

整合素 β_3 在大鼠腹主动脉瘤中的表达及意义

武亚丽, 周洪莲, 郑红波, 童雪影

(华中科技大学同济医学院附属同济医院老年病科, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 腹主动脉瘤; 整合素 β_3 ; 动物模型

[摘要] **目的** 观察整合素 β_3 在大鼠腹主动脉瘤模型中的表达情况, 探讨其在腹主动脉瘤发病中的意义。**方法** 弹力蛋白酶灌注法构建大鼠腹主动脉瘤模型并测量腹主动脉直径, 计算直径扩张度; HE 染色观察主动脉病理改变; 免疫组织化学技术和实时定量 PCR 技术分别从蛋白水平和基因水平检测主动脉组织中整合素 β_3 的相对表达量。**结果** 腹主动脉瘤组主动脉扩张度明显高于生理盐水组和正常组 (3.689 ± 0.443 比 1.175 ± 0.159 和 1), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HE 染色腹主动脉瘤组主动脉结构紊乱并有炎症细胞浸润; 免疫组织化学结果显示整合素 β_3 在腹主动脉瘤组、生理盐水组和正常组中的表达分别为 0.33 ± 0.07 、 0.20 ± 0.06 和 0.19 ± 0.07 ($P < 0.05$); 整合素 β_3 mRNA 在以上三组的相对表达量为 36.23 ± 5.65 、 1.14 ± 0.30 和 1, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 整合素 β_3 的高表达可能参与腹主动脉瘤的发生发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Significance and Expression of Integrin β_3 in Rat Model of Abdominal Aortic Aneurysm

WU Ya-Li, ZHOU Hong-Lian, ZHENG Hong-Bo, and TONG Xue-Ying

(Department of Geriatrics, Tongji Hospital, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

[KEY WORDS] Abdominal Aortic Aneurysm; Integrin β_3 ; Animal Model

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expression of integrin β_3 by making rat model of abdominal aortic aneurysm and explore the significance of integrin β_3 in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm. **Methods** Making a rat model of abdominal aortic aneurysm and measuring the diameter of all aortas then calculating their extended rate of the aorta. HE staining was used to observe the change of pathology. Immunohistochemistry and real time PCR were used to detect the expression of integrin β_3 from the level of protein and gene. **Results** Rat model of abdominal aortic aneurysm was successfully made. Compared with saline group and normal group (1.175 ± 0.159 and 1), the extended rate of experimental group (3.689 ± 0.443) was obviously rising and the infiltration of inflammatory cell was more apparent ($P < 0.05$). Immunohistochemistry showed that the expression of integrin β_3 in experimental group, saline group and normal group were 0.33 ± 0.07 , 0.20 ± 0.06 and 0.19 ± 0.07 ($P < 0.05$); Real time PCR showed the expression of integrin β_3 mRNA in experimental group, saline group and normal group were 36.23 ± 5.65 , 1.14 ± 0.30 and 1 ($P < 0.05$).

Conclusions The increasing expression of integrin β_3 may participate in the occurrence and development of experimental abdominal aneurysms.

各种原因引起的局部腹主动脉永久性扩张, 且扩张的腹主动脉直径超过正常腹主动脉的 2 倍或其直径 ≥ 3 cm 时, 称为腹主动脉瘤 (abdominal aortic aneurysm, AAA)。在发达国家, 腹主动脉瘤在 65 ~

85 岁老年人群中的发病率约为 1.3%, 而其中 90% 伴有粥样硬化改变, 并且瘤体一旦破裂其死亡率高达 50% ~ 80%^[1]。在我国随着人们生活水平的提高和饮食结构的改变, 腹主动脉瘤的发病率也呈逐

[收稿日期] 2012-12-26

[基金项目] 湖北省武汉市科技攻关计划项目 (200862123565)

[作者简介] 武亚丽, 硕士, 研究方向为腹主动脉瘤的发病机制, E-mail 为 wuji3399@163.com。通讯作者周洪莲, 硕士生导师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为腹主动脉瘤的发病机制, E-mail 为 zhouhonglian63@yahoo.com.cn。郑红波, 硕士, 研究方向为骨桥蛋白对大鼠腹主动脉血管平滑肌细胞内信号通路的作用机制, E-mail 为 zheng1283@163.com。

