

• 论著 •

MK2 在动脉粥样硬化形成中的作用

雷 敏 徐 戈 曾知恒 李志乐

【摘要】 目的:检测丝裂原活化蛋白激酶激活蛋白激酶 2 (MK2) 在实验性兔动脉粥样硬化模型主动脉壁中的 mRNA 表达水平, 并探讨其在动脉粥样硬化形成中的作用。

方法:16 只雄性新西兰大白兔随机分为对照组与动脉粥样硬化组, 对照组给予普通饮食 14 周, 动脉粥样硬化组给予高脂饲料 14 周。实验前后测定血脂、体重, 14 周末处死动物, 无菌条件下分离主动脉, 病理学测定主动脉内膜厚度及斑块面积, 实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR) 检测各组兔主动脉壁 MK2 mRNA 的表达, 并分析其与主动脉内膜厚度及斑块面积的相关性。 **结果:**与对照组相比, 动脉粥样硬化组高脂饮食 14 周后血清总胆固醇 (TC), 低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 及三酰甘油 (TG) 水平显著升高, 高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平降低, 主动脉内膜和斑块面积显著增加, MK2 mRNA 的相对表达量为对照组的 19.46 ± 8.16 倍, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。MK2 mRNA 的相对表达量与斑块面积 ($r = 0.941$, $P < 0.01$) 及内膜厚度 ($r = 0.918$, $P < 0.01$) 均呈正相关。 **结论:**MK2 可能在转录水平参与了动脉粥样硬化的形成。

【关键词】 动脉粥样硬化; 主动脉; 内膜; 丝裂原活化蛋白激酶激活蛋白激酶 2; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2011.02.015

Role of MK2 in the pathogenesis of atherosclerosis LEI Min, XU Ge, ZENG Zhi-heng, LI Zhi-le.

Department of Cardiovascular, No. 1 affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

【Abstract】 Objective: The mRNA expression level of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MK2) was detected in the aortic wall of rabbit atherosclerosis model, in order to investigate the role of MK2 in the pathogenesis of atherosclerosis. **Methods:** Sixteen male New Zealand white rabbits were randomly divided into control group and atherosclerosis group. The control group were given normal diet for 14 weeks, and the atherosclerosis group were given the high fat diet for 14 weeks. Serum lipids and body weights were measured before and after experiments. MK2 mRNA expression in aortas was evaluated by real-time quantitative PCR, and the histopathological changes of the aortas were analyzed at the end of the study. We analyzed the correlation between MK2 mRNA expression and plaque area, as well as intimal thickness of the rabbit aortic wall. **Results:** Compared with the control group, the TC, LDL-C, TG levels of atherosclerosis groups were significantly increased, and so were aortic plaque area and intimal thickness. The relative expression of MK2 mRNA of atherosclerosis groups was 19.46 ± 8.16 times more than the control group ($P < 0.01$). MK2 mRNA relative expression was positively correlated with plaque area ($r = 0.941$, $P < 0.01$) and intimal thickness ($r = 0.918$, $P < 0.01$). **Conclusion:** MK2 may be involved in the pathogenesis of atherosclerosis at the transcriptional level.

【Key words】 Atherosclerosis; Aorta; Tunica Intima; MAP-kinase-activated kinase 2; PCR

基金项目: 广西青年科学基金资助 (桂科青 0832049)

作者单位: 530021 广西医科大学第一附属医院心血管病研究所心内科

通信作者: 徐戈, Email: xuggee@21cn.com

动脉粥样硬化是多种心脑血管疾病共同的主要病理基础,严重危害人类的健康^[1]。随着动脉粥样硬化炎症学说的提出,炎症在动脉粥样硬化的发生发展中的作用已引起人们极大的关注^[2]。p38 蛋白激酶信号途径是丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族中的重要成员,参与了多种细胞的胞内信号传递,介导炎症、应激等多种细胞反应,与心血管疾病发生的多种病理过程如心肌病变、心脏缺血/再灌注、动脉硬化和高血压的发生等相关^[3]。

