

[文章编号] 1007-3949(2010)18-12-0961-05

• 实验研究 •

## p27K ip1在大鼠动脉粥样硬化斑块中的表达及法舒地尔的干预作用

孙立群<sup>1</sup>, 赵慧颖<sup>2</sup>, 郭功亮<sup>3</sup>, 裴丽丽<sup>4</sup>

(1 吉林大学第一医院儿科, 吉林省长春市 130021; 2 吉林大学第一医院心血管疾病诊治中心, 吉林省长春市 130021; 3 吉林大学第三医院心内科, 吉林省长春市 130031; 4 齐齐哈尔医学院附属第一医院心内科, 黑龙江省齐齐哈尔市 161041)

[关键词] p27K ip1; 动脉粥样硬化斑块; 法舒地尔

[摘要] 目的 观察 p27K ip1在大鼠动脉粥样硬化斑块中的表达及盐酸法舒地尔的干预作用。方法 将 30 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为三组: 正常对照组、动脉粥样硬化组和法舒地尔组。正常对照组大鼠行假球囊损伤手术后给予正常饮食, 动脉粥样硬化组和法舒地尔组大鼠给予维生素 D3 右下肢肌肉注射后用球囊行动脉拉伤, 在基础饲料中加入胆固醇、胆酸钠、丙基硫氧嘧啶、维生素 D3 粉剂、猪油等饲养, 法舒地尔组同时给予法舒地尔腹腔注射。喂养 9 周后抽血并处死, 自主动脉弓下约 1 cm 处留取动脉组织行 HE 染色, 用免疫组织化学法检测主动脉壁中 Rho 激酶和 p27K ip1 蛋白的表达。结果 HE 染色显示, 动脉粥样硬化组均形成了典型的粥样斑块; 免疫组织化学检测发现, Rho 激酶在正常的血管壁即有表达, 在动脉粥样硬化组的表达明显高于正常对照组和法舒地尔组 ( $P < 0.01$ ), 在法舒地尔组的表达明显高于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。p27K ip1 蛋白在正常血管壁表达较多, 在动脉粥样硬化组的表达明显低于正常对照组和法舒地尔组 ( $P < 0.01$ ), 在法舒地尔组的表达明显低于正常对照组 ( $P < 0.05$ )。结论 动脉粥样硬化病变时, 粥样硬化灶内 Rho 激酶表达明显增加, p27K ip1 蛋白的表达明显下调; 法舒地尔明显抑制粥样硬化灶内的血管平滑肌细胞增殖, 抑制 Rho 激酶的表达上调及 p27K ip1 蛋白的表达下调。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Expression of p27K ip1 in the Atherosclerotic Plaques of Rats and the Influence of Fasudil

SUN Li-Qun<sup>1</sup>, ZHAO Hui-Ying<sup>2</sup>, GUO Gong-Liang<sup>3</sup>, and PEI Li-Li<sup>4</sup>

(1 Department of Pediatrics, the First Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China; 2 Center for Diagnosis and Treatment of Cardiovascular Disease, the First Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130021, China; 3 Department of Cardiology, the Third Hospital of Jilin University, Changchun, Jilin 130031, China; 4 Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Qiqihar Medical College, Qiqihar, Heilongjiang 161041, China)

[KEY WORDS] p27K ip1; Atherosclerotic Plaque; Fasudil

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the expression of p27K ip1 in the atherosclerotic plaques of rats and fasudil hydrochloride intervention role. **Methods** 30 healthy male Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group, atherosclerosis group and fasudil group. Rats in normal control group were undertaken fake sacculus proprius damage and then were offered normal diet. Rats in atherosclerosis group and fasudil group were given Vitamin D3 intramuscular injection first, then were suffered artery balloon injury and were fed with basic diet added cholesterol, sodium cholate, propylthiouracil, Vitamin D3 powder, lard. While rats in fasudil group were given the intraperitoneal injection of fasudil. After 9 weeks, all the rats were killed, the expression of Rho kinase and p27K ip1 protein in the vascular tissues were detected by immunohistochemistry method. **Results** The atherosclerosis group formed typical atherosclerotic plaque. Semiquantitative immunohistochemical analysis showed that Rho kinase expressed in the normal vessel wall and increased significantly in atherosclerosis group compared with that in the other two groups ( $P < 0.01$ ), Rho kinase expression in fasudil group also increased compared with that in normal control group ( $P < 0.05$ ). p27K ip1 protein expression in the normal vessel wall more, p27K ip1 protein expression in atherosclerosis group decreased significantly compared with that in the other two groups ( $P < 0.01$ ). p27K ip1 protein expression in fasudil group also decreased compared with that in the normal control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of Rho kinase obviously increased and the expression of p27K ip1 protein obviously reduced in atherosclerotic lesions. Fasudil obviously inhibited vascular smooth muscle cell proliferation, inhibited the up-regulation of Rho kinase expression and down-regulation of the p27K ip1 protein in atherosclerotic lesions.