年上升趋势。整合素 (integrin) 是一大类跨膜蛋白家族, 主要由 α 、 β 两个亚基通过非共价键连接而成的异二聚体, 目前已发现 24 种不同的整合素分子。其主要的生理作用是调节信号转导和介导细胞与细胞外基质、细胞与细胞的黏附以及参与炎症反应及损伤修复。本研究主要探讨整合素 β_3 在大鼠腹主动脉瘤模型中的表达及意义。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

猪胰弹力蛋白酶 (E1250) 购自美国 Sigma 公司; 整合素 β_3 一抗为小鼠源, 购自 Epitomics 公司 (2264-1); Trizol 试剂购自北京 Aidlab 公司; 免疫组织化学试剂盒 (KIT-9901) 购自福州迈新生物科技有限公司。

1.2 动物与饲料

选用 7~8 周龄的 SPF 级雄性 SD 大鼠 (质量合格证编号: 4209800160) 30 只, 体重为 250~300 g, 给予标准大鼠饲料喂养, SD 大鼠及饲料均购自华中科技大学同济医学院实验动物中心。

1.3 大鼠腹主动脉瘤模型的建立^[2]

将 30 只大鼠随机分为三组: 正常组、生理盐水组和腹主动脉瘤组, 每组 10 只。腹主动脉瘤组大鼠以 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) 腹腔麻醉, 常规消毒, 剖腹, 并于 10 倍体视显微镜 (天津医用光学仪器厂) 下游离肾静脉水平以下腹主动脉约 1 cm, 测量腹主动脉直径 (d_1)。以 6~0 丝线于肾静脉水平下端及腹主动脉髂动脉分叉处分别结扎, 插入 PE-10 导管, 并将猪胰弹力蛋白酶灌入结扎段的腹主动脉中, 持续约 20 min 后将浸有氯化钙溶液的小纱布覆盖于灌注段的腹主动脉上, 持续约 10 min 后, 取出纱布, 拔出 PE-10 导管, 以 8~0 丝线缝合造口处, 松开结扎处, 合腹, 以 2~0 丝线缝合腹部切口。术后肌注青霉素 3 天抗感染, 常规饮水、进食。生理盐水组大鼠于灌注中给予生理盐水, 余操作同腹主动脉瘤组的处理方法。

术后 14 天, 再次以 10% 水合氯醛腹腔麻醉大鼠, 剖腹, 游离大鼠腹主动脉并测量其直径 (d_2), 以 d_2/d_1 计算出大鼠腹主动脉的直径扩张度, 随后取出腹主动脉组织。

1.4 HE 染色及免疫组织化学法

将 4% 多聚甲醛固定完全的主动脉组织标本经脱水、透明、石蜡包埋、切片后, 行常规苏木精-伊红

(HE) 染色, 整合素 β_3 的检测按免疫组织化学试剂盒说明书进行操作。结果判定: 整合素 β_3 的免疫组织化学结果以细胞膜或细胞质中出现棕黄色颗粒为阳性表达; 在光学显微镜的高倍镜 (400 \times) 下随机取 5 个视野, 观察照相, 用 Image-Pro Plus 图像分析系统对每张切片的免疫反应产物进行半定量分析; 每个视野的结果以平均光密度 (mean density = IOD SUM/area) 表示, 每张切片的 5 个视野取平均值作为该片的平均光密度。

1.5 实时定量 PCR 测定整合素 β_3 的 mRNA 表达

引物由 Primer 5.0 软件设计, 并由 Invitrogen 公司合成。整合素 β_3 引物为上游 5'-TGA-CATCGAGCTGTTGAAAG-3', 下游 5'-GAGTAG-CAAGGCCAATGAGC-3', 扩增片长 224 bp; β -actin 作为内参, 其引物为上游 5'-CGTTGACATCCGTA-AAGACCTC-3', 下游 5'-TAGGAGCCAGGGCAGTA-ATCT-3', 扩增片长 110 bp。用 TRIzol 试剂消化并充分匀浆腹主动脉组织以提取 RNA, 依照逆转录试剂盒说明书, 取 RNA 溶液 5 μ L 在逆转录酶作用下合成 cDNA。然后以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR。反应体系及参数为 5 μ L cDNA, 整合素 β_3 上下游引物各 0.4 μ L, 总反应体系为 25 μ L。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 20 s, 共 40 个循环, 进行荧光检测, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 进行分析。

