

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.002

Fas 死亡结构域相关蛋白对颈动脉成形术后大鼠血管狭窄和平滑肌细胞增殖的影响

陈洁¹, 吴飞², 熊国祚¹, 戴先鹏¹, 申昕¹, 邓礼明¹, 毕国善¹

(南华大学 1. 附属第二医院血管外科; 2. 护理学院, 湖南 衡阳 421001)

[摘要] 目的: 探讨大鼠颈动脉成形术后, 死亡域相关蛋白(death domain-associated protein, DAXX)对损伤后血管狭窄和平滑肌细胞增殖的影响及其机制。方法: 将32只SD大鼠随机分为4组: 假手术组、手术组、空转染组、转染组。所有动物暴露颈动脉, 假手术组仅游离颈总动脉, 手术组采用球囊扩张损伤大鼠左颈总动脉, 空转染组及转染组在此基础上局部运用脂质体转染DAXX空质粒或DAXX质粒, 于术后7, 14 d分别取各组大鼠左颈总动脉行HE染色, 观察并测量内膜、中膜的面积比; 免疫组织化学和PCR检测平滑肌中DAXX及氨基末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)的表达。结果: 术后7, 14 d手术组均出现血管管腔狭窄, 管壁增厚, 血管平滑肌细胞增殖明显($P < 0.01$); 转染组管腔狭窄程度、平滑肌细胞数、血管内膜/中膜面积比值中较手术组明显降低($P < 0.01$)。手术组平滑肌细胞中DAXX及JNK的蛋白及mRNA表达较假手术组均有所增多($P < 0.01$), 而转染组DAXX, JNK的表达上调程度更为显著($P < 0.01$)。结论: DAXX局部高表达能有效抑制球囊扩张术后大鼠颈动脉平滑肌细胞增殖, 减轻血管狭窄, 其作用机制可能与DAXX-JNK通路相关。

[关键词] 死亡域相关蛋白; 氨基末端激酶; 平滑肌细胞; 增殖; 血管狭窄

Effects of death domain-associated protein on vascular stenosis and smooth muscle cells proliferation in rats after carotid angioplasty

CHEN Jie¹, WU Fei², XIONG Guozuo¹, DAI Xianpeng¹, SHEN Xin¹, DENG Liming¹, BI Guoshan¹

(1. Department of Vascular Surgery, Second Hospital; 2. School of Nursing, University of South China, Hengyang Hunan 421001, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects and the mechanism of death domain-associated protein (DAXX) on vascular stenosis and smooth muscle cells proliferation in the balloon-injured rat carotid artery. **Methods:** Thirty-two male SD rats were divided into 4 groups: a sham-surgery group, a surgery group, a blank-transfected group, and a transfected group. The gross artery in the sham-surgery group were free, in the surgery group the carotid artery were injured by using balloon, based on the above the blank-transfected group and the transfected group

收稿日期 (Date of reception): 2018-01-27

通信作者 (Corresponding author): 熊国祚, Email: xionguozuo@aliyun.com

基金项目 (Foundation item): 湖南省自然科学基金 (2011JJ2117)。This work was supported by the Hunan Provincial Natural Science Foundation, China (2011JJ2117).

was transfected DAXX plasmid or DAXX blank plasmid by using topical liposome. Every rat's carotid artery was exposed. We collected carotid artery segments of each groups at 7 and 14 days. HE was used to assess the degree of vascular stenosis. Immunohistochemistry and PCR were performed to detect the expression of DAXX and Jun N-terminal kinase (JNK). **Results:** In the surgery group, smooth muscle cells significantly increased, vessels wall thickened, luminal narrow at 7 days and 14 days. While in the transfected groups luminal were relatively smoother, smooth muscle cells were less, the intimal/medial area ratio were lower when compared with the surgery group ($P < 0.01$). The expression levels of mRNA, protein of DAXX and JNK in the surgery group were higher than those in the sham-surgery group and less than those in the transfected group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Topical high expression of DAXX may inhibit the proliferation of smooth muscle cells in mice carotid after the balloon-injured surgery and reduce the vascular stenosis, the mechanism may be related with JNK signaling pathway.

