

[文章编号] 1007-3949(2009)17-11-0921-04

· 实验研究 ·

大鼠主动脉内皮损伤后核因子 κ B活性的动态变化及血管细胞黏附分子 1的表达

朱彦琪, 张治, 安英华, 严轶文, 戴秋艳, 孙宝贵

(上海市第一人民医院心内科, 上海市 200080)

[关键词] 内皮损伤; 核因子 κ B; 血管细胞黏附分子 1

[摘要] 目的 观察动脉损伤后核因子 κ B活性的动态变化, 以及血管局部血管细胞黏附分子 1的表达, 分析二者的关系。方法 SD大鼠以球囊剥脱主动脉内皮建立大鼠动脉损伤模型。按照术后处死的时间点, 将动物分为 8组: 0 h(对照组)、12 h、24 h、1天、2天、3天、7天及 14天, 每组 6只。凝胶迁移率实验检测各个时间点核因子 κ B活性的动态变化, 免疫组织化学观察血管细胞黏附分子 1在血管局部的表达。结果 术后即刻以扫描电镜观察内皮完全剥脱。术后 14天可见明显的增生内膜, 模型建立成功。大鼠主动脉球囊损伤后, 核因子 κ B在术后 12 h即有明显活化, 高峰在 1~3天, 然后逐渐下降, 14天左右接近术前水平。术后即刻无血管细胞黏附分子 1表达, 7天时在内膜表面及少量中膜平滑肌细胞可以看到血管细胞黏附分子 1表达, 术后 14天时在内膜近内弹力板处, 新生内膜的近血管腔面少量表达, 而主要的阳性转移到新生内膜近内弹力板处。结论 核因子 κ B和血管细胞黏附分子 1参与大鼠的主动脉损伤后的炎症过程; 核因子 κ B的活化与失活成动态变化; 血管细胞黏附分子 1在不同时间表达在不同的部位, 核因子 κ B的活化与失活在血管细胞黏附分子 1的表达与消退之前, 核因子 κ B对血管细胞黏附分子 1的表达起调节作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Time Course of Nuclear Factor- κ B activation and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Rat Artery After Endothelium Denudation

ZHU Yan-Qi, ZHANG Zhi, AN Ying-Hua, YAN Yi-Wen, DAI Qiu-Yan, and SUN Bao-Gui

(Department of Cardiology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China)

[KEY WORDS] Endothelium denudation; Nuclear Factor- κ B; Vascular Cell Adhesion Molecule-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate time course of nuclear factor- κ B (NF- κ B) activation after artery endothelium denudation and its relationship with local vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression. **Methods** Denudation injury of rat aorta was produced by ballooning (3 times) with PTCA catheter. Crucify 6 rats before and at every time points after procedure: 0 h, 12 h, 24 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d and 14 d. NF- κ B activation was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Local VCAM-1 expression was measured by immunohistochemical assay.

Results Scanning electron microscopy showed that endothelium was completely denudated. Significant neointima proliferation was seen at 14 days after injury. NF- κ B was activated at 12 h and culminated at 1 to 3 days after operation, and then decreased gradually. Its activation was higher at 14 days after operation than control, but there was no statistical significance. No local VCAM-1 expression could be detected immediately after denudation. At 7 days after operation, VCAM-1 was positive on the surface of endothelium and in the medium smooth muscle cells (SMC). At 14 days after operation, VCAM-1 was still positive on the surface of uncovered endothelium, while more abundant expression was seen in the bottom of neointima near internal elastic lamina. **Conclusions** NF- κ B activation and VCAM-1 expression participate in the inflammation of rat denudated artery. Activation and inactivation of NF- κ B occur before the expression and disappearance of VCAM-1.

