

CyPA 及 p-ERK1/2 在动脉粥样硬化大鼠血管内皮中的表达

李 敏^{1,2}, 黎红华^{1,2}, 骆文静¹, 易 娟¹, 吴晓飞¹

摘要 目的 观察动脉粥样硬化(AS)大鼠血管内皮功能以及亲环素 A(CyPA)和磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(p-ERK1/2)的表达变化。方法 将 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组(每组 10 只):对照组、AS 12 周组、AS 16 周组。对照组给予基础饲料喂养+腹腔注射等量生理盐水;AS 组给予高脂饲料喂养+维生素 D3 注射液 60 万 IU/kg 一次性腹腔注射。对应不同造模时间处死大鼠,分离腹主动脉,观测离体腹主动脉环对乙酰胆碱的舒张反应;HE 染色、免疫组化法检测动脉血管壁 CyPA 及 p-ERK1/2 的表达。结果 与对照组比较,AS 12 周、AS 16 周组血管内皮功能下降,3 组差异有统计学意义($P < 0.05$);HE 染色显示对照组大鼠血管壁呈正常结构,AS 12 周组大鼠内皮细胞破坏、平滑肌细胞增生,AS 16 周组粥样钙化斑块形成;免疫组化分析显示 3 组大鼠血管壁内 CyPA 及 p-ERK1/2 表达逐渐升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 随着 AS 程度加重,大鼠血管内皮依赖性舒张功能明显下降,动脉粥样钙化斑块严重, CyPA 及 p-ERK1/2 表达显著增加。CyPA、p-ERK1/2 信号机制参与加重血管动脉粥样硬化进展,可能是促进 AS 进展的途径之一。

关键词 动脉粥样硬化;亲环素 A;磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2;内皮依赖性舒张功能

中图分类号 R 543.1+2

2016-07-15 接收

基金项目:湖北省自然科学基金(编号:2013CFB428)

作者单位:¹ 广州军区武汉总医院神经内科,武汉 430070

² 南方医科大学附属武汉临床学院神经内科,武汉 430070

作者简介:李 敏,女,硕士研究生;

黎红华,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: lihonghua567@aliyun.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1768-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.011

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是以内皮细胞功能障碍为起始事件,慢性炎症反应相互作用的病理过程,是导致血管性疾病的主要致病因素^[1]。在长期高脂高糖作用下产生大量活性氧自由基,诱导机体处于氧化应激状态,促进血管内皮炎性反应,损伤内皮完整性^[2]。亲环素 A(cyclophilin A, CyPA)作为一种重要的氧化应激诱导因子与 AS 病变的关系成为近年研究热点^[3],磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(phosphorylated extracellular signal regulated kinase, p-ERK1/2)是细胞信号转导机制中重要的信号调节酶,将信号从细胞膜表面受体转导至细胞核,诱导炎症细胞增殖、迁移,促炎症反应^[4]。但是 CyPA 是否参与 AS 进展,与 AS 严重程度关系尚未见报道。该实验通过高脂喂养诱导大鼠血管动脉粥样硬化,观察血管内皮功能变化以及血管内皮细胞 CyPA、p-ERK1/2 的表达,探讨动脉硬化发生发展的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 30 只,180~200 g,购自湖北省实验动物研究中心。饲养于 12 h 明暗交替的 SPF 环境中,提供充足饮水、饲料,维持室内温度(22 ± 1)℃,湿度(60 ± 10)%。

1.1.2 主要实验药剂 维生素 D3 注射液(上海通

measured by ELISA. Mice were divided into two groups including anti-IL-17A neutralization antibody-treated mice and isotype control antibody-treated mice. After partial hepatectomy, the liver weight was measured and the liver weight/body weight ratio was calculated. The interleukin 6(IL-6) levels in the sera were measured by ELISA. The levels of phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3(STAT3) and cyclinD1 in the hepatocytes were measured by Western blot. **Results** The levels of IL-17A in the liver significantly increased after partial hepatectomy($P < 0.01$). Neutralization of IL-17A not only reduced the live weight and the liver weight/body weight ratio, but also decreased the IL-6 levels in the sera and the levels of phosphorylated STAT3 and cyclinD1 in the hepatocytes. **Conclusion** The increasing IL-17A induces IL-6 production and promotes hepatocyte proliferation, which plays an important role in the liver regeneration after partial hepatectomy.

