

• 基础研究 •

急性肺栓塞后富半胱氨酸蛋白1的表达变化及其机制研究

李圣青 李树钧 刘阿茹 赵峰 简文 遆新宇 欧阳海峰

【摘要】 目的 研究大鼠急性肺栓塞模型肺组织中富半胱氨酸蛋白1(CRP1)的表达变化以及内皮素-1(ET-1)和血小板源性生长因子(PDGF)对肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)中 CRP1 表达的影响。方法 建立大鼠急性肺栓塞模型,分别在急性肺栓塞后 1,8,24,48h 开胸取出肺组织。常规提取肺组织的总 RNA 和总蛋白,以正常组为对照,采取半定量 RT-PCR 和 Western blot 方法研究 CRP1 在 mRNA 水平和蛋白水平的表达变化;采用免疫组织化学的方法检测大鼠肺组织中 CRP1 在肺栓塞前后表达的变化及其组织分布情况。分离培养 PASMCs,在培养液中分别加入 $1\mu\text{mol/L}$ ET-1 和 $10\mu\text{g/L}$ PDGF,分别采用半定量 RT-PCR、Western blot 和免疫荧光染色的方法研究不同时间点 CRP1 在 PASMCs 中的表达。采用 Western blot 方法研究 SRF-CRP1-GATA6 转录蛋白复合体中 SRF 和 GATA6 蛋白在不同时间点的表达。结果 在大鼠急性肺栓塞后的不同时间点,CRP1 的 mRNA 水平和蛋白水平均逐渐升高,免疫组化研究表明 CRP1 主要分布在 PASMCs,在急性肺栓塞后表达显著升高。PASMCs 在 ET-1 和 PDGF 的作用下 CRP1 的表达随着时间的延长均显著升高。Western blot 检测发现 PASMCs 内 SRF 和 GATA6 蛋白在不同时间点的表达均明显升高。结论 大鼠急性肺栓塞后肺组织内 PASMCs 的 CRP1 表达明显升高。离体实验表明 ET-1 和 PDGF 显著促进了 PASMCs 内 CRP1 的表达。CRP1 可能通过 SRF-CRP1-GATA6 转录蛋白复合体参与 PASMCs 特异性基因表达的调控。

【关键词】 肺栓塞;肺动脉;平滑肌细胞;富半胱氨酸蛋白1;血小板源性生长因子;内皮素-1

The expression changes of cysteine-rich protein 1 and its mechanism after acute pulmonary embolism

LI Shengqing, LI Shujun, LIU Aru, et al

Department of Respiratory Medicine, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xian 710032, China

【Abstract】 Objective To study the expression changes of cysteine-rich protein 1 (CRP1) in the lung tissues of acute rat pulmonary embolism (PE) model and the effects of endothelin-1 (ET-1) and platelet-derived growth factor (PDGF) on the expression of CRP1 in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). Methods Acute rat PE model was established. The samples of lung tissues were collected at different time points; 1h, 8h, 24h and 48h after PE. The normal rats were used as controls. The mRNA level changes of CRP1 were identified by semi-quantitative RT-PCR, and the protein level changes of it were identified by Western blot method. The immunohistochemical method was employed to study the distribution and expression changes of CRP1 in the lung tissues after acute PE. PASMCs were isolated and cultured with $1\mu\text{mol/L}$ ET-1 and $10\mu\text{g/L}$ PDGF. Semi-quantitative RT-PCR, Western blot and immunofluorescent staining were employed to study the expression changes in PASMCs at different time points. The expression changes of SRF and GATA6 in PASMCs, the components of the transcriptosome SRF-CRP1-GATA6, were studied by the methods of Western blot. Results At different time points after PE, the mRNA levels and protein levels of CRP1 increased in the lung tissues of acute rat PE models. The immunohistochemical study indicated that CRP1 was mainly expressed in PASMCs of the fumica media of the pulmonary arteries, and the expression of it was up-regulated after acute PE. The expression of CRP1 in PASMCs stimulated by ET-1 or PDGF increased gradually at different time points and so did the expression of SRF and GATA6. Conclusion The expression of CRP1 in PASMCs was up-regulated after acute PE. ET-1 and PDGF could significantly increase the expression of CRP1 in PASMCs *in vitro*. The protein CRP1 might activate expression of PASMCs-specific gene through the SRF-

收稿日期:2007-01-29

作者单位:710032 西安市,第四军医大学西京医院呼吸科

作者简介:李圣青,女,1970年1月生,安徽芜湖市人,医学博士,副主任医师,副教授。Tel: 029-84775237, E-mail: shengqingli@gmail.com

CRP1-GATA6 transcriptosome.