Keywords death domain-associated protein; Jun N-terminal kinase; smooth muscle cell; proliferation; vascular stenosis

腔内球囊扩张手术现已作为治疗外周血管疾病的重要手段, 然而术后血管腔狭窄常常无法避免, 这也成为评价疾病预后的关键难点及重点; 但是血管成形术后狭窄的发病机制存在争议, 大部分学者^[1]认为血管内皮细胞的完整性遭到破坏会导致新生血管内膜增生、平滑肌细胞异常增殖与迁移等, 而后者在血管成形术后血管狭窄的形成中起重要作用。Fas死亡域相关蛋白(death domain-associated protein, DAXX)是细胞核内的一种新型转录调控蛋白, 在细胞周期中DAXX介导的凋亡信号途径具有促进细胞凋亡、抑制细胞生长及增殖的作用^[2]。但是DAXX能否在平滑肌细胞中表达尚不清楚, 其作用机制更是鲜有文献报道。本研究旨在通过建立大鼠左颈总动脉球囊扩张的血管损伤模型, 局部转染DAXX质粒, 探讨DAXX表达上调在减轻血管狭窄、抑制平滑肌细胞增殖方面的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

32只300~400 g SD雄性大鼠购自南华大学动物实验中心; pCDNA3.1(+)-DAXX质粒由南华大学附二医院实验中心提供; lipofectamine-2000购自美国Invitrogen公司; RNA提取试剂盒购自上海生工生物技术有限公司; RNA反转录试剂盒购自日本东洋纺公司; SP-0023HistostainTM-Plus试剂盒、DAB染色试剂盒及Rabbit Anti-Tubulin- α 购自北京博奥森生物有限公司; SABC试剂盒购自博士德生物工程公司; 山羊血清购自中国Solarbio公司; DAXX(25C12) Rabbit mAb购自美国Cell Signaling公司, 于-20 °C液氮中保存; Anti-phospho-JNK购自美国Millipore公司。

1.2 方法

1.2.1 pCDNA3.1(+)-DAXX 质粒转染

将pCDNA3.1(+)-DAXX 160 μ L加入500 μ L无血清培养基稀释, 加入lipofectamine-2000 20 μ L, 混匀, 常温孵育20 min; 置入4 °C冰箱保存。

1.2.2 大鼠颈动脉狭窄模型的建立及分组

实验大鼠完全随机分为假手术组、手术组、空转染组、转染组, 每组8只。大鼠每300 g注射10%水合氯醛1 mL腹腔麻醉, 在相对无菌操作下取颈部正中切口约5 cm, 分离组织, 暴露左侧颈动脉。假手术组仅打开切口后再缝合, 不以任何其他处理。其余3组均先用动脉夹分别夹住颈总及颈内动脉, 切开颈外动脉, 然后从颈外动脉插入1.5F球囊于颈总动脉, 0.2 mL蒸馏水充盈球囊扩张颈总动脉3次, 每次30 s, 此过程总共2 min, 作为损伤后大鼠血管狭窄的模型即手术组。转染组及空转染组则是在手术组的基础上继续往管腔损伤处注入50 μ L pCDNA3.1(+)-DAXX质粒或空转染质粒。

1.2.3 HE 染色检测血管内膜增厚情况

取血管标本置于10%甲醛溶液中固定, 酒精脱水, 浸蜡, 包埋, 切片: 将切片放入二甲苯中脱蜡, 放入酒精脱水, 苏木精染色后自来水冲洗, 再次脱水, 伊红染色, 透明, 最后树脂封片, 显微镜下观察。

1.2.4 免疫组织化学(链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物技术, SABC) 检测平滑肌细胞中DAXX 及 JNK 蛋白的表达

石蜡切片于3% H₂O₂孵育15 min, 0.125%胰酶孵育10 min, 水冲洗, 加山羊血清封闭液1滴, 孵育10 min, 不洗, 室温孵育10 min, 然后加一抗兔抗鼠DAXX抗体或兔抗鼠JNK抗体, 放入4 °C湿盒

中过夜, PBS冲洗, 加二抗(羊抗兔IgG), 室温孵育10~15 min, PBS冲洗, 加SABC试剂1滴, DAB显色, 苏木精复染。阴性对照组: PBS代替一抗。