血管损伤后的修复, 是炎症过程中内皮修复及内膜增殖的对立平衡。由血管细胞黏附分子 1 (VCAM-1)所介导的单核巨噬细胞的黏附被认为

是血管损伤后炎症反应的首要环节^[1]。核因子 κ B (NF- κ B)是一个转录因子家族, 在正常机体发育、免疫反应以及病理过程中都发挥重要的基因调节作用^[2]。NF- κ B活化后, 从胞浆转移到胞核, 与 DNA 结合, 调节相应下游基因的表达。VCAM-1即为其中之一^[3]。生理状态下, NF- κ B的活化是短暂的, 适当的调节一些参与免疫和应激基因的表达; 但在病理状态下, 它的活化是异常而持久的过度激活^[4], 导致

[收稿日期] 2009-06-22 [修回日期] 2009-10-05

[作者简介] 朱彦琪, 博士, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化。E-mail为 zvcath@vahoo.com.cn。张治, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为干细胞在心肌缺血中的保护作用。通讯作者戴秋艳, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为高血压及冠状动脉粥样硬化的基础理论与临床。

病变的持续发展。因此,了解动脉损伤后 NF- κ B 活化的时间趋势为寻找合理的治疗时机至关重要。本研究观察大鼠主动脉内皮剥脱后修复过程中 NF- κ B 活性的动态变化以及局部 VCAM-1 的表达,为进一步的干预研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

健康 SD 大鼠,雄性,体重 400 g 左右,由本院实验动物中心提供。普通饲料喂养,按照主动脉球囊拉伤术后时间点分为 8 组:0 h(对照组)、12 h、24 h、1 天、2 天、3 天、7 天及 14 天,每组 6 只动物。

1.2 球囊拉伤大鼠主动脉

1% 异戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉大鼠。将大鼠仰卧位固定。分离左侧颈总动脉及颈内、颈外动脉。从颈外动脉远端以显微剪斜行剪一破口,送入 2.5 mm PTCA 球囊 (Cordis 公司) 至降主动脉远端。以生理盐水充盈球囊,来回 3 次拉伤血管内膜,撤出球囊,结扎颈外动脉。

1.3 处死动物及取材

每组动物按照时间点,过量麻醉后迅速沿中线剖开躯体,分离主动脉全长,包括从升主动脉弓直至髂总动脉分叉处,冲洗干净后置于冰盐水中,新鲜提取核蛋白备用。将左侧颈总动脉一段置于固定液中保存,作冰冻切片及固定,以 1:50 稀释的兔抗人 VCAM-1 抗体 (Santa Cruz 公司) 行免疫组织化学检查 VCAM-1 在大鼠颈动脉损伤处的表达。

1.4 抽提核蛋白

按照 Active Motif 公司试剂盒说明书抽提核蛋白。分装后于 -80°C 保存备用。

1.5 BCA 法蛋白定量

按照 BCA 试剂盒 (Pierce 公司) 说明书进行。以酶标仪在 590 nm 检测微孔板内样品的吸光度;由酶标仪附接的计算机自动生成标准曲线;参照标准曲线,得出待测样品的蛋白浓度。

1.6 凝胶电泳迁移率分析检测核因子 κ B 活性

按照 Pierce 公司说明书进行。试剂盒自带 EBNA 对照系统。双链 DNA 探针委托上海生工生物工程公司合成。正义序列为 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3', 下划线处为 NF- κ B 分子特异性结合的位点。探针分为生物素标记和未标记两种 (未标记探针用于竞争抑制试验)。

1.6.1 结合电泳迁移实验 制作 6% 聚丙烯酰胺凝胶,6 μg 样品蛋白和标记探针配成反应系统,

100~200 V 电压下电泳,直至溴酚蓝指示剂跑至胶板全长的 2/3 处,转膜,254 nm 紫外灯下 120 mJ/cm² 交联 1 min,利用亲和素 HRP、化学发光底物系统显像,在胶片上曝光成像。

1.6.2 竞争抑制实验 在反应体系中,加入 200 倍于标记探针的未标记 DNA 探针,特异性条带将被竞争性抑制而消失。

1.6.3 超迁移实验 在反应体系中,加入抗 P65 (NF- κ B 的活性亚基,Lab Vision 公司) 抗体,与蛋白中活化的 P65 结合而使复合物分子量加大,因而泳动更加滞后,条带位置上移。

1.6.4 图像分析 每次反应中均以固定剂量的 EBNA 对照系统作为参照。以 Scion 软件分析阻滞条带的面积及灰度值,二者相乘得到一个数值;将每个样品组织条带的数值与本次反应中标准品阻滞条带的数值相比,将此比值作为该样品的最终数值,进行统计分析。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 Office Excel 统计软件进行 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 球囊拉伤大鼠主动脉后核因子 κ B 的活化

