

## 动脉壁正常区与脂斑区血小板源性 生长因子及其受体基因表达的比较\*

杨国君<sup>①</sup> 张琪 丁金凤

(中国医学科学院、中国协和医科大学心血管病研究所、阜外心血管病医院, 北京 100037)

### Gene Expression of Platelet-derived Growth Factor and Its Receptor in Aortic Wall and Fatty Streaks

YANG Guo-Jun, CHANG Chi and DING Jin-Feng  
(Cardiovascular Institute and Fu Wai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100037, China)

To Investigate the relationship of platelet derived growth factor (PDGF) and the pathogenesis of atherosclerosis, the expression of PDGF and its receptor in normal human aortic wall and fatty streaks was studied.

**Methods** Total RNA of normal human aortic smooth muscle and fatty streaks from thoracic aorta was isolated by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. The gene expression PDGF A, B chain and PDGF  $\alpha$ - and  $\beta$ -receptor was investigated by Northern blot analysis.

**Results** In normal aortic smooth muscle or the normal region from the aorta with atherosclerotic lesions, the gene expression of PDGF was very low, while that of PDGF receptor was not detected. In contrast, in the fatty streaks, the expression of PDGF A mRNA and PDGF  $\beta$ -receptor mRNA were augmented significantly.

**Conclusions** It suggests that the increased gene expression of PDGF A chain and PDGF  $\beta$ -receptor promotes the proliferation of smooth muscle cells thus

highly related to the pathogenesis of atherosclerosis.

**KEY WORDS** Platelet-derived growth factor; Atherosclerosis; Northern blot analysis

**摘要** 应用 Northern 印迹分析技术测定了正常人主动脉平滑肌细胞血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)及其受体 mRNA 的表达,以探讨其与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的关系。结果显示,正常动脉壁及有脂纹脂斑动脉的正常区 PDGF 链 mRNA 仅有微量表达,未检出 PDGF 受体 mRNA 的表达;而脂纹脂斑区的 PDGF A 链 mRNA 及 PDGF  $\beta$ -受体 mRNA 表达则显著增高。提示动脉壁 PDGF A 链及 PDGF 受体 mRNA 表达增高与 As 的发生有关。

**关键词** 血小板源生长因子;动脉粥样硬化; Northern 印迹分析

动脉内膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变的主要特征之一。SMC 从动脉中膜迁移至内膜并增殖的过程受多种因素的影响,其中血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)及其受体起着重要的作用<sup>[1]</sup>。PDGF 为机体强有力的有丝分裂剂之一,通过其靶细胞膜受体发挥生物学效应<sup>[2]</sup>。培养的动脉 SMC、内皮细胞(endothelial cell, EC)及未成年大鼠的动脉平滑肌细胞中均有 PDGF 及其受体基因的表达,但成年大鼠动脉平滑肌细胞中无或仅有微量 PDGF 及其受体基因的表达<sup>[3]</sup>;而 As 动脉壁和实验性损伤、以及移植的动脉血管平滑肌细胞中的 PDGF mRNA 表达明显增高<sup>[4]</sup>,说明 PDGF 基因的表达状态与

本课题属国家“八五”科技攻关项目(85-915-03-04)

<sup>①</sup>博士生

动物生长发育不同阶段的细胞表型及细胞是否受到机械损伤等因素的刺激有关。国外有关研究多为动物实验结果,本文则以人主动脉为研究材料,旨在探讨 PDGF 及其受体基因表达与人 As 形成的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

血小板源性生长因子 A、B 链及 PDGF  $\alpha$ 、 $\beta$  受体探针由 Hedin CH 博士(瑞典)馈赠,  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP(北京亚辉医学生物工程公司), 异硫氰酸胍(Sigma), 甲醛凝胶缓冲液(Promega)。

### 1.2 材料

人胸主动脉,取自意外死亡者。死后立即取出放入液氮,肉眼观察无任何病变者为正常主动脉,有脂纹脂斑为病变主动脉。用弯头镊子撕去内膜,剥去外膜后,立即应于 24 h 内分别取正常动脉平滑肌、有病变动脉的正常区平滑肌及脂斑区的内中膜组织(主要为平滑肌),待提取总 RNA。

### 1.3 Northern 印迹分析

用缺口平移法以  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP 标记 PDGF A、B 链及其  $\alpha$ 、 $\beta$  受体 cDNA 探针。用酸性异硫氰酸胍酚氨方法分别从上述各平滑肌组织中提取总 RNA<sup>[1]</sup>, 取总 RNA 30  $\mu$ g, 经 1% 琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳后, 转移到尼龙膜上, 80℃ 烤膜 2 h, 68℃ 预杂交 2 h 后加入标记探针, 于 42℃ 继续杂交 20 h, 洗膜后于 -70℃ 放射自显影。