MAPK 激活蛋白激酶 2 (MAP Kinase-Activated Protein Kinase 2, MK2)是于 1992 年发现并被纯化的第一个 MAPK 激活蛋白激酶^[4],主要被 p38 蛋白激酶直接磷酸化激活,是 p38 蛋白激酶的重要底物^[5]。近年来,MK2 在心脑血管疾病及炎症方面的生物学功能日益受到重视^[6,7]。MK2 可通过促进血管壁巨噬细胞泡沫细胞形成和增加单核细胞/巨噬细胞趋化的细胞因子来促进动脉粥样硬化的发展^[8]。但 MK2 在动脉粥样硬化中的作用机制尚未完全明确,MK2 mRNA 在动脉粥样硬化主动脉组织中的表达情况目前尚未见明确报道。本研究通过建立实验性兔动脉粥样硬化模型,采用实时荧光相对定量聚合酶链反应(RQ-PCR)检测动脉粥样硬化组及对照组兔主动脉壁中的 mRNA 的含量,并分析其与斑块面积及内膜厚度的相关性,从 mRNA 水平进一步探讨 MK2 在动脉粥样硬化发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

胆固醇(安徽天启化工科技有限公司),蛋黄粉(亳州市红日实业有限公司),Trizol RNA 提取试剂(Invitrogen),逆转录试剂盒(Fermentas),Real Master Mix 试剂盒(SYBR Green),PCR 引物(上海闪晶分子生物科技有限公司),病理图像分析仪(DMR + 550),紫外分光光度计(PE LAMB DA BIO 20),荧光实时定量 PCR 仪(ABI7500),凝胶电泳成像分析系统(Bio-Rad Gel DOC 2000)

1.2 动物分组与饲养

广西医科大学实验动物中心提供的 16 只新西兰雄性大白兔(清洁级,3 月龄),体重(2.05 ± 0.2) kg,随机分为两组:对照组和动脉粥样硬化组。对照组予以普通饮食 14 周,动脉粥样硬化组予以高脂饲料(1%胆固醇、7.5%蛋黄粉和 8%猪油)喂养 14 周。每只兔每日总食量约为 120g,饮水不限。饲

养期间因生病和意外,对照组死亡 2 只,动脉粥样硬化组死亡 1 只。于第 14 周末空气栓塞处死存活动物,无菌条件下分离主动脉血管(从主动脉起始处至髂动脉分叉处),生理盐水冲洗。部分用作病理组织学诊断,部分置液氮中冻存待测 RQ-PCR。

1.3 血脂及体重测定

饲养前及饲养至第 14 周末,称取动物体重(BW),并经兔耳中央动脉取空腹血 2 ml,静置 30 min 后离心取血清,检测血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)的浓度。

1.4 主动脉病理学观察

选取靠近主动脉弓部的主动脉约 1.5 cm,置于 4%福尔马林溶液内固定 24h 以上,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,血管横断面作 5 μm 连续切片,常规苏木素-伊红(HE)染色做病理学检测,由有经验的病理科医师采用高清晰度的病理图像分析系统测定主动脉内膜厚度及斑块的最大横截面积,计算其占主动脉横截面积的比例。将剩余的主动脉从背侧面纵行正中中线剪开、铺平,对铺平的主动脉进行摄像,将照片输入计算机,观察脂质条纹、斑块破裂、血栓形成情况。

1.5 荧光定量 PCR 法检测主动脉 MK2 mRNA 的表达

1.5.1 总 RNA 制备及 cDNA 合成 应用 Trizol 试剂盒按说明书提取 RNA。然后按常规方法应用随机引物和逆转录试剂盒合成 cDNA 第 1 链。

