

[文章编号] 1007-3949(2006)14-02-0127-05

• 实验研究 •

p38 和丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 在内膜损伤后血管平滑肌细胞表型转化过程中的表达变化

张新平¹, 庞月华², 冯义伯¹, 付作林¹, 史春志¹, 谷翔¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院心内科, 湖北省武汉市 430022;

2. 乌鲁木齐市友谊医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830049)

[关键词] 病理学与病理生理学; p38 和丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 与内膜增殖相关; 免疫组织化学染色; 丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1; 内膜损伤; 血管平滑肌细胞; p38

[摘要] 目的 观察动脉内膜损伤后血管平滑肌细胞表型转化和 p38 及丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 表达的动态变化。方法 分别用免疫组织化学、免疫印迹和逆转录聚合酶链反应方法检测假损伤组和损伤后不同时间点血管壁中增殖细胞核抗原、平滑肌 α 肌动蛋白、p38 蛋白和丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 蛋白及其 mRNA 的表达。结果 假损伤组血管中膜平滑肌细胞及内皮细胞增殖细胞核抗原为阴性表达; 损伤后 5~14 天, 新生内膜阳性细胞率逐渐增加, 28 天后开始逐渐减少, 且新生内膜阳性率均略高于中膜。假损伤组血管中膜平滑肌 α 肌动蛋白表达为阳性, 内皮为阴性; 中膜阳性面积于损伤后 1 天开始减少, 3 天最为明显, 5 天后开始逐渐增加, 且新生内膜阳性表达略低于中膜。假损伤组血管中膜 p38 呈阴性或弱阳性着色; 损伤后 1~35 天呈持续高表达, 新生内膜阳性表达高于中膜。p38 表达变化与增殖细胞核抗原表达变化呈正相关。假损伤组血管中膜丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 呈弱阳性或阳性表达; 损伤后 1 天即开始下降, 14~28 天稍有回升, 至 35 天仍未回到假损伤组水平, 且新生内膜阳性面积稍低于中膜。其表达变化与增殖细胞核抗原表达变化呈负相关。结论 内膜损伤后血管平滑肌细胞增殖能力与其表型转化密切相关, p38 和丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 参与了损伤后血管平滑肌细胞表型转化的信号转导及调节。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Changes of p38 and Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1 in Phenotypic Modulation of Vascular Smooth Muscle Cells After Intimal Injury

ZHANG Xin-Ping¹, PANG Yue-Hua², FENG Yi-Bo¹, FU Zhuo-Lin¹, SHI Chun-Zhi¹, and GU Xiang¹

(1. Department of Cardiology, the Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China; 2. the Friendship Hospital, Urumqi City, Xinjiang 830049, China)

[KEY WORDS] Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatase-1; Intimal Injury; Vascular Smooth Muscle Cell; p38; Neointima; Phenotypic Modulation

[ABSTRACT] **Aim** To explore phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells (VSMC) and change of p38, mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) expression after intimal injury. **Methods** The model of vascular restenosis established by intimal injury of rabbit carotid arteries was used. Immunohistochemistry, Western blot and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the changes of proliferation cell nuclear antigen (PCNA), smooth muscle α actin (SM α actin), p38 protein, and MKP-1 protein as well as its mRNA of sham-injured arteries and injured arteries at different time points. **Results** PCNA was negative in the medium and endothelium in sham-injured arteries. Positive cell rate of PCNA was gradually increased at 1~14 days in the medium and at 5~14 days in the neointima after injury, but it declined gradually after 28 days. Positive cell rate of PCNA in the neointima was slightly more than that in the medium at different time points. SM α actin was positive in the medium, negative in the endothelium in sham-injured arteries. SM α actin initially decreased in the medium at 1 day, it was minimal at 3 days after injury, but it increased gradually after 5 days. Positive expression of SM α actin in the neointima was slightly lower than that in the medium. p38 was negative or feeble positive in the medium in sham-injured arteries. p38 was continuously increased at 1~35 days after injury. Positive expression of p38 in the neointima was higher than that in the medium. There was positive relationship between change of p38 and that of PCNA in the vascular wall at different time points after injury. MKP-1 was feeble positive or positive in sham-injured arteries. MKP-1 initially decreased at 1 day and increased gradually from 14~28th day, but it was still lower than that in the sham-injured arteries on 35th day after injury. There was negative relationship between change of MKP-1 and that of PCNA in the vascular wall at dif-

[收稿日期] 2005-05-24

[修回日期] 2005-12-12

[作者简介] 张新平, 博士, 副主任医师, 研究方向为冠心病介入诊治, E-mail 为 zhangxinping117202@sina.com。庞月华, 主治医师, 研究方向为老年心血管病学。冯义伯, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病介入诊治。

ferent time points after injury. **Conclusion** There was close relationship between phenotypic modulation and proliferation ability of VSMC. p38 and MKP-1 participated in phenotypic modulation of VSMC and its regulation after intimal injury.

