

球囊扩张术后大鼠腹主动脉钙调神经磷酸酶、血浆 MCP-1 的变化

熊龙根¹, 黎德恩¹, 董 颖²

(1. 广州医学院第二附属医院心血管内科, 广州心血管疾病研究所, 广东省广州市 510260;

2. 广州医学院生理教研室, 广东省广州市 510182)

[关键词] 狭窄; 钙调神经磷酸酶; 活化 T 细胞核因子; 单核细胞趋化蛋白 1

[摘要] **目的** 探讨大鼠腹主动脉球囊扩张术后内膜增生、钙调神经磷酸酶(calcineurin, CaN)信号通路以及炎症水平的变化。**方法** 雄性 SD 大鼠 48 只, 随机分为假手术组 24 只和球囊组 24 只。球囊损伤术后 30 天取材, 血管组织作 HE 染色, 光学显微镜观察病理学改变, 免疫组织化学检测钙调神经磷酸酶在血管壁中的表达; ELISA 法测定血清单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)水平。**结果** 球囊损伤后血管壁出现新生内膜, 形成的新生内膜厚度不均。球囊组与假手术组相比较内膜增生、内膜/中膜厚度明显增加($P < 0.05$)。免疫组织化学检测血管壁上钙调神经磷酸酶表达, 球囊组与假手术组相比表达明显增加($P < 0.05$)。血浆炎症因子血清单核细胞趋化蛋白 1 水平球囊组与假手术组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 球囊扩张术导致大鼠腹主动脉内膜增生, 同时伴随钙调神经磷酸酶蛋白表达明显增强以及血浆的炎症因子血清单核细胞趋化蛋白 1 水平升高, 提示钙调神经磷酸酶信号通路和炎症因子血清单核细胞趋化蛋白 1 可能在球囊损伤后内膜增生过程中起重要作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Alteration of Expression of Calcineurin in the Abdominal Aortas and Serum Concentrations of MCP-1 after Aortic Balloon Injury in Rats

XIONG Long-Gen¹, LI De-En¹, and DONG Qi²

(1. Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Institute of Cardiovascular Disease, Guangzhou 510260, China; 2. Department of Physiology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China)

[KEY WORDS] Stenosis; Calcineurin; Nuclear Factor of Activated T Cell; Monocyte Chemoattractant Protein-1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the alteration of expression of calcineurin in the abdominal aortas and levels of inflammatory cytokines injured by balloon in rats. **Methods** Forty-eight healthy adult male SD rats were randomly divided into two groups: sham group ($n = 24$) and balloon group ($n = 24$). Thirty days after injury, specimens were obtained from rats. HE staining and immunohistochemistry were performed to measure the expression level of CaN in arterial wall. Pathological changes of the arterial wall were observed by light microscope. The serum concentrations of MCP-1 was determined by Elisa. **Results** Intimal hyperplasia was observed in balloon injured rats, the neointima was not uniform in thickness. The thickness of the intimal layers, and the ratio of the intimal and the medial layers in the sham group was obviously lower than that in the balloon group ($P < 0.05$). Immunohistochemistry assay showed that the expression of CaN was significantly increased in balloon group compared with that in the sham group ($P < 0.05$). The serum concentrations of MCP-1 in balloon group is higher than that in sham group ($P < 0.05$). **Conclusions** Intimal hyperplasia in rat abdominal aorta following balloon injury, accompanied by the expression of CaN protein and plasma inflammatory cytokines MCP-1 levels were significantly increased, which indicated that CaN signaling pathway and MCP-1 may play an important role in intimal hyperplasia caused by balloon injury.

