

[文章编号] 1000-2200(2010)11-1084-04

· 基础医学 ·

ERK-1/2 在移植静脉再狭窄中的作用

焦学飞, 高 涌

[摘要] 目的:研究细胞外信号调节激酶-1/2(extracellular regulated protein kinases, ERK-1/2)活化在移植静脉中的作用。**方法:**用 45 只健康成年大白兔建立自体颈外静脉翻转行颈动脉转流手术模型。随机分成正常组、VG 组和 VG/UO 组, Western blot 分析移植静脉用来做 ERK-1/2 活化。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)检测细胞增殖的指标。**结果:**VG 组移植静脉 28 天后发现内膜增生, 静脉移植动脉化导致了 ERK-1/2 表达的双峰(3 h, 3 d)。PCNA 在术后 3 h 开始表达, 持续到 28 天。而应用 UO126(ERK-1/2 抑制剂)后, ERK-1/2 活化被明显抑制, 减弱了其在细胞增殖和细胞凋亡中的作用。**结论:**ERK-1/2 的激活可能是内膜增生的关键环节, 通过抑制 ERK-1/2 的活化可以抑制内膜增生, 防止移植血管再狭窄。

[关键词] 动静脉转流术; 内膜增生; 细胞外信号调节激酶; 静脉移植

[中国图书资料分类法分类号] R 654.4 **[文献标识码]** A

Role of ERK-1/2 in restenosis of vein grafts

JIAO Xue-fei, GAO Yong

(Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] Objective: To study the role of extracellular regulated protein kinases(ERK-1/2) in vein grafts. **Methods:** Forty-five adult rabbits were randomly divided into control group, VG group and VG/UO group. Carotid artery bypasses were performed using reversed autologous external jugular vein. A segment of each sample was analyzed with western blot. **Results:** Intimal hyperplasia was observed 28 days after the operation in group VG. The reversed autologous external jugular vein grafts resulted in activation of ERK-1/2 with stronger activation occurring at 3 h and at 3 d. Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) began to express 3 h after the operation and lasted for 28 d. The activation of ERK-1/2 in group VG/UO was significant inhibited after the application of UO126, and there was no peak of activation detected. **Conclusions:** ERK-1/2 activation may be the key point in the process of intimal hyperplasia. Inhibition of the ERK-1/2 pathway inhibits intimal hyperplasia, and therefore, results in inhibition of the late events.

[Key words] carotid artery bypasses; intimal hyperplasia; extracellular regulated protein kinases; vein graft

内膜增生是自体静脉在心脏和外周血管转流手术后血管长期通畅的主要障碍。尽管静脉移植是冠状动脉转流手术最常用的方法, 但是成功率受高发的后期狭窄和最终管腔阻塞限制^[1]。血管转流手术可以导致丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)的活化。MAPKs 主要包括 ERK-1/2、JNK 和 P-38 3 个亚族, 与细胞增殖、迁移和凋亡有关。在本研究中, 我们应用大白兔制作颈动脉转流模型, 研究 ERK-1/2 活化在移植静脉中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组 健康大白兔 45 只, 体重(3.0 ± 0.5)kg, 雌雄不限, 实验前正常饲养 7 天。随机分为 2 组, 正常组 3 只, 手术组 42 只, 其中手术组随机分成 VG 组和 VG/UO 组。

1.2 动物模型建立 以 0.3% 戊巴比妥钠行耳缘静脉注射麻醉动物, 无菌手术, 经颈部中央切开, 暴露颈外静脉, 游离并结扎其属支, 切一段 3 cm 静脉, 动物肝素化(100 u/kg)后, 暴露颈总动脉, 将颈外静脉倒转行端侧吻合于颈总动脉上, 分别于术后 1 h、3 h、1 天、3 天、7 天、14 天、28 天切取移植静脉标本, 同时取对侧颈静脉作对照。根据本实验要求, VG 组将静脉桥在吻合前置于含 0.8% DMSO 的缓冲液中培养 30 min(VG 组), 而 VG/UO 组静脉桥在吻合前先置于含有 80 μmol/L UO126(ERK-1/2 抑制剂)

[收稿日期] 2009-05-26

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 血管外科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 焦学飞(1981-), 男, 硕士研究生。

[通讯作者] 高 涌, 研究生导师, 主任医师, E-mail: dr. gaoyong@163.com

- [7] 蔡辉, 修春英, 郭郡浩, 等. 川芎嗪对溶血磷脂酸诱导的心脏成纤维细胞增殖及胶原合成的影响[J]. 医学研究生学报, 2008, 21(1): 31-33.
- [8] Zhang H, Pi R, Li R, et al. PPAR beta/delta activation inhibits angiotensin II-induced collagen type I expression in rat cardiac

fibroblasts[J]. Arch Biochem Biophys, 2007, 460(1): 25-32.