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)分为分化型(收缩型)和去分化型(合成型)两种表型。损伤后在生长因子作用下,VSMC可由分化型转变为去分化型,从中膜向内膜下迁移并增殖,合成大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),这个过程称为表型转化^[1]。平滑肌 α 肌动蛋白是分化型VSMC中特有的收缩蛋白,其表达下调是VSMC表型转化最重要的标志^[2]。增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen, PCNA)是反映细胞增殖的重要生物学指标,目前将其作为去分化型VSMC的重要标志^[3]。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)是胞外信号向核内传递,引起细胞增殖和肥大反应的共同通路与中心环节,p38是MAPK超家族的新成员,在细胞分化中起着至关重要的作用^[4]。而丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶(mitogen activated protein kinase phosphatase, MKP)作为一种双重底物特异性蛋白磷酸酶,能使MAPK上的苏氨酸/酪氨酸去磷酸化使其失活,因此对MAPK起着负性调节作用^[5]。本文观察动脉损伤后不同时间点血管壁平滑肌 α 肌动蛋白、PCNA及p38和MKP-1蛋白及mRNA的表达变化,旨在探讨内膜损伤后VSMC表型转化及p38和MKP-1在表型转化中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

经皮腔内血管成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)球囊导管(2.5×14.0 mm)德国贝朗公司;高清晰度彩色医学图文分析系统(HMIAS-2000)日本Olympus公司;凝胶图像分析仪(Geldoc 2000)美国Bio-Rad公司;PCNA、平滑肌 α 肌动蛋白鼠单克隆抗体、p38兔多克隆抗体和链霉素亲和素-生物素-酶复合物(strept avidin-biotin-enzyme complex, SABC)免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;MKP-1兔多克隆抗体购自Santa Cruz公司;MKP-1及三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物由大连宝生物工程有限公司合成;家兔购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。

1.2 动脉内膜损伤模型建立及分组

将48只体重2.3~2.8 kg家兔随机分为假损伤组和损伤后1、3、5、7、14、28及35天组,共8组,每组6只。参照文献[6],3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔

麻醉家兔后,沿颈前正中线剪开皮肤,游离左颈外动脉和左颈总动脉3~4 cm,将颈外动脉远心端结扎,用动脉夹将左颈总动脉近心端临时夹闭后,在颈外动脉结扎处近心端做“V”型切口,插入球囊导管至颈总动脉,经压力泵向球囊注入肝素生理盐水(8 atm),慢速回拉球囊至颈内外动脉分叉处。回抽盐水后重新送回导管,反复3次,结扎颈外动脉近心端,松开动脉夹,恢复血流,逐层缝合切口。术前静脉注射肝素0.1 u/kg抗凝。术后肌注青霉素预防感染。以结扎左颈外动脉的家兔作为假手术组。

1.3 标本制备

假手术组于35天处死,损伤组分别于术后不同时间点处死,剪取靶血管段3 cm,取其远端1 cm血管段置于4%甲醛溶液固定,每份标本切成2段,石蜡包埋,间断均匀切片(4 μ m),进行免疫组织化学染色。余标本迅速置-70℃冰箱保存,用于逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)和Western blot检测。

1.4 免疫组织化学染色

采用SABC法,严格按照试剂盒说明进行PCNA、平滑肌 α 肌动蛋白、p38和MPK-1免疫组织化学染色,阳性表达均为棕黄色或棕褐色,PCNA主要定位于胞核,平滑肌 α 肌动蛋白和p38定位于胞浆,MPK-1定位于胞浆和部分胞核。图文分析系统随机测量每张切片中3个视野,观察它们的表达变化并计算PCNA阳性细胞百分率,取其均值。

1.5 Western blot检测p38蛋白

取各组血管标本100 mg分别剪碎,加入裂解液,碾磨成乳糜状,离心后收集上清液,考马斯兰法测定蛋白含量。各取50 μ g蛋白,进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,硝酸纤维素膜转膜,5%脱脂奶粉室温下封闭,分别加入p38抗体(1:100稀释)和GAPDH抗体(1:200稀释),12 h后冲洗,加生物素标记的二抗(羊抗兔IgG),用化学荧光剂压片显影,凝胶图像处理系统扫描显影密度。实验重复3次。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶1 mRNA的表达

