

· 论 著 ·

磷脂酶 A₂ 与高血压大动脉血管重构关系初步研究*

曹相玫¹, 景 丽^{1△}, 张建中¹, 孙金萍², 安 欣¹, 郭凤英¹

(宁夏医科大学: 1. 病理系; 2. 附属医院病理科 银川 750004)

摘要:目的 探讨磷酸化胞浆型磷脂酶 A₂ (cPLA₂) 及其上游激酶 MEK 与高血压大动脉血管平滑肌细胞增殖/凋亡失衡的关系, 进一步探讨高血压状态下大动脉血管重构的可能机制。方法 将 4、16、24 周龄组雄性自发性高血压大鼠 (SHR) 作为实验组, 同周龄雄性 Wistar 大鼠 (MKY) 作为对照组, 各组 5 只大鼠。采用免疫组化和 Western blot 对比分析各组动物主动脉平滑肌细胞中 cPLA₂ 以及 MEK 的表达。结果 (1) SHR 从 8 周龄开始血压升高, SHR16、SHR24 与同周龄 WKY 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$); (2) 各周龄 WKY 心脏/体质量比值差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 相同周龄 SHR 心脏/体质量比值较高并随周龄增加心脏/体质量比值呈增高趋势, SHR 心脏/体质量比值均高于同周龄对照组; (3) 磷酸化 cPLA₂ 在 SHR4 表达率分别为 11.71%、46.00%、51.59%, 而同周龄 WKY 表达率分别为 29.10%、36.00%、67.84%, 随大鼠周龄增加, 磷酸化 cPLA₂ 表达率逐渐增加 ($P < 0.05$); (4) 随大鼠周龄增加, 磷酸化 MEK 表达率增加 ($P < 0.05$)。结论 MEK 的激活与 cPLA₂ 活性减弱可能共同参与到了高血压大动脉血管重构的发生、发展。

关键词: 高血压; 主动脉; 血管平滑肌细胞; 胞浆型磷脂酶 A₂; MEK

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2010.21.005

中图分类号: R544.102

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2010)21-2858-03

Preliminary study on relation of phospholipase A₂ and Vascular remodeling of hypertensive main artery*

CAO Xiang-mei, JING Li[△], ZHANG Jian-zhong, et al.

(1. Department of Pathology; 2. Department of Pathology, Affiliated Hospital, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: Objective To study the relation of phosphorylated cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂) and phosphorylated mitogen-activated protein kinase (MEK) with proliferation or apoptosis imbalance of vascular smooth muscle cells (VSMC) of large artery and to further study the possible mechanism of vascular remodeling of large artery under hypertensive status. **Methods** The experimental groups included 4-week-old spontaneously hypertensive rats (SHR), 16-week-old SHR and 24-week-old SHR, while male Wistar rats (WKY) with the same week age as the control, 5 cases in each group, the expressions of cPLA₂ and MEK of aorta VSMC in each animal group were comparatively analyzed by immunohistochemical technique and Western blot. **Results** (1) Blood pressure in SHR increased from the beginning of 8-week-old. There was statistical difference between SHR 16W, SHR 24W and same week age WKY ($P < 0.05$). (2) The ratio of heart to body weight in various week age groups had no statistical difference. The ratio of heart to body weight in the same week age SHR was higher and showed the increasing trend with the week age increasing. The ratio of heart to body weight in SHR was higher than that of the control group. (3) The expression of phosphorylated cPLA₂ in SHR 4W (11.70%), SHR 16W (46.00%) and SHR 24W (51.59%) was lower than that (29.10%, 36.00%, 67.84%, respectively, $P < 0.01$) in same week age WKY. The positive rate of phosphorylated cPLA₂ was increased with the week age increasing ($P < 0.05$). (4) The positive rate of phosphorylated MEK was increased with the week age increasing ($P < 0.05$). **Conclusion** MEK activation and activity attenuation of cPLA₂ may jointly participate the occurrence and development of vascular remodeling of hypertensive large arteries.

