

RhoA/ROK 通路在糖尿病桥血管病变中作用机制的研究

丁荣晶 夏昆 冯文会 李大连 程智广 郭建中 胡大一

作者单位:100044 北京市,北京大学人民医院心脏中心(丁荣晶 胡大一)

100050 北京市,首都医科大学附属北京友谊医院心脏中心(夏昆)

100043 北京市,首都医科大学附属北京朝阳医院心脏中心(冯文会 李大连 程智广 郭建中)

【摘要】 目的 分析糖尿病(diabetes mellitus, DM)对行冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting, CABG)患者桥血管 RhoA/ROK 表达的影响及其 RhoA/ROK 通路在桥血管病变中的作用机制,为临床合理选择桥血管以及桥血管病变防治提供理论依据。方法 选择行 CABG 患者 14 例,其中 DM 和非 DM 患者各 7 例,术中取其废弃的配对桡动脉(radial artery, RA)、乳内动脉(internal mammary artery, IMA)、大隐静脉(great saphenous vein, GSV)。应用体外血管环灌注方法,检测配对 RA、IMA、GSV 对苯肾上腺素(phenylephrine, PE)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)及法苏地尔(fasudil)的反应。将配对 RA、IMA、GSV 分别进行 RhoA 免疫组化及 RhoA、ROK mRNA 的 RT-PCR 检测。结果 与非 DM 组比较,DM 组 GSV 对 PE 收缩反应增强,对 Ach 和 fasudil 的舒张反应减弱,且差异均有统计学意义(P 均 <0.05); RA 和 IMA 对 PE、Ach 和 fasudil 的反应在两组间差异均无统计学意义(P 均 >0.05);与非 DM 组比较,DM 组 GSV 中 RhoA 表达增强,且差异具有统计学意义($P<0.05$),而 IMA、RA、RhoA 表达两组间差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。DM 组 GSV RhoA 中 ROK mRNA 表达水平较非 DM 组显著升高且差异均有统计学意义(P 均 <0.01);RA、IMA 中 RhoA、ROK mRNA 表达两组差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。结论 DM 时 GSV RhoA/ROK 表达增加,RA、IMA 中 RhoA/ROK 表达无明显变化。

【关键词】 桡动脉;乳内动脉;大隐静脉;RhoA/ROK 通路

The mechanism action research of RhoA/ROK passway in bypass blood vessel with DM

DING Rong-jing¹, XIA Kun², FENG Wen-hui³, et al. ¹Heart Center of Beijing University People's Hospital, Beijing 100044, China ²Heart Center of Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital University of Medical Science, Beijing 100050, China ³Heart Center of Beijing Chao-Yang Hospital Affiliated to Capital University of Medical Science, Beijing 100043, China

【Abstract】 Objective To analysis the influence of DM to the expression of RhoA/ROK in bypass blood vessel of patients undergoing coronary artery bypass grafting (CABG) and the mechanism of action of RhoA/ROK passway in blood vessel lesion, and to provide theory foundation for reasonable choose and lesion prevetion of bypass blood vessel. Methods 14 cases patients including 7 DM and 7 non-DM undergoing CABG were recruited. Matched segments including radial artery(RA), internal mammary artery(IMA) and great saphenous vein (GSV) which would be discarded were obtained from these patients. The response to phenylephrine (PE), acetylcholine (Ach) and fasudil of RA, IMA and GSV were tested by vascular circle perfusion in vitro. Matched segments of RA, IMA and GSV were tested for RhoA expression by immunohistochemistry, for RhoA, ROK mRNA by RT-PCR. Results The contractile response of GSV to PE were higher and the relaxation response to Ach and fasudil were lower in DM group than in non-DM group and the differences all had statistical significance ($P<0.05$). There were no statistical significance in the difference of response of IMA and RA to PE, Ach and fasudil between the two groups ($P>0.05$). The GSV RhoA expression in DM group were higher than in non-DM group and the difference had statistical significance($P<0.05$), while there were no statistical significance in the differences of IMA and RA RhoA expression between the two groups ($P>0.05$). The levels of GSV RhoA, ROK mRNA expression in DM group were higher than in non-DM group and the differences all had statistical significance($P<0.01$). There were no statistical significance in the differences of IMA and RA RhoA, ROK mRNA expression between the two groups ($P>0.05$). Conclusion The level of GSV RhoA/ROK expression in DM group is higher than in non-DM group. There is no significance change in the expression of RhoA/ROK in RA, IMA.

