论著

文章编号:1000-5404(2006)12-1276-04

AT2R基因转染对大鼠颈动脉球囊损伤后BTEB2表达的影响

唐 兵,何国祥,李 德,姜大春,刘建平,黎 军 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究AngⅡ2型受体(angiotensin Ⅱ type 2 receptor, AT2R)基因转染对大鼠颈动脉球囊损伤后基本转录元件结合蛋白2(basic transcription element binding protein 2, BTEB2)表达变化的影响,揭示AT2R介导抑制新生内膜形成作用的机制。**方法** 大鼠颈动脉球囊损伤后,局部转染带有大鼠AT2R基因的重组腺病毒载体(pAdCMV/AT2R)或空病毒载体(pAd-GFP),分为正常组、未转染组、pAd-GFP组、pAdCMV/AT2R组。于术后7、14、21 d取材,用HE染色、图像分析、逆转录-聚合酶链反应、免疫组织化学方法检测AT2R、BTEB2 mRNA及蛋白水平在大鼠颈动脉壁中的表达及新生内膜增生变化。**结果** 在正常组无AT2R、BTEB2 mRNA及蛋白表达;在球囊损伤的未转染组和pAd-GFP组AT2R、BTEB2 mRNA及蛋白表达显著高于正常组;在pAdCMV/AT2R组,AT2R的表达水平显著高于未转染组和pAd-GFP组($P<0.01$),大鼠颈动脉内膜/中膜面积比(I/M)显著低于未转染组和pAd-GFP组($P<0.01$),BTEB2 mRNA及蛋白表达显著低于未转染组和pAd-GFP组($P<0.01$)。**结论** AT2R基因转染能抑制新生内膜形成,能显著下调BTEB2的表达,提示BTEB2的下调表达参与了AT2R介导的抑制新生内膜形成作用的机制。

关键词: 血管紧张素;受体;2型;基本转录元件结合蛋白2;新生内膜

中图法分类号: R322.121;R394.3;R543.402 **文献标识码:** A

Effect of AT2R gene transfer on BTEB2 expression in rat carotid ateries after balloon angioplasty

TANG Bing, HE Guo-xiang, LI De, JIANG Da-chun, LIU Jian-ping, LI Jun (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of angiotensin Ⅱ type 2 receptor (AT2R) gene transfer on BTEB2 expression in rat carotid arteries after balloon angioplasty and explore the mechanism of AT2R-mediated inhibition of neointimal hyperplasia. **Methods** Following the establishment of rat carotid restenosis model after balloon injury, pAdCMV/AT2R with AT2R gene or control virus pAd-GFP was transduced into rat carotid arteries. Rats were assigned into normal group, non-transduced group, pAd-GFP group, pAdCMV/AT2R group. The arteries were harvested on day 7, 14, 21 after gene transfer. The expressions of AT2R, BTEB2 and the change of neointima were evaluated by RT-PCR, immunohistochemistry, HE and image analysis. **Results** The expressions of AT2R and BTEB2 were negative in normal group. After balloon injury, the expressions of AT2R, BTEB2 in vessels increased significantly. In pAdCMV/AT2R group, the levels of AT2R in vessels were much higher, but the levels of BTEB2 as well as the ratio of new intima to media area were significantly lower than that of non-transduced and pAd-GFP group (both $P<0.01$). **Conclusion** AT2R gene transfer inhibits neointimal hyperplasia and BTEB2 expression in rat carotid artery after balloon injury. The low expression of BTEB2 may involve in the mechanism of AT2R-meidated inhibition of neointimal hyperplasia.

