反义 p38 MAPK 寡核苷酸对 AT1R 介导的血管收缩的影响及其机制

雷 艳 （第三军医大学基础部外科应用解剖与手术学教研室）

［**摘 要**］ **目的** 研究反义 p38 MAPK 寡核苷酸在血管紧张素Ⅱ1 型受体（AT1R）介导的血管平滑肌收缩反应中的作用及其机制。**方法** 采用反义寡核苷酸（ASODN）基因封闭技术来特异性调控 p38 MAPK 的表达，观察 p38 MAPK 在 AT1R 介导的大鼠主动脉血管平滑肌收缩中的作用及其与血管平滑肌肌球蛋白轻链激酶（MLCK）的关系。**结果** AngⅡ诱导大鼠主动脉产生浓度依赖性的收缩，AT1R 拮抗剂 losartan 和 p38 MAPK-ASODN 处理均可拮抗 AngⅡ诱导的血管收缩反应。同时，AngⅡ处理可明显升高血管 MLCK 的活性，AT1R 拮抗剂和 p38 MAPK-ASODN 也明显抑制了 AngⅡ的这一作用。**结论** p38 MAPK 参与了 AT1R 介导的血管收缩反应的调节，其机制与 MLCK 调节途径有关。

［**关键词**］反义寡核苷酸；p38 MAPK；血管紧张素Ⅱ1 型受体；血管收缩

［**中图分类号**］R331.3；R972 ［**文献标识码**］A ［**文章编号**］1672-5042（2011）06-0625-02

Mechanism and effect of p38 MAPK antisense oligodeoxynucleotide on vascular contraction induced by AT1R

LEI Yan （Department of Surgical Applied Anatomy and Operative Surgery, College of Basic Medcial Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China）

Abstract: Objective To study the mechanism and the effect of p38 MAPK antisense oligodeoxynucleotide (ASODN) on the contractile response of vascular smooth muscle induced by angitensin Ⅱ type 1 receptor (AT1R). **Methods** The expressions of p38 MAPK were regulated by ASODN approach. The effects of p38 MAPK on the contractile response of rat aortic smooth muscle induced by AT1R and its relations with myosin light chain kinase (MLCK) were observed. **Results** Concentration-dependent contractile response was induced by AngⅡ in rat aorta but the AngⅡ-induced vascular contraction was antagonized by AT1R inhibitor (losartan) and p38 MAPK-ASODN. The activity of MLCK in aorta was increased by AngⅡ but it was also antagonized by AT1R inhibitor and p38 MAPK-ASODN. **Conclusion** p38 MAPK is involved in the regulation of the vascular contraction induced by AT1R and its mechanism is possibly associated with MLCK pathway.

Keywords: antisense oligodeoxynucleotide; p38 MAPK; angitensin Ⅱ type 1 receptor; vascular contraction

血管紧张素Ⅱ（angiotensinⅡ，AngⅡ）是肾素-血管紧张素系统（rennin-angiotensin system，RAS）中最重要的活性物质，在正常或病理条件下的血管功能调节中起重要作用[1]。AngⅡ的主要生物学效应是通过其 1 型受体（AT1R）所介导。p38 MAPK 是丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）家族的重要成员，参与多种细胞的内信号传递，在细胞生长、分化、死亡、应答外界刺激和炎症反应等方面起着重要作用[2-3]。本实验通过采用反义寡核苷酸（antisense oligodeoxynucleotide，ASODN）基因封闭技术来特异性调控 p38 MAPK 的表达，研究 p38 MAPK 在 AT1R 介导的血管平滑肌收缩效应中的作用，及其与血管平滑肌肌球蛋白轻链激酶（MLCK，一种平滑肌细胞收缩调节的关键分子）的关系，探讨 AngⅡ通过其 AT1R 途径在心血管功能调节中的作用机制，为临床疾病治疗提供一种新的途径。

［**作者简介**］雷 艳（1979－），女，重庆市人，讲师，学士，主要从事普通外科临床及实验方面的研究。电话：（023）68752251

［**收稿日期**］2011-06-02 ［**修回日期**］2011-06-25

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠 65 只，雌雄各半，体重 200～230 g，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 血管制备和离体培养 SD 大鼠实验前 12 h 禁食，自由饮水，实验当日用戊巴比妥钠（30 mg/kg）腹腔注射麻醉，无菌条件下取胸主动脉，清除血管周围结缔组织，制备 2～3 mm 长的血管段。培养组血管放入 6 孔板内，加入 DMEM/F12 完全培养基，根据实验分组加入相应寡核苷酸孵育，在 37℃、5% CO_2 孵箱中培养 24 h 后用于实验。

