

## • 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2004)12-04-0378-05

## 缺氧—复氧诱导 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附的分子机制

周四桂, 雷小勇, 严鹏科, 严奉祥, 朱炳阳, 廖端芳

(南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药理学; 细胞粘附的分子机制; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 缺氧—复氧; 亲环素 A; 细胞外信号调节激酶; p70 核糖体 S6 激酶

[摘要] 为探讨缺氧—复氧诱导人脐静脉内皮细胞 ECV304 与中性粒细胞粘附的信号转导机制, 以缺氧—复氧诱导粘附为模型, 采用比色法检测粘附率, 流式细胞术检测 ECV304 细胞表面粘附分子 E 选择素、细胞间粘附分子 1 的表达, Western blot 法检测 ECV304 细胞亲环素 A、磷酸化细胞外信号调节激酶、总细胞外信号调节激酶、磷酸化 p70 核糖体 S6 激酶、总 p70 核糖体 S6 激酶蛋白的表达。结果发现, 经缺氧—复氧处理后, ECV304 细胞 E 选择素、细胞间粘附分子 1 的表达上调, 其表面中性粒细胞粘附增加。总细胞外信号调节激酶、总 p70 核糖体 S6 激酶蛋白表达无明显改变, 亲环素 A 蛋白表达明显上调, 细胞外信号调节激酶和 p70 核糖体 S6 激酶显著活化。亲环素 A 抑制剂环孢霉素 A 以及亲环素 A 反义寡核苷酸均明显减轻缺氧—复氧诱导的细胞外信号调节激酶和 p70 核糖体 S6 激酶激活, 显著减少 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附。p70 核糖体 S6 激酶阻断剂雷帕霉素显著抑制 p70 核糖体 S6 激酶的激活, 中性粒细胞与 ECV304 细胞的粘附亦明显减少。细胞外信号调节激酶信号通路特异性阻断剂 PD98059 亦显著抑制 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附。结果提示, 亲环素 A-细胞外信号调节激酶-p70 核糖体 S6 激酶信号通路介导缺氧—复氧诱导的 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

## Molecular Mechanisms of Neutrophils Adhesion to ECV304 Induced by Hypoxia-Reoxygenation

ZHOU Si-Gui, LEI Xiao-Yong, YAN Peng-Ke, YAN Feng-Xiang, ZHU Bing-Yang, and LIAO Duang-Fang

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Hypoxia/Reoxygenation; Cyclophilin A; Extracellular Signal-Regulated Kinase; p70 Ribosomal S6 Kinase; Cell Adhesion Molecule; Signal Transduction

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the signal transduction of neutrophils adhesion to human umbilical vein endothelial cells (hUVEC, ECV304) induced by hypoxia/reoxygenation. **Methods** The adhesion model was reproduced by hypoxia/reoxygenation. The adhesion rate of neutrophils to ECV304 was determined by color matching. The expression of endothelial cell adhesion molecules of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was measured with flow cytometry. The expression of cyclophilin A and the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) and p70 ribosomal S6 kinase (p70 S6K) were compared among experimental groups by western blot. **Results** After stimulation with 1 h hypoxia/4 h reoxygenation, ECV304 showed an enhanced neutrophil adhesivity in the association with an increased surface expression of E-selectin and ICAM-1. Furthermore, the expression of cyclophilin A increased significantly following 1 h hypoxia/4 h reoxygenation, which was accompanied with an increased activation of ERK1/2 and p70 S6K. Treatment with cyclophilin A inhibitor cyclosporin A and cyclophilin A antisense oligodeoxynucleotides significantly inhibited the activation of ERK1/2 and p70 S6K and decreased the adhesion of neutrophils to ECV304. p70 S6K antagonist rapamycin also significantly decreased the adhesion of neutrophils to ECV304. The specific ERK1/2 inhibitor PD98059 showed inhibition to neutrophils adhesion to hypoxia/reoxygenation-stimulated ECV304. **Conclusions** Cyclophilin A-ERK1/2-p70 S6K pathway is involved in the adhesion of neutrophils to ECV304 induced by hypoxia/reoxygenation.

