文章编号:1000-5404(2014)05-0483-04

论著

腹主动脉瘤中组织蛋白酶S以及NF-κB p65的表达及意义

李 伦,任 为 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院血管外科)

[摘要] **目的** 观察组织蛋白酶S(cathepsin S)及核因子κB(nuclear factor-κB,NF-κB) p65在腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm,AAA)中的表达,探讨其在AAA发生、发展及破裂中的作用及相关性。**方法** 收集我科2008年1月至2013年3月行手术治疗AAA术中留取的腹主动脉瘤壁组织78例,其中AAA(最大直径5~7 cm)组29例、AAA(最大直径>7~9 cm)组34例、破裂腹主动脉瘤(ruptured abdominal aortic aneurysm,RAAA)(最大直径>7~9 cm)组15例。采用免疫组化、Western blot检测cathepsin S及核心因子κB p65的表达,Spearman等级相关分析检测两者的相关性。**结果** 免疫组化结果显示NF-κB p65集中于细胞质和细胞核表达,cathepsin S主要集中在细胞质表达。NF-κB p65及cathepsin S在AAA(>7~9 cm)组中的阳性率明显高于AAA(5~7 cm)组($P<0.05$),在RAAA(>7~9 cm)组中阳性率较AAA(>7~9 cm)组显著升高($P<0.05$)。差异性分析显示cathepsin S和NF-κB p65在AAA组织中的表达与高血压、冠心病有关($P<0.05$),NF-κB p65在AAA中的表达还与吸烟有关($P<0.05$)。Western blot法检测显示NF-κB p65及cathepsin S在AAA组(>7~9 cm)中的表达显著高于AAA(5~7 cm)组($P<0.05$),在RAAA(>7~9 cm)组中表达显著高于AAA(>7~9 cm)组($P<0.05$)。相关性分析显示NF-κB p65与cathepsin S的表达呈正相关($P<0.05$)。**结论** cathepsin S与NF-κB p65在3组AAA组织中均有表达,其表达量均随AAA直径的增加及破裂呈现递增趋势,提示两种蛋白在AAA发生、发展、破裂中发挥重要作用。

[关键词] 腹主动脉瘤;组织蛋白酶S;核因子-κB p65
[中图法分类号] R345; R363; R543.16 [文献标志码] A

Expression and significance of cathepsin S and NF-κB p65 in abdominal aortic aneurysm

Li Lun, Ren Wei (Department of Vascular Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of cathepsin S and NF-κB p65 in abdominal aortic aneurysm (AAA), and determine their roles in the occurrence, progress and rupture of AAA. **Methods** Surgical specimens of abdominal aortic aneurysm wall tissue from 78 cases undergoing surgery in our department from January 2008 to March 2013 were collected. There were 29 cases with the aneurysm size of 5 to 7 cm, 34 cases with the size of 7 to 9 cm, and 15 cases with ruptured abdominal aortic aneurysm in size of 7 to 9 cm (RAAA). Immunohistochemical assay and Western blotting were applied to detect the expression of cathepsin S and NF-κB in the tissue specimens. Spearman analysis was carried out for the correlation of the expression with aneurysm size. **Results** Immunohistochemistry assay showed that NF-κB p65 was expressed in the cytoplasm and nucleus, while cathepsin S was mainly concentrated in the cytoplasm. The positive rate of NF-κB p65 and cathepsin S was significantly higher in 7 – 9 cm AAA group than in 5 – 7 cm AAA group ($P<0.05$). The positive rate of NF-κB p65 and cathepsin S was significantly higher in 7 – 9 cm RAAA group than in 7 – 9 cm AAA group ($P<0.05$). The expression of both cathepsin S and NF-κB p65 in abdominal aortic aneurysm tissues was correlated with hypertension and coronary artery diseases ($P<0.05$), and NF-κB p65 expression was also associated with smoking ($P<0.05$). Western blotting showed that NF-κB p65 and cathepsin S in 7 – 9 cm AAA group was higher than that in 5 – 7 cm AAA group ($P<0.05$). NF-κB p65 and cathepsin S in RAAA (7 – 9 cm) group was higher than that in 7 – 9 cm AAA ($P<0.05$). Among 78 cases of abdominal aortic aneurysm, NF-κB p65 and cathepsin S expression was positively correlated ($P<0.05$). **Conclusion** Cathepsin S and NF-κB p65 are expressed in AAA, and their expression is positively correlated