【Key words】 Radial artery; Internal mammary artery; Great saphenous vein; RhoA/ROK pathway

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是导致冠状动脉旁路移植术(coronary artery bypass grafting, CABG)预后不良的重要因素,因此DM患者行CABG术时桥血管的选择非常重要。有多个研究证实DM时动脉桥的远期开通率明显优于静脉桥,但其理论基础尚不十分清楚。RhoA/Rho 激酶(Rho kinase, ROK)通路通过对平滑肌细胞增殖调节^[1],参与桥血管痉挛发生,促进细胞增殖、分化、移动、凋亡等^[2,3],在动脉粥样硬化发病机制中发挥重要作用^[4-6]。动物实验^[7,8]显示DM状态ROK基因表达明显增强,而ROK抑制剂可明显改善桥血管的远期开通率。由此,推测RhoA/ROK通路可能在桥血管病变中发挥作用。

DM是否影响人桥血管ROK表达目前尚不清楚。本文拟通过探讨DM和非DM患者桥血管桡动脉(radial artery, RA)、乳内动脉(internal mammary artery, IMA)、大隐静脉(great saphenous vein, GSV)RhoA/ROK表达的差异,探讨作用机制,为临床更全面理解桥血管病变的病理生理基础,选择适当桥血管,寻找防治桥血管病变的新靶点提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 基本资料 选择2006年5月至2006年12月于我院心外科住院,经冠脉造影证实为多支弥漫病变、行CABG患者14例,其中DM和非DM患者各7例。年龄43~75岁,平均年龄(58.93±10.7)岁。术中取其废弃RA、IMA、GSV各约5~10 mm。所有患者术前均接受常规心血管药物治疗,包括β受体阻滞剂、钙离子拮抗剂、血管紧张素转换酶抑制剂、硝酸酯类药物、抗凝药等。术前停用扩血管药物24 h。排除标准:1、术中血液动力学不稳定、有明确缺血表现;2、自身免疫性疾病及放疗患者;3、依赖胰岛素治疗的DM患者及术前服用优降糖的患者;4、服用细胞毒性药物的患者;5、任何条件影响RA、IMA、GSV获取和吻合的病例;6、RA、IMA、GSV标本不完整病例。

1.2 方法

1.2.1 体外血管环灌流试验 共取得配对RA、IMA、GSV各14根,经 10^{-5} mol/L苯肾上腺素(phenylephrine, PE)检测血管活性,对于收缩张力<1 g的血管视为无活性,废弃。所获得配对RA、IMA、GSV血管各14根均可用。分别给予 10^{-5} mol/L PE和 10^{-5} mol/L乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)检测三种血管对两种药物的收缩及内皮依赖舒张反应。以 10^{-5} mol/L PE预收缩血管后,检测 10^{-7} mol/L~ 10^{-4} mol/L法苏地尔(fasudil)对三种血管的舒张作用,记录浓

度-反应曲线。以PE诱导的最大收缩幅度为标准值100%,以血管张力数值表示,单位为克;Ach对血管环的舒张强度用舒张率(%)表示,即加药后血管收缩下降幅度与加药前收缩幅度的百分比。达到药物最大收缩或舒张反应一半时的药物浓度为 EC_{50} ,用于比较fasudil对三种血管的舒张作用。

