

慢性低氧高二氧化碳肺动脉高压小鼠肺组织 Rho激酶的表达变化

商 萍 周红玲 冯彩丽 朱美丽 王小同*

(温州医学院附属第二医院康复、脑科中心, 温州 325000)

摘要 慢性低氧高二氧化碳性肺动脉高压严重威胁着国民身体健康, 但其发病机制尚未完全阐明。该研究通过检测正常对照组和慢性低氧高二氧化碳组小鼠右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI)、管壁厚度占血管外径的百分比(vessel wall thickness/total vascular diameter, WT%) and 管壁面积占血管总面积的百分比(vessel wall area/total vascular area, WA%), RT-PCR检测肺组织中Rho激酶(*ROCK1*, *ROCK2*)基因的表达, Western blot检测肺组织中ROCK1、p-MYPT1(phospho-myosin phosphatase target subunit 1)蛋白的表达, 免疫组织化学法观察ROCK1的定位表达, 探讨了Rho激酶在慢性低氧高二氧化碳性肺动脉高压形成中的作用。结果发现, 慢性低氧高二氧化碳组小鼠RVHI、WT%、WA%值均显著升高($P < 0.01$), *ROCK1*、*ROCK2*基因表达明显增加(*ROCK1* $P < 0.01$, *ROCK2* $P < 0.05$), ROCK1、p-MYPT1蛋白表达显著增加($P < 0.01$), ROCK1蛋白表达于肺动脉、肺泡和支气管。以上结果提示, 慢性低氧高二氧化碳条件下, 小鼠肺组织中Rho激酶表达升高, 可能参与了肺动脉高压的形成。

关键词 Rho激酶; 肺动脉高压; 小鼠; 低氧高碳酸血症

Changes of Rho Kinase in Pulmonary Hypertension Mice Induced by Chronic Hypoxic-hypercapnia

Shang Ping, Zhou Hongling, Feng Caili, Zhu Meili, Wang Xiaotong*

(Center of Rehabilitation & Neurology, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China)

Abstract Pulmonary hypertension induced by chronic hypoxic-hypercapnia is a serious threat to people's health in China, but its aetiology is still not clear. To investigate the effects of Rho kinases (ROCK1, ROCK2) in pulmonary hypertension mice induced by chronic hypoxic-hypercapnia, changes in the normal control group (NC) and the chronic hypoxia-hypercapnia group (HH) were observed. The right ventricular hypertrophy index (RVHI), vessel wall thickness/total vascular diameter (WT%) and vessel wall area/total vascular area (WA%) of both groups were measured. The expression of *ROCK1* mRNA and *ROCK2* mRNA was determined by RT-PCR. The expression of ROCK1 protein and the phospho-myosin phosphatase target subunit 1 (p-MYPT1) was tested by Western blot. The position of ROCK1 protein was located by immunohistochemistry. The results showed that the HH group had increased RVHI, WT% and WA% ($P < 0.01$), increased *ROCK1* and *ROCK2* mRNA expression (*ROCK1* $P < 0.01$,

收稿日期: 2012-11-14 接受日期: 2012-12-03

浙江省自然科学基金(批准号: Y2080503)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86699362, E-mail: wangxt22@163.com

Received: November 14, 2012 Accepted: December 3, 2012

This work was supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No. Y2080503)

*Corresponding author. Tel: +86-577-86699362, E-mail: wangxt22@163.com

网络出版时间: 2013-2-26 17:01 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130226.1701.004.html>

ROCK2 $P < 0.05$), increased ROCK1 and p-MYPT1 protein expression level ($P < 0.01$). ROCK1 protein expressed mainly in pulmonary artery, alveolar and bronchus. All the results suggested that the increased expression of Rho kinase may be associated with the development of pulmonary arterial hypertension induced by chronic hypoxia-hypercapnia in mice.