取各时间点血管标本,剪碎后充分匀浆至组织完全裂解。按试剂盒说明书提取总RNA后,各样品取1 μ g RNA,进行cDNA合成及PCR扩增。MKP-1(431 bp)上游5'-GCTGTGCAGCAAACAGTCGA-3',下游5'-CGATTAGTCCTCATAAGGTA-3';GAPDH(299 bp)上游5'-GTGAAGTCCGAGTCAACG-3',下游5'-

GGTGAAGACGCCAGTGGACTG-3'。热启动法进行 PCR, 94 °C 变性 10 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 40 s, 共 30 个循环。取 20 μL 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后于凝胶图像分析仪进行扫描分析。实验重复 3 次。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件, 组间比较采用方差分析(ANOVA)和 *t* 检验。P < 0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 增殖细胞核抗原表达变化

假手术组动脉中膜及内皮细胞呈阴性着色; 损伤后 1 天中膜近腔侧出现散在阳性细胞, 3~ 7 天开始逐渐增多, 14 天达最多并向腔面集聚, 28 天后虽开始减少, 但仍有较高表达; 损伤后 3 天管腔内表面开始出现阳性细胞, 5 天新生内膜形成, 5~ 14 天新

生内膜中阳性细胞进行性增多, 新生内膜逐渐增厚, 28~ 35 天阳性细胞开始逐渐减少, 新生内膜进行性增厚。各时间点新生内膜阳性细胞率均略高于中膜(图 1 和表 1)。

表 1. 不同时间点中膜和内膜增殖细胞核抗原阳性细胞百分率 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分 组	中膜	内膜
假手术组	0	-
1 天	5.16% ± 1.52% ^a	-
3 天	30.47% ± 4.15% ^c	7.25% ± 1.71% ^a
5 天	39.29% ± 4.83% ^b	40.31% ± 5.23% ^c
7 天	46.53% ± 5.67% ^b	48.69% ± 5.35% ^b
14 天	58.21% ± 6.13% ^c	63.93% ± 6.84% ^c
28 天	43.76% ± 3.81% ^c	49.28% ± 5.46% ^c
35 天	27.19% ± 2.72% ^c	33.93% ± 3.88% ^c

