

文章编号:1005-6947(2004)01-0029-05

· 实验研究 ·

## p38 MAPK 在自体移植静脉中的表达及其意义

胡新华<sup>1</sup>, 杨军<sup>2</sup>, 杨德华<sup>1</sup>, 宋方明<sup>3</sup>, 辛世杰<sup>1</sup>, 张强<sup>1</sup>

(中国医科大学附属第一医院 1. 血管外科 2. 骨科, 辽宁 沈阳 110001; 3. 辽宁省鞍山市第三医院 外科, 辽宁 鞍山 114031)

**摘要:**目的 研究丝裂原活化蛋白激酶 p38MAPK 信号传导通路在自体移植静脉中的表达。方法 Wistar 大鼠 80 只, 建立自体移植静脉模型。术后随机分为 6, 24h, 3, 7d 和 2, 4, 6, 8 周等 8 组, 于相应时点取材, 半定量逆转录 PCR 检测移植血管中 p38MAPK 的 mRNA 表达, Western 蛋白印迹定量检测 p38 的蛋白产物及磷酸化蛋白产物表达, 原位杂交和免疫组化方法定位 p38 mRNA 及蛋白表达。结果 移植静脉术后 6h p38 的 mRNA 表达即较正常静脉明显增强 ( $P < 0.01$ ), 并于术后 2 周达高峰, 表达值为  $(59 \pm 26)\%$ , 与 4, 6, 8 周比较差异极显著 ( $P < 0.01$ )。Western 蛋白印迹提示 p38 在移植 2~4 周达高峰, 之后开始减少, 8 周时仍维持一定表达量 ( $1/4 \sim 1/2$ )。原位杂交及免疫组化提示阳性表达多定位于移植血管中层或增生内膜中的血管平滑肌细胞 (VSMCs)。结论 p38 MAPK 通路的激活参与了移植静脉的内膜增生以及血管重塑, 可望成为防治移植静脉狭窄闭塞的治疗靶点。

**关键词:** 静脉/移植; 移植, 自体; 丝裂原活化蛋白激酶 p38

**中图分类号:** R617; Q555.7

**文献标识码:** A

## Expression and significance of p38 mitogen-activated protein kinases in autogenous vein graft

HU Xin-hua<sup>1</sup>, YANG Jun<sup>2</sup>, YANG De-hua<sup>1</sup>, SONG Fang-ming<sup>3</sup>, XIN Shi-jie<sup>1</sup>, ZHANG Qiang<sup>1</sup>

(1. Department of Vascular Surgery 2. Department of Orthopedics, The First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China; 3. Department of Surgery, The Third Hospital of Anshan City, Anshan, Liaoning 114031, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression and significance of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in autogenous vein graft. **Methods** Autogenous vein graft model was established by transplanting the right jugular vein to infrarenal abdominal aorta in 80 Wistar rats. Ten vein graft samples were harvested 6 hours, 24 hours, 3 days, 7 days, 2 weeks, 4 weeks, 6 weeks and 8 weeks after surgery, respectively. Reverse transcription-PCR and in situ hybridization, Western blot and immunohistochemistry methods were used to detect the expression of protein and phosphorylation protein of p38 and p38mRNA. **Results** The expression of p38 mRNA increased 6 hours after surgery and reached the peak on the second week after surgery ( $59\% \pm 26\%$ ), and significantly higher than that on 4, 6, 8 weeks ( $P < 0.01$  vs. ), Expression of p38 detected by Western blot reached to the peak on 2 to 4 weeks, and decreased significantly to 1/4 to 1/2-fold on 8 weeks after surgery. The positive cells were mostly located in the vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the media and/or intimal hyperplasia of vein graft. **Conclusions** The activation of p38 MAPK system in intimal hyperplasia and vascular remodeling after vein graft may become a new target of the therapy for stenosis or obliteration of vein graft.

**Key words:** VEIN/transpl; TRANSPLANTATION, AUTOLOGOUS; p38 MITOGEN-ACTIVATE PROTEN KINASE

**CLC number:** R617; Q555.7

**Document code:** A

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(30371401)。

**收稿日期:**2003-08-04; **修订日期:**2003-12-08。

**作者简介:**胡新华(1971-),男,辽宁清原人,中国医科大学附属第一医院主治医师,主要从事血管外科方面的研究。

利用自体静脉行冠状动脉搭桥或肢体旁路转流手术,目前仍然是挽救患者生命和肢体功能的重要手段。但是,移植早期内膜增生及后期的动脉硬化导致移植血管狭窄、闭塞,致手术远期失败率高达50%,其中的关键环节是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)在外界因素或多种细胞因子的刺激下产生迁移、增殖以及凋亡<sup>[1]</sup>。多种信号传导通路参与了这一复杂过程<sup>[2]</sup>,而丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs)是控制细胞增殖、分裂及凋亡过程非常重要的信号传导通路。我们研究移植静脉中p38 MAPKs激活、表达的变化规律,进一步阐明血管移植后狭窄、闭塞及血管重塑的机制,寻找到新的干预靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型的建立及标本收集