Key words Rho kinase; pulmonary hypertension; mice; hypoxia-hypercapnia

肺动脉高压发病率高, 预后差。其发病机制复杂, 包括肺血管内皮细胞功能受损、肺血管持续收缩、血管闭塞重构、原位血栓形成和炎症反应等^[1-3]。

小鼠低氧合并高二氧化碳的肺动脉高压模型更符合人类发病的情况, 能更好地模拟人类疾病的特点。本实验组前期研究报道, 在慢性低氧高二氧化碳环境下, 小鼠肺动脉高压形成, 右心室收缩压、右心肥大指数升高, 肺小动脉结构重建^[4]。但其具体机制尚未完全明确。

Rho激酶是一种分子量约为160 kDa的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 包括ROCK1和ROCK2^[5]。有多篇文献报道, Rho激酶表达的部位广泛, 可调节细胞收缩、迁移、浸润、增殖、凋亡等, 在肺动脉高压发病中起重要作用^[5-7]。本实验采用慢性低氧高二氧化碳法建立肺动脉高压小鼠模型, 观察肺组织中Rho激酶的表达变化, 探讨Rho激酶在慢性低氧高二氧化碳肺动脉高压形成中可能的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8周龄, 体重22~25 g的SPF级雄性C57BL/6小鼠, 由温州医学院实验动物中心提供[合格证号: SYXK(浙)2010-0150]。动物的饲养和实验均得到温州医学院伦理委员会的批准。

1.1.2 主要仪器与试剂 常压低氧高二氧化碳舱由温州医学院肺心病研究室研制; RT-PCR仪与蛋白电泳转移系统为美国BIO-RAD公司产品; SmartView凝胶图像分析系统为上海复日科技有限公司产品; BX51光学显微镜系日本Olympus公司产品。ROCK1抗体购自美国Santa Cruz公司; p-MYPT1(phospho-myosin phosphatase target subunit 1)(Thr696)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司; 内参 α -tubulin抗体购自美国Bioworld公司; BCA蛋白浓度测定试剂盒购自Thermo公司; SP法免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Trizol reagent购自Invitrogen公司; 逆转录试剂盒购自Fermantas公司; 引物由上海捷瑞生物工程有限公司

设计。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制作 20只SPF级雄性C57BL/6小鼠按随机数字表法分成2组: 正常对照组(normal control group, NC)和慢性低氧高二氧化碳组(chronic hypoxia and hypercapnia group, HH), 每组各10只。HH组置于常压低氧高二氧化碳舱中, 通过 N_2 调节舱内 O_2 浓度使其降低并维持在9%~11%, CO_2 浓度维持在5.5%~6.5%, 室温22~24 °C, 相对湿度50%~70%, 每天8 h, 每周6 d, 持续4周, 其余时间与NC组一样, 在正常大气环境中饲养。

1.2.2 肺组织取材及RVHI测定 造模4周后, 两组小鼠用10%水合氯醛(0.01 mL/g)腹腔注射麻醉, 打开胸腔, 经左心室温生理盐水灌注处死后, 完整取出小鼠心脏, 分离右心室(right ventricle, RV)和左心室+室内隔(left ventricle+septum, LV+S), 生理盐水冲洗, 滤纸吸干后在电子天平上分别称重, 计算RV/(LV+S)值, 作为右心室肥厚指标(right ventricular hypertrophy index, RVHI)。右肺组织取出后立即保存于液氮中, 左侧肺组织用4%多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋。

1.2.3 肺小血管组织形态学观察 肺组织石蜡切片5 μ m, 常规HE染色。光镜下观察肺小动脉组织形态及血管重构现象, 每只小鼠3张不连续肺组织切片, 每张切片随机选取直径20~100 μ m的截面较完整的肺细小动脉3条, 用Image-proplus(IPP)6.0软件进行图像分析, 测定其管壁厚度占血管外径的百分比(vessel wall diameter/total diameter, WT%)和管壁面积占血管总面积的百分比(vessel wall area/total area, WA%), 并计算每组平均值。

1.2.4 RT-PCR检测ROCK1、ROCK2 mRNA的表达 按说明书用Trizol试剂提取总RNA, 测RNA浓度, 取总RNA 1 μ g进行逆转录反应, 然后进行PCR。PCR为25 μ L反应体系: 2 \times Taq PCR Mix 12.5 μ L、上下游引物各1 μ L、cDNA 1 μ L、ddH₂O 9.5 μ L。反应条件为: 94 °C预变性4 min; 94 °C变性40 s, 退火30 s(ROCK1、 β -actin 56 °C, ROCK2 57 °C), 72 °C延伸45 s, 循环30次; 72 °C终末延伸7 min。ROCK1(扩增长度为166 bp)