1.2.5 RT-PCR 检测血管中 DAXX 及 JNK mRNA 的表达

提取总RNA, 反转录为cDNA, PCR扩增, 从PubMed检索获取DAXX(Homo/Mus)/JNK(Mus) DAXX(Homo/Mus)引物: 上游5'-TG GCGTCTATGTGGCAGAGATC-3'; 下游5'-TGGCGTCTATGTGGCAGAGATC-3'(829 bp)。JNK(Mus)引物: 上游5'-ACAATCA-GCAGGAGTAAGAG-3'; 下游5'-CCAAGAGGC-GTAACAGTC-3'(317 bp)。

使用25 μ L PCR反应体系, 混匀, 低速离心, 90 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 58 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸55 s, 进行32个循环, 最后72 $^{\circ}$ C总延伸2 min; 各组取5 μ L产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳(120 V, 30 min), 用全自动凝胶分析系统进行灰度扫描分析并保存结果。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0软件进行分析。每组样本数为4, 数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。使用Image-Pro Plus 6.0图像处理软件测量各组动脉内膜、中膜的面积, 并计算两者的比值(IA/MA); Image-Pro Plus 6.0软件对术后各组血管平滑肌细胞中DAXX及JNK免疫组织化学进行半计量; AlphascreenTM2200软件测量大鼠颈总

动脉术后血管中DAXX及JNK mRNA的表达。

2 结果

2.1 各组不同时间段大鼠左颈总动脉的 HE 染色结果

术后7, 14 d分别取各组大鼠血管标本切片行HE染色, 显微镜下观察发现: 假手术组血管厚度均一, 管腔无狭窄, 内膜光滑, 平滑肌细胞不多, 而手术组、空转染组、转染组均出现不同程度的颈动脉管腔狭窄, 新生内膜增生, 平滑肌细胞数明显增多且排列紊乱; 与术后7 d各组相比, 术后14 d手术组管腔狭窄更显著, 内膜增殖明显, 大量平滑肌细胞; 与手术组比较, 转染组7, 14 d血管狭窄程度及平滑肌细胞数量均明显减轻(图1, 2)。

2.2 免疫组织化学检测各组血管中 DAXX 及 JNK 蛋白的表达

免疫组织化学示术后7, 14 d, 空转染组与手术组血管平滑肌细胞中DAXX及JNK的蛋白表达差异均无统计学意义($P>0.1$)。而与假手术组相比, 手术组DAXX及JNK蛋白表达量均明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 但与手术组相比, 转染组中DAXX蛋白及JNK蛋白增加更为明显, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与术后7 d相比, 术后14 d各组DAXX蛋白表达降低。且组织切片中JNK变化趋势类似, 当DAXX增加或减少时, JNK的蛋白表达亦出现相应的增减, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 图3~6)。

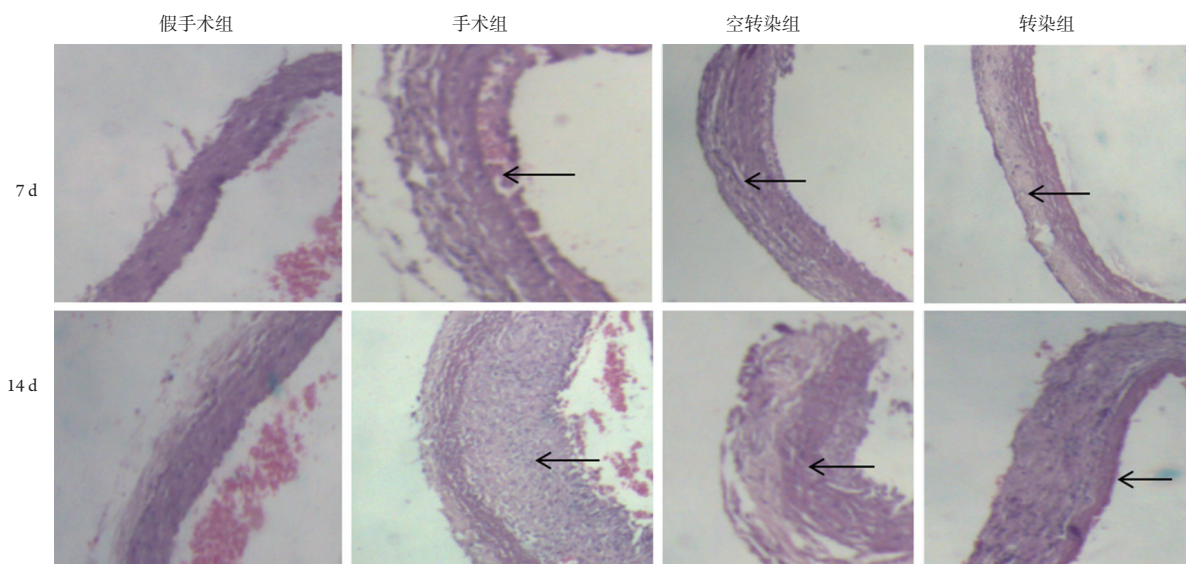


图1 手术后7, 14 d各组的大鼠颈总动脉病理切片(HE, $\times 100$)