1.2.2 p38 MAPK 反义寡核苷酸转染 硫代修饰的 p38 MAPK 反义（ASODN）和正义寡核苷酸（SODN）由上海生物工程技术公司合成。ASODN 的设计依照反义链与大鼠 p38 基因翻译起始编码区互补的原则，ASODN 序列：5’GGGCCTTTCCTGCGACAT3’，SODN 序列：5’ATGTCGCAGGAAAGGCCC3’。按照说明书将 p38 MAPK 反义及正义寡核苷酸与转染试剂 SuperFect Transfection Reagent（Qiagen）混合，加入放有血管的培养孔中孵育 24 h。设 p38 MAPK-ASODN 为Ⅰ组，p38 MAPK-SODN 为Ⅱ组，空白对照组与 SODN 组共同作为对照，设为Ⅲ组。常

规方法提取血管组织蛋白，Western blot 方法检测反义寡核苷酸的抑制效率。

1.2.3 p38 MAPK 反义寡核苷酸对 AT1R 介导的血管收缩的影响 实验分为 3 组：对照组、AT1R 拮抗剂（losartan）组、p38 MAPK-ASODN 组。将血管段挂于含 K-H 液的 37 ℃恒温离体器官灌流浴槽中，槽中持续通入 5% CO_2 和 95% O_2 的混合气体，血管收缩张力通过张力传感器经八道生理记录仪记录。按累积浓度法向浴槽 Krebs 液中依次加入 Ang Ⅱ，使其终浓度分别为 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L，持续记录血管张力。

1.2.4 p38 MAPK 反义寡核苷酸对 AT1R 调节 MLCK 活性的影响 实验分为 4 组：对照组（A 组）、Ang Ⅱ 组（B 组）、Ang Ⅱ 加 AT1R 拮抗剂组（C 组）、Ang Ⅱ 加 p38 MAPK-ASODN 组（D 组）。按实验分组用 Ang Ⅱ、AT1R 拮抗剂和 p38 MAPK-ASODN 处理血管后，按文献[4]方法检测血管 MLCK 的活性。

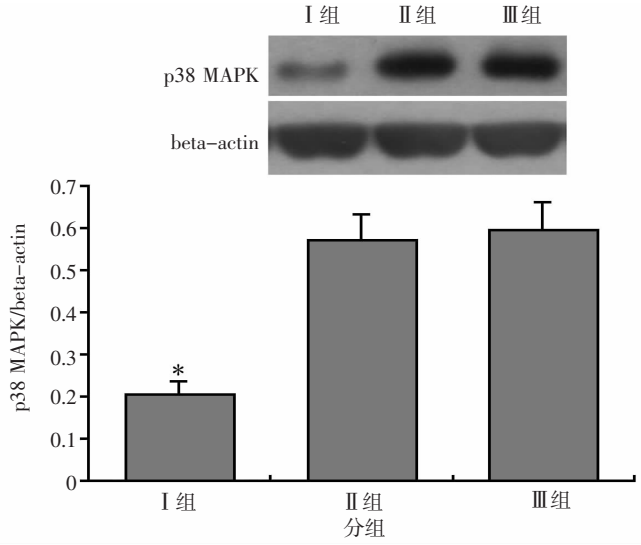
1.3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。组间比较用单因素方差分析，方差分析有统计学意义的组间比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 p38 MAPK 反义寡核苷酸的抑制效率

p38 MAPK-ASODN 转染后，血管表达 p38 MAPK 的水平显著降低，其表达水平为对照组的 34.4%（$P<0.01$）。而正义寡核苷酸转染后，p38 MAPK 的表达水平与对照组相比无明显差异。Western blot 电泳及光密度分析结果见图 1。

