

Caveolin-1 对血管吻合口白细胞介素 10 和白细胞介素 6 表达的影响

熊国祚¹, 戴先鹏¹, 毕国善¹, 申 昕¹, 邓礼明¹, 颜亚平¹, 虞勤慧²

(1. 湖南省衡阳市南华大学附属第二医院血管外科, 湖南省衡阳市 421001; 2. 湖南中医药大学医学院, 湖南省长沙市 410000)

[关键词] 小凹蛋白; 白细胞介素 6; 白细胞介素 10; 吻合口

[摘 要] **目的** 建立兔颈总动脉血管吻合口狭窄模型,并用局部转染小凹蛋白(Caveolin-1)质粒,观察血管吻合口部位 Caveolin-1 对白细胞介素 10(IL-10)和白细胞介素 6(IL-6)表达的影响。**方法** 从南华大学动物中心取成年家兔 32 只,行颈总动脉血管吻合术,运用脂质体局部转染 Caveolin-1 质粒,随机分为 4 组:正常组(假手术组)、手术组、手术+空转染组、手术+转染组。分别于 7 天及 28 天取颈总动脉标本,通过 HE 染色观察内膜增生情况,并测量内膜与中膜面积比值(IA/MA);实时荧光定量 PCR 检测血管中 Caveolin-1 和 IL-6、IL-10 mRNA 的表达,免疫组织化学观察血管组织中 IL-6、IL-10 蛋白的表达。**结果** HE 染色显示,手术组及空转染组内膜明显增殖,管壁增厚,管腔缩小;而转染组未见明显内膜增殖及管壁增厚;从血管内膜/中膜面积比值发现,转染组比手术组明显降低;血管吻合手术后,抗炎因子 IL-10 和促炎因子 IL-6 都升高。当吻合口部位 Caveolin-1 基因高表达时,IL-10 mRNA 和蛋白表达都上调,而 IL-6 mRNA 和蛋白表达都减少。**结论** Caveolin-1 促使血管吻合口部位炎症因子的平衡向抑炎因子倾斜。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effect of Caveolin-1 on the Expression of Interleukin-10 and Interleukin-6 in Vascular Anastomotic Stoma

XIONG Guo-Zuo¹, DAI Xian-Peng¹, BI Guo-Shan¹, SHEN Xin¹, DENG Li-Ming¹, YAN Ya-Ping¹, and TUO Qin-Hui²
(1. The Second Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Medical College, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410000, China)

[KEY WORDS] Caveolin-1; Interleukin 6; Interleukin 10; Anastomotic Stoma

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of the caveolin-1 on the expression of interleukin-10(IL-10) and interleukin-6(IL-6) in rabbit carotid artery anastomotic stoma. **Methods** 32 New Zealand white rabbits were randomly divided into sham operation group, operation group, empty vector group and caveolin-1 transfected group. The rest specimens were taken for HE staining at 7 d and 28 d, which were used to observe the proliferation of intima, and the ratio of intima/media area was measured by Image-Pro Plus 6.0 software; Real time PCR was used to detect the mRNA, and immunohistochemistry was used to assay the expression of protein. **Results** Anti-inflammatory cytokine IL-10 and pro-inflammatory cytokine IL-6 were increased by carotid artery end-to-end-intestinal anastomosis. Local transfected caveolin-1 plasmid can increase the expression of caveolin-1 mRNA in rabbit carotid artery anastomotic stoma. Compared with other groups, the mRNA and protein of IL-10 were increased in caveolin-1 transfected group. However, IL-6, a potent pro-inflammatory cytokine, was decreased in caveolin-1 transfected group. **Conclusion** Caveolin-1 promotes anti-inflammatory factor in the balance between the pro- and anti-inflammatory cytokines in rabbit carotid artery anastomotic stoma.