[收稿日期] 2011-09-27

[基金项目] 广东省医学科学技术研究基金(A2006298); 广东省科技厅科技计划项目(2010B031600140)。

[作者简介] 熊龙根, 主任医师, 心内科副主任, 硕士研究生导师, 主要从事心血管疾病的诊治及流行病学研究, E-mail 为 xionglg66@126.com。黎德恩, 现在广州医学院第四附属医院心内科工作, 医学硕士, 主要从事心血管内科临床和实验研究。董颖, 副教授, 主要从事冠心病和高血压发病机制的实验研究。

研究经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)术后再狭窄的发病机制以及寻找有效的控制措施是当前冠心病介入治疗的热点。单纯经皮冠状动脉腔内血管成形术后3~6个月内有30%~50%患者可出现手术局部的再狭窄。目前,随着药物洗脱支架的出现,再狭窄率下降至10%以下。与单纯经皮冠状动脉腔内血管成形术相比,药物洗脱支架不仅消除了弹性回缩和血管重塑,而且药物洗脱支架可在局部缓慢释放抑制血管平滑肌细胞增殖(vascular smooth muscle cell, VSMC)药物,再狭窄率明显降低。国内外均有研究表明^[1-2],钙(Ca^{2+})/钙调素(calmodulin, CaM)-CaN-活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cell, NFATc)信号通路在血管平滑肌细胞(VSMC)增殖中起作用。同时,炎症反应是PCI术后VSMC的增殖最重要的机制之一,与PCI术后再狭窄相关的炎症因子也参与CaN信号通路^[3],而CaN信号通路激活也是许多炎症反应的前提。因此我们推测CaN信号通路参与PCI后的炎症改变以及再狭窄的形成。本实验从整体动物水平探讨大鼠腹主动脉球囊扩张术后CaN信号通路以及重要的炎症因子MCP-1水平的改变,为再狭窄的防治提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立与分组

将48只体重350~450 g,10~12周的雄性SD大鼠(购自广东省实验动物监测所)随机分为假手术组($n=24$)、球囊组($n=24$)。参考文献[4]的方法,用3%戊巴比妥钠溶液按50 mg/kg腹腔注射麻醉,仰卧手术台固定。球囊组大鼠取颈部正中切口,暴露左颈总动脉,在导丝的指引下将球囊导管(1.5 mm×20 mm,雅培公司产品)自左颈总动脉插至腹主动脉末端,经体外压力泵注入生理盐水充盈球囊,保持压力为6 atm(大气压),扩张30 s,回抽球囊,间歇60 s,再将球囊导管送入,重复3次,撤出球囊,结扎近心端的左颈总动脉,切断两结扎端之间的动脉,适量庆大霉素局部喷洒手术野,缝合切口。假手术组不进行球囊扩张,其余同球囊组。术中全身肝素化(100 U/kg),术后每天庆大霉素1.5 mg/kg腹腔注射以预防感染,共3天。术中球囊组10只死亡,假手术组4只死亡。

1.2 标本收集和制备

术后30天处死实验大鼠,取材检验。大鼠麻醉后行腹腔切开,用5 mL注射器于腔静脉抽血2 mL,

将静脉血放置于2 mL EP管中,以肝素抗凝,于4℃,2000 r/min离心10 min,吸取上层血浆分装于PCR管中,每管150 μL ,保存于-80℃冰箱备用。分离腹主动脉,取出扩张血管段约1.5 cm,用1×PBS液快速清洗血管段,于4%多聚甲醛中固定24 h以上,作HE染色以及免疫组织化学。

1.3 常规病理检查

各组动物于术后30天处死,取损伤血管段,经石蜡包埋、切片,HE染色。采用光学显微镜和Image-Pro Plus 6.0图像分析系统对各组HE染色切片分别测量血管内膜和中膜横断面的厚度,计算内膜/中膜厚度,以内弹力膜、外弹力膜区别内膜和中膜。

1.4 免疫组织化学染色

CaN抗体购自ABCAM公司,SP试剂盒购自河北博海生物工程开发有限公司。石蜡切片(5 μm)后,用SP法进行CaN(一抗稀释度1:150)的免疫组织化学染色。细胞质中出现棕褐色处为阳性信号。利用Image-Pro Plus 6.0图像分析系统,测定平均光密度值以表示阳性产物的强度,平均值越大,其阳性反应产物表达强度越强,表明蛋白的含量越高。

