

基因调控

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000149

转录因子激活蛋白-1 在 Buerger's 病中的
表达与意义

李 涛, 郑文涛, 刘 佳, 吴田芳, 代远斌

(重庆医科大学附属第一医院血管外科, 重庆 400016)

【摘要】目的:观察转录因子激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)在 Buerger's 病患者腰交感神经元内的表达。**方法:**收集 2011 年 1 月至 2012 年 3 月行腰交感神经节切除术的 Buerger's 病男性患者腰交感神经节标本, Buerger's 病患者组:23 例, 对照组:12 例。应用免疫组化、RT-PCR、Western blot 技术测定对照组腰交感神经节神经元 AP-1 的表达水平并比较其表达差异。**结果:**Buerger's 病患者腰交感神经节神经元中 AP-1 的基因表达($P=0.0459$)、蛋白表达($P=0.0283$), 高于对照组。**结论:**AP-1 在调节 Buerger's 病细胞增殖和血管炎症反应中发挥着作用。

【关键词】Buerger's 病; 转录因子激活蛋白-1; 自身免疫; 炎症

【中图分类号】R654.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-06

Expression and significance of transcription factor activator protein-1
in Buerger's disease

Li Tao, Zheng Wentao, Liu Jia, Wu Tianfang, Dai Yuanbin

(Department of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate expression of transcription factor activator protein-1 (AP-1) in lumbar sympathetic ganglion neurons of patients with Buerger's disease. **Methods:** Specimens of lumbar sympathetic ganglion of male patients with Buerger's disease between January 2011 and March 2012 were collected and divided into two groups: Buerger's disease group ($n=23$) and normal control group ($n=12$). Immunohistochemistry, reverse transcription quantitative PCR and Western blot were used to detect and compare expression of AP-1 in lumbar sympathetic neurons of patients with and without Buerger's disease. **Results:** AP-1 gene ($P=0.0459$) and protein ($P=0.0283$) expression in lumbar sympathetic ganglion neurons of patients with thromboangiitis obliterans were higher than those of normal people. **Conclusions:** AP-1 plays a role in the regulation of cell proliferation and vascular inflammation response in Buerger's disease.

【Key words】 Buerger's disease; transcription factor activator protein-1; autoimmune; inflammation

血管闭塞性脉管炎称为 Buerger's 病。近年有研究发现炎症因子在 Buerger's 病中起到重要的作用, 说明炎症与 Buerger's 病有着密切的联系^[1]。越来越多证据表明, 转录因子激活蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 参与调节炎症因子在血管重构中的作用, 在细胞增殖和炎症反应中发挥重要作用^[2]。但是对 AP-1 在 Buerger's 病中的作用目前尚无文献报道, 因此对于 AP-1 的研究有重要意义。在本研究

中, 运用免疫组化、RT-PCR、Western blot 方法, 观察 Buerger's 病患者腰交感神经节神经元内 AP-1 的表达变化, 并探讨其发病机制和临床意义。

1 材料和方法

1.1 材料

经患者知情同意, 收集 23 例行腰交感神经节切除术的 Buerger's 病患者, 年龄 29~60 岁, 平均 38.5 岁, 经病史、体检及 64 排 CT 三维动脉血管成像或 DSA 动脉造影检查确诊。正常组: 对照组 12 例非正常死亡病人标本 (经患者家属同意), 排除 Buerger's 病及其他肿瘤、传染病等。年龄 43~81 岁,

作者介绍: 李 涛, Email: 1315989254@qq.com,

研究方向: 普外科血管外科。

通信作者: 代远斌, Email: daiyuanbin@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000149.html>

平均 67 岁。标本收集后,每例标本分成 2 份,1 份在术后立即置于液氮快速冷冻冻存,用于 PCR 和 Western blot 实验。另 1 份标本经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片后用于组织形态学实验研究。