[通信作者] 任 为,E-mail: renwei9771@foxmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140102.1435.020.html(2014-01-02)

with the aneurysm size and rupture, suggesting that they might play important roles in the occurrence, development and rupture of AAA.

[**Key words**] abdominal aortic aneurysm; cathepsin S; NF-κB p65

Corresponding author: Ren Wei, E-mail: renwei9771@foxmail.com

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm,AAA)是以腹主动脉局限性扩张为主要表现的一种疾病,好发于年龄>60岁的老年人,其发生、发展机制复杂,目前认为可能与遗传、生化、免疫、炎症、血流动力学等多种因素有关,此病一旦发生就会不断扩张直至破裂,预后极差[1]。AAA的组织学特征主要是血管壁的炎症反应和动脉壁中膜的重构[2]。组织蛋白酶S(cathepsin S)是组织蛋白酶家族中的重要一员,近年来其在心血管疾病中的作用受到广泛的关注。研究证实cathepsin S具有调节炎性因子表达从而介导炎性反应的作用[3],越来越多的证据提示cathepsin S在AAA的形成中可能发挥重要作用[4-5]。核因子κB(nuclear factor-κB,NF-κB) p65是一种细胞核内转录因子,NF-κB p65信号通路在调节炎症、免疫和细胞凋亡反应中起着重要作用[6],其在主动脉中异常激活可促进炎症因子和基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinase,MMP)类水解蛋白的表达而成为动脉瘤发生的诱导因素之一[7]。本实验通过观察在不同直径以及破裂腹主动脉瘤(ruptured abdominal aortic aneurysm,RAAA)中cathepsin S与NF-κB p65的表达,探讨其在AAA发展、破裂中的作用。

1 资料与方法

1.1 临床资料

目前认为腹主动脉瘤体直径≥5 cm时有手术指征,患者术前均行CTA检查以确定最大直径。2008年1月至2013年3月我院行腹主动脉瘤切除人工血管植入术的患者共78例,包括63例非破裂AAA和15例破裂腹主动脉瘤(RAAA)患者的病变组织,其中男性63例,女性15例,年龄63~82(73±10)岁。按AAA不同直径及是否破裂分为3组。RAAA(>7~9 cm)组:15例,破裂动脉瘤最大直径>7.0~9.0 cm;AAA(>7~9 cm)组:34例,未破裂动脉瘤最大直径>7.0~9.0 cm;AAA(5~7 cm)组:29例,未破裂动脉瘤最大直径为5.0~7.0 cm。未破裂标本留取AAA最大直径处外侧壁全层瘤壁,破裂AAA取破裂边缘全层动脉瘤壁。采集新鲜标本均分为2份,1份经4%多聚甲醛固定、包埋保存,另1份用液氮保存为新鲜标本。本研究经医院伦理委员会批准。患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

cathepsin S兔抗人多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),NF-κB p65兔抗人多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),生物素标记羊抗兔IgG二抗(北京博奥森生物技术有限公司),Western blot羊抗兔IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),Western blot试剂盒及其他相关试剂(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 免疫组化法检测cathepsin S和NF-κB p65蛋白的表达

