的激活在细胞功能和促进细胞增殖的信号传递中具有十分重要的意义。Nishizuka Y等^[9]在食饵性As兔的主动脉平滑肌细胞内发现PKC的表达及其活性均增强。有学者报道^[10],MCP-1是VSMC的促分裂因子,它通过PKC或增强细胞外Ca²⁺内流

而促进 VSMC 增殖。PKC 通路可能是介导血管壁 MCP-1 表达的主要细胞内信号转导途径。虽然 PKC 在细胞生长与增殖过程中的作用已经确立,但目前尚未见有关 As 发病过程中 PKC 与 MCP-1 关系的报道。我们发现,不同阶段主动脉粥样硬化新生内膜 PKC α 表达量与 MCP-1 表达量之间呈正相关。这些研究结果提示,As 血管组织的 PKC α 活性增强,可能在介导 MCP-1 的促平滑肌细胞增生过程中起着重要作用。

核因子 κ B 是由两种 Rel 家族蛋白构成的异二聚体蛋白质,多种因素可通过第二信使通路——蛋白激酶 C (PKC) 激活核因子 κ B 启动基因转录。目前研究证实^[11],单核细胞与内皮细胞粘附、向内皮下迁移、泡沫化及相关炎性介质与细胞因子的释放大都受核因子 κ B 的调控。Brand 等^[12]在早期 As 兔的动脉中发现,核因子 κ B 三聚体中的 P50 和 P60 两组分的活性明显增强;与此同时,单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)和白细胞介素 8 (IL-8) 的基因和蛋白表达也随之升高,并与动脉内膜的增生程度呈正相关。本实验采用 EMSA 方法对不同阶段食饵性 As 组织核因子 κ B 活性的检测结果显示,4 周时 As 组织核因子 κ B 的活性即有升高,12 周时达高峰。这与上述研究报道结果基本一致,提示核因子 κ B 参与了 As 的发病与发展的整个过程。通过我们的实验结果,结合其他实验的研究报告和细胞增殖调控的理论基础,我们推测 As 损伤后,动脉壁血管细胞受多种因素刺激而激活 PKC,活化的 PKC 在细胞浆内磷酸化胞浆内转录因子核因子 κ B,后者转位于核,核

因子 κ B 核移位启动 MCP-1 表达,从而导致多种细胞的增殖。而其激活核因子 κ B 和上调 MCP-1 和 PKC α 表达的机制和因果关系尚需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Stephen E, Epstein MD, Zhou YF MD, et al. Current perspective infection and atherosclerosis. *Circulation*, 1999, **100**: e20-e28
- [2] 孟峰, 邓仲端. 凝血酶和脂多糖诱导小牛主动脉平滑肌细胞表达单核细胞趋化蛋白 1. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (3): 189-192
- [3] Brand K, Page S, Walli AK, et al. Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Exp Physiol*, 1997, **82**: 297-304
- [4] Martin T, Cardarelli PM, Parry GC, et al. Cytokine induction of monocyte chemoattractant protein 1 gene expression in human endothelial cells depends on the cooperative action of NF- κ B and AP-1. *Eur J Pharmacol*, 1997, **27**: 1091-097
- [5] Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RC. Accurate transcription by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*, 1983, **11**: 1475-486
- [6] Ylä-Herttuala, Lipton BA, Rosenfeld ME, et al. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 252-256
- [7] Yuh LC, Ya JC, Meei JJ, et al. Monocyte Chemoattractant protein 1 gene and protein expression in atherosclerosis of hypercholesterolemic rabbits. *Atherosclerosis*, 1999, **143**: 115-123
- [8] Yu XH, Dlug S, Graves DT, et al. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 6953-953
- [9] Nizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 1992, **258**: 607
- [10] Skikci O, Nesrin K, Ozer, AA. Dietary cholesterol-induced changes of protein kinase C and the effect of vitamin E in rabbit aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, 1996, **126**: 253-263
- [11] Lao F, Andalibi A, deBeer FC, et al. Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B-like transcription factor activation in response to atherogenic diet in mice. *J Clin Invest*, 1993, **91**: 2572-579
- [12] Brand K, Page S, Walli AK, et al. Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Exp Physiol*, 1997, **82**: 297-304

(此文编辑 胡必利)