

[文章编号] 1007-3949(2006)14-11-0971-04

• 实验研究 •

富含半胱氨酸蛋白 61 在球囊损伤大鼠腹主动脉中的表达变化

付鹏¹, 孙英贤¹, 牛铁生¹, 付新²

(1. 中国医科大学附属盛京医院心内科, 辽宁省沈阳市 110004; 2. 沈阳医学院附属第二医院心内科, 辽宁省沈阳市 110002)

[关键词] 内科学; 富含半胱氨酸蛋白 61; 免疫组织化学; 逆转录聚合酶链反应; 球囊损伤; 内膜增生; 大鼠

[摘要] 目的 观察大鼠腹主动脉球囊损伤后富含半胱氨酸蛋白 61 表达的变化。方法 对球囊损伤后不同时间段的大鼠腹主动脉标本采用组织形态学观察内膜增生, 采用免疫组织化学、逆转录聚合酶链反应、免疫蛋白印记分析检测富含半胱氨酸蛋白 61 的表达。结果 球囊损伤后可见新生内膜在术后 7 天出现, 术后 14 天明显增厚, 术后 28 天内膜继续增生, 形成的新生内膜厚度不均, 较假手术组明显增厚 ($P < 0.01$)。球囊损伤后 7 天、14 天采用免疫组织化学、逆转录聚合酶链反应、蛋白印记分析检测富含半胱氨酸蛋白 61 的表达均明显增强, 与假手术组比较差异有显著性 ($P < 0.01$)。28 天时与假手术组比较差异没有显著性 ($P > 0.05$)。结论 球囊损伤后富含半胱氨酸蛋白 61 的表达明显增强, 提示富含半胱氨酸蛋白 61 可能在球囊损伤后内膜增生过程中起重要作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Cysteine-Rich 61 Expression in Rats Abdominal Artery After Balloon Injury

FU Peng¹, SUN Ying-Xian¹, NIU Tie-Sheng¹, and FU Xin²

(1. Department of Cardiology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004; 2. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Shenyang Medical University, Shenyang 110002, China)

[KEY WORDS] Cysteine-Rich 61; Balloon Injury; Intimal Hyperplasia; Rats; Abdominal Artery

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the change of Cysteine-rich 61 in rats abdominal artery injured by balloon. **Methods** Forty-eight Wistar male rats were studied. Balloon injury was conducted in abdominal artery respectively. Rats were killed at different time points and abdominal artery were collected in time. Intimal hyperplasia was studied by histological morphology method. The expression of tissue Cysteine-rich 61 was determined by immunohistochemically, reverse transcription polymerase chain reaction and western blot. **Results** Intimal hyperplasia was present at 7th day after balloon injury, became more obvious at 14th day and in progression at 28th day. No change was observed in control group. The expression of Cysteine-rich 61 increased significantly at 7th day and 14th day after balloon injury, and it was significantly different between injury group and control group ($P < 0.01$). The expression of Cysteine-rich 61 was not significantly different between injury group and control group at 28th day ($P > 0.05$). **Conclusions** Cysteine-rich 61 expressed stronger in injury group than that in control group, which indicated that Cysteine-rich 61 may play an important role in intimal hyperplasia caused by balloon injury.

动脉损伤后狭窄的形成是一个复杂的病理生理过程, 已证实血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的活化、增殖和迁移是导致动脉壁过渡增生的中心环节^[1]。动脉损伤后血管壁局部存在多种生长因子如血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、转化生长因子 (transforming growth factor-beta, TGF- β)、胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 等, 能够刺激 VSMC 活化和迁移^[2-4]。研究发现, 富含半胱氨酸蛋白 61 (Cysteine-rich 61, Cyr61) 是由血清、PDGF、TGF- β 等作用于成纤

