

## 基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.2014.01.012

## 转录因子激活蛋白-2 在 Buerger's 病中的表达与意义

郑文涛, 李 涛, 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-2(transcription factor activator protein-2, AP-2)在 Buerger's 病中的表达与分布。**方法:**临床收集 2011 年 1 月至 2012 年 3 月共 23 例行腰交感神经节切除术 Buerger's 病患者腰交感神经节标本,应用 RT-PCR、Western blot 方法检测 AP-2 在 Buerger's 病组中基因和蛋白的表达变化,使用免疫组化的方法检测 AP-2 在 Buerger's 病组中的表达分布规律,以观察在该组中的表达特点。临床收集 12 例正常病例标本以同样方法处理。**结果:**RT-PCR 和 Western blot 结果显示,与正常对照组中相比,Buerger's 病组中 AP-2 基因和蛋白表达水平具有统计学差异( $P<0.05$ ),免疫组化显示病理组 AP-2 表达高于正常组,主要分布在细胞核。**结论:**Buerger's 病组中 AP-2 水平升高,表明 AP-2 在 Buerger's 病的发生与发展过程中可能发挥了重要作用。

**【关键词】**Buerger's 病;转录因子激活蛋白-2;炎症因子

**【中图分类号】**R654.4

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2013-04-23

## Expression and significance of transcription factor activator protein-2 in Buerger's disease

Zheng Wentao, Li Tao, Wu Tianfang, Dai Yuanbin

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

**【Abstract】Objective:** To investigate the expression and distribution of transcription factor activator protein-2 (AP-2) in Buerger's disease. **Methods:** Lumbar sympathetic ganglia were sampled in a total 23 patients with Buerger's disease between January 2011 and March 2012. Gene and protein expression of AP-2 in the lumbar sympathetic ganglia neurons was observed by RT-PCR and Western blot. Distribution principles of AP-2 in the lumbar sympathetic ganglia neurons were observed by immunohistochemical methods. Twelve normal lumbar sympathetic ganglia were processed by the same way. **Results:** RT-PCR and Western blot results demonstrated that AP-2 gene and protein expression levels in Buerger's disease tissues were significantly different from those in normal tissues ( $P<0.05$ ). Immunohistochemical result demonstrated that AP-2 expressions in Buerger's disease tissues were higher than those in normal tissues, mainly distributed in the nucleus. **Conclusions:** AP-2 level increases in patients with Buerger's disease, indicating that AP-2 plays an important role in the occurrence and development of Buerger's disease.

**【Key words】** Buerger's disease; transcription factor activator protein-2; inflammatory factor

Buerger's 病又称血栓闭塞性脉管炎,是一种累及血管的炎症性、闭塞性和周期性发作的慢性病变,其病因及发病机制尚不清楚。目前认为 Buerger's 病是一种遗传相关的自身免疫性疾病,炎症因子在 Buerger's 病的发生发展中占据了主导作用<sup>[1]</sup>,同时激素、血管活性物质、吸烟等因素与免疫因子相互关联,加速了该病的发生发展<sup>[2]</sup>。有研究显示,转录因子激活蛋白-2(transcription factor activator protein-2, AP-2)是一个可被炎症因子激活的转录因子家

族蛋白<sup>[3]</sup>,本课题组对 Buerger's 病患者腰交感神经节神经元中 AP-2 的形态学分布特点、基因和蛋白表达水平进行检测,希望得出 AP-2 在 Buerger's 病发病中的具体作用机制。

## 1 资料和方法

## 1.1 临床资料

经患者知情同意,收集 2011 年 1 月至 2012 年 3 月共 23 例腰交感神经节标本,患者年龄 28~59 岁,平均 38 岁,诊断标准为青壮年男性、吸烟史、特有的临床症状和体征计算机断层摄影血管造影或数字减影血管造影动脉造影确诊。正

作者介绍:郑文涛,Email:83337333@163.com,

研究方向:Buerger's 病方向。

通信作者:代远斌,Email:Daiyuanbin@163.com。

常组:12 例正常标本,排除 Buerger's 病及其他肿瘤、传染病等。年龄 42~89 岁,平均 48 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 RT-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 研究试剂与仪器

