

[文章编号] 1007-3949(2008)16-06-0461-04

•实验研究•

## 动脉粥样硬化大鼠动脉组织中组织蛋白酶 D 的表达

张志钢<sup>1,4</sup>, 张晓兰<sup>2</sup>, 舒青<sup>3</sup>, 郑强荪<sup>1</sup>

(1. 第四军医大学唐都医院心血管内科, 陕西省西安市 710038; 2. 南京军区福州总医院消化内科, 福建省福州市 350025; 3. 第四军医大学基础部遗传与发育教研室, 陕西省西安市 710032; 4. 南京军区福州总医院心血管内科, 福建省福州市 350025)

[关键词] 内科学; 动脉粥样硬化模型, 大鼠; 组织蛋白酶 D; 基因芯片; 免疫荧光; 免疫印迹

[摘要] 目的 用基因芯片技术研究动脉粥样硬化大鼠动脉组织中差异表达的基因, 以分析组织蛋白酶 D 基因表达变化。方法 以高脂饲料喂养加维生素 D3 腹腔注射建立大鼠动脉粥样硬化模型, 测定血清总胆固醇及甘油三酯; 病理学观察 HE 及油红 O 染色的冠状动脉及主动脉; 提取主动脉 RNA 作基因芯片检查, 用免疫荧光及免疫印迹法检测组织蛋白酶 D 在动脉中表达的分布情况及表达水平。结果 14 周时模型组总胆固醇和甘油三酯较对照组明显升高 ( $P$  均  $< 0.01$ ); 病理学观察发现模型组形成纤维增生性动脉粥样硬化病变; 基因芯片结果显示与对照组比较, 模型组组织蛋白酶基因表达上调, 组织蛋白酶 D 表达上调,  $R$  值 (Cy3/Cy5) 为 2.14 ( $P < 0.01$ ); 免疫荧光检测发现模型组中组织蛋白酶 D 表达主要分布在动脉内膜、中膜; 免疫印迹法检测动脉中组织蛋白酶 D 蛋白显示模型组表达较对照组增加 ( $P < 0.05$ )。结论 组织蛋白酶及其内源性抑制剂的失衡可能是导致动脉粥样硬化的因素之一, 组织蛋白酶 D 可能参与了血管重塑及细胞凋亡从而促进动脉粥样硬化的发展。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Expression of Cathepsin D in Aorta Tissue from Rats with Atherosclerosis

ZHANG Zhi-Gang<sup>1,4</sup>, ZHANG Xiao-Lan<sup>2</sup>, SHU Qing<sup>3</sup>, and ZHENG Qiang-Sun<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Tangdu Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710038, China; 2. Department of Gastroenterology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian 350025, China; 3. Department of Medical Genetics and Developmental Biology, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China; 4. Department of Cardiology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian 350025, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis Model; Rat; Cathepsin D; Microarray; Immunofluorescence; Western blot

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the potential candidate genes related to extracellular matrix (ECM) which might play roles in atherosclerosis by microarray technology. **Methods** Sixteen male SD rats were randomly subjected to the following treatments: standard diet with saline injection i. p. (control group,  $n = 8$ ) or fat diet with vitamin D3 injection i. p. (containing 3% cholesterol, 0.5% sodium cholate, 5% refined sugar, 10% lard, and 81.5% base feed) (model group,  $n = 8$ ). After 14 w, serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were detected. Thoracic aorta was stained with HE and a solution of oil red O to visualize the lesion area. Total RNA was isolated from the aorta for microarray to explore the differential gene expression profiling. Cathepsin D expression was measured by immunofluorescence and western blot. **Results** Compared with the control group, model group showed elevated serum TC and TG (both  $P < 0.05$ ) and aortic fibrous plaque formation. 510 genes were up-regulated and 1 218 ones were down-regulated in aorta tissue of model group by DNA microarray analysis when compared with control group. Further immunohistochemistry and western blot analysis revealed cathepsin D protein expression was significantly increased in aorta of model group whereas normal group showed little or no immunodetectable cathepsin D expression.