Key words: hypertension; aorta; vascular smooth muscle cells; cytosolic phospholipase A₂; MEK

高血压细小动脉重构直接影响高血压发生、发展, 参与导致靶器官结构和功能损害, 研究同时表明, 大动脉重构在高血压的发生、发展中也发挥重要作用^[1]。血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖/凋亡失衡是高血压引起血管重构的主要原因^[2]。VSMC 增殖/凋亡失衡的机制不清, 胞浆型磷脂酶 A₂ (cytosolic phospholipase A₂, cPLA₂) 活化后可对细胞的分化和增殖产生调节作用, cPLA₂ 的活化多经丝

裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路中细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 通路 (Ras/Raf/MEK/ERK) 进行^[3-4], 生理状态下, ERK 是 MEK 的惟一下游底物, MEK 和 ERK 在该通路中具有重要地位。本研究探讨高血压主动脉 VSMC 中 cPLA₂ 的作用以及与 ERK1/2 上游激酶 MEK 的关系, 以进一步明确高血压状态下大动脉 VSMC 增殖/凋亡失衡参与血管重

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30860095); 宁夏自然科学基金资助项目 (NZ0605)。△ 通讯作者, 电话: 0951-6980107; E-mail: jingli@nxmu.edu.cn。

构的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats,SHR)15 只,雄性 Wistar 大鼠(WKY)15 只,均购自北京维通利华实验动物有限公司。单克隆磷酸化兔抗 p-MEK1/2 IgG(Ser2211)抗体(Cell Signaling 公司产品),单克隆磷酸化兔抗 p-cPLA-2 IgG(P3639 Rb-h)抗体、过氧化物酶标记的链霉卵白素法(streptavidin -biotin-peroxidate complex,S-ABC)免疫组化染色试剂盒(USCNLIFE 公司产品),山羊抗兔 IgG-HRP(克隆号:04-15-06,KPL 公司),PBS 缓冲液、多聚赖氨酸、3,3'-二氨基联苯胺(3,3-diaminobenzidine DAB)试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),预染 Marker(兰州 TIAN-GEN 公司),Western 一抗稀释液、RIPA 细胞裂解液(武汉碧云天生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物 将 15 只 SHR 分为 4、16、24 周龄组,15 只 WKY 作为对照。SHR 大鼠出厂时经尾动脉仪测量基础血压及心率;所有大鼠均饲养于 SP-F 级环境中,安静、正常光照、正常饮食。每周同一时间用 BL-420E+生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司)测大鼠动脉压 1 次,至周龄处死。于处死前,经腹腔注射 3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后,经股动脉插管连接二导生理记录仪测量动物心率(HR)、动脉收缩压(SAP)、动脉舒张压(DAP)、平均动脉压(MAP)等。迅速取出胸主动脉一半置于 DEPC 处理后的 4%中性多聚甲醛溶液(1:1 000)中固定 48 h,用于免疫组化检测;一半装入冻存管,投入液氮中迅速冷冻后移置于-80℃冰箱中冷冻,用于 Western blot 测定蛋白含量。

1.2.2 免疫组化法 采用 SP 法。操作按照产品说明书进行,选择推荐的乳腺癌标本作阳性对照、PBS 代替一抗作为阴性对照,DAB 显色。

1.2.3 Western-blot 检测 按照蛋白质 SDS-PAGE 电泳操作步骤进行配胶、电泳、DAB 染色及采集图像。

1.2.4 结果判断 实验标本均取自胸主动脉,以其冠状切面包埋后切片,随机计数 20 个高倍视野中的全部 VSMC 细胞数,p-cPLA₂ 和 p-MEK 染色均以胞浆出现棕色或棕黄色颗粒视为阳性细胞。Western blot 检测结果经 BIO-RAD 生物学图像分析系统对目的显色条带进行光密度分析和扫描半定量

分析。观察各实验组泳道膜上棕黑色目的蛋白带密度的灰度并进行统计学分析。

1.3 统计学方法 用 SPSS11.5 统计软件进行数据统计,两组间血压用 *t* 检验,免疫组化阳性率用 χ^2 检验。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般状况 实验大鼠在实验期间饮食、活动、体质量增长均正常,无动物死亡现象。图 1 为各组大鼠处死时心脏/体质量趋势图,WKY 的体质量均高于同周龄 SHR。SHR 的心脏/体质量比值均较同周龄 WKY 的心脏/体质量比值高,并且随周龄增加心脏/体质量比值呈增高趋势。