维细胞株产生的调节因子^[5], 它能够启动 VSMC 的生长、迁移和粘附^[6]。因此, 本研究通过观察球囊损伤的腹主动脉中 Cyr61 的变化, 探讨动脉内膜损伤后血管狭窄形成的病理生理机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 Wistar 大鼠 (由中国医科大学实验动物中心提供)、球囊导管 (球囊直径 2.0 mm, 长 20 mm; Cordis 公司)、TRIZOL 试剂 (Gibco 公司)、引物及逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 (宝生物公司)、山羊抗人 Cyr61 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的兔抗山羊 IgG 二抗 (北京中山公司)、免疫组织化学试剂盒 (博士德公司)。

[收稿日期] 2006-07-03 [修回日期] 2006-11-05

[作者简介] 付鹏, 博士研究生, 讲师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 fupeng990927@yahoo.com.cn。孙英贤, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病的介入治疗。牛铁生, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的介入治疗。

1.2 动物分组与模型制作

48只健康雄性Wistar大鼠,体重350~450g,随机分为两组。球囊损伤组:按手术时间分术前和术后7天、14天、28天四个亚组,每个亚组6只;假手术组:除不进行球囊扩张外,余操作及分组均同损伤组,每个亚组6只。将大鼠用20g/L戊巴比妥钠(40mg/kg,腹腔内注射)麻醉后,沿中线切开颈部,暴露并钝性分离左颈总动脉,沿血管壁剪一纵形小切口,插入J型导引钢丝,在导丝指引下插入2.0mm×20mm动脉球囊导管至腹主动脉下段进行扩张,压力为6atm,回拉至颈总动脉分叉处,反复3次,将导管旋转180°,再反复回拉3次,拔出导管,结扎缝合切口,常规饲养。术中肝素化,术后常规青霉素抗菌治疗。分别于不同时间点处死各组动物,取材检验。取材后一部分标本迅速置入液氮罐中,后转于-80℃低温冰箱中保存,用作RT-PCR和Western blot检测。另一部分用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,常规病理连续切片,切片厚度5μm,分别作HE染色和免疫组织化学染色。

1.3 HE染色形态学观察

光学显微镜下观察血管腔的形态、内膜增厚情况,并拍照记录。按照组织学划分,内弹力膜以内为血管内膜,在4倍物镜下将完整的血管横切面HE染色图像摄入计算机图像分析系统中,内膜厚度=(内弹力板周径-管腔周径)/2π。每张切片测3次,取平均值。

1.4 富含半胱氨酸蛋白61免疫组织化学检测

石蜡包埋的血管组织常规切片、脱蜡、水化、灭活内源性过氧化物酶、抗原修复、正常血清封闭、一抗(1:200)4℃过夜、二抗(1:200)孵育20min、SABC孵育20min(各步骤间用0.1mol/L PBS缓冲液漂洗切片5min,3次)、DAB显色、苏木精复染、分化、脱水、封片。以PBS缓冲液为一抗作阴性对照,以人肿瘤细胞切片作为阳性对照,着棕褐色处为阳性信号。每例随机抽取染色清晰的切片5张,每张切片于光镜下(×400)随机选取5个视野,利用美国Universal Imaging Porporation图像分析系统,应用MetaMorph软件,测定平均光密度值以表示阳性产物的强度,平均值越大,其阳性反应产物表达强度越强,表明蛋白的含量越高。

1.5 富含半胱氨酸蛋白61mRNA表达的检测

检索基因库Cyr61和β-actin cDNA序列设计和合成引物。Cyr61引物上游为5'CAA CCC AAC TGT AAA CAT C3',下游为5'GCA TCC TGC TAA GTA AAT C3'(GenBank accession NO. NM0313327),扩增片段