1.2.2 血管组织免疫组化及mRNA检测 14例CABG患者均获得RA、IMA、GSV三种血管。(1)免疫组化染色:切片用3% H_2O_2 灭活内源性过氧化物酶,经抗原修复后加二抗,同种动物正常血清封闭,然后加入鸡抗人RhoA (GDP/GTP结合蛋白)(美国usbio公司),二抗为辣根过氧化物酶标记链酶卵白素,DAB显色。阳性结果为细胞膜或胞浆染成棕褐色。应用IMS细胞图像分析系统,高倍电子显微镜下每个标本取三个视野,采用医学图像分析软件计数每个视野阳性目标积分光密度,取其三次检测平均值。(2)血管壁RhoA、ROK mRNA表达检测:用Tripure试剂提取组织总RNA。用核酸蛋白测定仪鉴定RNA纯度和含量,所用RNA的A260/280均在1.8~2.0之间。用M MLV逆转录酶将提出的RNA逆转录为cDNA。以cDNA为模板进行PCR扩增反应。PCR的特异性引物由上海生工生物科技有限公司制备合成。①GAPDH (108 bp)上游引物:5'-CATCCATGACAACCTTTGGTATC-3',下游引物:5'-CCATCAGCCACAGTTTC-3';②RhoA (244 bp)上游引物:5'-ACCAAGTTCACAGAGGTGTATGT-3',下游引物:5'-TTGGGACAGAAATGCCTTGACTTC-3';③ROK (512 bp)上游引物:5'-GAGCAACTATGATGTGCCTGAAAAAT-3',下游引物:5'-GATGTCGTTTGATTCTTC-3'。扩增条件为94℃ 5 min后进行以下循环:94℃ 30 s,50℃ (ROK) 或54℃ (RhoA, GAPDH) 30 s,72℃ 45 s,循环35次,最后延伸72℃ 10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后扫描拍照,以GAPDH (230 bp)吸光度作为内参照。

1.2.3 统计学处理 采用SPSS 11.5统计软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。成组设计的两样本均数比较采用t检验。非正态分布计量资料采用秩和检验,成组设计两样本比较采用Wilcoxon法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组间一般资料比较 由表1、2可见,DM组和非DM组间胰岛素抵抗指数、血糖及糖化血红蛋白水平差异均具有统计学意义(P 均 < 0.05),其余指标之间差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

2.2 血管环张力试验统计结果比较 DM 对 IMA、RA、GSV 收缩和内皮舒张功能的影响见表 2; 10^{-5} mol/L PE、 10^{-5} mol/L Ach 对 DM 和非 DM 组 IMA 和 RA 反应相似, 差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05); 而 DM 组 GSV 对 PE 反应明显强于非 DM 组, 两组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), DM 组 GSV 对 Ach 内皮依赖舒张反应较非 DM 组明显减弱, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 3。 $10^{-7} \sim 10^{-4}$ mol/L fasudil 对 RA 和 IMA 舒张作用在 DM 组和非 DM

组中差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。 $10^{-7} \sim 10^{-4}$ mol/L fasudil 对 GSV 舒张作用在 DM 和非 DM 组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$), EC_{50} 值为: $(3.77 \pm 0.66) \times 10^{-8}$ mol/L vs $(4.35 \pm 0.55) \times 10^{-7}$ mol/L。 结果见表 4。

2.3 IMA、RA、GSV 血管壁 RhoA 表达免疫组化结果比较 RhoA 蛋白免疫组织化学染色呈棕褐色, 在 IMA、RA、GSV 血管壁内膜内皮细胞、中膜平滑肌细胞的胞浆及胞膜表达 (见图 1)。DM 组 GSV RhoA 蛋

表 1 DM 组及非 DM 组一般资料比较

组别	例数	年龄 (岁)	性别 (男/女)	BMI (kg/m ²)	胰岛素抵抗 指数	TC (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/dL)	TC (mmol/L)
DM 组	7	59.86±7.79	6/1	24.86±1.34	2.90±1.14	4.96±0.67	0.88±0.12	2.95±0.57	2.20±1.24
非 DM 组	7	58.00±12.53	7/0	25.47±1.97	1.76±0.57	5.24±0.91	0.88±0.17	3.02±0.72	2.48±0.51
P 值		0.745	0.708	0.509	0.035	0.510	1.000	0.856	0.587

表 2 DM 组及非 DM 组一般资料比较

组别	血糖 (mmol/L)	胰岛素 (u/L)	糖化血红蛋白 (%)	吸烟 (n)	高血压 (n)	高胆固醇血症 (n)	药物治疗			
							硝酸酯类 (n)	β 受体阻滞剂 (n)	ACEI (n)	钙拮抗剂 (n)
DM 组	6.55±1.28	10.19±3.32	7.22±0.58	4	7	3	7	7	7	1
非 DM 组	4.88±0.78	8.03±2.54	5.71±0.29	4	6	5	7	7	7	1
P 值	0.013	0.197	0.001	0.923	0.777	0.054	0.925	0.738	0.857	0.729