采用免疫组化S-P染色法,5 μm切片进行抗原修复及封闭内源性生物素,滴加一抗(cathepsin S 1∶100,NF-κB p65 1∶100),4 ℃过夜,PBS洗涤3次后滴加二抗,PBS洗涤,DAB显色,常规梯度乙醇脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片。在400倍下拍照,根据每张切片的阳性细胞比例及着色深浅计分。评分标准:着色细胞比例<1/3为1分,着色细胞比例1/3~2/3为2分;>2/3为3分。着色深度:无着色为0分,浅黄色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分。二者乘积作为每1例的积分,积分<4分为阴性,积分≥4分为阳性。

1.4 Western blot检测cathepsin S和NF-κB p65蛋白的表达

常规方法进行组织蛋白提取,BCA法测定蛋白浓度。取60 μg蛋白进行12%聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉封闭非特异性抗原。加入一抗(cathepsin S,1∶200;NF-κB p65抗体,1∶200),4 ℃孵育过夜。用含0.1% Tween20的TBST洗膜,加二抗,室温孵育1 h。洗膜后,加入增强化学发光底物ECL Plus试剂,曝光于X线片上,常规显影、定影。采用Quantity One软件进行图像扫描和分析其灰度值。

1.5 采用差异性分析法分析cathepsin S和NF-κB p65的表达与AAA患者临床病理特征的关系

将78例AAA组织切片分别按性别、年龄、吸烟史、高血压、冠心病、糖尿病、慢性阻塞性肺部疾病(chronic obstructive pulmonary diseases,COPD)进行分组,比较各组中cathepsin S和NF-κB p65蛋白表达的差异。

1.6 统计学分析

应用SPSS 18.0统计软件,计数资料采用χ^2检验;计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用单因素方差分析;采用Spearman等级相关分析cathepsin S与NF-κB p65表达的关系。

2 结果

2.1 各组中cathepsin S和NF-κB p65蛋白的表达

免疫组化检测显示NF-κB p65在细胞质和细胞核中均有表达(图1),其在AAA(5~7 cm)组、AAA(>7~9 cm)组、RAAA(>7~9 cm)组阳性表达率分别为24.14%(7/29)、50.00%(17/34)和86.67%(13/15)。其中,AAA(5~7 cm)组与AAA(>7~9 cm)组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),AAA(>7~9 cm)组与RAAA(>7~9 cm)组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。cathepsin S主要表达于细胞质(图1),其在AAA(5~7 cm)组、AAA(>7~9 cm)组、RAAA(>7~9 cm)组阳性表达率分别为17.24%(5/29)、44.12%(15/34)和80.00%(12/15)。其中AAA(5~7 cm)组与AAA(>7~9 cm)组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),AAA(>7~9 cm)组与RAAA(>7~9 cm)组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。78例AAA组织中cathepsin S和NF-κB p65的蛋白表达呈正相关($r=0.317$,$P<0.05$)。

