

E1A 激活基因阻遏子基因表达变化与 颈动脉血管重塑的关系*

李 洋 闫承慧 田孝祥 彭程飞 韩雅玲**

(沈阳军区总医院全军心血管病研究所心内科, 沈阳 110840)

摘要 E1A 激活基因阻遏子(CREG)是一种广泛表达的小分子糖蛋白, 但其生物学功能仍不完全清楚. 为了探索病理性血管重塑的病理生理机制以及 CREG 在其中发挥的调控作用, 采用颈动脉导丝损伤模型构建小鼠病理性血管重塑模型, 应用小动物超声、Masson 染色、免疫组织化学染色、RT-PCR、Western-blot 等方法检测小鼠颈动脉内膜-中膜厚度、胶原含量、I 型胶原和 CREG 表达变化. 结果表明, 小鼠颈动脉损伤后 3 d 血管壁 CREG mRNA 和蛋白质水平迅速下降, 损伤后 7 d CREG 表达回升, 至损伤后 14 d 和 28 d 基本恢复到正常对照组水平. 血管损伤后 3 d 血管壁中 I 型胶原 mRNA 水平开始升高, 损伤后 7 d 血管壁开始增厚, 管壁中 I 型胶原表达水平继续增高, 损伤后 14 d 和 28 d 新生内膜形成, 管腔严重狭窄, I 型胶原在管壁和新生内膜内大量表达. 血管损伤早期 CREG 表达水平的变化与病理性血管重塑程度呈负相关关系, CREG 的表达为先迅速降低, 再逐渐回升, 而胶原表达和血管重塑程度则表现为持续加重. 上述研究结果提示, CREG 基因表达参与血管损伤导致的病理性血管重塑过程, 并可能决定了血管重塑的进程和结局.

关键词 E1A 激活基因阻遏子, 血管重塑, 小鼠

学科分类号 Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0128

在中国, 以血管功能失衡为病理学基础的心脑血管疾病的发病率呈逐年上升趋势. 血管损伤导致新生内膜形成是局部血管损伤的一种过度修复反应, 在高血压、动脉粥样硬化、冠脉搭桥术后移植血管及血管成形术后局部血管的再狭窄等多种血管重塑性疾病的病理过程中起着重要作用^[1-2]. 细胞外基质合成增加是血管重塑过程中的关键环节^[3]. 因此, 明确血管重塑发生机制并进行有效干预, 对多种血管重塑相关疾病的防治有重要意义.

E1A 激活基因阻遏子 (cellular repressor of E1A-stimulated genes, CREG) 是 1998 年发现的一个参与维持组织及细胞成熟分化稳态的重要调控因子^[4-5]. 本实验室系列研究发现, CREG 基因在血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞中均有高丰度表达^[6], 并能够调控血管壁细胞的生物学功能^[7-9], 提示 CREG 可能在维持血管稳态方面发挥重要作用, 有望成为防治血管重塑相关疾病的新靶点. 本文旨在观察小鼠颈动脉损伤模型中 CREG 表达变

化规律, 以探讨 CREG 基因参与颈动脉血管重塑的意义.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

雄性 12 周龄 C57BL/6 小鼠 50 只, 体重 25~30 g, 购自沈阳军区总医院实验动物科. 动物在本研究所动物房饲养, 恒温(22±2)℃, 恒湿(55±5)%, 人工光照明暗各 12 h, 自由取食及饮水.

1.1.2 主要试剂及仪器

4%水合氯醛溶液; 0.014 英寸直径的弹性导丝; 眼科镊、眼科剪、持针器、弯钳、直钳、动脉夹; 显微外科器械和 XTS-4A 型手术显微镜(镇江

* 国家自然科学基金资助项目(81130072, 81400316).

** 通讯联系人.

Tel: 024-23911006, E-mail: yalinghan@gmail.com

收稿日期: 2014-05-08, 接受日期: 2014-12-29

中天光学仪器有限责任公司); VisualSonics 公司的 Vevo2100 超声生物显微镜成像系统; 使用抗体: 小鼠抗 β -actin 抗体购自 Sigma 公司; 兔抗 I 型胶原抗体购自 Novus Biological 公司; 兔抗 CREG 抗体购自 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记的二抗购自康为世纪公司; 对二甲氨基偶氮苯(DAB)试剂盒购自中山金桥公司; Masson 染色试剂盒购自 Sigma 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 手术模型建立^[10]与分组