AP-2 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武汉博士德公司,普通 PCR 试剂盒、逆转录 PCR 试剂盒购自 TAKARA 公司,总 RNA 提取试剂 Trizol 购自 Invitrogen 公司,浓度测定仪购自 Thermo 公司,PCR 仪购自 Amersham Biosciences 公司,凝胶成像系统、Western blot 显影系统购自美国 Bio Rad 公司,光学显微摄影系统购自德国 Leica 公司。其余试剂均为进口分装或国产分析纯。

## 1.3 免疫组化染色

采用免疫组化 SP 染色法,石蜡切片,常规脱蜡和水化,3% $H_2O_2$  室温孵育 5~10 min,蒸馏水冲洗,PBS 浸泡,正常山羊血清封闭,室温 20 min,甩去多余液体,滴加 I 抗(抗 AP-2,1:100),4℃过夜,37℃复温 30 min,PBS 冲洗 3 次各 5 min,滴加 II 抗,37℃静置 30 min。PBS 洗 3 次各 5 min,然后 DAB 显色 5~10 min,在显微镜下掌握染色程度,PBS 冲洗 10 min;苏木精复染 2 min,盐酸酒精分化,自来水冲洗 10~15 min,最后脱水、透明、封片、镜检。阳性对照由试剂公司提供,用 PBS 代替 I 抗作为阴性对照。以细胞质和/或细胞核中出现明显的黄色或黄褐色颗粒视为免疫组化染色阳性。

## 1.4 RT-PCR 检测 AP-2 mRNA 的表达

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。引物设计:(1)AP-2 上游引物序列:5'-ACTA-CAGGCGGCACGAGGAC-3';下游引物序列:5'-GGAGATG-AGGTGAAAGTGGG-3';扩增长度:773 bp。(2) $\beta$ -actin 上游引物序列:5'-ACTGGCATCGTGATGGACT-3';下游引物序列:5'-GGAAGGAAGGCTGGAAGAG-3';扩增长度:355 bp。各引物均由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;94℃45 s,60℃45 s,72℃45 s,35 个循环;72℃延伸 10 min。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,采用 Image Lab 凝胶分析软件进行分析,分别以疾病组和对照组的 AP-2 与相应  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值作为 AP-2 基因的相对表达水平。

## 1.5 Western blot 免疫蛋白检测

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,称量后放入机械组织匀浆器中,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,Bradford 法测定蛋白浓度。取 60  $\mu$ g 蛋白进行 10%聚丙烯酰胺凝胶电

泳,半干式电转至硝酸纤维素膜,5%脱脂奶粉封闭 2 h。加入 I 抗(1:1 000),4℃孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的 II 抗(1:5 000),室温孵育 1.5 h。洗膜后,加入增强化学发光底物 ECL Plus 试剂,曝光于 X 线胶片上,常规显影、定影。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  $\beta$ -actin 为内参进行校正。分别以疾病组和对照组的 AP-2 与相应  $\beta$ -actin 条带灰度值的比值作为 AP-2 蛋白的相对表达水平。

## 1.6 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用独立样本间的  $t$  检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 Buerger's 病组和正常对照组 AP-2 mRNA 转录水平

应用 RT-PCR 技术,证实 AP-2 在 Buerger's 病组和正常对照组 mRNA 表达差异。图 1 显示,AP-2 条带位于 773 bp 左右, $\beta$ -actin 条带位于 355 bp 左右,与预期产物大小保持一致。结果显示,Buerger's 病组 AP-2 mRNA 为高表达水平( $2.524 0 \pm 0.198 2$ ),正常对照组为低表达水平( $0.679 2 \pm 0.123 1$ )。与正常对照组相比,Buerger's 病组中 AP-2 mRNA 表达水平明显升高,差异有统计学意义( $t=7.908, P=0.000$ )。

