论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1384-04

腺病毒载体介导 hRAMP1 调节兔颈动脉球囊损伤后炎症细胞因子表达对增生内膜的影响

龙仙萍[1],石 蓓[1],赵然尊[1],许官学[1],崔 璨[1],喻 田[2] (563003 贵州 遵义,遵义医学院:第一附属医院心血管内科[1],医学与分子生物学研究中心[2])

[摘要] **目的** 探讨腺病毒载体介导人受体活性修饰蛋白-1(receptor activity modifying protein-1,hRAMP1)基因对兔颈动脉粥样硬化并球囊成形术后炎性细胞因子表达的影响。**方法** 建立兔动脉粥样硬化狭窄模型并行球囊损伤血管(简称血管成形术),随机抽样分为 RAMP1 组($n=18$)和对照组($n=18$),经球囊局部注射携带 hRAMP1 基因腺病毒载体(pAd2-GFP-RAMP1)或 PBS,于注射后7、14 d 和28 d,应用 ELISA 法检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和 C-反应蛋白(CRP)表达水平;Western blot 检测局部 hRAMP1 目的基因表达;免疫组织化学染色测定血管局部 TNF-α 表达,HE 染色检测血管形态学。**结果** 血管成形术后不同时间点 TNF-α 表达增加[7 d:(74.13±4.99),14 d:(93.40±6.69),28 d:(67.46±6.57)],外源 hRAMP1 注射后 TNF-α 表达下降[7 d:(64.95±6.77),14 d:(75.29±4.73),28 d:(45.08±5.00),$P<0.05$],病毒注射后7 d 和14 d RAMP1 组 CRP 水平[7 d:(29.27±1.57),14 d:(9.68±1.60)]与对照组比较[7 d:(43.96±7.88),14 d:(13.51±1.68)]显著下降($P<0.05$),28 d 2 组间无差异性;腺病毒注射后28 d 损伤血管局部仍检测到 hRAMP1 蛋白表达,同时 RAMP1 组局部 TNF-α 表达与对照组比较明显下降,HE 染色显示:RAMP1 组新生内膜面积[7 d:(0.07±0.18),14 d:(0.15±0.05),28 d:(0.35±0.05)]与对照组[7 d:(0.14±0.02),14 d:(0.39±0.09),28 d:(0.56±0.05]比较明显降低($P<0.05$)。**结论** 外源 hRAMP1 基因调节兔动脉粥样硬化并血管成形术后 CRP 和 TNF-α 的表达,抑制血管成形术后再狭窄。

[关键词] 人受体活性修饰蛋白-1;炎症细胞因子;血管成形术;增生内膜
[中图法分类号] R392-33;R392.3;R543.4 [文献标志码] A

Effect of inflammatory cytokine expression in adenovirus vector-mediated human receptor activity modifying protein-1 after carotid artery saccule injury on proliferative intima

Long Xianping[1], Shi Bei[1], Zhao Ranzun[1], Xu Guanxue[1], Cui Can[1], Yu Tian[2] ([1]Deparment of Cardiology, First Affiliated Hospital, [2]Research Center of Medical and Molecular Biology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou Province, 563003, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of adenovirus vector-mediated human receptor activity modifying protein-1 (hRAMP1) on expression of inflammatory cytokines in rabbits after carotid artery saccule plastic operation for carotid atherosclerosis. **Methods** A rabbit atherosclerotic carotid artery stenosis model was established and underwent angioplasty. Thirty-six rabbits were randomly divided into RAMP1 group ($n=18$) and control group ($n=18$). On days 7, 14 and 28 after they were injected with pAd2-eGFP-RAMP1 or phosphate buffered saline (PBS), serum levels of TNF-α and CRP were measured by ELISA. Expression of hRAMP1 target gene in carotid artery was detected by Western blotting and expression of TNF-α in carotid artery was detected with immunohistochemical staining. Morphology of carotid artery was observed with HE staining. **Results** The expression level of TNF-α was 74.13±4.99, 93.40±6.69 and 67.46±6.57, respectively, on days 7, 14 and 28 after angioplasty, and 64.95±6.77, 75.29±4.73 and 45.08±5.00, respectively, on days 7, 14 and 28 after injection of exogeneous hRAMP1 ($P<0.05$). The expression level of CRP was significantly lower in RAMP1 group than in control group on days 7 and 14 after injection of adenovirus (29.27±1.57 *vs* 43.96±7.88, 9.68±1.60 *vs* 13.51±1.68, $P<0.05$). However, no significant difference was found in the expression level of CRP on day 28 after injection of adenovirus between the two groups. The hRAMP1 protein was expressed in local injured blood vessels on day 28 after injection of adenovirus and the TNF-α expression level was significantly lower in hRAMP1 group than in control group. HE staining showed that the neointimal area was