中性粒细胞与血管内皮细胞粘附是心肌缺血再灌注损伤的一个早期和重要事件, 其中主要由粘附

分子介导<sup>[1]</sup>。但缺血再灌注如何调节粘附分子表达, 促进中性粒细胞与血管内皮细胞粘附的信号途径尚不清楚。研究发现, 亲环素 A 为氧化应激诱导分泌的生长因子, 在氧化应激致细胞损伤反应中起着重要作用<sup>[2]</sup>。活性氧可刺激亲环素 A 的表达和分泌。亲环素 A 分泌至胞外作为一种细胞外信号介质, 可介导细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 的活化。p70 核糖体 S6

[收稿日期] 2004-02-26 [修回日期] 2004-05-01

[基金项目] 国家自然科学基金 (30171084) 和湖南省社会发展重大项目 (01ssy200904) 资助

[作者简介] 周四桂, 博士研究生, 研究方向为细胞粘附的作用机制及药物干预, E-mail 为 susanzsg@sina.com。雷小勇, 博士, 讲师, 研究方向为细胞和分子生物学。廖端芳, 教授, 博士研究生导师, 主要从事信号转导与分子生物学方面的研究, 本文通讯作者, E-mail 为 dfliao@hotmail.com。

激酶(p70 ribosomal s6 kinase, p70 S6K)作为 ERK1/2 下游的信号分子,它能催化 40 S 核糖体蛋白 S6 高度磷酸化,促进蛋白合成。

本实验拟采用 ECV304 细胞缺氧—复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型,诱导 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附,观察 H/R 作用下二者的粘附及其信号通路的激活,从分子水平揭示 H/R 所致 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附的发生机制,为阐明缺血再灌注损伤的机制提供新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 由中南大学湘雅医学院提供;新鲜人全血,来自健康志愿者。DMEM 培养基和 Lipofectamine<sup>TM</sup>(Gibco);新生牛血清(杭州四季青公司);胰酶、PD98059 和 p-nitrophenol-N-acetyl-β-D-glucosaminide(Sigma);Polymorphprep<sup>TM</sup>分离液(AXIS-SHIELD Poc AS);雷帕霉素和环孢霉素 A(Calbiochem);鼠抗人 E 选择素-FITC(IQ 公司);鼠抗人细胞间粘附分子 1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)-FITC(BD 公司);兔抗人亲环素 A 单克隆抗体(Affinity Bioreagents);兔抗人磷酸化 p70 S6K 多克隆抗体(Cell signaling);鼠抗人磷酸化 ERK1/2 单克隆抗体、鼠抗人总 ERK1/2 单克隆抗体和兔抗人总 p70 S6K 多克隆抗体(Santa Cruz);HRP 标记的羊抗鼠单克隆抗体和 HRP 标记的羊抗兔单克隆抗体(北京中山生物公司);5% CO<sub>2</sub> 和 95% N<sub>2</sub>(长沙特种气厂)。其余试剂均为市售分析纯。

### 1.2 人脐静脉内皮细胞株的培养与分组

ECV304 细胞按内皮细胞常规法培养。实验分为 8 组:空白对照组不予 H/R 处理;④缺氧—复氧组缺氧 1 h 复氧 4 h;④环孢霉素 A 组 H/R 前 30 min 加入环孢霉素 A,终浓度为 100 nmol/L;雷帕霉素组 H/R 前 30 min 加入雷帕霉素,终浓度为 10 nmol/L;PD98059 组 H/R 前 30 min 加入 PD98059,终浓度为 20 μmol/L;亲环素 A 反义寡核苷酸组(antisense oligodeoxynucleotide, AS-ODN)H/R 前 24 h 加入不同剂量 AS-ODN,AS-ODN 终浓度分别为 0.1、0.3、1、3 及 10 μmol/L;⑧亲环素 A 错义寡核苷酸组(nonsense oligodeoxynucleotide, NS-ODN)H/R 前 24 h 加入不同剂量 NS-ODN,NS-ODN 终浓度分别为 0.1、0.3、1、3 及 10 μmol/L;④脂质体空载组 H/R 前 24 h 加入等浓度的脂质体。

### 1.3 亲环素 A 寡核苷酸的设计、合成与转染

AS-ODN 序列为 5'-CATGGCTAATAGTACACGGT-3',靶序列为亲环素 A mRNA 中含 AUG 起始位点的 20 个核苷酸。该序列运用 Blast 程序<sup>[3]</sup>在 GenBank 数据库进行同源性检索,证实该序列在人类基因组中具有唯一性。NS-ODN 序列为:5'-TGGATAGCTA-AGTTCAGACC-3'。寡核苷酸均进行全硫代磷酸化修饰,由上海生工生物工程公司合成。细胞转染参照脂质体转染说明书进行。