[收稿日期] 2013-01-07

[基金项目] 湖南省教育厅基金(09C845),湖南省高校创新平台开放基金(12K096),南华大学研究生科研创新项目(2011XCX22)资助

[作者简介] 熊国祚,副教授,硕士研究生导师,研究方向为血管外科、疝外科, E-mail 为 xiongguo-zuo@yahoo.com.cn。戴先鹏,主治医师,研究方向血管外科疾病防治, E-mail 为 ppdaixianpeng@sina.com。毕国善,医师,研究方向为血管外科疾病的基础与临床, E-mail 为 biguoshan@126.com。通讯作者虞勤慧,教授,硕士研究生导师,主要从事动脉粥样硬化性心血管疾病的发病机制与防治研究, E-mail 为 qhtuo@aliyun.com。

血管吻合术最主要的并发症是吻合口狭窄,狭窄的主要原因是吻合口血管内膜增生与局部炎症反应^[1]。白介素家族是炎症反应中重要的一类细胞因子,在血管内膜的病理改变中起着重要作用^[2]。小凹蛋白(Caveolin-1)已被证明能抑制血管局部的炎症反应^[3,4],但对吻合口部位炎症还少有报道。本实验拟通过建立家兔颈总动脉吻合口模型,观察 Caveolin-1 质粒对白介素 6 和 10 的作用,为临床血管吻合后吻合口狭窄的防治寻求新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

雄性新西兰兔 32 只,体重 1.5~2.5 kg,由南华大学实验动物中心提供;Rabbit anti-IL6(bs-6312R)和 Rabbit anti-IL10(bs-0698R)均购于北京博奥森生物科技有限公司;lipofectamineTM2000 购于美国 invitrogen 公司(#1168-019);小鼠 pCDNA3.1(+) Caveolin-1 质粒由南华大学药理实验室构建并提供^[5];SABC 免疫组化试剂盒(SA1026)购于武汉博士德公司。其他试剂均为国产试剂分析纯。

1.2 实验分组及建模

根据随机化的原则将新西兰兔分为正常组、手术组、手术+空转染组和手术+转染组。正常组不给予任何处理;其余各组均建立颈总动脉吻合口动物模型。根据文献[6]用戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,固定于手术台上,备皮、消毒、铺巾、沿着动脉走行在右颈部切开皮肤约 2 cm 切口,在颈前三角暴露颈总动脉及颈内和颈外动脉。用血管夹阻断右颈总动脉两端血流,然后在中间剪断血管、修剪外膜并将管腔冲洗干净,8-0 尼龙线做颈总动脉端一端缝合,每个吻合口缝 8 针,检查血流通畅并无出血后,依次缝合伤口。

1.3 Caveolin-1 转染方法

用已提取好的质粒及 lipofectamineTM2000 分别稀释于无血清培养基中(两者的比例为 1:3),室温静置 4 分钟再将两者混合室温放置 20 min。在最后一针向吻合口内注入真核表达载体 pCDNA3.1(+) Caveolin-1 质粒与 Lipofectin 2000 的混合溶液(转染组)或真核表达载体 pCDNA3.1 质粒与 Lipofectin 2000 的混合溶液(空转染组),在血管内局部孵育 30 min。

1.4 血管标本取材

于术后 7 天在各组中随机各取 5 只新西兰兔,取以吻合口为中心 2 cm 动脉,用于 PCR 检测。术后 28 天,以吻合口为中心取长 0.5 cm 的动脉,生理盐水冲洗

干净。放入 10% 甲醛中固定 20 min,石蜡包埋,连续切片,厚度 4 μm,用于 HE 染色及免疫组化的检测。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测血管中 Caveolin-1 和 IL-6、IL-10 mRNA 的表达

采用 RT-PCR 技术,以 Trizol 试剂提取血管总 RNA,逆转录为 cDNA,再进行实时荧光定量 PCR;反应体系 20 μL,含 2 × SYBR Premix Ex TeqTM 10 μL,上、下游引物 10 μmol/L 各取 0.4 μL,cDNA 模板 2 μL,ddH₂O 7.2 μL。将反应体系加入 EP 管,稍离心,放入 Light Cycler 中进行实时荧光定量 PCR 反应。循环设置:95℃ 10 s,61℃ 20 s,72℃ 15 s 循环 38 次;于 95℃ 0 s,65℃ 15 s,95℃ 0 s 得融解曲线。反应完成后,得到所有标本的所有记录点曲线。软件自动进行数据分析,调整基线,计算出达到阈值的最低循环数 Threshold cycle(Ct 值)。以 Ct 值来计算标本中目的基因的 mRNA 拷贝数。每个基因均重复测量 3 次,Ct 值取其均值进行比较及相应的统计分析。为比较各组基因表达量差异,采用相对表达量算法(2^{-ΔΔCt}法),具体计算如下:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{GAPDH}};$$

$$\Delta \Delta Ct = \Delta Ct_{\text{other group}} - \Delta Ct_{\text{control group}}$$

$$\text{Fold change (relative quantification)} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$$