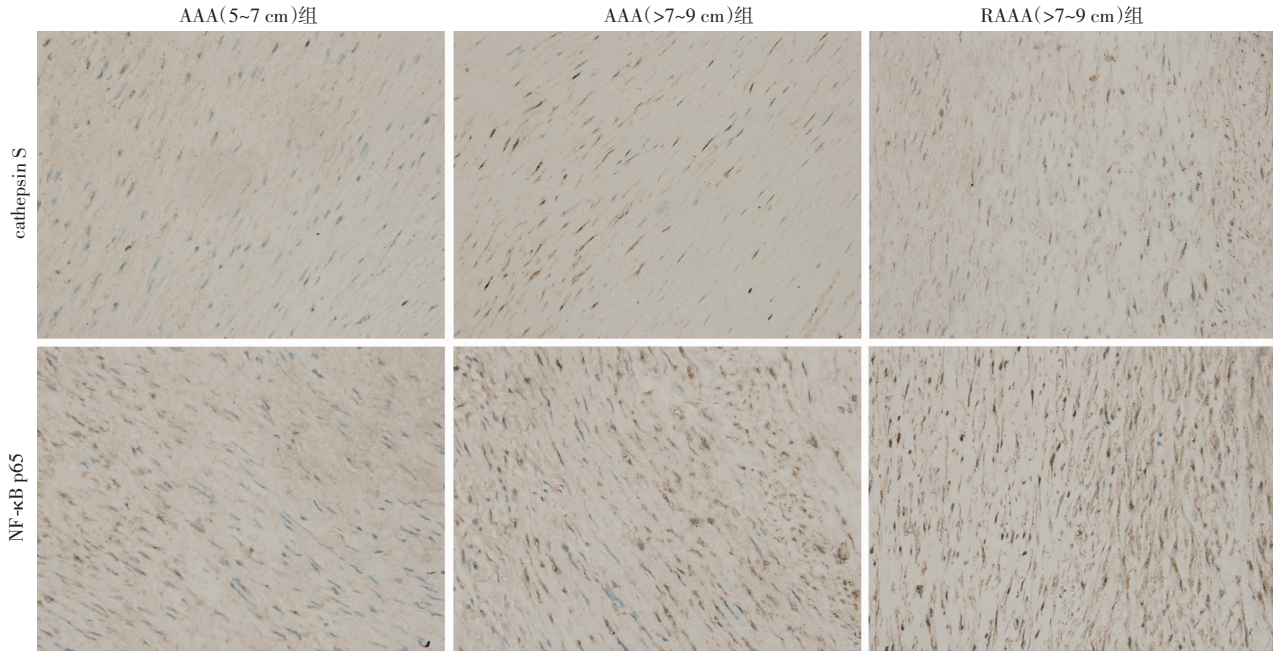


图1 免疫组化检测蛋白酶S和NF-κB p65蛋白表达 (S-P ×400)

2.2 cathepsin S和NF-κB p65的蛋白表达与腹主动脉瘤临床特征的关系

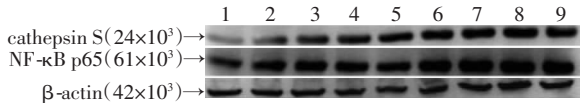
统计学分析显示,cathepsin S的表达与患者的性别、年龄、吸烟、糖尿病、慢性阻塞性肺病无明显相关性,与合并冠心病、高血压有关($P<0.05$)。NF-κB p65的表达与患者的性别、年龄、糖尿病、慢性阻塞性肺病无明显相关性,与合并高血压、冠心病、吸烟有关($P<0.05$)。见表1。

表1 NF-κB p65及cathepsin S的表达与临床病理特征的关系

临床特征	例数	NF-κB p65			cathepsin S		
		阳性	χ^2值	P值	阳性	χ^2值	P值
年龄(岁)							
≥70	44	20	0.159	>0.05	19	0.194	>0.05
<70	34	17			13		
性别							
男性	63	30	0.004	>0.05	25	0.244	>0.05
女性	15	7			7		
吸烟史							
有	47	27	4.753	<0.05	20	0.114	>0.05
无	31	10			12		
高血压							
有	54	30	4.640	<0.05	26	3.936	<0.05
无	24	7			6		
冠心病							
有	34	24	12.957	<0.05	19	5.499	<0.05
无	44	13			13		
糖尿病							
有	18	12	3.471	>0.05	10	2.042	>0.05
无	60	25			22		
COPD							
有	24	13	0.630	>0.05	11	0.331	>0.05
无	54	24			21		

2.3 Western blot检测cathepsin S和NF-κB p65蛋白的表达

Western blot检测显示2种蛋白在各组均有表达,NF-κB p65及cathepsin S在AAA(>7~9 cm)组中的表达较AAA(5~7 cm)组显著增高($P<0.05$);在RAAA(>7~9 cm)组的表达较AAA(>7~9 cm)组显著增高($P<0.05$)。78例AAA组织中cathepsin S和NF-κB p65的蛋白表达呈正相关($r=0.704$, $P<0.01$)。见图2、表2。