Wistar大鼠80只(由中国医科大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体重200~300g。10%水合氯醛水溶液300mg/kg腹腔注射麻醉。在SXB-1型显微镜下(10×)行无菌显微外科手术:取大鼠右颈总静脉长约4mm,肝素盐水冲洗后用11-0血管缝合线端-端吻合间置移植于肾下腹主动脉,每个吻合口采用间断缝合12~14针,确定血管通畅后关闭腹腔。术后分笼饲养,随机分8组,每组10只:分别为术后6,24h,3,7d和2,4,6,8周时点。按期切取移植静脉标本,同时取对侧颈静脉作对照,液氮冻存。参照文献<sup>[2]</sup>进行HE,弹力纤维VG染色,测量增生内膜厚度,辅以计算机图像分析。

### 1.2 逆转录多聚酶链反应(RT-PCR)

RT-PCR试剂盒购自大连宝生物公司。结合GeneBank序列设计引物,p38 MAPK(Genebank, NM-031020) F: 5'-GTGTCGGTGATGTCAGATGG-3', R: 5'-CAGTATGCAGTCCAGCTCCA-3',产物长度687bp;  $\beta$ -actin(Genebank, NM\_031144) F: 5'-TTCTGACCCATACCACCAT-3', R: 5'-ATTACAGTGGCTGA-AAGG-3',产物长度508bp。各取100mg血管组织,采用TRIZOL提取总RNA,然后逆转录为cDNA。20 $\mu$ l PCR反应体系:Taq DNA聚合酶2U,引物各

50pmol。PCR反应条件:94℃变性2min后,94℃30s,55℃45s和72℃60s顺序循环30次,最后72℃延伸7min。2%琼脂糖电泳,凝胶自动成像系统上摄像并分析各条带吸光度值(基因表达值=p38 MAPK/ $\beta$ -actin)。

### 1.3 Western 蛋白印迹

在细胞裂解液中剪碎血管组织后机械匀浆,4℃低温10 000r/min离心10min取上清。考马亮蓝R250染色法测总蛋白质浓度,将各组蛋白浓度调到同一水平,置于-70℃冻存。制备10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶,每孔加蛋白样品100 $\mu$ g,电泳后将蛋白转到硝酸纤维素滤膜。丽春红S染色确定转膜情况并标记蛋白Marker位置。5%脱脂奶粉TBS缓冲液室温封闭2h;一抗1:1 000稀释,4℃过夜,洗膜后加入1:1 000稀释的过氧化物酶标记的马抗兔IgG-HRP,1h后TBS洗3次后加入ECL 1min,暗室显影2min并冲洗胶片。凝胶成像分析系统上摄像分析吸光度值。第一抗体p38(sc-535)及p-p38(sc-7973)均为Santa Cruz公司产品;兔多克隆抗体(p代表抗磷酸化蛋白产物的抗体),均购自北京中山公司。

### 1.4 原位杂交

p38 MAPK mRNA原位杂交检测试剂盒购于武汉博士德公司,采用寡核苷酸探针,地高辛标记。标本处理及原位杂交步骤参见文献<sup>[2]</sup>,BCIP/NBT显色后,400倍光镜下观察,计算单位视野内阳性细胞(胞浆或胞核染成蓝紫色)百分率。

### 1.5 免疫组化染色

抗p38及用于识别VSMCs的actin抗体均为Santa Cruz公司产品(兔IgG多抗,工作浓度1:100);增殖细胞核抗原(PCNA)和SP试剂盒为美国Zymed公司产品。按试剂盒说明SP法染色,DAB显色。正常静脉作自身对照,PBS代替一抗作阴性对照。400倍光镜观察,细胞浆或胞核出现棕黄色颗粒为阳性。

### 1.6 统计学分析

SPSS10.0统计软件处理数据。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内差异显著性采用方差分析及 $q$ 检验;组间比较采用 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 移植血管组织病理学改变

正常静脉内膜只覆盖单层内皮细胞,中膜很薄,由2~3层平滑肌细胞及胶原组成。移植24h至3d静脉内膜受损:内皮细胞脱落,局部血栓形成,有大量炎性细胞浸润,血管壁内可见灶性出血。移植7d可见内膜增生,2~4周达到高峰,4周以后内膜增生速度减缓。

### 2.2 半定量 RT-PCR 结果

静脉移植术后6h p38 mRNA 表达明显增强,与正常静脉比较差异有极显著意义 ( $P < 0.01$ );术后2周表达达高峰,表达值为  $(58.8 \pm 26.2)\%$ ,与4,6,8周各时点比较差异有非常显著意义 ( $P < 0.01$ ),之后表达开始减弱(表1,图1,2)。