a 为 P < 0.01, 与假损伤组比较; b 为 P < 0.05, c 为 P < 0.01, 与损伤组上一时间点比较。

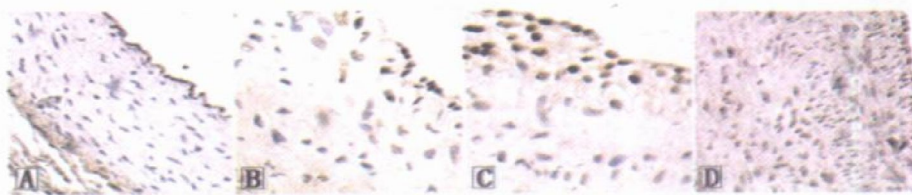


图 1. 损伤后不同时间点增殖细胞核抗原免疫组织化学染色 400), D 为损伤后 28 天 (× 200)。

A 为假手术组 (× 200), B 为损伤后 3 天 (× 400), C 为损伤后 7 天 (×

2.2 平滑肌细胞 α 肌动蛋白表达变化

假手术组血管中膜呈阳性表达, 内皮及外膜呈阴性表达; 损伤后 1 天中膜近管腔侧阳性表达开始减少, 3 天显著减少, 5 天后开始逐渐增加, 至 35 天

接近于假手术组水平; 损伤后 3 天管腔内表面 VSMC 呈阴性着色, 5~ 35 天新生内膜中均有阳性表达, 但略弱于中膜(图 2)。

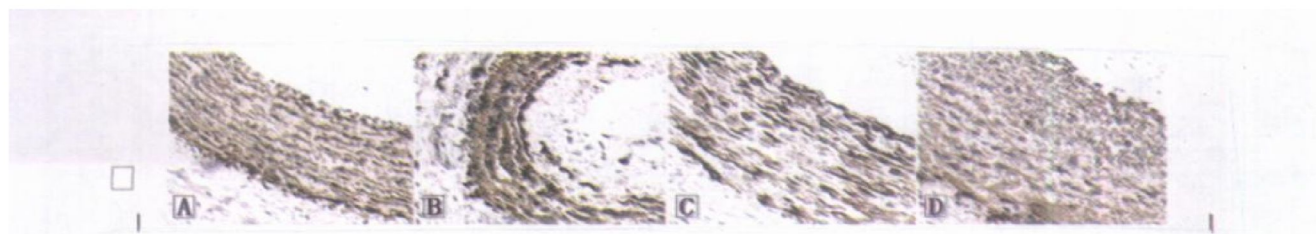


图 2. 损伤后不同时间点血管壁平滑肌 α 肌动蛋白免疫组织化学染色 (× 200)

A 为假手术组, B 为损伤后 3 天, C 为损伤后 5 天, D 为损伤后 14 天。

2.3 p38 表达变化

假手术组血管中膜呈弱阳性或阴性表达; 损伤后 1 天中膜阳性表达明显增加, 3~ 14 天持续增加, 28 天后开始减少, 但仍明显高于假手术组。p38 持

续高表达于 5~ 35 天的新生内膜形成中, 且强于中膜表达。阳性着色主要出现在胞核较大的 VSMC 中, 而胞核较小的 VSMC 则较少和无阳性着色(图 3)。Western blot 检测假手术组血管壁中有少量 p38

蛋白表达, 损伤后 1~ 35 天持续升高, 以 3~ 14 天最为明显, 28 天后虽开始逐渐减少, 但仍有较强表达 (表 2 和图 5)。

2.4 丝裂原蛋白激酶磷酸酶 1 表达变化

假手术组血管中膜呈弱阳性或阳性表达; 损伤后 1~ 3 天中膜阳性表达进行性减少, 5~ 7 天降到最低值, 同时新生内膜呈阴性或弱阳性着色。14~ 28 天中膜和新生内膜阳性表达略有增加, 35 天明显增加。各时间点新生内膜阳性表达稍弱于中膜表达, 阳性着色主要分布在胞核较小的 VSMC 中, 而胞核增大的细胞则较少着色和无着色 (图 4)。MKP-1 mRNA 水平在损伤后 1 天开始逐渐下降, 5~ 7 天达最低水平, 14~ 28 天略有回升, 35 天仍未回到假手术组水平 (表 2 和图 6)。

表 2. p38 蛋白和丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	p38 蛋白	MKP-1 mRNA
假手术组	0.256 ± 0.013	1.206 ± 0.041
1 天	0.978 ± 0.028 ^a	1.114 ± 0.038 ^a
3 天	1.134 ± 0.031 ^c	1.032 ± 0.034 ^c
5 天	1.246 ± 0.033 ^c	0.938 ± 0.029 ^c
7 天	1.250 ± 0.039	0.941 ± 0.031
14 天	1.248 ± 0.035	0.992 ± 0.032
28 天	0.964 ± 0.030 ^c	0.995 ± 0.033
35 天	0.955 ± 0.027 ^a	1.067 ± 0.035 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与假损伤组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与损伤组上一时间点比较。

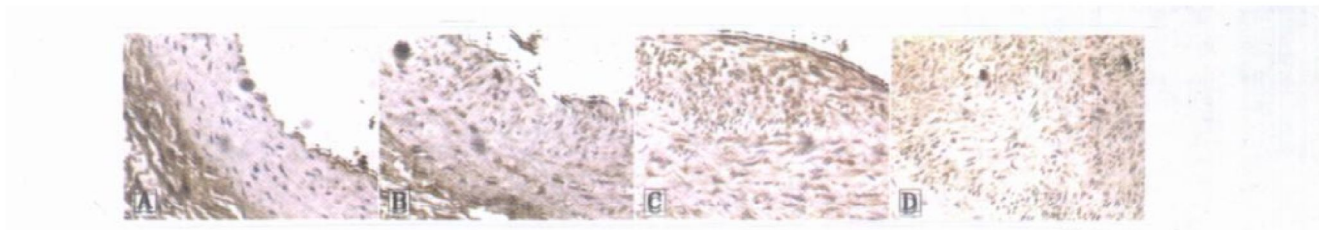


图 3. 损伤后不同时间点血管壁 p38 免疫组织化学染色 (× 200) A 为假手术组, B 为损伤后 1 天, C 为损伤后 14 天, D 为损伤后 35 天 (左下角为中膜)。