2.2 血压变化 实验期间,各周龄 WKY MAP 维持在(106.22±11.52)~(110.60±12.50)mm Hg 之间。4 周龄 SHR 血压为(90.25±4.13)mm Hg,8 周龄组开始升高,SHR8、SHR16、SHR24 明显高于 SHR4 和同周龄 WKY,图 2 为 SHR 血压随周龄的增加呈升高趋势。

2.3 p-cPLA₂ 检测结果

2.3.1 主动脉 VSMC 中 p-cPLA₂ 免疫组化染色表明 p-cPLA₂ 在各组大鼠主动脉 VSMC 中有不同程度的表达,SHR 和 WKY 均随周龄增加其表达逐渐增强,SHR 表达率低于同周龄 WKY(表 1),差异有统计学意义($P < 0.01$)。SHR24 阳性细胞少,阳性细胞着色淡,其分布多接近内皮下和外膜下(图 3a),而 WKY24 主动脉各层 VSMC 均可见较广泛的表达(图 3b)。

2.3.2 主动脉 VSMC 中 p-cPLA₂ 经 Western blot 检测未检出,可能由于组织在-80℃冰箱放置时间过长,同时裂解过程处理不当,而组织中 p-cPLA₂ 易失去活性,所以经反复实验,Western blot 均未检出。

2.4 p-MEK 的检测结果

2.4.1 主动脉 VSMC 中 p-MEK 免疫组化染色结果 SHR 和 WKY 均随周龄增加其 p-MEK 表达逐渐增强,SHR 表达于同周龄 WKY(表 2),且差异有统计学意义($P < 0.01$,SHR24 主动脉中各层 VSMC 均可见较广泛的表达(图 4a),而 WKY24 表达明显减少,且细胞着色淡,多分布于内皮下和外膜下(图 4b)。

2.4.2 p-MEK Western blot 检测结果 相对分子质量 43 kD 附近可见 p-MEK 蛋白杂交条带(图 5),经蛋白条带相对浓度分析显示,随周龄增加 SHR 主动脉 VSMC 中 p-MEK 蛋白相对含量逐渐增高。

表 1 主动脉 VSMC 中 p-cPLA₂ 的表达[个/20HPF,(%)]

组别	周龄(周)		
	4	16	24
SHR	76.67±66.49 ^a (11.71)	322.00±173.32 ^a (46.00)	462.40±280.46 ^a (51.59)
WKY	194.50±16.26(29.10)	288.75±234.97(36.00)	562.80±208.99(67.84)

^a: 与同周龄 WKY 比较, $P < 0.01$ 。

表 2 主动脉平滑肌细胞中 p-MEK 的表达[个/20HPF,(%)]

组别	周龄(周)		
	4	16	24
SHR	85.00±98.14 ^a (11.53)	421.60±143.32 ^a (54.74)	533.40±282.95 ^a (55.11)
WKY	165.50±65.76(24.45)	205.25±101.04(26.90)	373.00±161.62(45.90)