1.5 ELISA检测血浆大鼠单核细胞趋化蛋白1

取上述冻存的大鼠血浆,ELISA法检测MCP-1水平。具体操作按试剂盒说明进行(购自R&D公司)。将待测样品(10 μL)加入待测样品孔,再加样本稀释液40 μL ,37℃30 min,洗涤后加酶标工作液50 μL ,于37℃孵育30 min,洗板后每孔先加入显色液A 50 μL ,再加入显色液B 50 μL ,用手轻轻震荡混匀30 s,37℃避光显色15 min。取出酶标板,每孔加终止液50 μL ,终止反应(颜色由蓝色立转黄色)。以空白孔调零,在终止反应后15 min内,酶标仪上用450 nm波长测量各孔的吸光值(OD值)。根据标准品的浓度及对应的OD值,计算出标准曲线的直线回归方程,再根据样本的OD值,在回归方程上计算出对应的样本浓度。最终浓度为实际测量浓度乘以稀释倍数。

1.6 统计分析

运用SPSS 13.0统计软件处理实验数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析并作样本均数两两比较的T检验。 $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 病理形态学变化

HE染色镜下观察与图像分析见假手术组血管

壁厚度均一,内、外弹力板清晰、完整,内皮细胞排列整齐匀称,中膜 VSMC 核呈梭形,内皮层下未见有

VSMC 迁入。球囊组显示血管壁新生内膜显著增生,厚度不均,细胞外基质增加(图 1 和表 1)。

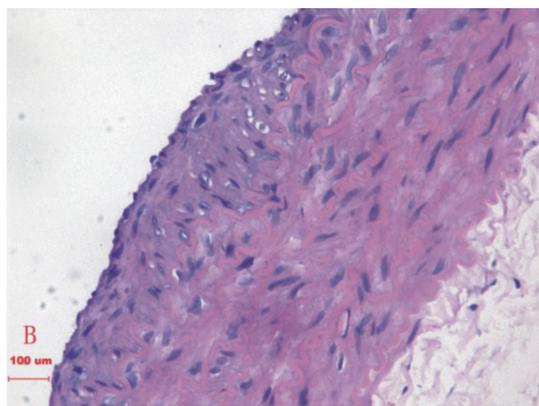
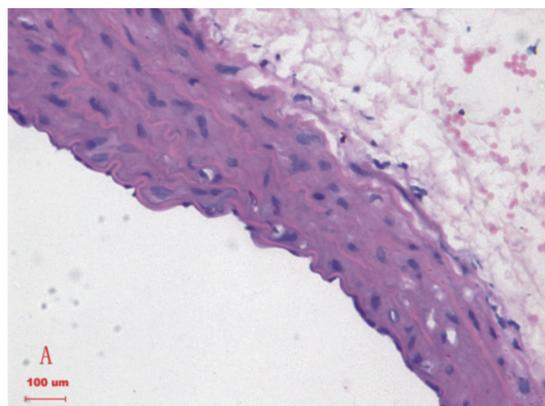


图 1. 血管的 HE 染色结果(×400) A 为假手术组,B 为球囊组。黑色箭头所示为内弹力膜,黄色箭头所示为外弹力膜,黑色线条表示内膜厚度。

Figure 1. HE staining of blood vessels (×400)

表 1. 血管球囊损伤后各组动物内膜增生情况($\bar{x} \pm s$)

Tabal 1. Intimal hyperplasia following balloon injury in each goup($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	平均内膜厚度(μm)	平均中膜厚度(μm)	内膜厚度/中膜厚度
假手术组	20	9.69 ± 1.72	309.29 ± 45.38	0.03 ± 0.01
球囊组	14	197.62 ± 48.99 ^a	384.52 ± 52.68	0.51 ± 0.08 ^a

a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较。

高于假手术组($P < 0.05$;表 3)。

表 2. 各组血管壁 CaN 免疫组织化学检测结果($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The CaN immunohistochemistry results on vessel wall in all groups ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	平均光密度($\times 10^{-3}$)
假手术组	20	6.12 ± 3.55
球囊组	14	44.32 ± 25.09 ^a

a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较。

2.2 各组免疫组织化学检测结果

假手术组血管壁 CaN 少量表达。球囊组血管中膜和内膜 VSMC 细胞大部分细胞内出现棕褐色颗粒(图 2),球囊组 CaN 的平均光密度值比假手术组显著增加($P < 0.05$;表 2)。