大鼠主动脉拉伤后抽提核蛋白标本有阻滞条带,远端空白探针减少。术后 12 h 即有 NF- κ B 的活化,其后各个时间点均可见不同程度的活化,对照组未见明显特异性阻滞条带 (图 1)。但是每个泳道均可见上下 2 条条带,根据竞争抑制实验和超迁移实验明确目的条带。

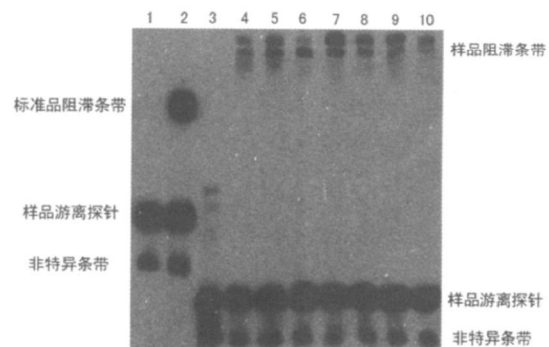


图 1 凝胶迁移率实验测定大鼠主动脉球囊拉伤后核因子 κ B 活性 1 为标准品空白探针,2 为标准品蛋白 + 探针,3 为样品空白探针,4~10 为样品蛋白,其中 4 为 12 h 5 为 24 h 6 为 2 天,7 为 3 天,8 为 7 天,9 为 14 天,10 为对照组。

2.2 竞争抑制实验和超迁移实验情况

3、4 泳道的样品可以看到明显的上下 2 条阻滞

条带; 5、6泳道加入未标记竞争探针后, 远端游离探针明显增多, 原 3、4泳道的下面一条条带消失; 7、8泳道加入抗 P65的抗体以后, 下面的一条减淡上移。根据以上两个实验, 说明下面的一条是目标条带, 上面一条是非特异性结合条带 (图 2)。

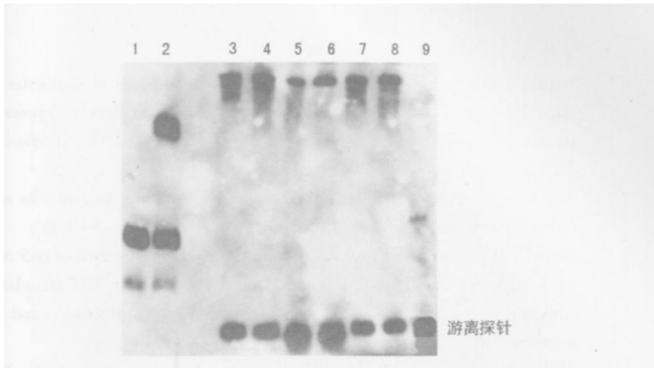


图 2 超迁移和竞争抑制实验以明确目标条带 1为标准品空白探针, 2为标准品蛋白+探针, 3为样品 a 4为样品 b 5为样品 a+未标记探针, 6为样品 b+未标记探针, 7为样品 a+抗 P65 抗体, 8为样品 b+抗 P65 抗体, 9为空白探针。

2.3 主动脉拉伤后各时间点核因子 κ B 活性的动态变化

大鼠主动脉拉伤后 12 h NF- κ B 即有明显活化, 并逐渐增强, 在 1天和 3天有两个小的高峰, 第 7天逐渐下降, 14天时虽仍旧高于正常, 但与对照组没有统计学差异 ($P < 0.05$; 图 3)。

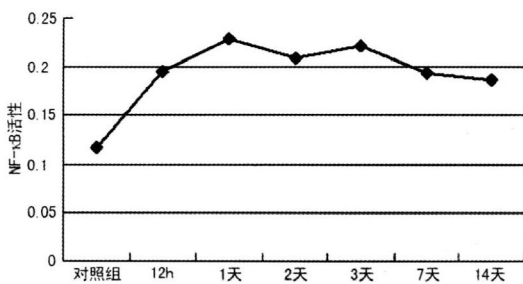


图 3 大鼠主动脉内膜球囊损伤后 NF- κ B 的活性变化

2.4 血管细胞黏附分子 1 在大鼠颈动脉损伤处的表达

拉伤后即刻取材, 可见血管表面内皮细胞完全剥脱, 未见 VCAM-1 阳性表达; 拉伤术后 7 天时, 血管内膜面可见细胞散在分布, 部分成阳性, 中膜也可见 VCAM-1 表达; 术后 14 天, 可见新生内膜表面部分有内皮细胞覆盖, 近血管腔面少量棕黄色阳性细胞, 大部分阳性细胞在新生内膜近内弹力板处; 中膜未见阳性细胞 (图 4)。

