

A20 基因转染对大鼠颈动脉再狭窄和核因子 κ B 表达的影响高 静¹, 李 蕾¹, 徐 丹¹, 林媛媛², 曲 鹏¹

(1. 大连医科大学附属第二医院心内科, 辽宁省大连市 116027;

2. 浙江省杭州市第三人民医院急诊科, 浙江省杭州市 310009)

[关键词] 病理学与病理生理学; 再狭窄; 大鼠; 锌指蛋白 A20; 核因子 κ B; 内膜增生; 基因转染

[摘要] 目的 观察局部转染锌指蛋白 A20 基因对大鼠颈动脉再狭窄模型球囊损伤后内膜增生和血管平滑肌细胞增殖的影响并探讨其可能的机制。方法 建立大鼠颈总动脉球囊损伤模型。104 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 4 组($n=26$): 假手术组、模型组、对照组和治疗组。假手术组只进行颈动脉结扎, 不进行球囊损伤术; 模型组只进行球囊损伤术, 不进行局部转染治疗; 对照组球囊损伤术后局部灌注 Lipofectamine 2000 Reagent+ TE buffer; 治疗组球囊损伤术后局部灌注 Lipofectamine 2000 Reagent+ pCAGGS-GFP/A20 重组质粒。荧光显微镜观察 A20 在损伤动脉壁的转染效率; 病理组织学观察内膜增生情况; 溴脱氧尿嘧啶核苷标记技术评估血管平滑肌细胞的增殖指数; 分别用免疫组织化学染色、Western blotting 方法检测核因子 κ B p65 在各组大鼠颈总动脉中的表达情况。结果 大鼠颈总动脉球囊损伤术后 14 d 模型组和对照组血管内膜显著增生。A20 基因转染可抑制新内膜面积的增加(减少 47.8%, $P<0.05$) 和/或中膜比值的增加(减少 42.9%, $P<0.05$)。术后 10 d 治疗组血管平滑肌细胞体内增殖指数($9.6\% \pm 2.3\%$) 显著少于对照组($26.7\% \pm 5.1\%$, $P<0.05$)。术后 10 d 治疗组血管壁细胞核因子 κ B p65 阳性细胞率显著低于对照组($P<0.05$)。术后 7 d、14 d 和 28 d 治疗组血管组织核因子 κ B p65 的蛋白表达量显著低于对照组($P<0.05$)。结论 局部转染 A20 基因可抑制损伤血管内膜增生及平滑肌细胞的增殖, 其分子机制可能通过其负反馈抑制了核因子 κ B 介导的胞内信号转导途径。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of A20 Gene Transfection on Restenosis and Nuclear Factor- κ B Expression of Rat Carotid ArteryGAO Jing¹, LI Lei¹, XU Dan¹, LIN Yuan-Yuan², and QU Peng¹

(1. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2. Emergency Department, Third People Hospital of Hangzhou City, Hangzhou 310009, China)

[KEY WORDS] Restenosis; Rat; Zinc Finger Protein A20; Nuclear Factor- κ B; Intimal Hyperplasia; Gene Transfection

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of in vivo local transfection of zinc finger protein A20 gene on restenosis of balloon injured rat carotid artery and its possible mechanism. **Methods** Balloon catheter denudation of the endothelium of rat common carotid artery was routinely used as a model of restenosis. 104 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: the sham group(no injury), the model group (the simple injury), the control group (vacant transfection reagent group) and the therapeutic group (A20 gene and transfection reagent group). pCAGGS-GFP/A20 (20 μ g) with 40 μ L Lipofectamine 2000 or TE buffered solution (20 μ L) with 40 μ L Lipofectamine 2000 was instilled into the lumen of the injured segment for 30 min after injury. The transfection efficiency of plasmid in injured vascular wall was evaluated 24 hours after transfection by using fluorescence microscope. Quantification of intimal hyperplasia was determined by pathologic examination. Proliferation index of VSMC in vivo was assessed by thymidine analogue bromodeoxyuridine (BrdU) labeling technique. The expression of nuclear factor- κ B p65 (NF- κ Bp65) of rat carotid arteries in different groups were confirmed by immunohistochemical staining and Western blot analysis. **Results** At day 14 significant intimal hyperplasia was detected after arterial injury in the model and control group.

