论著

文章编号:1000-5404(2008)05-0424-03

p27 基因对血管平滑肌细胞中连接蛋白 43 表达的影响

冉擘力,何国祥,王 耿,宋治远,舒茂琴 (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)

摘 要:目的 研究连接蛋白 43(Cx43)在 p27 基因抑制血管平滑肌细胞(VSMC)增殖中的作用。方法 以携带大鼠 p27 基因表达序列的复制缺陷型 5 型腺病毒载体(AdCMV-p27)转染 VSMC 后,应用免疫细胞化学染色检测 p27 和 Cx43 表达的变化;应用^{3}H 标记的胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)掺入试验观察 p27 基因表达增强对 VSMC 增殖的影响。结果 (1) AdCMV-p27 转染前,血小板衍化生长因子 BB(platelet-derived growth factor, PDGF-BB)下调 P27 蛋白的表达,AdCMV-p27 转染后,无论有无 PDGF-BB 刺激,VSMC 中 P27 蛋白的表达均比转染前显著增高。(2) AdCMV-p27 转染使 VSMC 中 Cx43 蛋白的表达基本恢复至有丝分裂原刺激前状态。(3) AdCMV-p27 转染使 VSMC 的^{3}H-TdR 掺入量均较未转染组显著降低。结论 p27 基因对 Cx43 表达的调控,使细胞间连接通讯得到维护,是其抑制 VSMC 增殖的重要机制之一。

关键词:p27 基因;血管平滑肌细胞;细胞增殖;连接蛋白 43
中图法分类号:R322.12;R329.24;R394.2 文献标识码:A

Effect of p27 gene on expression of connexin43 in vascular smooth muscle cells

RAN Bo-li, HE Guo-xiang, WANG Geng, SONG Zhi-yuan, SHU Mao-qin (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of connexin 43 in p27 gene inhibited vascular smooth muscle cells (VSMCs) proliferation. Methods The expressions of P27 and connexin43 were evaluated by immunocytochemical staining and the effect of p27 overexpression on VSMCs proliferation was observed by ^{3}H-thymidine incorporation. Results (1) Before AdCMV-p27 was transfected to VSMCs, P27 protein was down-regulated by platelet-derived growth factor (PDGF) BB. After AdCMV-p27 was transfected to VSMCs, the level of P27 protein expression was significantly higher than that before transfection, and no correlation with the stimulation of PDGF-BB. (2) After AdCMV-p27 was transfected to VSMCs, the pattern of connexin43 protein expression almost recovered to that in quiescent VSMCs. Conclusion The mechanism of p27 inhibiting VSMCs proliferation involves that p27 regulate CX43 expression and maintain normal inter-cellular junctional communication.

Key words: p27; vascular muscle smooth cell; proliferation; connexin43

p27 是重要的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI),在细胞周期的调节中占据了重要地位。p27 在 G_1/S 和 G_2/M 处构筑了两道‘堤坝”,当 p27 大量降解时,细胞就可以顺利地实现 G_1/S 转换而进入恶性增殖。以往对 p27 的研究多集中在抑制肿瘤细胞的增殖上,而在心血管领域中有关 p27 对 VSMC 增殖的影响及其机制的报道较少。本实验利用携带 p27 基因的重组腺病毒载体(AdCMV-p27)转染 VSMC,研究转染前后血小板衍化生长因子 BB(PDGF-BB)对 VSMC 表达 P27 和连接蛋白 43 的影响,探讨 p27 基因影响 VSMC 增殖的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

携带大鼠 p27 基因的重组腺病毒载体(AdCMV-p27)由作者用位置特异性重组的方法构建,并经 PCR 鉴定,获得病毒滴度约 5×10^{10} 空斑形成单位/毫升(pfu/ml),最佳感染复数(MOI)为 40。VSMC 由作者以大鼠主动脉经组织块贴壁法原代培养获得,并经 α-平滑肌肌动蛋白免疫细胞化学鉴定,第 6~8 代细胞应用于本实验。兔抗大鼠 P27 单克隆抗体及兔抗人连接蛋白 43(Cx43)多克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品。血小板衍化生长因子 BB(PDGF-BB)为 R&D System 公司产品,DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)均为美国 HyClone 公司产品,氚标记胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)为上海原子能研究所产品。