### 1.4 ECV304 细胞缺氧—复氧模型的建立

参照文献[4]将各组已汇合成单层的 ECV304 细胞置于一密闭容器中,在 37℃下通以含 5% CO<sub>2</sub> 和 95% N<sub>2</sub> 的混合气体,通气速度为 1 L/min,持续 1 h,然后取出置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中复氧 4 h。对照组细胞一直置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中,用药组于 H/R 前加入不同浓度药物。

### 1.5 外周血中性粒细胞的分离

取 5 mL Polymorphprep<sup>TM</sup> 分离液加于离心管底部,随后将 5 mL 新鲜抗凝血轻轻加在上面,于 18℃~22℃、450~500 g 离心 30~35 min,取出离心管,可见两层白细胞。上层为单核细胞,下层为中性粒细胞,用吸管轻轻吸出下层中性粒细胞,加入同体积 0.45% NaCl 溶液恢复等渗。用 PBS 洗涤 3 次,离心(400 g、10 min、18℃~22℃),然后悬浮于含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基中,新鲜应用。

### 1.6 中性粒细胞与 ECV304 细胞粘附的测定<sup>[5]</sup>

将 ECV304 细胞接种于 96 孔板,每孔  $1 \times 10^5$ /L,24 h 后弃培养基,PBS 洗涤 1 次,每孔加入 100 μL 中性粒细胞( $1 \times 10^6$ /L),用药组加入不同浓度药物,37℃、30 min 后进行 H/R 处理。缺氧 1 h 复氧 4 h 后,用 100 μL PBS 洗 3 次,以除去未粘附的细胞。每孔加入 7.5 mmol/L p-nitrophenol-N-acetyl-β-D-glucosaminide(溶于 0.1 mol/L 柠檬酸 buffer, pH 5.00) 60 μL,置 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。2 h 后每孔加入 90 μL 甘氨酸 buffer(甘氨酸 50 mmol/L、EDTA 5 mmol/L, pH 10.4)终止反应,405 nm 测吸光度 A 值。粘附率(%)=(粘附细胞 A 值-ECV304 细胞 A 值)÷加入总细胞 A 值×100%。

### 1.7 流式细胞术检测 ECV304 细胞 E 选择素和细胞间粘附分子 1 的表达

生长状态良好的 ECV304 细胞换含 1% 新生牛血清的 DMEM 过夜后,用含 10% 新生牛血清的 DMEM 培养。缺氧 1 h 复氧 4 h 后胰酶消化,PBS 收集细胞,离心去上清,加入 FITC 标记的 E 选择素和 ICAM-1 单克隆抗体各 5 μL,30 min 后,PBS 重悬细

细胞,离心去上清,1 mL 0.5% 多聚甲醛固定,流式细胞仪检测其阳性细胞百分率。

## 1.8 Western blot 检测 ECV304 细胞亲环素 A、细胞外信号调节激酶及 p70 核糖体 S6 激酶蛋白的表达

配制 10% SDS-PAGE 分离胶和 5% 积层胶,每孔加入 40  $\mu$ g 蛋白样品,置电泳缓冲液中,60 V 电泳约 30 min,待样品进入分离胶后,120 V 电泳至所需时间。将蛋白转印至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶粉于室温封闭 2 h,分别加一抗(小鼠来源磷酸化 ERK1/2、总 ERK1/2 单克隆抗体、兔来源亲环素 A 单克隆抗体、磷酸化 p70 S6K 和总 p70 S6K 多克隆抗体),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,次日 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,再加二抗(HRP 标记的羊抗鼠和羊抗兔 IgG)室温孵育 1 h,发光剂孵育 6 min,曝光,显影定影,水洗,结果用 Lab-work 凝胶图像分析软件对胶片扫描测定感光区带的感吸光度,并进行积分处理。

## 1.9 统计学处理

所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.0 软件进行统计学处理,全部数据经方差齐性分析后,采用单因素方差分析进行差异显著性检验, $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 反义寡核苷酸和雷帕霉素对亲环素 A 蛋白表达的影响