4%水合氯醛按每 20 g 体重 0.2 ml 腹腔注射麻醉小鼠. 小鼠仰卧位, 丝线固定前上切牙, 胶带固定四肢. 手术野皮肤去毛, 碘酒、酒精消毒, 铺巾. 腹壁皮下注射低分子肝素 1 mg/kg 抗凝. 行颈部前正中切口, 结扎颈外动脉, 用血管夹暂时阻断颈内动脉和颈总动脉血流. 在颈外动脉用显微剪行动脉切开, 插入直径为 0.014 英寸的弹性导丝, 导丝进入颈外动脉后再推送导丝跨越动脉分叉直达颈总动脉近心端的血管夹处, 旋转并来回推送导丝 3 次, 造成颈总动脉损伤. 退出导丝, 结扎动脉切开的近心端, 缝合皮肤. 假手术组术后 3 d($n=5$), 7 d($n=5$), 14 d($n=5$)和 28 d($n=5$)除不进行导丝损伤之外, 其他操作与手术组相同. 手术组术后 3 d($n=5$), 7 d($n=5$), 14 d($n=5$)和 28 d($n=5$)处死小鼠前行小动物超声检测双侧颈动脉内 - 中膜厚度, 处死小鼠后取双侧颈动脉进行指标检测. 血管组织用生理盐水轻轻冲洗后, 一部分置于组织冻存管, 液氮保存, 做 RT-PCR 或 Western-blot 备用, 一部分置于 4%多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 连续均匀切片, 切片厚约 5 μ m, 分别进行 HE 染色、Masson 染色, 光镜观察组织病理学改变.

1.2.2 颈动脉内 - 中膜厚度的超声检测^[11]

将小鼠仰卧位固定于恒温检查台, 温度保持 37℃, 同步记录小鼠心电、呼吸等生理参数, 心率维持在 450 次/min 左右, 心率稳定 1 min 后前胸涂抹耦合剂行超声生物显微镜检查. 获取颈总动脉长轴切面, 以锁骨和颈总动脉分叉为解剖标志, 便于在血管长轴准确定位测量部位, 分别测量颈总动脉近心端(锁骨平面)、中间段和远心端(颈总动脉分叉平面)的内 - 中膜厚度.

1.2.3 HE 染色

石蜡切片常规脱蜡至水, 苏木素液染核 10 min 后, 0.5%伊红溶液复染 10 min, 再经酒精梯度脱水干燥后透明封片. 光镜观察血管损伤后重塑情

况. 形态学分析利用计算机图像分析仪分别测量血管内膜和中膜横断面的面积, 计算内膜 / 中膜面积比(I/M), 以内弹力膜区别内膜和中膜, 测量采用单盲法.

1.2.4 Masson 染色

石蜡切片常规脱蜡至水, Weigert 苏木精液染核 20 min 后, 丽春红酸性复红液 10 min, 1%磷钼酸水溶液分化 3 min, 不经水洗, 直接用苯胺蓝染 15 min, 再经酒精梯度脱水干燥后透明封片. 光镜观察血管损伤后纤维化程度.

1.2.5 免疫组织化学染色

石蜡切片常规脱蜡至水, 将切片置于 0.01 mol/L pH 6.0 柠檬酸盐缓冲液中沸水煮 40 min 进行抗原修复; 3% H_2O_2 消除内源性过氧化物酶活性; 切片滴加正常山羊血清工作液封闭, 倾去血清, 勿洗; 滴加 CREG 或 I 型胶原抗体工作液(1:100), 4℃过夜; 切片滴加 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1:300), 室温孵育 2 h; 切片滴加 DAB 显色液, 再经酒精梯度脱水干燥后透明封片. 胞浆内见棕黄色颗粒为 CREG 或 I 型胶原阳性.

1.2.6 RT-PCR

以 Trizol 试剂提取组织总 RNA. 用核酸蛋白质测定仪测光密度 A_{260}/A_{280} 均在 1.6~1.8 之间, 说明 RNA 纯度较高. 各样品取 1 μ g RNA, 按试剂盒说明书进行 cDNA 合成和 PCR 扩增. CREG 的引物序列为 5' TGTACCTGAGTCCACTGCAG 3' 和 5' TCGAACAAACAGCGAATCCC 3', 扩增产物长度为 209 bp. I 型胶原的引物序列为 5' GTGAA-CCTGGCAAACAAGGT 3' 和 5' CTGGAGACCA-GAGAAGCCAC 3', 扩增产物长度为 413 bp. GAPDH 的引物序列为 5' ACATCATCCCTGCAT-CCACT 3' 和 5' CCTGCTTCACCACCTTCTTG 3', 扩增产物长度为 180 bp. 扩增条件为, 94℃变性 4 min 后进行以下循环: 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 循环 30 次, 最后 72℃延伸 7 min. 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳后凝胶扫描仪观察拍照, 以 GAPDH 的吸光度作为内参照.