表 3 PE、Ach 对 DM 和非 DM 组 IMA、RA、GSV 反应比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IMA		RA		GSV	
		Ach (%)	PE (g)	Ach (%)	PE (g)	Ach (%)	PE (g)
DM 组	7	78.84±9.66	2.04±0.76	67.73±14.37	2.86±0.42	32.71±7.84*	3.31±1.03*
非 DM 组	7	76.21±17.64	1.88±1.32	72.47±18.81	3.80±0.98	57.49±9.31	1.98±0.67

注: * 与非 DM 组比较, $P < 0.05$



图 1a GSV(非 DM)×400

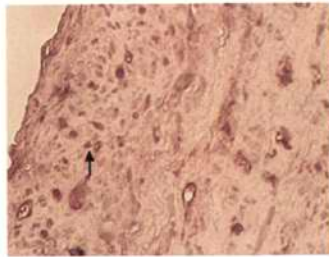


图 1b GSV(DM)×400

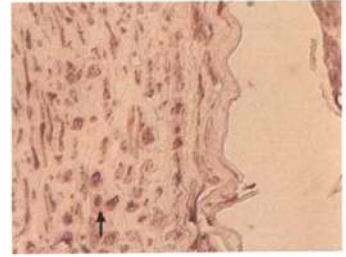


图 1c IMA(非 DM)×400

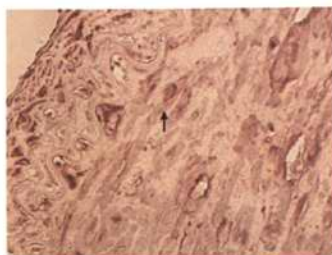


图 1d IMA(DM)×400

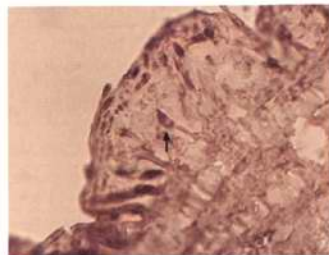


图 1e RA(非 DM)×400

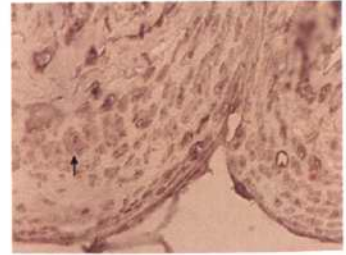


图 1f RA(DM)×400

图 1 DM、非 DM 患者的 IMA、RA、GSV 血管壁 RhoA 蛋白免疫组化表达

注: RhoA 蛋白免疫组织化学染色呈棕褐色, 在 IMA、RA、GSV 血管壁内膜内皮细胞、中膜平滑肌细胞的胞浆及胞膜表达。箭头示阳性表达



白表达明显增强,与非 DM 组比较差异有统计学意义($P<0.05$);RA、IMA RhoA 表达两组之间差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。见表 5。

2.4 DM 组和非 DM 组中 IMA、RA、GSV 血管壁 RhoA、ROK mRNA 表达水平比较 结果显示 DM 组 GSV 中 RhoA、ROK mRNA 表达水平显著高于非 DM 组且差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。RA、IMA 中 RhoA、ROK mRNA 表达水平两组比较差异均无统计

学意义(P 均 >0.05)。(见表 6,图 2、3)。

3 讨论

RhoA/ROK 通路通过调节平滑肌收缩、细胞黏附、迁移、增殖和基因表达等参与动脉粥样硬化、高血压、血管痉挛的发生、发展。据文献^[2]报道,应用 ROK 抑制剂可明显缓解桥血管痉挛,且另有动物实验^[6]显示 ROK 抑制剂可改善静脉桥血管开通率,提示 RhoA/ROK 通路在桥血管病变中发挥着重要作

表 4 fasudil 对 DM 和非 DM 组 IMA、RA、GSV 舒张作用的比较($\bar{x}\pm s$, mol/L)

组别	例数	IMA	RA	GSV
DM 组	7	(3.06±0.43)×10 ⁻⁶	(5.93±0.38)×10 ⁻⁸	(3.77±0.66)×10 ⁻⁸ *
非 DM 组	7	(3.12±0.39)×10 ⁻⁶	(6.04±0.42)×10 ⁻⁸	(4.35±0.55)×10 ⁻⁷

注:*与非 DM 组比较, $P<0.05$

表 5 IMA、RA、GSV 血管壁 RhoA 表达免疫组化结果比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	IMA	RA	GSV
DM 组	7	12809.4±1999.9	24661.2±6272.1	23224.9±6405.9*
非 DM 组	7	15060.0±2484.7	26.19.4±4163.5	16461.2±3312.1

