

主动脉夹层中层 P53、MDM2 及 TRIM25 的表达变化和 VSMC 表型转化

任 伟 王志维 李博文 昌金星 王嘉慧

摘 要 **目的** 探讨主动脉中层中 α -SMA、OPN、P53、MDM2 和 TRIM25 蛋白在主动脉夹层中的表达变化及其意义。**方法** 将 12 例 A 型 AD 手术患者的升主动脉作为实验组,12 例 DCD 供体的升主动脉作为对照组。用免疫组化和 Western blot 法检测 α -SMA、OPN、P53、MDM2、TRIM25 和 p-P53 在 AD 组及对照组中的表达情况,用 RT-PCR 技术检测 AD 组及对照组组织中 P53、MDM2 及 TRIM-25 mRNA 含量。**结果** 通过 Western blot 法和 RT-PCR 法检测结果显示,P53、MDM2 和 TRIM-25 的蛋白、mRNA 含量在 AD 组织中明显增加,免疫组化检测也表明 P53、MDM2 和 TRIM25 含量增加,但其 p-P53 水平却下降。免疫组化结果显示 α -SMA 阳性细胞在 AD 组中的含量较对照组显著减少,而 OPN 阳性细胞在 AD 组增高,进一步 Western blot 法检测也证实了这一变化。**结论** AD 主动脉中层中 VSMC 表型向去分化型转变,而 P53、MDM2、TRIM25 的表达量增高,提示 TRIM25 可能通过影响 P53/MDM2 反馈环而导致 VSMC 表型转变参与 AD 形成。

关键词 主动脉夹层 血管平滑肌细胞 TRIM25 P53 MDM2

中图分类号 R654.3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.02.008

Expression of P53, MDM2 and TRIM25 and VSMC Phenotype Transformation in the Media of Aortic Dissection. Ren Wei, Wang Zhiwei, Li Bowen, et al. Department of Cardiovascular Surgery, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To investigate the expression of α -SMA, OPN, P53, MDM2 and TRIM25 protein in the middle layer of aorta in AD. **Methods** The ascending aorta of 12 patients with type A AD was used as the experimental group, and the ascending aorta of 12 DCD donors served as the control group. The expression of α -SMA, OPN, P53, MDM2, TRIM25 and p-P53 were tested by western blotting and immunohistochemical detection in AD group and control group. P53, MDM2 and TRIM-25 mRNA were detected in AD group and control group by RT-PCR. **Results** By Western blott and RT-PCR examination, we found that P53, MDM2 and TRIM-25 protein and mRNA in AD was significantly increased in tissue. Immunohistochemical detection also showed that the increase of P53, MDM2 and TRIM25 content, but the level of p-P53 was decreased. The results of immunohistochemistry showed that α -SMA positive cells in the AD group were significantly lower than those in the control group, while the OPN positive cells increased in the AD group, which was confirmed by further western blot. **Conclusion** The phenotype of VSMC in AD medial wall was changed to dedifferentiation. The expression of P53, MDM2 and TRIM25 increased, suggesting that TRIM25 may induce the VSMC phenotype to participate in AD formation by affecting the P53/MDM2 feedback loop.

Key words Aortic dissection; VSMC; TRIM25; P53; MDM2

主动脉夹层(aortic dissection, AD)是心血管外科的常见的灾难性疾病之一,其发生率呈逐年上升趋势,目前认为主动脉中层平滑肌的退行性病变、炎症、力学冲击三者参与夹层的发生,平滑肌收缩对血流力学冲击的拮抗是血管的稳态之一,一旦损伤容易诱发夹层。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,

VSMC)的表型转化是主动脉中层退行性变的主要特征,但是其转化的具体机制仍未阐明^[1-3]。三基序蛋白 25(tripartite-motif protein25, TRIM25)能够通过泛素化参与多种细胞功能的调节,包括细胞周期调控和转录,主要在子宫、胚胎及主动脉组织中表达^[4,5]。本研究通过对正常主动脉组织和夹层主动脉中层中 TRIM25、P53、MDM2 表达量变化和 VSMC 表型变化的研究,探讨其在 AD 形成过程的作用及可能机制。

资料与方法

1. 一般资料:选取 2015 年 1 月~2016 年 1 月在武汉大学人民医院行全弓替换手术患者 12 例作为

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81570428);湖北省自然科学基金资助项目(2018CFB141);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2042018kf 0095)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心血管外科