Figure 1 Pathological section of rat's carotid artery in each group at 7 and 14 days (HE, $\times 100$)

2.3 RT-PCR 检测 血管中 DAXX mRNA 和 JNK mRNA 的表达

术后7 d手术组和空转染组中DAXX mRNA和JNK mRNA表达差异无统计学意义($P>0.1$)。与假

手术组相比,手术组中DAXX mRNA和JNK mRNA表达均明显上升,差异有统计学意义($P<0.01$);转染组DAXX mRNA和JNK mRNA表达均较手术组显著升高($P<0.05$;图7,8)。

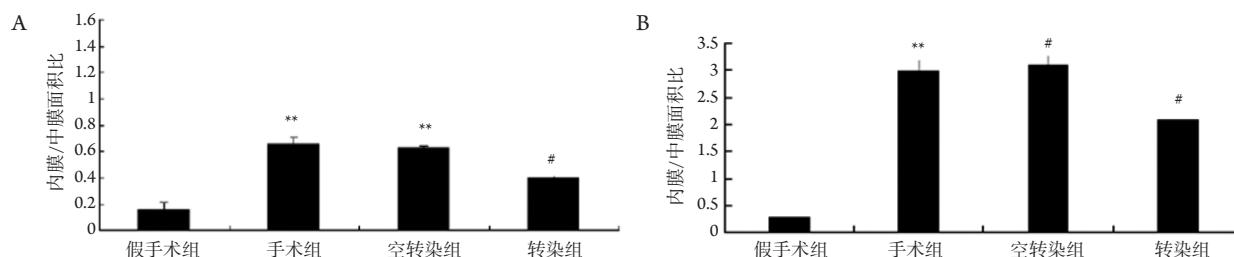


图2 术后7, 14 d 各组血管内膜 / 中膜的面积比值比较

Figure 2 Comparison of intimal/medial area ratio at 7 and 14 days postoperation among the 4 groups

(A) 术后7 d; (B) 术后14 d。与假手术组相比, $**P<0.01$; 与手术组相比, $*P<0.05$ 。

(A) 7 days postoperation; (B) 14 days postoperation. Compared with the sham-surgery group, $**P<0.01$; compared with the surgery group, $*P<0.05$.

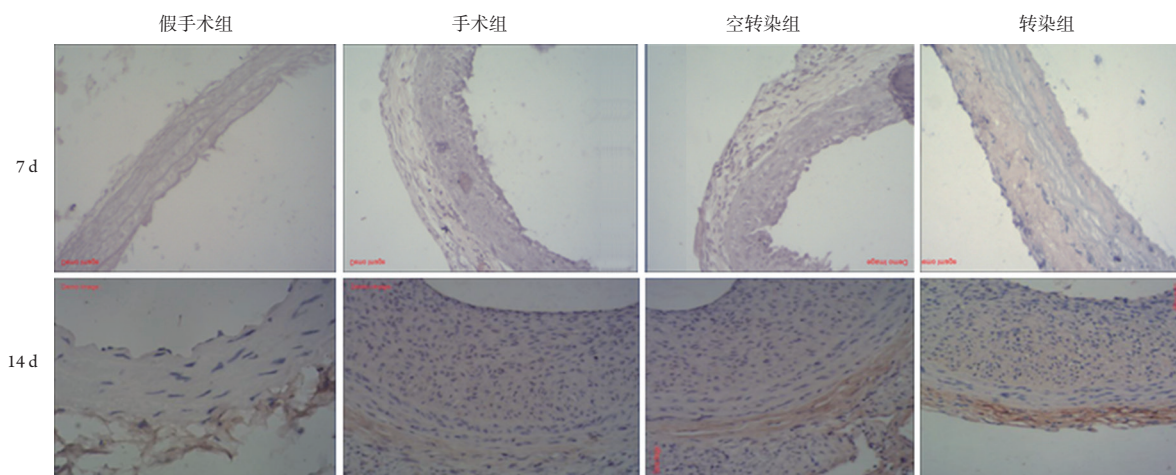


图3 大鼠颈总动脉术后7, 14 d DAXX的免疫组织化学染色结果(SABC, $\times 400$)