1.2.7 Western-blot

利用液氮、研钵粉碎血管组织, 加入 RIPA 缓冲液(3 ml/克组织)、PMSF(10 g/L, 30 μ l/克组织), 冰上孵育 30 min. 12 000 g 离心 15 min, 上清液为蛋白裂解液. BCA 法测定蛋白质浓度, 取相同质量的细胞裂解液, 并加等体积的 4×电泳缓冲液, 沸水浴 3 min, 上样, 电泳(浓缩胶 20 mA, 分离胶

35 mA), 电转膜仪转膜(100 mA 40 min). 5%脱脂奶粉封闭 2 h, 加入兔抗 CREG(1: 1 000)、I 型胶原(1: 1 000)抗体、小鼠抗 β -actin(1: 2 000)抗体, 4℃ 过夜. TBS-T 缓冲液清洗后, 分别加入 HRP 标记的山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗(1: 2 000), 室温孵育 2 h 后, 进行显影曝光.

1.2.8 统计学处理

所有数据采用 SPSS 17.0 软件包进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组之间的比较采取单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为有显著性差异.

2 结果与分析

2.1 颈动脉损伤诱导血管重塑

将颈动脉从颈动脉分叉近端开始进行连续切片. 光镜下, HE 染色可以观察到血管横切面呈内、中、外膜三层结构, 假手术组小鼠颈动脉无新生内膜形成, 内膜可见单层扁平的长梭形内皮细胞; 血管损伤 0 d 可见动脉内皮剥脱; 损伤后 3 d 可见动脉内表面附着少量红细胞, 血管管壁开始增厚; 损伤后 7 d 血管管壁继续增厚, 尚无新生内膜形成; 损伤后 14 d 新生内膜形成, 管腔狭窄; 损伤后 28 d 管腔严重狭窄(图 1, 表 1).

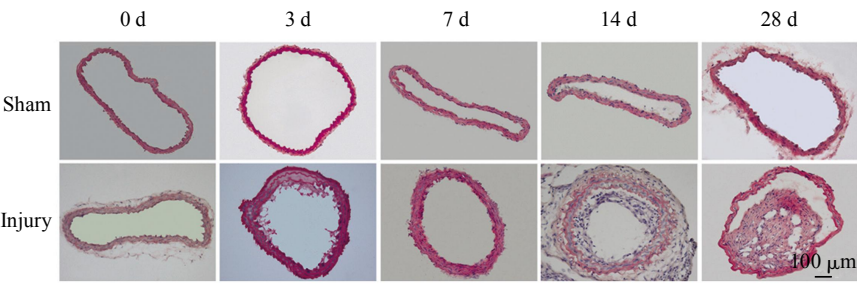


Fig. 1 Hematoxylin and eosin (H&E) staining of representative cross-sections of mouse carotid arteries

Table 1 Quantitative analysis of neointima area and I/M ratio of injured arteries

	Post 14 d	Post 28 d
Neointima area/ μm^2	16517.24 $\pm$ 4119.23	49551.94 $\pm$ 9877.13
I/M ratio	0.61 $\pm$ 0.08	1.54 $\pm$ 0.12

小动物超声观察损伤血管的内膜 - 中膜厚度. 假手术组中损伤血管的内膜 - 中膜厚度未见明显变化. 血管损伤前颈动脉内膜 - 中膜厚度为(88 $\pm$ 8) μm , 血管损伤 7 d 后, 血管的内膜 - 中膜厚度开始增加 [(115 $\pm$ 9) μm], 14 d[(150 $\pm$ 10) μm]和 28 d[(252 $\pm$ 43) μm]后损伤血管内膜 - 中膜厚度增加更为显著(图 2).

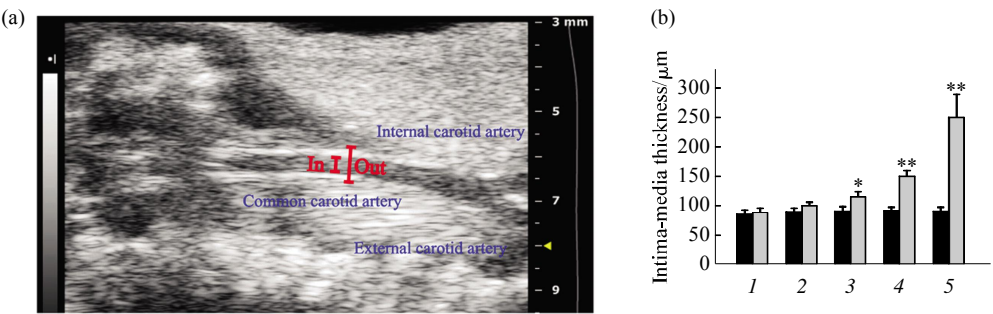


Fig. 2 Ultrasound analysis of intima-media thickness of mouse carotid arteries

(a) A representative ultrasound biomicroscopy image showing mouse left common carotid artery, external carotid artery and internal carotid artery. (b) Quantification of the intima-media thickness of mouse left common carotid arteries. Values are $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$ for each group). $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs. control group. I: Control; 2: Post 3 d; 3: Post 7 d; 4: Post 14 d; 5: Post 28 d. ■: Sham; □: Injury.