1.2 免疫组化实验方法

采用链霉素抗生物素蛋白——过氧化物酶(SP)法。AP-1 小鼠抗人多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,生物素化山羊抗小鼠二抗购自北京中杉金桥公司。主要步骤:37 ℃二甲苯 30 min × 2 脱蜡后,依次梯度乙醇水化各 5 min;3% H₂O₂ 室温孵育 10 min,消除内源性过氧化物酶活性;抗原微波法热修复,采用 pH 6.0 的 0.01 mol/L 枸橼酸钠溶液,维持 95 ℃,10~12 min;正常动物血清封闭,室温 10 min;加抗 AP-1 抗体(1:100, Abcom),37 ℃湿盒孵育 2 h;生物素化二抗,室温 10 min;辣根酶标记链酶卵白素工作液,室温 10 min;DAB 显色 3~4 min;苏木精复染,中性树胶封片。AP-1 染色定位于腰交感神经元神经节细胞核内与胞浆中。并且除了交感神经元外,纤维细胞也有表达。阳性表达呈黄色颗粒。染色强度分为:0 级(完全阴性,与背景一致);1 级(弱阳性,淡黄色,高于背景);2 级(阳性,黄色,明显高于背景);3 级(强阳性,棕褐色)。观察切片 400 × 视野,可见细胞核者为有效计数细胞,不同细胞染色强度与细胞数的乘积,总和作为每高倍视野下染色分值。每例切片随机计数 10 个视野,最后取其均值,选择视野时注意避开非神经元组织(纤维结缔组织和血管、淋巴管断面)过多的视野。

1.3 RT-PCR 实验方法

分别取新鲜腰交感神经节 50~100 mg,Trizol 法抽提总 RNA,浓度仪测定样品纯度和含量,按逆转录试剂盒说明书提供的方法逆转录,逆转后的 cDNA 作为 PCR 的模板进行 PCR 扩增。引物序列分别为:AP-1,上游引物序列:ACTCGG-ACCTCCTCACCTCG,下游引物序列:GTTCTCATGCGCTT-CCTCT;内参 β -actin,上游引物序列:CGGGAAATCGTGCGT-GAC,下游引物序列:GATCTTCATTGTGCTGGGTG。PCR 循环条件为:94 ℃预变性 3 min,94 ℃变性 30 s,61 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,35 个循环后于 72 ℃延伸 5 min。PCR 反应产物的大小分别为 617 bp(AP-1)和 366 bp(β -actin),PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色。使用紫外光凝胶照像,经 Image J 软件进行灰度测定,实验重复 3 次。将 AP-1 的灰度值与 β -actin 灰度值的比值进行分析。

1.4 Western blot 实验方法

手术切除的组织块迅速置于预冷的 0.95% 生理盐水中,漂洗清洁表面血迹,称量后放入组织匀浆器中,按组织净重,裂解液=1:10 的比例,加入相应体积的裂解液进行匀浆,离心收集上清,以 1:1 浓度加入 Laemmli 样品缓冲液强力混匀,样品置 100 ℃的水浴箱水浴加热 3~5 min,10 000 g 离心 10 min,取上清液,将其转入另一洁净的试管中。采用 BCA 法(美国 Pierce 公司试剂盒)测定总蛋白浓度。总蛋白以每个泳道 30 μ g 加样进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完成后,采用

Bio-Rad 浸渍电转移系统将蛋白电转移至硝酸纤维素膜(Millipore, USA)。硝酸纤维素膜依次经过血清封闭、AP-1 一抗(小鼠抗人单克隆,1:1 000; Abcom, USA)孵育、洗膜、辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:5 000; 中杉金桥, 北京)孵育、洗膜。最后采用化学发光显色试剂显影并摄像。采用美国 Image Lab 凝胶成像分析软件进行图像扫描和分析,所有蛋白条带均用 β -肌动蛋白为内参进行校正。分别以疾病组和对照组的 AP-1 与相应 β -actin 条带灰度值的比值作为 AP-1 的相对表达水平。

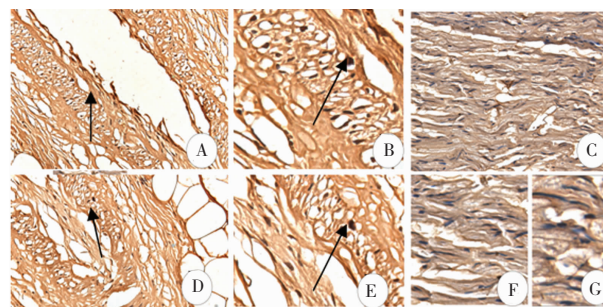
1.5 统计学分析

应用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析。各组数据均为正态分布,计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用两独立样本 t 检验进行组间比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 Buerger's 病腰交感神经组织和对照组 AP-1 蛋白水平