Key words: angiotensin; receptor; type 2; basic transcription element binding protein 2; tunica intima

基本转录元件结合蛋白2(basic transcription element binding protein 2, BTEB2)是锌指转录因子家族的典型成员,能促进血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型转化及细胞周期进展,激活某些生长因子及原癌基因的表达,从而促进VSMC分裂、增殖,而且临床研究也表明BTEB2可作为冠状动脉再狭窄的预测因子[1]。血管紧张素Ⅱ(an-

作者简介:唐 兵(1969-),女,四川省绵阳市人,博士研究生,主治医师,主要从事冠心病发病机制方面的研究,现在成都军区总医院心血管内科。电话:13808224340,E-mail: tangbing6988@163.com

通讯作者:何国祥,E-mail: yyxnk@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-09-01;修回日期:2006-01-12

giotensin Ⅱ，AngⅡ）能通过其 1 型受体（angiotensin Ⅱ type 1 receptor，AT1R）上调 BTEB2 的表达，而关于其 2 型受体（angiotensin Ⅱ type 2 receptor，AT2R）与 BTEB2 之间的作用关系尚少见报道。本研究以腺病毒为载体介导 AT2R 基因转染球囊损伤后的大鼠颈动脉，观察 AT2R 对新生内膜形成及 BTEB2 表达变化的影响，探讨它们的作用关系，揭示 AT2R 介导抑制新生内膜形成作用的机制。

1　材料与方法

1.1　材料

含有大鼠 AT2R 基因编码序列的腺病毒载体（pAdCMV/AT2R）由本室构建，经 PCR 和测序鉴定，载体中含有的外源基因片段完全正确；空载腺病毒载体 pAd-GFP 由美国 John Hopkins 肿瘤中心 Bert Vogelstein 教授赠送，用于对照组；逆转录-聚合酶链反应（RT-PCR）试剂盒购自美国 Promega 公司，PCR 引物由上海博亚公司合成，兔 AT2R、羊 BTEB2 多克隆抗体（Santa Curz），免疫组化 S-P 试剂盒（北京中山生物技术有限公司）。其他试剂采用国产或进口分析纯试剂。雄性 SD 大鼠 60 只，体质量 350～400 g，由第三军医大学实验动物中心提供。2.0F PTCA 球囊导管为 Cordis 公司产品。

1.2　方法

1.2.1　大鼠颈动脉球囊损伤动物模型的建立及基因转染　取雄性 SD 大鼠，腹腔注射戊巴比妥钠（30 mg/kg）麻醉，取颈部正中切口，从颈外静脉注射肝素钠 100 U/kg，将 2.0F PTCA 球囊导管从颈外动脉切口插入至颈总动脉，以 1.5 个大气压充盈球囊，来回抽动 3 次以剥脱内膜。分别取 pAd-GFP、pAdCMV/AT2R 重组腺病毒载体的病毒上清或 PBS 50 μl，局部注射至损伤的血管节段内，作用 45 min 后，再颈动脉注射肝素钠 100 U/kg，结扎颈外动脉，去除血管夹，恢复血流，缝合颈部伤口。分为正常组、未转染组、pAd-GFP 组、pAdCMV/AT2R 组，正常组 6 只，余每组 18 只。

1.2.2　取材　术后 7、14、21 d 大鼠戊巴比妥钠麻醉，游离出颈总动脉段，阻断血流，迅速取下标本，一部分用肝素 DEPC 水（100 U/ml）冲洗血管段置入液氮罐，用于 RT-PCR 检测 AT2R、BTEB2 mRNA 表达；另一部分组织以 4% 多聚甲醛固定 6 h 后，30% 蔗糖多聚甲醛过夜，行石蜡切片及 OCT 包埋冰冻切片。

1.2.3　RT-PCR 检测血管中 AT2R、BTEB2 mRNA 的表达　取液氮冻存的血管组织约 50 mg，用 Tripure（Roche 公司）一步法提取组织总 RNA，取 1 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA。引物设计：AT2R（1.1 kb）上游：5′-GGAAGATCTATGAAGGACAAC-3′，下游：5′-CCGCTCGAGTTAAACACAA-3′；B TEB2（662 bp）上游：5′-CGCGGATCCATGCCCAGTTCGACAAA-3′，下游：5′-CCGGAATTCCTCTGGTGGCGCTTCA；$GAPDH_1$（452 bp）；$GAPDH_2$（752 bp）。反应体系（50 μl），AT2R 反应条件：94 ℃ 预变性 5 min 后进入 PCR 循环；94 ℃ 变性 30 s，50 ℃ 退火 45 s，72 ℃ 延伸 2 min，共 33 个循环；72 ℃ 再延伸 10 min。BTEB2 反应条件基本同 AT2R，仅退火条件变为 58 ℃，1 min。反应完成后分别取 5 μl PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析。