Masson 三色法检测血管损伤后血管中总胶原含量变化情况。如图 3 显示, 与假手术组相比, 血管损伤后 7 d 血管外膜和中膜中胶原含量增多, 损伤后 14 d 见新生内膜中胶原表达, 呈进行性增多

趋势, 损伤后 28 d 血管外膜、中膜和新生内膜中含大量胶原, 提示随着血管损伤时间的延长, 血管纤维化程度逐渐加重。

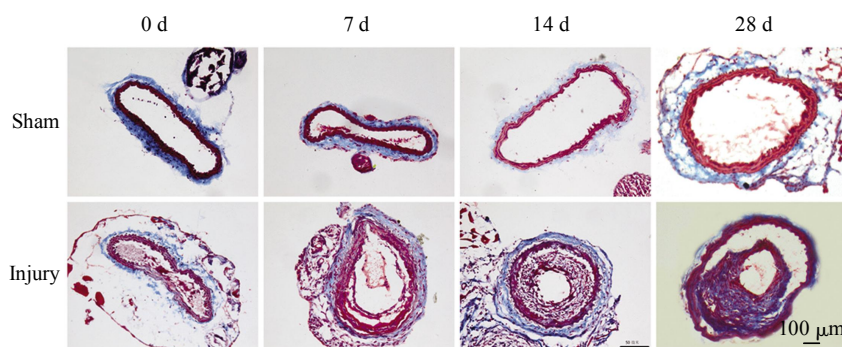


Fig. 3 Masson staining of representative cross-sections of mouse carotid arteries

RT-PCR(图 4)、Western-blot(图 5)和 I 型胶原免疫组化染色(图 6)结果均显示, 血管损伤诱导血

管中 I 型胶原 mRNA 和蛋白质水平均呈时间依赖性增加。

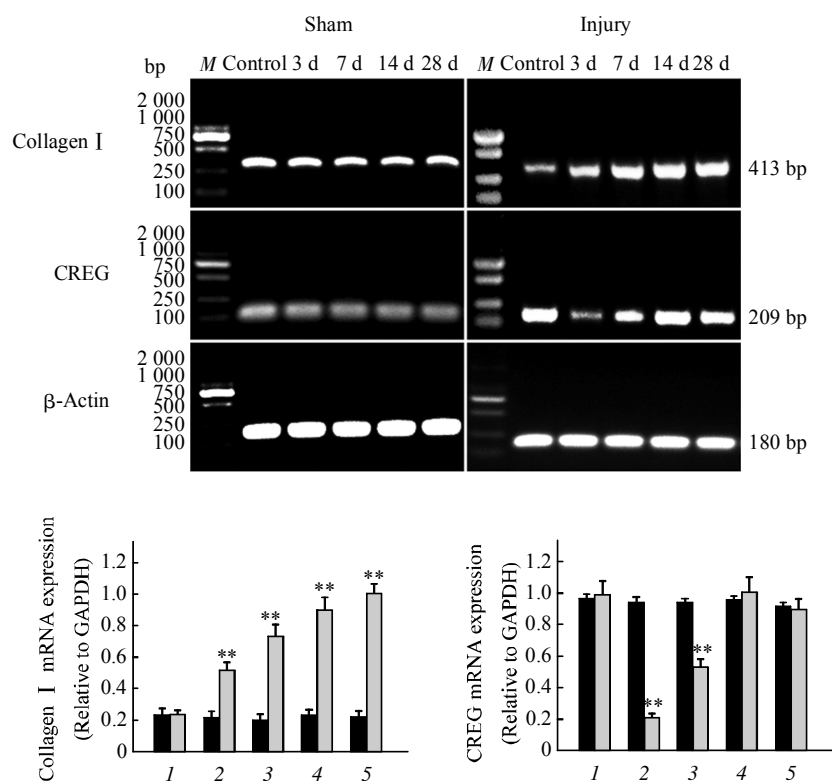


Fig. 4 Collagen I and CREG mRNA levels by RT-PCR from carotid arteries in mice

Data were acquired by RT-PCR and normalized to GAPDH. Values are $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$ for each group). ** $P < 0.01$ vs. control group. 1: Control; 2: Post 3 d; 3: Post 7 d; 4: Post 14 d; 5: Post 28 d. ■: Sham; □: Injury.