1.2 AdCMV-p27 转染前后 PDGF-BB 对 VSMC 表达 P27 和 Cx43 蛋白的影响

1.2.1 实验分组 分转染组和未转染组,每组又分别施加 PDGF-BB(10 ng/ml)刺激和无 PDGF-BB 刺激两种干预因素。

1.2.2 转染方法 将 VSMC 传入 24 孔板,各组每个实验条件设 3 孔。当细胞 80% 融汇时,无血清培养 24 h,然后将培养板中培养液吸出,加入 AdCMV-p27 转染液 40 MOI,置 37 ℃、5% CO_2 培养 1 h,其间每 10~15 分钟摇动培养板 1 次,使其均匀感染,1 h 后去除转染液,加入 PDGF-BB,继续培养 24 h。未转染组除不转染 AdCMV-p27 外,其余同前。

作者简介:冉擘力,男,重庆市人,博士,主治医师,讲师,主要从事冠心病、心脏电生理方面的研究。电话:(023)68765671
收稿日期:2007-11-30;修回日期:2008-01-04

1.2.3　免疫细胞化学检测　按 SP 试剂盒使用说明进行，P27 和 Cx43 抗体的工作浓度分别为 1∶200 和 1∶500。DAB 显色后镜下计数 P27 蛋白染色阳性细胞数和总细胞数，计算阳性细胞占同类细胞的百分比，每张玻片随机计数 3 个视野（×100），取平均值。对作连接蛋白 43 染色的玻片进行图像分析，每张玻片随机检测 3 个视野的光密度值（×100），取平均值。

1.3　^{3}H-TdR 掺入法测定细胞 DNA 合成

实验分组及干预因素同 P27 蛋白检测。以每孔 1×10^5 个细胞将 VSMC 接种于 24 孔培养板中，各组每个实验条件设 3 孔。37 ℃、5% CO_2 培养 24 h 后，无血清培养 24 h 转染及施予干预因素后 24 h 加入 ^{3}H-TdR，使之终浓度为 3.7×10^4 Bq/ml；继续培养 16 h 后，常规消化收集细胞，经微孔滤膜抽滤细胞并用 10% 三氯乙酸（TCA）破碎细胞膜，滤膜烘干后置于闪烁瓶中，加入闪烁液，用液体闪烁计数仪测定放射性强度。

1.4　统计学分析

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行非配对 t 检验。

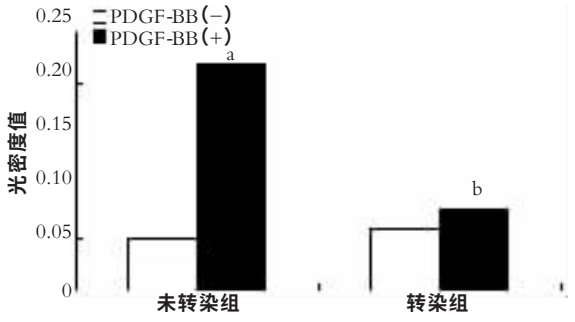
2　结果

2.1　AdCMV-p27 转染前后 PDGF-BB 对 VSMC 的 P27 蛋白表达的影响

未转染组没有给予 PDGF-BB 刺激时，VSMC 上 p27 蛋白表达阳性率为 38%，PDGF-BB 刺激后，其阳性表达率显著下降为 4.23%（$P<0.01$），而转染 p27 后其阳性表达率仍保持在 33.91% 的较高水平（$P<0.01$）；PDGF-BB 刺激前后转染组 VSMC 的 p27 蛋白阳性表达率没有显著差异（$P>0.05$）。

2.2　AdCMV-p27 转染前后 PDGF-BB 对 VSMC 的 Cx43 表达的影响

未转染组和转染组没有施加 PDGF-BB 刺激时，VSMC 上可见少量 Cx43 免疫细胞化学染色阳性颗粒 给予 PDGF-BB 刺激后，未转染组着色颗粒显著增多（$P<0.01$），转染 AdCMV-p27 后，着色颗粒比转染前显著减少（$P<0.05$，图 1）。



a：$P<0.01$，与 PDGF-BB（−）比较；b：$P<0.01$，与未转染组比较

图 1　AdCMV-p27 转染 VSMC 前后 PDGF 对连接蛋白 43 表达的影响

2.3　^{3}H-TdR 掺入法测定细胞 DNA 合成

^{3}H-TdR 掺入量反映增殖细胞 DNA 合成的情况，是反映细胞增殖的良好指标。未转染组没有施加 PDGF-BB 刺激时，VSMC 的 ^{3}H-TdR 掺入量较少，PDGF-BB 刺激后 ^{3}H-TdR 掺入量显著增加至 14 713.24（$P<0.01$）转染 p27 后其掺入量则明显受到抑制（$P<0.05$），AdCMV-p27 转染可使没有施加 PDGF-BB 时 VSMC 的 ^{3}H-TdR 掺入量减少，但不显著（$P>0.05$，表 1）。