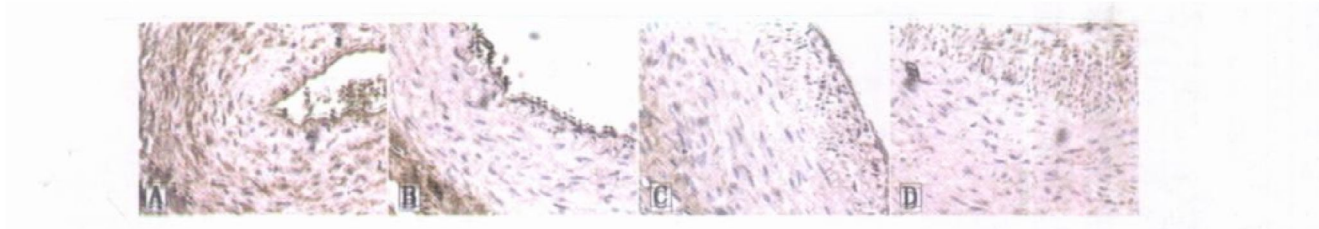


图 4. 损伤后不同时间点丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 免疫组织化学染色 (× 200) A 为损伤后 1 天, B 为损伤后 5 天, C 为损伤后 14 天, D 为损伤后 35 天 (左下为中膜)。

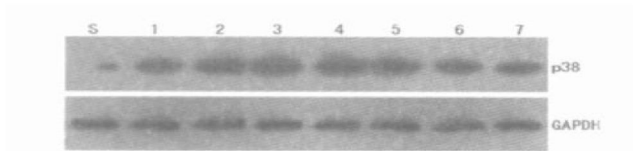


图 5. p38 蛋白表达的免疫印迹产物电泳图 S 为假手术组, 1~ 7 分别为损伤后 1、3、5、7、14、28 及 35 天。

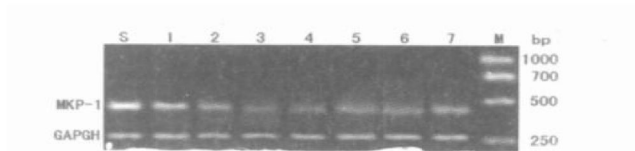


图 6. 丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶 1 mRNA 的逆转录聚合酶链反应产物电泳图 S 为假手术组, 1~ 7 分别为损伤后 1、3、5、7、14、28 及 35 天, M 为 Marker。

3 讨论

血管平滑肌细胞 (VSMC) 是一种高度特化的细胞, 具有可变性。在胚胎期或新生动物, VSMC 处于合成型即去分化型, 细胞可以分裂、增殖及迁移, 但

收缩蛋白和肌纤维成分少, 收缩功能差。在成年动物, 生理情况下 VSMC 处于收缩型即分化型, 收缩功能好, 但不再增殖、分化和迁移, 合成 ECM 的能力较低, 对生长因子几乎无反应, 处于静止期。

血管壁由不同种类的 VSMC 构成, 发生表型转化后由不同功能的特殊亚群细胞执行着不同功能^[7]。当血管壁特别是内膜损伤后, VSMC 迅速发生以基因表达改变为特征的表型转化, 表现为分化型标志基因表达下调, 肌纤维骤减, 粗面内质网、核糖体和高尔基体等细胞器增多, 合成和分泌功能增强, 重新获得增殖能力, 并可从中膜游走到内膜, 合成和分泌大量 ECM, 形成新生内膜^[8]。因为没有标志基因对鉴定 VSMC 表型转化是特异性的^[7], 所以使用平滑肌 α 肌动蛋白和 PCNA 作为分化和去分化标志, 观察内膜损伤后 VSMC 表型转化。结果发现, 假手术组中膜平滑肌 α 肌动蛋白呈阳性, PCNA 呈阴性表达, 说明正常 VSMC 处于分化状态。损伤后 1 天和 3 天, 中膜管腔侧出现散在 PCNA 阳性细胞并开始增多, 胞核增大呈卵圆形; 而平滑肌 α 肌动蛋白表达开始减少并显著减少, 表明部分 VSMC 发生了表型转化。5~14 天中膜及新生内膜中 PCNA 阳性细胞进行性增多并向管腔侧集聚; 28~35 天虽开始逐渐减少, 但仍有较高阳性率且新生内膜略高于中膜表达。中膜平滑肌 α 肌动蛋白阳性表达于损伤后 5 天开始逐渐增加, 但新生内膜其阳性表达略弱于中膜表达。逐渐增厚的新生内膜以大量 VSMC 为主, 同时夹杂着丰富 ECM。提示内膜损伤诱发 VSMC 表型转化后, 使其获得增殖、迁移和合成 ECM 能力; 发生表型转化的 VSMC 一部分可返回分化型, 一部分仍处于去分化状态继续增殖, 并在此种状态下持续至少 35 天; 迁移至血管内腔的 VSMC 是形成新生内膜的主要成分, 并且可以继续增殖, 分泌大量 ECM, 使新生内膜进行性增厚; 损伤早期(1~14 天) 以中膜 VSMC 增殖为主, 以后以新生内膜 VSMC 增殖为主。