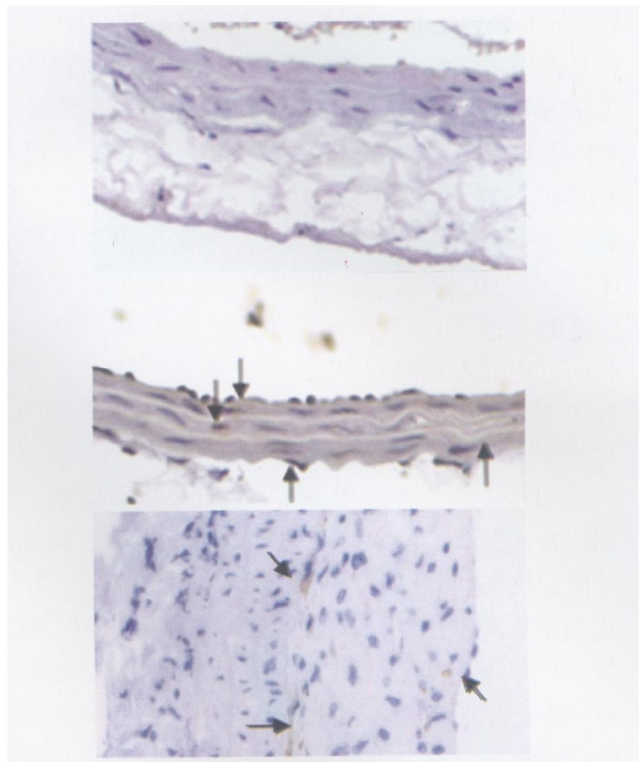


图 4 免疫组织化学观察大鼠颈动脉球囊拉伤后 VCAM-1 的表达 ($\times 400$) 上为拉伤后即刻取材, 中为拉伤术后 7 天, 下为术后 14 天。

3 讨论

NF- κ B 在动脉内皮损伤后的过度激活, 介导了很多炎症因子的表达及细胞的活化, VCAM-1 是其调节的下游因子之一。在大鼠主动脉拉伤去内皮的模型中, 观察到 NF- κ B 在术后很快就活化, 并呈上升趋势, 在 1~3 天达到峰值, 随后逐渐回落, 14 天时虽仍旧高于对照组, 但没有统计学差异。大鼠主动脉损伤后, 血管壁细胞增殖的高峰是在 7~9 天左右, 完成再内皮化大约在 21 天^[5], 后期主要是血管壁的重构, 其中主要是细胞外基质胶原的合成与代谢。NF- κ B 作为基因调节因子, 其活化高峰在血管壁细胞增殖高峰之前; NF- κ B 自身的负反馈调节及局部环境因素的作用使得 NF- κ B 的活化受到抑制, 逐渐恢复到静止状态, 内膜的修复也随之完成, 血管的炎症反应渐趋稳定。

VCAM-1 在术后即刻取材的标本, 没有看到阳性表达。术后 7 天时, VCAM-1 表达在内膜表面的细胞, 可能是新生的内皮细胞, 可能是黏附的炎症细胞, 也可能是迁移到内膜的平滑肌细胞 (SMC), 但都是核小而圆形且深染的细胞, 说明处于活化分裂状态, 参与血中炎症细胞与局部的相互作用, 另外中膜 SMC 也有少量表达 VCAM-1。VCAM-1 在 SMC 中的表达是细胞周期依赖性的^[6], 处于 S 期 SMC

