

炎性细胞因子和凋亡相关蛋白参与大鼠下肢深静脉血栓形成

冯涛¹, 李晶², 潘金强¹, 郑殿宇¹, 陈辉¹, 杜曼·巴戈达提¹, 耿中利^{1*}

(新疆医科大学附属中医医院 1. 普外二科; 2. 内分泌科, 新疆乌鲁木齐 830000)

摘要:目的 探讨 IL-1 β 、TNF- α 、Bcl-2 和 Bax 在大鼠下腔深静脉血栓形成中的表达调控机制。方法 将大鼠随机分为对照组(control)、下腔静脉血栓模型组(model)、miR-5189-3p 抑制剂组(inhibitor)和 miR-5189-3p 抑制剂阴性对照(inhibitor NC)组,每组 10 只。24 h 后,颈椎脱臼法处死,抽取血样和采集组织;用 ELISA 检测血样中 IL-1 β 、TNF- α 水平;病理学 HE 染色法观察下腔静脉血栓形态;Western blot 检测下腔静脉组织 Bcl-2、BAX 蛋白的表达。结果 模型组 IL-1 β 和 TNF- α 含量较对照组显著升高($P < 0.05$);miR-5189-3p 抑制剂组较对照组显著升高($P < 0.05$);miR-5189-3p 抑制剂组较模型组显著升高($P < 0.05$);miR-5189-3p 抑制剂阴性对照较模型组显著降低($P < 0.05$)。模型组和 miR-5189-3p 抑制剂组可见红色血栓和混合血栓,血管壁伴炎性细胞浸润,miR-5189-3p 抑制剂阴性对照血栓明显机化,有血流再通的征象。模型组 Bcl-2/BAX 蛋白表达较对照组显著降低($P < 0.05$);miR-5189-3p 抑制剂组较模型组显著降低($P < 0.05$);miR-5189-3p 抑制剂阴性对照较模型组显著升高($P < 0.05$)。结论 miR-5189-3p 可以通过调节炎性细胞因子和凋亡相关蛋白表达,从而影响下肢深静脉血栓的形成,为后期研究提供了新的思路与基础。

关键词: 深静脉血栓;静脉内皮细胞;Bcl-2;BAX

中图分类号:R364.1+5 文献标志码:A

Inflammatory cytokines and apoptosis related proteins participate in the formation of deep vein thrombosis of lower extremity in rats

FENG Tao¹, LI Jing², PAN Jin-qiang¹, ZHENG Dian-yu¹, CHEN Hui¹,
Duman BAGODAT¹, GENG Zhong-li^{1*}

(1. Department of General Surgery; 2. Department of Endocrinology, the Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

Abstract: Objective To investigate the expression and regulation mechanism of IL-1 β , TNF- α , Bcl-2 and BAX in rats with inferior vena cava thrombosis. **Methods** The rats were randomly divided into control group, inferior vena cava thrombus model group, mir-5189-3p inhibitor group and miR-5189-3p inhibitor NC group. Twenty-four hours later, the animals were killed by cervical vertebrae dislocation, blood samples were taken and tissues were collected; the level of IL-1 β and TNF- α in blood samples were detected by ELISA; The morphology of inferior vena cava thrombus was microscopied with HE staining; The expression of Bcl-2 and BAX protein in inferior vena cava was detected by Western blot. **Results** The level of IL-1 β and TNF- α in the model group was significantly higher

收稿日期:2020-03-02 修回日期:2020-06-30

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2019D01C167)

*通信作者(corresponding author):46867442@qq.com

than those in the control group ($P < 0.05$); the level of miR-5189-3p inhibitor group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$); the level of miR-5189-3p inhibitor group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$); the level of miR-5189-3p inhibitor negative control group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). In the model group and miR-5189-3p inhibitor group, red thrombus and mixed thrombus were found; the vessel showed inflammatory cell infiltration, and thrombus in the negative control group of miR-5189-3p inhibitor was obviously organized, with signs of blood flow recanalization. Bcl-2/BAX protein level in the model group was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$); miR-5189-3p inhibitor group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$); while miR-5189-3p inhibitor in negative control group was significantly higher than that in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** miR-5189-3p can affect the formation of DVT by regulating the expression of inflammatory cytokines and apoptosis related proteins, which provides a new idea and basis for later research.