Key words IL-17A; IL-6; liver regeneration

用药业);胆固醇、胆酸钠(武汉胜天宇生物科技有限公司);兔抗 CyPA 抗体、兔抗 p-ERK1/2 抗体(北京索莱宝科技有限公司);基础饲料由华中科技大学实验动物中心提供;高脂饲料(81.3% 普通饲料、5% 蔗糖、10% 猪油、3% 胆固醇、0.5% 胆酸盐、0.2% 丙基硫氧嘧啶)由湖北省万千佳兴生物科技有限公司提供。

1.1.3 主要仪器 BL-420S 生物机能实验系统、HV-4 离体组织器官恒温灌流系统、JH-2 型张力换能器(成都泰盟公司)。YB-6 型生物组织包埋机, RM2016 型 Leica 石蜡切片机, OLYMPUS BX51 照相显微镜等。

1.2 方法 30 只大鼠随机分为 3 组:对照组 10 只, AS 12 周组 10 只, AS 16 周组 10 只。AS 组给予高脂饲料喂养,并在高脂饲料喂养第 2 天给予一次性腹腔注射维生素 D3 注射液 60 万 IU/kg^[5]。对照组给予基础饲料+腹腔注射等量生理盐水。造模后处死大鼠,取材。

1.3 取材 过量水合氯醛麻醉处死大鼠,剔除周围组织,快速分离腹主动脉。

1.3.1 离体血管环内皮依赖性舒张功能测定 每条腹主动脉截取约 4 mm 长血管环连接到 JH-2 型张力换能器,下方以钢钩固定于槽底,置于含 Krebs 液的 HV-4 离体恒温组织器官灌流系统,给予 2 g 张力负荷,通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体,在 37 °C 水浴中平衡 1 h,每 15 min 换 Krebs 液 1 次。血管环张力平衡后向浴槽中加入终浓度为 10⁻⁶ mol/L 去甲肾上腺素收缩血管环,待其张力达平顶后依次加入不同浓度(10⁻⁹ ~ 10⁻⁴ mol/L)的乙酰胆碱,记录每一浓度下血管环的张力,取各组的平均张力,各浓度的内皮依赖性舒张反应(%) = [(最大张力-各浓度点的张力)/(最大张力-基础值)] × 100%,绘制浓度反应曲线。

1.3.2 HE 染色 新鲜腹主动脉以 4% 多聚甲醛固定 48 h 后,行石蜡包埋,切片(横切,切片厚度为 2 μm),按照 HE 染色步骤染色后置于 400 倍光镜下

观察并摄片。

1.3.3 免疫组织化学 SP 法染色与数据采集 石蜡切片按照免疫组化 SP 法步骤进行染色。以胞质胞膜出现棕黄色染色为 CyPA 染色阳性,以胞质胞核出现棕黄色染色为 p-ERK1/2 染色阳性。每张切片随机抽取 3 个不同的 400 倍视野,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对免疫组化结果进行分析,测定其平均光密度值(累积光密度/测量区域面积)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 21.0 软件进行分析,计量资料服从正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠动脉环对乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张功能反应 30 只大鼠腹主动脉环在乙酰胆碱浓度梯度(10⁻⁹ ~ 10⁻⁴ mol/L)下的内皮依赖性舒张功能呈现不同反应。对照组血管环内皮依赖性舒张功能良好,最大舒张功能达(98.54 ± 2.72)%, AS 12 周和 AS 16 周组内皮功能均较相应浓度下对照组血管内皮舒张功能下降,最大舒张功能分别是(69.39 ± 3.24)%、(46.24 ± 2.37)%,明显低于对照组,AS 16 周又显著低于 AS 12 周组,3 组间大鼠血管环内皮舒张功能在乙酰胆碱浓度(10⁻⁹ ~ 10⁻⁴ mol/L)梯度下相比,差异均有统计学意义($F = 38.56, 96.87, 148.32, 139.47, 485.54, 539.28, P < 0.05$)。见表 1。

2.2 各组大鼠血管 HE 染色结果 光镜下各组大鼠腹主动脉 HE 染色结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组大鼠腹主动脉内皮光滑完整,内皮细胞和平滑肌细胞排列整齐,无增生及凋亡,未见炎性细胞浸润,无弹性纤维连续性中断(图 1A)。AS 12 周组大鼠动脉内皮损伤,平滑肌细胞出现增生、细胞核排列紊乱,内皮下可见炎性细胞浸润,细胞外基质增大,弹性纤维连续性中断,粥样斑块形成(图 1B)。AS 16 周大鼠血管内皮损伤脱落,弹性纤维断