### 2.3 Western 蛋白印迹结果

p38 表达在移植2~4周达高峰,然后逐渐减少,但移植后8周仍维持一定表达量(1/4~1/2)(图3)。

### 2.4 原位杂交结果

p38mRNA 原位杂交可见24h即有部分细胞出现阳性表达,细胞浆或少数细胞核出现蓝紫色颗粒状沉淀。p38mRNA 则在移植后2周阳性表达细胞最多,4~6周时仍可见阳性表达。分布特点:阳性细胞最初出现在移植血管内皮细胞处,在2~4周时的增生内膜及中层VSMCs可见较多阳性表达,移植8周时表达明显减少(表2,图4)。

### 2.5 免疫组织化学染色结果

p38 MAPK 免疫组织化学染色可见阳性细胞胞浆染成棕黄色,表达变化趋势与Western蛋白印迹结果的变化趋势基本一致(表3,图5,6)。阳性表达多定位于移血管中层或增生内膜中的VSMCs。

表1 RT-PCR 检测 p38 的 mRNA 表达值比较

检测时点(n=10)	正常静脉	6h	24h	3d	7d	2周	4周	6周	8周
p38mRNA 表达值( $\bar{x} \pm s, \%$ )	$4.0 \pm 2.0^{2)3)}$	$8.5 \pm 2.5^{1)2)3)}$	$15.8 \pm 8.0^{1)2)3)}$	$20.4 \pm 12.0^{1)2)3)}$	$33.8 \pm 15.0^{1)2)}$	$58.8 \pm 26.2^{1)3)}$	$32.6 \pm 18.2^{1)2)}$	$18.6 \pm 8.8^{1)2)3)}$	$11.9 \pm 6.0^{1)2)3)}$

注:1)与正常静脉比,  $P < 0.01$ ;2)与移植2周比,  $P < 0.01$ ;3)与移植4周比,  $P < 0.01$

M:GeneRulerTM100bp DNA Ladder Marker,

1:正常静脉;2~9:移植后6,24h,3,7d,2,4,6,8周

图1 p38 MAPK mRNA RT-PCR 扩增电泳图

图2 RT-PCR 检测 p38 的 mRNA 表达结果示意图

表2 原位杂交检测 p38mRNA 表达结果的比较

检测时点(n=10)	正常静脉	6h	24h	3d	7d	2周	4周	6周	8周
p38mRNA 表达值( $\bar{x} \pm s, \%$ )	$4 \pm 3^{2)3)}$	$7 \pm 3^{1)2)3)}$	$11 \pm 7^{1)2)3)}$	$12 \pm 6^{1)2)3)}$	$23 \pm 10^{1)}$	$28 \pm 9^{1)3)}$	$19 \pm 10^{1)2)}$	$16 \pm 8^{1)2)}$	$11 \pm 7^{1)2)3)}$

注:1)与正常静脉比,  $P < 0.01$ ;2)与移植2周比,  $P < 0.01$ ;3)与移植4周比,  $P < 0.01$

表3 免疫组化检测 p38MAPK 蛋白产物表达比较

检测时点(n=10)	正常静脉	6h	24h	3d	7d	2周	4周	6周	8周
p38 表达值( $\bar{x} \pm s, \%$ )	$4 \pm 2^{2)3)}$	$6 \pm 2^{1)2)3)}$	$10 \pm 4^{1)2)3)}$	$13 \pm 8^{1)2)3)}$	$21 \pm 11^{1)2)}$	$33 \pm 10^{1)3)}$	$37 \pm 15^{1)3)}$	$25 \pm 7^{1)2)}$	$18 \pm 5^{1)2)}$

注:1)与正常静脉比,  $P < 0.01$ ;2)与移植2,4周比,  $P < 0.01$ ;3)与移植6,8周比,  $P < 0.01$

1:正常静脉;2~9:移植后6,24h,3,7d,2,4,6,8周

**图3** p38MAPK(A)及其磷酸化蛋白(B)的 Western blot 蛋白印迹

**图4** 静脉移植4周的 p38 mRNA 原位杂交结果,增生内膜可见阳性表达( $\times 1\ 000$ )

**图5** 移植4周 p38 蛋白产物的免疫组化染色结果,移植血管中层可见 VSMCs 阳性表达( $\times 400$ )

**图6** 免疫组织化学检测 p38 MAPK 蛋白产物表达比较

### 3 讨论

MAPKs 家族是一组具有丝氨酸和苏氨酸双磷酸化能力的蛋白激酶,广泛存在于各种细胞中,其主要成员包括蛋白激酶 C(p38 MAPK)和 c-Jun 氨基末端激酶(JNKs)及细胞外信号调节激酶(ERKs)。p38 和 JNK 主要介导细胞的各种应激反应,它们的激活促进凋亡;而 ERK 主要介导增殖反应。血管移植后狭窄闭塞是一个多因素、多阶段、多基因参与的复杂病理过程,确切发生机制目前仍不清楚<sup>[3]</sup>。近来人们逐渐认识到由于 VSMCs 增殖、凋亡以及细胞外基质合成或降解所致血管重塑(vascular remodeling)在此过程中的重要作用。凋亡