[收稿日期] 2010-10-21 [修回日期] 2010-12-09

[作者简介] 孙立群, 硕士, 医师, 主要从事动脉硬化及其发病机制研究。通讯作者赵慧颖, 博士, 教授, 主要从事高血压、冠心病、动脉硬化的基础与临床研究, Email: zhaohuiying163@163.com。郭功亮, 硕士, 医师, 主要从事冠心病、心衰的相关研究。

动脉粥样硬化及其所致心脑血管疾病是危害人类健康的主要疾病,是导致人类死亡的重要原因。最近研究发现小分子 G 蛋白家族的 Rho 蛋白及 Rho/Rho 激酶途径在动脉粥样硬化的发病机制中具有重要作用。Rho/Rho 激酶在细胞骨架调节、形态维持、迁移、平滑肌细胞收缩等细胞活动中有重要作用,在细胞的各种生物活动如血管平滑肌细胞增殖、细胞黏附、血小板聚集、接触抑制、生长和凋亡中也起关键作用。已有研究表明 Rho/Rho 激酶途径参与高血压、变异型心绞痛、心力衰竭、心肌梗死后心肌重构等病理过程,我们先前的研究已证明了 Rho/Rho 激酶途径通过促进 MCP-1 的过度表达<sup>[1]</sup>,参与了动脉粥样硬化的形成过程,但是其具体的分子机制目前研究比较少。本研究主要针对此方面观察并探讨动脉粥样硬化时血管平滑肌细胞增殖的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

健康雄性 Wistar 大鼠,体重在 220~250 g 购自吉林大学实验动物中心。

### 1.2 主要试剂、药物和器械

盐酸法舒地尔 (Rho 激酶抑制剂) 为天津红日药业有限公司赠予;胆固醇、胆酸钠购自湖南祁东县同信生化厂;丙基硫氧嘧啶购自上海复星朝晖药业有限公司;维生素 D3 粉购自北京华明盛商贸发展有限公司;兔抗鼠 Rho 激酶一抗购自北京博奥森生物工程有限公司;兔抗鼠 p27Kip1 一抗购于 Abcam 公司;SP 试剂盒、液体 DAB 酶底物显色试剂盒、抗原修复液、防脱片、消化液等购自福州迈新生物技术开发有限公司。

### 1.3 动物分组及处理

将 30 只健康雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、动脉粥样硬化组、法舒地尔组,每组 10 只。正常对照组行假球囊损伤手术并给予正常饮食;动脉粥样硬化组和法舒地尔组给予维生素 D3 300 ku/kg 右下肢肌肉注射后用球囊行胸主动脉及颈动脉拉伤,在基础饲料中加入 2% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、0.2% 丙基硫氧嘧啶、维生素 D3 粉剂 ( $1.25 \times 10^6$  u/kg 饲料)、3% 猪油等饲养。法舒地尔组同时腹腔注射法舒地尔 5 mg/kg 每日 2 次。喂养 9 周后空腹 24 h 采血并将大鼠处死,自主动脉弓下约 1 cm 处留取动脉组织 1 cm 用 4% 甲醛溶液固定,行 HE 染色及免疫组织化学分析。球囊拉伤过程<sup>[2]</sup>: 戊巴比妥