A20 gene transfection markedly reduced the neointimal area (47.8% reduction; $P<0.05$) and intimal to media area ratio (42.9% reduction; $P<0.05$) in the therapeutic group. Proliferation index of VSMC (BrdU index) at day 10 after operation was decreased significantly in the therapeutic group ($9.6\% \pm 2.3\%$) than in the control group ($26.7\% \pm 5.1\%$, $P<0.05$). A significantly lower level of NF- κ Bp65 positive cells ratio was observed in the therapeutic group than in the control group at 10d after operation ($P<0.05$). A significantly lower level of NF- κ Bp65 protein expression was observed in the therapeutic group than in the control group

[收稿日期] 2008-03-03 [修回日期] 2008-05-20

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30670836)

[作者简介] 高静, 博士研究生, 研究方向为介入心脏病学, 联系电话为 0411-81236823, E-mail 为 slgaojing@sohu.com。李蕾, 博士研究生, 研究方向为介入心脏病学, 联系电话为 0411-81131093, E-mail 为 muzilei1980@126.com。通讯作者曲鹏, 博士, 博士研究生导师, 研究方向为介入心脏病学, 联系电话为 0411-84671291-3021, E-mail 为 qupeng777@yahoo.com.cn。

at day 7 d, 14 d, 28 d after operation ($P < 0.05$). **Conclusion** Local transfection of A20 gene inhibits intimal hyperplasia and VSMC proliferation after arterial injury. Its possible molecular mechanism is that A20 negative feedback inhibits NF- κ B signaling pathway. This study provides evidence for the inflammatory mechanism of restenosis and suggests that A20 gene therapy may serve as a novel gene therapeutic approach to inhibit restenosis.

经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)是治疗冠心病的有效手段,但是再狭窄仍是制约这一技术应用的主要问题。大量研究证实,再狭窄的机制主要由于球囊扩张和支架置入时导致血管壁损伤,引起炎症反应,进而导致血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖和移行^[1,2]。锌指蛋白 A20(zinc finger protein A20)。A20 是核因子 κ B 信号系统重要的负反馈调节因子,也是防止体内炎症反应失控的重要调节蛋白^[3,4]。已有研究证实核因子 κ B 的激活是球囊损伤动脉后血管狭窄发生的重要机制之一^[5]。结构研究显示, A20 既有去泛素活性,又有泛素连接酶活性,是一种重要的泛素调节酶^[6],在 A20 等泛素调节酶的作用下泛素调节参与了核因子 κ B 前体的处理、核因子 κ B 抑制性结合蛋白(inhibitor nuclear factor- κ B, I κ B)的降解和 I κ B 激酶(I κ B kinases, IKK)的活化等主要环节^[3,4],反馈抑制了核因子 κ B 的活化。本研究将 A20 基因于活体局部转染至大鼠球囊损伤的颈动脉,观察其在损伤血管壁细胞内过表达对内膜增生和平滑肌细胞增殖及炎症因子变化的影响,并探讨其分子机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

高效真核表达载体 pCAGGS-GFP/A20 由比利时根特大学分子生物学系 Dr K. Heyninck 和 Prof. R. Beyaert 提供;Endo-Free Plasmid Maxi kit 购自 QIAGEN 公司;Lipofectamine 2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;溴脱氧尿嘧啶核苷(bromodeoxyuridine, BrdU)购自 Sigma 公司;兔抗鼠核因子 κ Bp65 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;抗平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体购自武汉博士德生物工程有限公司;鼠抗 BrdU 单克隆抗体、SP 免疫组化试剂盒、辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术公司;Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;2F Fogarty 球囊导管购自美国 Edwards Lifesciences 世界贸易公司。

1.2 实验动物及分组

健康雄性 SD 大鼠 104 只,体重 350~400 g,由大连医科大学动物实验中心提供。实验前适应性饲养一周,喂食标准饲料,自由摄食水。将 104 只大鼠

随机分为 4 组($n = 26$):假手术组只进行颈动脉结扎,不进行球囊损伤术;模型组即单纯手术组只进行球囊损伤术,不进行局部转染治疗;对照组球囊损伤术后局部灌注 Lipofectamine 2000 Reagent+ TE buffer;治疗组球囊损伤术后局部灌注 Lipofectamine 2000 Reagent+ pCAGGS-GFP/A20 重组质粒。

1.3 pCAGGS-GFP/A20 重组质粒的鉴定

将获得的 pCAGGS-GFP/A20 质粒菌保涂氨苄青霉素抗性的平板后,过夜培养。挑单菌落于 3 mL 氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中 37℃摇床中过夜培养,集菌后,使用 TaKaRa MiniBEST Plasmid Purification Kit 进行小量质粒提取,并使用 EcoR (H/Sma)iv 进行双酶切鉴定,酶切产物 1%琼脂糖凝胶电泳。