经 AS-ODN(3  $\mu$ mol/L) 处理 24 h 的 ECV304 细胞亲环素 A 蛋白表达产物明显低于对照组,约减少 63.8%,而 NS-ODN(3  $\mu$ mol/L) 处理后无此改变(图 1, Figure 1)。经 H/R 处理后,ECV304 细胞亲环素 A 蛋白表达明显高于对照组,AS-ODN(3  $\mu$ mol/L) 显著抑制 H/R 诱导的亲环素 A 表达上调,而雷帕霉素对亲环素 A 的表达未见明显抑制作用(图 2, Figure 2)。

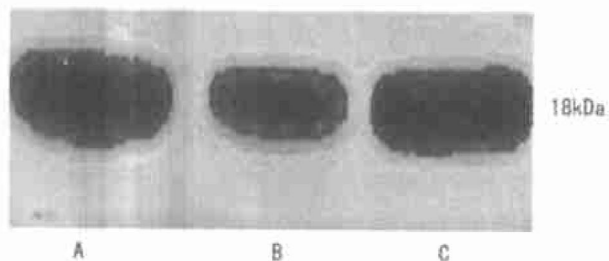


图 1. 反义和错义寡核苷酸对 ECV304 细胞亲环素 A 蛋白表达的影响 A 为对照组, B 为反义寡核苷酸(3  $\mu$ mol/L) 组, C 为错义寡核苷酸(3  $\mu$ mol/L) 组。

Figure 1. Effect of cyclophilin A AS-ODN and NS-ODN on the expression of cyclophilin A

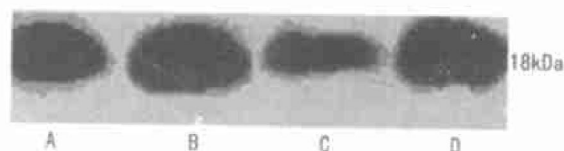


图 2. 缺氧-复氧、反义寡核苷酸及雷帕霉素对 ECV304 细胞亲环素 A 蛋白表达的影响 A 为对照组, B 为缺氧-复氧组, C 为反义寡核苷酸(3  $\mu$ mol/L) 组, D 为雷帕霉素组。

Figure 2. Effect of cyclophilin A AS-ODN or rapamycin on the expression of cyclophilin A

### 2.2 反义寡核苷酸、环孢霉素 A 及雷帕霉素对 p70 核糖体 S6 激酶活性的影响

缺氧-复氧(H/R) 组磷酸化 p70 S6K (p-p70 S6K) 蛋白表达明显高于对照组, AS-ODN(3  $\mu$ mol/L) 及环孢霉素 A 均显著抑制 H/R 诱导的 p-p70 S6K 表达上调,雷帕霉素对 p-p70 S6K 蛋白表达的抑制作用更为显著。各组间总 p70 S6K 蛋白表达未见明显改变(图 3, Figure 3)。

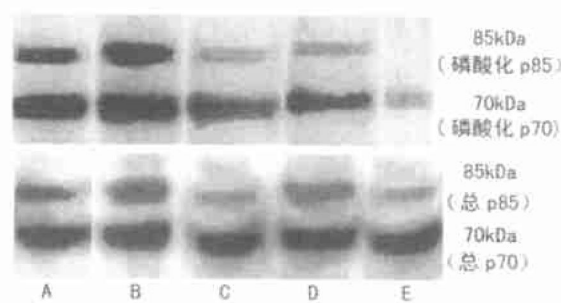


图 3. 缺氧-复氧、反义寡核苷酸、环孢霉素 A 及雷帕霉素对 ECV304 细胞 p70 核糖体 S6 激酶活性的影响 A 为对照组, B 为缺氧-复氧组, C 为反义寡核苷酸(3  $\mu$ mol/L) 组, D 为环孢霉素 A 组, E 为雷帕霉素组。

Figure 3. Effect of cyclophilin A AS-ODN or cyclosporin A or rapamycin on the expression of p-p70 S6K and total p70 S6K

### 2.3 细胞外信号调节激酶在缺氧-复氧激活亲环素 A-p70 核糖体 S6 激酶信号通路中的作用

缺氧-复氧(H/R) 组磷酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) 蛋白表达量较正常对照组明显增加, AS-ODN(3  $\mu$ mol/L) 和环孢霉素 A 均可阻止 H/R 引起的 p-ERK1/2 表达上调,雷帕霉素对 p-ERK1/2 表达无明显影响,各组间总 ERK1/2 蛋白表达无明显改变(图 4, Figure 4)。

