

小鼠颈动脉损伤新生内膜增生与局部转录因子 Id1的关系

王红, 喻杨, 覃军, 石燕昆, 郭瑞威, 黄岚

(第三军医大学附属新桥医院全军心血管病研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 转录因子; 血管损伤; 新生内膜; 内膜增生

[摘要] 目的 研究转录因子 Id1在小鼠颈动脉损伤后血管壁的动态表达及在损伤血管新生内膜增生中的作用。方法 采用昆明小鼠颈动脉球囊损伤动物模型, 随机均分为四组: 正常对照组、血管损伤后 7天、14天及 28天组。HE染色评价血管内膜增生情况。逆转录聚合酶链反应、Western blotting及免疫组织化学染色等方法检测血管壁 Id1的表达。结果 正常对照组小鼠颈动脉内膜/中膜面积比值很小, 损伤 7天组颈动脉内膜/中膜面积比值显著高于正常对照组 ($P < 0.05$), 损伤 14天组和 28天组颈动脉内膜/中膜面积比值明显高于 7天组 ($P < 0.05$)。正常对照组小鼠颈动脉血管壁 Id1 mRNA 和蛋白表达很低, 损伤后 7天血管壁 Id1 mRNA 和蛋白表达水平明显增加, 损伤 14天 Id1 mRNA 和蛋白表达显著高于 7天组 ($P < 0.05$), 但损伤 28天组 Id1 mRNA 和蛋白表达较 14天组有所降低 ($P < 0.05$)。免疫组织化学显示正常血管壁 Id1表达很弱; 随血管损伤时间延长 Id1表达逐渐增强, 14天达到高峰, 28天表达出现减弱。结论 颈动脉损伤后局部 Id1表达动态改变伴随血管损伤新生内膜增生的变化, 提示转录因子 Id1可能参与血管损伤后新生内膜增生的调控过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Relationship Between Id1 Expression and Neointima Hyperplasia After Carotid Arteries Injury in Mice

WANG Hong¹, YU Yang¹, QIN Jun, SHI Yang-Kun, GUO Rui-Wei and HUANG Lan

(Cardiovascular Research Institute of Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] Transcription Factor; Vascular Injury; Neointima; Intima Hyperplasia

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between Id1 expression in neointima and vascular neointima hyperplasia. **Methods** The model of carotid arteries injured was established by catheter in mice. Kunming mouse were randomly divided into 4 groups: control group, groups of 7 day, 14 day and 28 day after the injury. The vascular morphology was analyzed by HE dying. The expression of Id1 mRNA was measured by reverse transcriptase PCR, and the protein of Id1 was assessed by Western blotting and immunohistochemistry. **Results** The ratio of intima area to media area (IA/MA) was significantly increased in 7 day after vascular injury than that in control group ($P < 0.05$), and further to increase on 14 day and 28 day after injury ($P < 0.01$). The expression of Id1 mRNA in experimental groups was significantly increased than that in control group ($P < 0.05$). The Id1 mRNA was significantly increased on 14 day than that in 7 day and 28 day after vascular injury ($P < 0.05$). The expression of Id1 protein was similar with the expression of mRNA. The low level Id1 was detected in the uninjured vessel by the immunohistochemistry. However, Id1 staining was increased only in the medium at 7 days, enhanced significantly in medium and neointima at 14 days. However, Id1 staining was decreased at 28 days. **Conclusion** The Id1 expression was in the dynamic changes in the process of vascular neointima hyperplasia after vascular endothelial injury, and it maybe play a role in the neointima hyperplasia after vascular injury.

血管内皮损伤是动脉粥样硬化发生及经皮冠状动脉介入术 (PCI) 后血管内膜修复不良、支架内血栓形成的重要机制, 内皮损伤后平滑肌细胞迁移、

过度增殖是新生内膜增生的主要病理过程, 故血管损伤后尽早促进受损血管再内皮化, 以及抑制平滑肌细胞异常迁移、增殖为阻止新生内膜形成、发展的重要环节。然而, 目前对于血管损伤后调控新生内膜增生的分子机制尚待更深层次的认识。业已证实, 在细胞基因转录、蛋白质表达等方面转录因子起着关键作用, 转录因子家族中的 Id 蛋白参与了包括肌肉、神经、肿瘤等多种细胞的增殖、分化及细胞周期的调控, 其亚型 Id2、Id3 被证实在血管损伤后局

[收稿日期] 2009-12-18 [修回日期] 2010-04-04

[基金项目] 国家自然科学基金 (30770852); 重庆市自然科学基金 (2007BB5028)