1.4 无内毒素质粒的大量提取

将鉴定好的 pCAGGS-GFP/A20 质粒菌保接种于 100 mL 氨苄青霉素抗性的 LB 培养基中过夜培养后,使用 QIAGEN 公司的 Endo-Free Plasmid Maxi kit 进行无内毒素质粒的提取,溶于试剂盒中的 TE 缓冲液,并使用 EcoR (H/Sma)iv 进行双酶切鉴定,酶切产物 1%琼脂糖凝胶电泳。将质粒 DNA 提取物按适当比例稀释,置核酸浓度测定仪内,测定 DNA 浓度,并用真空浓缩机将质粒浓度调整至 1 g/L。

1.5 灌注液配制

对照组: Lipofectamine 2000 Reagent 40 μ L+ TE 20 μ L; 治疗组: Lipofectamine 2000 Reagent 40 μ L + pCAGGS-GFP/A20 质粒 20 μ L(含质粒 20 μ g),按 Lipofectamine 2000 Reagent 说明书配制,室温下静置 30 min 以上即可使用。

1.6 大鼠颈动脉球囊损伤模型的建立及 A20 基因转染^[7,8]

健康雄性 SD 大鼠,体重 350~400 g。10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉后将大鼠仰卧固定,颈部剃毛,常规消毒,取颈正中切口,切开皮肤,分离皮下组织;寻找左颈总动脉和颈外、颈内动脉分叉处,将颈外动脉向远端分离 1 cm 左右。为了预防术中术后急性血栓形成,在球囊损伤前 5 min 由睾丸静脉注入肝素钠(200 IU/kg)^[9]。用显微血管夹夹闭左颈总动脉近心端及颈内动脉,结扎颈外动脉远端,暂时阻断血流;在颈外动脉斜剪一小口,将 2F Fogarty 球囊导管从切口插入至左颈总动脉近心端约 2.0 cm,用 50 μ L 生理盐水充盈球囊,直径扩大至动脉外

径的 2 倍, 来回抽动 3 次以剥脱内膜。退出球囊, 用灌注管向损伤节段内缓慢注入灌注液。局部作用 30 min 后, 结扎颈外动脉, 恢复颈总和颈内动脉血流, 适量庆大霉素局部喷洒手术野, 缝合颈部切口, 碘伏涂擦创口及周围皮肤。将大鼠送回饲养笼饲养。喂食标准饲料, 自由饮水。以上操作由固定的 2 人完成。

1.7 质粒在损伤动脉壁转染效率的测定

转染治疗 24 h 后处死各组大鼠 2 只, 迅速取下球囊损伤及对侧未损伤颈动脉标本, 用肝素生理盐水轻柔冲洗管腔, 随即用冷冻包埋剂包埋, -20°C 冷冻 30 min, 其后于冰冻切片机上取 5 μm 厚度切片。不固定, 不染色, 于荧光显微镜下观察双侧颈动脉绿色荧光蛋白表达, 籍以评估 A20 重组质粒在损伤动脉壁的转染情况。

1.8 内膜增生的形态学分析

在球囊损伤术后 14 d, 分别取各组大鼠各 6 只, 10% 水合氯醛过量麻醉大鼠, 4% 多聚甲醛原位灌注固定, 40 min 后切取颈总动脉损伤处中段约 2 cm, 置于 4% 多聚甲醛保存。常规固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光学显微镜观察, 将图像摄入计算机图像分析系统中, 进行图像编辑, 准确勾出外弹力膜、内弹力膜以及管腔的轮廓, 分别测量血管内膜和中膜横断面的面积, 计算内膜/中膜面积比 (Intimal/Media, I/M)。每只动物随机选取 5 张切面进行图像分析, 取平均值。

1.9 血管平滑肌细胞的体内增殖指数测定

通过胸腺嘧啶类似物 BrdU 标记技术评估 VSMC 增殖情况。分别取各组大鼠各 6 只, 大鼠被处死前 24 h 腹腔内注射 BrdU (100 mg/kg)^[10]。球囊损伤术后第 10 天过量 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 4% 多聚甲醛原位灌注固定后切取颈总动脉, 常规固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 参照文献[11]的方法进行 BrdU 免疫组织化学染色。主要步骤为: 3% H_2O_2 室温 30 min; 50% 甲醛胺/2 $\times$ SSC, 62°C 温箱 5 h; 2 mol/L HCl 37°C 1 h; 1% BSA (含 0.3% Triton X-100 的 0.01 mol/L PBS 配制), 37°C 30 min; 鼠抗 BrdU 单克隆抗体 (1:100) 室温 2 h 后置 4°C 冰箱过夜; 生物素标记的羊抗小鼠 IgG (1:200) 室温 2 h; HRP 标记的卵白素 (1:200) 室温 2 h; DAB 室温显色约 5 min; 各步骤间用 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。常规脱水, 透明, 封片。阴性对照除用 1% BSA 代替一抗外, 其余步骤相同。在光学显微镜下计数中膜和新生内膜 BrdU 阳性细胞核, 细胞核内棕褐色颗粒为阳性。BrdU 指数通过下面公式计算: DAB 染色的阳性细胞核