表 1. 引物序列
Table 1. Primer sequences

基 因	序 列(5'-3')	长 度
Caveolin-1	上游 TTGGATGAGGATCACTGTTTTC	636 bp
	下游 CCCCATTGTGCCACTGTAATTT	
IL-6	上游 GAAAACACCAGGTCAGCAT	153 bp
	下游 CAGCCACTGGTTTTCTGCT	
IL-10	上游 GAACTCCCTGGGGGAAAAC	145 bp
	下游 GGCTTTGTAGACGCCTTCCT	
GAPDH	上游 TTCATTGACCTCCAATACATGG	340 bp
	下游 CGTTGCTGACAATCTTGAGAGA	

1.6 免疫组织化学染色(SABC 法)检测血管组织中 IL-6、IL-10 蛋白的表达

按照试剂盒说明,将石蜡切片放入二甲苯(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ)中依次脱蜡,每次 15min;再用梯度酒精脱水(100%、95%、90%、80%、70% 各 2 min),3% H₂O₂ 孵育 10 min 灭活内源性过氧化物酶,再滴加 5% BSA 室温孵育 20 min 封闭非特异性位点。然后顺序孵育一抗、二抗;DAB 显色。参考文献[7]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。

1.7 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析,所得数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 Caveolin-1 对血管吻合口狭窄的影响

在兔血管吻合术后 28 天,取标本进行组织切片

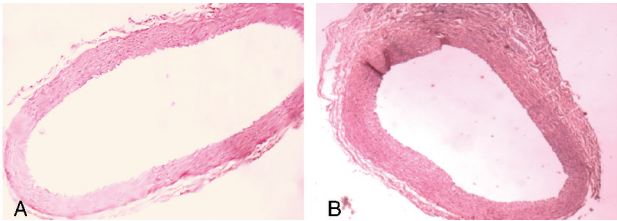


图 1. 血管 HE 染色直观图 A 为正常组,B 为手术组,C 为空转染组,D 为转染组。

Figure 1. HE staining of vascular

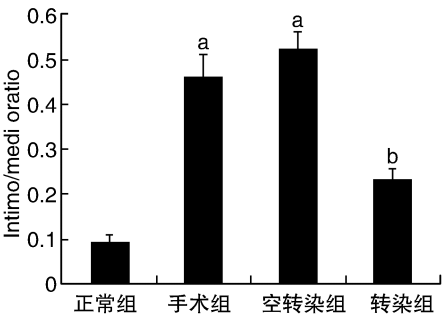


图 2. 用 Image-Pro Plus 6.0 软件测量血管内膜与中膜面积并计算比值($\bar{x} \pm s, n = 3$) a 为 $P < 0.01$,与正常组比较;b 为 $P < 0.05$,与手术组比较。

Figure 2. Image-Pro Plus 6.0 software measured the ratio of intimal and medial area($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2 家兔血管组织中 Caveolin-1 表达情况

术后 7 天取家兔吻合口血管组织,提取总 RNA,采用实时荧光定量 PCR 技术检测家兔吻合口血管组织中 Caveolin-1 mRNA 表达情况,检测转染是否成功。与正常组比较,手术组和空转染组的 Caveolin-1mRNA 表达降低($P < 0.05$);与手术组比较,转染组 Caveolin-1 明显升高($P < 0.05$;图 3)。

2.3 Caveolin-1 促进家兔血管组织中 IL-10 的表达

与正常组比较,手术组和空转染组的 IL-10 的蛋白表达减少;Caveolin-1 转染后 IL-10 的蛋白表达明显增加($P < 0.05$;图 4)。与荧光实时定量 PCR 结果吻合(图 5 和表 2)。

HE 染色,观察血管吻合口情况(图 1),可见手术组和空转染组血管内膜增殖,管壁明显增厚,血管腔变窄;而转染组血管未见明显的管壁增厚和管腔狭窄。用专业图像处理软件(Image-Pro Plus6.0 软件)测量血管内膜与中膜的面积,计算两者的比值(IA/MA;图 2)。从图中可以看出,与正常组比较,手术组和空转染组的比值明显增高($P < 0.05$),而与手术组比较,转染组内膜/中膜面积比值明显降低($P < 0.05$)。