## 2 结果

### 2.1 总 RNA 提取质量的鉴定

无论从正常还是有脂纹脂斑动脉的正常区及脂纹脂斑区平滑肌细胞中提取的总 RNA 经电泳后显示 28 s 和 18 s 二条清晰带, 二者之比约为 2:1, 说明在提取过程中未产生 RNA 的降解(Figure 1)。

### 2.2 正常和脂纹脂斑区平滑肌细胞中 PDGF A 链 mRNA 表达的比较

取自正常和有脂纹脂斑动脉的正常区及脂纹脂斑区平滑肌细胞中的总 RNA 各 30  $\mu$ g, 分别上样及电泳, 经 Northern 印迹显示, 正常动脉壁及病变动脉壁的正常区平滑肌细胞中

PDGF A 链 mRNA 有微量表达(Figure 2 a, b); 但在脂纹脂斑区, 其 mRNA 表达量异常增高(Figure 2 c, d)。

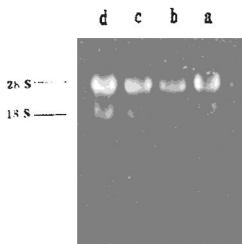


Figure 1. Electrophoretogram of total RNA of smooth muscle cell from human normal aorta and fatty streaks. a. normal aortic smooth muscle cell; b. normal region of the aorta with atherosclerotic lesions; c, d. fatty streaks.

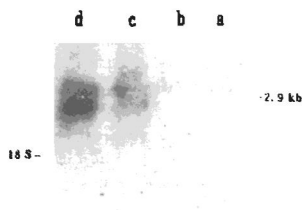


Figure 2. PDGF A chain gene expression of smooth muscle cell from human normal aorta and fatty streaks. a. normal aortic smooth muscle cell; b. normal region of the aorta with atherosclerotic lesions; c, d. fatty streaks.

### 2.3 正常和脂纹脂斑区平滑肌细胞中 PDGF $\beta$ 受体 mRNA 表达的比较

用上述同法电泳和 Northern 印迹杂交, 显示正常主动脉及有脂纹脂斑动脉的正常区平滑肌细胞中均未检出 PDGF  $\beta$  受体的 mRNA 表达(Figure 3 a, b); 而在主动脉的脂纹脂斑区, 该受体的 mRNA 含量明显升高(Figure 3 c, d)。以上结果说明在脂纹脂斑区 PDGF A 链及 PDGF  $\beta$  受体有基因表达增强。

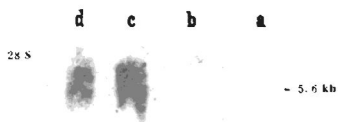


Figure 3. PDGF  $\beta$  receptor gene expression of smooth muscle cell from human normal aorta and fatty streaks. a. normal aortic smooth muscle cell; b. normal region of the aorta with atherosclerotic lesions; c. d. fatty streaks.

用上述同样方法在正常动脉壁及脂纹脂斑区均未检出 PDGF B 链及 PDGF  $\alpha$  受体 mRNA 的表达。

### 3 讨论

本研究结果显示,人正常主动脉及病变主动脉正常区的平滑肌细胞中 PDGF A 链及 PDGF  $\beta$  受体 mRNA 仅有微量表达或未检测到;而脂纹脂斑区二者的表达则明显增强,与文献报道的动物实验结果一致<sup>[6]</sup>。说明在人体,PDGF 及其受体基因表达增高也与 As 发生关系密切。脂纹脂斑区的 PDGF A 链 mRNA 表达增高可能是主动脉壁受到 As 致病因素的刺激后,SMC 中 PDGF 的自分泌和旁分泌系统再度被激活的结果<sup>[6]</sup>。增多的 PDGF-AA 作用于自身或相邻的 SMC,进一步引起 SMC 分泌更多的 PDGF,因此加速了 SMC 向内膜迁移及增殖的过程。Barrent 和 Benditt<sup>[7]</sup>通过原位杂交技术表明 As 斑块组织的内皮细胞和巨噬细胞的 PDGF B 链 mRNA 表达明显增高。但我们无论在正常或病变动脉壁均未检测到 PDGF B 链的表达。由于取材为动脉平滑肌,虽然脂纹脂斑病灶尚含少量能分泌 PDGF B 链的巨噬细胞,可能因含量少,用 Northern 印迹技术难以检出其 mRNA 的表达。最近 Lapidot 等<sup>[8]</sup>报道 PDGF-BB 刺激血管 SMC 增殖的作用最强。其

作用乃通过  $\beta$  受体完成。本实验观察到脂纹脂斑区的 PDGF  $\beta$  受体 mRNA 表达明显增加,因而 PDGF  $\beta$  受体合成可能增加。已知 PDGF  $\beta$  受体只能和 PDGF B 链结合,故其增加可使之与更多的 PDGF-BB 结合,从而引起 SMC 的增殖,参与 As 的发生。至于 PDGF  $\beta$  受体基因在脂纹脂斑区表达增高的原因,可能与 As 发生中内皮细胞和 SMC 的转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor, TGF- $\beta$ )分泌增加有关,因 TGF- $\beta$ 能正向调节 PDGF 的  $\beta$  亚基,使之增加大约 50%<sup>[9]</sup>。