/苏木素染色的总细胞核。

1.10 免疫组织化学检测血管壁核因子 KB 和平滑肌肌动蛋白 αactin 的表达

球囊损伤术后第 10 天过量 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 4% 多聚甲醛原位灌注固定后切取颈总动脉, 常规固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片厚度为 5 μm , 进行免疫组织化学染色。各组石蜡切片脱蜡至水, 3% H_2O_2 室温孵育 15 min; 0.1% 胰酶 37°C 30 min 修复抗原; 动物血清封闭, 室温孵育 15 min, 倾去勿洗; 滴加核因子 KB p65 一抗 (1:250) 或 αSMA 一抗 (1:100), 37°C 孵育 80 min 或 4°C 过夜; 滴加生物素标记的二抗, 室温 10 min; 滴加辣根过氧化物酶标记链酶卵白素, 室温孵育 10 min; 滴加 DAB 显色液约 3 min; 各步骤间用 0.01 mol/L 的 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。常规脱水, 透明, 封片。阴性对照除用 1% BSA 代替一抗外, 其余步骤相同。光镜初步观察后, 每张切片随机选取 3 个视野, 计算细胞核或细胞质染色阳性率, 取平均数。

1.11 Western blotting 法检测血管组织中核因子 KB p65 的表达

于术后第 3、7、14 和 28 d 分别取各组大鼠 3 只采集颈动脉标本, 按照凯基核蛋白和胞质蛋白提取试剂盒说明书分别提取胞质蛋白和核蛋白, 按照 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定所提蛋白的浓度。标本储于 -70°C 保存备用。蛋白定量, 上样, 电泳, 转膜, 5% BSA 封闭 4°C 16 h, 封闭后加核因子 KB p65 一抗 (1:500), 均为兔抗多克隆抗体, 37°C 孵育 1 h, TTBS 洗, 滴加 1:1000 稀释的辣根酶标记山羊抗兔 IgG, 37°C 孵育 1 h, TTBS 洗, DAB 显色, 观察有清晰的特异条带出现时, 用大量的清水冲洗 NC 膜以终止显色反应。扫描, 凝胶成像分析系统测定各条带的积分光密度值。

1.12 统计学分析

所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间和组内比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 在体转染效果观察

治疗组大鼠转染 A20 基因 24 h 后, 取损伤局部血管的冰冻切片置于荧光显微镜下, 用 470~490 nm 光激发可见治疗组残存血管内膜及中膜有大量绿色荧光分布, 对照组、模型组及假手术组未见绿色荧光分布, 证明质粒转染入血管壁细胞内并表达 (图 1)。

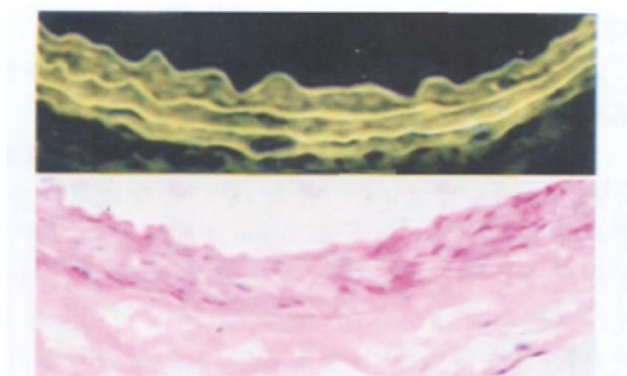


图1. 荧光显微镜和光学显微镜分别观察治疗组冰冻切片 ($\times 400$) 上图为 A20 转染治疗后 24 h 可见残存内膜及中膜有大量绿色荧光分布; 下图为与 A 同一血管组织相邻切片的 HE 染色, 证明荧光主要分布在血管平滑肌层。

2.2 病理形态学分析

光镜下, 假手术组大鼠颈动脉内膜仅见单层内皮细胞, 内弹力膜完整(图 2A)。模型组球囊损伤术后 14 d, 颈动脉新生内膜呈均一或不均一增厚, 管腔呈向心性或偏心性狭窄, 内膜增生明显, 已形成损伤后再狭窄动物模型(图 2B)。对照组与同一时间点模型组相比, 内膜增生情况差异无显著性(图 2C)。治疗组与同一时间点模型组和对照组相比, 内膜增生明显减轻, 差异有显著性($P < 0.01$, 图 2D, 表 1)。