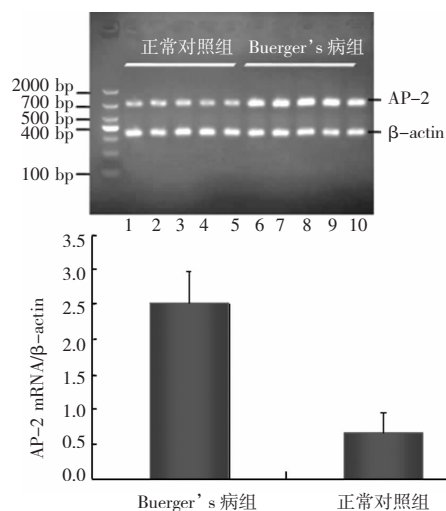


图 1 RT-PCR 检测基因 AP-2 mRNA 在 Buerger's 病组和正常对照组的表达

Fig.1 Expression of AP-2 mRNA in lumbar sympathetic nerve tissues of patients with Buerger's disease and normal tissues

## 2.2 Buerger's 病组和正常对照组 AP-2 蛋白水平

应用 Western blot 技术,证实 AP-2 在 Buerger's 病组和正常对照组中蛋白表达差异( $1.418 5 \pm 0.050 7$ )、( $0.413 \pm 0.047 1$ )。图 2 显示,AP-2 蛋白条带位于 48 kD 左右,与预期蛋白位点大小保持一致。结果显示,Buerger's 病组中 AP-2 蛋白为高表达水平( $1.418 5 \pm 0.050 7$ ),正常对照组为低表达水平

( $0.413 \pm 0.047$ ), 2 组差异有统计学意义( $t=14.522, P=0.000$ ), Western blot 结果与 RT-PCR 结果一致。

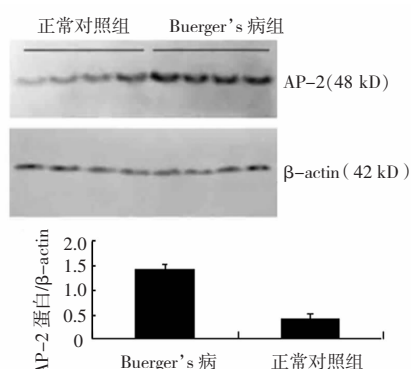
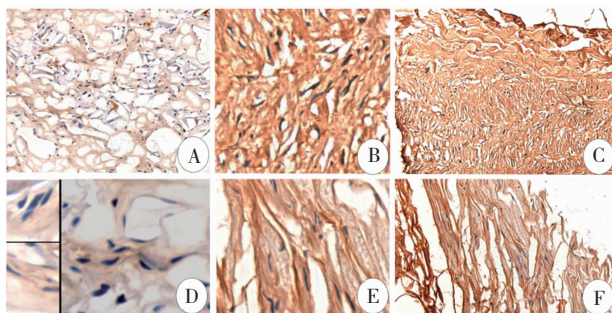


图2 Buerger's 病组和正常对照组 AP-2 蛋白表达水平

Fig.2 Expression of AP-2 protein in lumbar sympathetic nerve tissues of patients with Buerger's disease and normal tissues

### 2.3 Buerger's 病组和正常对照组 AP-2 蛋白的表达与分布

应用免疫组化法对 Buerger's 病组和正常对照组进行染色,发现正常对照组并未见明显的 AP-2 强烈高表达,呈现弱阳性表达(图 3A,D)。与之相反,Buerger's 病组中 AP-2 均阳性表达(图 3B、C、E、F),AP-2 主要分布于细胞核,表达阳性率为 100%。图为细胞核或细胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性信号。



A、D: 正常对照组; B、C、E、F: Buerger's 病组

图3 免疫组化检测 AP-2 在 Buerger's 病组和正常对照组中的表达 (×400)

Fig.3 Expression of AP-2 in lumbar sympathetic nerve tissues of patients with Buerger's disease and normal tissues by immunohistochemistry (400×)