通讯作者:王志维,电子邮箱:wangzhiwei@whu.edu.cn

AD 组。纳入标准:主动脉 CTA 明确诊断为 A 型主动脉夹层,发病 1 周以内;排除标准:马方综合征和特纳综合征等结缔组织疾病,合并二叶式主动脉瓣畸形或胸部损伤,再次心脏手术者和 CTA 或术中发现严重的主动脉壁粥样硬化。正常对照组的患者来自于心脏死亡捐献者,无主动脉疾病史,其他排除标准同上。术前资料总结发现两组患者年龄性别和体重无明显差异,AD 组合并高血压者明显高于正常组,详见表 1。术前签署知情同意书,并获得武汉大学人民医院伦理委员会的批准。

表 1 AD 组和正常对照组的基本特征 $[\bar{x} \pm s, n(\%)]$

项目	正常组	AD 组	P
年龄(岁)	49.1 ± 6.8	50.0 ± 9.3	>0.05
男性	10(83.3)	10(83.3)	>0.05
体重(kg)	59.6 ± 13.7	62.39 ± 12.3	>0.05
高血压	2(16.7)	11(91.7)	<0.05
糖尿病	1(8.3)	0(0)	
吸烟史	4(33.3)	8(66.7)	
血管性结缔组织病	0(0)	0(0)	
主动脉夹层 A 型	0(0)	12(100.0)	

主要试剂骨桥蛋白(OPN)和(平滑肌肌动蛋白(α -SMA)兔单克隆抗体购于北京博奥森公司,P53 和 p-P53(Ser15)鼠抗人单克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司,MDM2 兔抗人单克隆抗体购于英国 Abcam 公司,TRIM25 兔抗人单克隆抗体购于武汉三鹰公司,抗鼠/兔二抗购于美国 Licor 公司。

2. 免疫组化染色:获取升主动脉组织后去除主动脉外膜和内膜,保留中层组织,固定后石蜡包埋,4 μ m 厚切片。石蜡切片二甲苯脱蜡 2 次,梯度乙醇水化,微波修复抗原 10min,3% 双氧水孵育 15min 以阻断内源性过氧化物酶,PBS 冲洗后 5% 山羊血清封闭,分别加入鼠抗人 α -SMA、OPN、P53、TRIM25、MDM2 一抗,稀释比例为 1:100,HRP 标记的抗鼠二抗 37℃ 孵育 30min;各步骤用 PBS 洗 3min × 3 次,DAB 显色剂,苏木素轻度复染,脱水透明后封片。在显微镜下观察阳性染色区域为棕黄色或棕褐色颗粒;采用 Image-Pro Plus 6 图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)对免疫组织化学染色进行计量分析。从每张切片中连续手动随机取 5 个高倍视野(×200 倍)。分别对切片免疫组织化学染色的阳性区域、阳性细胞数进行定量分析,计算每视野阳性染色的积分吸光度(IOD)值,并取积分吸光度之和。

3. Western blot 法实验:将取得的组织在 1~2ml

匀浆皿中于 4℃ 生理盐水中洗净、称量、研磨,加用 400 μ l 单去污剂裂解液 PMSF,裂解 30min 后在 4℃ 下 12000r/min 离心 5min,取上清于 0.5ml EP 管,取少量蛋白提取液,使用 PerkinElmer 酶标仪测定蛋白含量(波长 560nm),标本储存于 -80℃ 备用。将蛋白质样品液与上样缓冲液混合,煮沸 5min,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,半干转法(北京六一公司)将蛋白质转至 PVDF 膜,室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 2h,加入一抗 GAPDH(1:1000), α -SMA、OPN、P53、MDM2、TRIM25、p-P53(1:500)。4℃ 过夜,加带显色剂的抗鼠二抗,室温震动下孵育 2h,TBST 避光洗涤(5min × 3 次)后直接奥德赛扫膜仪(美国 Licor 公司)上扫膜,再对条带进行背景调节和灰度值测定并分析。