**Conclusion** Cathepsin D might influence vascular remodeling, which plays an important role in As.

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是威胁人类健康的主要疾病之一, 其发病机制尚不十分明确。细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 与 As 的发生、发展关系密切<sup>[1]</sup>。近年研究发现组织蛋白酶参与了

As 的发展<sup>[2]</sup>。本实验用基因芯片技术研究 As 大鼠与正常大鼠动脉组织差异性表达基因, 旨在探讨 As 可能的发病机制。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物

雄性清洁级 SD 大鼠, 体重 230~250 g, 由第四军医大学动物中心提供。在标准环境下经适应性喂养 2 周后随机分为模型组和对照组, 每组 8 只。

[收稿日期] 2008-03-13 [修回日期] 2008-05-20

[作者简介] 张志钢, 硕士, 医师, 主要从事动脉粥样硬化的研究, 联系电话为 029-82502134, E-mail 为 zhangzg-fj@yahoo.cn。张晓兰, 硕士, 医师, 主要从事脂质代谢紊乱相关疾病研究, E-mail 为 zhangxl-fj@yahoo.cn。通讯作者郑强荪, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 主要从事心律失常及动脉粥样硬化研究, 联系电话为 029-8477742, E-mail 为 qingshu@fmmu.edu.cn。

## 1.2 主要试剂和仪器

分析纯胆固醇(上海康捷生物科技有限公司),胆盐(北京奥博星生物技术公司),维生素 D3(上海第六制药厂),兔抗蛋白酶 D(cathepsin D, CTSD) 抗体(Santa Cruz); Texas 红标记的鼠抗兔抗体(Molecular Probes),羊抗兔抗体(中衫生物技术公司),DAPI 染色液(sigma),油红 O(sigma),基因芯片(Rat Oligo Microarray G4130A) 购于 Agilent 公司。

## 1.3 动物模型建立

模型组大鼠以高脂饲料(含 3% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、5% 精制糖、10% 猪油、基础饲料 81.5%) 喂养,并在开始高脂饲料前 1 d 给予维生素 D3 腹腔注射( $6 \times 10^5$  u/kg 体重),此后每 30 d 重复一次给予维生素 D3 腹腔注射( $3 \times 10^5$  u/kg 体重),对照组给予基础饲料喂养及等剂量生理盐水腹腔注射<sup>[3]</sup>。

## 1.4 标本采集

14 周后各组动物禁食过夜,戊巴比妥钠腹腔麻醉,分离腹主动脉,在肾静脉分叉处下方,穿刺静脉采血,分离血清;剪下主动脉,以冰 PBS 冲洗,迅速剔除外周结缔组织。胸主动脉约 1 cm 用 4% 多聚甲醛固定,用于形态学检查,其余动脉组织投入液氮中 2 h 后移入 -80℃ 冰箱中保存,取下心脏在冠状沟下方和距心尖 0.5 cm 处横断,用 4% 多聚甲醛固定。

## 1.5 血脂检测

采用日立全自动生物化学分析仪 7600 检测大鼠血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)。

## 1.6 病理学观察

胸主动脉及心肌组织以 4% 多聚甲醛固定 12 h 后,移入 20% 蔗糖溶液脱水,恒冷箱切片机上连续切片,切片固定于载玻片上,以 HE 及改良的油红 O 染色<sup>[4]</sup>,光镜观察。

## 1.7 总 RNA 抽提及基因芯片检测动脉粥样硬化大鼠与正常大鼠动脉组织差异性表达基因

用 Trizol 提取主动脉组织总 RNA,取 1  $\mu$ g 总 RNA 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析。以样本提取的 RNA 作为模板,制备荧光标记的 cRNA 靶物(正常组和模型组分别以 Cy5 和 Cy3 标记),与基因芯片杂交,杂交后的芯片置于 Axon 4000B 型扫描仪中采用 Genepix 3.0 软件得到芯片杂交图谱。根据芯片名称,导入相应的 GAL(Genepix Array List) 文件,将阵列模板与芯片图谱中的阵列逐样点对应起来,抓取每个样点的原始荧光信号数据。抓取的数据用 spotfire 8.0 软件进行分析,对数据进行归一化。将归一化后的数据取对数,进行差异表达基因分析,将