1.5.2 实时定量 PCR MK2 上游引物(5'-3'): TCAAGAAAAACGCCATCATCG,下游引物(5'-3'): TTGGGGCAGTCCTGAAGCA,扩增目的片段长度 139bp。肌动蛋白(β-actin)上游引物(5'-3'): CGCAGAAACGAGACGAGA,下游引物(5'-3'): GCTGTACCTTCACCGTTCC,扩增目的片段长度 126bp。应用 Real MasterMix 试剂盒,总反应体积为 20 μl,包括 2.5 倍 Real MasterMix 8 μl,上、下游引物各 1 μl, cDNA 2 μl 以及去离子水 8 μl。以 β-actin 为内对照,每个标本均进行 MK2 和 β-actin 检测,重复检测 2 次。反应条件为:95℃预变性 2min 后,共进行 45 个循环扩增,每一循环包括 95℃变性 15 s,58℃退火 15 s,68℃延伸 31 s。并在延伸阶段 68℃时收集荧光信号。整个 PCR 反应完成后,将温度从 60℃升至 95℃,每升高 1℃仪器自动收集荧光信号,得到溶解曲线。反应在 ABI7500 荧光定量 PCR 仪中进行。最后对扩增产物进行琼

脂糖凝胶电泳分析特异性。

1.5.3 扩增效率一致性检测 将样本 cDNA 以 10 倍倍比稀释,并以此做为模板,扩增 MK2 和 β -actin。以 cDNA 浓度梯度的对数值作为横坐标, $\Delta Ct = (Ct_{MK2} - Ct_{\beta-actin})$ 作为纵坐标绘制关系曲线。若所得曲线斜率绝对值 < 0.1 ,说明 MK2 和 β -actin 扩增效率相同,可通过下列公式计算 MK2 的相对表达量: MK2 mRNA 的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$, $\Delta\Delta Ct = (\Delta Ct, Q) - (\Delta Ct, C)$ 。其中 $\Delta Ct, Q$ 为动脉粥样硬化组 MK2 基因的 Ct 值与内参照 β -actin 基因 Ct 值之差; $\Delta Ct, C$ 为对照组 MK2 基因的 Ct 值与内参照 β -actin 基因 Ct 值之差。

1.6 统计学处理

计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较采用 t 检验。相关统计采用 Pearson's 相关回归分析。采用 SPSS 13.0 软件处理数据。

2 结果

2.1 血脂和体重测定结果

两组兔的体重在实验过程中组间无显著差异。

高脂饮食 14 周后兔血清 TC, LDL-C, TG 水平较 0 周及对照组同时期显著升高, HDL-C 水平降低(见表 1)。

表 1 两组兔 0 周和 14 周时的血脂变化 (mmol/L)

血脂	对照组		动脉粥样硬化组	
	0 周	14 周	0 周	14 周
TC	0.97 ± 0.26	1.27 ± 0.36	1.07 ± 0.28	$28.24 \pm 5.49^{(1)(2)}$
TG	0.81 ± 0.1	0.98 ± 0.5	0.72 ± 0.09	$2.39 \pm 0.39^{(1)(2)}$
HDL-C	1.72 ± 0.32	1.80 ± 0.23	1.88 ± 0.37	$1.57 \pm 0.37^{(2)}$
LDL-C	0.60 ± 0.33	0.71 ± 0.24	0.79 ± 0.36	$30.36 \pm 2.71^{(1)(2)}$

注:与本组 0 周相比, $^{(1)} P < 0.01$;与对照组同时期相比,

$^{(2)} P < 0.05$

2.2 各组兔主动脉病理形态学的变化

对照组主动脉血管内膜连续、光滑、内皮完整;动脉粥样硬化组血管内膜明显增厚,内皮下见脂质沉积和泡沫细胞形成,泡沫细胞分布于整个血管壁,局部聚集成脂质斑块,斑块内纤维成分少,细胞成分多,且在内膜显著增厚的基础上发生了典型的动脉粥样硬化病变(见图 1)。