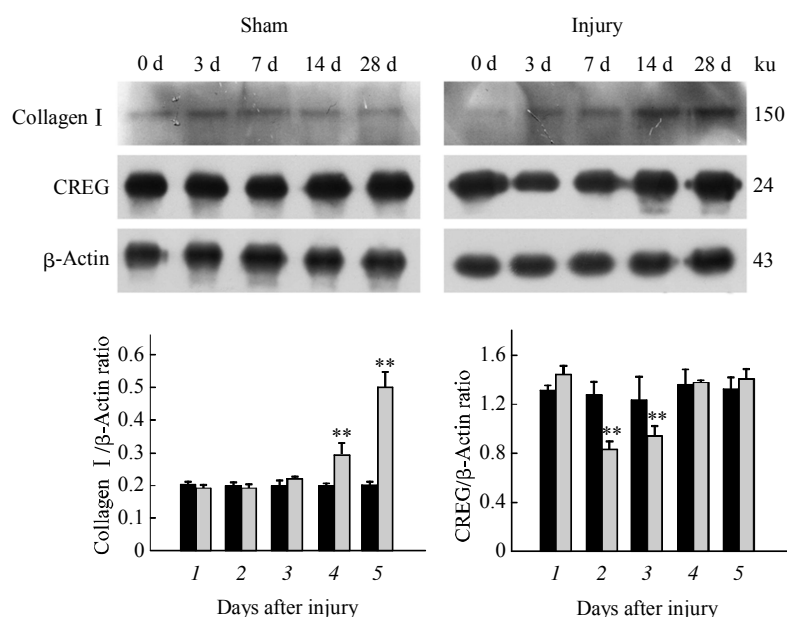


Fig. 5 Collagen I and CREG protein levels by Western-blot from carotid arteries in mice

Representative Western bands of collagen I, CREG and β -actin are shown above each bar. Values are $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$ for each group). ** $P < 0.01$ vs. control group. 1: 0 d; 2: 3 d; 3: 7 d; 4: 14 d; 5: 28 d. ■: Sham; □: Injury.

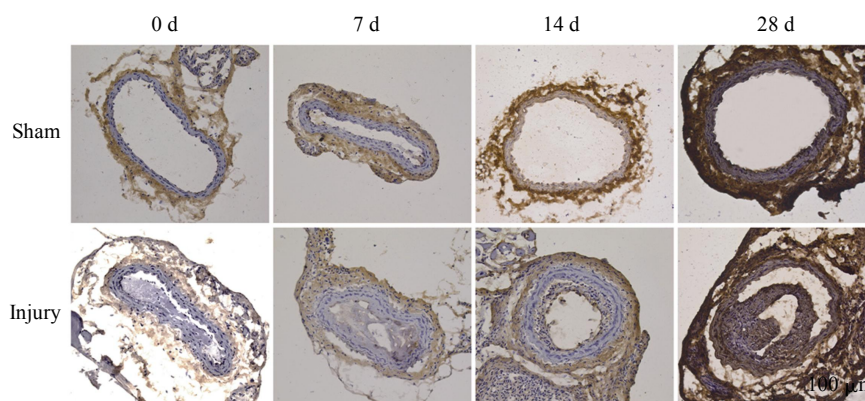


Fig. 6 Representative sections showing immunohistochemical analysis of collagen I in mouse carotid arteries

2.2 血管损伤诱导血管重塑过程中 CREG mRNA 表达变化

CREG mRNA 的表达和内参照 GAPDH 的扩增条带与理论值相符。假手术组中, CREG mRNA 在血管中的表达水平未见明显变化。血管损伤后 3 d, 血管中 CREG mRNA 表达水平显著下调(为损伤前水平的 21.00%, $P < 0.01$), 损伤后 7 d 与损伤后 3 d 相比 CREG mRNA 表达水平有所恢复, 但与损伤前相比仍下调 46.44%, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。损伤后 14 d(为损伤前水平的 101.17%, $P = 0.53$)和 28 d(为损伤前水平的 93.28%, $P = 0.21$)血

管中 CREG mRNA 表达水平基本恢复到损伤前水平(图 4)。

2.3 血管损伤诱导血管重塑过程中 CREG 蛋白表达变化

免疫组织化学结果显示, CREG 在正常颈动脉的内膜、中膜和外膜均有表达, 血管损伤 3 d CREG 在损伤血管中的表达水平降低最显著, 损伤后 7 d 较 3 d 时 CREG 表达有所增加, 但较其他时间点仍减弱, 损伤后 14 d 和 28 d CREG 蛋白在新生内膜和血管壁中表达水平有所恢复(图 7)。