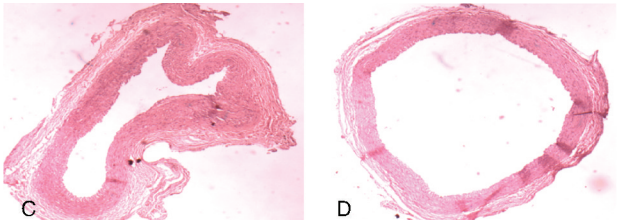


图 3. 家兔血管组织中 Caveolin-1 mRNA 表达情况

a 为 $P < 0.05$,与正常组相比;b 为 $P < 0.05$,与空转染组和手术组比较。

Figure 3. Caveolin-1 mRNA expression of rabbit vascular tissue

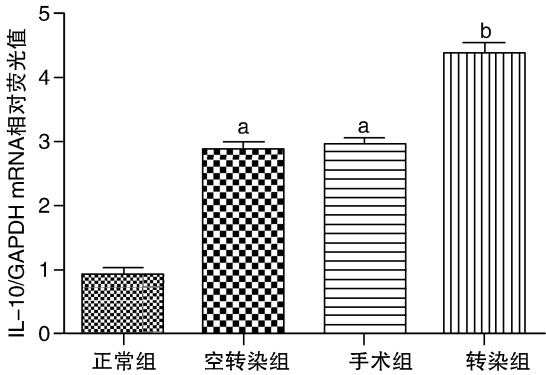


图 4. 家兔血管组织中 IL-10 mRNA 表达情况 a 为 $P < 0.05$,与正常组相比;b 为 $P < 0.05$,与空转染组和手术组。

Figure 4. IL-10 mRNA expression of rabbit vascular tissue

2.4 Caveolin-1 抑制家兔血管组织中 IL-6 的表达

与正常组比较,手术组和空转染组的 IL-6 的 mRNA 表达增加;Caveolin-1 转染后 IL-6 的 mRNA 表达明显降低($P < 0.05$;图 6)。与免疫组织化学结果一致(图 7),可见 Caveolin-1 转染后血管壁的棕褐色颗粒显著减少,而在手术组和空载体组棕褐色颗粒明显多于对照组。

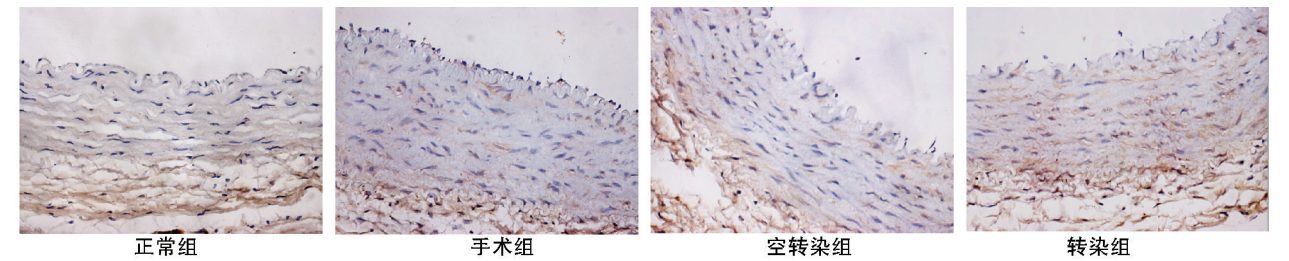


图 5. 兔血管 IL-10 免疫组织化学染色结果(SABC ×400)
Figure 5. IL-10 immunohistochemical staining of rabbit vascular(SABC ×400)

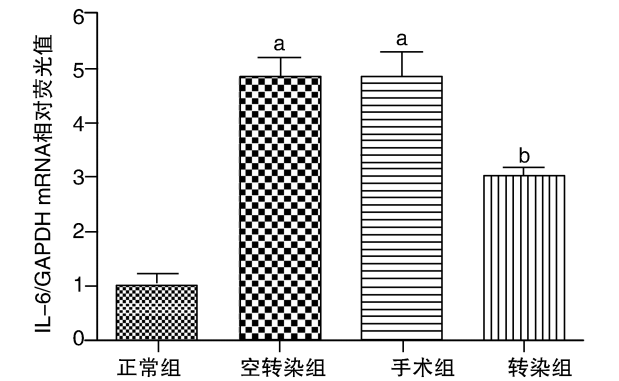


图 6. 家兔血管组织中 IL-6 的 mRNA 表达情况 a 为 $P < 0.05$,与正常组相比;b 为 $P < 0.05$,与空转染组和手术组比较。
Figure 6. IL-6 mRNA expression of rabbit vascular tissue