钠 30 mg/kg 腹腔麻醉后,常规消毒,于胸骨上约 1 cm 处切开左侧颈部皮肤,分离左颈总动脉。对照组假球囊损伤手术为结扎远心端和近心端,剪断动脉,但不插球囊管;动脉粥样硬化组和法舒地尔组结扎远心端,近心端用手术线拉起阻断血流,滴硝酸甘油数滴于颈总动脉上,切开动脉前壁约 1 mm 小口,把内径为 1.5 mm,长 20 mm 球囊向近心端插入,进入约 8 cm,球囊内注入 0.2 mL 生理盐水,来回拉动 3~4 次,放水再进约 8 cm,注水、回拉,共 3 次。拔出球囊,结扎近心端。消毒、缝合皮下组织、皮肤。

### 1.4 HE 染色和免疫组织化学染色

9 周后处死动物,取主动脉全段,生理盐水冲洗后观察,自主动脉弓下约 1 cm 处留取动脉组织用 4% 甲醛溶液固定、脱水、石蜡包埋后切片,行 HE 及免疫组织化学染色。免疫组织化学染色法取制备好的切片 (厚度为 5  $\mu$ m) 分别加入抗 Rho 激酶抗体 (兔抗鼠多克隆抗体 1:150)、抗 p27Kip1 抗体 (兔抗鼠多克隆抗体,1:150),采用 SP 法, DAB 显色,脱水透明后中性树脂封固。正常对照组实验用 PBS 取代一抗,其余步骤同上,以上步骤严格按照试剂说明进行,棕黄色产物为阳性染色。每只动物检测 5 张切片,每张切片检测 5 个视野,在相同条件下,用 Motic 公司生产的 Images advanced 3.2 图像采集系统采集图像并进行分析,测定观察部位的平均光密度。阳性反应产物越深,光密度越大。各组之间取同侧相同部位的平均光密度进行比较。

### 1.5 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,行方差分析,各组均数间用 Student-Newman-Keuls 法行两两比较,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

动脉粥样硬化组大鼠因心肌梗死死亡 1 只,法舒地尔组大鼠因腹泻死亡 1 只,正常对照组大鼠无死亡。

### 2.2 动脉组织病理形态学变化

HE 染色可见正常对照组胸主动脉壁层次清晰,内皮细胞完整,中层平滑肌细胞排列正常无增殖,外层为疏松结缔组织;动脉粥样硬化组可见明显的动脉粥样硬化斑块形成,动脉内膜呈偏心性增厚,斑块内充满泡沫细胞,内膜有少量炎细胞及增殖的平滑肌细胞,中膜平滑肌细胞轻度增殖,伴有片状钙盐沉积;法舒地尔组血管内膜、中膜平滑肌细胞均无