4. RT-PCR 检测:称取 200mg 超低温冻存的主动脉中层组织使用液氮碾磨法碾磨成粉末,加入 1ml Trizol 溶液充分匀浆,将匀浆液转移至 EP 管中,室温静置 5min,向上述匀浆裂解液中加入 1/5 体积氯仿,充分混合至乳白色,室温静置 5min,12000 × g 离心力 4℃ 离心 15min,取上层无色上清液至另一 EP 管中,向上清液中加入 0.5~1.0 倍体积的异丙醇,上下颠倒充分混匀后室温静置 10min,12000 × g 离心力 4℃ 离心 10min,弃上清,加入与 Trizol 等体积的 75% 乙醇,轻轻颠倒洗涤,7500 × g 离心力 4℃ 离心 5min 后弃去上清,倒扣 EP 管干燥沉淀后,加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀,紫外分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。按照日本 TaKaRa 公司反转录试剂盒说明书(RR047A),反应分两步,步骤一:取一 PCR 管,分别加入 5 × gDNA Eraser Buffer 2 μ l,gDNA Eraser 1 μ l,Total RNA 1 μ g,然后用 RNase Free dH₂O 补足至 10 μ l,于 PCR 仪上 42℃ 保温 2min,迅速置冰上冷却;步骤二:提前配制 Master Mix,将步骤一的 10 μ l 反应液与 Master Mix 10 μ l 混匀后于 PCR 仪上按照 37℃ 15min → 85℃ 5s → 4℃ ∞ 设定程序进行反应,上述所有反转录程序均为 1 个循环。反转录完成后按照 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒(RR820A)进行 PCR,反应体系如下(总体积 20 μ l):SYBR Premix Ex Taq 10 μ l + PCR Forward Primer (10 μ mol/L) 0.8 μ l + PCR Reverse Primer (10 μ mol/L) 0.8 μ l + ROX Reference Dye II 0.4 μ l + DNA 模板 2 μ l + dH₂O 6 μ l;扩增程序如下:Stage 1 (1 Reps): 95℃ 30s → Stage 2 (40 Reps): 95℃ 5s → 60℃ 34s → Dissociation。所有引物均在上海生物工程股份有限公司合成,各基因引物序列如下:P53 上游引物:5'-AGGTTGGCTCTGACTG-

TACC - 3', 下游引物: 5' - GATTCTCTTCCTCTGT-GCGC - 3'; MDM2 上游引物: 5' - CAGGCAGGG-GAGAGTGATA - 3', 下游引物: 5' - GTGATG-GAAGGGGGGGATT - 3'; TRIM25 上游引物: 5' - AATACACGGAAATGAAGGCT - 3', 下游引物: 5' - AACTCATCCCTCTTGCTCAG - 3'; β - actin 上游引物: 5' - AGCGAGCATCCCCAAAGTT - 3', 下游引物: 5' - GGGCACGAAGGCTCATCATT - 3'。

5. 统计学方法: 使用 GraphPad 7.0 软件完成所有统计分析。所有计量资料表示为均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 采用 t 检验比较实验组与对照组样本, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 免疫组化检测主动脉中层平滑肌细胞变化: 主动脉中层的主要细胞成分就是平滑肌细胞, 免疫组化证实获取组织主要细胞成分是 α - SMA 阳性的平滑肌细胞。已有研究表明 VSMC 由分化型转变成未分化型会导致 SMC 收缩功能减弱, 而这有可能导致主动脉中层组织薄弱。在本实验中, 分别检测主动脉中层分化型 VSMC 表型标志物 α - SMA 和未分化型表型标志物 OPN。通过免疫组化染色实验发现, 与正常对照组比较, 在 AD 组血管中层的 α - SMA 含量显著降低而 OPN 含量显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1, 表 2)。