- [9] Bu PL, Zhao XQ, Wang LL, et al. Tong-xin-luo capsule inhibits left ventricular remodeling in spontaneously hypertensive rats by enhancing PPAR-gamma expression and suppressing NF-kappaB activity[J]. Chin Med J(Engl), 2008, 121(2): 147-154.

的缓冲液中培养 30 min 后再移植 (VG/UO 组)。术后动物自由饮水,不用抗凝剂及抗生素,正常饲料饲养。

1.3 Western-blot 方法 常规收集各实验组各时间段血管组织置于 1~2 ml 匀浆器中球状部位,用干净的剪刀将组织尽量剪碎。加 0.5~1.0 ml 单去污剂裂解液(含 PMSF)与匀浆器中,进行匀浆,然后置于冰上。几分钟后再碾一会儿,置于冰上,重复碾几次使组织尽量碾碎。裂解 30 min 后,移液器将裂解液移至 1.5 ml 离心管中,4 ℃ 下 1 200 r/min 离心 5 min,取上清液分装于 0.5 ml 离心管中置于 -70 ℃ 保存。Bradford 法测定细胞提取物的蛋白浓度。ERK1/2 存在磷酸化(有活性)与非磷酸化(无活性)两种状态,以特异性识别双磷酸化 ERK1/2 的抗体(鼠抗兔 P-ERK-1/2 单克隆抗体,美国 SantaCruz 产品)检测磷酸化 ERK1/2 的量;以抗总 ERK1/2 抗体(鼠抗兔 ERK-1/2 单克隆抗体,美国 SantaCruz 产品)检测总 ERK1/2 的量为对照。经 SDS-PAGE 电泳,并经半干式电转移法将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜后放入封闭缓冲液(含 5% 脱脂奶粉 TBST),室温封闭 1 h,按 0.1 ml/cm² 加入兔抗人 ERK-1、ERK-2 单克隆抗体(工作浓度均为 1:500)及小鼠抗人 p-ERK 单抗、鼠抗兔 PCNA 单克隆抗体(购于合肥志宏生物有限公司)(均为 1:500),4 ℃ 过夜, TBST 漂洗 3 次,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG,羊抗小鼠 IgG(二抗,工作浓度为

1:2 000),37 ℃ 作用 1 h, TBST 漂洗,将 Western 印迹试剂均匀涂于 PVDF 膜上,作用 1~2 min 后倾去发光试剂,用保鲜膜盖于 PVDF 膜上,在暗室内将 X 线片置于保鲜膜上,曝光 1~2 min,冲洗 X 线片,拍照及进行计算机图像分析。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

2 结果

2.1 移植血管组织学改变 HE 染色示正常静脉壁较薄,内膜光滑,内皮细胞完整,呈单层扁平状,中膜很薄。术后 3 天 VG 组移植静脉桥较 VG/UO、对照组有明显内皮损伤,7 天有新生内膜形成,平滑肌细胞增生,14 天、28 天新生内膜进一步增厚,平滑肌细胞变性,表型改变,有明显的平滑肌向内皮侧迁移,而 VG/UO 组内膜较完整,未见明显的平滑肌细胞向内皮侧迁移。

2.2 Western blot 结果

2.2.1 P-ERK-1/2 的表达 VG 组:静脉移植后 1 h, P-ERK-1/2 表达明显增强,与正常静脉比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$),在移植 3 h 和 3 天表达高峰,呈现双峰现象,与其余时点比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$),28 天后恢复接近正常水平; VG/UO 组:移植静脉 P-ERK-1/2 表达明显减少,术后未见明显的活化高峰,术后 28 天仅有极少量的表达,与 VG 组静脉 P-ERK-1/2 表达差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)(见表 1、图 1)。