[基金项目] 国家自然科学基金(81060014);麻醉与器官保护基础研究重点实验室专项资金(黔科合技工字[2011]4006)
[通信作者] 石 蓓,E-mail:shibei2147@163.com

significantly smaller in hRAMP1 group than in control group on days 7, 14 and 28 after injection of adenovirus (0.07 ± 0.18 *vs* 0.14 ± 0.02, 0.15 ± 0.05 *vs* 0.39 ± 0.09, 0.35 ± 0.05 *vs* 0.56 ± 0.05, $P < 0.05$). **Conclusion** Exogenous hRAMP1 can regulate the expression of CRP and TNF-α and reduce the restenosis of atherosclerotic carotid artery after angioplasty.

[**Key words**] receptor activity modifying protein-1; inflammatory cytokine; angioplasty; proliferative intima

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81060014), the Special Funds of Key Laboratory of Anesthesiology and Organ Protection of Guizhou Province ([2011]4006). Corresponding author: Shi Bei, E-mail: shibei2147@163.com

经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)是心肌梗死患者恢复血液灌注的有效方式之一,但其术后易发生再狭窄,且发生再狭窄率仍达10%~20%[1],影响了其远期疗效和临床应用。目前PCI术后再狭窄已成为心血管领域研究的热点和难点之一。研究[2-3]发现,再狭窄除了与血管弹性回缩、中膜血管平滑肌细胞的迁移与增殖和晚期细胞外基质重构有关外,炎症反应也起了重要作用。本实验前期研究[4]显示:人受体活性修饰蛋白-1(human receptor activity modifying protein-1, hRAMP1)转染间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSCs)移植球囊损伤颈动脉后,hRAMP1-MSCs组与单纯MSCs组比较只是一定程度上抑制血管平滑肌细胞增殖,但再狭窄率降低较为显著,因而推测外源RAMP1基因除了抑制血管平滑肌细胞迁移增殖降低再狭窄外,还可能通过其他途径抑制内膜增生因而减轻血管成形术后再狭窄。因此本实验建立颈动脉粥样硬化并球囊损伤模型兔,观察hRAMP1转染对血管损伤后炎性细胞因子表达的影响,以期为防止血管成形术后再狭窄提供动物实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组

4~5月龄新西兰雄性大白兔36只,体质量(2.0±0.5) kg,购自第三军医大学实验动物中心。随机抽样分为RAMP1组和对照组,2组动物均构建动脉粥样硬化狭窄模型并接受球囊成形术。

1.2 材料

含有人RAMP1基因编码序列腺病毒载体,带有绿色荧光蛋白报告基因(pAd2-GFP-RAMP1),由本室构建,经PCR, Western blot和测序鉴定,载体中含有的外源基因片段完全正确[5]。小鼠抗人RAMP1多克隆抗体、驴抗小鼠IgG购自Santa Cruz公司;小鼠抗兔TNF-α多克隆抗体、小鼠SABC免疫组化试剂盒购自武汉博士德公司;TNF-α、CRP ELISA试剂盒均购于上海西塘生物公司。2F PTCA球囊导管为Cordis公司产品。图像处理系统为德国莱卡公司的Leica Qwin Plus。

