

替米沙坦对大鼠血管损伤性重塑过程中 粘着斑激酶表达和活化的影响

程芳洲^{1,2}, 鲍翠玉², 彭 绩¹, 柯 俊³

(1. 深圳市慢性病防治院, 广东省深圳市 518020; 2. 咸宁医学院附属医院心内科, 湖北省咸宁市 437100;

3. 华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 病理学与病理生理学; 替米沙坦; 血管重塑; 粘着斑激酶; 内皮剥脱术

[摘要] 目的 研究血管紧张素受体拮抗剂替米沙坦对血管损伤性重塑及其过程中粘着斑激酶表达和活化的影响。方法 建立大鼠主动脉内皮剥脱后再狭窄模型, 将雄性大鼠随机分为对照组、模型组和替米沙坦组, 每组 12 只。30 天后取损伤部位血管段进行形态学观察, 逆转录聚合酶链反应法测定粘着斑激酶 mRNA 的表达, Western blot 法测定粘着斑激酶蛋白总量和磷酸化蛋白含量。结果 术后 30 天, 模型组主动脉内膜明显增厚, 粘着斑激酶 mRNA 水平明显增高, 蛋白含量及磷酸化水平均明显增加, 而替米沙坦组血管内膜增生程度明显减轻, 粘着斑激酶 mRNA 表达活性明显降低, 粘着斑激酶蛋白含量及磷酸化水平明显降低。结论 替米沙坦可明显减轻大鼠血管内膜剥脱术后血管内膜增生程度, 抑制血管损伤后粘着斑激酶表达与活化。替米沙坦的抗血管损伤性重塑作用可能与抑制粘着斑激酶表达与活化有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Timisartan on Focal Adhesion Kinase Expression in Vascular Remodelling After Artery Injury in Rats

CHENG Fang-Zhou, BAO Cu-Yu, PENG Ji, and KE Jun

(Shenzhen Chronic Disease Prevention and Control Center, Shenzhen 51802000, China)

[KEY WORDS] Timisartan; Vascular Remodeling; Focal Adhesion Kinase; Balloon Endothelial Denudation

[ABSTRACT] **Aim** To examine the effect of timisartan on expression and activity in vascular remodeling after artery injury in rats. **Methods** The rat models of balloon endothelial denudation were builded. Male Wistar rats were randomized to three groups: nomal control group (n= 12), model group (n= 12) and timisartan group (n= 12). The rats in timisartan group were supple diet with timisartan 40 mg/(kg·d). The animals were sacrificed at 30 days after the injury. Western blot were used to detect the expression and activity of focal adhesion kinase (FAK) with RT-PCR or Western blot method. Hyperplasia of intima were observed. **Results** Compared with the control group, hyperplasia of intima were significantly increased, the expression of FAK mRNA, protein and its activity were significantly increased in model group at 30 days after the injury. Compared with the model group, hyperplasia of intima were significantly lower, the expression of FAK mRNA, the expression of FAK protein and activity were significantly decreased in Timisartan group. **Conclusion** Timisartan significantly inhibited artery wall remodelling and expression and activity of FAK in the rat model of artery injury. The mechanisms of Timisartan inhibiting artery wall remodelling could involve inhibition of expression and activity of FAK.

血管内皮损伤后伴有血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的粘附迁移、增殖及细胞外基质(ext racellular matrix, ECM)的大量合成和重构, 这是血管成形术后发生重塑导致再狭窄发生过程中的一个重要环节^[1]。而在此过程中常伴有粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的表达和磷酸化激活^[2]。也有实验证明血管紧张素参与了血管损伤性重塑过程^[3]。本研究旨在探讨血管紧张素受体拮抗

剂替米沙坦对血管损伤性重塑的影响以及对此过程中粘着斑激酶的表达和活化的影响, 以了解替米沙坦在防止血管再狭窄中的作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar 大鼠由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供; 兔抗鼠 FAK 多克隆抗体、羊抗小鼠 PY-99 抗体和 ECL 试剂盒购自武汉博士德生物工程公司; TaqManGold RT-PCR Kit 为美国 PE 公司产品; FAK 引物由上海生工生物工程公司合成; 替米沙坦

[收稿日期] 2007-06-09 [修回日期] 2007-07-02

[基金项目] 湖北省科技厅面上项目(2005ABA086)资助

[作者简介] 程芳洲, 博士, 主任医师, 副教授, 研究方向为心血管疾病预防, E-mail 为 chengfangzhou001@163.com。

为德国勃林格殷格翰公司生产。

1.2 血管内皮剥脱后再狭窄动物模型的建立

体重 300~360 g 的雄性 Wistar 大鼠, 随机分为三组: 对照组、模型组和替米沙坦组, 每组 12 只。模型组、替米沙坦组大鼠以球囊导管法剥脱血管内皮。对照组及模型组正常进食及饮水, 替米沙坦组在正常进食及饮水的同时给予替米沙坦 5 mg/(kg·d), 连续 30 天, 随即取损伤部位血管段进行形态学观察及提取 RNA 和蛋白质。