R(Cy3 荧光信号强度/Cy5 荧光信号强度) 值按照差异等级分类,当  $R \geq 2$  时,表示基因上调; $R \leq 0.5$  时,表示基因下调;当  $0.5 < R < 2$  时,则认为基因无差异表达(由西北大学生物芯片研发中心完成)。

## 1.8 免疫荧光染色检测动脉组织组织蛋白酶 D 表达分布

冰冻切片,用 10 mmol/L PBS 漂洗  $3 \times 10$  min,滴加兔抗 CTSD (1:300, Santa Cruz) 4℃ 孵育 24 h,经荧光标记的二抗室温孵育 2 h(避光),以 4,6-联脒-2-苯基吲哚(DAPI) 染核 30 min,常规甘油与 PBS 的混合液封片。每步骤均用 10 mmol/L PBS 充分清洗,荧光显微镜下观察。用不加 CTSD 抗体孵育作为阴性对照。在同一视野下分别采集红色荧光及蓝色荧光图像,用 OLYMPUS-manager 系统合成图像。

## 1.9 免疫印迹法检测动脉组织组织蛋白酶 D 表达水平

取保存于 -80℃ 主动脉组织约 100 mg,加入裂解液,冰上匀浆,4℃ 离心收集上清,Lowry's 法定量蛋白。其余与 SDS 加样缓冲液混匀,100℃ 煮沸 5 min,保存于 -80℃。检测时聚丙烯酰胺凝胶(PAGE),调整样品蛋白浓度,用 12% 分离胶、5% 的积层胶和 Tris-甘氨酸电泳缓冲液进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分离蛋白,电压 120 V,1.5 h。用电转缓冲液将蛋白转至硝酸纤维素(NC)膜上,稳流 200 mA,90 min。封闭与杂交:将 NC 膜放入封闭液 TBS-T 中 37℃ 封闭 1 h。加入 1:200 稀释的 CTSD 一抗,4℃ 过夜;TBS-T 缓冲液洗涤,加入 1:1000 稀释的二抗,37℃ 孵育 1 h;滴加 1 mL 化学荧光发光剂,测定免疫印迹区带的光密度, Bio-RAD-Quantity 数据处理系统分析结果。actin 作为内参照。

## 1.10 统计学处理

所有数据均用均数  $\pm$  标准差表示,用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理,使用 t 检验进行两样本均数比较, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血脂水平

14 周时对照组 TC 为  $1.48 \pm 0.37$  mmol/L, TG 为  $0.30 \pm 0.07$  mmol/L; 模型组 TC 为  $8.77 \pm 1.52$  mmol/L, TG 为  $0.69 \pm 0.2$  mmol/L, 模型组 TC 及 TG 均显著增高,两组之间差异均有显著性( $P < 0.01$ )。

### 2.2 病理学观察

14 周时,光镜下 HE 染色显示模型组动脉内皮细胞排列紊乱,部分脱落,中膜平滑肌细胞增殖、断

裂, 纤维组织增生伴片状或点状钙化, 弹性纤维层结构不清, 形成纤维增生性动脉粥样硬化斑块。模型组大鼠冠状动脉内皮细胞排列紊乱, 内膜增厚, 中膜平滑肌细胞增殖、排列紊乱。油红 O 染色可见, 模型组主动脉和冠状动脉内皮下有橙红色脂质染色, 证明模型建立成功。对照组未见明显 As 病变(图 1)。