1.3 方法

1.3.1 建立兔动脉粥样硬化和颈动脉球囊损伤模型及腺病毒注射 参照课题组[6]已成功建立兔动脉粥样硬化模型。动物高脂喂养1个月后,严格无菌操作游离右侧颈动脉,充分暴露右侧颈总和颈内、外动脉,左侧颈动脉作为对照,球囊损伤颈总动脉,总共3次损伤以剥脱内膜,模型建立成功后从球囊导管交换导丝侧孔缓慢注入pAd2-GFP-RAMP1(3.48×10^{11} pfu/ml)或PBS 50 μl,局部孵育保留45 min后吸出病毒液,生理盐水冲洗管腔,结扎颈外动脉,恢复颈总动脉和颈内动脉血流,分层缝合,应用青霉素预防感染。

1.3.2 动物血标本收集 球囊损伤前及重组腺病毒注射后7、14、28 d采血。抽取的静脉血室温静置2 h,血清分层后,2 000 r/min离心20 min,吸出上清,-80 ℃冰箱保存待用。

1.3.3 标本留取、观察指标和测定方法 每只动物取材血管分为2段,每段长约0.5 cm,分别进行如下处理和检测:①液氮固定1 h后移入-80 ℃环境冻存,备Western blot检测局部RAMP1目的基因表达;②另一段以10%福尔马林浸泡固定,石蜡包埋,备HE染色,免疫组化测定。

1.3.4 ELISA法检测血清TNF-α和CRP的浓度 根据ELISA试剂盒说明书方法测定不同时间点血清TNF-α和CRP的浓度。

1.3.5 血管组织形态学分析及免疫组织化学检测TNF-α表达 病毒注射后28 d血管组织采用SABC法进行免疫组化染色。首先分别滴加小鼠抗兔TNF-α(1∶100)和RAMP1(1∶200)一抗,4 ℃孵育过夜,再滴加抗小鼠二抗37 ℃孵育30 min, DAB显色,常规复染,脱水,透明中性树胶封片。余石蜡切片经梯度乙醇脱水,进行HE染色。利用光学显微镜及Leica Qwin Plus图像分析系统分析各组损伤血管内膜和中膜面积。

1.3.6 Western blot检测RAMP1基因表达 取组织加裂解液,BCA法测定蛋白浓度,以50 μl上样,10% SDS-PAGE电泳分离蛋白,湿转法转移至PVDF上,含5% BSA的TBST室温下封闭1~2 h后,一抗RAMP1(1∶800、1∶1 000)4 ℃孵育过夜,TBST洗膜10 min×3次,二抗(1∶5 000)室温孵育2~3 h, ECL化学发光显色,曝光,实验重复3次。以β-actin作为内参,利用伯乐凝胶成像系统分析各Western blot条带光密度值,再计算各条带与内参条带的光密度比值做蛋白含量半定量分析。

1.4 统计学处理

应用SPSS 16.0软件进行统计学分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用成组资料的 t 检验,组内比较采用单因素方差分析。