上游引物: 5'-CAT TCC TAC CCT CTA CCA CTT TCC-3', 下游引物: 5'-AGA TGG TCT CTG TGG CAC TTA AC-3'; *ROCK2*(扩增长度为271 bp)上游引物: 5'-CAA GTA AAA GCC ACA CGA C-3', 下游引物: 5'-ATC CAA CTA AGG AAA CCC A-3'; *β -actin*(扩增长度为266 bp)上游引物: 5'-GTC CCT CAC CCT CCC AAA AG-3', 下游引物: 5'-GCT GCC TCA ACA CCT CAA CCC-3'。 *ROCK1*、*ROCK2*和 *β -actin*均单管扩增。各取6 μ L PCR产物混匀, 在1.8%琼脂糖凝胶上电泳。以 *β -actin*作为内参计算目的基因的相对表达量。

1.2.5 Western blot检测ROCK1、p-MYPT1蛋白的含量 蛋白裂解液提取蛋白, BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, SDS-PAGE电泳(12%分离胶及4%浓缩胶), 切胶、转膜、封闭, 孵育小盒中分别加入I抗、ROCK1抗体(1:800)、p-MYPT1抗体(1:500)、内参 α / β -tubulin(1:5 000), 4 $^{\circ}$ C孵育过夜, TBST漂洗3次, 加HRP标记的II抗(1:6 000), 室温孵育1~2 h, TBST漂洗3次后化学发光试剂检测反应。AlphaEaseFC凝胶软件分析系统分析ROCK1、p-MYPT1和 α / β -tubulin条带的光密度值, 以目的蛋白条带和内参 α / β -tubulin条带光密度比值代表目的蛋白的相对表达量, 独立实验重复3次。

1.2.6 免疫组化观察ROCK1的定位表达 肺组织石蜡切片依次脱蜡至水, 高温高压抗原修复2 min, 自然冷却至室温。3% H_2O_2 室温孵育10 min。5%牛血清封闭30 min, 滴加ROCK1 I抗(1:100), 放入4 $^{\circ}$ C冰箱过夜。37 $^{\circ}$ C复温45 min, PBS冲洗3次后滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的II抗37 $^{\circ}$ C孵育30 min。

DAB显色, 苏木素复染, 透明, 封片。PBS代替I抗作为阴性对照, 光镜下观察。结果判读: 显微镜下棕黄色为阳性表达。

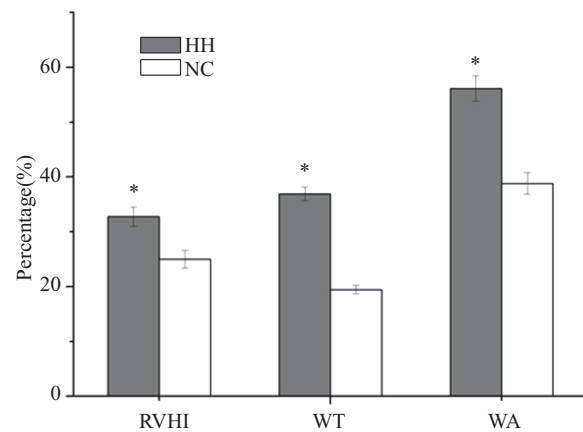
1.3 统计学分析

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组均数比较采用独立样本 t 检验, 所有数据采用SPSS 16.0统计分析软件进行分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 右心肥厚指数(RVHI)变化

两组(NC组和HH组)小鼠按照1.2.2方法处理后, 分别检测右心肥厚指数(RVHI)值。结果如图1所示, 与NC组相比, HH组小鼠RVHI值明显升高, 结果有

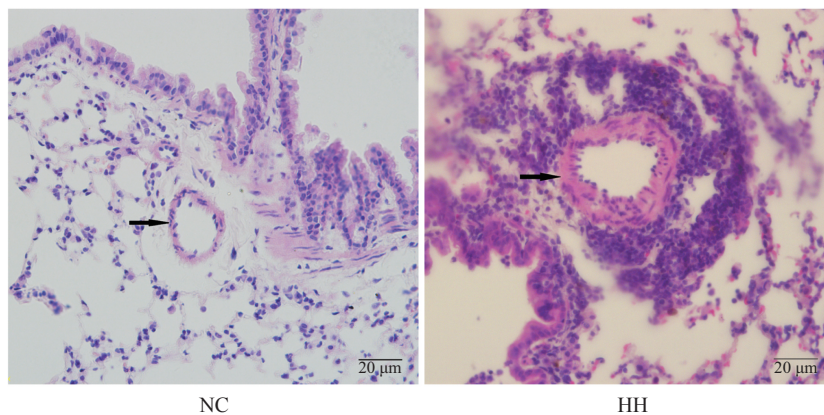


* $P<0.01$, 与NC组比较。

* $P<0.01$ compared with NC group.