Haisong 等^[9] 研究认为持续激活 p38 在损伤后的内膜增殖中起着重要作用。本研究结果发现 p38 阳性细胞首先出现于中膜, 损伤后 1 天即明显增加, 3~14 天最为显著, 新生内膜表达高于中膜表达并持续至少 35 天。p38 阳性表达主要分布在胞核大的去分化型 VSMC 中, 而胞核较小的分化型 VSMC 则较少或无表达。损伤后各时间点血管壁中 p38 蛋白持续升高, 其表达变化与 PCNA 表达变化呈正相关($r = 0.76, P < 0.01$), 且早于平滑肌 α 肌动蛋白表

达减少。说明 p38 表达增加与 VSMC 表型转化密切相关, 合成型 VSMC 有很强的增殖能力及更高的 p38 水平。血管损伤后持续高表达 p38 在 VSMC 表型转化中起着重要作用。假手术组血管中膜 MKP-1 呈阳性表达, 其 mRNA 表达亦较高。损伤后迅速下降, 同时 VSMC 去分化、增殖活跃; 至 35 天呈恢复趋势, 去分化返回分化状态的 VSMC 亦逐渐增多。MKP-1 在分化型 VSMC 中均呈高表达, 在去分化 VSMC 中则低表达或无表达。损伤后不同时间点 MKP-1 mRNA 与 PCNA 表达变化呈负相关($r = -0.78, P < 0.01$), 与平滑肌 α 肌动蛋白表达变化趋势基本一致。说明血管损伤后 MKP-1 表达减少有助于 VSMC 表型转化。其可能机制是: 内皮损伤 \rightarrow 蛋白激酶 C、受体酪氨酸激酶激活 \rightarrow MKP 失活 \rightarrow MAPK 激活 \rightarrow VSMC 由收缩型转合成型 \rightarrow 增殖反应。

综上所述 VSMC 表型转化在血管再狭窄发病机制中占有重要地位。p38 和 MKP-1 参与了损伤后 VSMC 表型转化的信号转导及其调节。因此, 抑制 p38 和增强 MKP-1 表达可能是抑制损伤后 VSMC 表型转化的新靶点。

[参考文献]

- [1] Lavigne MC, Ramwell PW, Clarke P. Growth and phenotypic characterization of porcine coronary artery smooth muscle cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, **35** (3): 136-143
- [2] Regan CP, Adam PJ, Madsen CS, Owens GK. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury[J]. *J Clin Invest*, 2000, **106** (9): 1139-147
- [3] 韩雅玲, 王效增, 康建, 刘海伟, 李少华. 大鼠颈动脉球囊损伤后血管平滑肌细胞 E1A 激活基因阻遏子的表达变化[J]. *中华心血管病杂志*, 2004, **32** (1): 53-58
- [4] Zetser A, Gredinger E, Bengel E. p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation[J]. *J Biol Chem*, 1999, **274** (8): 5193-200
- [5] Bernhard M, Chaohong L, Yanhua H, Gertraud S, Nassim GT, Qingbo X. LDL stimulates mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression, independent of LDL receptors, in vascular smooth muscle cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (8): 1862-871
- [6] 李永秋, 徐明, 姚绍鑫, 张志勇. 实验性家兔颈动脉球囊扩张动脉狭窄动物模型的建立[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (3): 263-266
- [7] Meena SK, Gary KO. Combinatorial control of smooth muscle specific gene expression[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (3): 737-747
- [8] Hungerford JE. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall[J]. *J Vasc Res*, 1999, **36** (1): 2-27
- [9] Haisong J, Sandhya N, Charles FS, Alan RO, Rosanna M, Dawn Z, et al. Sustained activation of p38MAPK mitogen-activated protein kinase contributes to the vascular response to injury[J]. *Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, **301** (1): 15-20

(此文编辑 文玉珊)