表 3. 血浆 MCP-1 的水平($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Plasma levels of MCP-1($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	MCP-1(ng/L)
假手术组	20	423.05 ± 66.13
球囊组	14	813.20 ± 110.02 ^a

a 为 $P < 0.05$,与假手术组比较。

2.3 各组大鼠血浆 MCP-1 的水平

经球囊损伤后,大鼠血浆的 MCP-1 水平明显

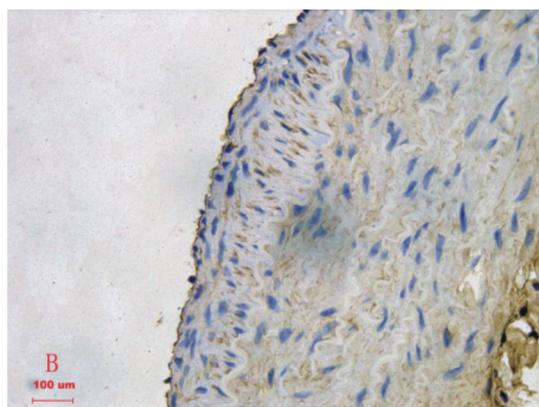
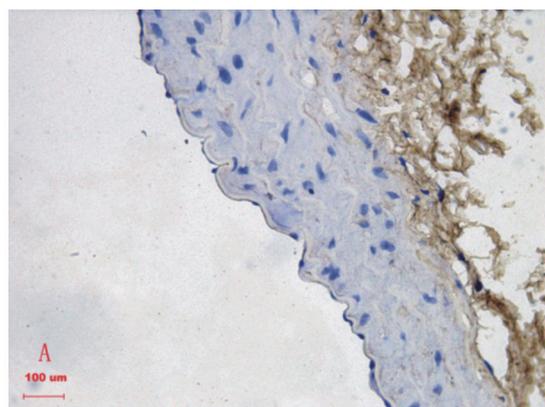


图 2. 大鼠腹主动脉 CaN 免疫组织化学结果(×400) A 为假手术组,B 为球囊组。

Figure 2 CaN Immunohistochemical staining in rat abdominal aorta(×400)

3 讨论

CaN 是目前所知的唯一依赖于 Ca^{2+}/CaM 的丝氨酸/苏氨酸 (Serine/Threonine, Ser/Thr) 磷酸酶, 是由 1 个相对分子质量为 59 000 的催化亚基 Calcineurin A (CnA) 和 1 个相对分子质量 19 000 的调节亚基 Calcineurin B (CnB) 组成的异二聚体。CaN 在全身组织广泛分布, 在神经组织及 T 淋巴细胞中含量特别丰富, 在心脏及骨骼肌中较高表达, 肺、脾脏、肾、子宫、血小板及肝组织中均存在, 血管组织中亦存在 CaN 分布, 提示 CaN 可能对血管平滑肌存在重要的生理作用。NFATc 分为 NFATc1、(NFAT2/c)、NFATc2 (NFAT1/p)、NFATc3 (NFAT4/x)、NFATc4 (NFAT3) 及 NFAT5 等 5 个成员。CaN 一旦激活, 即与 NFATc 结合并使之脱磷酸化, NFATc 则从胞浆转入胞核, 与核内其他转录因子协同调节多种基因的活化。