2 结果

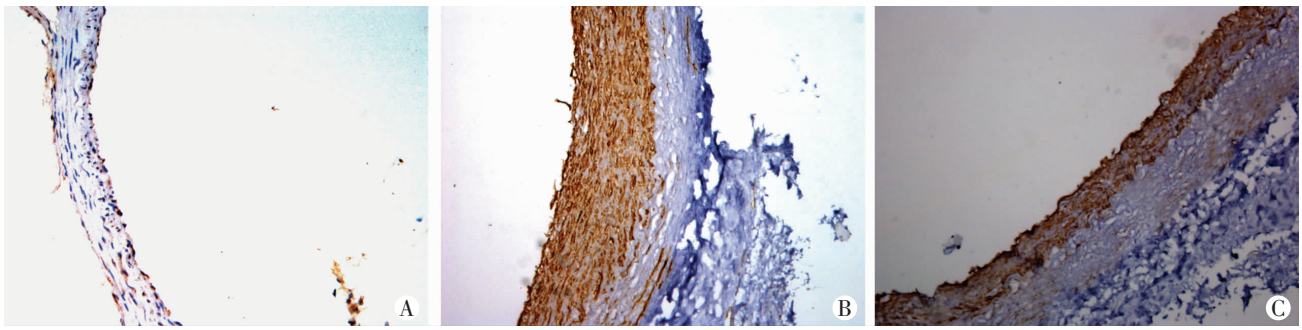
2.1 实验动物情况

实验期间2组实验动物组均无死亡,无手术切口感染或不愈合等情况;所有实验动物管腔均无血栓及闭塞。

表1 兔血管成形术并病毒注射后不同时间各组TNF-α及CRP的质量浓度比较（pg/ml，$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	TNF-α				CRP			
	术前	术后7 d	术后14 d	术后28 d	术前	术后7 d	术后14 d	术后28 d
对照组	41.58±9.65	74.13±4.99	93.40±6.96	67.46±6.57	3.96±0.65	43.96±7.88	13.51±1.68	5.02±0.89
RAMP1组	43.84±8.00	64.95±6.77[a]	75.29±4.73[a]	45.08±5.02[a]	3.85±0.34	29.27±1.57[a]	9.68±1.60[a]	4.82±0.96

a：$P<0.05$，与对照组比较



A：正常血管组织；B：对照组；C：RAMP1组

图1 兔血管成形术并病毒注射后28 d各组血管组织TNF-α免疫组织化学染色观察（SABC ×400）

2.2 血清TNF-α和CRP水平测定结果

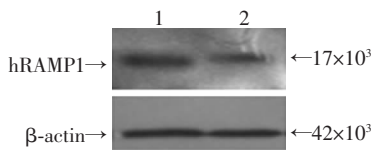
血管成形术并病毒注射后7、14 d和28 d，RAMP1组循环中TNF-α表达水平较对照组明显减少（$P<0.05$），病毒注射后7、14 d，RAMP1组CRP表达较对照组明显下降（$P<0.05$），而28 d CRP表达水平两组间比较无差异（表1）。

2.3 免疫组织化学分析

正常血管内膜呈单层柱状上皮，无TNF-α表达；血管损伤后，新生内膜中TNF-α表达增加，TNF-α表达阳性呈棕褐色颗粒，主要位于细胞质，细胞核也有少量表达。血管成形术并病毒注射后28 d从图中可见RAMP1组TNF-α表达量较对照组减少，所得结果与ELISA结果相似（图1）。

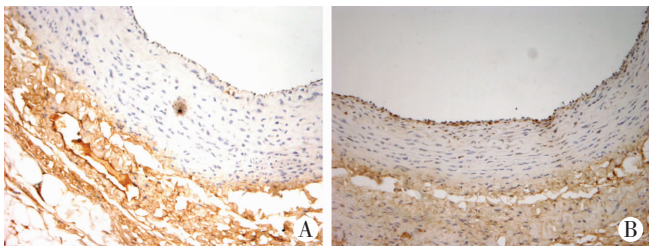
2.4 血管损伤局部RAMP1测定

应用Western blot技术和免疫组织化学检测血管局部RAMP1蛋白表达，结果显示：血管成形术并病毒注射后28 d，RAMP1组和对照组均有RAMP1基因表达，但尤以RAMP1组表达增加明显（图2、3）。



1：RAMP1组；2：对照组

图2 Western blot检测兔血管成形术并病毒注射后28 d各组血管组织RAMP1表达



A：对照组；B：RAMP1组

图3 免疫组织化学检测兔血管成形术并病毒注射后28 d各组血管组织RAMP1表达（SABC ×200）

2.5 组织形态学结果分析

血管正常颈动脉内弹力板完整，内膜为单层柱状上皮；血管成形术并病毒注射后28 d对照组内膜增生明显，内膜/中膜面积比明显增加，而携带RAMP1基因腺病毒注射后不同时间点损伤血管新生内膜和新生内膜/中膜面积比均明显下降（$P<0.05$）（表2）。

表2 兔血管成形术并病毒注射后28 d各组新生内膜情况比较（$n=18$，$\bar{x}\pm s$）

组别	内膜面积（mm^2）	中膜面积（mm^2）	内膜/中膜面积比
对照组	0.56±0.05	0.70±0.07	0.81±0.05
RAMP1组	0.35±0.05[a]	0.66±0.07	0.53±0.02[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