1.6 统计学处理

采用 SPSS18.0 软件进行统计学处理, 计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。两变量间的相关性采用 Spearman's 相关分析, 以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 直径扩张度

腹主动脉直径扩张度为手术后 14 天腹主动脉直径 (d_2)/术前直径 (d_1), 此比值 ≥ 2 为模型构建成功的客观指标。术后腹主动脉瘤组大鼠死亡 1 只, 生理盐水组大鼠全部存活; 腹主动脉瘤组大鼠直径扩张度均达到诊断为腹主动脉瘤的标准, 而生理盐水组大鼠腹主动脉直径虽然也有轻微扩张, 但尚未达到诊断标准。腹主动脉瘤组大鼠术后直径扩张度 (3.689 ± 0.443) 明显大于生理盐水组 (1.175 ± 0.159) 和正常组 (1) ($P < 0.01$), 而生理盐水组与正常组比较差异无统计学意义 ($P = 0.148$; 图 1)。

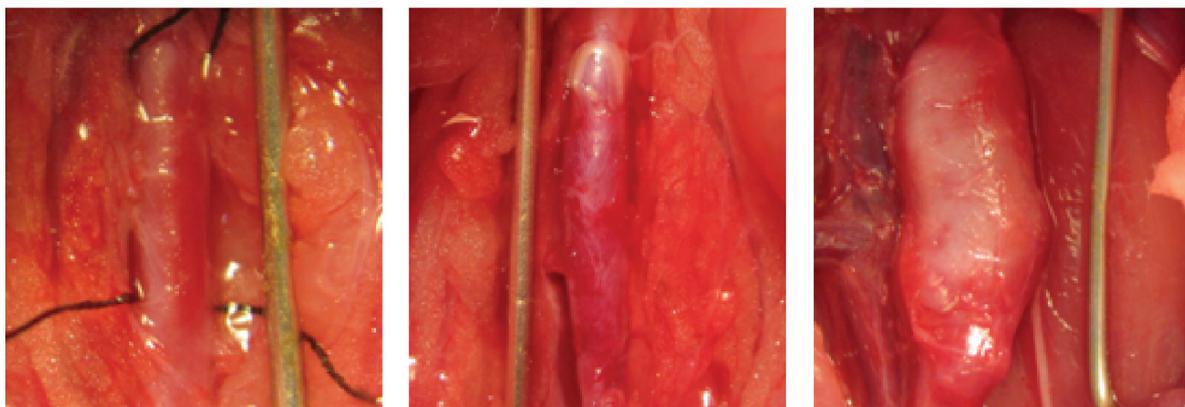


图 1. 三组大鼠腹主动脉直径扩张度 ($\times 10$) 从左至右依次为正常组、生理盐水组和腹主动脉瘤组。

Figure 1. The extended rate of rats abdominal aortic diameter of three groups ($\times 10$)

2.2 HE 染色结果

HE 染色结果发现,腹主动脉瘤组主动脉壁破坏明显,内、中、外膜三层结构分界不明显,平滑肌细胞发生萎缩、变性、排列紊乱,弹性纤维降解,胶原纤维大量增生,炎症细胞浸润较多;生理盐水组

主动脉壁有轻微改变,内、中、外膜三层结构分界较清晰,平滑肌细胞有轻微结构异常;正常组主动脉壁结构清晰,内皮细胞、平滑肌细胞及胶原纤维等结缔组织排列整齐(图 2)。