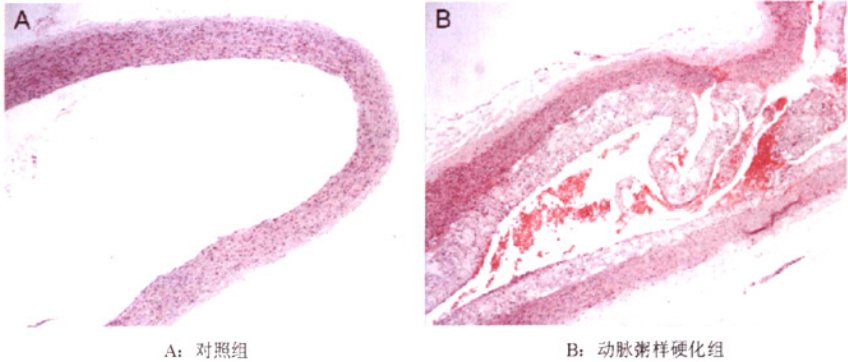


图 1 2 组兔主动脉 HE 染色结果对比 ($\times 25$)

2.3 各组主动脉内膜厚度和斑块面积变化

动脉粥样硬化组内膜厚度及斑块面积显著高于对照组(见表 2)。

表 2 各组主动脉内膜厚度和斑块面积变化

组别	内膜厚度 (μm)	斑块面积 (%)
对照组	8.11 ± 3.86	0
动脉粥样硬化组	$85.72 \pm 13.42^{(1)}$	$66.81 \pm 16.47^{(1)}$

注:与对照组相比, $^{(1)} P < 0.01$

2.4 主动脉 MK2 mRNA 的表达

相对定量分析结果显示,各组兔动脉壁均有 MK2 mRNA 表达。与对照组(差别倍数为 $2^0 = 1$) 比较,动脉粥样硬化组 MK2 mRNA 表达升高,是对照组的 19.46 ± 8.16 倍 ($P < 0.01$),见图 2。

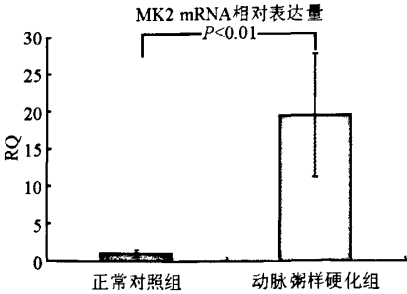


图 2 MK2 mRNA 的相对表达量

2.5 MK2 mRNA 表达量与动脉斑块面积及内膜厚度的相关性分析

MK2 mRNA 的相对表达量与斑块面积 ($r =$

0.941, $P < 0.001$) 及内膜厚度 ($r = 0.918$, $P < 0.001$) 均呈正相关。

3 讨论

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性疾病,许多细胞炎症因子和调节炎症途径的信号分子均参与了动脉粥样硬化的炎症过程^[9]。MK2 是炎症过程的一个关键调节信号分子,具有稳定富含 AU 元件的 mRNA、参与细胞迁移,介导炎症因子的产生等多种细胞炎症功能,在炎症过程中具有多重作用,包括介导炎症介质表达、转录因子调控及炎症介质转录后调控等^[10, 11]。

本研究利用高脂饮食成功地建立了实验性动脉粥样硬化兔模型,观察到动脉粥样硬化组兔主动脉 MK2 mRNA 表达水平较对照组明显升高,且各组 MK2 mRNA 表达量与动脉粥样硬化斑块面积 ($r = 0.941$, $P < 0.01$) 及内膜厚度 ($r = 0.918$, $P < 0.01$) 呈显著正相关,提示 MK2 可能在基因水平参与了促 AS 的进程。