1.3 血管壁增生程度观察

石蜡组织切片 HE 染色。光镜下, 用计算机图像分析系统测量大鼠损伤动脉段外弹力板围绕面积及腔内面积。管壁面积按照外弹力板围绕面积减去腔内面积计算。

1.4 逆转录聚合酶链反应测定粘着斑激酶 mRNA 表达

FAK 上游引物 5'-ACT TGG ACG CTG TAT TGG AG-3', 下游引物 5'-CGG TAG CCT GTC TTC TGG AG-3', 扩增产物长度为 833 bp, β -actin 上游引物 5'-AGC TGA GAG GG A AAT CGT GCG-3', 下游引物 5'-GTG CCA CCA GAC AGC ACT GTG-3', 扩增产物长度 300 bp。采用异硫氰酸胍—酚—氯仿一步法从上述各组动物的血管中提取总 RNA 作逆转录, 然后用 PCR 扩增仪进行 PCR 反应, 反应条件 94℃预变性 5 min 后 94℃变性 1 min $\rightarrow$ 68℃退火 1 min $\rightarrow$ 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72℃延伸 10 min, 4℃结束反应。1.2% 琼脂糖电泳, 电泳结束后凝胶成像系统扫描分析图像。

1.5 Western blot 法测定粘着斑激酶的蛋白总量和磷酸化蛋白含量

取各组大鼠胸、腹主动脉剪碎, 加入 1 mL RIPA 裂解缓冲液, 冰浴中匀浆, 离心取上清, 用 Lowry 法定量蛋白。取 150 μ g 蛋白, 经 SDS-PAGE 后转膜, 分别与 FAK、磷酸酪氨酸抗体及二抗反应, 用化学发光显影定影后底片置凝胶成像系统中扫描分析图像。

1.6 统计学分析

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 血管形态学变化

对照组大鼠主动脉壁各层结构完整, 内膜光滑, 中膜 VSMC 排列整齐。术后 30 天, 内膜呈弥漫性增厚, 新生内膜中以 VSMC 为主。经替米沙坦治疗后, 大鼠血管内膜增生程度较模型组明显减轻。

2.2 粘着斑激酶基因表达活性的变化

正常主动脉组织中可检测到 FAK mRNA 的存在; 内膜剥脱后 30 天, FAK mRNA 水平明显高于对照血管; 替米沙坦治疗后 FAK mRNA 表达活性比模型组降低 15.1% (图 1)。

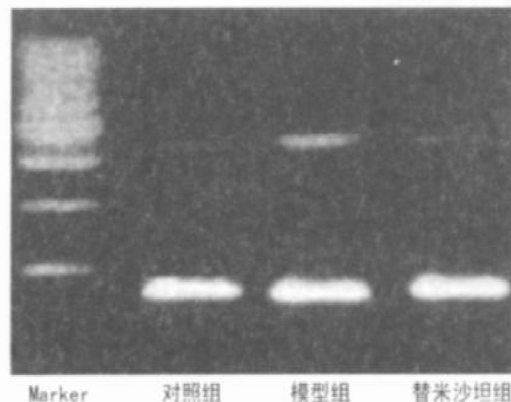


图 1. 粘着斑激酶 mRNA 的表达

2.3 粘着斑激酶蛋白含量及磷酸化水平的变化

在正常血管中存在一定量的 FAK 蛋白且以非磷酸化形式为主。术后 30 天, 血管中 FAK 蛋白含量及磷酸化水平分别较对照组增加了 38.4% 和 72.3%; 替米沙坦治疗后 FAK 蛋白含量及磷酸化水平分别较模型组降低了 21.2% 和 38.1% (图 2)。

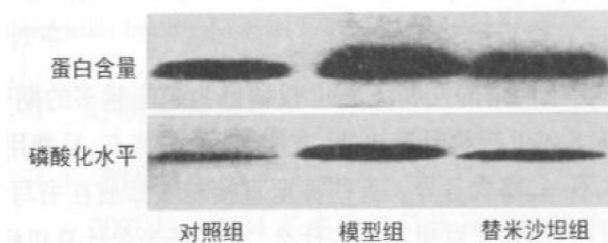


图 2. 粘着斑激酶蛋白含量及磷酸化水平的表达

3 讨论

再狭窄是经皮腔内冠状动脉成形术 (PTCA) 后主要的远期并发症。随着 PTCA 的广泛应用, 人们也一直未停止对术后再狭窄防止方法的探索。术后再狭窄的机制较复杂, 其中血管壁的增生性重塑是主要机制之一。在血管增生性重塑过程中, VSMC 大量增殖与血管生长因子的作用有关。通过调节血管生长因子, 可能会达到控制血管增生性重塑、防止再狭窄的目的。血管紧张素 ① 是最为重要的血管生长因子, 已有实验证明, 损伤的血管壁组织局部血管紧张素 ① 水平升高^[4], AT1 受体上调。本实验结果