^a: 与同周龄 WKY 比较, $P < 0.05$ 。

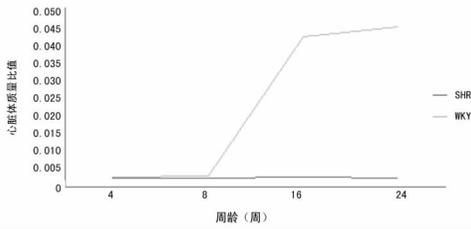


图 1 各组大鼠处死时心脏/体质量变化趋势图

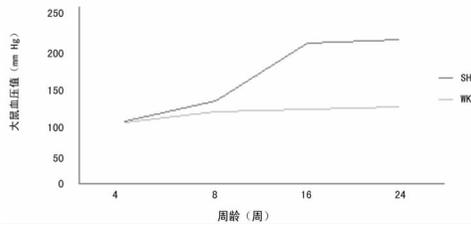
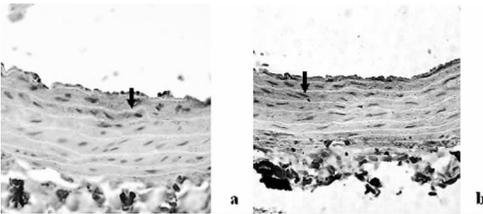
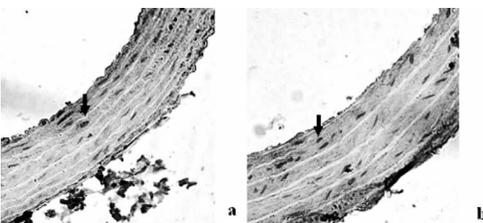


图 2 各组大鼠血压变化趋势图



a: SHR24 可见少数 VSMC 阳性(↑) b: WKY24 VSMC 阳性(↑)

图 3 主动脉 VSMC 中 p-cPLA₂ 免疫组化染色(DAB 显色, ×400)



a: SHR24 VSMC 阳性(↑) b: WKY24 可见少数 VSMC 阳性(↑)

图 4 主动脉 VSMC 中 p-MEK1/2 免疫组化染色(DAB 显色, ×400)

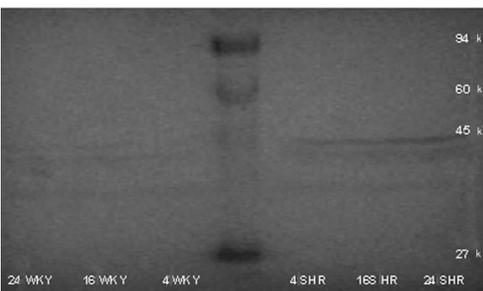


图 5 主动脉 VSMC 中 p-MEK1/2 Western blot 检测

3 讨 论

高血压时大动脉重构主要表现为管腔扩张,管壁增厚、钙化,病变血管壁中层弹性纤维数量减少、弹性膜断裂,胶原纤维增殖、聚集,弹力纤维与胶原纤维的比例明显下降;弹力膜内的

平滑肌细胞肥大、排列紊乱,纤维基质与平滑肌细胞的结合松散,导致大动脉顺应性减退^[5]。

临床上,高血压患者主动脉长期受高血压及高应力的影响,顺应性下降,是造成心肌肥厚和心功能不全的重要因素^[1]。在高血压患者中,约有 1/3 会出现左室肥厚,这是心脏对慢性压力和容积超负荷的适应性变化,也是血管重构引起心脏受累病理表现。本研究证实,SHR 从 8 周龄开始血压明显升高,随周龄增加,SHR 血压逐渐升高、心脏/体质量比值也逐渐升高,可能提示高血压状态下主动脉发生重构、顺应性下降,使心脏长期压力负荷增加而造成代偿性肥厚。

磷脂酶 A₂ 是一类能水解磷脂 sn-22 位酯键释放出游离的脂肪酸和溶血磷脂的酯酶超家族^[3],分为分泌型、胞浆型和钙离子非依赖型三大类^[12],在炎症中发挥重要作用,其中 cPLA₂ 可通过磷酸化作用而活化,活化后与细胞的增殖和凋亡有密切的关系^[4]。王韻等^[7]进行人脐静脉内皮细胞内低密度脂蛋白的研究提示,cPLA₂ 的活化参与了 MM-LDL 引起的 AA 释放和人脐静脉内皮细胞凋亡。Panini^[8]等研究发现,cPLA₂ 通过钙调蛋白信号转导途径参与 25-OHC 或氧化修饰低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞和成纤维细胞凋亡。Faghini 等^[9]研究发现 Ang II 通过活化 cPLA₂ 后激活 VSMC 中 Syk(一种 72 kD 酪氨酸激酶,与生长、分化以及造血和非造血细胞的信号转导相关),促进 VSMC 分化和增殖,并由 LO 促进 AA 产生代谢产物。本实验结果显示,各周龄 SHR 和 WKY 的主动脉 VSMC 中 p-cPLA₂ 均有表达,且随着大鼠周龄增加,p-cPLA₂ 表达率增加;各周龄 SHR 表达均比同周龄 WKY 明显减少,可能提示随着大鼠周龄增加,内外环境的某些刺激因素可激活 cPLA₂,活化的 cPLA₂ 可以诱导大动脉 VSMC 凋亡,而在高血压状态下,复杂的体内外环境因素使 cPLA₂ 对大动脉 VSMC 凋亡调节减弱,细胞增殖活性相对增强,间质胶原纤维增殖、聚集,使大动脉重构、弹性减退、顺应性下降,而促使 SHR 心脏肥大、心脏/体质量比值增加。