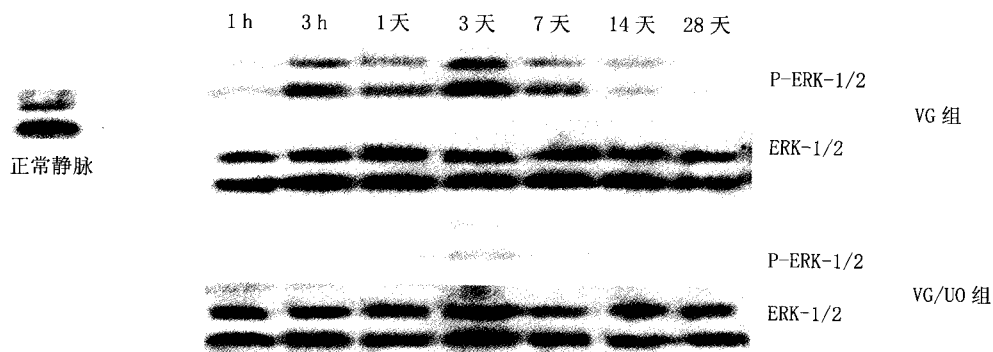


图 1 Western blot 检测正常静脉、VG 组及 VG/UO 组移植静脉不同时间段 P-ERK-1/2、ERK-1/2 蛋白的表达

表 1 各组不同时点移植静脉 P-ERK-1/2 的表达 ($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	1 h	3 h	1 天	3 天	7 天	14 天	28 天
对照组	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01
VG 组	0.20 ± 0.02**	0.64 ± 0.02**	0.45 ± 0.02**	0.84 ± 0.05**	0.63 ± 0.03**	0.31 ± 0.02**	0.11 ± 0.01**
VG/UO 组	0.05 ± 0.01 ^{△△}	0.09 ± 0.01 ^{△△}	0.10 ± 0.01 ^{△△}	0.10 ± 0.02 ^{△△}	0.07 ± 0.01 ^{△△}	0.05 ± 0.02 ^{△△}	0.01 ± 0.01 ^{△△}
<i>F</i>	129.50	1 695.50	759.50	604.30	920.73	236.33	84.00
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
<i>MS</i> 组内	0.000 2	0.000 2	0.000 2	0.001 0	0.000 4	0.000 3	0.000 1

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 VG 组比较^{△△} $P < 0.01$

2.2.2 增殖细胞核抗原(PCNA)的表达 VG组: 静脉移植术后3 h开始有明显的表达,随后表达逐渐增多,与对照组PCNA比较差异有统计学意义

($P < 0.01$)。VG/UO组:PCNA表达明显下调,与VG组PCNA比较差异均有统计学意义($P < 0.01$) (见表2、图2)。

表2 各组别不同时间点移植静脉PCNA的表达($n_i = 3; \bar{x} \pm s$)

分组	1 h	3 h	1天	3天	7天	14天	28天
对照组	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02
VG组	0.55 ± 0.03**	0.68 ± 0.03**	0.83 ± 0.04**	1.10 ± 0.02**	0.91 ± 0.02**	0.76 ± 0.04**	0.57 ± 0.02**
VG/UO组	0.22 ± 0.01 $\Delta\Delta$	0.27 ± 0.02 $\Delta\Delta$	0.35 ± 0.03 $\Delta\Delta$	0.30 ± 0.02 $\Delta\Delta$	0.29 ± 0.01 $\Delta\Delta$	0.19 ± 0.02 $\Delta\Delta$	0.16 ± 0.02 $\Delta\Delta$
F	190.50	276.53	265.76	1 600.00	1 261.00	342.88	325.75
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	0.000 5	0.000 6	0.001 0	0.000 4	0.000 3	0.000 8	0.000 4