表 1 各组动脉环在浓度梯度下内皮依赖性舒张反应(%, $n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	乙酰胆碱浓度(mol/L)					
	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
对照	9.58 ± 2.32	18.37 ± 2.18	39.48 ± 2.45	63.52 ± 3.26	79.98 ± 2.23	98.54 ± 2.72
AS 12 周	5.46 ± 1.29*	12.76 ± 1.25*	28.87 ± 2.13*	45.38 ± 3.25*	59.39 ± 2.35*	69.39 ± 3.24*
AS 16 周	3.37 ± 1.23*#	7.72 ± 1.37*#	17.49 ± 1.26*#	27.54 ± 2.38*#	35.45 ± 1.47*#	46.24 ± 2.37*#

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 AS 12 周组比较: # $P < 0.05$

裂,血管中层钙化斑形成(图1C)。

2.3 各组大鼠动脉 CyPA、p-ERK1/2 免疫组化染色及平均光密度值比较 免疫组化染色光镜下观察各组大鼠腹主动脉血管壁内 CyPA、p-ERK1/2 均有不同程度的表达。CyPA 主要表达在血管内皮细胞及血管平滑肌细胞胞质, p-ERK1/2 主要在血管内皮细胞和平滑肌细胞胞质及胞核内显著表达。对照组血管壁内皮及平滑肌层见散在少量 CyPA、p-ERK1/2 表达。AS 12 周组、AS 16 周组大鼠血管壁内可见显著散在

CyPA、p-ERK1/2 的表达,明显高于对照组 ($P < 0.05$) 且 AS 16 周大鼠腹主动脉血管壁内上述指标的表达又显著高于 AS 12 周组 ($P < 0.05$),见图 2、3。进一步平均光密度值测定提示, CyPA、p-ERK1/2 的表达在对照组、AS 12 周和 AS 16 周大鼠血管壁内呈显著递增趋势(CyPA: 0.0539 ± 0.0047 vs 0.2987 ± 0.0302 vs 0.4099 ± 0.0264 ; p-ERK1/2: 0.0977 ± 0.0323 vs 0.4864 ± 0.0239 vs 0.6654 ± 0.0446); 3 组 CyPA、p-ERK1/2 的表达相比, 差异均有统计学意