3 讨论

小凹蛋白-1(Caveolin-1)是细胞膜上小凹

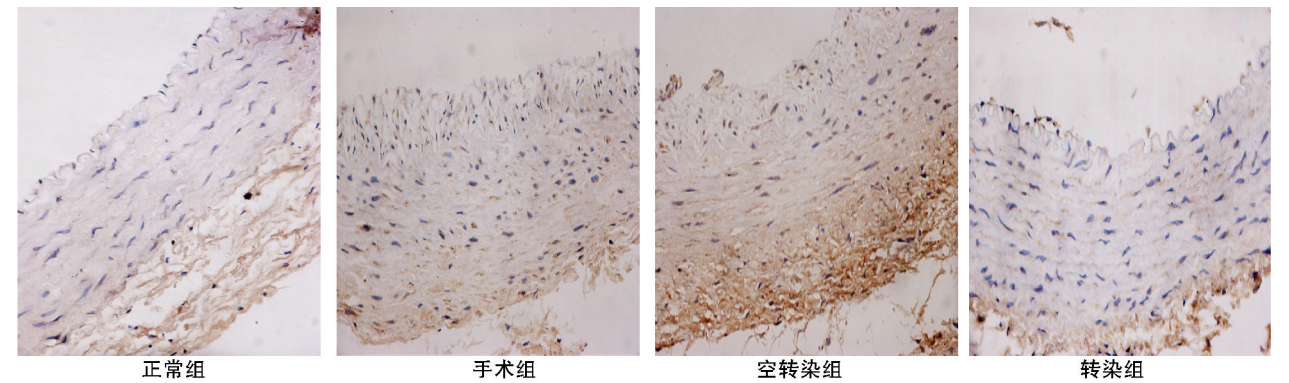


图 7. 兔血管 IL-6 免疫组化染色(SABC ×400)
Figure 7. IL-6 immunohistochemical staining of rabbit vascular(SABC ×400)

表 2. 各组血管壁 IL-10 免疫组织化学检测结果($\bar{x} \pm s$)
Table 2. IL-10 immunohistochemistry results of the vessel wall ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	平均光密度($\times 10^{-3}$)
正常组	5	30.78 \pm 13.26
手术组	5	15.41 \pm 8.33
空转染组	5	12.57 \pm 4.58
转染组	5	—

(Caveolae) 的结构蛋白。Caveolin-1 能通过“脚手架”区域的共有序列与多种信号分子相互作用,对多种信号分子和血管活性因子起着重要调节作用。Caveolin-1 能调节炎症细胞和内皮细胞中信号传导通路,影响炎症细胞对炎症反应的应答,进而影响炎症反应过程^[6-7]。炎症反应常导致炎症细胞释放大量的细胞因子,而这些炎症细胞因子是参与血管平滑肌细胞迁移与增殖,继而引起血管内膜过度增殖,导致血管吻合口狭窄^[8]。血管吻合口狭窄是炎症反应的结果,而 Caveolin-1 是否可以调节血管吻合口炎症反应而抑制吻合口的狭窄,目前并不是很清楚。我们从血管 HE 染色可以看出,手术组和空转染组内膜增生、管腔狭窄,IA/MA 比值增高;而转染组内膜增殖不明显,IA/MA 比值低于手术组,这说明 caveolin-1 可以抑制血管内膜的增生,延缓吻合口狭窄的发生。

有文献表明^[9] caveolin-1 在调节炎症反应过程中与 IL-10 密切相关,IL-10 是一种多效性的抗炎因子,由单核细胞、辅助 T 细胞和内皮细胞产生,能抑制多种炎症因子的产生。IL-10 主要功能是限制和终止炎症反应,并可使单核细胞失活从而抑制血管平滑肌细胞的过度增殖^[10]。IL-10 可抑制单核、巨噬细胞的活性,又能抑制趋化因子和炎症因子的表达,从而降低血管平滑肌细胞的增殖^[11]。有研究表明,IL-10 还可通过阻断 NF-κB 信号通路而减少 IL-6 的产生^[12]。IL-6 是一种糖蛋白,由单核-吞噬细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞等多种细胞产生,是参与心血管病理的重要炎性因子。当血管损伤后,IL-6 从血管平滑肌细胞大量释放,趋化、活化单核细胞和中性粒细胞,使血管内皮细胞表达黏附分子和其他炎症递质增加,增强局部炎症反应^[13]。本实验发现手术组血管壁的 IL-10 下调而 IL-6 表达升高,可能其参与了血管损伤后的炎症反应,与血管增殖密切相关。Hojo 等^[14]也证明 IL-6 在血管成形术后表达增高,并与血管再狭窄存在直接联系。有文献报道血管损伤后,通过积极的抗炎治疗后下调 IL-6 的水平,可以缓解血管内膜增殖,说明 IL-6 在血管平滑肌细胞增殖过程起着重要作用中,但是 IL-6 的具体作用机制仍不清楚。