q 检验:与VG组比较 $\Delta\Delta P < 0.01$;与对照组比较** $P < 0.01$

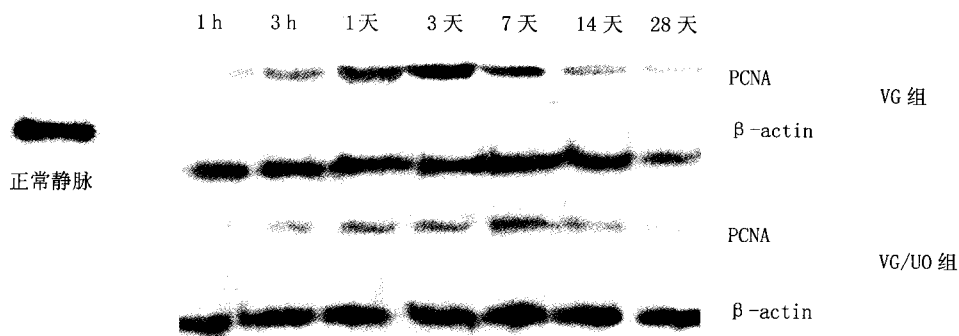


图2 Western blot 检测正常静脉、VG组及VG/UO组不同时间段移植静脉PCNA蛋白的表达

3 讨论

移植静脉动脉化血管重塑和内膜增生伴随炎症反应和平滑肌细胞的增生和迁移,这些反应主要是由于静脉壁受到动脉压力和血流冲击后过度反应造成,最后发生动脉样变化。内皮细胞的脱落,平滑肌细胞的增生和迁移,细胞外基质的沉积及形成新生内膜最终导致移植手术的失败。在哺乳动物细胞中,ERK-1/2主要参与细胞增殖与分化的调控,目前对其激活过程及生物意义已有了较深入的认识,但是关于移植血管内膜增生方面的研究还较少,Pintucci等^[2]认为将大隐静脉移植到动脉系统后,ERK-1/2在早期就有强烈的表达,因此人们尝试通过抑制细胞外信号通路来降低内膜增生。

对外科手术损伤的血管应用相关的抑制剂不仅可以防治早期狭窄,而且可预防血栓形成,保证血管的长期通畅率^[3]。本实验发现ERK-1/2在移植静脉中有较高的表达,并且其表达与PCNA的表达变化趋势相似,这与内膜增生的变化规律基本一致,据此我们认为ERK-1/2与内膜增生有密切的关系。ERK-1/2主要介导增殖反应,包括细胞的分裂、生长、分化等,其中ERK-1/2是MAPK信号传导通路的枢纽,也是介导细胞增殖的最重要途径。

ERK-1/2信号链构成细胞对胞外信号反应的关键途径,导致平滑肌细胞增殖的有丝分裂反应大部分都是经过ERK途径^[4]。因此,ERK-1/2在移植静脉再狭窄过程中有重要的作用。另外,我们应用ERK-1/2抑制剂UO126后ERK-1/2的磷酸化以及PCNA的表达都明显受抑制,这就提示UO126可能是治疗选择。因此在药理上将这一方法应用于临床是可行的,主要是因为:(1)应用抑制剂的方法可以避免全身反应,但是可以起到持续的局部作用。(2)在体给药并不能给手术过程造成困难。(3)早期移植MAPK活化可以调整血管重塑的关键过程,例如,凋亡、增生,在短时间内降低移植静脉的新生细胞形成^[5]。因此,抑制ERK-1/2活化在移植静脉再狭窄过程的早期起重要作用。通过抑制移植静脉中的ERK-1/2活化,可以阻断移植静脉内膜增生,并且产生持续的细胞凋亡。应用UO126治疗,可以改变血管壁中的细胞增生和凋亡之间的平衡,提示它可能是一种降低移植静脉内膜增生的工具。我们的结果指出了一种新的调节移植静脉细胞功能的药理方面的工具。

总之,应用ERK-1/2抑制剂不仅可以降低静脉转流手术诱导的细胞增生和加速细胞的凋亡,并且可以在血管损伤早期阻断炎症反应。

[文章编号] 1000-2200(2010)11-1087-04

· 基础医学 ·

细胞外基质支架对大鼠嗅鞘细胞神经营养素表达的影响

蒋 锋, 胡萍萍, 沈丽萍, 吴晓红, 杨 平

[摘要]目的:构建一种复合型细胞外基质支架,并探讨其是否影响大鼠嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OEC)合成神经营养素。方法:将纤维蛋白原、层黏连蛋白和纤黏连蛋白按一定比例混合,在新鲜大鼠血浆促凝作用下,构建细胞外基质支架,在支架表面种植大鼠 OEC,观察其生长增殖情况和对神经营养因子表达能力的影响。结果:OEC 在复合支架上贴壁良好,增殖旺盛,伸出较长的突起。生长于复合支架上的 OEC 较玻璃片上的细胞合成更多的神经营养素。结论:细胞外基质支架能促进 OEC 增殖,同时促进 OEC 神经营养素分泌。