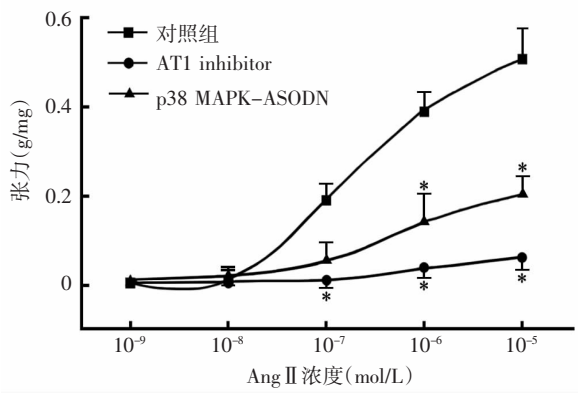


*：与Ⅲ组比较，$P<0.01$

图 1 p38 MAPK 反义寡核苷酸的抑制效率

2.2 p38 MAPK-ASODN 和 AT1R 拮抗剂对 Ang Ⅱ 诱导的血管收缩反应的影响

10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L 的 Ang Ⅱ 可诱导大鼠主动脉产生浓度依赖性的收缩，AT1R 拮抗剂 losartan 预处理非常显著地抑制了 Ang Ⅱ 诱导的血管收缩（$P<0.01$），提示 Ang Ⅱ 诱导的血管收缩效应主要通过 AT1R。p38 MAPK-ASODN 转染后血管的收缩反应也显著降低，其最大收缩张力显著低于对照组（$P<0.01$），见图 2。

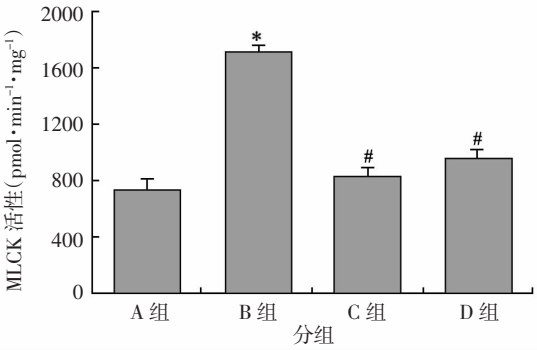


*：与对照组比较，$P<0.01$

图 2 p38 MAPK-ASODN 和 AT1R 拮抗剂对 Ang Ⅱ 诱导的血管收缩反应的影响

2.3 p38 MAPK-ASODN 和 AT1R 拮抗剂对 Ang Ⅱ 调节血管 MLCK 活性的影响

Ang Ⅱ 处理使血管 MLCK 活性明显升高，与对照组相比，差异具有统计学意义（$P<0.01$），AT1R 拮抗剂可抑制 Ang Ⅱ 的这一作用，p38 MAPK-ASODN 明显抑制了 Ang Ⅱ 诱导的 MLCK 活性升高，其活性水平降低（$P<0.01$），见图 3。



*：与 A 组比较，$P<0.01$；#：与 B 组比较，$P<0.01$

图 3 Ang Ⅱ、p38 MAPK-ASODN 和 AT1R 拮抗剂对血管 MLCK 活性的影响

3 讨论

血管紧张素Ⅱ是一种具有多种功能的激素，在血管平滑肌细胞的收缩和生长等过程发挥着重要的调节作用。它的作用主要通过其 AT1R 诱导多条细胞内信号转导通路来发挥。本实验结果也证实了 Ang Ⅱ 诱导大鼠主动脉血管平滑肌收缩主要是通过其 AT1R。已有报道显示，Ang Ⅱ 可通过 AT1R 激活 MAPK 信号途径，在心血管系统中起重要作用，目前的相关研究主要集中在心肌细胞和血管平滑肌细胞的生长、增殖和凋亡等方面[5-6]。

反义寡核苷酸技术是研究细胞信号传导分子机制的一项生物技术,临床试验证明它在疾病的治疗中具有显著的效果[7]。本实验采用反义寡核苷酸技术特异性抑制了 p38 MAPK 的表达,观察 p38 MAPK 在 AngⅡ通过 AT1R 介导的血管收缩效应中的作用。实验结果显示,用 ASODN 阻断 p38 MAPK 信号途径后,大鼠主动脉对 AngⅡ诱导的收缩反应显著降低,提示 p38 MAPK 信号途径参与了 AngⅡ通过 AT1R 介导的血管收缩过程。本实验证实 p38 MAPK 是 AT1R 介导血管收缩的信号分子的同时,是否也提示反义 p38 MAPK 寡核苷酸可能作为治疗 AT1R 相关疾病(如高血压等)的新的靶点,这需要进一步的研究证实。

血管平滑肌细胞的收缩/舒张与肌球蛋白轻链(MLC)的磷酸化状态有密切关系,而肌球蛋白轻链激酶(MLCK)是调节 MLC 磷酸化的关键分子。本实验进一步观察了 p38 MAPK-ASODN 对 AngⅡ调节血管 MLCK 活性的影响,结果显示 AngⅡ通过 AT1R 诱导血管 MLCK 活性升高,p38 MAPK-ASODN 可明显拮抗 AngⅡ升高 MLCK 活性的作用。这一结果提示 AngⅡ通过 AT1R 激活 p38 MAPK 后,可能通过增强 MLCK 活性,进而促进 MLC 磷酸化来诱导血管平滑肌收缩。但是,这其中的具体信号传导途径尚不清楚,还需进一步的研究来证明。

[参考文献]

[1] Aplin M, Bonde MM, Hanse JL. Molecular determinants of angiotensin Ⅱ type 1 receptor functional selectivity[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(1):15 - 24.