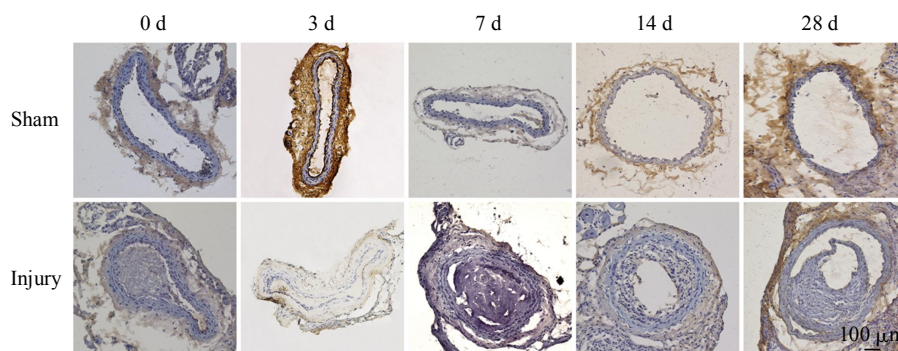


Fig. 7 Representative sections showing immunohistochemical analysis of CREG in mouse carotid arteries

Western-blot 结果显示, 假手术组中 CREG 蛋白在血管中的表达水平未见明显变化. 血管损伤后 3 d, 血管中 CREG 蛋白表达水平显著下调(为损伤前水平的 57.50%, $P < 0.01$). 损伤后 7 d 与损伤后 3 d 相比 CREG 蛋白表达水平有所恢复, 但与损伤前相比仍下调 34.61%, 差异有统计学意义($P < 0.01$). 损伤后 14 d(为损伤前水平的 95.43%, $P = 0.22$)和 28 d(为损伤前水平的 97.44%, $P = 0.35$)血管中 CREG 蛋白表达水平基本恢复到损伤前水平(图 5).

3 讨 论

血管重塑是众多心血管疾病病理过程中起决定作用的因素之一, 如自然形成的动脉粥样硬化、血管移植动脉粥样硬化、各种血管成形术后的血管再狭窄、静脉嫁接后形成的粥样硬化等病理过程均与血管重塑有着密切的关系^[1-2]. 血管重塑, 是指病理因素刺激导致的血管结构性改变, 包括一切内外因素所造成的血管腔/壁比例和几何形状的改变, 细胞外基质合成增加是血管重塑过程中的关键环节. 迄今为止, 血管重塑形成机制尚不完全明确, 目前的研究成果还没有形成有效的药物和器械以防止血管重塑的发生. 因此, 明确血管重塑发生机制并进行有效的干预, 将对多种血管重塑相关疾病的防治有重要意义.

目前, 小鼠颈动脉损伤模型主要有颈动脉结扎、颈动脉套管、颈动脉外膜氯化铁损伤和颈动脉导丝损伤法^[12-14]. 颈动脉导丝损伤模型的致病因素和病理生理过程最符合临床上损伤致血管重塑发生、发展的特点^[12], 因此在本研究中采用此方法制

作血管重塑模型.

本研究通过建立小鼠颈动脉损伤模型, 对损伤后不同时间点新生内膜形成和血管重塑过程进行了系统观察. I 型胶原是细胞外基质的重要成分, 已将其视为血管纤维化和重塑的重要标志^[15]. 结果表明, 小鼠颈动脉损伤后 3 d, 虽然血管壁厚度未见明显变化, 但此时损伤血管中 I 型胶原 mRNA 水平开始增高. 至损伤后 7 d 血管壁明显增厚, 但未形成新生内膜, Masson 染色显示血管壁中胶原含量增加, 其中 I 型胶原 mRNA 和蛋白质水平均显著增高, 表明血管损伤导致血管重塑发生. 血管损伤 14 d 和 28 d 时, 新生内膜形成导致血管腔狭窄, 血管中 I 型胶原含量进一步增加, 提示损伤致血管重塑程度进一步加重. 上述研究结果符合其他文献报道的小鼠颈动脉损伤后的血管重塑过程^[10-12].

CREG 是 1998 年哈佛大学 Gill 教授从 HeLa 细胞 cDNA 文库中发现的一种分泌型糖蛋白, 其在成熟分化的组织/细胞中广泛表达, 但在去分化的组织/细胞中却呈低表达或不表达状态^[4]. CREG 可直接与外源性腺病毒蛋白 E1A 及哺乳动物体内转录因子 E2F 家族蛋白竞争性地结合在靶基因的启动子上, 从而阻遏 E1A 和 E2F 对靶基因的激活作用^[5]. 近年来研究发现, CREG 可能是一种新的心血管稳态调控因子. 首先, 在胚胎发育过程中, E 9.5 d 的胚胎血管内皮细胞中 CREG 表达阳性; E10.5 d 的胚胎血管内皮细胞周围开始出现少量肌动蛋白表达阳性的原始血管平滑肌细胞, 同时 CREG 蛋白表达, 定位于肌动蛋白一致; CREG 蛋白在三层结构的血管细胞中均为阳性表达, 其表达强度在 E15.5 d 达到最高, E18.5 d 表达下降并维持