Key words: deep vein thrombosis; vein endothelial cells; Bcl-2; BAX

深静脉血栓形成(deep vein thrombosis, DVT)是由于静脉内壁细胞损伤,血液异常凝集和血流速率变慢导致外周血管疾病,发病率高,占血管疾病总数的40%左右,同时可以诱导产生一系列严重的并发症和死亡现象^[1]。比如有5%~10%的深静脉血栓患者会出现致死性肺动脉栓塞,50%左右的患者会发展成慢性期致残性的血栓后综合征^[2]。这两种症状都严重的威胁着患者的生命健康。

深静脉血栓病发部位主要是下肢,在临床上会出现肢体的外在组织形态变化、疼痛、肤色变化等表现。其血栓脱落可引发肺栓塞^[3]。炎症因子在下肢DVT形成中起着重要作用^[4],参与了下肢血管壁内皮细胞损伤所导致的DVT的形成和发展。微RNAs(miRNAs)是一类长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA序列分子,参与转录后基因表达的调控反应,在维持机体内细胞稳定分化、增殖、凋亡等方面具有及其重要的作用,目前已发现少量miRNAs在DVT发病中的作用^[5]。本研究预通过检测不同分组内DVT大鼠血清IL-1 β 、TNF- α 水平和凋亡相关蛋白Bax、Bcl-2的表达,来验证miR-5189-3p在下肢深静脉血栓形成中对相关炎症细胞因子和凋亡相关蛋白的表达调控作用,为后期临床治疗提供新的方向。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:SPF级7~8周SD大鼠48只,体质量180~200g(新疆医科大学动物中心,动物许

可证:XJYK-2019-0013)。

1.1.2 实验试剂:HE染色试剂盒(Solarbio公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒、Bax Polyclonal Antibody和Bcl-2 Polyclonal Antibody(Bioswamp公司);大鼠白介素1 β ELISA试剂盒和大鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA试剂盒(Cusabio公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物的分组及处理:将大鼠分为对照组(control);下腔静脉血栓模型组(model),暴露下腔静脉,5-0丝线结扎下腔静脉分支至髂静脉;miR-5189-3p抑制剂组(miR-5189-3p inhibitor),尾静脉注入5 μ g/kg miR-5189-3p inhibitor;miR-5189-3p抑制剂阴性对照组(miR-5189-3p inhibitor NC),尾静脉注入5 μ g/kg miR-5189-3p抑制剂,每组10只。

1.2.2 静脉血栓组织病理学检查:用4%多聚甲醛磷酸缓冲液固定下腔静脉血栓组织标本,石蜡包埋、切片,经苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)染色后在光镜下观察组织病理变化。

1.2.3 ELISA检测炎症因子水平:分离血浆,按照ELISA试剂说明书检测IL-1 β 、TNF- α 水平。

1.2.4 Western blot检测Bax、Bcl-2蛋白表达:将少量组织块置于1~2 mL匀浆器中球状部位,加400 μ L单去污剂裂解液(含PMSF)于匀浆器中进行匀浆,重复碾几次使组织尽量碾碎,裂解30 min后,在4 $^{\circ}$ C,12 000 r/min离心5 min,取适当稀释的上清液用BCA法来测定蛋白浓度,调整蛋白质浓度后用免疫印迹法(Western blot)检测组织内Bax、Bcl-2的表达,其步骤大致如下;经过灌胶、加样、电泳、转

膜后,将膜装入 5% BSA 封闭液,制置室温摇床 1 h,加 5 mL 一抗稀释液于 4 ℃ 冰箱过夜。然后加 10 mL 二抗稀释液(1:10 000)置于摇床上 1 h,显色,在暗室中压片曝光显影,结果用 Quantity-one 图像软件分析并进行吸光度值扫描,分别计算目的蛋白条带与 GAPDH 吸光度值比值(%)。

1.3 统计学分析

所有数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,利用 SPSS 13.0 软件进行数据处理,对计量资料进行单因素方差分析,采用 LDS 法进行两两比较。

2 结果

2.1 静脉血栓组织病理变化

模型组,血栓充满静脉管腔,与静脉管壁未见明显的黏连,无血管内皮细胞脱落,有少量炎性细胞浸润。miR-5189-3p 抑制剂组,血栓未见明显机化,与静脉管壁未见明显的黏连,有大量炎性细胞出现,有少量内皮细胞脱落。miR-5189-3p 抑制剂阴性对照