【Key words】 pulmonary embolism; pulmonary artery; smooth muscle cells; cysteine-rich protein 1; platelet-derived growth factor; endothelin-1

肺栓塞(pulmonary embolism, PE)是血栓性或其他性质的栓子(如气体、羊水、脂肪)顺着血流方向堵塞肺动脉的结果。PE的血栓性栓子主要来源于下肢或盆腔静脉,少部分来自其他体静脉和右心。老年人因为合并较多的PE易患因素,如肥胖、糖尿病、肿瘤及心肺疾病等,使老年PE的临床表现更为复杂而不易识别,误诊率更高^[1]。随着PE诊断水平的提高和人口老龄化的进展,老年PE的患者人数呈逐年增加趋势,因此PE的研究在老年心血管病的研究中占有越来越重要的地位。笔者研究发现,大鼠急性PE后出现了一系列的蛋白表达变化,其中富半胱氨酸蛋白1(cysteine-rich protein 1, CRP1)在急性PE后出现了明显的表达上调^[2]。CRP家族包括CRP1、CRP2和CRP3三种蛋白,它们都共同含有两个LIM结构域。CRP1主要表达于脉管系统的平滑肌细胞和内脏的平滑肌细胞,是平滑肌细胞的特异性标记蛋白。CRP2除了表达于平滑肌细胞外,还表达于成纤维细胞,能够促进成纤维细胞向平滑肌细胞的转化^[3]。CRP3则主要表达于横纹肌细胞。目前研究发现CRP1基因上游有一个含CArG盒的增强子,血清反应因子(serum reaction factor, SRF)与CArG盒相结合可以激活CRP1基因的表达^[4]。CRP1主要有两大功能,一方面CRP1可以与 α -辅肌动蛋白和斑联蛋白结合,参与细胞骨架的重构;另一方面CRP1能够与SRF和GATA蛋白相结合,形成转录复合体蛋白,激活平滑肌细胞特异性基因如SM α A, SM22 α 和SM-calponin等的表达^[5]。内皮素-1(endothelin-1, ET-1)和血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)是急性PE后活化的血小板释放的主要生物活性因子^[6]。它们一方面有强烈的缩血管作用,还能够促进肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)的增殖,促进成纤维细胞向平滑肌细胞的转化,从而导致肺血管系统的重构^[7,8]。为了深入研究CRP1分子与急性PE的关系,本研究进一步探讨了CRP1在急性PE后的表达变化以及ET-1和PDGF对PSMCs中CRP1表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 TRIzol Reagent和SuperScript III均购自Invitrogen公司。rTaq酶购自Takara公司。

CRP1鼠单抗和SRF鼠单抗均购自Biocompare公司,GATA6兔多抗购自Santa Cruz公司。ET-1和PDGF均购自Sigma公司。紫外分光光度计UV330购自英国Unicam公司,PE 9700 PCR仪和Image Master TotalLab v1.11软件均购自Amersham Pharmacia公司。雄性Wistar大鼠购自第四军医大学实验动物中心。

1.2 大鼠急性PE模型的建立 在Clozel等^[9]的模型基础上做如下改进:首先制备体外血栓,取Wistar大鼠1只,心脏穿刺取血,注入医用输液器的前段塑料管(内径约2 mm)。每毫升全血中加入33 nkat凝血酶,室温下静置过夜,制备直径2 mm、长10 mm的自体血栓。取40只Wistar大鼠,随机分5组(即正常对照组、1h组、8h组、24h组和48h组),每组8只。将大鼠用10g/L戊巴比妥1.2 ml麻醉,经大鼠颈总静脉插管注入栓子,3个/只。以正常组为对照。分别在1,8,24,48h开胸取肺组织,用于提取总RNA和总蛋白,剩余部分肺组织用于石蜡包埋切片。

1.3 大鼠PSMCs的分离培养 将大鼠麻醉后在无菌条件下,分离2~3级肺动脉平滑肌组织,按照组织贴块法培养PSMCs,用含20%小牛血清的DMEM培养液培养,每周换液2次。培养的细胞用相差显微镜观察形态学特征,采用抗肌动蛋白单克隆抗体免疫细胞化学染色证实为平滑肌细胞,无内皮细胞、成纤维细胞污染。0.25%胰蛋白酶消化传代培养,取其第3~5代作为实验用细胞。在培养液中分别加入1 μ mol/L ET-1或10 μ g/L PDGF孵育,分别在1,8,24,48h收集PSMCs,用于半定量RT-PCR,Western blot和细胞免疫荧光检查。