1.2.4　免疫组织化学方法检测血管中 AT2R、BTEB2 的表达　切片 3% 甲醇-H_2O_2 封闭液室温孵育 15 min，1% BSA-0.5% TritonX-100 室温 30 min，正常羊血清封闭孵育 15 min，一抗 AT2R 或 BTEB2（1∶500）37 ℃孵育 1 h 再 4 ℃过夜，生物素标记的二抗工作液 37 ℃孵育 30 min，辣根酶标记链霉卵白素三抗工作液 37 ℃孵育 30 min，DAB 显色，苏木精复染，脱水透明，中性树胶封片；每张切片用光学显微镜在高倍镜下随机选 6 个视野，用美国 Image Pro Plus 4.5 计算机图像分析仪和细胞计数的方法检测血管中 AT2R 、BTEB2 的表达，分别计数每个视野中血管内膜和中膜平滑肌细胞总数及 BTEB2 阳性细胞数，求百分比，取平均值即为 BTEB2 阳性细胞百分比。

1.2.5　HE 染色及计算内膜/中膜面积比　石蜡切片常规 HE 染色，利用计算机图像分析仪分别测量血管内膜和中膜横断面的面积，计算内膜/中膜面积比（I/M），以内弹力膜区别内膜和中膜，测量采用单盲法，测量者为与本实验无关者。

1.3　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学分析，计量资料采用 t 检验，计数资料采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　颈动脉中 AT2R 的表达

正常组动脉壁中无 AT2R mRNA 的表达，未转染组和 pAd-GFP 组在球囊损伤后 7 d 有少量 AT2R mRNA 表达，14 d 达高峰，此后表达下降，21 d 时仅有微量 AT2R mRNA 表达；而 pAdCMV/AT2R 组 AT2R mRNA 的表达水平显著高于未转染组和 pAd-GFP 组，21 d 时仍维持较强表达。免疫组织化学结果显示：正常组未见 AT2R 表达，7、14、21 d 时，未转染组及 pAd-GFP 组在内膜、中膜、外膜有少量 AT2R 表达，而 pAdCMV/AT2R 组 AT2R 的表达显著高于未转染组和 pAd-GFP 组（表 1）。

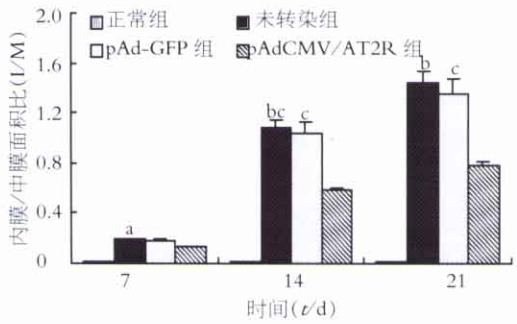
表 1　动脉壁 AT2R 蛋白表达的图像分析结果（灰度值，n=6，$\bar{x} \pm s$）

时间（t/d）	正常组	未转染组	pAd-GFP 组	pAdCMV/AT2R 组
7	0	20.57 ± 3.05[a]	25.89 ± 8.43[a]	49.53 ± 6.36[c]
14	0	45.99 ± 7.65[b]	40.36 ± 9.38[b]	99.52 ± 8.03[d]
21	0	19.58 ± 6.13[a]	23.41 ± 9.57[a]	77.64 ± 5.293[d]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与 pAd-GFP 组和未转染组比较

2.2　pAdCMV/AT2R 转染对大鼠颈动脉损伤后新生内膜增生的影响

大鼠颈动脉损伤后 7 d，3 组动脉内膜增生无显著差异（$P>0.05$）；损伤后 14～21 d，未转染组和 pAd-GFP 组损伤动脉的新生内膜明显向管腔内增生，造成明显的管腔狭窄，pAdCMV/AT2R 组损伤动脉仍有明显的新生内膜增生，但新生内膜增生程度显著低于未转染组和 pAd-GFP 组。损伤后 14 d 和 21 d，与未转染组和 pAd-GFP 组相比，pAdCMV/AT2R 组的内膜/中膜面积比（I/M）显著降低（$P<0.01$）（图 1）。



a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较；c：$P<0.05$，与 pAdCMV/AT2R 组比较