表 1. 术后 14 d 形态学分析($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	内膜面积(mm^2)	中膜面积(mm^2)	内/中膜面积比
对照组	0.134 ± 0.019^a	0.127 ± 0.010	1.05 ± 0.037
模型组	0.120 ± 0.013	0.110 ± 0.008	1.10 ± 0.045
治疗组	0.07 ± 0.009^{bc}	0.115 ± 0.012	0.6 ± 0.032^{bc}

a 为 $P > 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较; c 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 血管平滑肌细胞的体内增殖指数测定

各组阳性细胞率如表 2 所示。BrdU 染色阳性细胞呈棕黄色颗粒, 位于细胞核内, 模型组 BrdU 阳性细胞率为 $25.8\% \pm 4.7\%$, 对照组阳性细胞率为 $26.7\% \pm 5.1\%$, 两者之间差异无显著性($P > 0.05$); 治疗组阳性细胞率为 $9.6\% \pm 2.3\%$, 较对照组显著减少($P < 0.01$)。假手术组 10 d 无新内膜形成, 只在中膜偶见阳性染色细胞。 αSMA 免疫组织化学染色表明新内膜中增生的细胞主要为平滑肌细胞, 阳性颗粒为棕黄色, 位于细胞质内(图 3)。

2.4 血管壁细胞核因子 κB p65 的定位表达

核因子 κB p65 正常情况下呈棕黄色颗粒, 胞核几乎无染色; 活化后进入核内, 表现为核染色。假手术组几乎没有核易位(图 4A); 球囊损伤术后 10 天对照组可见血管壁新生内膜细胞较多棕黄色细胞核 ($15.6\% \pm 1.1\%$, 图 4B); 治疗组细胞核阳性率为 $6.8\% \pm 0.5\%$ (图 4C), 明显低于对照组($P < 0.01$)。

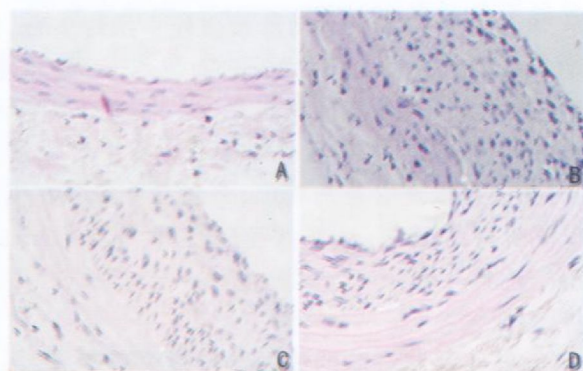


图 2. 球囊损伤术后 14 天各组大鼠典型的 HE 染色结果($\times 200$) A 为假手术组, B 为模型组, C 为对照组, D 为治疗组。白色箭头指示内弹力膜。

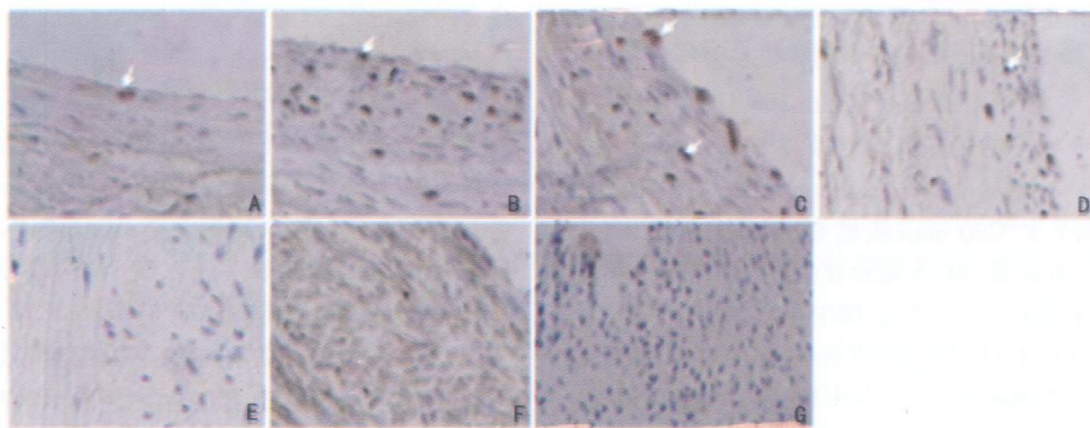


图 3. 球囊损伤术后 10 天各组大鼠溴脱氧尿嘧啶核苷免疫组织化学染色结果($\times 200$) A 为假手术组, B 为模型组, C 为对照组, D 为治疗组, E 为 BrdU 抗体阴性对照组, F 为 αSMA 免疫组织化学染色, G 为 αSMA 抗体阴性对照组。白色箭头所指为 BrdU 染色阳性细胞。