1.4 半定量RT-PCR 采用TRIzol试剂提取大鼠肺组织和PSMCs的总RNA。采用琼脂糖凝胶电泳验证总RNA的质量,采用紫外分光光度计进行RNA定量。采用SuperScript III合成cDNA第一链,总反应体系达20 μ l,反应物-20 $^{\circ}$ C保存或直接用于PCR。采用Primer Premier 5.0 PCR引物设计软件分别设计CRP1和 β -actin的引物。同时采用Sequencher序列比对软件对CRP1和内参 β -actin的引物序列做了特异性验证。CRP1引物序列:上游5'-GGG CAA CAG CTT CCA CAA -3',下游5'-CGG CAC CGA TCA CCT TCT -3',扩增长度329bp。内参 β -actin引物序列:上游5'-GAT

GAC CCA GAT CAT GTT TG-3',下游 5'-TAG GAG CCA GGG CAG TAA-3',扩增长度 614bp。采用 PE 9700 PCR 仪,反应体系 25 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 2min, 94 $^{\circ}$ C 变性 10s, 55 $^{\circ}$ C 退火 15s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存。分别在 20、30 和 35 个循环取样,用 12 g/L Agorase 进行琼脂糖电泳。采用 Image Master TotalLab v1.11 软件作图像分析。首先确定条带,消除背景,然后以 Marker 条带为标准计算待测条带的 Volume 值,最后计算目的条带与对应内参条带的比值。

1.5 Western blot 先用三氯醋酸/丙酮沉淀法沉淀肺组织蛋白,然后在沉淀中加入裂解液(50mmol/L Tris HCl,pH8.0,10 g/L SDS,10 g/L DTT,1 mmol/L PMSF,1 mmol/L EDTA,0.7 mg/L 抑肽酶,0.5 mg/L 亮肽素)。15 $^{\circ}$ C,40 000 $\times$ g,离心 1h,取上清。用 Bradford 法对上清进行蛋白定量,分装后-80 $^{\circ}$ C 保存。PASCs 的蛋白提取略有不同。先将 PASCs 细胞用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次,迅速称量样品湿重后,加入约 5 倍量的上述裂解液,混匀后移入 1.5 ml Eppendorf 管中,冰浴中以最大功率超声破碎细胞(3 $\times$ 10 s),然后 15 $^{\circ}$ C,40 000 $\times$ g 的转速离心 1 h。收集上清用 Bradford 法定量。肺组织 SDS-PAGE 电泳的蛋白上样量为 40 μ g,PASCs 的 SDS-PAGE 电泳的蛋白上样量为 20 μ g。经过转膜和封闭处理后,按顺序分别加一抗和相对应的二抗,以 β -tubulin 为内参照,最后用 A、B 液显色。采用 ImageMaster3.0 软件扫描测定每个蛋白条带的 Volume 值。