Figure 3 Immunohistochemistry of DAXX in rat's carotid artery at 7 and 14 days (SABC, $\times 400$)

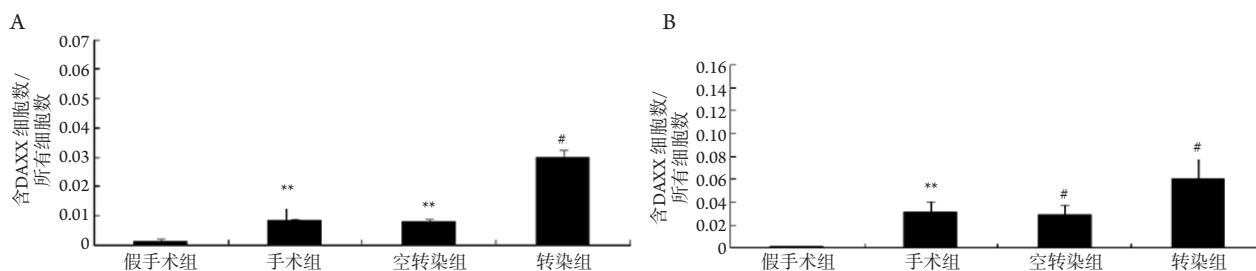


图4 术后7, 14 d 各组血管平滑肌细胞中含DAXX细胞数/所有细胞数比值

Figure 4 Ratio of the DAXX cells/smooth muscle cells in each group at 7 and 14 days

(A) 术后7 d; (B) 术后14 d。与假手术组相比, $**P<0.01$; 与手术组相比, $*P<0.05$ 。

(A) 7 days postoperation; (B) 14 days postoperation. Compared with the sham-surgery group, $**P<0.01$; compared with the surgery group, $*P<0.05$.

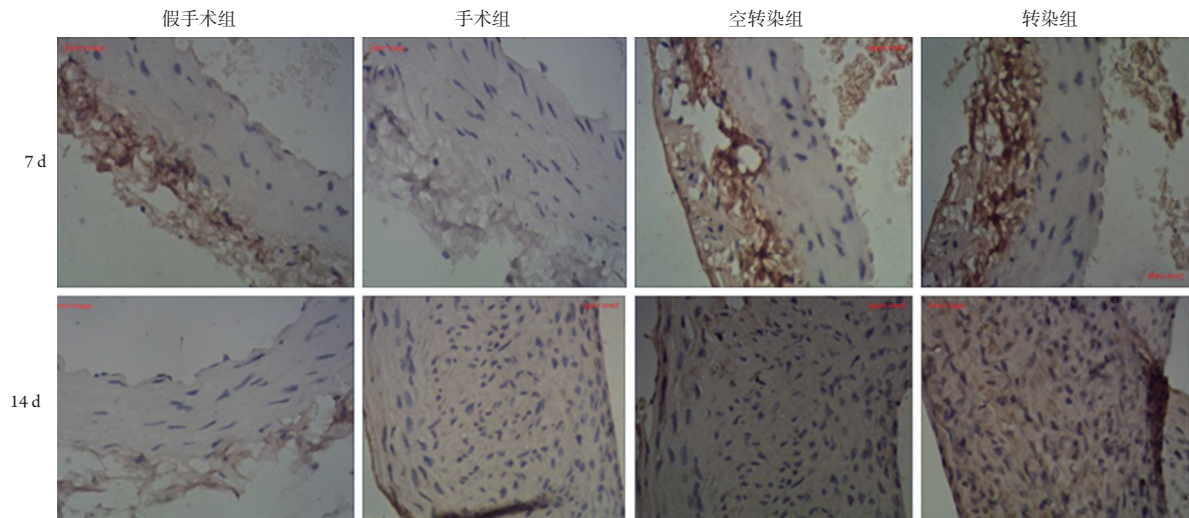


图5 大鼠颈总动脉术后7, 14 d JNK的免疫组织化学染色结果(SABC, × 400)