3 讨论

PCI后再狭窄的特征是：血管内皮损伤并剥脱后诱导血小板聚集和细胞炎症因子浸润，进而促使中膜血管平滑肌细胞（vascular smooth muscle cells，VSMCs）增殖迁移以及细胞外基质重构等多因素作用结果。越来越多的研究表明炎症反应在再狭窄和动脉粥样硬化的发病中起了关键的作用。TNF-α和CRP已被证实参与再狭窄过程。Murayama等[7]研究显示：TNF-α、干扰素-γ等炎症细胞因子与支架置入后血管再狭窄发生有关。Pesarini等[8]研究也证实：支架植入术后调节患者核转录因子κB活性，负性调节TNF-α表达后明显减轻支架植入术后再狭窄。本课题组前期研究[9]结果也显示：核转录因子κBp65及外周TNF-α和白细胞介素-6参与血管成形术后再狭窄的过程，BMSCs移植后下调上述表达抑制血管成形术后内膜增生，进一步证实炎症反应在血管成形术后再狭窄中的作用。本实验结果显示：兔颈动脉球囊损伤后局部和循环中TNF-α和CRP表达增加，新生内膜增生明显。

因此,有效抑制血管炎症反应可能有助于减轻 PCI 后血管再狭窄的发生。

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide,CGRP)是一种含 37 个氨基酸的神经肽,广泛分布于哺乳动物和人的中枢及外周感觉神经末梢中,调节机体多种生理和病理过程。国外一些研究[10]已证明,CGRP 不仅介导神经源性炎症,还与一些炎性细胞、免疫细胞、炎症介质和细胞因子有相互作用,并依此对炎症的转归产生影响;Ma 等[11]研究显示:CGRP 可调节内毒素激活的巨噬细胞的多种功能,如抑制致炎细胞因子 TNF-α 和白介素-12 的产生及双相调节白介素-6 的产生。而后来 Huang 等[12]研究也进一步证实 CGRP 可以调节细胞趋化因子产生。而 CGRP 需与 CGRP 受体结合才能发挥效应。研究显示多种免疫细胞均存在 CGRP 受体,CGRP 通过与其受体结合,影响这些细胞合成和分泌炎症介质。CGRP 受体由受体活性修饰蛋白-1(receptor activity-modify proteins-1,RAMP-1)、降钙素受体样受体(calcitonin receptor-like receptor,CRLR)和受体组成蛋白(receptor component protein,RCP)组成,CGRP 受体只有在 RAMP1 存在的前提下才具有活性,RAMP1 是调节 CGRP 作用及其关键的信号肽,是 CGRP 受体发挥作用的限速蛋白[13-14]。体外实验[14-15]已证实,异源性 RAMP1 基因的存在可以增强 CGRP 亲和力,从而发挥 CGRP 的最大抗炎和抗血管平滑肌细胞增殖的效应。Tsujikawa 等[16]在 RAMP1 基因剔除大鼠中,发现 LPS 诱导炎症因子表达明显增加,而过表达 RAMP1 基因的则能抑制 LPS 诱导 TNF-α 和 IL-12 的表达。因而说明 RAMP1 在炎症细胞因子调节中也起关键作用。本研究结果显示:血管成形术后 7、14 和 28 d,RAMP1 组循环和局部组织中 TNF-α 表达与对照组比较均明显下降,而 CRP 表达水平在外源 RAMP1 干预治疗后 7、14 d 也有明显的抑制作用,血管成形术后 28 d,RAMP1 组观察到炎症细胞因子下降的同时血管新生内膜面积及新生内膜面积/中膜面积比明显下降,因而进一步证实炎症因子参与血管成形术后再狭窄的过程,而 RAMP1 基因过表达可以调节炎症细胞因子产生,减轻血管成形术后再狭窄。因此,外源 RAMP1 可望成为 RS 防治的候选靶点。