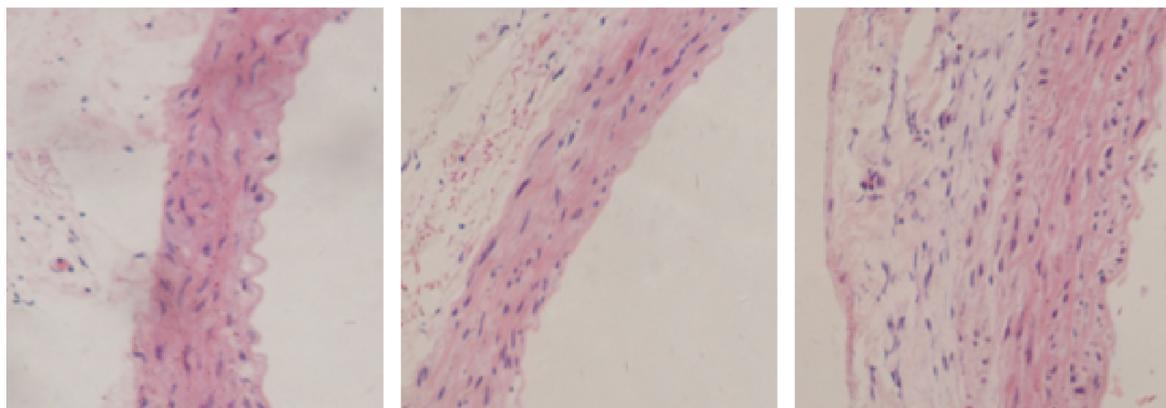


图 2. 三组大鼠腹主动脉组织 HE 染色结果 ($\times 100$) 从左至右依次为正常组、生理盐水组和腹主动脉瘤组。

Figure 2. The HE staining results of rats abdominal aorta tissue of three groups ($\times 100$)

2.3 免疫组织化学法检测整合素 β_3 表达水平

整合素 β_3 在生理盐水组有少量表达,而在正常组中微量表达或不表达,在腹主动脉瘤组中整合素 β_3 的表达明显增多。经分析,与生理盐水组和正常组相比,腹主动脉瘤组整合素 β_3 的表达差异均具有统计学意义,而生理盐水组与正常组相比其整合素 β_3 的表达差异无统计学意义(表 1 和图 3)。

2.4 实时定量 PCR 检测整合素 β_3 的 mRNA 表达水平

溶解曲线显示,内参和整合素 β_3 都只有一个尖锐的峰,说明扩增产物稳定正确,数据可以采用。扩增曲线显示,腹主动脉瘤组的 Ct 值(每个反应管内的荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数)明显低

于生理盐水组和正常组,经计算整合素 β_3 mRNA 在腹主动脉瘤组大鼠腹主动脉中的表达明显高于生理盐水组和正常组,其差异均具有统计学意义($P < 0.001$),而生理盐水组与正常组之间整合素 β_3 mRNA 的表达差异无统计学意义($P = 0.924$;表 1)。

表 1. 整合素 β_3 蛋白及 mRNA 表达水平

Table 1. The protein and mRNA levels of integrin β_3

分 组	n	蛋白	mRNA
正常组	10	0.19 \pm 0.07	1
生理盐水组	10	0.20 \pm 0.06	1.14 \pm 0.30
腹主动脉瘤组	9	0.33 \pm 0.07 ^{ab}	36.23 \pm 5.65 ^{ab}
F		13.403	389.840
P		0.000	0.000

a 为 $P < 0.05$, 与正常组比较; b 为 $P < 0.05$, 与生理盐水组比较。

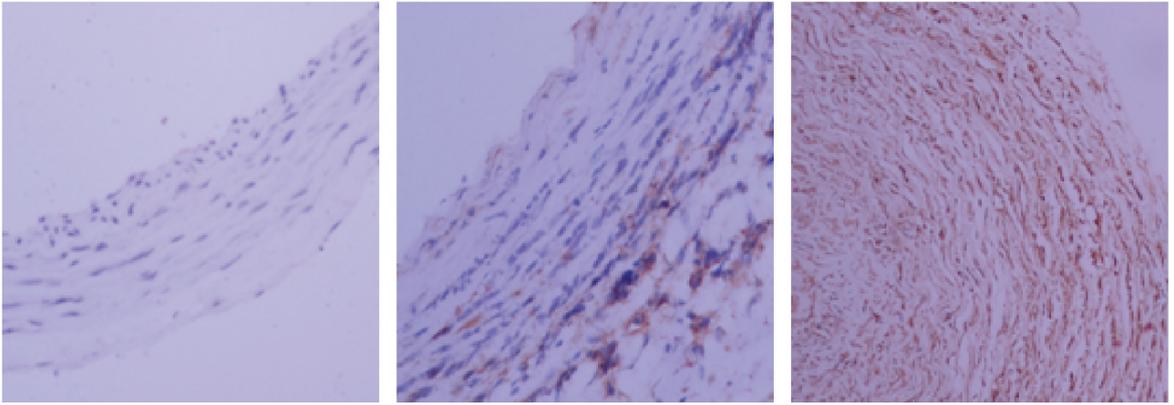


图 3. 整合素 β_3 在三组大鼠腹主动脉组织中的表达 ($\times 100$)