Figure 5 Immunohistochemistry of JNK in rat's carotid artery at 7 and 14 days postoperation (SABC, × 400)

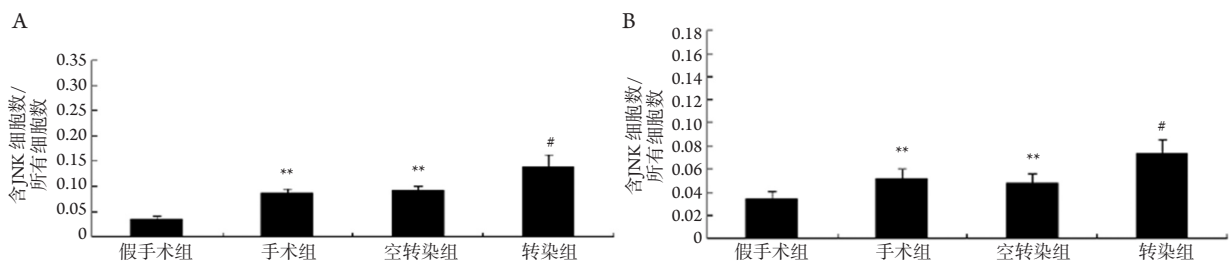


图6 术后7, 14 d各组血管平滑肌细胞中含JNK细胞数/所有细胞数比值

Figure 6 Ratio of the JNK cells/smooth muscle cells in each group at 7 and 14 days

(A) 术后7 d; (B) 术后14 d。与假手术组相比, ** $P < 0.01$; 与手术组相比, # $P < 0.05$ 。

(A) 7 days postoperation; (B) 14 days postoperation. Compared with the sham-surgery group, ** $P < 0.01$; compared with the surgery group, # $P < 0.05$.

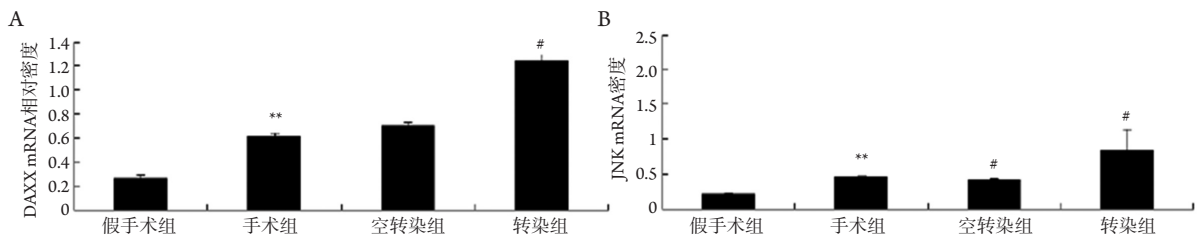


图7 术后7 d各组血管平滑肌中DAXX mRNA, JNK mRNA的相对密度比较

Figure 7 Relative density of DAXX mRNA and JNK mRNA in smooth muscle cells in each groups at 7 days

(A) 术后7 d DAXX mRNA的表达; (B) 术后7 d JNK mRNA的表达。与假手术组相比, ** $P < 0.01$; 与手术组相比, # $P < 0.05$ 。

(A) Expression of DAXX mRNA in each group at 7 days; (B) Expression of JNK mRNA in each group at 7 days. Compared with the sham-surgery group, ** $P < 0.01$; compared with the surgery group, # $P < 0.05$.

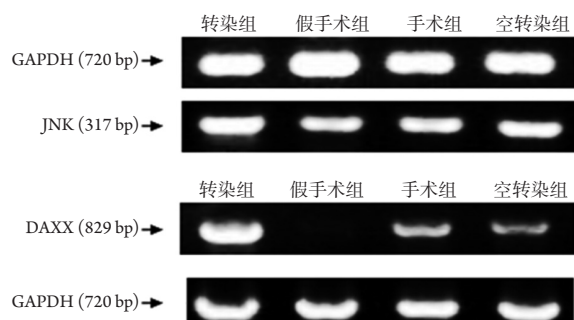


图8 各组大鼠颈动脉DAXX mRNA和JNK mRNA的表达水平
Figure 8 Expression of DAXX mRNA and JNK mRNA in each groups