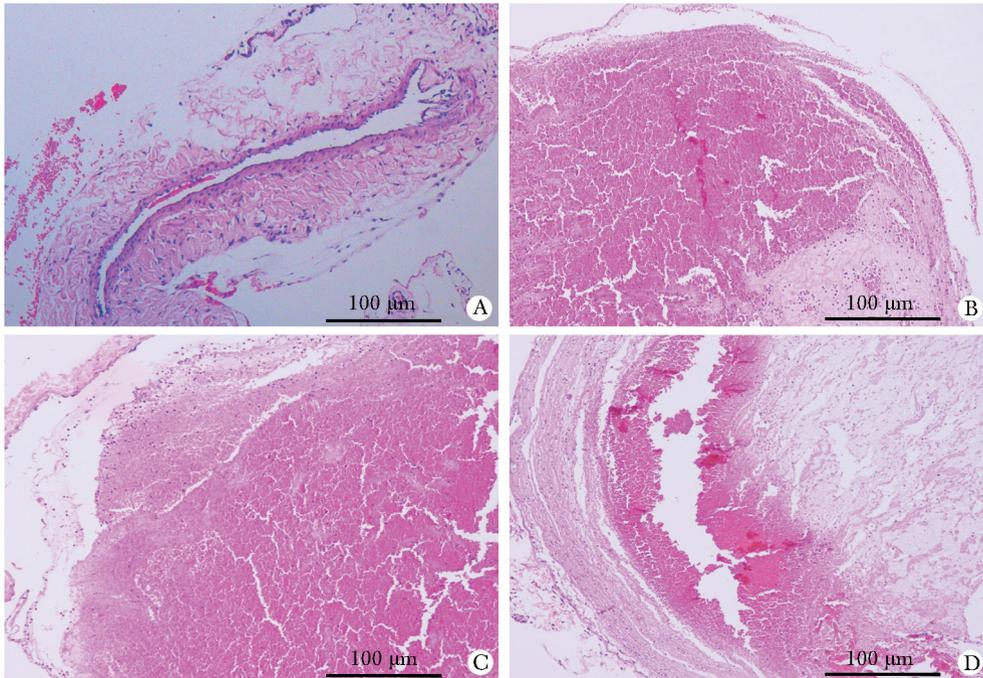
组,静脉血栓机化,血栓与静脉管壁有明显黏连,肉芽组织出现,有血流再通的征象,可见少许红细胞的存在(图 1)。

2.2 ELISA 检测大鼠血浆 IL-1 β 、TNF- α 含量

模型组 IL-1 β 和 TNF- α 含量较对照组显著升高($P<0.05$),miR-5189-3p 抑制剂组较模型组进一步升高($P<0.05$);miR-5189-3p 抑制剂阴性对照较模型组显著回降($P<0.05$),但仍高于对照组(表 1,图 2)。

2.3 BAX 和 Bcl-2 在下腔静脉组织内的表达情况

模型组 Bax 蛋白表达较对照组显著升高($P<0.05$),miR-5189-3p 抑制剂组较模型组进一步升高($P<0.05$),miR-5189-3p 抑制剂阴性对照较模型组显著回降($P<0.05$)。模型组 Bcl-2 蛋白表达较对照组显著降低($P<0.05$),miR-5189-3p 抑制剂组较模型组进一步降低($P<0.05$),miR-5189-3p 抑制剂阴性对照较模型组显著回升($P<0.05$) (图 3,表 2)。



A. control group, there was no thrombus in the control group; B. model group, thrombus filled the venous lumen; C. miR-5189-3p inhibitor group, there was no obvious mechanism of thrombus, no obvious adhesion with the venous wall, a large number of inflammatory cells appeared, and a small number of endothelial cells fell off; D. negative control group with miR-5189-3p inhibitor, venous thrombus was institutionalized, thrombus had obvious adhesion to the venous wall, granulation tissue appeared, and signs of blood flow recanalization were observed, with the presence of a few red blood cells

图 1 大鼠下腔深静脉血栓组织的病理变化

Fig 1 Pathological changes of the deep inferior vena cava thrombus tissues of the rats (HE staining)