[关键词] 嗅鞘细胞;纤维蛋白原;层黏连蛋白;纤黏连蛋白;神经营养素;大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 338.3 **[文献标识码]** A

The influence of extra cellular matrix scaffold on the expression of neurotrophins in rat olfactory ensheathing cells

JIANG Feng, HU Ping-ping, SHEN Li-ping, WU Xiao-hong, YANG Ping

(Department of Medical Affairs, Zhenjiang Second People's Hospital, Zhenjiang Jiangsu 212001, China)

[Abstract] **Objective:** To construct a kind of extracellular matrix scaffold and investigate whether it can influence the expression of neurotrophins in rat olfactory ensheathing cells. **Methods:** Mixed fibrinogen, laminin and fibronectin proportionally, then added fresh rat plasma to construct scaffold. Plated the rat olfactory ensheathing cells(OEC) on scaffold and then observed the influence of scaffold on proliferation and neurotrophin expression of OEC. **Results:** Rat OEC adhered to scaffold easily, proliferated quickly and extended long processes. Immunofluorescence and western blotting showed rat OEC on scaffold could produce more neurotrophins than those on glass. **Conclusions:** Extracellular matrix scaffold can promote proliferation of rat OEC and promote the production of neurotrophins.

[Key words] olfactory ensheathing cells; fibrinogen; laminin; fibronectin; neurotrophins; rat

脊髓损伤后神经再生困难,嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cells, OEC)移植是治疗脊髓损伤的主要方法之一。OEC 不仅存在于嗅球中,而且存在于鼻腔嗅黏膜中,获取 OEC 较为方便。OEC 可以通过分泌神经营养因子(nerve growth factor, NGF)、脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经营养素-3(neurotrophin-3, NT-3)等在内的多种神经营养素来促进神经再生和修复^[1-2]。如何将 OEC 移植至损伤部位并保持细胞生长良好及功能对治疗效果有重要影响。以注射细胞悬液的方式移植简便,但 OEC 很容易从损伤部位流失。而应用组织工程支架移植 OEC 治疗脊髓损伤可能具有

良好的应用前景,但支架上生长的 OEC 是否仍然具有分泌神经营养素的能力目前尚不清楚。本实验利用 3 种细胞外基质(ECM)蛋白、纤维蛋白原(FG)、层黏连蛋白(LN)和纤黏连蛋白(FN)构建了一种复合支架,以圆玻片为对照,探讨这种复合支架对 OEC 中神经营养素表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料 实验用 SD 雌性大鼠若干只,体重 250~300 g,由江苏大学实验动物中心提供;FG(F6755)、LN(L2020)和 FN(F7049)购自 Sigma 公司;新鲜鼠血浆为未加抗凝剂大鼠全血高速离心(4 000 r/min, 5 min)后的上清。DMEM、F12 培养基和胎牛血清购自 Gibco 公司;一抗:兔抗大鼠 NGF、BDNF、NT-3 等多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)

[收稿日期] 2009-06-22

[作者单位] 江苏省镇江市第二人民医院 医教科, 212001

[作者简介] 蒋 锋(1962-),男,硕士,研究员。

[参 考 文 献]

- [1] Numaguchi Y, Okumura K, Harada M, et al. Catheter-based prostacyclin synthase gene transfer prevents in-stent restenosis in rabbit atheromatous arteries [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(1): 177-185.
- [2] Pintucci G, Saunders PC, Gulkarov I, et al. Anti-proliferative and anti-inflammatory effects of topical MAPK inhibition in arterIALIZED

vein grafts[J]. FASEB J, 2006, 20(2): 398-400.

- [3] Saunders PC, Pintucci G, Bizakis CS, et al. Vein graft arterialization causes differential activation of mitogen-activated protein kinases [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2004, 127(5): 1276-1284.
- [4] Pintucci G, Mosecatelli D, Saponara F, et al. Lack of ERK activation and cell migration in FGF-2-deficient endothelial cells[J]. FASEB J, 2002, 16(6): 598-600.