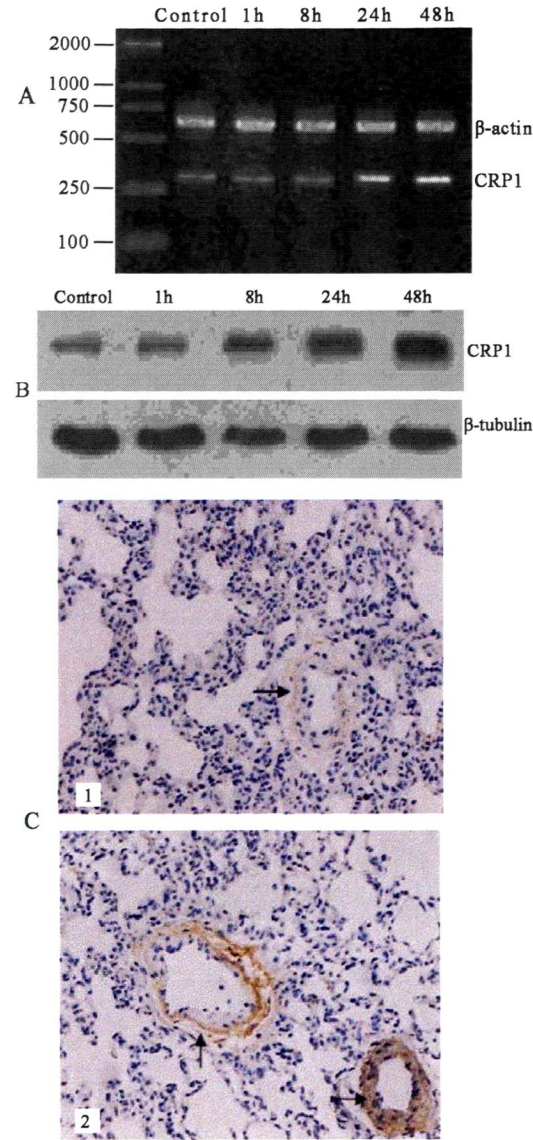
1.6 免疫组织化学和细胞免疫荧光染色 采用 CRP1 鼠单抗检测急性 PE 后 48 h 肺组织内 CRP1 蛋白的表达,二抗为 HRP 标记,最后用 DAB 显色。一抗用 PBS 代替作为空白对照。采用间接细胞免疫荧光染色法,利用 CRP1 鼠单抗和 FITC 标记的二抗检测 PASCs 内 CRP1 蛋白的表达。

1.7 统计学分析 采用 SPSS10.0 统计软件分析,测量值以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较采用重复测量方差分析法。

2 结果

2.1 肺组织内 CRP1 的表达 大鼠急性 PE 后,肺组织中 CRP1 的 mRNA 和蛋白水平逐渐升高,在 24 和 48h 尤为显著(图 1,表 1)。免疫组化染色显示 CRP1 主要表达于肺动脉中膜的平滑肌细胞和支气管壁的平滑肌细胞。在急性 PE 后 48h,肺动脉中膜的平滑肌细胞 CRP1 的表达显著升高,同时部分

成纤维细胞内也可见 CRP1 蛋白的表达(图 1)。



A: CRP1 的半定量 RT-PCR 结果;B: CRP1 的 Western blot 结果;C: CRP1 的免疫组化结果,C1: 对照组,C2: 48h

图 1 急性肺栓塞后不同时间点肺组织中 CRP1 的表达变化

表 1 大鼠急性 PE 模型肺组织中 CRP1 的表达变化(n=8, $\bar{x}\pm s$)

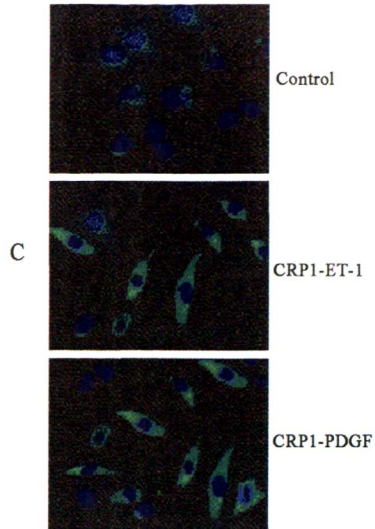
组别	CRP1(mRNA)	CRP1
对照组	0.24 $\pm$ 0.13	214723 $\pm$ 2577
1h 组	0.22 $\pm$ 0.11	224758 $\pm$ 2474
8h 组	0.26 $\pm$ 0.14	408736 $\pm$ 3857
24h 组	0.92 $\pm$ 0.33*	1193758 $\pm$ 9483*
48h 组	0.98 $\pm$ 0.37*	1257893 $\pm$ 9985*