明显增殖,其间可见少量散在的钙盐沉积和泡沫细胞(图 1)。

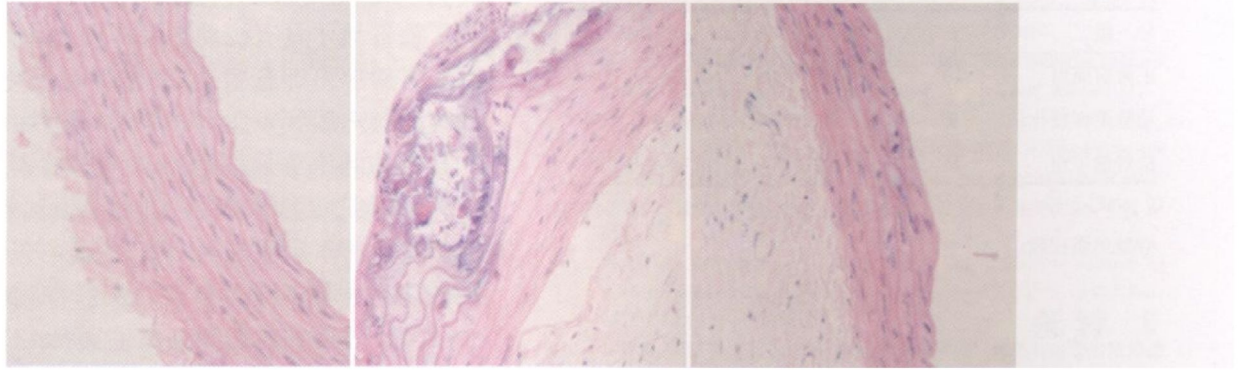


图 1 HE 染色 (×200) 从左至右为正常对照组、动脉粥样硬化组、法舒地尔组。

### 2.3 主动脉内膜、中膜 Rho 激酶的阳性表达

正常对照组内皮细胞和平滑肌细胞即有 Rho 激酶表达;动脉粥样硬化组内皮细胞、平滑肌细胞及斑块内 Rho 激酶表达明显增多,呈深褐色,部分呈

点状、片状着色;法舒地尔组内皮细胞和平滑肌细胞胞浆中 Rho 激酶表达较动脉粥样硬化组明显减少(表 1 和图 2)。

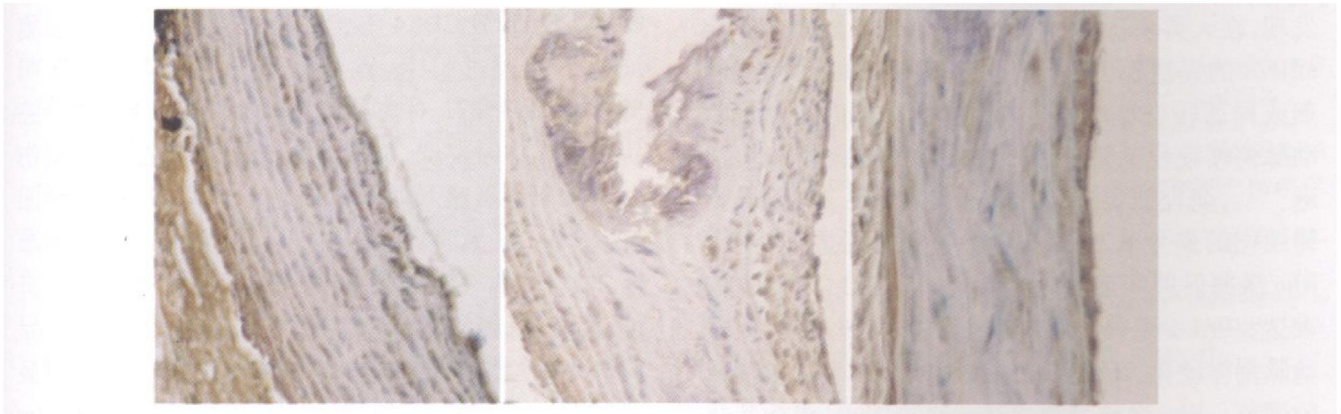


图 2 免疫组织化学染色检测 Rho 激酶表达 (×200) 从左至右为正常对照组、动脉粥样硬化组、法舒地尔组。

### 2.4 主动脉内膜 p27Kip1 蛋白的阳性表达

正常对照组内皮细胞和平滑肌细胞胞浆中可见大量 p27Kip1 蛋白阳性表达,为深褐色,呈片状着色;动脉粥样硬化组 p27Kip1 蛋白阳性表达较正常

对照组明显减少;法舒地尔组内皮细胞和平滑肌细胞胞浆中 p27Kip1 蛋白阳性表达较动脉粥样硬化组明显增加,但较正常对照组也有所减少(表 1 和图 3)。

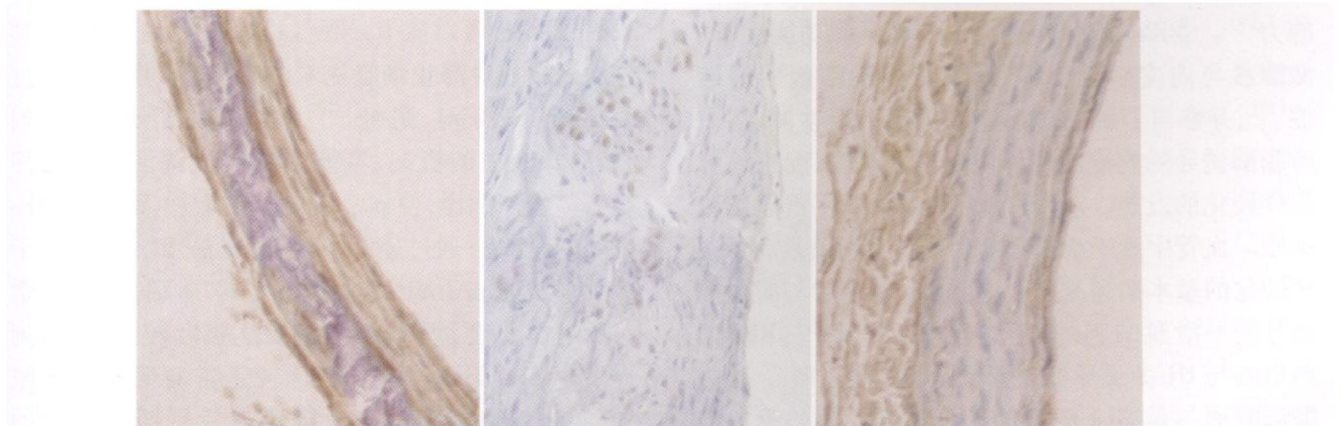


图 3 免疫组织化学染色检测 p27Kip1 蛋白表达 (×200) 从左至右为正常对照组、动脉粥样硬化组、法舒地尔组。

表 1 实验 9 周后血管组织中 Rho 激酶和 p27K ip1 蛋白的阳性表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	n	Rho 激酶	p27K ip1
正常对照组	10	0 138 ± 0 006	0 228 ± 0 008
动脉粥样硬化组	9	0 252 ± 0 011 <sup>bc</sup>	0 111 ± 0 028 <sup>bc</sup>
法舒地尔组	9	0 215 ± 0 013 <sup>a</sup>	0 189 ± 0 01 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与正常对照组比较; c 为  $P < 0.01$ , 与法舒地尔组比较。