注:*与非 DM 组比较, $P<0.05$

表 6 DM、非 DM 组血管壁 RhoA、ROK mRNA 表达水平的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	RhoA/GAPDH			ROK/GAPDH		
		IMA	RA	GSV	IMA	RA	GSV
DM 组	7	0.70±0.22	1.13±0.19	1.40±0.30*	0.78±0.49	1.13±0.22	1.35±0.39*
非 DM 组	7	0.72±0.13	1.06±0.08	0.70±0.18	0.71±0.33	1.22±0.45	0.63±0.43

注:*DM 组与非 DM 组比较, $P<0.01$

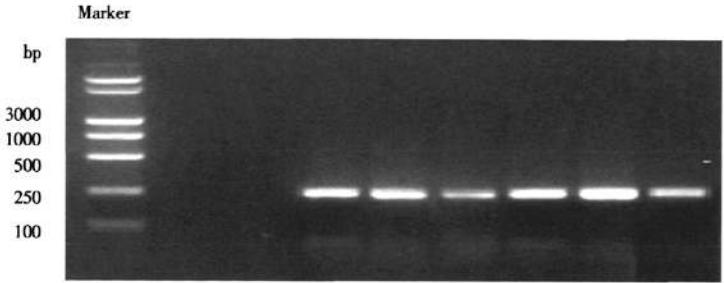


图 2 DM、非 DM 患者的 IMA、RA、GSV 血管壁 RhoA RT-PCR 产物电泳图

注:图中 6 条条带由左向右依次为 RhoA 在非 DM 患者 GSV、RA、IMA 及 DM 患者 RA、GSV、IMA 中表达产物电泳条带

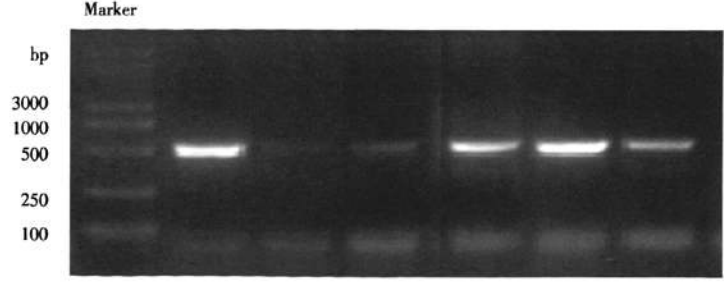


图 3 DM、非 DM 患者的 IMA、RA、GSV 血管壁 ROK RT-PCR 产物电泳图

注:图中 6 条条带由左向右依次为 ROK mRNA 在非 DM 患者 GSV、RA、IMA 及 DM 患者 RA、GSV、IMA 中表达产物电泳条带

用。有研究^[7]发现 DM 鼠胸主动脉 RhoA mRNA 表达水平增加, RhoA 蛋白膜转位增加。另有文献^[9]报道 2 型 DM 鼠脑小动脉对 ROK 抑制剂 Y-27632 的舒张反应明显增强, 提示 RhoA/ROK 活性在 DM 状态时升高。众所周知, DM 是 CABG 术后远期预后不良的重要因素, 但 RhoA/ROK 通路是否与 DM 患者 CABG 术后预后不良有关目前尚不清楚。

基于既往动物实验结论, 本文研究探讨了 DM 和非 DM 患者桥血管 RhoA/ROK 表达的差异。离体血管环张力实验发现, 与非 DM 组比较, DM 组 GSV 对 PE 诱导的血管收缩反应有显著增加, 而 DM 组 RA 和 IMA 对 PE 诱导的血管收缩反应无变化; ROK 抑制剂 fasudil 对 DM 组 GSV 舒张作用明显强于非 DM 组 GSV, 而 fasudil 对 RA 和 IMA 的舒张作用不受 DM 状态的影响, 提示 DM 时 GSV 中 ROK 的功能增加; 进一步观察 RA、IMA、GSV 中 RhoA 免疫组化染色显示: DM 组 GSV 中 RhoA 表达明显增强, 与非 DM 组比较差异有统计学意义, 而 RA、IMA 中 RhoA 表达在 DM 和非 DM 之间差异无统计学意义。基因水平检测显示: DM 组 GSV 中 RhoA、ROK mRNA 表达水平显著高于非 DM 组, 差异有统计学意义; 而 RA、IMA 的 RhoA、ROK mRNA 表达水平在 DM 和非 DM 之间差异无统计学意义。上述研究结果一致显示 DM 时三种血管中只有 GSV 中 RhoA/ROK 表达和功能有变化, 而 IMA 和 RA 中 RhoA/ROK 表达和功能变化不明显。提示 DM 患者组 GSV 桥血管远期开通率低可能与 RhoA/ROK 有关。