451bp;内参β-actin产物大小为360bp,引物序列上游为5'TTC CAG CCT TCC TTC CTG G3',下游为5'TTG CGC TCA GGA GGA GCA AT3'。按TRIZOL试剂盒的操作步骤抽提总RNA,用分光光度计测定RNA含量和纯度,A260/A280均为1.7~2.0。cDNA的合成:RT体系20μL含1μg总RNA,MgCl₂4μL(25mmol/L),dNTP2μL(各10mmol/L),Rnaseinhibitor20IU,AMV逆转录酶15IU,随机引物1μL(50pmol/L)。PCR反应:反应体系为25μL,内含cDNA3μL,10×buffer2.5μL,MgCl₂(25mmol/L)1.5μL,dNTP(10mmol/L)0.5μL,Taq酶1.5IU。反应参数为:94℃预变性3min,94℃变性30s→60℃退火30s→72℃延伸60s,30个循环;72℃延伸10min。取PCR产物10μL在2%琼脂糖凝胶上电泳,用ImageMasterVDSCL凝胶成像系统进行光密度扫描,以Cyr61/β-actin的比值表示Cyr61 mRNA的相对表达水平。

1.6 富含半胱氨酸蛋白61的蛋白质印记分析

取各组血管组织100mg,用裂解缓冲液提取总蛋白质,用Bradford方法测定蛋白质浓度。等量蛋白质分别采用12%SDS或5%SDS聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳进行分离,然后转至醋酸纤维滤膜上,室温下摇动封闭(TBST+5%脱脂奶粉)1h,经洗膜后,加入抗Cyr61多克隆抗体(1:200稀释)4℃过夜,室温下洗膜后加入辣根过氧化物酶耦联兔抗羊IgG(1:300稀释),最后用化学发光底物进行发光显迹。均以β-actin为内参,用Kodak Digital Science 1D 210图像分析软件对Cyr61进行半定量分析。

1.7 统计学处理

各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析。所有统计处理均由SPSS10.0软件包完成。

2 结果

2.1 球囊损伤后腹主动脉HE染色

假手术组内壁光滑,内皮完整,内膜由单层内皮细胞及少量细胞外基质构成。血管壁圆形,厚度均一,内、外弹力板清晰、完整,管腔侧内皮细胞核蓝染,排列整齐均称,中膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)核呈梭形,内皮层下未见有SMC潜入。球囊损伤组新生内膜在术后7天出现,14天明显增厚,可见大量增生的VSMC,排列紊乱,胞核多为圆形和椭圆形,明显不同于中膜的梭形核;28天内膜继续增生,形成的新生内膜厚度不均,较对照组明显增厚($P < 0.01$,表1和图1)。

表 1. 两组大鼠在不同时间血管内膜厚度 ($\bar{x} \pm s$, μm)

分 组	术前 (n=6)	术后 7 天 (n=6)	术后 14 天 (n=6)	术后 28 天 (n=6)
假手术组	6.28 ± 0.06	6.27 ± 0.06	6.30 ± 0.07	6.29 ± 0.07
球囊损伤组	6.30 ± 0.09	39.26 ± 2.87 ^{ab}	65.35 ± 3.22 ^{ab}	74.31 ± 3.56 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与本组术前比较; b 为 $P < 0.01$, 与假手术组同时时间比较。

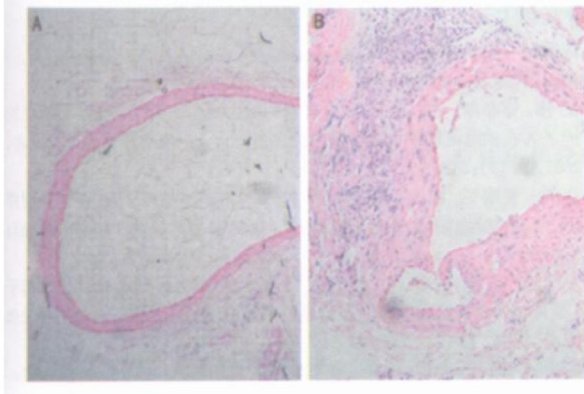


图 1. 光学显微镜下血管形态学改变 (HE 染色 $\times 40$) A 为假手术组, B 为球囊损伤 14 天组。

2.2 球囊损伤后腹主动脉富含半胱氨酸蛋白 61 免疫组织化学检测结果

球囊损伤后新生内膜在术后 7 天出现, 增殖的内膜层大部分细胞质内出现棕黄色或棕褐色颗粒, 内膜 VSMC 强阳性表达 Cyr61; 14 天内膜阳性表达有所下降, 有向腔面聚集的趋势, 术后 28 天内膜仍有少量表达; 阴性对照未见着色(表 2 和图 2)。