表 2. 颈动脉血管中膜和内膜平滑肌细胞溴脱氧尿嘧啶核苷标记率(%)

分 组	新生内膜	中膜	新生内膜+ 中膜
对照组	30.1% ±8.3%	13.9% ±3.6%	26.7% ±5.1%
模型组	28.5% ±6.4%	12.2% ±2.3%	25.8% ±4.7%
治疗组	15.9% ±3.1% ^a	3.3% ±0.8% ^a	9.6% ±2.3% ^a

a 为 $P < 0.01$, 与模型组及对照组比较。

2.5 血管组织中核因子 κB p65 蛋白表达的变化

假手术组核因子 κB p65 在各时相点有微弱的蛋白条带; 模型组和对照组均显示球囊损伤后 3 d 蛋白条带增强, 第 7 天时最强, 第 14 天减弱, 与假手术组比较差异有显著性 ($P < 0.01$); 治疗组核因子 κB p65 在各时相点均比对照组微弱, 第 3 天差异无显著性, 第 7 天以后差异有显著性 ($P < 0.05$, 表 3, 图 5)。

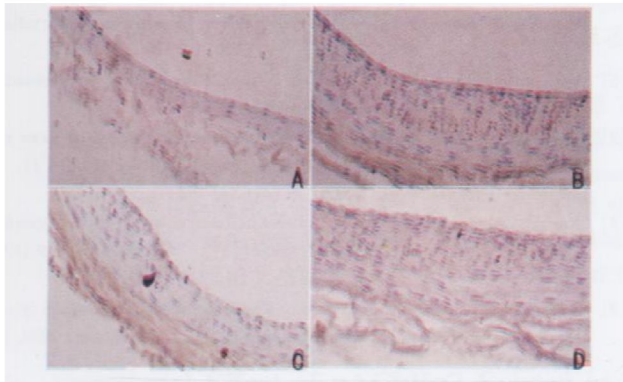


图 4. 核因子 κB p65 在血管壁细胞的表达 A 为假手术组, B 为对照组, C 为治疗组, D 为核因子 κB p65 抗体阴性对照组。白色箭头指示内弹力膜。

表 3. 各组血管组织 核因子 κB p65 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

分 组	3 d	7 d	14 d	28 d
假手术组	32.13 ±4.56	29.32 ±1.07	4.17 ±2.89	3.24 ±0.58
模型组	128.35 ±7.28 ^a	148.37 ±5.32 ^a	125.31 ±6.15 ^a	94.29 ±5.73 ^a
对照组	130.47 ±8.39 ^a	157.12 ±6.95 ^a	128.54 ±5.69 ^a	95.37 ±8.07 ^a
治疗组	125.16 ±7.52 ^a	123.25 ±7.80 ^{ab}	117.36 ±8.72 ^{ab}	78.13 ±5.91 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$, 与假手术组比较, b 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

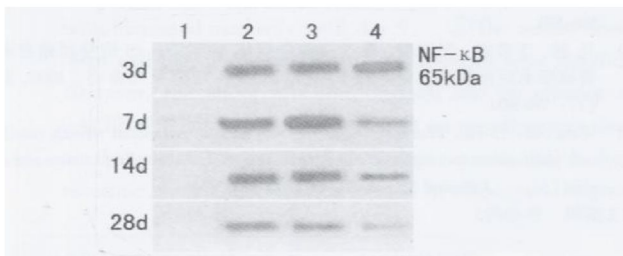


图 5. Western blot 法检测各组血管组织中核因子 κB p65 的蛋白表达 1 为假手术组, 2 为模型组, 3 为对照组, 4 为治疗组。

3 讨论

近年来, 炎症反应在再狭窄形成过程中的作用及其分子生物学机制日益引起人们的关注。A20 是新近人们发现的参与体内炎症反应调控的内源性蛋白。对 A20 的序列分析揭示了其具有两种明显的结构区: N 端半区(残基 1-386), 又称“N 区”; C 端半区(残基 387-790), 又称“锌区”。锌区包含了 7 种锌指结构, 该区在对多种刺激的反应中显示出了对核因子 κB 的抑制活性。