图1 两组小鼠右心肥厚指数、WT%和WA%的比较

Fig.1 Comparison of RVHI, WT% and WA% in mice of the two groups

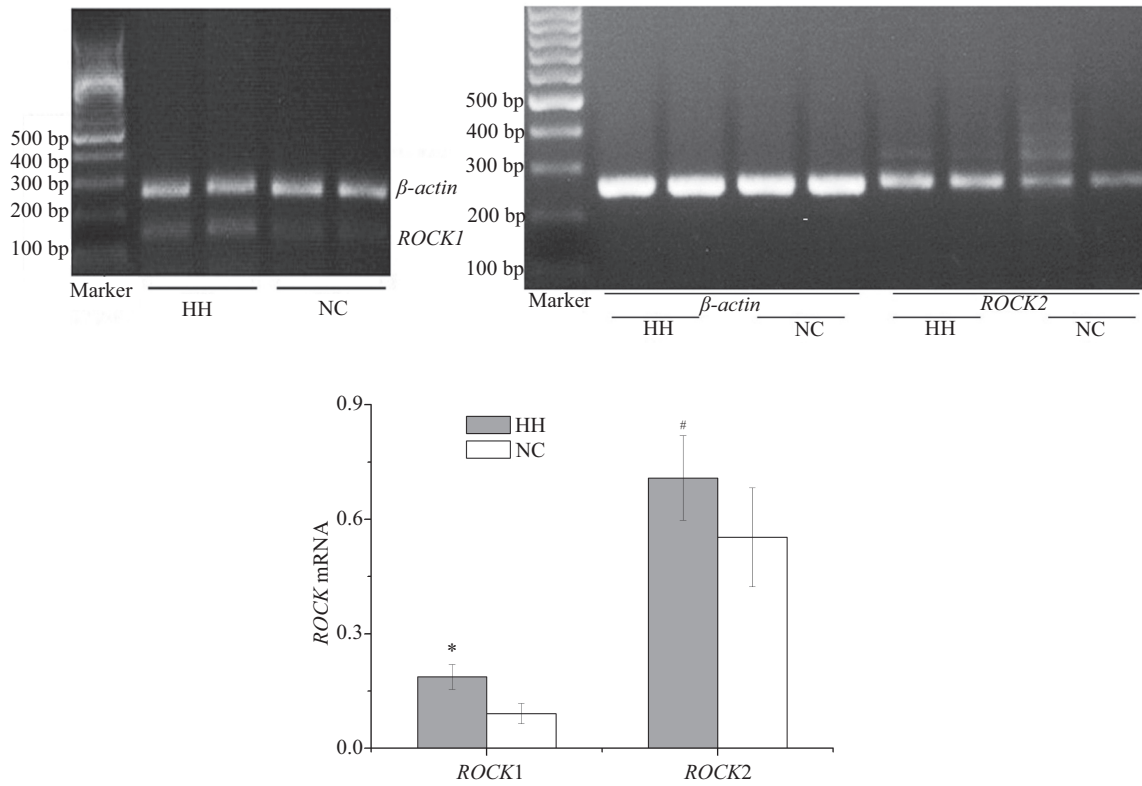


箭头所指的是肺动脉。

The arrow indicates pulmonary artery.