注:与对照组相比较,*P<0.05,*P<0.01

2.2 ET-1 和 PDGF 促进 PSMCs 内 CRP1 的表达

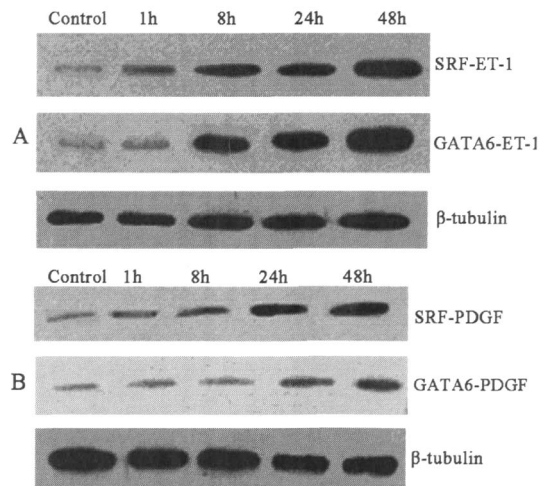
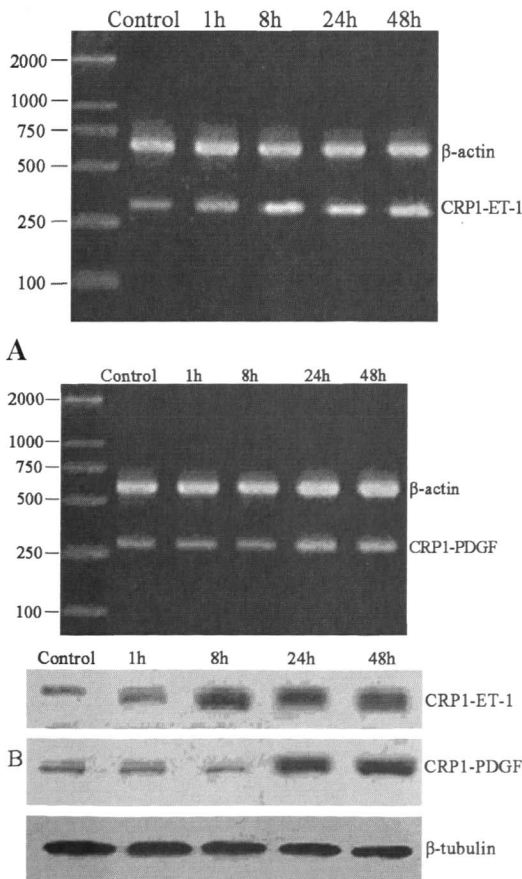
与对照组相比, PSMCs 中加入 ET-1 和 PDGF 后细胞生长速度加快。CRP1 的表达无论在 mRNA 水平还是在蛋白水平都显著升高(图 2, 表 2)。但是 PSMCs 与 ET-1 共同孵育 1h, 就可见 CRP1 的表达升高, 在 8h 时达高峰并一直维持在较高水平。PSMCs 与 PDGF 共同孵育 24h, CRP1 的表达才出现显著升高。细胞免疫荧光染色也显示与 ET-1 和 PDGF 共同孵育 48h 的 PSMCs 中 CRP1 的表达明显升高, 不仅胞浆染色阳性, 胞核内也可见 CRP1 的表达(图 2)。

2.3 CRP1 的转录调节作用 PSMCs 与 ET-1 共同孵育 1h 后, SRF 的表达迅速升高并维持在一个较高水平。GATA6 的表达在 8h 时明显升高, 并一直维持在较高水平(图 3, 表 2)。PSMCs 与 PDGF 共同孵育 8h 后, SRF 的表达迅速升高并维持在一个较高水平。GATA6 的表达在 24h 时明显



A: CRP1 表达的半定量 RT-PCR 结果; B: CRP1 表达的 Western blot 结果; C: 与 ET-1 或 PDGF 共同孵育 48h 时 CRP1 表达的免疫荧光染色结果

图 2 PSMCs 中 CRP1 蛋白在 ET-1 和 PDGF 作用下不同时间点的表达变化



A: 与 ET-1 共同孵育的 SRF 和 GATA 6 的 Western blot 结果; B: 与 PDGF 共同孵育的 SRF 和 GATA 6 的 Western blot 结果

图 3 ET-1 和 PDGF 对 PSMCs 中 SRF 和 GATA 6 表达的影响

3 讨论

笔者发现, CRP1 在急性 PE 后表达显著升高。CRP1 含有两个 LIM 结构域, 主要表达于脉管系统的平滑肌细胞和内脏的平滑肌细胞, 是平滑肌细胞

表2 ET-1和PDGF对PASCs中CRP1表达的影响($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	PASCs incubated with ET-1				PASCs incubated with PDGF			
	CRP1(mRNA)	CRP1	SRF	GATA6	CRP1(mRNA)	CRP1	SRF	GATA6
0h	0.29±0.13	94587±1034	53756±937	48758±949	0.12±0.06	39758±578	21875±475	13756±487
1h组	0.58±0.29	104857±2148	98823±981	45968±937	0.24±0.11	40872±647	22847±658	15375±381
8h组	1.18±0.43*	938546±4756*	489374±3246*	934576±3928*	0.21±0.09	29386±523	28679±876	14982±536
24h组	0.94±0.39*	789358±4364*	419487±2946*	998284±4765*	0.89±0.34*	837567±5487*	683587±3247*	302857±1283*
48h组	0.93±0.36*	774658±4175*	997468±4756*	1345863±9878*	0.81±0.36*	912847±4856*	798822±4193*	417464±2463*