### 2.4 亲环素 A 在 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附中的作用

ECV304 细胞转染 AS-ODN 后,经缺氧 1 h 复氧 4 h 处理,ECV304 细胞与中性粒细胞的粘附率亦显著降低,而 NS-ODN 及脂质体空载组无上述作用。环孢霉素 A 亦显著抑制 ECV304 细胞与中性粒细胞的粘附(表 1, Table 1)。

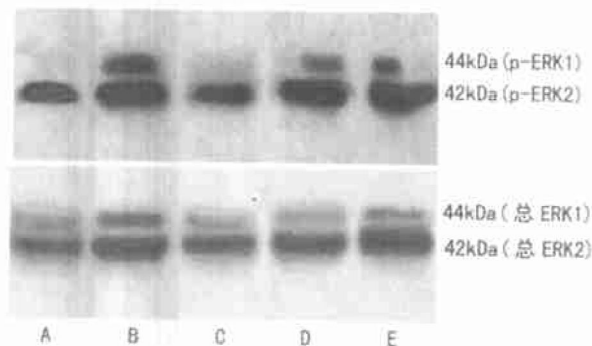


图 4. 缺氧-复氧、反义寡核苷酸、环孢霉素 A 和雷帕霉素对 ECV304 细胞细胞外信号调节激酶活性的影响 A 为对照组, B 为缺氧-复氧组, C 为反义寡核苷酸(3  $\mu$ mol/L)组, D 为环孢霉素 A 组, E 为雷帕霉素组。

Figure 4. Effect of cyclophilin A AS-ODN or cyclosporin A or rapamycin on the expression of p-ERK1/2 and total ERK1/2

表 1. 反义、错义寡核苷酸和环孢霉素 A 对缺氧-复氧诱导 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 1. Effect of AS-ODN, NS-ODN and cyclosporin A on adhesion rate of neutrophil with ECV304 induced by hypoxia/reoxygenation

分 组	粘附率
对照组	7.8% $\pm$ 1.5%
缺氧-复氧组	19.9% $\pm$ 3.1% <sup>a</sup>
环孢霉素 A 组	10.6% $\pm$ 1.9% <sup>c</sup>
反义寡核苷酸	
0.1 $\mu$ mol/L	21.3% $\pm$ 3.2%
0.3 $\mu$ mol/L	20.7% $\pm$ 2.9%
1 $\mu$ mol/L	14.9% $\pm$ 2.1% <sup>b</sup>
3 $\mu$ mol/L	9.8% $\pm$ 1.5% <sup>c</sup>
10 $\mu$ mol/L	10.4% $\pm$ 2.1% <sup>c</sup>
错义寡核苷酸	
0.1 $\mu$ mol/L	22.5% $\pm$ 3.8%
0.3 $\mu$ mol/L	21.8% $\pm$ 4.8%
1 $\mu$ mol/L	22.1% $\pm$ 3.3%
3 $\mu$ mol/L	21.3% $\pm$ 4.1%
10 $\mu$ mol/L	21.7% $\pm$ 3.9%
脂质体空载组	21.6% $\pm$ 3.5%

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.05$ , c:  $P < 0.01$ , 与缺氧-复氧组比较。

## 2.5 细胞外信号调节激酶和 p70 核糖体 S6 激酶活性对 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附的影响

经缺氧 1 h 复氧 4 h 处理后, ECV304 细胞与中性粒细胞粘附率明显增高, H/R 组为 20.8%  $\pm$  2.5%, 对照组为 8.3%  $\pm$  1.4%, 两组比较差异显著 ( $P < 0.01$ ); 预先加入 PD98059 及雷帕霉素后, 其粘附率分别降至 11.3%  $\pm$  2.1% 和 12.1%  $\pm$  2.3%, 与 H/R 组比较具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

## 2.6 亲环素 A 表达及细胞外信号调节激酶和 p70 核糖体 S6 激酶活性对 E 选择素和细胞间粘附分子 1 表达的影响

经缺氧 1 h 复氧 4 h 处理后, ECV304 细胞 E 选择素和 ICAM-1 表达明显上调。AS-ODN、环孢霉素 A、PD98059 及雷帕霉素均显著降低 H/R 引起的 E 选择素和 ICAM-1 的表达(表 2, Table 2)。