Jagavelu 等^[8]研究也显示:(1)在高胆固醇血症低密度脂蛋白受体(-/-)小鼠主动脉中,MK2 的活性形式(磷酸化 MK2)在动脉内皮和巨噬细胞丰富的斑块区域呈强阳性,而在平滑肌细胞丰富的血管壁则呈阴性,这表明了 MK2 在动脉粥样硬化的作用主要是启动内皮细胞和单核/巨噬细胞的进程;(2)在体内,MK2 缺陷可以通过减少血管脂质沉积和巨噬细胞含量抑制动脉粥样硬化;(3)在体外,MK2 缺陷可显著降低食源性泡沫细胞的形成和清道夫受体在腹膜巨噬细胞的表达;在用小干扰 RNA (siRNA)沉默 MK2 的内皮细胞中,吸引巨噬细胞进入血管壁的关键介质—血管内皮细胞粘附分子 1 (VCAM-1)和单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1)的表达显著降低。该研究为 MK2 参与动脉粥样硬化的不同阶段提供了证据,即 MK2 可通过促进血管壁巨噬细胞泡沫细胞形成和增加单核细胞/巨噬细胞趋化的细胞因子来促进动脉粥样硬化的发展。遗憾的是该研究没有从基因水平研究 MK2 在动脉粥样硬化中的作用,而我们的研究正好弥补了这一点。

总之,MK2 在活性蛋白及 mRNA 水平均参与了动脉粥样硬化的发展,是一个更有选择性地抑制动脉粥样硬化重要进程的靶点。如能进一步采用 MK2 特异性抑制剂阻断这一环节,减少炎症因子的

释放,进而延缓动脉粥样硬化的进展,将为治疗提供有力的理论依据,MK2 亦有望成为动脉粥样硬化治疗的新靶点。

参考文献

- [1] Robinson J G, Fox K M, Bullano M F, et al. Atherosclerosis profile and incidence of cardiovascular events; a population-based survey. [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2009, 9: 46.
- [2] Libby P, Okamoto Y, Rocha V Z, et al. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. [J]. Circ J, 2010, 74(2): 213-220.
- [3] Cao W H, Xiong Y, Collins Q F, et al. p38 mitogen-activated protein kinase plays a critical role in the control of energy metabolism and development of cardiovascular diseases. [J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2007, 32(1): 1-14.
- [4] Argiriadi M A, Sousa S, Banach D, et al. Rational mutagenesis to support structure-based drug design: MAPKAP kinase 2 as a case study. [J]. BMC Struct Biol, 2009, 9: 16.
- [5] Ronkina N, Kotlyarov A, Dittich-Breiholz O, et al. The mitogen-activated protein kinase (MAPK)-activated protein kinases MK2 and MK3 cooperate in stimulation of tumor necrosis factor biosynthesis and stabilization of p38 MAPK. [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(1): 170-181.
- [6] Streicher J M, Ren S, Herschman H, et al. MAPK-activated protein kinase-2 in cardiac hypertrophy and cyclooxygenase-2 regulation in heart. [J]. Circ Res, 2010, 106(8): 1434-1443.
- [7] Duraisamy S, Bajpai M, Bughani U, et al. MK2; a novel molecular target for anti-inflammatory therapy. [J]. Expert Opin Ther Targets, 2008, 12(8): 921-936.
- [8] Jagavelu K, Tietge U J, Gaestel M, et al. Systemic deficiency of the MAP kinase-activated protein kinase 2 reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. [J]. Circ Res, 2007, 101(11): 1104-1112.
- [9] Virani S S, Polsani V R, Nambi V. Novel markers of inflammation in atherosclerosis. [J]. Curr Atheroscler Rep, 2008, 10(2): 164-170.
- [10] Thandavarayan R A, Watanabe K, Ma M, et al. Dominant-negative p38alpha mitogen-activated protein kinase prevents cardiac apoptosis and remodeling after streptozotocin-induced diabetes mellitus. [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 297(3): H911-H919.
- [11] Yoshizawa T, Hammaker D, Boyle D L, et al. Role of MAPK kinase 6 in arthritis: distinct mechanism of action in inflammation and cytokine expression. [J]. J Immunol, 2009, 183(2): 1360-1367.

(收稿: 2010-08-17 修回: 2010-10-21)

(本文编辑: 丁媛媛)