血管损伤后出现的持续炎症和 VSMC 迁移、增殖被认为是 PCI 术后再狭窄的关键因素, 局部的炎症细胞与受损内皮细胞协同作用, 不但可促发血小板黏附、血栓形成, 还可释放多种生物活性物质刺激内皮、VSMC 增殖及胶原增生^[5]。炎症因子的表达必需依赖于 CaN 信号通路的激活^[6]。MCP-1 是 PCI 术后再狭窄起重要作用的一种炎症因子, 由单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞和 VSMC 等分泌, 在炎性的发生发展中起着重要的作用, 它对单核细胞、巨噬细胞、嗜碱性粒细胞有趋化和激活作用, 聚集的单核/巨噬细胞又可进一步促进 MCP-1 生成。当血管内皮细胞损伤时可使 MCP-1 分泌增多, 趋化单核/巨噬细胞至血管损伤处。单核/巨噬细胞在损伤动脉的新生内膜中浸润, 可合成分泌大量炎症细胞因子和生长因子, 刺激中膜 VSMC 向内膜移行、增殖, 并产生大量细胞外基质, 导致新生内膜形成及再狭窄。此外, MCP-1 可调节血管内皮细胞粘附分子的表达, 并直接诱导 VSMC 迁移和增殖, 从而参与再狭窄的形成。Kensuke 等^[7]用抗 MCP-1 基因 (7ND) 洗脱支架植入兔和猴的颈动脉后, 发现与置入裸支架的相比, 可明显减轻内膜增生, 而未显现副作用。Norihiito 等^[8]发现 PCI 术后再狭窄的患者血浆 MCP-1 水平较没有再狭窄的明显升高。本课题结果表明, 大鼠腹主动脉损伤后, 有显著新生内膜形成。免疫组织化学检测发现: 球囊组血管组织 CaN 表达显著增加, 提示腹主动脉球囊扩张术后内膜增生与 CaN 信号通路激活相关。同时 ELISA 检查发现球囊组的

大鼠外周血 MCP-1 与假手术组相比较, 明显增高, 而之前 Hiroshi 等^[9]已在离体实验中证明 CaN 信号通路在 VSMC 激活后能诱导 MCP-1 mRNA 的表达及 MCP-1 蛋白的生成, 提示球囊损伤血管后, CaN 在血管中被激活, 诱导炎症因子如 MCP-1 的产生, 从而吸引单核/巨噬细胞聚集到损伤动脉的新生内膜中, 致使中膜 VSMC 向内膜移行、增殖。

综上所述, 本实验从整体动物水平证明球囊扩张术后动脉管腔狭窄与 CaN 信号通路活化有关, 其可能通过参与炎症反应, 如促进血浆的炎症因子 MCP-1 生成从而介导损伤血管 VSMC 迁移和增殖。CaN 信号通路在 PCI 术后再狭窄中的作用的阐明, 以及对 CaN 作用机制的深入研究, 对进一步认识 PCI 术后再狭窄具有重要意义, 更为临床 PCI 术后再狭窄的防治新措施提供了一条新的思路。

[参考文献]

- [1] Jabr RI, Wilson AJ, Riddervold MH, et al. Nuclear translocation of calcineurin Abeta but not calcineurin Aalpha by platelet-derived growth factor in rat aortic smooth muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292 (6): C2 213-225.
- [2] 郑红花, 李映红, 罗德生, 等. 川芎嗪对血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖的抑制作用及机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14 (4): 301-303.
- [3] Yu H, Sliedregt-Bol K, Overkleeft H, et al. Therapeutic potential of a synthetic peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells as antirestenotic agent [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26 (7): 1 531-537.
- [4] 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.
- [5] Inoue T, Node K. Molecular basis of restenosis and novel issues of drug-eluting stents [J]. *Circ J*, 2009, 73 (4): 615-621.
- [6] Zhang W, Wei Q. Calcineurin stimulates the expression of inflammatory factors in RAW 264.7 cells by interacting with proteasome subunit alpha type 6 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 407 (4): 668-673.
- [7] Egashira K, Nakano K, Ohtani K, et al. Local delivery of anti-monocyte chemoattractant protein-1 by gene-eluting stents attenuates in-stent stenosis in rabbits and monkeys [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27 (12): 2 563-568.
- [8] Inami N, Nomura S, Shimazu T, et al. Adiponectin incompletely prevent MCP-1-dependent restenosis after percutaneous coronary intervention [corrected] in patients with coronary artery disease [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2007, 24 (3): 267-273.
- [9] Satonaka H, Suzuki E, Nishimatsu H, et al. Calcineurin promotes the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in vascular myocytes and mediates vascular inflammation [J]. *Circ Res*, 2004, 94 (5): 693-700.

(此文编辑 李小玲)