表 2. 反义寡核苷酸、环孢霉素 A、PD98059 及雷帕霉素对缺氧-复氧诱导 ECV304 细胞 E 选择素和细胞间粘附分子 1 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 2. Effect of cyclophilin A antisense oligodeoxynucleotide or cyclosporin A or PD98059 or rapamycin on the expression of E-selectin and ICAM-1 in ECV304 induced by hypoxia/reoxygenation

分 组	E 选择素	细胞间粘附分子 1
对照组	5.2% $\pm$ 0.9%	20.3% $\pm$ 2.2%
缺氧-复氧组	29.5% $\pm$ 5.2% <sup>a</sup>	84.1% $\pm$ 10.8% <sup>a</sup>
反义寡核苷酸(3 $\mu$ mol/L)组	7.9% $\pm$ 1.2% <sup>b</sup>	27.4% $\pm$ 3.1% <sup>b</sup>
环孢霉素 A 组	8.3% $\pm$ 1.5% <sup>b</sup>	36.9% $\pm$ 5.7% <sup>b</sup>
PD98059 组	9.7% $\pm$ 1.7% <sup>b</sup>	37.8% $\pm$ 6.3% <sup>b</sup>
雷帕霉素组	10.5% $\pm$ 2.1% <sup>b</sup>	41.0% $\pm$ 9.4% <sup>b</sup>

a:  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b:  $P < 0.01$ , 与缺氧-复氧组比较。

## 3 讨 论

心肌缺血再灌注损伤病因复杂, 其发生机制涉及多种因素。其中, 中性粒细胞与血管内皮细胞粘附引起的炎症反应与心肌缺血再灌注损伤密切相关。为了阐明缺血再灌注诱导血管损伤的机制, 对血管内皮细胞进行缺氧-复氧处理, 可以模拟缺血再灌注所诱导的血管改变<sup>[6]</sup>。本实验对 ECV304 细胞进行缺氧 1 h 复氧 4 h 后, E 选择素和 ICAM-1 的表达明显上调, 中性粒细胞与 ECV304 细胞的粘附增加, 这与 Hiroshi Ichikawa 等<sup>[7]</sup>的报道一致。

细胞缺氧是活化转录因子及 MAPK 通路的重要信号。H/R 通过刺激 ROS 的产生, 引起细胞氧化应

激损伤。ROS 不仅引起膜脂质过氧化、蛋白变性,而且参与细胞信号转导。亲环素 A 为亲免素家族成员之一,是环孢霉素 A 在细胞内专一性的受体蛋白,具有肽脯氨酸异构酶 (peptidylproline cis-trans isomerase, PPIase) 活性<sup>[8]</sup>,普遍存在于原核与真核细胞中,其 PPIase 活性受环孢霉素 A 抑制。研究证明,在氧化应激条件下,亲环素 A 的表达和分泌增加,并可由细胞内分泌至细胞外,介导活性氧对细胞 ERK1/2 的激活。此外,PPIase 活性参与亲环素 A 对细胞 ERK1/2 的活化。本研究发现,ECV304 细胞经缺氧 1 h 复氧 4 h 后,ROS 释放增多,亲环素 A 的表达明显上调,ERK1/2 显著活化。表明 ECV304 细胞经 H/R 处理后,通过释放大量 ROS,促进了亲环素 A 的表达和分泌,进而激活 ERK1/2。

MAPK 系统是细胞外信号向核转导的重要途径。活化的 MAPK 可通过激活 p70 S6K 调控蛋白翻译<sup>[9,10]</sup>。本实验中观察到,H/R 明显激活 ERK1/2 及其下游信号分子 p70 S6K,二者的磷酸化水平明显增强。p70 S6K 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它能催化 40S 核糖体蛋白 S6 高度磷酸化,促进蛋白合成。由此表明,H/R 通过激活 ERK1/2 以及 p70 S6K,从而在翻译水平达到促进细胞粘附分子 E 选择素及 ICAM-1 合成的作用,使中性粒细胞与 ECV304 细胞粘附增加。