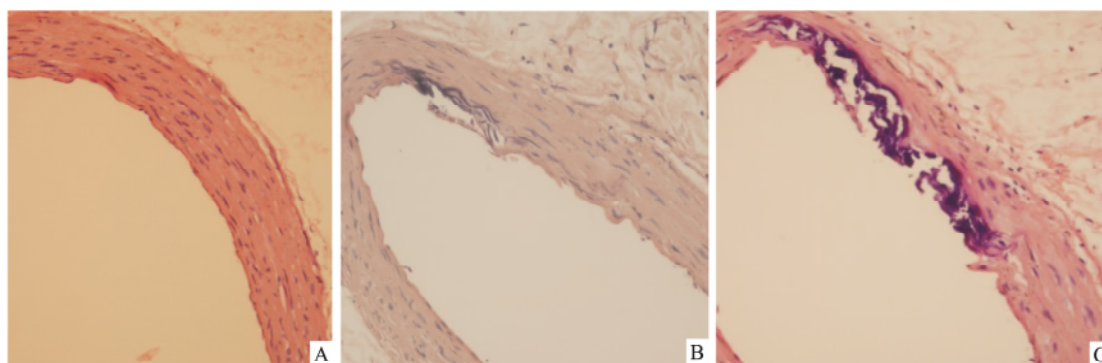


图1 大鼠腹主动脉切片 HE 染色 $\times 400$

A: 对照组; B: AS 12 周组; C: AS 16 周组

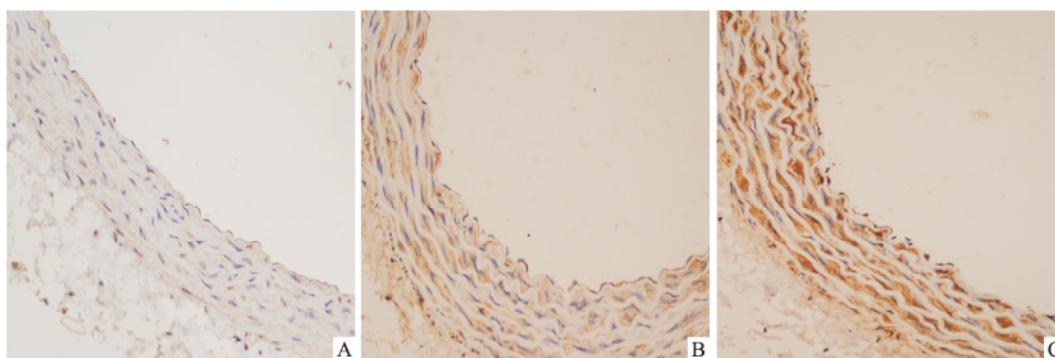


图2 各组大鼠腹主动脉 CyPA 免疫组化染色 $\times 400$

A: 对照组; B: AS 12 周组; C: AS 16 周组

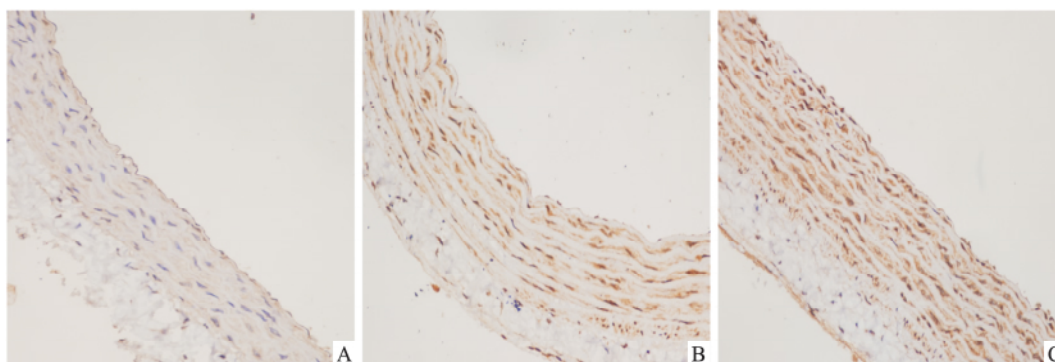


图3 各组大鼠腹主动脉 p-ERK1/2 免疫组化染色 $\times 400$

A: 对照组; B: AS 12 周组; C: AS 16 周组

义($F = 108.67, 154.83, P < 0.05$)。见图4。

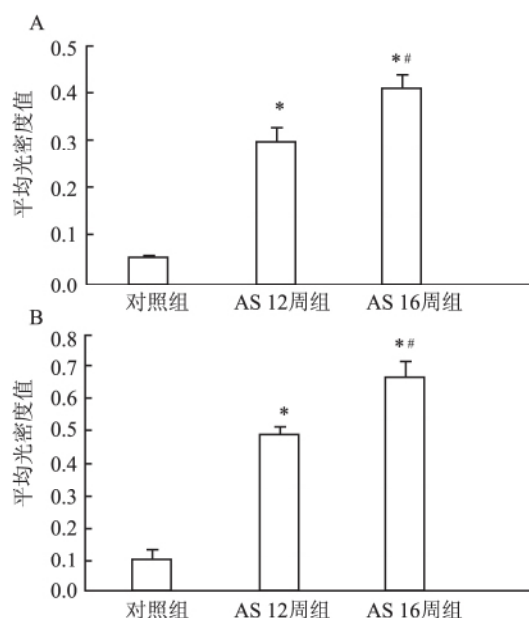


图4 大鼠动脉壁 CyPA、p-ERK1/2 免疫组化平均光密度值测定

A: CyPA; B: p-ERK1/2; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 AS 12 周组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