免疫组化检测发现对照组中,细胞质、胞浆中可见 AP-1 蛋白弱阳性表达。而在 23 例 Buerger's 病患者的腰交感神经标本中的 AP-1 主要表达于腰交感神经元神经节细胞核内与胞浆中。并且除了交感神经元外,纤维细胞也有表达。与对照组相比,按照染色强度记分:0 分为无染色,1 分为浅黄色,2 分为黄色,3 分为棕黄色(图 1)。细胞核或细胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性信号。



A、B、D、E 为 Buerger's 病手术标本;C、F、G 为对照组

→表示 AP-1 在图中的高表达

图 1 免疫组化检测 AP-1 在 Buerger's 病患者和对照腰交感神经元中的表达

Fig.1 Expressions of AP-1 in lumbar sympathetic ganglion neurons of patients with and without Buerger's disease detected by immunohistochemistry

2.2 Buerger's 病腰交感神经组织和对照组 AP-1 mRNA 转录水平

RT-PCR 结果显示,在腰交感神经元神经节 AP-1 及内参照 β -actin 的 PCR 反应产物的大小分别为 617、366 bp。Buerger's 病组中检测到 AP-1 的基因高表达。对照组的 AP-1 A 值为 $0.866 8 \pm 0.085 7$, Buerger's 病组的 AP-1 A 值为 $1.967 4 \pm 0.419 7$, 结果显示, Buerger's 病交感神经组织 AP-1 mRNA

NA 为高表达水平, 对照组为低表达水平 ($t=1.063, P=0.046$), 见图 2。

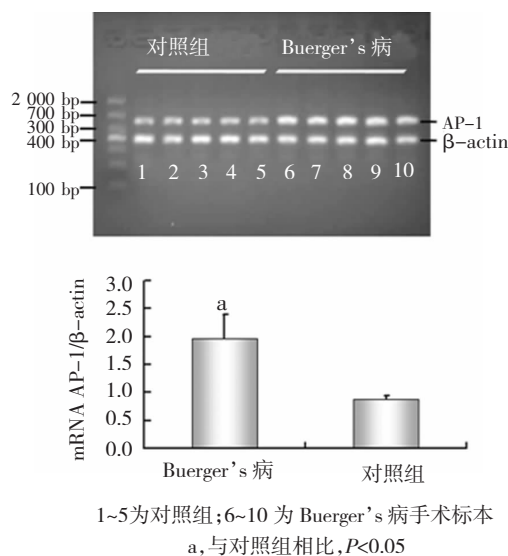


图2 Buerger's 病患者腰交感神经节组织和对照组中 AP-1 mRNA 表达

Fig.2 mRNA expression of AP-1 in lumbar sympathetic ganglion neurons of patients with and without Buerger's disease

2.3 Buerger's 病腰交感神经组织和对照组 AP-1 Western blot 水平

蛋白印迹图显示, AP-1 及内参照 β-actin 的 Western blot 反应产物的大小分别为 43、42 kD。对照组的 AP-1 灰度值为 $0.304 7 \pm 0.027 2$, Buerger's 病组的灰度值为 $1.095 7 \pm 0.149 5$, 结果显示, Buerger's 病交感神经组织 AP-1 蛋白为高表达水平, 对照组为低表达水平 ($t=2.777, P=0.028$), 见图 3。

