

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2009)17-07-0528-03

## MG132对兔颈总动脉球囊损伤后狭窄部位泛素和 Caspase-3表达的影响

郭芳<sup>1</sup>, 孙文清<sup>1</sup>, 屈顺林<sup>1</sup>, 杨向东<sup>1,2</sup>

(南华大学 1. 病理生理学教研室; 2. 心血管病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 泛素-蛋白酶体途径; 蛋白酶体抑制剂; 再狭窄; Caspase-3

[摘要] 目的 采用球囊拉伤新西兰白兔颈总动脉, 复制出血管损伤后狭窄模型; 在损伤血管局部应用蛋白酶体抑制剂 MG132 观察蛋白酶体抑制剂 MG132 对球囊损伤后血管狭窄部位泛素和 Caspase-3 表达的影响。方法 将新西兰白兔 30 只随机分成对照组、球囊损伤组和 MG132 组, 喂养 8 周后取颈总动脉损伤段血管制成病理切片, 采用免疫组织化学法观察泛素蛋白和 Caspase-3 蛋白的变化。结果 免疫组织化学法检测到球囊损伤组颈总动脉管壁泛素蛋白表达加强; 而 MG132 组与球囊损伤组比泛素蛋白表达明显减少 ( $P < 0.01$ ), Caspase-3 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.01$ )。结论 局部应用蛋白酶体抑制剂 MG132 能抑制颈总动脉管壁泛素蛋白表达, 并增强 Caspase-3 蛋白表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of MG132 on Ubiquitin and Caspase-3 Expression in Balloon Injury Induced Stenotic Rabbit Carotid

GUO Fang<sup>1</sup>, SUN Wen-Qing<sup>1</sup>, OU Shun-Lin<sup>1</sup>, and YANG Xiang-Dong<sup>1,2</sup>

(1. Department of Pathophysiology, 2. Institute of Cardiovascular Disease, Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Ubiquitin-Proteasome Pathway; Proteasome Inhibitor; Restenosis; Caspase-3

[ABSTRACT] **Aim** Using a rabbit common carotid arteries balloon injury stenosis model to observe the influence of proteasome inhibitor MG132 on vascular stenosis and expression of ubiquitin and caspase-3. **Methods** 30 New Zealand white rabbits were randomly divided into control group, the balloon injury group and MG132 group. After the rabbits were fed respectively for 8 weeks, their common carotid arteries were made pathology section. Ubiquitin and caspase-3 protein expression were measured by immunohistochemistry. **Results** The expression of ubiquitin protein was remarkably inhibited ( $P < 0.01$ ) and caspase-3 was up-regulated ( $P < 0.01$ ) by MG132. **Conclusion** The inhibitory effect on vascular stenosis of proteasome inhibitor MG132 may associate with interdicting ubiquitin-proteasome pathway and up-regulating caspase-3 expression.

泛素-蛋白酶体途径 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 广泛参与多种生理过程如细胞周期调控、DNA 修复、细胞信号转导、细胞凋亡、蛋白的跨膜定位和细胞表面膜受体的内化等<sup>[1]</sup>。经皮冠状动脉腔内成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 是冠心病治疗学上的一个重大进展, 但 PTCA 术后 3~6 个月再狭窄 (restenosis) 率较高<sup>[2]</sup>, 严重影响治疗效果。我们的前期研究发现, 采用高脂饮食加颈总动脉内皮球囊损伤术构建血管内皮损伤后血管狭窄的家兔动物模型, 局部应用蛋

白酶体抑制剂 MG132 能够抑制血管内膜增生, 抑制损伤后血管狭窄<sup>[3]</sup>。文献报道 UPP 抑制剂可以促进平滑肌细胞凋亡, 调控 UPP 的表达可能是调控血管壁细胞凋亡的重要手段<sup>[4]</sup>。目前对 UPP 与再狭窄发生的关系尚处于探索阶段, 蛋白酶体抑制剂对 Caspase-3 表达的影响国内尚无报道。为此, 我们在前期研究的基础上进一步研究蛋白酶体抑制剂 MG132 对家兔球囊拉伤后颈总动脉管壁泛素蛋白和 Caspase-3 蛋白表达的影响, 初步探讨 UPP 在其中的作用。