[作者简介] 王红, 博士, 副主任医师, 研究方向为血管损伤及修复。Email 为 wangh43@126.com。通讯作者黄岚, 博士, 博士研究生导师, 教授, 研究方向为血管损伤及修复, Email 为 huanglan260@126.com。喻杨, 博士, 住院医师, 研究方向为血管损伤及修复。

部呈动态改变,参与并调控血管损伤后内膜增生病理过程^[1-3]。同为该家族中另一个重要成员 Id1 是否也参与到血管损伤修复过程尚无相关报道。故本研究在观察血管损伤后血管壁局部 Id1 表达的情况,并比较 Id1 动态变化与损伤血管内膜增生的关系,旨在为进一步探讨 Id1 参与血管内膜损伤修复机制提供实验研究依据。

1 材料和方法

1.1 动物及主要试剂

昆明小鼠 25~30 g 雄性,由第三军医大学动物实验中心提供。羊多克隆 Id1 抗体 (Santa 公司), β -actin 抗体 (Sigma 公司),辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗羊 IgG、免疫组织化学试剂盒 (中杉公司), RT-PCR 试剂盒 (天根公司), Trizol 提取液 (Invitrogen 公司)。

1.2 小鼠颈动脉内膜损伤模型的建立及分组

32 只小鼠随机分为 4 组:正常对照组、血管损伤 7 天组、14 天组及 28 天组,每组各 8 只。建立小鼠血管内膜损伤模型,用 2% 戊巴比妥钠按 50 mg/kg 腹腔注射麻醉。沿颈前正中中线切开皮肤,在颈前三角区暴露左颈总动脉及颈内、外动脉,分别在颈总动脉近心端、颈内动脉远心端打活结结扎以阻断血流,结扎颈外动脉远心端,稍上提颈外动脉远心端结扎线,以小儿头皮针针尖在颈外动脉结扎处近心端,再用改制过的 Q 014 英寸直径的弹性导丝穿刺颈外动脉,导丝进入颈外动脉后再推送导丝跨越动脉分叉直达颈总动脉近心端的结扎线处,旋转并来回推送导丝 3 次,以达到剥离颈总动脉内皮,退出导丝,结扎颈外动脉的穿刺口近心端,松开颈总动脉及颈内动脉活结,以恢复颈总动脉血流,缝合颈部切口,常规饲养。术后常规肌注射青霉素以预防感染。对照组行假手术,不向颈总动脉内插入钢丝。

1.3 苏木精-伊红 (HE) 染色

切片经常规复水后行 HE 染色,图像分析软件下计算内膜与中膜面积比值 (IMA)。

1.4 RT-PCR 检测血管组织中 Id1 的表达

Trizol 试剂提取总 RNA,并测定其浓度和纯度。Id1 引物序列正义 5'-AGG TGG TAC TTG GTC TGT CGG-3',反义 5'-GCT CAC TTT GCG GTT CTG G-3',扩增出 173 bp 的 cDNA 片段,退火温度为 58℃,共 30 个循环;内参照 β -actin 寡核苷酸引物序列上游 5'-CAC TGT GCC CAT CTA CGA-3',下游 5'-CAG GAT TCC ATA CCC AAG -3',扩增出 353 bp

的 cDNA 片段,退火温度为 58℃,共 30 个循环。所有引物均由上海英俊生物有限公司合成。反应取同一样品总 RNA 2 μ g 按试剂盒说明进行,琼脂糖凝胶电泳检测产物,凝胶成像系统拍摄。用 Image-Pro Plus 5.1 图像软件测定 Id1 目标条带的光密度值,以 β -actin 条带的光密度值进行标准校正计算 Id1 mRNA 产物的相对含量,Id1 mRNA 相对量 = Id1 mRNA 条带光密度值 / β -actin mRNA 条带光密度值。

1.5 Western blotting 检测血管壁 Id1 蛋白的表达

血管壁细胞蛋白经 RIPA 提取,采用考马斯亮蓝法测定细胞蛋白浓度,根据蛋白浓度分装于 1.5 mL 离心管,使每管蛋白总量在 50 μ g 左右,置于 -70℃ 保存。取约 50 μ g 总蛋白,置于 95℃ 变性 5 min,采用 5% 浓缩胶和 12% 分离胶行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳条件恒压 80 mV,时间为 3 h。采用“三明治”法将蛋白转移至 PVDF 膜,转膜采用 Bio-Rad 电转仪,转膜条件为恒流 15 mA,时间为 90 min。之后将 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 加入封闭液稀释的 1:200 羊多克隆 Id1 一抗封闭过夜,加 1:500 辣根过氧化物酶标的兔抗山羊 IgG 室温反应 1 h 后染色,用相同方法检测内参 β -actin 的蛋白表达 (42 kDa),用化学发光法 (ECL) 显色,凝胶成像分析系统进行定量分析。