cPLA₂ 的磷酸化激活主要是通过两条途径,即 MAPKs 信号转导途径和钙/钙调蛋白激酶信号转导途径,多数细胞经 MAPKs 信号转导途径中 ERK 通路活化 cPLA₂。其整个过程为:通过 Ras→Raf→MEK1/2→ERK1/2 环节中的 Raf 蛋白磷酸化 cPLA₂ 的两个 MAPKs 磷酸化位点(S505 和 S727)而将其激活,激活 cPLA₂ 使其对细胞的分化和增殖产生调节作用^[4,6]。Su 等^[10]研究显示,衣原体吸收甘油磷酸变位酶必须 Raf-MEK-ERK-cPLA₂ 信号级联的活化;Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 途径和 cPLA₂ 可被衣原体感染活化;cPLA₂ 抑制剂阻断了衣原体摄取甘油磷酸变位酶并降低了衣原体的生长活性;封闭 c-Raf-1 或 MEK1/2 的活性可以阻止衣原体 ERK1/2 的激活,而阻止了衣原体对宿主细胞 cPLA₂ 的活化和甘油磷酸变位酶的释放。Pavicevic 等^[11]对兔 VSMC 进行在体研究显示,cPLA₂ 通过 ERK1/2 途径被丝氨酸-505(S505)磷酸化而激活。

本实验结果显示,各周龄 SHR 和 WKY 的主动脉 VSMC 中 p-MEK 均有表达,且随着大鼠周龄增加,p-MEK 阳性表达增加;SHR 比同周龄 WKY 表达均明显增高。与之相反,SHR p-cPLA₂ 表达与同周龄 WKY 相比均明显减少。提示 MEK 的激活与 cPLA₂ 活性减弱可能共同参与了高血压大动脉血管重构的发生、发展。

(下转第 2863 页)

作者推测在自然流产蜕膜组织中,细胞内质网处于应激状态,大量未折叠或误折叠的蛋白堆积于内质网急需折叠,因而对分子伴侣的需求增加,钙网蛋白的合成也相应增加。而钙网蛋白 N-结构域 1~180 位氨基酸片段具有血管生成抑制剂效应,对蜕膜血管的重建可能产生抑制作用,从这一点看,钙网蛋白合成增加不利于蜕膜血管的重建,可能是自然流产发生的重要原因之一,但其作用的分子机制有待进一步研究。

本研究主要对自然流产蜕膜组织和正常妊娠蜕膜组织的蛋白质组进行了比较分析,并对某些差异蛋白进行了质谱鉴定,对建立早期自然流产临床生物标志物奠定了实验基础。这些蛋白分子表达的改变在自然流产中的意义以及它们在生殖过程中的调节作用,将是作者后续工作的研究重点。

参考文献:

- [1] 李良平,魏莲枝,周建荣. 高低分化喉癌组织的二维电泳图谱的建立及质谱分析[J]. 重庆医学,2008,37(2):149.
- [2] Cookson BT, Engelhardt S, Smith C, et al. Organization of the human annexin V (ANX5) gene[J]. Genomics, 1994, 20(3):463.
- [3] Dubois T, Oudinet JP, Mira JP, et al. Annexins and protein kinases C[J]. Biochim Biophys Acta, 1996, 1313(3):290.
- [4] 李淑红,岳亚飞,赵小鸽,等. Human Annexin V 在不同胎盘中的表达的定量分析[J]. 中国优生与遗传杂志,2005,13(10):31.
- [5] 李欣,高福禄,窦志杰,等. 膜联蛋白 A5 过表达对宫颈癌

细胞系 SiHa 细胞凋亡的影响[J]. 解剖学杂志,2008,31(5):668.