有研究^[10]发现 DM 时 RA、GSV 和 IMA 的内皮功能变化并不一致, 同非 DM 血管比较, DM 时 IMA 和 RA 的内皮功能均正常, 只有 GSV 内皮功能明显受损。本文研究结果同上述研究结果基本一致。内皮功能受损导致内皮生成一氧化氮 (nitric oxide, NO) 减少, 内皮素-1 分泌相对增加, NO 有抑制 RhoA 活性的作用。文献^[11]报道, NO 的生成减少使其对 RhoA 激活和 RhoA、ROK 表达的抑制作用减弱, 导致 RhoA 和 ROK 的表达增加, 这可能是 DM 时 GSV 中 ROK 表达增加的原因。高糖状态 ROK 上调的分子机制已有很多研究。最近一项研究^[12]显示, 可能与 PDGFR- β 通路有关。本文研究并没有探讨高糖状态下 Rho 表达的机制, 将在今后的研究中进行探讨。

本文研究结果显示 DM 状态下 GSV 易于发生动脉粥样硬化和远期通畅率下降的原因可能与 RhoA/ROK 通路有关, 提示 DM 患者选择 GSV 作为桥血管应慎重, 应用 ROK 抑制剂是否有望减少静脉

桥血管病变的发生, 还需进一步临床研究验证。

4 参考文献

- 1 Takemoto M, Sun J, Hiroki J, et al. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2002, 106: 57-62.
- 2 Jernigan NL, Walker BR, Resta TC. Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca^{2+} sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295: L515-L529.
- 3 Ding R, Hu DY, Xia K, et al. Increased RhoA/ROK mRNA expression and function in diabetic vein grafts compared with nondiabetic vein grafts and diabetic arterial grafts. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, 58: 148-153.
- 4 Kun X, Lefeng W, Rongjing D, et al. RhoA/ROK pathway related to the mechanism of higher susceptibility to spasm in RA than in IMA. *J Card Surg*, 2009, 24: 766-771.
- 5 Lee YJ, Hsu TC, Du JY, et al. Extracellular matrix controls insulin signaling in mammary epithelial cells through the RhoA/Rok pathway. *J Cell Physiol*, 2009, 220: 476-484.
- 6 夏昆, 王乐丰, 杨新春. 桡动脉、乳内动脉、大隐静脉中 RhoA/ROK mRNA 的表达与心血管危险因素的相关性. *心脏杂志*, 2009, 21: 99-104.
- 7 Miao L, Calvert JW, Tang J, et al. Upregulation of small GTPase rhoA in the basilar artery from diabetic (mellitus) rats. *Life Sci*, 2002, 71: 1175-1185.
- 8 Hattori T, Shimokawa H, Higashi M, et al. Long-term treatment with a specific Rho-kinase inhibitor suppresses cardiac allograft vasculopathy in mice. *Circ Res*, 2004, 94: 46-52.
- 9 Didion SP, Lynch CM, Baumbach GL, et al. Impaired endothelium-dependent responses and enhanced influence of rho-kinase in cerebral arterioles in type II diabetes. *Stroke*, 2005, 36: 342-347.
- 10 Lorusso R, Pentiricci S, Raddino R, et al. Influence of type 2 diabetes on functional and structural properties of coronary artery bypass conduits. *Diabetes*, 2003, 52: 2814-2820.
- 11 Gudi T, Chen JC, Casteel DE, et al. CGMP-dependent protein kinase inhibitors serum-response element-dependent transcription by inhibiting rho activation and function. *J Biol Chem*, 2002, 277: 37382-37393.
- 12 Akiyama N, Naruse K, Kobayashi Y, et al. High glucose-induced upregulation of Rho/Rho-kinase via platelet-derived growth factor receptor-beta increases migration of aortic smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45: 326-332.

(收稿日期: 2011-03-12)

(本文编辑: 陈淑莲)