表 1　AdCMV-p27 转染前后有丝分裂原对 VSMC ^{3}H-TdR 掺入的影响（cpm，$\bar{x}\pm s$）

组别	血清（−）	PDGF-BB
未转染组	5 820.52 ± 921.57	14 713.24 ± 3 540.12[a]
转染组	5 073.50 ± 1 252.00	9 451.25 ± 1 865.42[b]

a：$P<0.01$，与血清（−）组比较；b：$P<0.05$，与未转染组比较

3　讨论

目前有关 p27 的研究多数集中在其抑制肿瘤细胞增殖方面，而对 p27 基因抑制 VSMC 增殖及其机制的相关报道较少。有研究表明，p27 对细胞周期实行负调控，抑制细胞增殖[1]。且 p27 过度表达可拮抗有丝分裂原的促细胞增殖作用，其机制与 p27 基因转录显著下降及翻译减少有关[2,3]。我们在实验中发现有丝分裂原 PDGF-BB 下调 p27 基因表达，以腺病毒为载体对 VSMC 进行转染后，p27 基因表达增强。本实验 ^{3}H-TdR 掺入法测定结果表明，在 PDGF-BB 刺激后，VSMC 增殖能力比刺激前明显增强，以腺病毒为载体对 VSMC 转染 p27 基因后，PDGF-BB 刺激所引起的 VSMC 增殖较转染前显著减弱，说明 p27 基因可抑制由有丝分裂原刺激所引起的 VSMC 增殖。

为深入了解 p27 基因抑制 VSMC 增殖的相关机制，本实验探讨了 AdCMV-p27 转染对细胞间连接通讯的影响。资料表明 VSMC 间隙连接的主要组成成分是 Cx43[4]。其功能缺陷与肿瘤细胞增殖失控和恶性表型的发生有关[5,6]。由于动脉粥样硬化和 RS 病灶中 VSMC 的生长特征类似肿瘤细胞，所以间隙连结的功能及数目的改变可能与动脉粥样硬化和 RS 的发生关系密切。本实验显示无血清培养后的 VSMC 表达 Cx43 较少；PDGF-BB 刺激后，激活了 PKC 及癌基因的基因转录[7,8]，Cx43 的磷酸化、正常转运及装配受到干扰，使大量 Cx43 滞留于细胞质内，其功能受到抑制，从而使 VSMC 发生表型改变及异常增殖。转染 AdCMV-p27 使 p27 基因表达增强以后，PDGF-BB 刺激所引起的 Cx43 异常改变得到纠正，这可能是腺病毒介导的 p27 基因过度表达作为一种刺激信号引起信号转导中的级联反应，导致效应分子 Cx43 蛋白的酪氨酸残基发生磷酸化作用[6]，从而维持细胞间隙连接的正常功能，使 VSMC 能够保持收缩表型和高分化状态，抑制细胞分裂增殖。综上所述，p27 基因转染使 p27 过度表达可抑制 VSMC 增殖，有利于减轻血管球囊损伤后新生内膜的形成及防止 RS 的发生。

参考文献：

[1] Chen J, Willingham T, Shuford M, *et al*. Tumor suppression and inhibition of aneuploid cell accumulation in human brain tumor cells by ectopic overexpression of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27KIP1 [J]. J Clin Invest, 1996, 97(8): 1983 – 1988.

[2] Servant M J, Coulombe P, Turgeon B, *et al*. Differential regulation of

p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms[J]. J Cell Biol, 2000, 148(3): 543-556.

[3] Virgintino D, Robertson D, Errede M, *et al*. Expression of the gap junction protein connexin43 in human telencephalon microvessels[J]. Microvasc Res, 2001, 62(3): 435-439.

[4] Chen F, Kim E, Wang C C, *et al*. Ciglitazone-induced p27 gene transcriptional activity is mediated through Sp1 and is negatively regulated by the MAPK signaling pathway[J]. Cell Signal, 2005, 17(12): 1572-1577.

[5] Rochefort N, Quenech'du N, Ezan P, *et al*. Postnatal development of GFAP, connexin43 and connexin30 in cat visual cortex[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2005, 160(2): 252-264.

[6] Rama A, Matsushita T, Charolidi N, *et al*. Up-regulation of connexin43 correlates with increased synthetic activity and enhanced contractile differentiation in TGF-beta-treated human aortic smooth muscle cells[J]. Eur J Cell Biol, 2006, 85(5): 375-386.