表 1 各组血浆中 IL-1 β 、TNF- α 的含量情况Table 1 Content of IL-1 and TNF- α in each group ($\bar{x}\pm s$, pg/mL, $n=10$)

group	IL-1 β	TNF- α
control	15.32 \pm 0.45	153 \pm 2
model	42.28 \pm 0.52*	312 \pm 5*
miR-5189-3p inhibitor	54.32 \pm 1.38**	350 \pm 6**
miR-5189-3p inhibitor NC	23.40 \pm 0.93**	183 \pm 3**

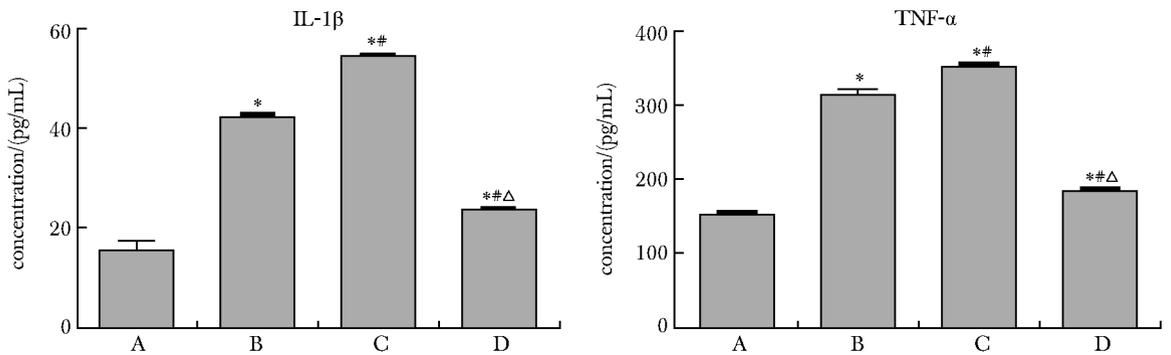
* $P < 0.05$ compared with control group; ** $P < 0.05$ compared with model group.

表 2 BAX 和 Bcl-2 在静脉组织内的表达情况

Table 2 Expression of Bax and Bcl-2 in venous tissues ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

group	BAX	Bcl-2
control	0.30 \pm 0.012	0.71 \pm 0.03
model	0.90 \pm 0.031*	0.30 \pm 0.01*
miR-5189-3p inhibitor	1.24 \pm 0.05**	0.22 \pm 0.02**
miR-5189-3p inhibitor NC	0.63 \pm 0.03**	0.42 \pm 0.03**

* $P < 0.05$ compared with control group; ** $P < 0.05$ compared with model group.



A. control group; B. model group; C. miR-5189-3p inhibitor group; D. negative control group with miR-5189-3p inhibitor; * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with model group; $\Delta P < 0.05$ compared with miR-5189-3p inhibitor group

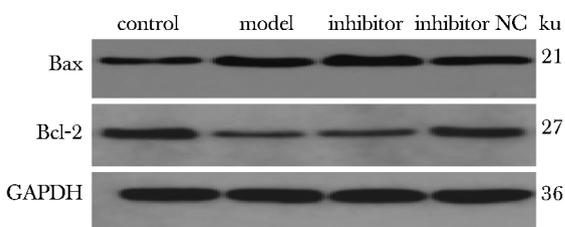
图 2 各组血浆中 IL-1 β 、TNF- α 的含量情况Fig 2 Content of IL-1 and TNF- α in each group ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

图 3 不同分组组织中 Bax、Bcl-2 蛋白表达

Fig 3 BAX and Bcl-2 proteins expression in different groups

3 讨论

DVT 是周围血管常见疾病,且近年来发病率呈逐年升高的趋势^[6]。已成为第三大危害人类健康的外周血管疾病,随着现代人生活习惯的改变,老年人逐渐增多,外周血管疾病患病率逐年增加^[7]。仅美国新增 DVT 患者约 80 万人/年,大约有 37% 的患者死于肺动脉栓塞。

miRNA 主要参与在转录水平上,可以起到抑制靶基因的翻译,在细胞增殖、细胞迁移、血管生成等过程都有参与,在疾病的发生发展过程中发挥作用。目前已有报道,miRNA 可以在血栓机化再通发挥着重要作用。miRNA 在心血管疾病发生发展中的作用机制和生物学功能^[8]。例如 miRNA-92a,通过对其进行功能实验阐明,上调 miR-92a 的会抑制静脉血栓的溶解再通,而下调 miR-92a 可以促进静脉血栓的溶解再通^[9]。miR-221 可以通过调节 PAK 1 的表达,起到抑制细胞增殖的作用^[10-11]。