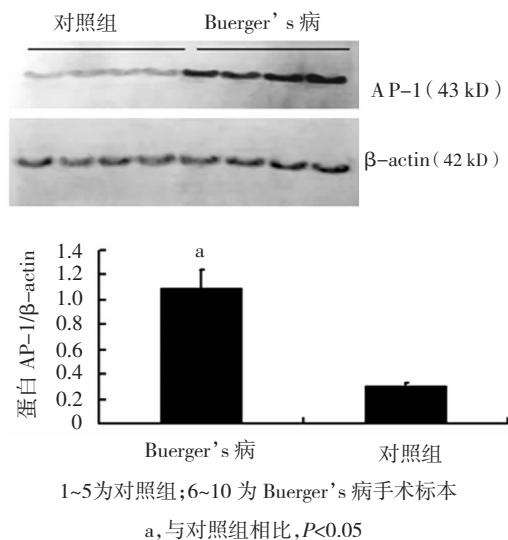


图3 Buerger's 病患者腰交感神经节组织和对照组中 AP-1 蛋白表达水平

Fig.3 Protein expression of AP-1 in lumbar sympathetic ganglion neurons of patients with and without Buerger's disease

3 讨论

Buerger's 病是一种罕见的非动脉粥样硬化、节段性、炎症性血管炎, 最常见是及小型和中型动脉、静脉甚至影响神经和四肢, 发病年龄在 25~45 岁之间^[3]。在 1 个世纪前 Buerger's 病就被第 1 次描述, 但至今病因仍不清楚, 大量的数据表明, 在细胞和分子水平上, 主要有 4 个炎症反应组成部分, 包括血管内皮细胞、血小板、白细胞和感觉神经元可能参与 Buerger's 的发病机制^[4]。它的特征是一种非特异性炎症细胞浸润的闭塞性血栓, 其主要由中性粒细胞、单核细胞和罕见的多核巨细胞组成。显示炎症免疫系统在 Buerger's 病的病因中扮演着重要的角色^[5]。

AP-1 由碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)蛋白组成, 是包括 Jun、Fos 或 ATF 结合到相同的 DNA 位点二聚体转录因子的统称。近年研究表明不同的 AP-1 因子可调节不同的靶基因, 从而执行不同的生物学功能^[6]。AP-1 蛋白在各种细胞调控过程包括细胞的增殖和存活、分化、生长、凋亡迁移和转化中起着重要的作用^[6]。近年来的研究已经认识到 AP-1 与自身免疫性疾病密切相关。自身免疫性疾病的发病机制之一可能为多种始发的诱因刺激下激活 AP-1, 而促使的 AP-1 调控多种细胞因子及炎症介质的释放, 产生级联效应, 介导了疾病的病情演变。最近研究提示, AP-1 家族成员包括 Fra-1 已被证明在炎性和增生性疾病中起到重要的作用, 通过对 AP-1 不同家族成员的过表达或敲除基因影响情况下, 发现这些成员可以促进炎症的发展^[7]。

本实验结果显示: 23 例 Buerger's 病患者, 12 例非对照组患者, 在免疫组化和 PCR 中, AP-1 在 Buerger's 病组明显高于对照组, 表明 AP-1 在 Buerger's 病中表达明显增加。Western blot 的结果进一步证实了在 Buerger's 病中 AP-1 的高表达。说明 AP-1 蛋白在 Buerger's 病具有显著的作用, 直接激活 IL-1β, IL-1β 直接作用于血管壁, 然后通过影响神经, 使神经递质分泌增加, 使血管收缩。

本研究通过临床标本的基因、蛋白、形态学表达分析发现, AP-1 在 Buerger's 病患者组腰交感神经节神经元内的表达远高于对照组。该研究结果说明 AP-1 在 Buerger's 病神经大量激活, 可能在参与或形成血栓过程中起着非常重要的作用。Buerger's

超声诊断与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000079

聚焦超声辐照兔眼角膜的生物效应研究

王娟¹, 杜之渝¹, 瞿贤桂¹, 晏丕松², 张珣²

(1. 重庆医科大学附属第二医院眼科中心, 重庆 400010; 2. 重庆明达眼科, 重庆 400010)