本实验发现 Caveolin-1 可降低血管损伤后的促炎因子 IL-6 并升高抗炎因子 IL-10,说明 Caveolin-1 促使血管吻合口部位炎症因子的平衡向抑炎因子倾斜。作者以前也观察到 Caveolin-1 抗血管吻合口狭窄的作用,提示 Caveolin-1 的抗狭窄作用可能与其调节促炎和抗炎因子平衡的作用有关。但是更加具体的机制还有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Indolfi C, Mongiardo A, Curcio A, et al. Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapy with eluting stents [J]. Trends Cardiovasc Med, 2003, 3: 142-148.

[2] Niida T, Isoda K, Kitagaki M, Ishigami N, Adachi T, Matsubara O, Takeda K, Kishimoto T, Ohsuzu F. IkBNS regulates interleukin-

6 production and inhibits neointimal formation after vascular injury in mice [J]. Cardiovasc Res. 2012, 93(2): 371-379.

[3] Hassan GS, Williams TM, Frank PG, Lisanti MP. Caveolin-1-deficient aortic smooth muscle cells show cell autonomous abnormalities in proliferation, migration, and endothelin-based signal transduction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006, 290(6): H2393-401.

[4] 罗红梅,唐圣松,廖端芳,等. Caveolin-1 基因转染对人胃腺癌细胞生长的影响[J]. 南华大学学报(医学版), 2007, 35(2): 147-149.

[5] 朱林,纪祥军,王汉东,等. 大鼠颈总动脉端-侧吻合模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(03): 13-15.

[6] Thmos S, Overdevest JB, Nitz MD, et al. Src and caveolin-1 reciprocally regulate metastasis via a common downstream signaling pathway in bladder cancer [J]. Cancer Research, 2011, 71(3): 101-109.

[7] Wood WG, Igbavboa U, Muller WE, et al. Cholesterol asymmetry in synaptic plasma membranes [J]. J Neurochemistry, 2011, 116(5): 684-689.

[8] Versaci F, Reimers B, Prati F, et al. Prediction of cardiovascular events by inflammatory markers in patients undergoing carotid stenting [J]. Mayo Clin Proc, 2012, 87(1): 50-58.

[9] Wang XM, Kim HP, Song R, et al. Caveolin-1 confers anti-inflammatory effects in murine macrophages via the MKK3/p38 MAPK pathway [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 34(4): 434-442.

[10] Li JJ, Guo YL, Yang YJ. Enhancing anti-inflammatory cytokine IL-10 maybe beneficial for acute coronary syndrome [J]. Mde Hypotheses, 2005, 65: 103-106.

[11] Xia C, Huo Y, Yin H, et al. Interleukin 10 inhibits the rat VSMC proliferation and collagen secretion stimulated by angiotensin II [J]. Chin Med Sci J, 2001, 16(3): 125-128.

[12] Dagvadorj J, Naiki Y, Tumurkhuu G, et al. Interleukin (IL)-10 attenuates lipopolysaccharide-induced IL-6 production via inhibition of IkappaB-zeta activity by Bcl-3 [J]. Innate Immun, 2009, 15(4): 217-224.

[13] Xia ZY, Yang H, Qu HQ, et al. Impact of carotid artery stenting on plasma interleukin-6, tumor necrosis factor-α and C-reactive protein [J]. Int Angiol, 2012, 31(1): 28-32.

[14] Hojo Y, Ikeda U, Katsuki T, et al. Interleukin 6 expression in coronary circulation after coronary angioplasty as a risk factor for restenosis [J]. Heart, 2000, 84(1): 83-87.

(此文编辑 李小玲)