有资料报道自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)和正常血压 WKY 大鼠动脉平滑肌中有微量量的 PDGF  $\alpha$  受体 mRNA 表达<sup>[10]</sup>,但其数量不足  $\beta$  受体的 1/6<sup>[11]</sup>。本实验在正常和病变动脉中的正常区均未检测到 PDGF  $\alpha$  受体 mRNA,可能与其数量极少有关。

已知动脉 SMC 以合成与分泌 PDGF-AA 为主,只分泌极少量 B 链<sup>[1]</sup>,而在其细胞膜上的受体分布却以  $\beta$  亚基占明显优势。显然,动脉 SMC 的增殖不仅靠其自身分泌的 PDGF-AA,更有内皮细胞及巨噬细胞中合成的 PDGF-BB 通过旁分泌,作用于 SMC 细胞膜上的  $\beta$  受体而促进其增殖。

以上结果提示,血管壁细胞合成的 PDGF 及动脉平滑肌细胞膜上 PDGF 受体的分布是参与 As 形成的因素之一。

### 参考文献

- 1 Ross R. Peptide regulatory factor: Platelet-derived growth factor. *Lancet*, 1989, 27: 1 179~83.
- 2 Seifert RA. Two different subunits associated to create isoform-specific PDGF receptors. *J Biol Chem*, 1989, 264: 8 771~77.
- 3 Spöndlin M, Hedin U, Sejesen Y, et al. Arterial smooth muscle cells express PDGF A chain mRNA, secrete a PDGF like mitogen, and bind exogenous PDGF in a phenotype- and growth state-dependent manner. *J Cell Biol*, 1988, 106: 403~413.
- 4 Newby AC, George SJ. Proposed role for growth factors in mediating smooth muscle proliferation in vascular

- pathologies. *Cardiovas Res*, 1993, **27**: 173~83.
- 5 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolated by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biol*, 1987, **162**: 156~159.
  - 6 Walker LN. Production of PDGF-like molecule by cultured arterial smooth muscle cells accompanies proliferation after arterial injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83**: 7 311~15.
  - 7 Barrent TB, Benditt EP. sis (PDGF) gene transcripts levels are elevated in human atherosclerotic lesions compared to normal artery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, **84**: 1 099~ 103.
  - 8 Lapidot SA, Phair RD. Platelet-derived growth factor causes sustained depletion of both inositol triphosphate-sensitive and caffeine-sensitive intracellular calcium stores in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 44~51.
  - 9 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: A prospective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801~809.
  - 10 Sarzan R. Hypertension-induced changes of platelet-derived growth factor receptor expression in rat aorta and heart. *Hypertension*, 1991, **17**: 888~895.
  - 11 Sachinidis A, Locher R, Vetter W, et al. Different effects of PDGF on rat vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 10 238~243.

(本文 1995-06-14 收到, 1995-11-30 修回)

## 1996 年中国病理生理学会学术活动计划

| 会 议 名 称                                             | 时 间                        | 地 点        | 计划人数      | 联 系 人                                                   |
|-----------------------------------------------------|----------------------------|------------|-----------|---------------------------------------------------------|
| 1 中国病理生理学会心血管专业委员会第 7 次及“国际心脏研究会(ISHR)中国分会第 4 次学术会议 | 1996 年 4 月<br>19~21 日(3 天) | 郑州河南医科大学   | 200 人     | 夏辉明(河南医科大学病理生理教研室, 郑州 450052)                           |
| 2 中国病理生理学会肿瘤专业委员会第 6 次会议免疫专业委员会第 7 次会议              | 1996 年 10 月                | 天津市或湖南岳阳市  | 150 人     | 肿瘤: 余应年(浙江医科大学, 杭州, 310031) 免疫: 钱振超(大连医科大学, 大连, 116027) |
| 3 中国病理生理学会第 7 届, 全军第 5 届, 微循环学术会议                   | 1996 年                     | 北京, 解放军总医院 | 50~200 人  | 李向红(北京解放军总医院微循环研究室, 北京, 100853)                         |
| 4 第二届中医病理生理专业委员会第 2 次学术会议                           | 1996 年 8~9 月               | 甘肃省敦煌市     | 80 人      | 邱才同(甘肃中医学院, 兰州, 730000)                                 |
| 5 全国受体学术会议                                          | 1996 年 8 月                 | 昆明市        | 150~200 人 | 徐仁宝(上海第二军医大学, 200433)                                   |
| 6 中国病理生理学会常务理事                                      | 1996 年 10 月                | 暂定内蒙古      | 15 人      | 韩启德(北京医科大学附属第三医院, 100083)                               |