[收稿日期] 2009-02-12 [修回日期] 2009-07-03

[基金项目] 湖南省科技厅基金 (06FJ3098) 和湖南省卫生厅基金 (C2006-024) 资助

[作者简介] 郭芳, 硕士, 讲师, E-mail 为 guofangh@163.com。通讯作者杨向东, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管疾病相关基因的克隆及功能研究, E-mail 为 XDY7@263.net

## 1 材料与方

### 1.1 主要材料

实验动物为体重 2.5 kg 左右的新西兰纯种大白兔, 由南华大学动物部提供。胆固醇 (华美医药

公司产品),猪油(市售),硫酸庆大霉素注射液(8万U,批号H41020366,河南天方药业股份有限公司),肝素钠注射液(12500U,批号030905,上海第一生化药业公司)和MG132(Sigma公司)。PTCA球囊扩张导管(美国USCI公司),手推式高压泵(美国NAMIC公司),光学显微镜(日本Olympus公司),手术显微镜(苏州医疗器械总厂),图像分析系统(武汉华海公司,HIPAS-1000型)和微量移液器(德国Eppendorf公司)。

## 1.2 实验分组

新西兰大白兔30只,随机分为对照组(10只)、球囊损伤组(10只)和MG132组(10只)。球囊拉伤颈总动脉,根据文献<sup>[4]</sup>采用局部注射的方法在颈总动脉导入蛋白酶体抑制剂MG132,注入150μL浓度为1mmol/L的MG132,持续5min,PBS冲洗2次。球囊损伤组及MG132组的新西兰大白兔在球囊内皮剥脱术的术前2周及术后8周均给予高脂饮食(1%胆固醇、10%猪油和89%基础饲料)。

## 1.3 家兔颈总动脉球囊损伤模型的建立

高脂饮食2周后,参照Clowes等<sup>[5]</sup>方法加以改良,行家兔颈总动脉球囊内皮剥脱术,逆行插入4FPTCA球囊导管(导管直径1.2mm,球囊膨胀直径2.0mm,球囊长度20mm)至颈总动脉段40mm处,球囊内充以0.5~0.7mL肝素生理盐水至3个大气压,牵拉旋转导管,回抽球囊内液体,使压力降为零后重新注入导管,并牵拉旋转导管,重复上述过程共3次,拔出球囊导管。于手术显微镜下缝合动脉切口,取下无创血管夹,可见颈总动脉有良好充盈。逐层缝合皮下组织及皮肤。术后切口局部给予硫酸庆大霉素16万U抗炎处理。

## 1.4 免疫组织化学染色检测颈总动脉壁的泛素蛋白和Caspase-3蛋白表达

术后8周末,各组动物均颈前正中切开皮肤,分离血管,取颈总动脉损伤段血管,迅速浸泡于10%中性福尔马林液中固定,常规酒精脱水,石蜡包埋,切片。按SABC试剂盒说明书做免疫组织化学染色检测颈总动脉壁泛素蛋白和Caspase-3蛋白的表达,细胞中呈现棕褐色颗粒者为阳性细胞。每组重复3次。采用IAS2000高清晰度彩色医学图文分析系统对染色强度进行定量分析。每组随机选取3只兔动脉行石蜡切片,每只兔选取3张非连续切片行免疫组织化学染色,每张切片于40倍物镜下随机抽测5个视野,每例标本共15个视野。测定目标平均灰度、标定空白处平均灰度和目标面积,计算目标平均光密度(mean optical density, MOD),  $MOD = \lg(\text{标$

定空白处平均灰度/目标平均灰度)。

## 1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS10.0软件分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐者用LSD检验,方差不齐者用Dunnett'T3检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 8周末颈总动脉泛素蛋白表达

泛素蛋白呈棕黄色颗粒积聚于胞浆(图1)。球囊损伤组血管内膜和靠近内膜的中膜中泛素蛋白表达明显高于对照组血管;MG132组泛素蛋白表达比球囊损伤组明显降低( $P < 0.01$ ,表1)。