IL-1 β 和 TNF- α 是炎症反应早期细胞因子,是机体炎症反应早期的标志物^[12]。可以直接作用于血管内皮细胞,对内皮细胞进行破坏,造成功能异常,促局部血栓形成。因此 IL-1 β 和 TNF- α 在血栓的形成中发挥重要作用。本次实验结果表明,IL-1 β 和 TNF- α 在不同分组内表达量差异明显,miR-5189-3p 对炎症反应因子 IL-1 β 和 TNF- α 起到明显的调

节作用,抑制 miR-5189-3p,可以增加炎症反应因子的表达量,提示 miR-5189-3p 参与了血栓形成的过程。

BAX 和 Bcl-2 是一类细胞凋亡相关性蛋白。BAX 是促进细胞凋亡蛋白,而 Bcl-2 是抑制细胞凋亡蛋白。通过 Bcl-2 和 BAX 的蛋白表达比值可以判断,抑制 miR-5189-3p,会明显的促进细胞凋亡;而 miR-5189-3p 可以有效的抑制细胞凋亡。本次实验结果说明,miR-5189-3p 在内皮细胞凋亡过程中,起到抑制作用。病理结果也通过 C 组和 D 组的比对

说明了,抑制 miR-5189-3p 会导致血栓机化过程降低,血栓溶解再通周期变长,提示 miR-5189-3p 参与了血栓形成的过程。

总之,miR-5189-3p 尚属于研究较少的 miRNA,也是一种较新的 miRNA。通过 HE 染色、Western blot 和 ELISA 实验,说明抑制 miR-5189-3p 可以降低血栓的机化和溶解再通,促进细胞凋亡,从而导致血栓的形成加剧。进一步说明了 miR-5189-3p 通过调节炎症细胞因子和凋亡相关蛋白可以起到抑制静脉血栓形成的作用。

参考文献:

- [1] 邓华亚,徐新,张社兵. 深静脉血栓形成诊断研究进展[J]. 中国心血管病研究,2016,14: 678-681.
- [2] Sáez-Giménez B, Berastegui C, Llorca K, *et al.* Deep vein thrombosis and pulmonary embolism after solid organ transplantation: an unresolved problem [J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2015, 29: 85-92.
- [3] Hong J, Lee JH, Yhim HY, *et al.* Incidence of venous thromboembolism in Korea from 2009 to 2013 [J]. *PLoS One*, 2018, 13: e0191897. doi: 10.1371/journal.pone.0191897.
- [4] 张玥,侯玉芬,刘明. 炎性细胞因子在深静脉血栓形成中的作用[J]. 中国中西医结合外科杂志,2006,12: 590-592.
- [5] 蒋知云,马俊芬,明亮. microRNA 在深静脉血栓形成中的作用及临床价值研究进展[J]. 医学研究生学报, 2017, 30: 893-896.
- [6] Jeraj L, Spirkoska A, Jezovnik MK, *et al.* Deep vein thrombosis and properties of the arterial wall [J]. *Vasa*, 2018, 47: 197-201.
- [7] Heit JA, Spencer FA, White RH. The epidemiology of venous thromboembolism [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2016, 41: 3-14.
- [8] Gurha P. MicroRNAs in cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Cardiol*, 2016, 31: 249-254.
- [9] Daniel JM, Penzkofer D, Teske R, *et al.* Inhibition of miR-92a improves re-endothelialization and prevents neointima formation following vascular injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 103: 564-572.
- [10] Kong L, Hu N, Du X, *et al.* Upregulation of miR-483-3p contributes to endothelial progenitor cells dysfunction in deep vein thrombosis patients via SRF [J]. *J Transl Med*, 2016, 14: 23. doi: 10.1186/s12967-016-0775-2.
- [11] Kong L, Du X, Hu N, *et al.* Downregulation of let-7e-5p contributes to endothelial progenitor cell dysfunction in deep thrombosis via targeting FASLG [J]. *Thromb Res*, 2016, 138: 30-36.
- [12] Bijak M, Dziedzic A, Synowiec E, *et al.* Flavonolignans inhibit IL1- β -induced cross-talk between blood platelets and leukocytes [J]. *Nutrients*, 2017, 9: 1022. doi: 10.3390/nu9091022.