1.6 免疫组织化学检测血管壁 Id1 的表达

4% 多聚甲醛固定血管组织,制石蜡切片。二甲苯脱蜡,PBS 清洗,3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶,枸橼酸钠 (0.02 mol/L) 煮沸抗原修复,PBS 清洗后用 5% 羊血清封闭液孵育于 37℃ 水浴箱 30 min。一抗为 1:200 羊多克隆 Id1 抗体,4℃ 过夜。二抗为 1:500 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗羊 IgG,37℃ 水浴箱孵育 30 min,漂洗后将 DAB 显色,苏木素复染细胞核。

1.7 统计学方法

多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 Tukey's 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管形态学变化

光镜下,正常对照组小鼠颈动脉内膜仅见单层内皮细胞;损伤后 7 天有新生内膜增生;损伤后 14 天新生内膜明显增厚,管腔内径变小,细胞排列紊乱,细胞外基质增多,有较多的血管平滑肌细胞增殖,排列紊乱,内弹力层迂曲明显;28 天时增生内膜几乎堵塞整个血管腔 (图 1)。

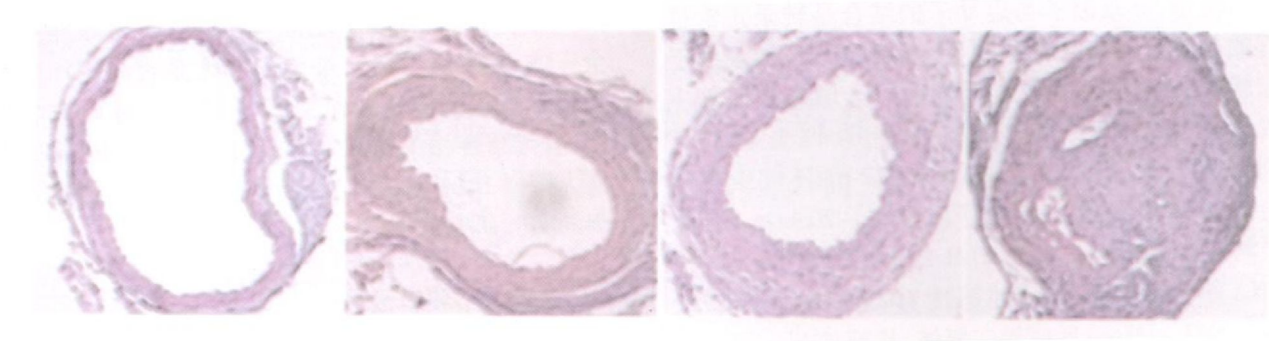


图 1. HE 染色显示各组血管形态学变化 (×200) 从左至右为正常对照组、损伤 7 天、14 天及 28 天组。

2 2 内膜面积 / 中膜面积比值的变化

损伤后 7 天组 I A M A 比值 (0.28 ± 0.02) 较正常对照组 (0.03 ± 0.01) 明显增加 ($P < 0.05$), 损伤后 14 天组 I A M A 比值 (1.30 ± 0.15) 和 28 天组 I A M A 比值 (4.10 ± 0.20) 较损伤 7 天组显著增加 ($P < 0.01$)。

2 3 颈动脉损伤后血管壁 Id1 mRNA 和蛋白的表达变化

正常对照组 Id1 mRNA 和蛋白的表达很低, 损伤 7 天后局部新生内膜 Id1 mRNA 和蛋白的表达较正常对照组明显增加 ($P < 0.05$), 损伤 14 天血管壁 Id1 mRNA 和蛋白的表达较损伤后 7 天显著增加 ($P < 0.05$), 28 天时 Id1 mRNA 和蛋白的表达较 14 天降低 ($P < 0.05$, 表 1 和图 2)。

表 1. 血管壁 Id1 mRNA 和蛋白的表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分 组	Id1 mRNA	Id1 蛋白
正常对照组	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.01
损伤 7 天组	0.49 ± 0.04^{ab}	0.37 ± 0.03^{ab}
损伤 14 天组	0.86 ± 0.07^a	1.12 ± 0.10^a
损伤 28 天组	0.42 ± 0.03^{ab}	0.40 ± 0.04^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与损伤 14 天组比较。