本实验应用 p70 S6K 抑制剂雷帕霉素预处理 ECV304 细胞,发现雷帕霉素明显抑制 H/R 引起的 p70 S6K 激活,但对 ERK1/2 的活化无明显改变,其亦显著抑制 H/R 引起的 E 选择素和 ICAM-1 表达。ERK1/2 信号通路特异性阻断剂 PD98059 亦显著减少 ECV304 细胞与中性粒细胞的粘附。本研究结果提示,ERK1/2 和 p70 S6K 作为亲环素 A 的下游信号分子,在 H/R 诱导 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附的同时也被磷酸化而活化。当 ERK1/2 和 p70 S6K 磷酸化受到抑制时,H/R 的这一反应也得到一定程度逆转,表明 ERK1/2、p70 S6K 在 H/R 诱导的 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附过程中起重要作用。

反义寡核苷酸是根据碱基互补原理<sup>[11,12]</sup>,设计与目标靶遗传物质(DNA 或 RNA)特定互补的短核苷酸片断,可封闭某个靶基因的表达,是研究细胞信号转导的有效手段。本实验采用亲环素 A 反义寡

核苷酸使其表达下调,以及应用环孢霉素 A 抑制亲环素 A 的 PPIase 活性,发现二者均可显著抑制 H/R 引起的 ERK1/2 和 p70 S6K 激活,抑制 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附。表明亲环素 A 受到诱导和抑制其表达及活性的调控以后,ERK1/2、p70 S6K 的活性也产生相应的变化,而且这一变化与 H/R 诱导的 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附有着调控的关系。提示亲环素 A 通过激活 ERK1/2 及其下游信号分子 p70 S6K,调节细胞粘附分子表达,介导 H/R 引起的 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附。

上述实验结果表明,p70 S6K 活化是 H/R 诱导 ECV304 细胞与中性粒细胞粘附的重要因素,Cyclophilin A-ERK1/2-p70 S6K 信号通路在其中发挥了重要作用,这为阐明缺血再灌注损伤的机制提供了一条新思路。

#### [参考文献]

- [1] Cassie S, Masterson MF, Polukoshko A, Viskovic MM, Tibbles LA. Ischemia/reperfusion induces the recruitment of leukocytes from whole blood under flow conditions. *Free Radic Biol Med*, 2004, **36** (9): 1 102-111
- [2] Jin ZG, Melaragno MG, Liao DF, Yan C, Haendeler J, Suh YA, et al. Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress. *Circ Res*, 2000, **87** (9): 789-796
- [3] Bellucci R, Sala R, De Propriis MS, Cordone I, de Fabritis P. Interferon alpha and ber-abl antisense oligodeoxynucleotides in combination enhance the antileukemic effect and the adherence of CML progenitors to preformed stroma. *Leuk Lymphoma*, 1999, **35** (5-6): 471-481
- [4] 王关嵩, 钱桂生, 陈维中. 低浓度一氧化碳和缺氧气体处理培养细胞容器的研制及其应用. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (1): 67-70
- [5] Ulf Landegren. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immun Methods*, 1984, **67** (1): 379-388
- [6] Chi NC, Karlner JS. Molecular determinants of responses to myocardial ischemia/reperfusion injury: focus on hypoxia-inducible and heat shock factors. *Cardiovasc Res*, 2004, **61** (3): 437-447
- [7] Ichikawa H, Flores S, Kvietys PR, Wolf RE, Yoshikawa T, Granger DN, et al. Molecular mechanisms of anoxia/reoxygenation induced neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Circ Res*, 1997, **81** (6): 922-931
- [8] Ivery MT. Immunophilins: switched on protein binding domains? *Med Res Rev*, 2000, **20** (6): 452-484
- [9] Mukhopadhyay NK, Price DJ, Kyriakis JM, Pelech SL, Sanghera J, Avruch J. An array of insulin-activated, proline-directed serine/threonine protein kinases phosphorylate the p70 S6 kinase. *J Biol Chem*, 1992, **267** (5): 3 325-335
- [10] 于文杰, 姚兴海, 刘秀华, 陈魁, 牛大地, 苏静怡, 等. 短暂低氧/复氧对培养新生兔心肌细胞丝裂素活化蛋白激酶活性的影响. *生理学报*, 1997, **49** (5): 531-536
- [11] 张新宇, 周初松, 靳安民, 郭爱林, 田京. 诱导型一氧化氮合酶反义核酸在脊髓损伤后细胞凋亡和 p38 MAPK 信号转导通路中的作用. *第一军医大学学报*, 2003, **23** (6): 578-80
- [12] 严鹏科, 廖端芳, 杨永宗. Caveolin-1 表达对血管平滑肌细胞胆固醇逆转运的调节作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 379-383

(此文编辑 文玉珊)