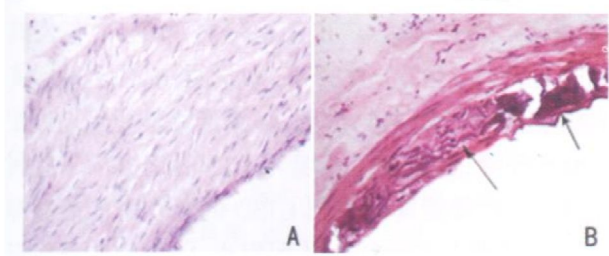


图 1. 大鼠主动脉显微镜图像(HE × 400) A 为对照组, B 为模型组。

### 2.3 基因芯片技术检测动脉粥样硬化大鼠与正常大鼠动脉组织差异表达基因

本实验采用 G4130A 芯片(共包括 22 575 个样点, 其中覆盖大鼠基因 20 500 个)检测了实验第 14 周时模型组与正常组动脉组织中差异表达基因。结果发现有 1 218 个基因下调, 510 个基因上调, 这些差异表达基因可能与炎症、脂代谢、氧化应激、细胞凋亡、血管重塑等相关(图 2)。模型组中 CTSD 基因表达上调, R 值为 2.14, CTSY、CTSL、CTSB 等溶酶体酶较正常组表达上调( $P < 0.01$ ), 而 Cystatin C 表达下调( $P < 0.01$ ), 表 1 列出了部分差异表达基因。

表 1. 部分与细胞外基质相关的差异表达基因

GenBank(编号)	表达蛋白	比率(Cy3/Cy5)
AA818798	Cathepsin Y	7.78
NM-013156	Cathepsin L	4.37
NM-134334	Cathepsin D	2.14
NM-022597	Cathepsin B	2.02
NM-012980	MMP-11	2.31
BQ200408	Cystatin C	0.41

### 2.4 免疫荧光染色检测动脉组织组织蛋白酶 D 表达分布

在激发状态, Texas 红标记 CTSD 发出红色荧光, DAPI 染色的细胞核发出蓝色荧光。在 As 组大鼠动脉可见红色荧光表达增加, 主要分布在内膜、中膜, 在增厚的中膜中 CTSD 表达增高更明显, 并且在蓝色荧光较稀疏的 ECM 中聚集增加。而在对照组表

达较少(图 3)

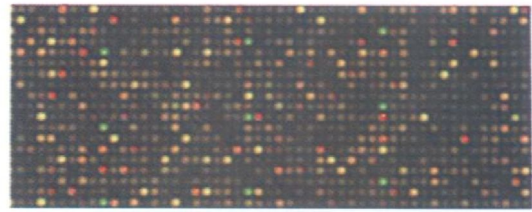


图 2. 模型组与对照组的 cRNA 样本杂交图谱(对照组和模型组分别为 Cy5 和 Cy3 标记)

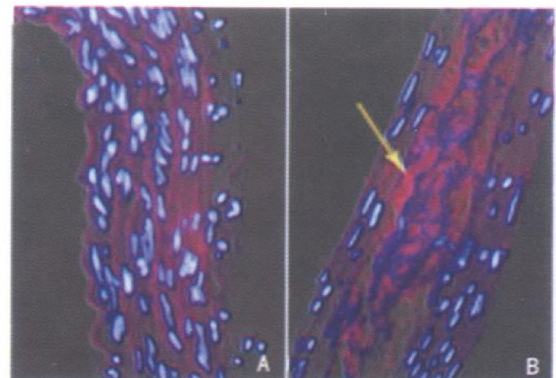


图 3. 组织蛋白酶 D 在动脉组织中的表达(免疫荧光 × 400) A 为对照组, B 为模型组。

### 2.5 免疫印迹法检测动脉组织组织蛋白酶 D 表达水平

模型组与对照组进行比较, CTSD 表达增加, 两组间差异有统计学意义( $CTSD/actin = 0.75 \pm 0.07$  与  $0.56 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ )。(图 4)