### 3 讨论

Rho 激酶广泛分布于哺乳类动物的组织细胞中,是具有信息传导和分子开关功能的信号多肽。近年来的研究表明,AT2、ET-1、TGF 等多种血管活性物质能通过 Rho/Rho 激酶途径<sup>[3-5]</sup>影响血管平滑肌细胞的功能和结构,直接参与心血管疾病的病理过程,与动脉粥样硬化、高血压、冠状动脉痉挛、心肌缺血等主要心血管疾病的发生发展关系密切。研究发现,在人类和动物的粥样硬化血管节段 Rho 激酶 mRNA 的表达都增强<sup>[2]</sup>。长期应用 Rho 激酶抑制剂或局部转染显性失活的 Rho 激酶基因能够预防动脉粥样硬化的形成或使已经形成的粥样斑块消退<sup>[6-7]</sup>。研究证实,Rho 激酶通过以下环节对动脉粥样硬化的发生和发展起到了关键的促进作用: Rho 激酶促进纤溶酶原激活物抑制剂 1(PAI-1)的表达。PAI-1 不仅参与纤维蛋白的溶解,也能促进动脉粥样硬化、高血压及球囊损伤后新生内膜形成的调节。Rho 激酶可通过活化转录因子,包括活化蛋白 1(AP-1)、Ets 及血清反应因子(SRE)等来向上调节 PAI-1 的表达<sup>[8]</sup>。④Rho 激酶参与单核细胞向内皮下迁移。单核细胞/巨噬细胞分泌趋化因子、生长调节因子、金属蛋白酶等,它们均参与了动脉粥样硬化的发生和发展。Rho 激酶可促进单核细胞尾部的收缩,进而增强单核细胞穿越内皮细胞的能力<sup>[9]</sup>。⑤Rho 激酶降低内皮细胞屏障功能。Rho 激酶参与内皮细胞收缩,增加了内皮细胞的通透性<sup>[10]</sup>,并参与了氧化型低密度脂蛋白、凝血酶、溶血磷脂酶诱导的内皮细胞屏障功能的改变,促进动脉粥样硬化的发展。Rho 激酶促进血管平滑肌细胞增殖。血管中膜平滑肌细胞的迁移和增殖是动脉粥样硬化的基本病理改变之一。Rho 激酶参与凝血酶诱导的平滑肌细胞的 DNA 合成及迁移<sup>[11]</sup>,Rho 激酶也参与 HU-2 诱导的血管平滑肌细胞增殖<sup>[12]</sup>。盐酸法舒地尔是 Rho 激酶的特异性抑制剂。我们先前的研究已证实了盐酸法舒地尔可以通过抑制 Rho 激酶、抑制 AT1R 的表达、抑制 MCP-1 的表达和生