表 2. 富含半胱氨酸蛋白 61 免疫组织化学检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	术前 (n=6)	术后 7 天 (n=6)	术后 14 天 (n=6)	术后 28 天 (n=6)
假手术组	2.29 ± 0.06	2.28 ± 0.08	2.30 ± 1.04	2.27 ± 0.08
球囊损伤组	2.30 ± 0.06	34.21 ± 2.56 ^a	26.68 ± 2.52 ^a	3.04 ± 1.02

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组同时时间比较。

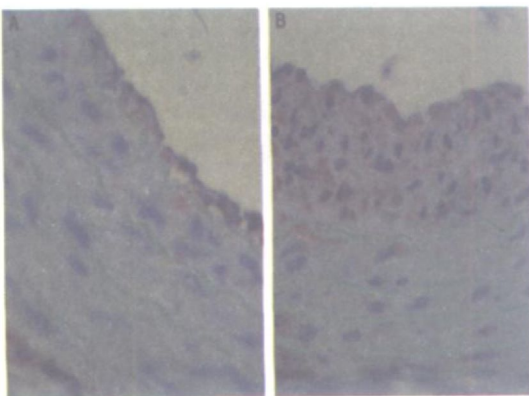


图 2. 血管免疫组织化学染色结果 ($\times 400$) A 为假手术组, B 为球囊损伤 14 天组。

2.3 球囊损伤后腹主动脉富含半胱氨酸蛋白 61-mRNA 和蛋白表达的变化

大鼠腹主动脉球囊损伤后 7 天时 Cyr61mRNA 和蛋白表达均明显增加 ($P < 0.01$), 14 天时略有下降, 与假手术组相比差异均有显著性 ($P < 0.01$), 至 28 天时仍未回到假手术组水平(表 3, 图 3 和图 4)。

表 3. 球囊损伤后腹主动脉富含半胱氨酸蛋白 61mRNA 和蛋白产物变化 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	Cyr61mRNA	Cyr61
假手术组	1.157 ± 0.022	0.094 ± 0.018
球囊损伤 7 天组	1.256 ± 0.056 ^a	0.202 ± 0.016 ^a
球囊损伤 14 天组	1.320 ± 0.068 ^a	0.169 ± 0.021 ^a
球囊损伤 28 天组	1.161 ± 0.025	0.130 ± 0.012