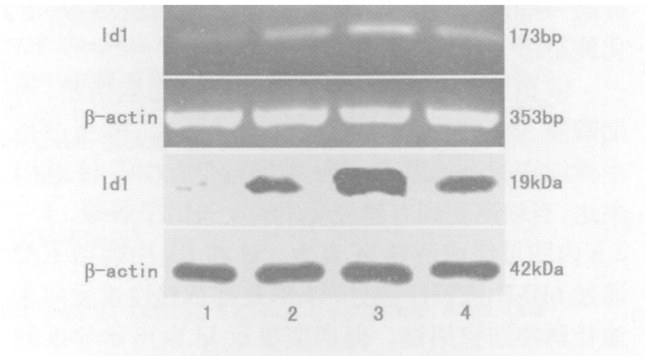


图 2 血管壁 Id1 mRNA 和蛋白的表达 1 为正常对照组, 2 为损伤后 7 天组, 3 为损伤后 14 天组, 4 为损伤后 28 天组。

2 4 血管壁 Id1 表达情况

细胞内有棕色染色为阳性, 提示 Id1 表达。正常对照组血管内膜及中膜平滑肌细胞浆内仅有少许棕色染色; 血管损伤后 7 天, Id1 在新生内膜及血管中层平滑肌棕色染色区域增加, 随损伤时间延长 Id1 在血管壁局部表达逐渐增强, 14 天 Id1 在损伤血管局部表达量最高, 到 28 天表达出现减弱 (图 3)。

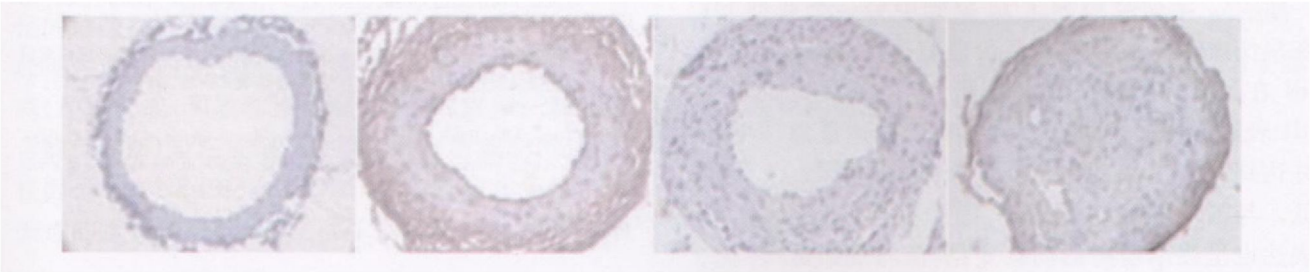


图 3 血管壁 Id1 免疫组织化学检测结果 (×200) 从左至右为正常对照组、损伤后 7 天组、14 天组及 28 天组。

3 讨论

血管内膜损伤可导致炎性细胞浸润、血管平滑肌细胞异常增殖及迁移、新生内膜形成, 为动脉粥样

硬化病理过程及 PCI 后内膜不良修复的起动环节, 深入研究抑制新生内膜增生的分子机制, 对动脉粥样硬化及 PCI 后内膜不良修复的防治将提供重要的理论依据。研究证实, 真核细胞基因转录、蛋白质表

达过程中, 转录因子与启动子的结合是转录正常进行的首要过程, 其中, 螺旋-环-螺旋 (HLH) 转录因子家族中的 Id 在调控细胞周期、分化、增殖及血管生成中有重要作用^[4-6]。Id 包括 Id1-Id4 四个亚型, 分别由位于 20q1、2p25、1p36 和 6p22-21 不同染色体上的 Id 基因编码, 相对分子质量 13~20 kDa。各成员均包括高度保守的 HLH 结构区, 但缺乏碱性 DNA 结合区。Id 与其他碱性 HLH 蛋白 (如 E2A、E12、E47、c-Myc) 形成异二聚体, 从而抑制了这些碱性 HLH 蛋白与 DNA 及其他组织特异性碱性 HLH 转录因子结合, 使其不能与 DNA 上的 E 基序结合, 抑制一些重要的分化基因的转录, 因而被称为“分化抑制因子”。

Id 蛋白的功能不尽相同, 它们在细胞增殖、周期调控、血管生成等方面有重要的作用。Id 蛋白是多种细胞的增殖因子, 静止期细胞仅有少量 Id 基因表达, 当细胞受到有丝分裂原或生长因子刺激, 1~2 h 内即可快速诱导 Id 表达。Id 在 G1 中晚期主要通过 HLH 依赖性途径和 HLH 非依赖性途径两条途径调控细胞周期。但研究显示 Id 也可诱导细胞的凋亡^[7]。因此, 在内膜增生过程中, Id 可能是调控细胞生长与死亡之间平衡的一个重要因素。