1~3:AAA(5~7 cm)组;4~6:AAA(>7~9 cm)组;7~9:RAAA(>7~9 cm)组

图2 Western blot检测cathepsin S及NF-κB p65蛋白表达

表2 Western blot检测NF-κB p65及cathepsin S蛋白的表达 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	NF-κB p65	cathepsin S
AAA(5~7 cm)组	29	5.08±0.53	3.08±0.53
AAA(>7~9 cm)组	34	8.15±1.05[a]	5.48±0.95[a]
RAAA(>7~9 cm)组	15	9.26±1.44[b]	6.30±1.04[b]

a:$P<0.05$,与AAA(5~7 cm)组比较;b:$P<0.05$,与AAA(>7~9 cm)组比较

3 讨论

AAA是一种以腹主动脉进行性扩张为主的病死率极高的血管疾病。在我国65岁以上人群中发病率高达2%~9%[8]。临床针对AAA以外科开放性治疗和血管内介入治疗为主。众多研究研究表明炎症反应与细胞外基质(extracellularmatrixc,ECM)退化是AAA形成的关键因素[9]。

NF-κB是一种转录调节因子,由2种亚单位组成的同源或异源二聚体,其中p50和p65组成的异源二聚体是其常见的二聚体形式,而二聚体化是其与基因κB位点结合的关键[10]。NF-κB p65在静息时主要以

无活性的前体形式存在于细胞质,当其被激活时可引起靶基因的表达,其靶基因包括白细胞介素-1(interleukin-1,IL-1)、IL-6等炎性介质及基质金属蛋白酶[6],其中靶基质金属蛋白酶2(matrix metallo proteinase-2,MMP-2)和MMP-9的转录激活可导致腹主动脉细胞外基质的降解破坏[7]。动物实验表明NF-κB抑制剂可显著抑制腹主动脉瘤形成[11]。本研究结果显示,在AAA中NF-κB p65的表达与AAA直径呈正相关,直径相同下RAAA中NF-κB p65的表达更高,这表明在AAA发展以及破裂中NF-κB可能是一个关键的因素。已有大规模临床研究表明吸烟、高血压会导致AAA的发病率明显增高[12]。本研究分析表明NF-κB p65表达强度与AAA患者合并有高血压、冠心病、吸烟有关,提示吸烟、高血压、冠心病可能通过影响NF-κB p65的表达导致AAA的发生和发展、破裂。

cathepsin S是半胱氨酸组织蛋白酶的一种,由细胞溶酶体分泌,在多种组织和细胞类型中以基础水平广泛表达。目前动物实验研究证实,其在心血管系统中具有水解细胞外基质中弹性蛋白和胶原蛋白[13],导致主动脉中微血管生成、诱导动脉中层平滑肌细胞细胞的凋亡[14]、调节组织炎性纤维化的作用。其在正常主动脉表达很少,而在动脉硬化和动脉瘤中高表达[15]。Qin等[16]以血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ,AngⅡ)灌注建立腹主动脉瘤模型,发现cathepsin S基因敲除小鼠小鼠AAA发生率显著降低。同时有研究表明在AAA患者的血清中cathepsin S水平显著升高,并与AAA直径呈正相关[5]。Pan等[17]研究发现cathepsin S可升高心肌巨噬细胞中活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的水平从而激活NF-κB p65水平,加重组织炎性反应。本实验结果显示,cathepsin S的表达水平与AAA直径呈正相关,且直径相同下RAAA中的cathepsin S表达更高,此外cathepsin S表达强度与AAA患者合并有冠心病、高血压有关,这与临床上可导致AAA发生的高危因素的结果一致[15]。说明cathepsin S高表达与AAA的发生、发展、破裂密切相关。