[7] Betti M, Minelli A, Canonico B, *et al*. Antiproliferative effects of tocopherols (vitamin E) on murine glioma C6 cells: homologue-specific control of PKC/ERK and cyclin signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41(3): 464-472.

[8] Kim D Y, Kam Y, Koo S K, *et al*. Gating connexin 43 channels reconstituted in lipid vesicles by mitogen-activated protein kinase phosphorylation[J]. J Biol Chem, 1999, 274(9): 5581-5587.

(编辑 邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2008)05-0426-01

外科换药疼痛的心理护理

向 勤,罗 梅 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所门诊部,重庆 400042)

疼痛是伴随现有的或潜在的组织损伤而产生的生理和心理因素复杂结合的主观感受[1]。由于人体组织受伤后一些致痛物质刺激游离的神经末梢,伤口换药时又直接刺激创面的神经末梢,操作时可引起剧烈疼痛。换药无论大小对患者来说,都是一种心理刺激,因此,加强心理护理已成为外科换药工作中一个重要组成部分。现本科2006年7 200例换药疼痛患者的心理护理实践和体会,现报告如下。

1 临床资料

本科在2006年1-12月共换药7 200例,其中男性3 950例,女性3 250例,年龄10~81岁,平均42岁;其中拨甲2 512例,脓肿切开2 081例,慢性溃疡1 231例,烫伤897例,其他换药479例。

2 常见的心理特点及护理对策

2.1 紧张恐惧的心理

小至孩童大到老者均有发生。由于个人经历、职业、家庭、环境、文化水平、耐受力等不一样,对换药疼痛的理解及感觉也不相同,初次换药容易产生紧张、恐惧的心理。护理人员在接待这类患者时,应用和蔼可亲的态度让患者感到温暖,耐心倾听患者的诉说,取得信任,消除顾虑,操作时向患者作好解释工作,强化其参与意识,让患者了解自己的病情及伤口情况,细心观察反应,当疼痛难忍时,可向患者讲清楚,疼痛是机体的"保护性"反应,说明机体正处在调整状态,疼痛感是暂时的,鼓励患者增强同病魔做斗争的决心和信心,让患者在心理默念"放松"、"不疼"等语句,通过自我暗示,减轻疼痛;也可让患者听他喜欢的音乐以转移其注意力。但对于某些较大且严重的位于神经末梢丰富部位的有剧烈疼痛难忍的伤口,仍需行局部阻滞麻醉以减轻疼痛,防止疼痛性休克的发生。

2.2 焦虑不安的心理

此种心理年轻患者较老年患者多,尤其是外伤后换药患者,担心受伤的程度及预后,思想上有一定压力,易产生焦虑不安的心理,加重疼痛反应。护理人员必须从每个患者的具体情况出发,细心观察,有针对性地做好心理疏导工作,让患者把想说的话说出来,使其感到心情舒畅,心理上得到最大满足。可采用心理治疗中的发泄疗法,患者愤怒或发牢骚时,可以引导其适当发泄,放松心情,提高疼痛阈值。

2.3 忧虑怀疑心理

患者的怀疑大多数是一种自我消除暗示,常影响其对客观事物的正确判断。长期换药患者如慢性小腿溃疡、糖尿病足患者,由于伤口血运较差,愈合时间较长,显效较慢,故患者失望感较重,身心疲惫,忧心忡忡,缺乏战胜疾病的信心。对这样的患者,护士在换药时更需要做好解释和心理疏导工作,告之当前的痛苦是暂时的,要勇于面对现实,以顽强的意志和毅力配合治疗,树立战胜疾病的信心。特别是在回答患者的问题时,一定要坚定,充满信心,多使用安慰性、鼓励性语言,缓解患者的心理压力,降低其不愉快的程度,稳定患者的情绪,增强疼痛的耐受性,起到有效的心理支持作用。

针对换药疼痛患者的心理特征,用最佳的心理护理措施来影响其心理活动,使患者保持良好的情绪,是减少晕厥发生,提高患者满意度的关键,使其伤口尽快痊愈。

关键词:换药疼痛;心理护理;措施
中图法分类号:R473.6 文献标识码:B

参考文献:

[1] 张娅男,张晓明. 住院老年人的疼痛评估[J]. 国际护理学杂志,2006,25(8):587-590.

(编辑 吴培红)

作者简介:向 勤,女,重庆市人,主管护师,主要从事护理学方面的研究。电话:(023)68757500

收稿日期:2007-11-07;修回日期:2008-01-29