AS 是一种慢性进展性炎症状态,在高血压、高血脂、高血糖等多种危险因素作用下均可导致血管发生慢性炎症病变。高脂高热量饮食习惯诱导体内大量脂肪组织沉积,研究^[6-8]表明体内过量沉积的脂肪组织诱发氧化应激,进而产生大量活性氧诱导内皮细胞凋亡、血管壁炎症反应等破坏血管内皮细胞完整性,启动血管壁动脉硬化病变。CyPA 是免疫抑制剂环孢素 A 的胞内结合蛋白。一般在机体氧化应激刺激下,通过血管内皮及平滑肌层细胞产生,并通过囊泡运输从胞内分泌到胞外参与平滑肌细胞、炎症细胞增殖,是一种氧化应激诱导分泌的生长因子^[9-10]。胞外的 CyPA 激活相应的信号通路,进而诱导血管内皮损伤及血管重构^[11];此外,体内血脂代谢受管壁清道夫受体影响关系密切,过量 CyPA 破坏受体调节功能,增加低密度脂蛋白的过量吸收,这一过程亦参与 AS 的进展。研究^[12]表明, CyPA 可通过细胞表面信号通路 CD137-CD137L 介导动脉硬化的发展,但具体相关信号机制仍不清楚。研究^[13]表明,病理状态下胞外 CyPA 介导 ERK1/2 的活化是将信号从细胞膜表面受体转导至胞核的关键,在内皮细胞及平滑肌细胞诱导核转录因子 NF- κ B 活

化、DNA 合成,促进细胞增殖以及促进炎症反应。

本实验通过运用高脂饲料联合维生素 D3 注射液复制 AS 大鼠模型。高脂饲料促进脂肪沉积引发氧化应激反应,联合给予维生素 D3 注射液干预,诱导大鼠机体血钙代谢紊乱,诱导大鼠血管发生 AS 病变同时增加钙盐沉积,加重病变血管炎性钙化。观察大鼠血管内皮功能改变、血管钙化斑块,同时检测病变血管 CyPA、p-ERK1/2 表达与 AS 病变程度的关系。结果显示,对照组大鼠血管内皮完整。AS 组大鼠血管内皮损伤,内皮依赖性舒张功能明显下降;炎症细胞浸润,平滑肌层明显增厚,粥样斑块形成; CyPA、p-ERK1/2 在血管内皮含量明显增加。机体氧化应激损伤血管内皮完整性,过量活性氧自由基介导 CyPA 的分泌,启动炎症细胞趋化作用,同时刺激 ERK1/2 信号酶活化,诱导血管内皮细胞炎症病变,促进 AS 发生。

CyPA 参与 AS 的发生是毋庸置疑的,但是 CyPA 是否与 AS 的严重程度有关目前罕见报道。Ainouz et al^[14]研究提示实验大鼠颈动脉血管的结构及功能改变与动脉硬化病变程度紧密相关。本实验在复制 AS 模型时依据造模时间不同分为 AS 12 周、AS 16 周,对比不同造模组间大鼠血管内皮功能以及各指标表达变化,明确 CyPA、p-ERK1/2 与动脉粥样硬化的严重程度。结果显示,3 组大鼠内皮依赖性舒张功能进行性下降,AS 16 周大鼠内皮依赖性舒张功能下降最显著,血管内皮脱落,弹性纤维断裂,血管中层钙化斑形成;血管壁 CyPA、p-ERK1/2 表达亦呈逐渐升高趋势,AS 16 周大鼠血管壁各指标的表达较其余组显著升高。由此推测 CyPA、p-ERK1/2 信号机制参与血管 AS 进展恶化,促进 AS 的发生发展。证实 CyPA 是 AS 进展的始动因子,贯穿 AS 进展全程。

综上所述,高脂饮食诱导机体氧化应激水平升高、血管内皮损伤,血管平滑肌细胞及内皮细胞分泌 CyPA 激活 p-ERK1/2 促进动脉硬化发生,启动并且加重 AS 恶化进展。由此认为, CyPA 可能是 AS 病变的始动因子,在病变过程中通过 CyPA-p-ERK1/2 信号通路参与 AS 的发生发展。CyPA、p-ERK1/2 信号通路可为 AS 预防和治疗提供新靶点。

参考文献

- [1] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115-26.
- [2] Lanqbein H, Hofmann A, Brunssen C, et al. Impact of high-fat diet