本研究中相关性分析显示cathepsin S和NF-κB p65的表达呈正相关,提示两者之间可能存在一定的调控关系,与Pan等[17]对于两种蛋白之间关联性的研究结果基本相符。由于AAA发病率低,且目前治疗方案以手术和介入治疗为主,本实验仅能对收集到的手术病例标本进行实验分析,这是本研究的局限之处。本研究表明cathepsin S和NF-κB p65在AAA组织中均有表达,且其表达程度与病情严重程度呈正比,提示它们可能参与了AAA的发展和破裂,同时cathepsin S与NF-κB p65的表达可能存在一定关联性。抑制cathepsin S与NF-κB的表达有望成为干预腹主动脉瘤发生、发展的新途径。

参考文献:

[1] Shimizu K, Mitchell R N, Libby P. Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms[J]. Arterioscler Thromb Vas Biol, 2006, 26(5): 987-994.

[2] 庄世虹, 周洪莲, 黄敏, 等. α-SMA, CD68在人胸主动脉瘤和腹主动脉瘤中表达的比较[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(13): 1294-1295.

[3] Qin Y, Yang Y, Liu R, *et al*. Combined Cathepsin S and hs-CRP predicting inflammatory of abdominal aortic aneurysm[J]. Clin Biochem, 2013, 46(12): 1026-1029.

[4] Lohoefer F, Reeps C, Lipp C, *et al*. Histopathological analysis of cellular localization of cathepsins in abdominal aortic aneurysm wall[J]. Int J Exp Pathol, 2012, 93(4): 252-258.

[5] Lv B J, Lindholt J S, Cheng X, *et al*. Plasma cathepsin S and cystatin C levels and risk of abdominal aortic aneurysm: a randomized population-based study[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41813.

[6] 徐祥, 梁华平. 核因子-κB的结构和功能研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2002, 18(1): 92-95.

[7] 童雪影, 周洪莲, 武亚丽, 等. 大鼠腹主动脉瘤发生与骨桥蛋白及核因子-κB表达的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(11): 2150-2152, 封3.

[8] 吴建秋, 景在平. 乙酰肝素酶在腹主动脉瘤发病中的作用[J]. 中华医学杂志, 2002, 82(20): 1378-1380.

[9] Weintraub N L. Understanding abdominal aortic aneurysm[J]. N Engl J Med, 2009, 361(11): 1114-1116.

[10] 苏颖洁, 黄杰安, 刘诗权, 等. 鞘氨醇激酶1和核因子κB p65在结肠癌中的表达及其临床意义[J]. 中华内科杂志, 2012, 51(3): 220-224.

[11] Parodi F E, Mao D, Ennis T L, *et al*. Suppression of experimental abdominal aortic aneurysms in mice by treatment with pyrrolidine dithiocarbamate, an antioxidant inhibitor of nuclear factor-kappaB[J]. J Vasc Surg, 2005, 41(3): 479-489.

[12] Singh K, Bonaa K H, Jacobsen B K, *et al*. Prevalence of and risk factors for abdominal aortic aneurysms in a population-based study: The Tromso Study[J]. Am J Epidemiol, 2001, 154(3): 236-244.

[13] Small D M, Burden R E, Scott C J. The emerging relevance of the cysteine protease cathepsin S in disease[J]. Clin Rev Bone Miner Metab, 2011, 9(2): 122-132.

[14] Shi G P, Sukhova G K, Kuzuya M, *et al*. Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth[J]. Circ Res, 2003, 92(5): 493-500.

[15] Sjoberg S, Shi G P. Cysteine protease cathepsins in atherosclerosis and abdominal aortic aneurysm[J]. Clin Rev Bone Miner Metab, 2011, 9(2): 138-147.

[16] Qin Y, Cao X, Guo J, *et al*. Deficiency of cathepsin S attenuates angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice[J]. Cardiovasc Res, 2012, 96(3): 401-410.

[17] Pan L, Li Y, Jia L, *et al*. Cathepsin S deficiency results in abnormal accumulation of autophagosomes in macrophages and enhances Ang II-induced cardiac inflammation[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35315.

(**收稿**: 2013-10-18;**修回**: 2013-11-08)

(编辑 龙 亮)