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较。

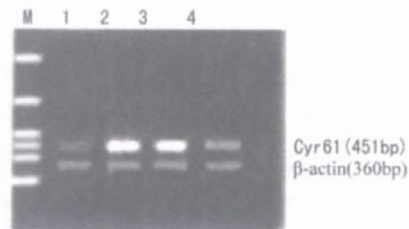


图 3. 富含半胱氨酸蛋白 61mRNA 的表达 M 为相对分子质量, 1 为假手术组, 2~ 4 分别为球囊损伤 7、14、28 天组。

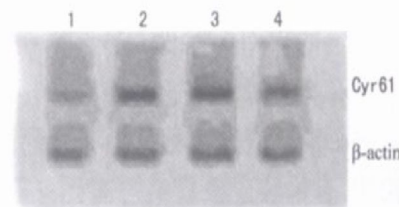


图 4. 富含半胱氨酸蛋白 61Western blot 结果 1 为假手术组, 2~ 4 分别为球囊损伤 7、14、28 天组。

3 讨论

富含半胱氨酸蛋白 61 (Cyr61) 属于 CCN 家族^[7], 其主要成员有: 结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF)、Cyr61、肾母细胞瘤过渡表达基因 (nov)、鼠黑色素瘤细胞的基因 wisp-1、wisp-2 和 wisp-3 等。由于 CTGF、Cyr61 和 nov 是这个家族最初的成员, 称这个家族为 CCN 家族。大部分 CCN 家族成员是含有 343~ 381 个氨基酸残基的相对分子质量为 35 000~ 40 000 的分泌蛋白, 这些蛋白都含有 38 个保守的半胱氨酸。Cyr61 位于染色体 1p22.3^[8], 具有明显的促有丝分裂活性和趋化性, 可诱导成纤维细胞增殖和分泌细胞外基质 (extracellular ma

trix, ECM), 参与调节细胞增生、分化、胚胎发育形成^[9,10]。Andres Hilfiker 等^[11]研究表明人正常动脉血管没有明显的 Cyr61 的染色,而在人颈动脉斑块旋切术和冠状动脉移植手术的动脉粥样硬化血管中 Cyr61 mRNA 及蛋白均呈高表达,在载脂蛋白 E 基因缺陷鼠动脉粥样硬化模型上 Cyr61 mRNA 及蛋白均高表达,说明 Cyr61 参与动脉粥样硬化的形成及血管的狭窄。本研究通过对球囊损伤的大鼠腹主动脉进行逆转录聚合酶链反应及免疫蛋白印记分析发现,假手术组 Cyr61 mRNA 及蛋白表现低水平的表达,球囊损伤组第 4 天时 Cyr61 表达开始增高,7 天至 14 天时 Cyr61 表达达高峰,14 天后减弱,28 天时仍有微弱表达,说明在血管损伤过程中, Cyr61 可能参与了这一过程。这与 Andres Hilfiker 等人的研究结果一致。平滑肌细胞的迁移、增殖是内膜增生的主要原因^[12,13]。有研究表明 Cyr61 可促进 VSMC 粘附并诱导其趋化。本研究通过对大鼠球囊损伤后内膜增殖情况的观察发现,7 天时新生内膜开始形成,并可见 VSMC 增殖,损伤后 14 天和 28 天,中膜的 VSMC 穿过断裂的基底膜移行至内膜,大量平滑肌细胞增殖,新生内膜明显增厚,引起管腔狭窄。同时,免疫组织化学结果表明假手术组中膜平滑肌细胞 Cyr61 呈阴性表达,而在球囊损伤 7 天、14 天组增殖的平滑肌细胞中 Cyr61 则呈明显的阳性表达,说明 Cyr61 在平滑肌细胞由中膜迁移至内膜的过程中可能发挥了一定的作用。Tatiana 等^[6]和 Chen 等^[14]发现, VSMC 向 Cyr61 粘附是通过整合素 α 与 $\beta 1$ 和细胞表面乙酰肝素硫酸酯蛋白聚糖介导的,该作用呈剂量依赖性,有饱和现象且绝对需要有乙酰肝素硫酸酯蛋白聚糖作为共受体。Cyr61 刺激 VSMC 是发生趋化作用而不是化学激活,即直接迁移而非随机移动。说明 Cyr61 是通过促进平滑肌细胞的粘附与聚集参与内膜增殖的病理过程的。近年来研究表明,ECM 在内膜增生中也起着非常重要的作用。基质金属蛋白酶可调节 ECM 合成从而调控细胞的迁移。Chen 等^[15]研究表明,过量表达 Cyr61 明显增加了培养基中基质金属蛋白酶 1 和 3 的 mRNA 和蛋白活性,并持续 24 h。本研究发现 VSMC 主要局限于 ECM 积聚处表达 Cyr61,特别是在平滑肌细胞增殖的部位,提示 Cyr61 除了诱导平滑肌细胞增殖可能还诱导基质金属蛋白酶表达,增加 ECM 合成,促进