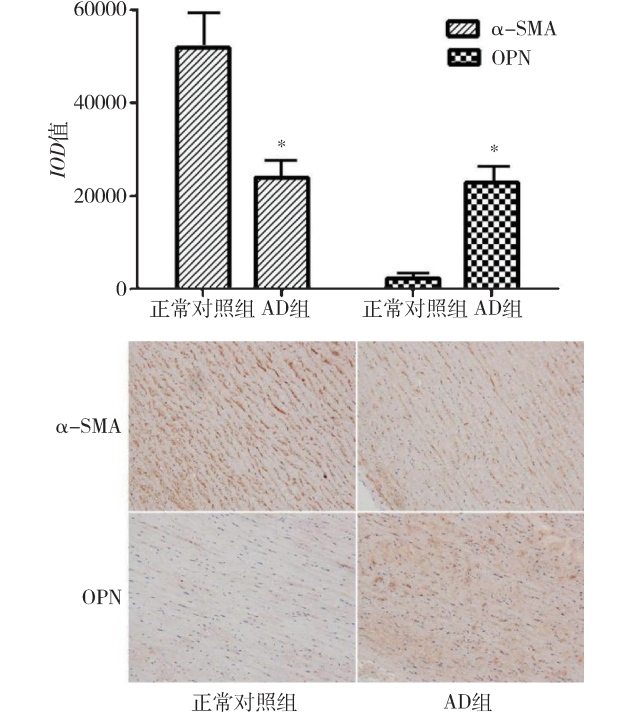


图 1 两组主动脉 α - SMA 和 OPN 表达免疫组化 ($\times 200$)
与正常对照组比较, * $P < 0.01$

表 2 主动脉 α - SMA 和 OPN 免疫组化 IOD 值

IOD 值	正常对照组 (n = 12)	AD 组 (n = 12)
α - SMA	518930 $\pm$ 7408	23985 $\pm$ 3975 *
OPN	2224 $\pm$ 485	22947 $\pm$ 3381 *

与正常对照组比较, * $P < 0.01$

2. 免疫组化检测主动脉中层 P53、MDM2 和 TRIM25 含量变化: 通过免疫组化检测发现 AD 组中层的 P53、MDM2 和 TRIM25 含量与正常对照组比较显著增多, 而 p - P53 蛋白表达量下降比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2, 表 3)。

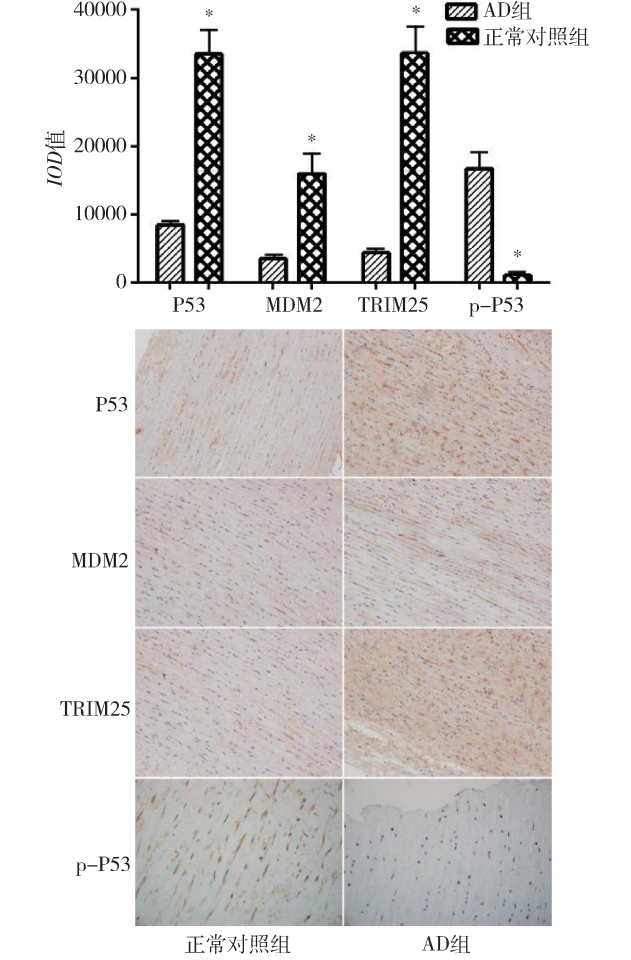


图 2 AD 组和正常对照组主动脉中层 (免疫组化, $\times 200$)
与正常对照组比较, * $P < 0.01$

表 3 P53、MDM2、TRIM25 和 p - P53 IOD 值

IOD 值	正常对照组 (n = 12)	AD 组 (n = 12)
P53	8484 $\pm$ 544	33537 $\pm$ 4310 *
MDM2	3475 $\pm$ 518	15961 $\pm$ 3767 *
TRIM25	4379 $\pm$ 460	33613 $\pm$ 4808 *
p - P53	16731 $\pm$ 2829	1035 $\pm$ 317 *

与正常对照组比较, * $P < 0.01$

3. Western blot 法检测主动脉中层蛋白表达:与正常对照组比较, α -SMA 和 p-P53 在 AD 患者主动脉组织内表达显著降低($P < 0.01$),而在 AD 患者主动脉组织中 OPN、P53、MDM2、TRIM25 蛋白水平却显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$,表 4,图 3)。