综上所述,本研究探讨了在兔颈动脉粥样硬化球囊损伤模型基础上转染腺病毒介导外源 RAMP1 对损伤血管炎症反应的影响。结果显示,RAMP1 可能通过抑制血管损伤后 TNF-α 和 CRP 表达,减轻血管损伤后炎症反应进而下调新生内膜增生,抑制了血管成形术后再狭窄的发生。推测上述抑制炎症效应可能与抑制核转录因子 κBp65 活性的活性有关,具体机制需要进一步研究来证明。

参考文献:

[1] Kim M S, Dean L S. In-stent restenosis[J]. Cardiovasc Ther, 2011, 29(3): 190-198.
[2] Niccoli G, Montone R A, Ferrante G, *et al*. The evolving role of inflammatory biomarkers in risk assessment after stent implantation[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(22): 1783-1793.
[3] Montone R A, Ferrante G, Baca M, *et al*. Predictive value of C-reactive protein after drug-eluting stent implantation[J]. Future Cardiol, 2010, 6(2): 167-169.
[4] 石蓓, 龙仙萍, 赵然尊, 等. 受体活性修饰蛋白-1 转染间充质干细胞对兔颈动脉球囊成形术后血管平滑肌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中华老年医学杂志, 2011, 39(增刊): 395-396.
[5] 石蓓, 宋付凯, 赵然尊, 等. 重组人 RAMP-1 基因腺病毒载体的构建及鉴定[J]. 遵义医学院学报, 2010, 33(4): 330-332.
[6] 沈长银, 石蓓, 赵然尊, 等. 兔颈动脉粥样硬化狭窄动物模型的制备[J]. 四川大学学报:医学版, 2009, 40(5): 923-926.
[7] Murayama H, Takahashi M, Takamoto M, *et al*. Deficiency of tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma in bone marrow cells synergistically inhibits neointimal formation following vascular injury[J]. Cardiovasc Res, 2008, 80(2): 175-180.
[8] Pesarini G, Amoruso A, Ferrero V, *et al*. Cytokines release inhibition from activated monocytes, and reduction of in-stent neointimal growth in humans[J]. Atherosclerosis, 2010, 211(1): 242-248.
[9] 刘志江, 石蓓, 许官学, 等. 骨髓间充质干细胞移植后颈动脉损伤球囊核转录因子 κBp65 和增殖细胞核抗原的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(10): 1814-1818.
[10] Li W, Wang T, Ma C, *et al*. Calcitonin gene-related peptide inhibits interleukin-1beta-induced endogenous monocyte chemoattractant protein-1 secretion in type Ⅱ alveolar epithelial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 291(3): C456-C465.
[11] Ma W, Quirion R. Increased calcitonin gene-related peptide in neuroma and invading macrophages is involved in the up-regulation of interleukin-6 and thermal hyperalgesia in a rat model of mononeuropathy[J]. J Neurochem, 2006, 98(1): 180-192.
[12] Huang J, Stohl L L, Zhou X, *et al*. Calcitonin gene-related peptide inhibits chemokine production by human dermal microvascular endothelial cells[J]. Brain Behav Immun, 2011, 25(4): 787-799.
[13] Poyner D R, Sexton P M, Marshall I, *et al*. International Union of Pharmacology. XXXⅡ. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors[J]. Pharmacol Rev, 2002, 54(2): 233-246.
[14] Sabharwal R, Zhang Z, Lu Y, *et al*. Receptor activity-modifying protein 1 increases baroreflex sensitivity and attenuates Angiotensin-induced hypertension[J]. Hypertension, 2010, 55(3): 627-635.
[15] Chrissobolis S, Zhang Z, Kinzenbaw D A, *et al*. Receptor activity-modifying protein-1 augments cerebrovascular responses to calcitonin gene-related peptide and inhibits angiotensin Ⅱ-induced vascular dysfunction[J]. Stroke, 2010, 41(10): 2329-2334.
[16] Tsujikawa K, Yayama K, Hayashi T, *et al*. Hypertension and dysregulated proinflammatory cytokine production in receptor activity-modifying protein 1-deficient mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(42): 16702-16707.

(**收稿**:2012-01-12;**修回**:2012-03-22)
(编辑 栾 嘉)