物活性来预防动脉粥样硬化的发生和发展<sup>[1]</sup>。本研究中,从 HE 染色和免疫组织化学染色结果也说明了法舒地尔具有抗动脉粥样硬化作用。Rho 激酶在正常对照组即有表达,动脉粥样硬化组较正常对照组动脉内膜和中膜 Rho 激酶表达均明显增多,而用盐酸法舒地尔干预后,Rho 激酶的表达明显减少,血管平滑肌细胞增殖受到抑制。但法舒地尔不能完全抑制血管平滑肌细胞增殖,由此可以推断,动脉粥样硬化是一种多因素参与的疾病,抑制其发病的一个环节不可能完全抑制其发生发展。

关于法舒地尔抗动脉粥样硬化,抑制血管平滑肌细胞增殖的机制,有文献报道是通过下调 p27K ip1 蛋白来实现的<sup>[13-14]</sup>。近年来的研究认为 p27K ip1 是血管平滑肌细胞增殖的重要抑制因子之一。p27K ip1 蛋白是细胞周期素依赖激酶抑制蛋白(CKI)家族中重要的成员之一,是非特异性的 CKI 能抑制不同的 CDK 复合物,主要抑制 CyclinE-CDK2、CyclinD-CDK4 等 G1 期复合物活性,使细胞周期不能通过 G1-S 点而阻断于 G1 期。褚现明等<sup>[15]</sup>在研究 p27 对大鼠胸主动脉球囊损伤后管腔狭窄的作用时发现,正常动脉壁显著表达 p27,损伤后中膜表达迅速下降,2 天时达最低水平,后逐渐回升;14 天、28 天时新生内膜中可见 p27 表达,并逐渐增多。Chen 等<sup>[16]</sup>在体外利用腺病毒介导将 p27K ip1 基因转染血管平滑肌细胞中,并诱导 p27K ip1 基因过度表达,结果发现 VSMC 增殖明显受抑制,使其停滞于 G0/G1 期,同时发现细胞 Cyclin A 启动子及 CDK2 活性显著下降。目前发现 p27K ip1 的作用主要通过抑制 Cyclin E-CDK2 及 Cyclin A 激酶活性使细胞停滞于 G1-S 限制点而产生的。研究发现,增殖的血管平滑肌细胞中 p27K ip1 表达水平降低可以增加 Rb 蛋白的磷酸化,而 Rb 的磷酸化为细胞进入 S 期所需。当 Rb 磷酸化时,转录因子 E2F 可以从 Rb 蛋白的抑制中脱逸出来,其过度表达诱导静止细胞从 G1 期进入 S 期。这一过程可被 p27K ip1 阻止<sup>[17]</sup>。关于法舒地尔下调 p27K ip1 蛋白的机制,可能为 Rho 激酶活性增加抑制 p27 蛋白翻译,使 p27 蛋白降解增加,而抑制 Rho 激酶的结果可通过使 3' 非编码区的 Rho 反应因子减少来增加 p27mRNA 的翻译<sup>[18]</sup>。本研究中,正常对照组血管壁 p27K ip1 蛋白表达强度较高,动脉粥样硬化组 p27K ip1 蛋白表达较正常对照组明显减少,而法舒地尔组内膜及中膜血管平滑肌细胞的 p27K ip1 蛋白表达较动脉粥样硬化组显著增高,与文献报道一致,说明 p27K ip1 蛋白是决定血管平滑