为了明确能否通过调控 A20 在体内的外源性表达来调节损伤修复过程中的炎症反应, 本实验观察了锌指蛋白 A20 重组质粒在体内的转染情况。荧光显微镜观察结果显示治疗组大鼠局部活体转染 A20 基因 24h 后, 可见残存血管内膜及中膜有大量绿色荧光分布, 而对照组、模型组及假手术组未见有绿色荧光分布, 证明质粒转染入血管壁细胞内并表达。核因子 κB 作为一种重要的转录因子, 参与调控脂多糖信号转导, 脂多糖通过 Toll 样受体跨膜信号途径激活核因子 κB 参与并加剧球囊损伤再狭窄的病理机制, 故核因子 κB 在血管修复过程中可能起到始动环节的作用^[12, 13]。其体内活化过程调控的负反馈途径如下: 细胞内核因子 κB 活化后, 在启动炎症介质基因转录的同时, 抑制蛋白如 $I\kappa B\alpha$ 、A20 以及 P105 基因等抑制其活化的基因的转录亦被上调, 这些基因的启动子均含有核因子 κB 反应元件^[14], 在 A20 等泛素调节酶的作用下泛素调节参与了核因子 κB 前体的处理、核因子 κB 抑制性结合蛋白 $I\kappa B$ 的降解和 $I\kappa B$ 激酶 IKK 的活化等主要环节^[3, 4], 反馈抑制了核因子 κB 的活化。这将有助于将核因子 κB 限制在细胞浆, 下调细胞核中核因子 κB 的活性, 从而终止炎症介质的生成。最近, Patel VI 等^[4]也证实 A20 可在平滑肌细胞由炎症刺激诱导并通过阻断核因子 κB 和核因子 κB 依赖的蛋白 ICAM-1 和 MCP-1 而发挥抗炎作用。另外, O'Reilly SM 等^[15]也报道, A20 对炎症反应信号通路的调节还体现在对效应细胞膜受体 TLR4 表达的抑制上。本实验室前期实验^[16]及本实验也证实球囊损伤后核因子 κB 的表达随时间的延长增加, 提示球囊损伤后炎症细胞活化释放的一系列炎症介质可能通过激活血管壁平滑肌细胞膜受体 TLR4, 进而启动了 TLR4/核因子 κB 胞内信号转导途径, 使 VSMC 由收缩型转变为合成型, 合成和分泌多种细胞外基质、血管活性物质和生长因子, 并在生长因子的刺激下迁移、分裂和增殖, 参与血管壁修复和新生内膜的形成。本实验通过病理学

观察球囊损伤后 14 d 的内膜增生情况以及局部转染 A20 基因对内膜增生的影响,显示经 A20 转染治疗后内膜增生明显减轻,增生内膜面积和内/中膜面积比值均与对照组比较有显著性差异;采用 BrdU 标记技术评估球囊损伤后 10 d VSMC 的增殖情况,显示经 A20 转染治疗后增殖指数明显降低,两者对照组阳性细胞率为 $26.7\% \pm 5.1\%$,治疗组为 $9.6\% \pm 2.3\%$ 差异有显著性。

血管组织内 NF- κ Bp65 的免疫组织化学结果显示假手术组几乎没有核易位,球囊损伤术后 10 d 治疗组阳性细胞率明显多于对照组($6.8\% \pm 0.5\%$ 比 $15.6\% \pm 1.1\%$, $P < 0.01$);组织内核因子 κ Bp65 蛋白的表达结果发现经 A20 转染治疗后,在术后 7 d、14 d 和 28 d 核因子 κ B p65 的蛋白表达量显著低于对照组。以上研究结果说明球囊损伤在激活细胞核因子 κ B 信号转导途径的同时,组织内高表达的锌指蛋白 A20 可能通过泛素调节作用抑制了核因子 κ B 的活化,阻止其核易位,从而终止炎症介质的生成。血管壁细胞经转染 A20 基因后,使 A20 在损伤局部细胞内高表达,加强了对核因子 κ B 的负反馈抑制,核因子 κ B 的表达减少,炎症介质分泌减少,进一步使细胞膜受体 TLR4 激活减少,由炎症反应引起的 VSMC 的迁移、分裂和增殖减轻,内膜增生减轻。