[2] Clark JE, Sarafraz N, Marber MS. Potential of p38-MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease[J]. Pharmacol Ther, 2007, 116(2):192 - 206.

[3] Muslin AJ. MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. Clin Sci (Lond), 2008, 115(7):203 - 218.

[4] Li T, Liu L, Liu J, et al. Mechanisms of Rho kinase regulation of vascular reactivity following hemorrhagic shock in rats[J]. Shock, 2008, 29(1):65 - 70.

[5] Freeman EJ, Sheakley ML, Clements RJ. Angiotensin II-dependent growth of vascular smooth muscle cells requires transactivation of the epidermal growth factor receptor via a cytosolic phospholipase A(2)-mediated release of arachidonic acid[J]. Arch Biochem Biophys, 2010, 498(1):50 - 56.

[6] Zhao Y, Chen X, Cai L, et al. Angiotensin Ⅱ/angiotensin Ⅱ type 1 receptor (AT1R) signaling promotes MCF-7 breast cancer cells survival via PI3-kinase/Akt pathway[J]. J Cell Physiol, 2010, 225(1):168 - 173.

[7] Roash W. Antisense aims for a renaissance[J]. Science, 1997, 276(5316):1192 - 1193.

(编辑:左艳芳)

(上接第 624 页)

术前多次发生 SAH 的患者,术中发生破裂的可能性增加。为防止动脉瘤破裂需要做好以下工作:麻醉要平稳,避免血压波动,分离动脉瘤时麻醉要加深,血压降低,降低动脉瘤的压力;充分打开脑池,耐心等待脑组织塌陷;使用临时阻断载瘤动脉;暴露和分离动脉瘤时,使用显微器械,吸引器头不堵住,首先暴露载瘤动脉,再从载瘤动脉开始分离至瘤颈,不挤压瘤体部。

择期手术治疗的破裂动脉瘤的好处在于:①在急性期,不管开颅手术还是介入治疗,都可能发生血管痉挛,有些甚至是致命性的。选择出血 2 周后手术,患者已经渡过了脑血管痉挛高峰期,可以最大限度减低和避免脑血管痉挛的发生。②蛛网膜下腔出血已大部分或完全吸收,病人症状减轻,生命体征稳定,便于术中、术后管理。③颅内压力下降,便于手术显露。④降低了脑水肿、脑肿胀的发生,保护了正常脑组织,减少了术后并发症。

对于大脑中动脉瘤若没有合并明显的血肿,采用择期锁孔手术,一方面缩短了手术时间,减少了机体组织的创伤;另一方面也夹闭破裂动脉瘤,减少了并发症的发生,有效规避了脑血管痉挛的发生,是一种安全、快捷、微创的治疗手段。

[参考文献]

[1] 于春泳,梁国标,薛洪利,等. 高龄蛛网膜下腔出血患者全脑血管造影临床体会[J]. 脑与神经疾病杂志, 2008, 16(2):145.

[2] 范 晓,吕发金,罗天友,等. 颅内交通动脉瘤的发生与 Willis 环变异的关系[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(4):359 - 362.

[3] Dumont AS, Dumont RJ, Chow MM, et al. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation[J]. Neurosurgery, 2003, 53(1):123 - 133.

[4] 岑 波,朱贤立. 经翼点入路显微手术治疗颅内前循环动脉瘤[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2005, 34(6):784 - 786.

[5] 康德智,兰 青,余良宏,等. 眶上与翼点"锁孔"入路显微手术治疗颅内动脉瘤的比较研究[J]. 中华显微外科杂志, 2006, 29(5):382 - 384.

[6] 于春泳,薛洪利. 应用锁孔技术显微手术切除前颅底巨大脑膜瘤[J]. 局解手术学杂志, 2009, 18(6):389 - 390.

[7] 于春泳,薛洪利,魏学忠. 锁孔手术急诊治疗破裂的后交通动脉瘤 65 例[J]. 中华显微外科杂志, 2009, 32(5):425 - 427.

[8] Leipzig TJ, Morgan J, Horner TG, et al. Analysis of intraoperative rupture in the surgical treatment of 1694 saccular aneurysms[J]. Neurosurgery, 2005, 56(3):455 - 468.

(编辑:余汇洋)