图1 各组颈动脉内膜/中膜面积比比较

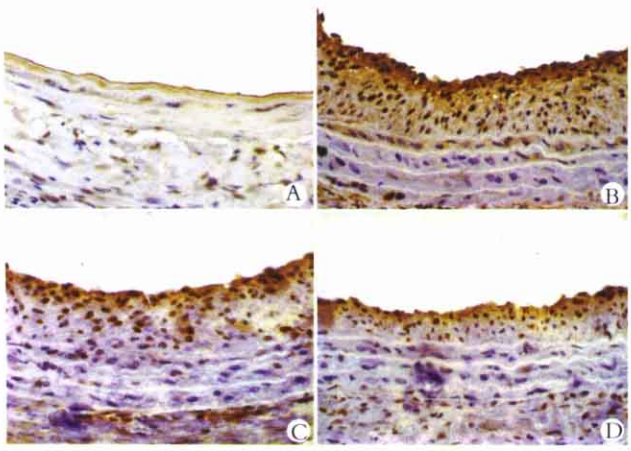
2.3 pAdCMV/AT2R 转染对颈动脉 BTEB2 mRNA 及蛋白表达的影响

用 RT-PCR 方法对各组颈动脉 BTEB2 mRNA 表达的变化进行检测，结果表明：正常组 BTEB2 mRNA 表达阴性，未转染组、pAd-GFP 组、pAdCMV/AT2R 组各组 BTEB2 mRNA 的表达水平显著高于正常组（$P<0.01$）；pAdCMV/AT2R 组 BTEB2 mRNA 的表达水平显著低于未转染组和 pAd-GFP 组（$P<0.01$），pAd-GFP 组和未转染组比较，BTEB2mRNA 及蛋白的表达无显著性差异（$P>0.05$，表2）。免疫组织化学结果显示：正常组未见 BTEB2 表达，损伤后 7、14、21 d 时，未转染组、pAd-GFP 组在内膜及中膜有大量细胞核阳性着色，BTEB2 表达阳性，高峰在术后 7 d，此后表达逐渐下降，而 pAdCMV/AT2R 组 BTEB2 的表达显著低于未转染组和 pAd-GFP 组（$P<0.01$）（图2，表3）。

表2 各组颈动脉 BTEB2 mRNA 表达的光密度比值（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

时间（t/d）	正常组	未转染组	pAd-GFP 组	pAdCMV/AT2R 组
7	0	0.98±0.040^{ab}	0.96±0.038^{ab}	0.55±0.034
14	0	0.72±0.029^{ab}	0.69±0.036^{ab}	0.33±0.027
21	0	0.41±0.030^{ab}	0.39±0.021^{ab}	0.18±0.017

a：$P<0.01$，与正常组比较；b：$P<0.01$，与 pAdCMV/AT2R 组比较



A：正常组；B：未转染组；C：pAd-GFP 组；D：pAdCMV/AT2R 组

图2 AT2R 基因转染后 14 d BTEB2 的表达（S-P×400）

表3 各组新生内膜 BTEB2 表达阳性率[$n=6$，($\bar{x}\pm s$)%]

时间（t/d）	正常组	未转染组	pAd-GFP 组	pAdCMV/AT2R 组
7	0	90.44±7.14^{ab}	91.60±8.35^{ab}	46.38±9.36
14	0	75.99±6.45^{ab}	73.68±5.21^{ab}	37.21±6.17
21	0	26.34±4.55^{ab}	27.79±9.11^{ab}	11.65±2.83

a：$P<0.01$，与正常组比较；b：$P<0.01$，与 pAdCMV/AT2R 组比较

3 讨论

肾素血管紧张素系统的效应分子 Ang Ⅱ 能通过 AT1R 促进平滑肌细胞增殖、迁移及胞外基质的合成，从而参与高血压、动脉粥样硬化和血管再狭窄的病理过程[2]。AT2R 是 Ang Ⅱ 的主要受体之一，可能具有拮抗 AT1R 的作用。本室前期的离体细胞实验结果表明，AT2R 介导了抑制 VSMC 增殖、迁移和促进 VSMC 凋亡的作用，推测其介导了抑制新生内膜形成的作用[3]。在该实验中，我们以腺病毒为载体进行 AT2R 基因在体转染，发现 AT2R 基因转染能显著上调球囊损伤后大鼠颈动脉中 AT2R 的表达，能抑制球囊损伤后新生内膜的增生，说明 AT2R 介导了抑制新生内膜形成的作用。