图2 HE染色显示肺动脉形态结构变化

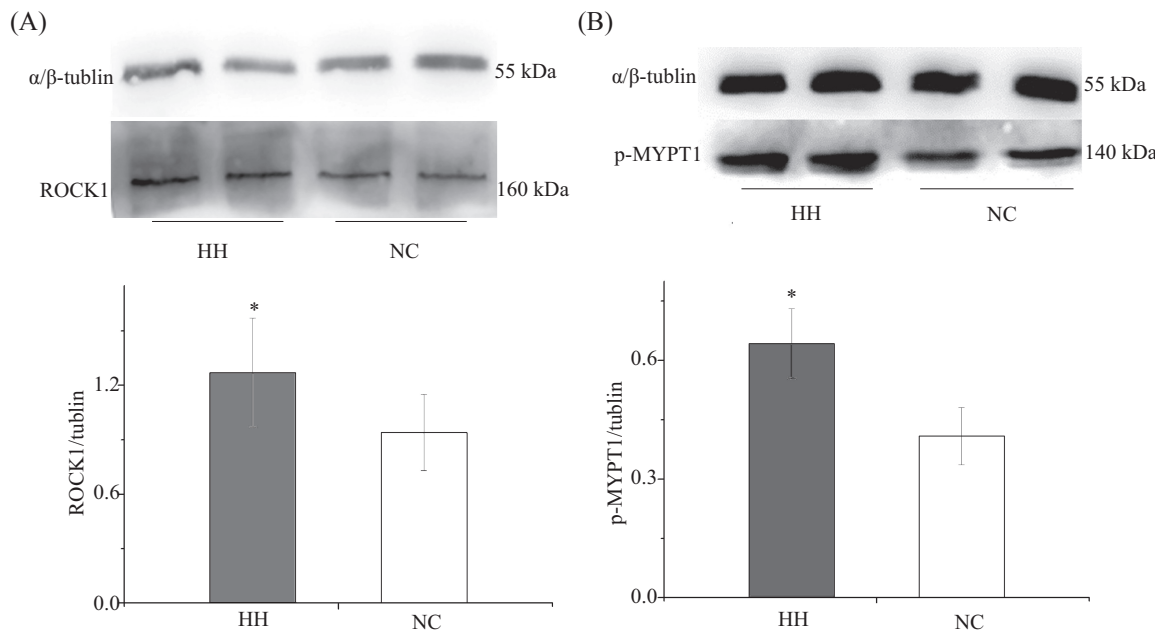
Fig.2 Morphological and structural changes in pulmonary artery observed by HE staining



* $P < 0.01$, # $P < 0.05$.

图3 RT-PCR法检测肺组织*ROCK1*和*ROCK2* mRNA的表达量

Fig.3 The expression of *ROCK1* and *ROCK2* mRNA in lung tissue detected by RT-PCR



* $P < 0.01$.

图4 Western blot法检测肺组织*ROCK1*、*p-MYPT1*蛋白的表达

Fig.4 Expression of *ROCK1* and *p-MYPT1* in the lung tissue detected by Western blot

统计学差异($P<0.01$)。

2.2 肺动脉形态学改变

光镜下, HH组小鼠肺动脉管壁内膜层不均匀增厚并向腔内突起, 中层平滑肌增生、肥厚, 胶原纤维增厚, 管腔明显狭窄, 血管周围出现明显的炎性细胞浸润; NC组小鼠肺动脉结构清晰, 管壁较薄、均匀一致, 平滑肌层未见明显增生, 管腔完整(图2)。IPP图像采集分析系统测量与统计学分析显示: 与NC组相比, HH组小鼠肺动脉管壁厚度占血管外径的百分比WT%和管壁面积占血管总面积的百分比WA%均明显升高, 差异显著($P<0.01$, 图1)。

2.3 *ROCK1*、*ROCK2* mRNA的表达变化

以 β -actin作为内参, 通过RT-PCR检测两组小

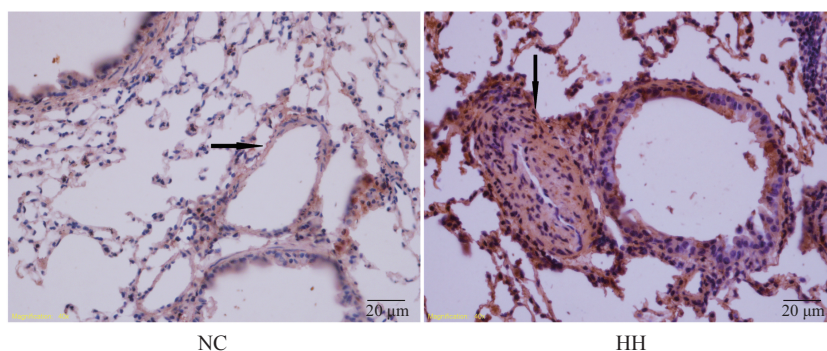
鼠中*ROCK1*和*ROCK2*的基因表达情况, 结果如图3所示: 与NC组相比, HH组小鼠肺组织中*ROCK1*、*ROCK2* mRNA表达显著上调, 差异有统计学意义(*ROCK1* $P<0.01$, *ROCK2* $P<0.05$)。