4. RT-PCR 检测结果:进一步通过 RT-PCR 检测了 P53、MDM2 和 TRIM25 的 mRNA 表达,发现夹层组中 P53、MDM2 和 TRIM25 的 mRNA 表达量也增加($P < 0.01$,表 5,图 4)。

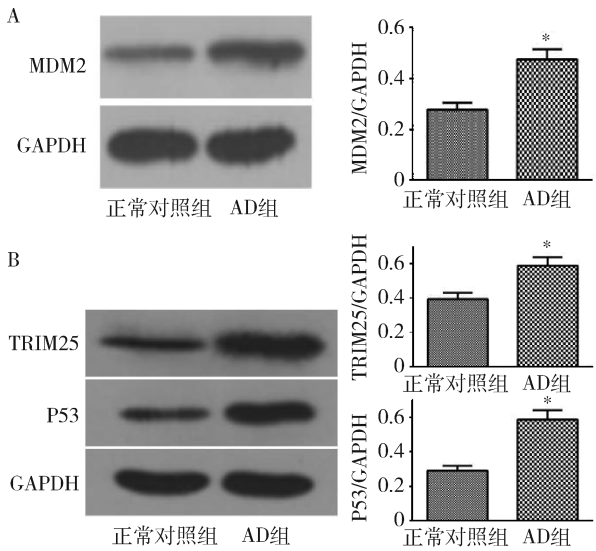


图 3 Western blot 法检测结果

A. MDM2; B. TRIM25 和 P53; C. α -SMA、OPN 和 p-P53;与正常对照组比较, * $P < 0.01$

表 5 AD 组和正常对照组 P53、MDM2、TRIM25 mRNA 表达水平

mRNA	正常对照组 ($n = 12$)	AD 组 ($n = 12$)
P53	1.000 $\pm$ 0.000	2.235 $\pm$ 0.203 *
MDM2	1.000 $\pm$ 0.000	1.697 $\pm$ 0.203 *
TRIM25	1.000 $\pm$ 0.000	1.794 $\pm$ 0.191 *