## 3 讨论

Buerger's 病是一种累及血管的炎症性、闭塞性和周期性发作的慢性病变,其病因及发病机制尚不清楚。目前多数学者认为 Buerger's 病是一种遗传相关的自身免疫性疾病,各种免疫细胞,免疫相关蛋白及炎症因子在 Buerger's 病发生发展中占据了主导作用<sup>[4]</sup>。Kobayashi 等<sup>[5]</sup>和 Kurata 等<sup>[6]</sup>采用免疫组

化的方法对 Buerger's 病患者动脉血管壁的检测发现,Buerger's 病患者动脉血管壁急性期血管内膜 CD3(+) T 细胞浸润,而慢性期炎症消退,CD20(+)B 细胞增多。CD3(+)T 淋巴细胞和 CD20(+)B 淋巴细胞是细胞免疫和体液免疫的重要的参与者,在 Buerger's 病急性期和慢性期这两种细胞交替升高,推测免疫反应被激活。另有学者推测在人 CD68(+) 巨噬细胞和 S-100(+) 树突状细胞中,可能存在一种未知抗原,就是这些抗原促使免疫反应激活,内膜增生,血栓形成<sup>[7]</sup>。国内有学者使用透射电镜观察 9 例 Buerger's 病患者血管管壁,有 4 例在动脉中膜平滑肌细胞内或平滑肌细胞间见高电子致密度的免疫复合物沉积,阳性率达 44%,同时还在中膜和外膜见具有吞噬和清除免疫复合物功能的中性粒细胞和巨噬细胞<sup>[8]</sup>。尽管显著的证据表明炎症反应在 Buerger's 病的发病过程中起着非常重要的作用,但是确切的发病机制仍然无法较好的理解和认识<sup>[9]</sup>。

本课题组应用免疫组化法对 Buerger's 病组和正常对照组进行染色发现,Buerger's 病组中 AP-2 全部阳性表达(图 3B、C、E、F),表达阳性率为 100%。正常对照组并未见明显的 AP-2 强烈高表达,呈现弱阳性表达(图 3A、D)。AP-2 主要分布于细胞核,在基因启动子联合其他 Domain 参与基因表达,正常对照组中 AP-2 呈弱阳性表达,两者有明显的差异。通过进一步的基因和蛋白表达检测发现,与正常对照组织相比,Buerger's 病组表达量明显升高。这种差异可能与炎症因子对 AP-2 的激活作用有关,有研究表示,除了佛波酯和环腺苷酸可以诱导 AP-2 激活,炎症因子也具有相同的作用<sup>[3]</sup>。事实上,绝大多数促炎细胞因子,除肿瘤坏死因子 α 外,白介素、前列腺素 E2、前列环素 2 等均可以促进 AP-2 在系膜细胞核中的表达。此外,AP-2 作为一种激活蛋白,也可以协同 AP-1、核因子 κB(nuclear factor-κB, NF-κB)、干扰素调节因子 1 等激活如 IL-8、IL-1β、环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)等免疫因子基因,进而使 IL-8、IL-1β、COX-2 等炎症因子分泌增强<sup>[10-11]</sup>。而炎症因子又刺激 AP-2 使其调控转录作用加强,这种结果促使炎症因子分泌进一步增强,促进炎症细胞趋化与浸润,引起血管内皮功能受损,慢性炎症还可以导致组织损伤、血栓形成,各种过程交互作用,组成一个复杂的网络<sup>[12]</sup>。



本课题组的实验也对李德卫等<sup>[13]</sup>的实验结果进行了进一步的解释,他们对 Buerger's 病患者和正常人的腰交感神经节中酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)和多巴胺- $\beta$ -羟化酶(dopamine beta hydroxylase, DBH)进行过研究,作为儿茶酚氨类物质的限速酶,TH 和 DBH 在 Buerger's 病患者腰交感神经节中的表达强于正常人,并且随着病情严重程度的增高,TH 和 DBH 的表达逐渐增强。AP-2 和 TH、DBH 的表达表现为一致性,这种一致性可用 Kim 等<sup>[14]</sup>研究进行解释,AP-2 做为核转录因子在 TH 目的基因上游区域可通过与多个位点的结合来调节 TH 基因的表达,通过与单个位点的结合来调控 DBH 基因的表达,这种调控可使 TH 与 DBH 基因转录机会大大增强,最终使儿茶酚氨类递质分泌增多。以上可以推测 Buerger's 病最初由各种原因激活体内免疫反应,大量炎症细胞浸润血管、神经,分泌炎症因子,而炎症因子促使 AP-2 激活,AP-2 协同 AP-1、NF- $\kappa$ B 等物质共同作用,一方面促进炎症反应,另一方面则使 TH 和 DBH 分泌增加,从而使儿茶酚氨类递质表达增强,最终使周围血管长期痉挛,肢体缺血坏死。