### 2.2 8周末颈总动脉Caspase-3蛋白表达

Caspase-3蛋白积聚于胞浆(图1)。MG132组与球囊损伤组比较,Caspase-3蛋白表达明显升高( $P < 0.01$ ,表1)。

表1. 泛素蛋白和Caspase-3蛋白表达的光密度值( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	泛素蛋白	Caspase-3蛋白
对照组	23.5 ± 4.7	26.7 ± 3.4
球囊损伤组	58.1 ± 5.9 <sup>a</sup>	31.2 ± 9.7
MG132组	27.4 ± 3.1 <sup>b</sup>	75.8 ± 12.6 <sup>b</sup>

a为 $P < 0.01$ ,与对照组比较;b为 $P < 0.01$ ,与球囊损伤组比较。

## 3 讨论

真核生物中广泛存在着一种序列高度保守的76个氨基酸组成的小分子蛋白质,这种蛋白质称为泛素。泛素所涉及的作用路径称为泛素-蛋白酶体途径(UPP)。UPP主要由泛素(ubiquitin)、泛素活化酶(ubiquitin-activating enzyme, UbaE1)、泛素缀合酶(ubiquitin-conjugating enzyme, UbcE2)、泛素-蛋白连接酶(ubiquitin-protein ligase, UblE3)和26S蛋白酶体(26S proteasome)组成,是生物体内进行蛋白质选择性降解的重要途径之一。研究表明UPP在凋亡调节中也发挥重要作用。当异常蛋白质降解减少而在细胞内异常积聚时就可能启动凋亡信号,导致细胞凋亡。近年来,经皮冠状动脉腔内成形术、冠状动脉气囊成形术等血管手术的应用逐步推广。但是内膜增生导致术后再狭窄的存在,一直是困扰血管外科的难题,它使手术后远期通畅率难以提高。家兔高脂饮食结合动脉内皮剥脱术能造成与人类PTCA术后再狭窄病变相似的进展性病变,本实验采用家兔高脂饮食结合动脉内皮剥脱术的方法,复

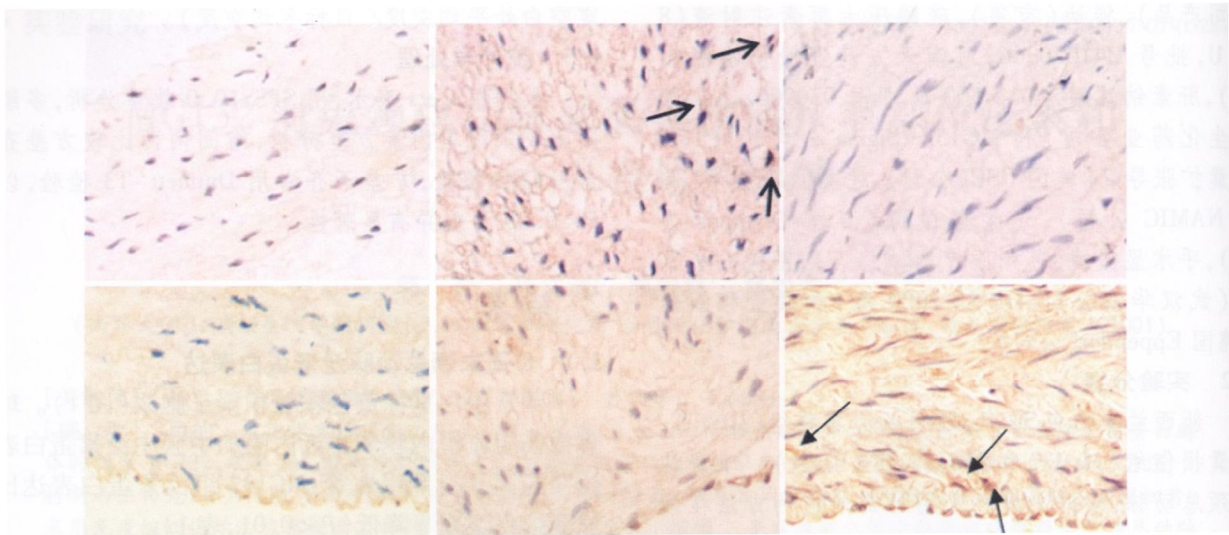


图 1 免疫组织化学法检测家兔颈总动脉泛素蛋白(上图)和 Caspase-3 蛋白(下图)的表达( $\times 40$ ) 左为对照组, 中为球囊损伤组, 右为 MG132 组。