2.4 *ROCK1*、p-MYPT1蛋白的表达变化

低氧高二氧化碳处理4周后, 与NC组相比, HH组小鼠肺组织中*ROCK1*、p-MYPT1蛋白表达明显增高(图4), 结果有统计学差异($P<0.01$)。

2.5 *ROCK1*蛋白的定位表达

如图5所示, 棕色反应物为*ROCK1*蛋白, 分布于肺动脉、肺泡和支气管, 在肺动脉中主要表达于肺动脉内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞, 肺泡和支气管中则主要表达于肺泡上皮细胞和支气管上皮细胞。



箭头所指的是肺动脉。

The arrow indicates pulmonary artery.

图5 免疫组化观察肺组织*ROCK1*蛋白的定位表达

Fig.5 The location of *ROCK1* in lung tissue observed by immunohistochemistry

3 讨论

高浓度二氧化碳可协同低氧促进肺动脉结构重建和右心室肥厚, 在肺动脉高压及肺心病发生发展中起重要作用^[4]。缺氧使肺部血管收缩增强、血管结构重建、肺动脉压力升高。高二氧化碳可以加重缺氧对内皮细胞和平滑肌细胞的影响而使血管结构变化更明显^[8]。本实验结果显示, 慢性低氧高二氧化碳模型组小鼠的右心肥厚指数升高, 光镜下小鼠肺动脉管壁内膜层、平滑肌层及胶原纤维增厚, 管腔狭窄, 血管周围出现明显的炎性细胞浸润, 管壁厚度占血管外径的百分比、管壁面积占血管总面积的百分比均升高, 说明实验组小鼠的肺动脉高压造模成功, 与我们以往的实验结果相似^[9-10]。

Rho激酶在肺动脉高压发生发展中有重要作

用。文献表明, Rho激酶活化影响内皮细胞、平滑肌细胞的增殖、凋亡、黏附、迁移与收缩, 促使成纤维细胞分裂, 促进炎症细胞和血小板聚集, 抑制内皮细胞一氧化氮合酶表达, 导致肺动脉重构、管腔狭窄、血管持续收缩及肺部炎症反应^[5,6,11-13]。在肺动脉高压患者肺组织中, Rho激酶的mRNA及蛋白表达均升高^[14]。在本实验慢性低氧高二氧化碳模型小鼠肺组织中, Rho激酶在基因与蛋白水平均表达增加, 提示低氧高二氧化碳对Rho激酶在转录水平的促进作用, 可使Rho激酶合成增加, 活性增加, 引起肺小动脉收缩和重构, 最终导致肺动脉高压。这与低氧模型中Rho激酶活化导致肺动脉高压的结果相似^[15-16]。

有研究报道, Rho激酶的调节亚单位磷酸化

MYPT1水平既反映Rho激酶的活化程度,又反映肺动脉血管平滑肌细胞的收缩程度^[1,17]。本实验中,磷酸化MYPT1蛋白表达显著增高,同样提示了Rho酶活性增加和血管收缩增强。

Rho激酶(ROCK1)在肺部广泛表达。本实验光镜下可见血管周围炎性细胞浸润明显,免疫组化显示,ROCK1蛋白分布于肺动脉、肺泡和支气管,根据组织学分析,ROCK1蛋白可能主要表达于肺动脉内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞。我们前期的实验发现,低氧高二氧化碳模型小鼠白介素6表达水平升高^[9]。Ito等^[18]发现,抑制Rho激酶可以降低血管平滑肌细胞白介素6的表达。这提示了Rho激酶与肺部炎症反应密切相关,其机制可能与白介素6等炎症因子改变有关。

综上所述,慢性低氧高二氧化碳性肺动脉高压小鼠肺组织Rho激酶升高可能参与了肺动脉高压形成,其机制可能与促进小鼠的肺动脉增生重构、血管收缩及肺部炎症反应有关。

参考文献 (References)