- and voluntary running on body weight and endothelial function in LDL receptor knockout mice [J]. *Atheroscler Suppl* 2015 ,18: 59 – 66.
- [3] Satoh K ,Nigro P ,Berk B C. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: a mechanistic linkage by cyclophilin A [J]. *Antioxid Redox Signal* 2010 ,12(5) : 675 – 82.
- [4] Chen Y ,Duan Y ,Yang X ,et al. Inhibition of ERK1/2 and activation of LXR synergistically reduce atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2015 ,35(4) : 948 – 59.
- [5] 周红 ,吴晓燕 ,袁艺标 ,等. 三种剂量维生素 D3 结合高脂饲料建立大鼠动脉粥样硬化模型的比较 [J]. *中国动脉硬化杂志* , 2012 ,11(20) : 995 – 8.
- [6] Moe K T ,Naylunn T M ,Yin N O ,et al. Tumor necrosis factor- α induces aortic intima-media thickening *via* perivascular adipose tissue inflammation [J]. *J Vasc Res* 2013 ,50(3) : 228 – 37.
- [7] Miao C Y ,Li Z Y. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth [J]. *Br J Pharmacol* ,2012 ,165 (3) : 643 – 58.
- [8] Takaoka M ,Suzuki H ,Shioda S ,et al. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 ,30(8) : 1576 – 82.
- [9] Suzuki J ,Jin Z G ,Meoli D F ,et al. Cyclophilin A is secreted by a vesicular pathway in vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res* , 2006 ,98(6) : 811 – 7.
- [10] Rezzani R ,Favero G ,Stacchiotti A ,et al. Endothelial and vascular smooth muscle cell dysfunction mediated by cyclophilin A and the atheroprotective effects of melatonin [J]. *Life Sci* 2013 ,92(17 – 19) : 875 – 82.
- [11] 张雁斌 ,杜大勇 ,李运田 ,等. CyPA 及 CD147 在动脉粥样硬化兔血管重构中的表达 [J]. *安徽医科大学学报* ,2015 ,50 (6) : 770 – 4.
- [12] Li Y ,Yan J ,Wu C ,et al. CD137-CD137L interaction regulates atherosclerosis *via* cyclophilin A in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *PLoS One* 2014 ,9(2) : e88563.
- [13] Obchoei S ,Sawanyawisuth K ,Wonkham C ,et al. Secreted cyclophilin A mediates G1/S phase transition of cholangiocarcinoma cells *via* CD147/ERK1/2 pathway [J]. *Tumour Biol* ,2015 ,36 (2) : 849 – 59.
- [14] Ainouz L ,Baz A ,Ammar Aouchiche M A ,et al. Relation between structure and function of the cerebral artery "carotid" in laboratory rat submitted to atherogenic diet [J]. *Ann Cardiol Angeiol* , 2015 ,64(3) : 180 – 6.

Expression of CyPA and p-ERK1/2 in atherosclerosis lesion of rats with atherosclerosis disease

Li Min^{1,2} , Li Honghua^{1,2} , Luo Wenjing¹ , et al

(¹Dept of Neurology , Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command , Wuhan 430070;

²Dept of Neurology ,The Wuhan Clinical Institute of Southern Medical University , Wuhan 430070)

Abstract Objective To observe the change of endothelial-dependent vasodilatation and the expression of cyclophilin A (CyPA) and phosphorylated extracellular signal regulated kinase 1/2(p-ERK1/2) in atherosclerosis lesion of high cholesterol diet fed rats. **Methods** Thirty male wistar rats were randomly divided into three groups: the control group , AS 12W group and AS 16W group. The rats in the control group were fed with base diet. The rats in AS groups were fed with high cholesterol diet and given intraperitoneal injection of a single dose of Vitamin D3 600 000 IU/kg. The rats were excuted after 16 weeks , the response of the separated aorta abdominalises to acetylcholine was examined in *ex vivo* organ bath. Besides , the aorta abdominalises were stained with hematoxylin and eosin , and the expression of CyPA and p-ERK1/2 was detected by immunohistochemical staining. **Results** Compared with the control group , it obviously declined in endothelial-dependent vasodilatation of the AS 12W group and AS 16W group , the differences of three groups had statistical significance ($P < 0.05$) . HE staining showed that normal vessel structure was observed in the control group , endothelial cells damage and vessel smooth muscle cells proliferation was observed in AS 12W group , formation of atheromatous plaque and calcified plaque was observed in AS 16W group. Immunohistochemical analysis suggested that the expression of CyPA and p-ERK1/2 were increasing in AS groups. Moreover , the differences of three groups had statistical significance ($P < 0.05$) . **Conclusion** CyPA and p-ERK1/2 may be one of mechanisms to promote the progress of atherosclerosis.

Key words atherosclerosis; cyclophilin A; phosphorylated extracellular signal regulated kinase1/2; endothelial-dependent vasodilatation