VCAM-1表达是被抑制的,而 VCAM-1与 VLA-4的相互作用可以促进 SMC向收缩表型转化^[7],说明在中膜 SMC活化增殖的同时,已经有一部分 SMC在趋向静止,事实上,在球囊损伤后 48~72 h就已经有 SMC恢复静止期了。术后 14天时,VCAM-1的表达主要在新生内膜中,内皮尚未完全覆盖内膜表面,炎症仍在继续,在新生内膜的近血管腔面处仍有少量的表达,但多数的阳性细胞已经转移到新生内膜的近内弹力板处,与以往研究报道一致^[8]。本研究中 VCAM-1的表达是在增生内膜内新生血管的内皮细胞表达,介导炎症的进一步发展。

NF- κ B的激活是 VCAM-1的重要调节因素。但 NF- κ B的激活在 VCAM-1的表达消退之前已经逐渐下降,是因为刺激 NF- κ B活化的因素终止了。在内皮剥脱加高脂饮食制作的兔动脉硬化模型中,损伤后 30天还有明显的 NF- κ B活化,并有大量的 VCAM-1表达及单核巨噬细胞聚集,说明炎症反应的持续存在。这与本研究中结果的差别在于兔动脉硬化模型中,除了动脉损伤,术后还有高胆固醇的持续刺激。李建军等^[9]研究发现兔主动脉单纯球囊损伤后,NF- κ B的激活仅在术后 3天即接近正常水平。Song等^[10]在兔髂动脉拉伤后分别给予高胆固醇饮食或正常饮食,发现 NF- κ B在喂养高胆固醇的动物术后 14天仍有表达,但正常饮食组 7天已经检测不到了,说明高胆固醇对 NF- κ B刺激活化的作用。兔正常主动脉未见 NF- κ B活性表达,在主动脉球囊拉伤后 3天,NF- κ B的活化即回复正常,本研究中大鼠主动脉术前也有极少量活性 NF- κ B,损伤后 NF- κ B的活化持续到术后 7天以后,可能是动物种属不同,兔是草食性,而大鼠是混合性饮食有关。

本研究观察了大鼠主动脉内皮球囊损伤后 NF- κ B的动态变化,以及 VCAM-1不同时期在不同部位的表达情况。NF- κ B的活化与消退都在 VCAM-1的活化与消退之前,从时间关系这一个侧面证实了 NF- κ B对 VCAM-1表达的调节作用。

[参考文献]

- [1] Dansky HM, Barlow CB, Lm inska C, et al Adhesion of monocytes to arterial endothelium and initiation of atherosclerosis are critically dependent on vascular cell adhesion molecule-1 gene dosage [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 **21** (10): 1 662
- [2] Kumar A, Takada Y, Boriek AM, et al Nuclear factor-kappaB its role in health and disease [J]. *J Mol Med* 2004 **82** (7): 434-448
- [3] Zerfaoui M, Suzuki Y, Naura AS, et al Nuclear translocation of p65 NF- κ B is sufficient for VCAM-1, but not ICAM-1, expression in TNF-stimulated smooth muscle cells differential requirement for PARP-1 expression and interaction [J]. *Cell Signal* 2008 **20** (1): 186-194
- [4] Martin DR, Hoeth M, Wabinek HR, et al The transcription factor NF-kappa B and the regulation of vascular cell function [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000 **20** (11): E 83-88
- [5] van Pelt-Verkuijle E, Knoester J, van Pelt W, et al Time course of arterial repair following endothelial denudation in the rat carotid artery: A morphometric study in Wistar and Sprague-Dawley rats [J]. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1986 **408** (6): 559-574
- [6] Braun-Dullaeus RC, Mann M J, von der Leyen HE, et al Evidence for cell cycle-dependent phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation* 1997 **96** (Suppl): I-285
- [7] Dulpaac C, Couffinhal T, Dufourcq P, et al The integrin very late antigen-4 is expressed in human smooth muscle cell [J]. *Circ Res* 1997 **80** 159-169
- [8] O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, et al Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content [J]. *Circulation* 1996 **93** (4): 672-682
- [9] 李建军, 李庚山, 黄从新, 等. 球囊损伤兔主动脉后核因子 κ B活性的动态变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (1): 34-36
- [10] Song M, Kim HS, Park SJ, et al Effect of hypercholesterolemia on macrophage infiltration after balloon injury to rabbit iliac artery [J]. *Jpn Circ J* 2001 **65** (2): 117-122

(此文编辑 文玉珊)