使细胞数减少而有利于扩张性血管重塑,而 VSMCs 增殖及内膜增生则导致收缩性血管重塑。笔者的既往研究结果<sup>[1]</sup>已证明 VSMCs 的凋亡与增殖均参与静脉移植后的血管重塑过程,并且二者之间存在动态失衡。本研究选择 p38 MAPK 为研究目标,观察与细胞凋亡有关的 MAPKs 信号转导通路在移植静脉中的表达变化规律。

本研究发现:p38 MAPK 的基因表达在血管移植后迅速被激活,6h 表达即明显升高,持续增加并于 2~4 周达高峰,移植 8 周时仍维持一定的表达量。p38 能够被脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、紫外线、牵张和缺血/再灌注损伤等多种因素激活。现

认为它们的活性能启动并促进细胞凋亡机制。VSMCs的凋亡有两方面的作用:当凋亡程度与巨噬细胞或VSMCs吞噬作用平衡时,可能有助于血管损伤的修复;如果该平衡失调,凋亡细胞或凋亡小体清除不充分会导致血管粥样硬化斑块进展。可见凋亡不足或过分凋亡均会造成血管重塑障碍。血管移植1~2周是VSMCs增殖的高峰,提示VSMCs的凋亡不足可能是内膜增生的一个重要机制,而在移植4周后凋亡超过增殖反应。有研究<sup>[4]</sup>表明:内膜增生仅是静脉移植后的部分病理过程,VSMCs凋亡对血管移植后的重塑过程也非常重要。临床上并非所有的移植血管均发生闭塞,良好的血管重塑可以纠正内膜增生导致的狭窄闭塞。因此,笔者研究了与VSMCs增殖/凋亡密切相关的p38MAPK信号传导通路的动态变化。该信号通路的阐明有可能寻找到新的干预靶点,为最终解决这一临床难题提供新的思路。MAPKs信号传导通路采用高度保守的三级激酶级链传递信号,所以MAPK通路存在多种抑制剂,可在不同水平上进行阻断。有人在大鼠动脉球囊损伤模型中应用p38MAPK选择性抑制剂FR167653,发现内膜增生受到抑制,内膜/中膜比值显著降低,增殖细胞核抗原以及白细胞介素IL-1 $\beta$  mRNA的表达也明显减少<sup>[5,6]</sup>。目前,笔者正

在进行这一领域的深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 冯勇,段志泉,胡海地,等. 移植静脉平滑肌细胞凋亡及相关基因表达与增殖关系的动态研究[J]. 中华医学杂志,1999,79(1):15-18.
- [2] 胡新华,张强,孙达欣,等. 核转录因子 $\kappa$ B及其抑制基因在自体移植静脉中的表达[J]. 中华医学杂志,2002,82(22):1546-1549.
- [3] Thury A, van Langenhove G, Carlier SG, *et al.* High shear stress after successful balloon angioplasty is associated with restenosis and target lesion revascularization [J]. *Am Heart J*, 2002, 144(1): 136-143.
- [4] Izumi Y, Kim S, Yoshiyama M, *et al.* Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 in injured artery and its critical role in neointimal hyperplasia [J]. *Circulation*, 2003, 108(22): 2812-2818.
- [5] Ohashi N, Matsumori A, Furukawa Y, *et al.* Role of mitogen-activated protein kinase in neointimal hyperplasia after vascular injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(12): 2521-2526.
- [6] Ma XL, Kumar S, Gao F, *et al.* Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion [J]. *Circulation*, 1999, 99(13): 1685-1691.

## 敬告读者(1):本刊为“万方数据——数字化期刊群”期刊

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,本刊已入网“万方数据——数字化期刊群”,所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入万方数据资料系统(Chinainfo),进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者,请另投它刊。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

万方数据——数字化期刊群是国家“九五”重点科技攻关项目(网址:<http://www.chinainfo.gov.cn/periodical>)。本刊全文内容按照统一格式制作编入万方数据资料系统(Chinainfo),读者可上因特网进入万方数据资料系统(Chinainfo)免费(一年后开始酌情收费)查询浏览本刊内容,也欢迎各界朋友通过万方数据资料系统(Chinainfo)向我刊提出宝贵意见、建议,或征订本刊。