最近,Wang AB 等^[17]报道重组腺病毒介导的人 A20 基因体内转染至大鼠球囊损伤的颈动脉局部可显著抑制内膜增生和平滑肌细胞增殖,体外实验显示 A20 显著抑制肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 诱导的大鼠血管平滑肌细胞的增殖和迁移,其机制是 A20 表达阻断了动脉损伤和 TNF- α 激活的体内和体外的 PI3K/Akt/GSK3 β /CREB 信号途径。这些实验结果均与本研究相符,说明应用 A20 基因进行体内转染上调 A20 的表达是一个抑制平滑肌细胞增殖的有效方法,但 A20 可能从多个信号途径抑制平滑肌细胞的增殖,其机制有待于进一步探讨。

球囊损伤后再狭窄早期,锌指蛋白 A20 作为体内重要的内源性抗炎蛋白质,其可能通过对核因子 κ B 信号途径的负反馈作用,减少炎症介质的生成,从而减轻了炎症反应介导的平滑肌细胞的迁移、分裂和增殖,使内膜增生减轻。充分说明锌指蛋白 A20 能有效地抑制球囊损伤引起的再狭窄,具有良

好的抗炎效应。但锌指蛋白 A20 在球囊损伤激活的炎症跨膜信号转导途径中和其他有关的核转录因子的相互关系如何,以及在复杂的炎症细胞因子网络中,锌指蛋白 A20 与其他细胞因子间的相互作用机制在其对损伤致炎信号的负反馈调控中的作用等方面还有必要做进一步研究和探讨。

[参考文献]

- [1] Cannon CP, Bhatt DL. Clinical trials update from the annual scientific session of the American College of Cardiology 2006 [J]. *Am J Cardiol*, 2006, **98** (12A): 36Q-41Q.
- [2] Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (11): 1769-776.
- [3] Boone DL, Turer EE, Lee EG, et al. The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses [J]. *Nature*, 2004, **5** (10): 1052-060.
- [4] Patel VI, Daniel S, Longo CR, et al. A20, a modulator of smooth muscle cell proliferation and apoptosis, prevents and induces regression of neointimal hyperplasia [J]. *FASEB J*, 2006, **20** (9): 1418-430.
- [5] Ohtani K, Egashira K, Nakano K, et al. Stent-based local delivery of nuclear factor- κ B decoy attenuates in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits [J]. *Circulation*, 2006, **114** (25): 2773-779.
- [6] Heynink K, Beyaert R. A20 inhibits NF- κ B activation by dual ubiquitin-editing functions [J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, **30** (1): 1-4.
- [7] Park KW, Kim DH, You HJ, et al. Activated forkhead transcription factor inhibits neointimal hyperplasia after angioplasty through induction of p27 [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (4): 742-747.
- [8] Ramirez Correa GA, Zaccagna S. Potent inhibition of arterial intimal hyperplasia by TIMP1 gene transfer using AAV vectors [J]. *Mol Ther*, 2004, **9** (6): 876-884.
- [9] Zoldhelyi P, McNatt J, Xu XM, et al. Prevention of arterial thrombosis by adenovirus-mediated transfer of cyclooxygenase gene [J]. *Circulation*, 1996, **93** (1): 10-17.
- [10] Gennaro G, Menard C, Giasson E, et al. Role of p44/p42 MAP kinase in the age-dependent increase in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, **23** (2): 204-210.
- [11] Okano HJ, Pfaff DW, Gibbs RB. Expression of EGFR α , p75NGFR α , and PSTAIR (cdc2)-like immunoreactivity by proliferating cells in the adult rat hippocampal formation and forebrain [J]. *Dev Neurosci*, 1996, **18** (3): 199-209.
- [12] Vink A, Schoneveld AH, van der Meer JJ, et al. In vivo evidence for a role of toll-like receptor 4 in the development of intimal lesions [J]. *Circulation*, 2002, **106** (15): 1985-990.
- [13] 胡榕, 吴可贵. 核因子 κ B 在心血管疾病中的作用的研究现状 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (5): 604-606.
- [14] Yamazaki S, Muta T, Takeshige K. A novel IkappaB protein, IkappaB-zeta, induced by proinflammatory stimuli, negatively regulates nuclear factor- κ B in the nuclei [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276** (29): 27657-662.
- [15] O'Reilly SM, Moynagh PN. Regulation of Toll-like receptor 4 signalling by A20 zinc finger protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **303** (2): 586-593.
- [16] 马林, 丁彦春, 崔晓琼, 等. Toll 样受体 4 核因子 κ B 信号通路在血管成形术后再狭窄过程中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (7): 596-600.
- [17] Wang AB, Li HL, Zhang R, et al. A20 attenuates vascular smooth muscle cell proliferation and migration through blocking PI3K/Akt signaling in vitro and in vivo [J]. *J Biomed Sci*, 2007, **14** (3): 357-371.

(此文编辑 李小玲)