制出比较满意的球囊损伤后血管狭窄模型。本实验复制的球囊损伤后血管狭窄动物模型, 其颈总动脉病变处管腔不规则, 内膜向心性肥厚, 管腔明显狭窄, 甚至完全闭塞, 平滑肌细胞自内膜下迁移并大量增殖<sup>[3]</sup>。我们在球囊拉伤家兔颈总动脉内膜的基础上, 局部应用蛋白酶体抑制剂 MG132 后, 病变在 8 周末较球囊损伤组明显减轻, 这说明 MG132 具有抗家兔颈总动脉球囊损伤后血管狭窄的作用。有研究表明, 动脉平滑肌细胞过度增殖是决定再狭窄的重要因素<sup>[6]</sup>。我们的实验还发现球囊损伤组血管内膜和靠近内膜的中膜中, 泛素蛋白表达明显高于正常血管, 而局部应用蛋白酶体抑制剂 MG132 后泛素蛋白表达明显降低。提示 UPP 在平滑肌细胞过度增殖导致血管狭窄性疾病的发生过程中可能具有一定的作用。

目前对泛素-蛋白酶体通路与再狭窄发生的关系尚处于探索阶段, 蛋白酶体抑制剂通过对泛素化通路的阻断可诱导多种人肿瘤细胞凋亡, 被认为是可成为很有发展前途的抗肿瘤药物, 但其作用机制至今仍未完全弄清<sup>[7]</sup>。多聚 ADP 核糖体聚合酶 (PARP) 是 DNA 修复关键酶, 凋亡时 Caspase-3 可裂解 PARP。在 HL60 细胞和 RVC 细胞, 蛋白酶体抑制剂可提高 Caspase-3 活性, 加快 PARP 降解, 促进凋亡<sup>[8]</sup>。Meiners 等发现<sup>[4]</sup> 在球囊损伤的局部应用 MG132 后, 大鼠颈动脉血管细胞的凋亡明显增加。我们的实验进一步发现, 局部应用 MG132 后, 血管内膜和靠近内膜的中膜中 Caspase-3 蛋白表达明显

高于球囊损伤组。提示细胞内异常蛋白质由于 UPP 的阻断而降解减少, 最终将导致细胞发生凋亡, 可能是蛋白酶体抑制剂抗家兔颈总动脉球囊损伤后再狭窄的重要机制。MG132 是一种有效、可逆的醛基肽类蛋白酶体抑制剂, 能阻止 26S 蛋白酶体对泛素结合蛋白的降解, 抑制 20S 蛋白酶体的糜凝乳蛋白酶活性, 从而阻断 UPP, 它能激活 c-Jun 氨基端激酶 (JNK1) 从而启动凋亡。可以推测 UPP 在球囊损伤后血管狭窄和血管壁细胞凋亡过程中有重要作用, 其中的机制有待进一步阐明。

#### [参考文献]

- [1] 刘俊文, 杨向东, 王仁, 等. 蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导人巨噬细胞 THP-1 凋亡 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12 (3): 271-274
- [2] Williams DO, Holbrook R, Yeh W, et al. Percutaneous coronary intervention in the current era compared with 1985-1986: the national heart lung and blood institute registries [J]. *Circulation*, 2000, 102 (24): 2910-2914
- [3] 郭芳, 孙文清, 屈顺林. 蛋白酶体抑制剂 MG132 对球囊损伤后血管狭窄的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (1): 53-55
- [4] Meiners S, Laule M, Rother W, et al. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis [J]. *Circulation*, 2002, 105 (4): 483-489
- [5] Clowes AW, Reilly MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury: I. smooth muscle growth in the absence of endothelium [J]. *Lab Invest* 1983, 49 (3): 327-333
- [6] Dale WE, Batra PS, Blaize EH, et al. Enhanced neointimal growth in cultured rabbit aorta following in vivo balloon angioplasty [J]. *In Vivo Cell Dev Biol Anim*, 1998, 34 (10): 805-812
- [7] 饶敏, 张淑玲, 熊莉娟. 蛋白酶体抑制剂 MG132 诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究进展 [J]. 医学分子生物学杂志, 2005, 2 (4): 298-301
- [8] Drexler HCA. Activation of the cell death program by inhibition of proteasome function [J]. *Proc Natl Acad Sci* 1997, 94: 855-860

(此文编辑 许雪梅)