肌细胞增殖的关键调节因子之一,促进其表达将有助于治疗一系列以血管平滑肌细胞增殖为病理基础的疾病。

综上所述,p27Kip1蛋白在动脉粥样硬化平滑肌细胞增殖时表达下调,本研究结果表明 Rho/Rho激酶途径参与了动脉粥样硬化的形成过程,Rho激酶的特异性抑制剂法舒地尔具有抑制血管平滑肌细胞增殖、抗动脉粥样硬化的作用。法舒地尔抑制血管平滑肌细胞增殖的作用与抑制 Rho激酶表达及活性、使 p27Kip1蛋白表达上调有关。所以 Rho激酶抑制剂对于治疗血管内中膜增生功能紊乱方面提供一个策略,对于未来心血管疾病的治疗可能提供一个治疗途径。

#### [参考文献]

- [1] 马小欣,赵慧颖. Rho/Rho激酶途径在动脉粥样硬化中的作用及机制研究 [D/OL]. (2007-4-1) [2007-8-2]. <http://epub.edu.cn/ki.net/griid2008>
- [2] Kandabashi T, Shimokawa H, Mukai Y, et al. Involvement of Rho-kinase in agonist-induced contractions of arteriosclerotic human arteries [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; **22** (2): 243-248
- [3] Montezano AC, Callera GE, YOGIA, et al. Aldosterone and angiotensin II synergistically stimulate migration in vascular smooth muscle cells through c-Src-regulated redox-sensitive RhoA pathways [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28** (8): 1511-518
- [4] Doi T, Sakoda T, Akagami T, et al. Aldosterone induces interleukin-18 through endothelin-1, angiotensin II, Rho/Rho-kinase and PPARs in cardiomyocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; **295** (3): H1279-287
- [5] Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, et al. TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60 (c-src)/EGFR (Y845) and Rho/ROCK signaling [J]. *J Mol Cell Cardiol* 2008; **44** (3): 527-538
- [6] Funayama T, Komori K, Shimokawa H, et al. Long-term inhibition of Rho kinase suppresses intimal thickening in autologous vein grafts in rabbits [J]. *Journal of Vascular Surgery*; 2006; **43** (6): 1249-256
- [7] Nohria A, Gannert ME, Rikitake Y, et al. Rho kinase inhibition improves endothelial function in human subjects with coronary artery disease [J]. *Circ Res* 2006; **99** (12): 1426-432
- [8] Takeda K, Ichiki T, Tokunou T, et al. Critical role of Rho-kinase and MEK/ERK pathways for angiotensin II-induced plasminogen activator inhibitor type-1 gene expression [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; **21** (5): 868-873
- [9] Worthylake RA, Lemoine S, Watson JM, et al. RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration [J]. *J Cell Biol* 2001; **154** (1): 147-160
- [10] 国伟,孟建中,陈宇,等. Rho/Rho激酶信号通路与血管内皮通透性的研究 [J]. *生物医学工程研究*, 2009; **28** (2): 154-158
- [11] Alexander JS. Rho tyrosine kinase, Ca<sup>2+</sup>, and junctions in endothelial hyperpermeability [J]. *Circ Res* 2000; **87** (4): 268-271
- [12] Sauzeau V, Lemellionec E. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase [J]. *Circ Res* 2001; **88** (11): 1102-104
- [13] Kanda T, Hayashi K, Homma K, et al. Role of Rho-kinase and p27 in angiotensin II-induced vascular injury [J]. *Hypertension*, 2005; **45** (4): 724-729
- [14] Croft DR, Olson ME. The Rho GTPase effector ROCK regulates cyclin A, cyclin D1, and p27Kip1 levels by distinct mechanisms [J]. *Mol Cell Biol* 2006; **26** (12): 4612-627
- [15] 褚现明,李冰,杜日映,等. P27对大鼠胸主动脉球囊损伤后管腔狭窄的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006; **14** (5): 417-421
- [16] Chen D, Krasinski K, Sylvester A, et al. Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27Kip1, an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery [J]. *J Clin Invest* 1997; **99** (10): 2334-341
- [17] Sherr CJ. Cancer cell cycles [J]. *Science* 1996; **274** (5293): 1672-677
- [18] Sasaki Y, Sasaki Y. Inhibition of myosin light chain phosphorylation in cultured smooth muscle cells by HA1077, a new type of vasodilator [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; **171** (3): 1182-187

(此文编辑 文玉珊)