与正常对照组比较, * $P < 0.01$

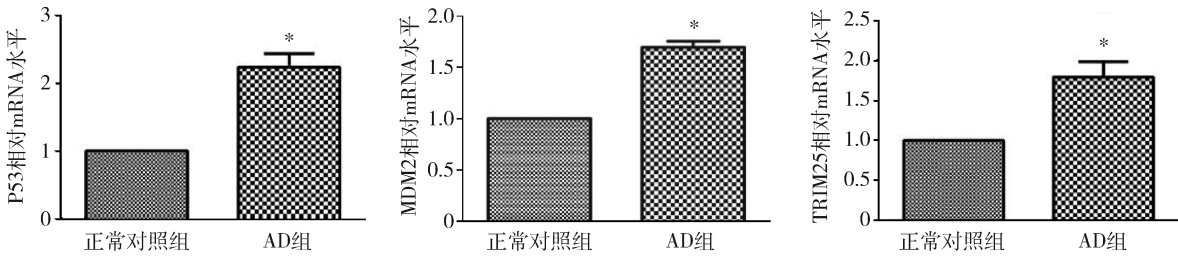


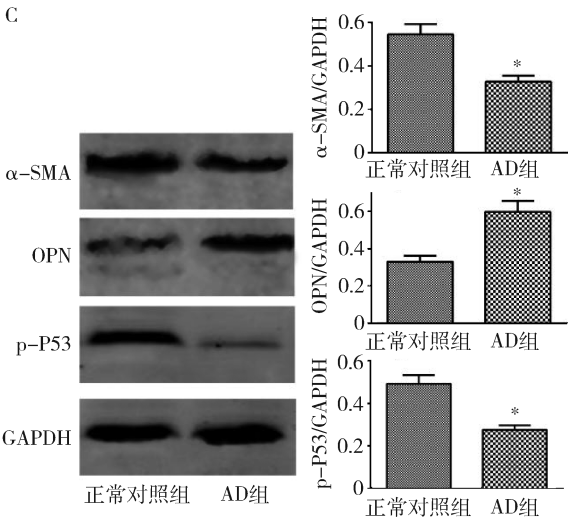
图 4 两组 P53、MDM2、TRIM25 mRNA 表达水平

与正常对照组比较, * $P < 0.01$

表 4 AD 组和正常对照组相关蛋白表达水平

项目	正常对照组 ($n = 12$)	AD 组 ($n = 12$)
α -SMA/GAPDH	0.544 $\pm$ 0.048	0.326 $\pm$ 0.028 *
OPN/GAPDH	0.330 $\pm$ 0.031	0.598 $\pm$ 0.058 *
P53/GAPDH	0.290 $\pm$ 0.028	0.588 $\pm$ 0.055 *
MDM2/GAPDH	0.276 $\pm$ 0.027	0.475 $\pm$ 0.039 *
TRIM25/GAPDH	0.393 $\pm$ 0.037	0.589 $\pm$ 0.051 *
p-P53/GAPDH	0.491 $\pm$ 0.041	0.275 $\pm$ 0.020 *

与正常对照组比较, * $P < 0.01$



讨 论

AD 的典型组织学特征是中层退行性变,目前对主动脉中层退行性变的分子机制正被广泛研究,但尚未阐明^[6]。大量研究显示微纤维、胶原、蛋白聚糖和黏多糖、血管 VSMC 等主动脉壁的组成结构和功能异常是 AD 发生的病理基础。而 VSMC 的表型转化和

凋亡在 AD 发生、发展中扮演重要角色,其受多种信号通路调节包括 MAPK、PI₃K 和 cAMP 等^[7,8]。最近发现 P53 是 VSMC 分化的强诱导因子,P53 导致

VSMC 由去分化型向分化型转化,分化型 VSMC 可以维持血管弹性和收缩血管,不易导致主动脉中层退行性变^[9]。Leeper 等也发现,CDKN2B 缺失的情况下,

P53 表达上调,动物模型主动脉瘤形成。在本实验中也证实 AD 组中 P53 含量明显增多, α -SMA 含量减少,说明 AD 中 VSMC 由分化型向去分化型转变。但这违背了 P53 作为 VSMC 分化诱导因子的功能。

P53 下游转录激活产物之一是 MDM2,它可以通过与 P53 结合形成复合物,维持低水平的 P53 蛋白表达进而抑制 P53 介导的转录活性,这个 P53/MDM2 反馈回路也是保持机体生理功能的重要机制之一。如果出现了各种刺激因素包括低氧、DNA 损伤和核苷酸缺失等情况会导致 P53 蛋白表达和转录活性迅速增加,从而激活下游的靶基因 MDM2。当 DNA 修复后,负调节因子 MDM2 开始反馈抑制 P53,从而防止 P53 的进一步作用^[10,11]。而在本研究中发现 AD 组的 MDM2 含量较正常组显著增加。在 AD 组主动脉中层组织中,Western blot 法检测 MDM2 的蛋白含量增加,并且通过 RT-PCR 检测笔者发现 MDM2 的 mRNA 含量较对照组增加数倍。所以,笔者推测在 AD 发病过程中,MDM2 和 P53 的负反馈平衡被打乱:增加的 P53 促进 MDM2 的 mRNA 表达量增加,使 MDM2 的 mRNA 表达量增多进而增加 MDM2 的蛋白含量,但是增加的 MDM2 蛋白不能降解 P53 蛋白,导致 P53 蛋白的稳定性增加并致使 P53 在 AD 中层组织中聚集。

MDM2 可通过多种分子机制参与对 P53 的反馈抑制,包括:①P53 的活性由多种因素决定,激活的 P53 在细胞核内激活其靶基因的转录,其降解在胞质中进行。核输出序列(NES)和核定位序列(NLS)是 MDM2 具有核质穿梭能力的重要标志,亚细胞定位对于其抑制 P53 转录活性非常重要。如果 P53 在高表达状态,细胞核中的 P53 可以被 MDM2 直接降解。如果 P53 在低表达状态时,其转录激活位点可以被具有 MDM2 突变的 NES 结合,从而抑制 P53 活性;②MDM2 的 N 端具有疏水和芳香氨基酸形成的深沟,P53 作为转录因子 TFIID 的组成部分与 MDM2 结合后抑制了其转录激活靶基因的能力;③P53 蛋白的特异性 E₃ 连接酶就是 MDM2,其可以使 P53 蛋白和泛素相连接后泛素化 P53,再被蛋白酶在胞质中降解^[12,13]。