Buerger's 病做为一种免疫性疾病其发病机制尚不清楚,其治疗手法多种多样,腰交感神经节切除术对早期患者具有明显的疗效,主要目的是控制儿茶酚氨类递质的释放,缓解外周血管痉挛从而减轻症状。AP-2 可能做为 TH 和 DBH 基因的调控因子,但与上游结合位点的作用机制尚不清楚。这种现象是否在炎症通路中起着正负调控开关的作用以及与 AP-1、NF- $\kappa$ B 等其他调控因子协同作用尚待进一步揭示。通过对 AP-2 的与 TH 与 DBH 基因结合位点进行进一步的深入研究,可能为 Buerger's 病的治疗提供新的治疗靶点。

## 参 考 文 献

- [1] Joras M, Poredos P, Fras Z. Endothelial dysfunction in Buerger's disease and its relation to markers of inflammation[J]. *Eur J Clin Invest*, 2006, 36(6): 376-382.
- [2] Olin JW. Thromboangiitis Obliterans (Buerger's Disease)[J]. *N Engl J Med*, 2000, 343(12): 864-849.
- [3] Suyama K, Kabuyama Y, Suzuki S, et al. Induction of transcription factor AP-2 by cytokines and prostaglandins in cultured mesangial cells[J]. *Am J Nephrol*, 2001, 21(4): 307-314.
- [4] Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(11): 1478-1493.
- [5] Kobayashi M, Ito M, Nakagawa A, et al. Immunohistochemical analysis of arterial wall cellular infiltration in Buerger's disease (endarteritis obliterans)[J]. *J Vasc Surg*, 1999, 29(3): 451-458.
- [6] Kurata A, Machinami R, Schulz A, et al. Different immunophenotypes in Buerger's disease[J]. *Pathol Int*, 2003, 53(9): 608-615.
- [7] Fazeli B, Rezaee SA. A review on thromboangiitis obliterans pathophysiology: thrombosis and angiitis, which is to blame?[J]. *Vascular*, 2011, 19(3): 141-153.
- [8] 崔新明, 陈越, 潘力, 等. 血栓闭塞性脉管炎血管中膜免疫复合物沉积的电镜观察[J]. *白求恩医科大学学报*, 2001, 27(4): 379-381.
- [9] Joras M, Poredos P, Fras Z. Endothelial dysfunction in Buerger's disease and its relation to markers of inflammation[J]. *Eur J Clin Invest*, 2006, 36(6): 376-382.
- [10] Leppänen T, Jalonen U, Kankaanranta H, et al. Inhibition of protein kinase C  $\beta$  II downregulates tristetraprolin expression in activated macrophages[J]. *Inflamm Res*, 2008, 57(5): 230-240.
- [11] Wang P, Wu P, Siegel MI, et al. Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(16): 9558-9563.
- [12] Aksu K, Donmez A, Keser G. Inflammation-induced thrombosis: mechanisms, disease associations and management[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(11): 1478-1493.
- [13] 李德卫, 赵渝, 时德, 等. 下肢 Buerger 病患者腰交感神经节神经元 TH 和 DBH 的表达[J]. *第四军医大学学报*, 2005, 26(18): 1705-1707.
- [14] Kim HS, Hong SJ, LeDoux MS, et al. Regulation of the tyrosine hydroxylase and dopamine beta-hydroxylase genes by the transcription factor AP-2[J]. *J Neurochem*, 2001, 76(1): 280-294.

(责任编辑:关蕴良)