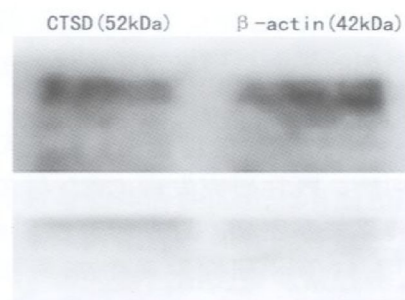


图 4. Western blot 检测动脉组织组织蛋白酶 D 表达水平 上图为对照组, 下图为模型组。

## 3 讨论

本实验使用维生素 D3 及高脂饲料的方法成功复制了大鼠 As 模型。由于大鼠没有胆囊因此在高脂饲料中加入胆盐促进胆固醇吸收。研究发现人类动脉硬化的血管壁中含有大量的钙, 其含量与冠心病的病变程度呈正相关。大剂量的维生素 D 可使

动脉发生钙化<sup>[5]</sup>,许多研究以大剂量维生素 D3 作为诱导剂建立动物模型。Bennani 使用维生素 D 和高脂食饵结合的方法复制 As 模型<sup>[6]</sup>,他们认为维生素 D 导致血钙升高,可促使钙在主动脉中膜沉积,使平滑肌细胞变性或钙化。As 的发病与血管重塑在病程中平行发展。Kiechl 等<sup>[7]</sup>观察到 As 患者 5 年病程中,急性事件的发生与管腔狭窄程度关系密切,这种现象是血管重塑的结果。ECM 代谢是影响血管重塑的重要因素,ECM 代谢有赖于细胞外蛋白酶。细胞外蛋白酶系是多源性酶的超家族,包括基质金属蛋白酶(MMP)族、半胱氨酸蛋白酶族(主要是 CTS)、天冬氨酸蛋白酶等<sup>[8]</sup>。新近研究发现 CTS 可能参与了 As 的发展,在 ox-LDL 及炎症因子调节下巨噬细胞、内皮细胞对 CTS 表达及分泌增加<sup>[9]</sup>。通过 CTSS<sup>-/-</sup> 并 LDL 受体缺陷鼠的资料证实,CTSS 参与早期白细胞游走、弹性层粘蛋白降解、内皮细胞迁移等过程;与仅有 LDL 受体缺陷鼠相比,斑块明显减小,发展亦显著减慢<sup>[10]</sup>。而在 As 患者斑块中 CTSL、CTSS 及 CTSK 表达上调,集中在纤维帽,血管中膜,富含巨噬细胞的肩部<sup>[11]</sup>。本实验利用高脂加维生素 D3 建立大鼠 As 模型,14 周时模型组大鼠动脉组织的病理学观察证实形成了纤维增生性的 As 病变。采用基因芯片技术研究 As 大鼠动脉组织 mRNA 的表达变化,发现与 ECM 降解有关的一些蛋白酶表达明显增加,这些酶包括 CTSD, CTSL, CTSB, CTSY, MMP-11 等。而模型组 cystatin C 较正常组降低, cystatin C 是内源性 CTS 的抑制剂,有研究发现它参与斑块消退相关的基质重塑<sup>[12]</sup>,对稳定斑块起重要作用。据此我们推测在 As 发病过程中组织蛋白酶及其内源性抑制剂的平衡是形成动脉硬化的重要因素之一。

CTSD 是一种 52 kDa 的糖蛋白,属于天冬氨酸蛋白酶的內切酶。既往研究发现 CTSD 与多种恶性肿瘤浸润及转移关系密切。近期研究发现 CTSD 在 As 中发挥作用, Li 等<sup>[13]</sup>研究发现在 7 $\beta$ -羟基胆固醇及 Ox-LDL 诱导巨噬细胞成为泡沫细胞而后发生调亡的过程中, Ox-LDL 及氧化固醇不仅使溶酶体膜不稳定,而且上调了 CTSD、CTSL、CTSB 的表达,使它们进入胞浆及胞核参与了泡沫细胞的调亡及基质降解使斑块不稳定。Haendeler 等<sup>[14]</sup>发现 CTSD 降解内皮细胞中具有抗调亡及清除活性氧作用的硫氧还蛋白促进内皮细胞调亡。本研究应用免疫荧光技术发现 CTSD 蛋白在正常大鼠血管壁组织中仅有少量表达