3 讨论

内皮细胞受损促进血管平滑肌细胞异常增殖、迁移及细胞外基质的分泌, 这些导致血管成形术后血管狭窄, 这一系列变化又将进一步导致血管内膜异常增生; 其中, 平滑肌细胞的增殖及迁移是导致病变的重要环节。因此, 延缓术后血管狭窄可以从抑制平滑肌增殖方面着手。

DAXX广泛分布于哺乳动物的正常细胞以及肿瘤细胞中^[3-5], 在细胞的凋亡、转录、生长等领域起重要作用^[6]。受到刺激后, DAXX可以通过上调JNK的表达, 诱发启动细胞凋亡程序, 从而抑制细胞生长增殖^[7]。实验结果^[8-9]显示: DAXX在动脉粥样硬化斑块中的平滑肌细胞中表达, 且体外环境下高表达的DAXX可有效上调斑块中平滑肌细胞凋亡水平, 减少增殖。但是DAXX在体内血管平滑肌细胞中是否能表达、有何作用鲜见报道。

本研究显示球囊损伤会导致血管腔狭窄、内膜增厚、平滑肌细胞增殖, 且随时间推移血管内膜增生严重、狭窄程度愈加明显; 而转染组能够有效减轻术后血管狭窄, 抑制平滑肌增殖。免疫组织化学示各组平滑肌细胞中均检测到DAXX蛋白, 说明DAXX能够在大鼠球囊损伤后的颈动脉平滑肌细胞中表达, 并具有减轻术后血管狭窄的作用。比较手术组与假手术组的免疫组织化学及PCR结果, 发现球囊损伤术后DAXX表达轻微上升, 随后却逐渐减少, 分析原因可能是随时间延长, 血管中短暂活化的DAXX可忽略不计; 但转染组中血管局部持续高表达的DAXX抑制平滑肌细胞的增殖效果远远大于球囊损伤, 进而减轻血管狭窄。手术组DAXX的表达均较假手术组明显增加, 即球囊损伤促进大鼠颈动脉平滑肌细胞中DAXX蛋白和mRNA表达水平上调; 最后将手术组与转染组比较发现: 术后7, 14 d转染组较手术组DAXX蛋白和

mRNA的表达均明显增加。各组、各个时间段手术组与空转染组的两两比较差异均无统计学意义, 提示脂质体本身作为载体其实无任何促进DAXX蛋白及mRNA表达的作用。本研究证实脂质体可成功在损伤部位局部转染DAXX质粒, 大鼠颈动脉球囊损伤可诱导平滑肌细胞中DAXX的表达上调。转染组较手术组血管平滑肌层中DAXX蛋白及mRNA表达水平大幅度升高, 说明球囊损伤能促进大鼠颈动脉新生内膜增生、血管狭窄, 亦能提高平滑肌细胞中DAXX的蛋白表达水平, 上调其转录水平, 增加DAXX mRNA, 而局部高表达的DAXX能抑制腔内成形术后平滑肌细胞的异常增殖, 延缓血管狭窄进程。

Yoshikane等^[10]发现小鼠感染白假丝酵母菌后, 小鼠腹主动脉出现扩张, 而扩张的动脉平滑肌细胞中检测到JNK蛋白。JNK信号通路的作用目前尚不明了, 但有实验^[11]表明在正常细胞中, 压力刺激或应激作用能诱导JNK表达上调, 从而启动细胞凋亡级联反应, 抑制细胞增殖。Wu等^[12]对170只因大脑中动脉闭塞导致大脑缺血再灌注损伤的SD大鼠进行研究, 发现大鼠脑组织中ASK1-JNK/p38起促进细胞凋亡、抑制增殖的作用。血管平滑肌细胞中JNK还对脑动脉瘤的产生、发展有一定作用^[13]。另外研究^[14]表明: P38/JNK通过抑制血管平滑肌细胞增殖而延缓大鼠肾静脉移植术后管腔狭窄。本研究在上述各组血管组织的切片中检测到JNK蛋白和基因的表达, 说明JNK蛋白及mRNA表达与DAXX的变化趋势一致, 即当DAXX上升时, JNK蛋白和基因水平均上升, 提示DAXX抑制大鼠颈动脉球囊损伤后的平滑肌细胞增殖的机制可能是通过活化JNK, 激活其下游的信号通路, 从而改善术后血管狭窄问题。