从左至右依次为正常组、生理盐水和腹主动脉瘤组。

Figure 3. The expression of integrin β_3 in rats abdominal aorta tissue of three groups ($\times 100$)

2.5 相关性分析

整合素 β_3 免疫组织化学结果的平均光密度与腹主动脉直径扩张度的散点图基本成线性相关, 统计分析显示呈正相关关系 ($r = 0.689, P < 0.001$); 整合素 β_3 mRNA 表达与腹主动脉直径扩张度的散点图也成线性相关, 统计分析显示呈正相关关系 (r

$= 0.967, P < 0.001$; 图 4) (其中 R^2 为拟合优度, 该值越大, 自变量对因变量的解释程度越高, 自变量引起的变动占总变动的百分比越高, 观察点在回归直线附近越密集)。因此无论从基因水平还是从蛋白水平均证明, 整合素 β_3 在腹主动脉组织中表达增高可能致使其发生扩张。

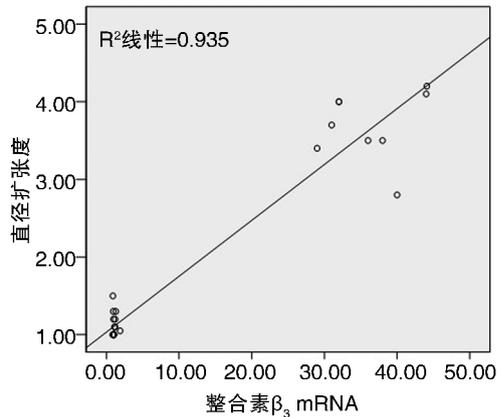
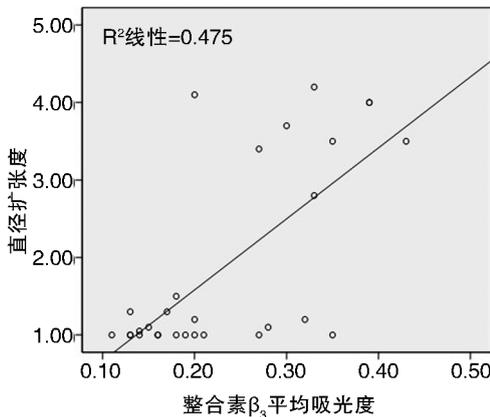


图 4. 整合素 β_3 的相对表达量与直径扩张度相关性拟合直线

Figure 4. The fitting curve of integrin β_3 relative expression levels and expansion rates

3 讨论

腹主动脉瘤是最常见的主动脉扩张性病变。近年的研究表明, 腹主动脉瘤是环境、遗传、生物化学等多种因素共同作用的结果。各种病因导致血管壁受损, 免疫反应被激活, 引起局部炎症细胞浸润、血管平滑肌细胞凋亡、细胞外基质代谢失衡及病理性重构, 最终导致动脉中膜受损, 动脉壁失去弹性, 不能耐受血流冲击逐渐膨大形成动脉瘤^[3]。因此引起人腹主动脉瘤发生的主要病理改变有炎症细胞浸润、弹性蛋白降解、胶原蛋白增加和平滑

肌细胞凋亡四方面, 本研究所用的动物模型基本符合人腹主动脉瘤的病理改变过程, 其中血管平滑肌细胞的凋亡和细胞外基质代谢失衡是腹主动脉瘤发病过程中极为关键的环节之一。

整合素 β_3 作为跨膜蛋白异二聚体家族中的一员, 在多个物种及细胞中均有表达, 其可以介导细胞与细胞之间、细胞与细胞外基质之间的相互作用, 而这种相互作用在维持组织的完整性, 促进细胞迁移、黏附和分化等方面都有极为重要的生物学作用; 除此之外, 整合素 β_3 在胚胎时期组织的发育、血管生成, 后期的伤口愈合以及血栓形成中也发挥