或不表达,而在 As 大鼠动脉表达增加,主要分布在 ECM,在内膜、中膜也有表达。Western-blot 检测发现, As 大鼠动脉组织中 CTSD 蛋白表达明显高于正常组。As 病程中,各种因素刺激 SMC、巨噬细胞、内皮细胞分泌大量细胞因子。在高脂及细胞因子的刺激下, CTSD 基因过度表达,导致其持续分泌,活性增强,一方面破坏 ECM 合成与降解的动态平衡,使平滑肌细胞迁移;另一方面使巨噬细胞转化为泡沫细胞,并参与泡沫细胞、内皮细胞调亡,促进 As 的发展使病变趋于不稳定。另外在 As 病程中,由于动脉狭窄痉挛引起组织缺血、缺氧,代谢产物堆积使局部处于酸性环境,这种酸性环境为 CTS 活化提供了有利环境。由此推测具有抑制 CTSD 的药物可能能够抑制 ECM 降解及细胞调亡从而阻止 As 发展并且稳定斑块,为临床治疗 As 提供了新的思路。

#### [参考文献]

- [1] Shogo Katsuda, Toshiyuki Kaji. Atherosclerosis and extracellular matrix [J]. *J Arterioscler Thromb*, 2003, **10** (5): 267-274.
- [2] 秦彦文, 王绿妮. 组织蛋白酶与动脉粥样硬化斑块稳定性[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (12): 950-952.
- [3] 郭延松, 吴宗贵, 杨军柯, 等. 三种大鼠动脉粥样硬化模型复制方法的比较[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (5): 465-469.
- [4] 张顺民, 龚志锦, 陈伟红, 等. 实验动物整体血管和心脏冰冻切片的脂质染色法改进与应用[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2004, **13** (1): 127-128.
- [5] Price PA, Faus SA, Williamson MK. Warfarin-induced artery calcification is accelerated by growth and vitamin D [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (2): 317-327.
- [6] Bennani-Kabchi N, Kehel L, El Bouayadi F, et al. New model of atherosclerosis in insulin resistant sand rats: hypercholesterolemia combined with D2 vitamin [J]. *Atherosclerosis*, 2000, **150** (1): 55-61.
- [7] Kiechl S, Willeit J. The nature course of atherosclerosis part ② vascular remodeling. Bruneck Study Group [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19** (6): 1491-498.
- [8] Arturo Garcia, Touchard, Henry TD, et al. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, **25** (6): 1119-127.
- [9] Burns-Kurtis CL, Olzinski AR, Needle S, et al. Cathepsin S expression is up regulated following balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, **62** (3): 610-620.
- [10] Liu J, Sukhova GK, Sun JS, et al. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, **24** (8): 1359-366.
- [11] Jian Liu, Galina K. Sukhova, Jir-Tian Yang, et al. Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells [J]. *Atherosclerosis*, 2006, **184** (2): 302-311.
- [12] Bengtsson E, Fong To, Grubb A, et al. Absence of the protease inhibitor cystatin C in inflammatory cells results in larger plaque area in plaque regression of apoE-deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2005, **180** (1): 45-53.
- [13] Li W, Yuan XM. Increased expression and translocation of lysosomal cathepsins contribute to macrophage apoptosis in atherogenesis [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2004, **1030** (3): 427-433.
- [14] Haendeler J, Popp R, Goy C, et al. Cathepsin D and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate degradation of thioredoxin 1: implication for endothelial cell apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2005, **280** (52): 42945-951.

(此文编辑 李小玲)