发现,替米沙坦可明显抑制内皮剥脱后 VSMC 增殖。

近年研究表明,FAK 广泛分布于多种细胞中,在 VSMC 也有分布,是依赖于整合素细胞信号转导通路中的信号传递分子,处于细胞内多条信号转导通路的交汇点,通过其分子中的酪氨酸磷酸化而被激活。活化的 FAK 通过细胞骨架蛋白、Src 激酶、磷酸肌醇 23 激酶等途径,调节细胞的粘附、迁移、增殖和分化^[5-7]。本研究结果发现,内膜剥脱后血管内膜增生的同时,FAK mRNA 水平、蛋白表达及磷酸化水平明显增高,而应用替米沙坦在明显抑制血管损伤后 FAK 表达与活化的同时,也抑制了血管内膜增生,提示 FAK 可能参与了血管重塑的发生,替米沙坦在影响血管内膜增生的机制可能与其抑制 FAK 表达与活化有一定关系。替米沙坦很可能通过抑制血管损伤后 FAK 表达与活化,阻断细胞外信号由整合素向细胞内的转导,进而抑制血管内膜增生。可见,血管紧张素受体拮抗剂一方面通过调节血管生长因子达到控制血管增生性重塑作用,也可能通过调节 FAK 表达与活化来抑制血管损伤后的血管再狭窄。至于 FAK 表达及活化与血管生长因子调节

之间有无相关关系,尚需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] Fisher M, Liu B, Glennon PE, et al. Downregulation of the ERK1 and mitogen activated protein kinase using antisense oligonucleotides inhibits proliferation of porcine vascular smooth muscle cells [J]. *Atherosclerosis*, 2001, **156**: 289-295.
 - [2] Bond M, Salar-Newby GB, et al. Focal adhesion kinase (FAK)-dependent regulation of S-phase kinase-associated protein 2 (Skp2) stability. A novel mechanism regulating smooth muscle cell proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (36): 37 304-310.
 - [3] Freeman EJ. The ang II-induced growth of vascular smooth muscle cells involves a phospholipase mediated signaling mechanism [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **374**: 363-370.
 - [4] Jiang Li, Chen Wanchun. Benazepril on tissue angiotensin converting enzyme and cellular proliferation in restenosis after experimental angioplasty [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1997, **30**: 790-797.
 - [5] Varadarajulu J, Laser M, Hupp M, et al. Targeting of alpha integrins interferes with FAK activation and smooth muscle cell migration and invasion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **331** (2): 404-412.
 - [6] Corley KM, Taylor CJ, Lilly B, et al. Hypoxia inducible factor 1alpha modulates adhesion, migration, and FAK phosphorylation in vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Biochem*, 2005, **96** (5): 971-985.
 - [7] 尹航,江丽惠,彭旭,等. 粘着斑激酶活化对平滑肌细胞粘附和迁移的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2002, **18** (6): 593-596.
- (此文编辑 文玉珊)

•读者•作者•编者•

关于 E-mail 投稿的要求及注意事项

本刊编辑部

由于网络的发展,E-mail 投稿已为越来越多的期刊编辑部采用,我刊也不例外。与传统信函邮寄投稿相比较,E-mail 投稿具有快捷、方便、直观等特点,且费用低廉。然而,在接受 E-mail 投稿过程中我们发现,稿件文本不一,格式各异。有些甚至直接将文章放在书写窗口内,经过传输,文章早已面目全非,又没有纸打印稿作对照,不知文章里写了些什么。尤其是当今计算机病毒肆虐,新的病毒层出不穷,一不小心染上病毒,整个文件就要被删除。为规范 E-mail 投稿,确保其安全性,我刊特作如下规定:

1、E-mail 投稿时,必须把文章作为附件发送,严禁将文章放在 E-mail 书写窗口内。

2、附件中的文章应为 Word 格式。书写时,进入 Word 界面后,应首先进入页面设置窗口设置页面,参数如下: 纸型为 A4; ④页边距上为 2.0 mm,下为 2.0 mm,左为 2.2 mm,右为 2.0 mm; ④文档网格为每行 45 个汉字,每页 40 行; 字体为中文宋体、常规、五号。然后点击选择其它参数,如“单倍行距”、“两端对齐”、“页面显示”等。

3、插图粘贴于正文相应位置中,表格直接在正文中绘制;标题与注释直接写于正文相应位置,严禁以文本框形式插入。

4、E-mail 投稿时,科研基金资助项目批准书的复印件和单位介绍信这两件不要扫描放入 E-mail 内,请另用信函形式邮寄编辑部,以方便存档。

5、请在 E-mail 附件内写明联系方式。