至成年, 说明 CREG 表达与胚胎血管发育密切相关^[16]。其次, 病理因素刺激下, 血管细胞中 CREG 基因表达下调^[17-18]。另外, 心衰也能够诱导心脏组织中 CREG 基因表达下调^[19-20]。但是, CREG 基因在小鼠血管重塑模型中表达变化规律目前国内外尚未见报道。

本实验研究发现, 小鼠颈动脉损伤早期血管重塑程度与 CREG 基因表达的变化呈负相关。动脉损伤修复的初始阶段(损伤后 3 d 和 7 d), CREG mRNA 和蛋白水平均显著下调, 此时血管壁开始增厚, I 型胶原的 mRNA 和蛋白表达增加, 表明血管中 CREG 表达变化趋势与 I 型胶原表达和损伤后血管重塑程度反向变化; 随着修复期的推移(损伤后 14 d 和 28 d), CREG mRNA 和蛋白的表达趋于恢复, 但此时血管重塑程度仍进一步加剧, 表现为新生内膜形成、管腔严重狭窄, 血管中 I 型胶原表达显著上调, 提示血管损伤早期血管中 CREG 表达下调在病理性血管重塑过程中发挥着至关重要的作用, 即使血管损伤后期血管中和新生内膜内 CREG 表达有所恢复, 也不能抑制病理性血管重塑的发展。血管损伤导致局部肾素-血管紧张素系统(RAS)的激活, 其主要效应分子血管紧张素 II (Ang II)水平升高^[21]。我们前期研究发现, Ang II 可通过其 I 型受体下调血管外膜成纤维细胞中 CREG 表达^[17], 推测血管损伤后局部 RAS 的激活可能是导致血管中 CREG 基因表达下调的机制之一。

目前已证明 E1A 和 E2F 均能刺激哺乳动物血管壁细胞增殖, 抑制其分化^[22], 进而促进血管损伤后病理性血管重塑的发生。所以, CREG 可能是通过与 E1A、E2F 竞争性抑制作用而起到抑制损伤后病理性血管重塑发生发展的作用, 其机制还有待进一步深入研究。因此, 血管损伤早期如果进行有效人为干预, 抑制损伤诱导的血管中 CREG 基因表达下调, 可能会抑制病理性血管重塑的发生发展。综上所述, CREG 有可能成为防治病理性血管重塑相关疾病的一个有效的调控基因, 为这类疾病的防治开辟一条新的思路和手段。

参 考 文 献

- [1] Korshunov V A, Schwartz S M, Berk B C. Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glatov's phenomenon. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, **27** (8): 1722-1728
- [2] Lan T H, Huang X Q, Tan H M. Vascular fibrosis in atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol*, 2013, **22**(5): 401-407
- [3] Ponticos M, Smith B D. Extracellular matrix synthesis in vascular disease: hypertension, and atherosclerosis. *J Biomed Res*, 2014, **28**(1): 25-39
- [4] Veal E, Eisenstein M, Tseng Z H, *et al*. A cellular repressor of E1A-stimulated genes that inhibits activation by E2F. *Mol Cell Biol*, 1998, **18**(9): 5032-5041
- [5] Veal E, Groisman R, Eisenstein M, *et al*. The secreted glycoprotein CREG enhances differentiation of NTERA-2 human embryonal carcinoma cells. *Oncogene*, 2000, **19**(17): 2120-2128
- [6] Li Y, Yan C H, Li S H, *et al*. CREG: a possible candidate for both prevention and treatment of proliferative vascular disease. *Curr Mol Med*, 2012, **12**(10): 1273-1281
- [7] 韩雅玲, 胡叶, 刘海伟, 等. E1A 激活基因阻遏子促进人血管平滑肌细胞分化和迁移. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32**(6): 517-522
Han Y L, Hu Y, Liu H W, *et al*. *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(6): 517-522
- [8] 韩雅玲, 徐红梅, 闫承慧, 等. RhoA 和血清反应因子(SRF)介导 E1A 激活基因阻遏子诱导人血管平滑肌细胞分化. *生物化学与生物物理进展*, 2006, **33**(5): 438-445
Han Y L, Xu H M, Yan C H, *et al*. *Prog Biochem Biophys*, 2006, **33**(5): 438-445
- [9] 韩雅玲, 赵昕, 闫承慧, 等. 转录因子 E2F1 抑制 CREG 表达调控体外培养人血管平滑肌细胞分化. *生物化学与生物物理进展*, 2007, **34**(5): 490-496
Han Y L, Zhao X, Yan C H, *et al*. *Prog Biochem Biophys*, 2007, **34**(5): 490-496
- [10] Holy E W, Jakob P, Eickner T, *et al*. PI3K/p110 α inhibition selectively interferes with arterial thrombosis and neointima formation, but not re-endothelialization: potential implications for drug-eluting stent design. *Eur Heart J*, 2014, **35**(12): 808-820
- [11] Razuvaev A, Lund K, Roy J, *et al*. Noninvasive real-time imaging of intima thickness after rat carotid artery balloon injury using ultrasound biomicroscopy. *Atherosclerosis*, 2008, **199**(2): 310-316
- [12] Lindner V, Fingerle J, Reidy M A. Mouse model of arterial injury. *Circ Res*, 1993, **73**(5): 792-796
- [13] van den Borne P, Haverslag R T, Brandt M M, *et al*. Absence of chemokine (C-x-C motif) ligand 10 diminishes perfusion recovery after local arterial occlusion in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, **34**(3): 594-602
- [14] Spectre G, Zhu L, Ersoy M, *et al*. Platelets selectively enhance lymphocyte adhesion on subendothelial matrix under arterial flow conditions. *Thromb Haemost*, 2012, **108**(2): 328-337
- [15] de Haas H J, Arbustini E, Fuster V, *et al*. Molecular imaging of the cardiac extracellular matrix. *Circ Res*, 2014, **114**(5): 903-915
- [16] Yang G T, Han Y L, Tian X X, *et al*. Pattern of expression of the CREG gene and CREG protein in the mouse embryo. *Mol Biol Rep*, 2011, **38**(3): 2133-2140
- [17] Li Y, Tao J, Zhang J, *et al*. Cellular repressor of E1A-stimulated genes controls phenotypic switching of adventitial fibroblasts by blocking p38MAPK activation. *Atherosclerosis*, 2012, **225** (2): 304-314