而 TRIM25 作为一种泛素化 E₃ 连接酶,主要表达在胚胎、子宫、甲状腺、主动脉和脾脏中表达,很少在其他组织中表达。有研究报道,在经雌激素治疗过的乳腺癌患者中可检测到高水平的 TRIM25、P53 和 MDM2 的表达^[14]。而本研究发现夹层组的 TRIM-25 蛋白和 mRNA 水平的表达量均显著增加。因而笔者推测可能由于夹层中 TRIM-25 的表达量增加竞

争性抑制 MDM2 与 P53 的泛素化降解从而增加 P53 含量。但是 P53 的活性受到抑制,从而不能诱导 VSMC 分化,通过 Western blot 法检测也发现夹层组 P53 的磷酸化水平降低。

综上所述,AD 主动脉中层中 P53、MDM2 及 TRIM 25 表达量均显著增加,主动脉中层中 VSMC 表型向去分化型转变,可能是由于 P53/MDM2 反馈平衡被 TRIM25 打乱所致。但是 P53、MDM2 及 TRIM25 在主动脉中层组织中的增多究竟是 AD 发病之前的诱因或者是其发病之后的结果,同时高血压对血管平滑肌细胞的影响如何?这需要进一步在体外细胞和动物实验来验证 TRIM-25 的过表达是否会导致 MDM2 和 P53 结合障碍从而引起其含量增加,导致 VSMC 表型和功能发生变化。

参考文献

- 1 Erbel R. Diagnosis and management of aortic dissection [J]. Eur Heart J, 2001, 22(18): 1642-1681
- 2 孙立忠. 急性主动脉夹层——我国主动脉外科急需攻克的难关 [J]. 中华胸心血管外科杂志, 2014, 30(6): 321-322
- 3 He R, Guo DC, Estrera AL, et al. Characterization of the inflammatory and apoptotic cells in the aortas of patients with ascending thoracic aortic aneurysms and dissections [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2006, 131(3): 671
- 4 Zheng X, Wang X, Tu F, et al. TRIM25 is required for the antiviral activity of Zinc-finger antiviral protein (ZAP) [J]. J Virol, 2017, 91(9): e00088-17
- 5 Zhang P, Blattner C. The estrogen-inducible finger-protein TRIM25 controls p53 abundance and activity [C]. Congress of the Federation of European Biochemical Societies, 2015: 28-29
- 6 Homme JL, Aubry MC, Edwards WD, et al. Surgical pathology of the ascending aorta: a clinicopathologic study of 513 cases [J]. Am J Surg Pathol, 2006, 30(9): 1159
- 7 Li B, Wang Z, Hu Z, et al. P38 MAPK signaling pathway mediates angiotensin II induced Mr143/145 gene cluster down-regulation during aortic dissection formation [J]. Ann Vasc Surg, 2017, 40: 262-273
- 8 Hirakata S, Aoki H, Nishihara M, et al. Abstract 13649: protective role of Stat3 in vascular smooth muscle cells during the development of acute aortic dissection [J]. Circulation, 2014, 130(1): A13649
- 9 Allaire E, Muscatelli-Groux B, Mandet C, et al. Paracrine effect of vascular smooth muscle cells in the prevention of aortic aneurysm formation [J]. J Vascular Surg, 2002, 36(5): 1018-1026
- 10 Tackmann NR, Zhang Y. Mouse modeling of the MDM2/MDMX-p53 signaling axis [J]. J Mol Cell Biol, 2017, 9(1): 34-44
- 11 Sriraman A, Li Y, Dobbstein M. Fortifying p53-beyond Mdm2 inhibitors [J]. Aging, 2016, 8(9): 1836-1837
- 12 Fang S, Jensen JP, Ludwig RL, et al. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53 [J]. J Biol Chem, 2000, 275(12): 8945
- 13 Qin Y, Cui H, Zhang H. Overexpression of TRIM25 in lung cancer regulates tumor cell progression [J]. Technol Cancer Res Treat, 2016, 15(5): 707
- 14 Gack MU, Shin YC, Joo CH, et al. TRIM25 RING-finger E₃ ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity [J]. Nature, 2007, 446(7138): 916-920

(收稿日期: 2018-04-15)

(修回日期: 2018-06-01)