BTEB2 是锌指转录因子家族的成员，它与多种基因启动子中的 GC 盒子结合，反式调节其转录活性。近期的研究发现，Ang Ⅱ、碱性成纤维细胞生长因子等有丝分裂原可诱导 BTEB2 在 VSMC 中表达，而 BTEB2 反过来又激活血小板源生长因子-A（PDGF-A）和转化生长因子 β（TGF-β）等 VSMC 增殖相关因子及其受体的表达。在 VSMC 表型转化、细胞周期进展、某些生长因子及原癌基因的激活过程中，BTEB2 起着重要的调节作用，从多个方面促进 VSMC 分裂、增殖[4,5]。

Ang Ⅱ 能通过 AT1R 激活 VSMC 的丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK），MAPK 使早期生长反应蛋白 1（early growth response protein 1，Egr-1）磷酸化，磷酸化的 Egr-1 与 BTEB2 启动子中的 GC 序列结合并激活其转录活性，从而诱导 BTEB2 表达[6]。有研究表明反义 BTEB2 基因转染能下调 Ang Ⅱ 所刺激的 VSMC 中 BTEB2、PDGF-BB、PCNA 的表达，能抑制球囊损伤后血管中 BTEB2 的重新表达，抑制新生内膜增生[7]。提示 BTEB2 是 Ang Ⅱ 促进新生内膜形成的桥梁分子。在 PC12W 细胞株、神经纤维母细胞及纤维母细胞 R3T3 中研究显示，AT2R 与 Ang Ⅱ 结合后，使 G 蛋白激活，进而灭活 AT1R 激活的胞外信号调节激酶 1、2（extracellular regulated kinase，ERK1、2），使 MAPK 进入细胞核内减少，减少转录因子核内聚集，从而降低许多原癌基因 *c-jun*、*c-fos* 表达，终止细胞分裂增殖、迁移的信号传递。在超压力负荷超肥厚心肌模型中，AT2R 基因转染能下调 MAPK 及

ERK表达,抑制左室肥厚[8,9]。转录因子BTEB2作为ERK的下游分子,AT2R基因转染对BTEB2表达的影响目前国内外尚少见报道,AT2R与BTEB2的相互关系尚属空白。在本实验中我们发现球囊损伤后7、14d时血管中转录因子BTEB2表达升高达峰值,AT2R基因转染能显著下调BTEB2的表达,提示BTEB2的下调表达参与了AT2R介导抑制新生内膜形成作用的机制,推测AT2R灭活AT1R激活的胞外信号调节激酶ERK1、2,使MAPK进入细胞核内减少,降低BTEB2的表达是AT2R介导抑制新生内膜形成的中间环节之一。

参考文献:

[1] 李 德,何国祥,唐 波,等. 腺病毒介导BTEB2反义RNA对血管平滑肌细胞增殖的抑制作用[J]. 第三军医大学学报,2005,27(5):388-391.
[2] KASCHINA E, UNGER T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function[J]. Blood Press, 2003, 12(2): 70-88.
[3] 何国祥,刘建平,景 涛,等. 血管紧张素Ⅱ对血管平滑肌细胞生物学行为的多重影响[J]. 中国介入心脏病学杂志,2003,11(6):319-322.
[4] MORI D, OKURO N, FUJII-KURIYAMA Y, *et al*. Gene structure and promoter analysis of the rat BTEB2 gene[J]. Gene, 2003, 304: 163-170.
[5] SHINDO T, MANABE I, FUKUSHIMA Y, *et al*. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling[J]. Nat Med, 2002, 8(8): 856-863.
[6] WATANABE N, KURABAYASHI M, SHIMOMURA Y, *et al*. BTEB2, a Kruppel-like transcription factor, regulates expression of the SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain B (SMemb/NMHC-B) gene [J]. Circ Res, 1999, 85(2): 182-191.
[7] 李 德,何国祥,唐 波,等. 基本转录元件结合蛋白2反义RNA对大鼠颈动脉新生内膜增生的抑制作用[J]. 中华心血管病杂志,2004,32(10):951.
[8] KACIMI R, GERDES A M. Alterations in G protein and MAP kinase signaling pathways during cardiac remodeling in hypertension and heart failure[J]. Hypertension, 2003, 41(4): 968-977.
[9] METCALFE B L, HUENTELMAN M J, PARILAK L D, *et al*. Prevention of cardiac hypertrophy by angiotensin II type-2 receptor gene transfer [J]. Hypertension, 2004, 43(6): 1233-1238.

(编辑 汪勤俭)

文章编号:1000-5404(2006)12-1279-01

个案与短篇

颞骨肿块的高分辨率CT表现

姚倩东[1],杨 光[1],王 虎[1],莫显斌[1],雷 勇[1],杨 春[1],郑敬文[2] ([1]四川省绵阳市科学城医院放射科,绵阳 621900;[2]第四军医大学西京医院放射科,西安 710032)

颞骨肿瘤较少见,临床表现缺乏特征性,术前诊断较困难。本研究回顾性分析17例资料完整的颞骨肿块,结合临床表现和手术病理,分析探讨其高分辨率CT(high-resolution CT, HRCT)特征及诊断要点。

1 临床资料

17例中男性9例,女性8例,年龄11~67岁,平均37.6岁。临床表现主要有头痛、头晕、复视、视力下降、视乳头水肿、听力下降、面神经麻痹、咽反射迟钝和颞部肿块等,病程4个月至15年。17例均行CT横断面扫描,使用GE9800和Somatom AR.C CT扫描仪,层厚、层距为2~5 mm,分别行骨算法和软组织两种方式重建,扫描条件110~120 kV,120~150 mAs。

2 结果

2.1 HRCT表现

4例骨纤维异常增殖症均表现颞骨膨大,其中2例为弥漫的透亮区和硬化区并存,2例表现为均匀一致的高密度区。3例颈静脉球瘤表现为颈静脉孔扩大,增强明显强化,边缘骨质不规则破坏,病变向周围侵犯。2例软骨骨瘤均为等、高混杂密度,形态不规则,内有多数钙化斑点和低密度影。1例岩骨尖破坏。2例嗜酸性肉芽肿表现为颞骨不规则软组织肿块,颞骨呈溶骨性破坏,轮廓不规则,内见残留骨片,邻近软组织明显肿胀。2例外耳道癌表现为外耳道软组织肿块,外耳道完整消失,1例侵犯邻近组织,可见软组织明显肿胀,但骨壁未见明显破坏。2例骨瘤表现为半球形骨性隆起,边缘清晰。1例脊索瘤表现为岩骨尖不均匀肿块,内见散在斑点状钙化灶,岩骨尖骨质破坏,肿瘤边缘不清。1例猫液瘤表现为岩骨等密度肿块,形态不规则,内部密度均匀,岩骨不规则破坏,肿块增强有轻度强化。

2.2 病理结果

骨纤维异常增殖症、嗜酸性肉芽肿、外耳道癌、软骨骨瘤及例颈静脉球瘤各2例,骨瘤、脊索瘤及猫液瘤各1例,共13例经手术病理证实。其余病例经临床和影像证实。

3 讨论

骨纤维异常增殖症影像学表现由病变的生长期和病变的纤维组织、骨样组织、新生骨小梁比例决定。受累骨的HRCT表

(下转1285页)

作者简介:姚倩东(1971-),男,四川省绵阳人,副主任医师,主要从事医学影像诊断方面的研究,发表论文14篇。电话:0816-2488821,E-mail:caistumiao@163.com

收稿日期:2005-10-24;修回日期:2006-01-10