- Oka M, Homma N, Taraseviciene-Stewart LG, Morris K, Kraskauskas D, Burns N, *et al.* Rho-kinase mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats. *Circ Res* 2007; 100(6): 923-9.
- Cool CD, Groshong SD, Oakey J, Voelkel NF. Pulmonary hypertension: Cellular and molecular mechanisms. *Chest* 2005; 128(6 Suppl): 565S-71S.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, *et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43(12 Suppl S): 13S-24S.
- 徐漫欢, 范小芳, 王小同, 龚永生, 胡良冈, 徐浩, 等. 吸入低氧高二氧化碳对小鼠右心室收缩压及肺小动脉重建的影响. *浙江医学*(Xu Manhuan, Fan Xiaofang, Wang Xiaotong, Gong Yongsheng, Hu Lianggang, Xu Hao, *et al.* Alteration of right ventricular systolic pressure and pulmonary vascular remodeling induced by exposure to low O₂ and high CO₂ in mice. *Zhejiang Medical Journal*) 2008; 30(1): 41-3.
- Connolly MJ, Aaronson PI. Key role of the RhoA/Rho kinase system in pulmonary hypertension. *Pulm Pharmacol Ther* 2011; 24(1): 1-14.
- Loirand G, Guerin P, Pacaud P. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 2006; 98(3): 322-4.
- Nossaman BD, Kadowitz PJ. The Role of the RhoA/rho-kinase pathway in pulmonary hypertension. *Curr Drug Discov Technol* 2009; 6(1): 59-71.
- 陈成水, 蔡孔长, 蒋仲荪, 徐正惠. 吸入高二氧化碳对大鼠慢性常压低氧性肺动脉高压模型的影响. *浙江医学*(Chen Chengshui, Cai Kongzhang, Jiang Zhongsun, Xu Zhenghui. Effect of high carbon dioxide on pulmonary hypertension induced by chronic hypoxic hypercapnia in rats. *Zhejiang Medical Journal*) 1999; 21(8): 464-6.
- 唐巧玲, 商萍, 朱美丽, 金露, 王小同. 慢性低氧高二氧化碳诱导肺动脉高压小鼠肺组织白介素6的表达. *中国病理生理杂志*(Tang Qiaoling, Shang Ping, Zhu Meili, Jin Lu, Wang Xiaotong. Changes of interleukin-6 in pulmonary hypertension mice induced by chronic hypoxic-hypercapnia. *Chin J Pathophysiol*) 2012; 28(1): 100-4.
- 刘银花, 杨汉文, 王小同, 金露, 祝家群, 程英. 羟胺对慢性低氧高二氧化碳大鼠肺动脉高压的影响. *中国病理生理杂志*(Liu Yinhu, Yang Hanwen, Wang Xiaotong, Jin Lu, Zhu Jiaqun, Cheng Ying. Effect of hydroxylamine on pulmonary arterial hypertension induced by chronic hypoxic hypercapnia in rats. *Chin J Pathophysiol*) 2010; 26(11): 2171-4.
- Ming XF, Viswambharan H, Barandier C, Ruffieux J, Kaibuchi K, Rusconi S, *et al.* Rho GTPase/Rho kinase negatively regulates endothelial nitric oxide synthase phosphorylation through the inhibition of protein kinase B/Akt in human endothelial cells. *Mol Cell Biol* 2002; 22(24): 8467-77.
- Shi J, Wei L. Rho kinase in the regulation of cell death and survival. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007; 55(2): 61-75.
- Guilluy C, Eddahibi S, Agard C, Guignabert C, Izikki M, Tu L, *et al.* RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: Role of 5-HT signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179(12): 1151-8.
- Laumanns IP, Fink L, Wilhelm J, Wolff JC, Mitnacht-Kraus R, Graef-Hoechst S, *et al.* The non-canonical wnt-pathway is operative in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009; 40(6): 683-91.
- Nagaoka T, Morio Y, Casanova N, Bauer N, Gebb S, McMurtry I, *et al.* Rho/Rho-kinase signaling mediates increased basal pulmonary vascular tone in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287(4): 665-72.
- Stenmark KR, McMurtry IF. Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension: A time for reappraisal. *Circ Res* 2005; 97(2): 95-8.
- 代丽, 吴尚杰. 阿托伐他汀抑制RhoA/Rho激酶活性逆转低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉高压和肺血管重构. *中南大学学报*(Dai Li, Wu Shangjie. A torvastatin attenuates hypoxic pulmonary hypertension in rats by inhibiting RhoA/Rho kinase pathway. *J Cent South Univ*) 2011; 36(1): 58-63.
- Ito T, Ikeda U, Shimpo M, Ohki R, Takahashi M, Yamamoto K, *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors reduce interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002; 16(2): 121-6.