综上所述, 本实验基于大鼠颈动脉成形术后局部转染DAXX, 抑制了血管平滑肌细胞增殖, 减轻了血管狭窄, 其作用机制可能与上调JNK有关, 这可能为防治介入术后狭窄提供新的途径。

参考文献

1. Lee YU, Luo J, Sprague E, et al. Comparison of artery organ culture and co-culture models for studying endothelial cell migration and its effect on smooth muscle cell proliferation and migration[J]. *Ann Biomed Eng*, 2010, 38(3): 801-812.
2. Chaudhary P, Sharma R, Sharma A, et al. Mechanisms of 4-hydroxy-2-nonenal induced pro- and anti-apoptotic signaling[J]. *Biochem*, 2010,

- 49(29): 6263-6275.
3. Tsai K, Chan L, Gibeault R, et al. Viral reprogramming of the Daxx histone H3.3 chaperone during early Epstein-Barr virus infection[J]. *J Virol*, 2014, 88(24): 14350-14363.
 4. Corpet A, Olbrich T, Gwerder M, et al. Dynamics of histone H3.3 deposition in proliferating and senescent cells reveals a DAXX-dependent targeting to PML-NBs important for pericentromeric heterochromatin organization[J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(2): 249-267.
 5. Kumar N, Wethkamp N, Waters LC, et al. Tumor suppressor protein Pdc4d interacts with Daxx and modulates the stability of Daxx and the Hipk2-dependent phosphorylation of p53 at serine 46[J]. *Oncogenesis*, 2013, 2: e37.
 6. Tang SY, Wan YP, Wu YM. Death domain associated protein (Daxx), a multi-functional protein[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2015, 20(5): 788-797.
 7. Khelifi AF, D'Alcontres MS, Salomoni P. Daxx is required for stress-induced cell death and JNK activation[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(7): 724-733.
 8. 庹勤慧, 刘锦红, 李天平, 等. Daxx对Chol: M β CD诱导血管平滑肌细胞凋亡的作用与机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21(9): I0029.
TUO Qinhui, LIU Jinhong, LI Tianping, et al. Effect and mechanism of DAXX on apoptosis of smooth muscle cells induced by cholesterol: model of β -cyclodextrin[J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2013, 21(9): I0029.
 9. Xiong G, Li L, Sun S, et al. Subcellular localization of DAXX influence ox-LDL induced apoptosis in macrophages[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(11): 7183-7190.
 10. Yoshikane Y, Koga M, Imanaka-Yoshida K, et al. JNK is critical for the development of *Candida albicans*-induced vascular lesions in a mouse model of Kawasaki disease[J]. *Cardiovasc Pathol*, 2015, 24(1): 33-40.
 11. 刘红岗, 赖远阳, 朱以芳, 等. JNK/FOXO3 信号通路介导黄连素促人肺腺癌PC-9 细胞凋亡的研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2017, 44(17): 846-850.
LIU Honggang, LAI Yuanyang, ZHU Yifang, et al. Berberine exerts pro-apoptotic effects on PC-9 cells via activation of JNK/FOXO3 signaling[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2017, 44(17): 846-850.
 12. Wu X, Li L, Zhang L, et al. Inhibition of thioredoxin-1 with siRNA exacerbates apoptosis by activating the ASK1-JNK/p38 pathway in brain of a stroke model rats[J]. *Brain Res*, 2015, 1599: 20-31.
 13. Guo D, Wang YW, Ma J, et al. Study on the role of Cathepsin B and JNK signaling pathway in the development of cerebral aneurysm[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(5): 499-502.
 14. Zheng H, Xue S, Lian F, et al. A novel promising therapy for vein graft restenosis: overexpressed Nogo-B induces vascular smooth muscle cell apoptosis by activation of the JNK/p38 MAPK signaling pathway[J]. *Med Hypotheses*, 2011, 77(2): 278-281.

本文引用: 陈洁, 吴飞, 熊国祚, 戴先鹏, 申昕, 邓礼明, 毕国善. Fas死亡结构域相关蛋白对颈动脉成形术后大鼠血管狭窄和平滑肌细胞增殖的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(6): 1146-1152. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.002

Cite this article as: CHEN Jie, WU Fei, XIONG Guozuo, DAI Xianpeng, SHEN Xin, DENG Liming, BI Guoshan. Effects of death domain-associated protein on vascular stenosis and smooth muscle cells proliferation in rats after carotid angioplasty[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(6): 1146-1152. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.06.002