注:与对照组相比较,* $P<0.05$,* $P<0.01$

的特异性标记蛋白。本研究进一步揭示了CRP1分子在大鼠急性PE肺组织中的表达变化,发现在大鼠急性PE后的不同时间点,CRP1的mRNA水平和蛋白水平均逐渐升高,免疫组化研究表明CRP1主要分布在PASCs和部分成纤维细胞,在急性PE后表达显著升高。

为了研究急性PE后活化的血小板释放的ET-1和PDGF对PASCs中CRP1表达的影响,本研究分离培养了PASCs,并与一定浓度的ET-1和PDGF共同孵育,发现PASCs在ET-1和PDGF的作用下CRP1的表达随着时间的延长在mRNA水平和蛋白水平均显著升高。细胞免疫荧光染色也显示与ET-1和PDGF共同孵育48h的PASCs中CRP1的表达明显升高,不仅胞浆染色阳性,胞核内也可见CRP1的表达。提示CRP1作为PASCs转录因子的作用也十分活跃。

CRP1能够与SRF和GATA蛋白相结合,形成转录复合体蛋白,激活平滑肌细胞特异性基因的表达。因此笔者研究了PASCs在ET-1和PDGF的作用下SRF和GATA6蛋白的表达。Western blot检测发现,PASCs在ET-1和PDGF的作用下,SRF和GATA6蛋白随着时间的延长表达均明显升高。SRF表达的升高一方面可以通过与CaRG盒的结合,促进CRP1基因的表达;另一方面还能够与CRP1和GATA6结合,形成转录复合体,促进大量平滑肌细胞特异性基因的表达^[10]。CRP1蛋白由于含有两个LIM结构,所以在这个转录复合体中发挥着桥接作用。

离体研究表明,大鼠急性PE后肺组织内PASCs的CRP1表达明显升高与体内高水平的ET-1和PDGF的作用密不可分。ET-1和PDGF可以通过SRF途径来增加CRP1的表达。PASCs内CRP1的高表达不仅可能参与PASCs细胞骨架的重构,而且还可能通过SRF-CRP1-GATA6转录蛋白复合体参与PASCs特异性基因表达的调控。

参考文献

- [1] Girard P, Sanchez O, Leroyer C, et al. Deep venous thrombosis in patients with acute pulmonary embolism: prevalence, risk factors, and clinical significance. *Chest*, 2005,128;1593-1600.
- [2] 李圣青,赵峰,戚好文,等.肺组织灌注前后的双向电泳比较. *西安交通大学学报(医学版)*,2006,27;203-206.
- [3] Chang DF, Belaguli NS, Iyer D, et al. Cysteine-rich LIM—only proteins CRP1 and CRP2 are potent smooth muscle differentiation cofactors. *Dev Cell*, 2003,4;107-118.
- [4] Najwer I, Lilly B. Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase IV activates cysteine-rich protein 1 through adjacent CRE and CaRG elements. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005,289;C785-C793.
- [5] Tran TC, Singleton C, Fraley TS, et al. Cysteine-rich protein 1 (CRP1) regulates actin filament bundling. *BMC Cell Biol*, 2005,6;45.
- [6] Reesink HJ, Meijer RC, Lutter R, et al. Hemodynamic and clinical correlates of endothelin-1 in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circ J*, 2006,70;1058-1063.
- [7] Jankov RP, Kantores C, Belcastro R, et al. Endothelin-1 inhibits apoptosis of pulmonary arterial smooth muscle in the neonatal rat. *Pediatr Res*, 2006,60;245-251.
- [8] Lanner MC, Raper M, Pratt WM, et al. Heterotrimeric G proteins and the platelet-derived growth factor receptor-beta contribute to hypoxic proliferation of smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005,33;412-419.
- [9] Clozel JP, Holvoet P, Tschopp T. Experimental pulmonary embolus in the rat: a new *in vivo* model to test thrombolytic drugs. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1988,12;520-525.
- [10] McDonald OG, Wamhoff BR, Hoofnagle MH, et al. Control of SRF binding to CaRG box chromatin regulates smooth muscle gene expression *in vivo*. *J Clin Invest*, 2006,116;36-48.