- [6] Tiscia G, Colaizzo D, Chinni E, et al. Haplotype M2 in the annexin A5 (ANXA5) gene and the occurrence of obstetric complications[J]. Thromb Haemost, 2009, 102(2):309.
- [7] Bogdanova N, Horst J, Chlystun M, et al. A common haplotype of the annexin A5 (ANXA5) gene promoter is associated with recurrent pregnancy loss[J]. Hum Mol Genet, 2007, 16(5):573.
- [8] 徐菲菲,刘秀华. 钙网蛋白的生理及病理生理学作用[J]. 生理科学进展,2006,37(3):216.
- [9] Liu XH. Calreticulin and cardiovascular diseases[J]. Int J Pathol Clin Med, 2006, 26(5):440.
- [10] Xiao F, Wei Y, Yang L, et al. A gene therapy for cancer based on the angiogenesis inhibitor, vasostatin[J]. Gene Ther, 2002, 9(18):1207.
- [11] 李丹莉,柳长柏. 钙网蛋白在肿瘤基因治疗中的应用[J]. 广东医学,2008,29(5):873.
- [12] Papp S, Dziak E, Opas M. Embryonic stem cell-derived cardiomyogenesis; a novel role for calreticulin as a regulator[J]. Stem Cells, 2009, 27(7):1507.
- [13] Michalak M, Guo L, Robertson M, et al. Calreticulin in the heart[J]. Mol Cell Biochem, 2004, 263(1/2):137.

(收稿日期:2009-12-30 修回日期:2010-04-05)

(上接第 2680 页)

参考文献:

- [1] Bouthier JD, Deluca N, Safar ME, et al. Cardiac hypertrophy and arterial distensibility in essential hypertension[J]. Am Heart J, 1985, 109(6):1345.
- [2] 焦阳,洪小苏. 高血压靶器官的细胞增生与凋亡[J]. 心血管病学进展,2002,23(6):356.
- [3] Taketo MM, Sonoshita M. Phospholipase A₂ and apoptosis[J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1585(2~3):72.
- [4] Yoo MH, Woo CH, You HJ, et al. Role of the cytosolic phospholipase A₂-linked cascade in signaling by an oncogenic, constitutively active Ha-Ras isoform[J]. J Biol Chem, 2001, 276(27):24645.
- [5] 王凡,刘国树. 大动脉顺应性减退的机制研究[J]. 国外医学心血管病分册,2005,32(5):275.
- [6] Hefner Y, Borsch-Haubold AG, Murakami M, et al. Serine 727 phosphorylation and activation of cytosolic phospholipase A₂ by MNK1-related protein kinases[J]. J Biol Chem, 2000, 275(48):37542.
- [7] 王韻,周新,汪炳华,等. 胞浆型磷脂酶 A₂ 介导弱氧化修

饰低密度脂蛋白诱导的人脐静脉内皮细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展,2004,31(4):350.

- [8] Panini SR, Yang L, Rusinol AE, et al. Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol[J]. J Lipid Res, 2001, 42(10):1678.
- [9] Yaghini FA, Li F, Malik KU. Expression and mechanism of spleen tyrosine kinase activation by angiotensin II and its implication in protein synthesis in rat vascular smooth muscle cells[J]. J Biol Chem, 2007, 282(23):16878.
- [10] Su H, McClarty G, Dong F, et al. Activation of raf/MEK/ERK/cPLA₂ signaling pathway is essential for chlamydial acquisition of host glycerophospholipids[J]. J Biol Chem, 2004, 279(27):9409.
- [11] Pavicevic Z, Leslie CC, Malik KU. cPLA₂ phosphorylation at serine-515 and serine-505 is required for arachidonic acid release in vascular smooth muscle cells[J]. J Lipid Res, 2008, 49(4):724.

(收稿日期:2010-06-18)