业已证实, 促进损伤血管再内皮化以及抑制平滑肌细胞异常迁移、增殖是防治血管损伤不良修复的关键, 本实验室既往已从不同层面研究探讨了内皮祖细胞及平滑肌细胞参与损伤血管修复的作用^[8-13], 提示寻找调控血管再内皮化及平滑肌细胞过度增殖是损伤血管良性修复主要切入点。研究报告, Id 家族中的 Id2、Id3 及其亚型 Id3a 可通过调控血管平滑肌细胞增殖、细胞周期等作用参与血管损伤修复过程^[1-3], 并且 Id2、Id3 在损伤血管局部的动态改变与损伤后血管壁平滑肌细胞增殖高峰趋势相一致^[14]。本研究检测了 Id 家族中另一个亚型 Id1 在损伤血管局部的基因及蛋白表达情况, 结果发现 Id1 在正常血管壁表达量很低, 但血管损伤后 7 天 Id1 表达量明显增加, 7 天到 14 天表达量急速增长并达到高峰, 至血管损伤 28 天时表达量较 14 天降低。与国外研究结果相似, 即血管损伤后局部 Id1 表达也呈逐渐增高的动态变化, 但与 Id2、Id3 不同,

Id1 表达高峰提前, 与局部平滑肌增殖高峰并不完全一致, 提示除平滑肌细胞外, Id1 是否还同样调控了内皮细胞或内皮祖细胞修复损伤血管内膜的作用, 有待结合相关的细胞实验做进一步研究, 本研究仅为探讨 Id1 参与血管内膜损伤修复机制提供了初步的实验研究依据。

[参考文献]

- [1] Matsumura ME, Lobe DR, McNamara CA. Contribution of the helix-loop-helix factor Id2 to regulation of vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277** (9): 7 293-297.
- [2] Matsumura ME, Li F, Berthou L, et al. Vascular injury induces posttranscriptional regulation of the Id3 gene: cloning of a novel Id3 isoform expressed during vascular lesion formation in rat and human atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (5): 752-758.
- [3] Forrest ST, Barrington KG, Perlegras D, et al. Intron retention generates a novel Id3 isoform that inhibits vascular lesion formation [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (31): 32 897-903.
- [4] Calkon CE, Swarbrick A, Lee CS, et al. The Helix-Loop-Helix Protein Id1 requires cyclin D1 to promote the proliferation of mammary epithelial cell acini [J]. *Cancer Res*, 2008, **68** (8): 3 026-036.
- [5] Jaiddeep C, Ingrid SR, Jacquelyn M, et al. The Helix-Loop-Helix inhibitor of differentiation (Id) proteins induce postmitotic terminally differentiated sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferation [J]. *Biol Res*, 2005, **72** (5): 1 205-217.
- [6] Skider HA, Devlin MK, Dunlap S, et al. Id proteins in cell growth and tumorigenesis [J]. *Cancer Cell*, 2003, **3** (6): 525-530.
- [7] Norton JD, Atherton GT. Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins [J]. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (4): 2 371-381.
- [8] Rui Wei Guo, Hong Wang, Pan Gao, et al. An essential role for stromal interaction molecule 1 in neointima formation following arterial injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2009, **81** (4): 660-668.
- [9] Xiaohui Zhao, Lan Huang, Yangguang Yin, et al. Autologous endothelial progenitor cells transplantation promoting endothelial recovery in mice [J]. *Transpl Int*, 2007, **20** (8): 712-721.
- [10] Xiaohui Zhao, Lan Huang, Yangguang Yin, et al. Estrogen induces endothelial progenitor cells proliferation and migration by estrogen receptors and PI3K-dependent pathways [J]. *Microvasc Res*, 2008, **75** (1): 45-52.
- [11] XiaoJING Wu, Lan Huang, Qi Zhou, et al. Effect of paclitaxel and mesenchymal stem cells seeding on ex vivo vascular endothelial repair and smooth muscle cells growth [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, **46** (6): 779-786.
- [12] 郭瑞威, 黄岚, 宋明宝, 等. RNA 干扰沉默基质交感分子 1 基因后对血管平滑肌细胞周期的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (9): 701-703.
- [13] 尹阳光, 黄岚, 赵晓辉, 等. 基质细胞衍生因子 1 α 介导小鼠内皮祖细胞修复损伤血管内膜 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (1): 6-10.
- [14] Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM, et al. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium [J]. *Lab Invest*, 1983, **49** (3): 327-333.

(此文编辑 文玉珊)