- [18] Wang J, Yan C H, Li Y, *et al.* MicroRNA-31 controls phenotypic modulation of human vascular smooth muscle cells by regulating its target gene cellular repressor of E1A-stimulated genes. *Exp Cell Res*, 2013, **319**(8): 1165–1175
- [19] Xu L, Liu J M, Chen L Y. CREG, a new regulator of ERK1/2 in cardiac hypertrophy. *J Hypertens*, 2004, **22**(8): 1579–1587
- [20] Bian Z, Cai J, Shen D F, *et al.* Cellular repressor of E1A-stimulated genes attenuates cardiac hypertrophy and fibrosis. *J Cell Mol Med*, 2009, **13**(7): 1302–1313
- [21] Montezano A C, Nguyen Dinh Cat A, Rios F J, *et al.* Angiotensin II and vascular injury. *Curr Hypertens Rep*, 2014, **16**(6): 431
- [22] Fujita N, Furukawa Y, Itabashi N, *et al.* Differences in E2F subunit expression in quiescent and proliferating vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, **283**(1): H204–H212

The Change of Cellular Repressor of E1A-stimulated Genes During Carotid Vascular Remodeling*

LI Yang, YAN Cheng-Hui, TIAN Xiao-Xiang, PENG Cheng-Fei, HAN Ya-Ling**

(Cardiovascular Research Institute and Department of Cardiology, Shenyang Northern Hospital, Shenyang 110840, China)

Abstract Cellular repressor of E1A-stimulated genes (CREG) has been shown to be ubiquitously expressed in human and mouse tissues. However, its physiological functions and possible involvement in pathological processes remain unknown. To explore pathogenesis of vascular remodeling and possible role of CREG, we established an injury model of the mouse carotid artery in the present study. High-resolution small-animal ultrasound, Masson staining, immunohistochemistry, RT-PCR and Western-blot were used to detect the intima-media thickness, collagen content, the change of collagen type I and CREG expression of arterial wall at different time after arterial injury. CREG was expressed in normal arteries. The expression of CREG mRNA and protein of the arterial wall was markedly down-regulated after injury of mouse carotid artery, and reached its lowest value on the third day after arterial injury, with close correlation to the process of vascular remodeling (increase in mRNA and protein level of collagen type I). CREG expression was gradually restored on the seventh day, and almost returned to normal levels on fourteenth day and twenty-eighth day after arterial injury. In contrast, injured arteries developed marked vascular remodeling after 7 days as manifested by increase in intima-media thickness, narrowing of the vascular lumen, collagen content as well as mRNA and protein level of collagen type I. There were negative relationships between CREG expression and vascular remodeling at the early time of artery injuries. The expression of CREG was decreased at beginning and then increased, but the degree of vascular remodeling was continued to exacerbate. These data strongly suggest that CREG is involved in the development of vascular remodeling after arterial injury, and that injury-induced CREG down-regulation may contribute to the progression of vascular remodeling.

Key words cellular repressor of E1A-stimulated genes, vascular remodeling, mouse

DOI: 10.16476/j.pibb.2014.0128

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (81130072, 81400316).

**Corresponding author.

Tel: 86-24-23911006, E-mail: yalinghan@gmail.com

Received: May 8, 2014 Accepted: December 29, 2014