内膜增厚。

总之,本实验通过对球囊损伤后新生血管内膜 Cyr61 的检测,发现 Cyr61 的表达明显增加,说明 Cyr61 可能参与了动脉损伤后血管狭窄的病理生理过程。

[参考文献]

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s [J]. *Nature*, 1993, **362**: 801-809
- [2] 王伟, 谭孝厚, 庄汉屏. 结合肝素的表皮样生长因子及血小板源生长因子 A 在动脉粥样硬化血管壁中的表达[J]. *中国动脉粥样硬化杂志*, 2002, **10** (3): 221-224
- [3] 金炜, 董维平, 杨红, 何奔, 孙宝贵. 转化生长因子 $\beta 1$ 在动脉粥样硬化形成中的作用及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2003, **19** (6): 650-653
- [4] 苏海霞, 盛净, 刘德利, 夏万尧, 成静, 陈朝婷. 胰岛素样生长因子 1 受体抗体对大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. *中国动脉粥样硬化杂志*, 2006, **14** (2): 137-139
- [5] O'Brien TP, Yang GP, Sanders L, Lau LF. Expression of cyr61: a growth factor-inducible immediate early gene [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, **10** (7): 3569-577
- [6] Tatiana M, Grzeszkiewicz, Volkhard Lindner, Ningyu Chen, Stephen CF Lam, Lester F, et al. The angiogenic factor cysteine-rich 61 (CYR61, CCN1) supports vascular smooth muscle cell adhesion and stimulates chemotaxis through integrin $\alpha 6 \beta 1$ and cell surface heparan sulfate proteoglycans [J]. *Endocrinology*, 2002, **143** (4): 1441-450
- [7] Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor [J]. *FEBS Lett*, 1993, **327** (2): 125-130
- [8] Jay P, Berger-Lefranc JL, Marsollier C, Mejean C, Taviaux S, Berta P. The human growth factor-inducible immediate early gene, CYR61, maps to chromosome 1p. *Oncogene* [J]. 1997, **14** (14): 1753-757
- [9] Kireeva ML, MO FE, Yang GP, Lau LF. Cyr61, a product of a growth factor-inducible immediate early gene, promotes cell proliferation, migration, and adhesion [J]. *Mol Cell Biol*, 1996, **16** (4): 1326-334
- [10] Kireeva ML, Latinkic BV, Kolesnikova TV, Chen CC, Yang Gp, Abler AS, et al. Cyr61 and Fisp12 are both ECM-associated signaling molecules: activities, metabolism, and localization during development [J]. *Exp Cell Res*, 1997, **233** (1): 63-77
- [11] Andres Hilfiker, Hilfiker-Kleiner D, Martin Fuchs, Karol Kaminski, Artur Liechtenberg, Drexler H. Expression of CYR61, an angiogenic immediate early gene, in arteriosclerosis and its regulation by angiotensin II [J]. *Circulation*, 2002, **106** (2): 254-260
- [12] 苏海霞, 盛净. 血管损伤后平滑肌细胞表型转变及其研究进展[J]. *国外医学·心血管病学分册*, 2002, **29** (1): 10-12
- [13] Landzberg BR, Frishman WH, Lerrick K. Pathophysiology and pharmacological approaches for prevention of coronary artery restenosis following coronary artery balloon angioplasty and related procedures [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 1997, **39**: 361-398
- [14] Chen N, Leu SJ, Todorovic V, Lam SC, Lau LF. Identification of a novel integrin $\alpha v \beta 3$ binding site in CCN1 (CYR61) critical for pro-angiogenic activities in vascular endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (42): 44166-176
- [15] Chen CC, Chen N, Lau LF. The angiogenic factors Cyr61 and connective tissue growth factor induce adhesive signaling in primary human skin fibroblasts [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (13): 10443-452

(此文编辑 许雪梅)