了较大的作用^[4,5]。近年来越来越多的研究发现,整合素 β_3 在一些心血管疾病中也有不同程度的表达。Panchatcharam 等的研究^[6]发现,在高糖条件下血管受到损伤后,整合素 β_3 可以通过介导相关的信号通路来增强血管平滑肌细胞的增殖和迁移。Xi 等的研究^[7]证实,胰岛素样生长因子可以促进整合素 β_3 在小鼠平滑肌细胞表面表达,高表达的整合素 β_3 通过促进细胞内 MAK 激酶的激活反过来增强血管平滑肌细胞与细胞外基质的相互作用,进而促使细胞增殖和迁移。Shewchuk 等^[8]也证实,在心肌肥厚的代偿期,整合素 β_3 在氧化应激条件下可以高表达并且抑制细胞凋亡,调节心肌重塑。

由于在腹主动脉瘤的发病过程中,平滑肌细胞的凋亡和细胞外基质的代谢失衡是关键环节之一,而整合素 β_3 可以介导细胞与细胞之间,以及细胞与细胞外基质之间的相互作用,并且在某些心血管疾病中也发现其可以介导平滑肌细胞与细胞外基质之间的相互作用。从而我们有理由推测:整合素 β_3 可能在腹主动脉瘤的发生发展中发挥了重要的作用。本实验也初步证实:在成功制作的大鼠腹主动脉瘤模型中,整合素 β_3 无论从基因水平还是从蛋白水平均明显高表达;同时整合素 β_3 的表达与腹主动脉的直径扩张度呈正相关性。因此,在腹主动脉瘤的发生发展中,各种细胞因子作为配体可能与分布在细胞膜上的整合素 β_3 相结合,进而激活一系列的细胞内信号通路分泌一些生物因子,或促进细胞外基质的代谢失衡^[9,10],或调节平滑肌细胞的形态结构和细胞周期^[11],最终使得细胞壁结构发生改变难以承受血流压力而扩张。

综上所述,整合素 β_3 在腹主动脉瘤的发生发展中可能起到了重要作用,日后的研究中可以考虑在大鼠腹主动脉瘤模型中使用整合素 β_3 的抑制剂或抗体来控制瘤体形成和扩张,旨在为腹主动脉瘤的内科保守治疗提供新思路。

[参考文献]

[1] Golledge J, Muller J, Daugherty A, et al. Abdominal aor-

tic aneurysm: pathogenesis and implications for management[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(12): 2 605-613.

[2] Azuma J, Asagami T, Dalman R, et al. Creation of murine experimental abdominal aortic aneurysms with elastase[J]. *J Vis Exp*, 2009, 13(29): 1 280.

[3] 许文平, 邱健, 丁力. 腹主动脉瘤发病机制及内科治疗进展[J]. *实用医学杂志*, 2006, 22(9): 3.

[4] Switala-Jelen K, Dabrowska K, Opolski A, et al. The biological functions of beta3 integrins[J]. *Folia Biol (Praha)*, 2004, 50(5): 143-152.

[5] 唐仁泓, 龙剑锋, 陈百华. 整合素 $\alpha v\beta_3$ 、组织因子及血管内皮细胞生长因子在实验性脉络膜新生血管中的表达[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2009, 34(8): 762-767.

[6] Panchatcharam M, Miriyala S, Yang F, et al. Enhanced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in response to vascular injury under hyperglycemic conditions is controlled by beta3 integrin signaling[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(6): 965-974.

[7] Xi G, Maile LA, Yoo SE, et al. Expression of the human beta3 integrin subunit in mouse smooth muscle cells enhances IGF-I-stimulated signaling and proliferation[J]. *J Cell Physiol*, 2008, 214(2): 306-315.

[8] Shewchuk LJ, Bryan S, Ulanova M, et al. Integrin beta3 prevents apoptosis of HL-1 cardiomyocytes under conditions of oxidative stress[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(3): 324-330.

[9] Mi T, Nie B, Zhang C, et al. The elevated expression of osteopontin and NF-kappaB in human aortic aneurysms and its implication[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2011, 31(5): 602-607.

[10] Schweitzer M, Mitmaker B, Obrand D, et al. Atorvastatin modulates matrix metalloproteinase expression, activity, and signaling in abdominal aortic aneurysms[J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2010, 44(2): 116-122.

[11] McCormick ML, Gavrila D, Weintraub NL. Role of oxidative stress in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(3): 461-469.

(此文编辑 许雪梅)