【摘要】目的:利用聚焦超声(focused ultrasound, FU)热效应对兔眼角膜进行辐照, 观察其生物效应的变化。**方法:**13 只新西兰兔(26 眼)根据辐照功率及辐照角膜直径的不同随机分为 A、B、C 组。设计 A 组辐照功率为 1 W, 辐照角膜直径为 9 mm; B 组辐照功率为 1.5 W, 辐照角膜直径为 9 mm; C 组辐照功率为 1 W, 辐照角膜直径为 7 mm。分别于术前及术后 3、10 d、1 月、2、3 月对术眼进行裂隙灯、自动验光仪、角膜地形图、内皮细胞计数仪及非接触眼压的检查及记录。**结果:**术后即刻 24 眼(92.3%)角膜辐照区上皮缺损, 术后 3 d 26 眼(100%)角膜上皮完整。角膜中央曲率于术后 1 月开始降低, 随观察时间延长呈逐渐降低趋势; 屈光度术后呈正向增加趋势, 向远视方向发展, 与角膜中央曲率变化趋势一致。非接触眼压术后 3、10 d 降低, 术后 1、2、3 月恢复到术前水平。角膜内皮细胞计数术前术后无明显变化。**结论:**辐照兔眼周边角膜引起角膜中央曲率降低。FU 应用于兔眼角膜安全性较高。

【关键词】聚焦超声; 兔; 角膜; 生物效应**【中图分类号】**R778.1¹**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-02-07

作者简介: 王娟, Email: 28825419@qq.com,

研究方向: 眼屈光。

基金项目: 重庆市卫生局重点课题(编号: 2010-1-25)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000079.html>

病患者免疫失调导致机体免疫细胞活化, 可以产生较多的白细胞介素-1 β 并激活固有免疫主要炎症信号因子髓样分化主反应 88(MyD88)的基因、白细胞介素 1 受体和蛋白激酶(IRAK)4 结合形成三聚体复合物。再通过 MyD88 下游信号泛素连接酶-6 从而激活 AP-1。并且许多 AP-1 的生物和生物抑制剂是通过抑制 AP-1 活化或抑制其与靶 DNA 结合的信号转导途径来发挥效应^[9]。有学者通过对 20 例 Buerger's 病患者的血浆进行调查发现细胞因子肿瘤坏死因子、IL-1 β 、IL-4、IL-17 和 IL-23 都明显增加^[10]。说明炎性细胞因子参与了 Buerger's 病的发病过程。

AP-1 在调节免疫性疾病 Buerger's 病细胞增殖和血管炎症反应中发挥着重要作用, 其可能成为治疗 Buerger's 病疾病的一个靶点, 但是这些作用机制仍然需要进一步深入研究和论证。

参 考 文 献

[1] Sandner TA, Degenhart C, Becker-Lienau J, et al. Therapy of peripheral vessel stenosis and occlusion in patients with thromboangiitis obliterans[J]. Radiologe, 2010, 50(10): 887-893.

[2] Karin M, Gallagher E. From JNK to pay dirt: jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance[J]. IUBMB Life, 2005, 57(4-5): 283-295.

[3] Dimmick SJ, Goh AC, Cauzza E, et al. Imaging appearances of Buerger's disease complications in the upper and lower limbs[J]. Clin Radiol, 2012, 67(12): 1207-1211.

[4] Fazeli B, Rezaee SA. A review on thromboangiitis obliterans pathophysiology: thrombosis and angiitis, which is to blame[J]. Vascular, 2011, 19(3): 141-153.

[5] Joviliano EE, Dellalibera-Joviliano R, Dalio M, et al. Etiopathogenesis, clinical diagnosis and treatment of thromboangiitis obliterans—current practices[J]. Int J Angiol, 2009, 18(3): 119-125.

[6] Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation[J]. Curr Opin Cell Biol, 1997, 9(2): 240-246.

[7] Vesely PW, Staber PB, Hoefler G, et al. Translational regulation mechanisms of AP-1 proteins[J]. Mutat Res, 2009, 682(1): 7-12.

[8] Rajasekaran S, Vaz M, Reddy S P. Fra-1/AP-1 transcription factor negatively regulates pulmonary fibrosis in vivo[J]. PLoS One, 2012, 7(7): e41611.

[9] 张亚敏, 刘立思. 激活蛋白-1 与变应性疾病的研究进展[J]. 医学研究生报, 2007, 20(2): 199-203.

[10] Dellalibera-Joviliano R, Joviliano EE, Silva J S, et al. Activation of cytokines corroborate with development of inflammation and autoimmunity in thromboangiitis obliterans patients[J]. Clin Exp Immunol, 2012, 170(1): 28-35.

(责任编辑: 冉明会)