

原位杂交检测胰岛素样生长因子-1 受体基因 在动脉粥样硬化组织中的表达

刘 鹏^① 韩琴琴^① 杨 毅^② 杨英珍^①

上海医科大学^①附属中山医院 上海市心血管病研究所, ^②儿科研究所分子
生物学实验室, 上海 200032)

主题词 胰岛素样生长因子-1; 受体; mRNA 基因; 原位杂交; 肌, 平滑; 动脉粥样硬化; 家兔

摘 要 为观察胰岛素样生长因子-1 受体基因在动脉粥样硬化组织中的表达及分布, 建立实验性动脉粥样硬化家兔模型。采用人胰岛素样生长因子-1 受体 cRNA 探针进行组织原位杂交。结果发现, 正常对照的家兔主动脉组织, 仅在外膜显示有胰岛素样生长因子-1 受体 mRNA 的阳性表达, 中膜及内膜均呈阴性; 实验组主动脉的整个血管壁, 包括外膜、中膜、新生内膜及动脉粥样硬化斑块组织均有胰岛素样生长因子-1 受体基因的表达。研究提示, 增殖的血管平滑肌细胞、新生的内皮细胞及构成动脉粥样硬化斑块主要成分的泡沫细胞均为胰岛素样生长因子-1 受体 mRNA 表达的靶细胞, 证实胰岛素样生长因子-1 受体基因参与动脉粥样硬化的发生。

Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor mRNA Detection in Rabbit Atherosclerotic Plaques by In Situ Hybridization

LIU Peng, HAN Qin-Qin, YANG Yi and YANG Ying-Zhen

(Shanghai Institute of Cardiovascular Disease, Zhongshan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

MeSH Insulin-Like Growth Factor-1; Receptor; mRNA Gene; In Situ Hybridization; Smooth Muscle Cell; Atherosclerosis; Rabbit

ABSTRACT **Aim** To determine the expression of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) gene in atherosclerotic plaques.

Methods White rabbits were fed with either regular feed or high cholesterol diets for 12 weeks. By in situ hybridization we detected the expression of IGF-1R mRNA in rabbit atherosclerotic plaques and normal artery wall.

Results Control rabbits, hybridization with antisense RNA probe only localized IGF-1R mRNA to adventitia. In atherosclerotic aortas, the positive signals were widely distributed in the vessel wall, including neointima, media, adventitia and atherosclerotic plaques.

Conclusion Smooth muscle cells, endothelial cells and foam cells are the major source of IGF-1 receptor mRNA in atherosclerotic lesions. Over expression of IGF-1R mRNA might be related to the genesis of the atheromatous plaque.

生长因子促进细胞生长分化的作用是通过其受体来实现的。胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 作为一种重要的有丝分裂原, 通过自分泌/旁分泌的途径来参与血管平滑肌细胞的分裂增殖。有证据表明, 胰岛素样生长因子-1 受体 (IGF-1 receptor, IGF-1R) 基因的单克隆抗体, 可以完全抑制 IGF-1 的这种促增殖作用^[1]。一些以血管平滑肌细胞增殖为主要病理改变的疾病^[2,3], 如主动脉缩窄造成的高血压、内皮剥脱及血管成形术后再狭窄等, 均可见到有 IGF-1 mRNA 的表达增加。而 IGF-1R 是否也存在同样的变化, 尚缺乏统一的认识。本实验利用原位杂交技术, 观察 IGF-1R 在实验性动脉粥样硬化组织中的表达及分布情况, 以便更

进一步了解动脉粥样硬化的发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

纯种新西兰家兔 12 只, 体重 2~2.5 kg, 由上海医科大学中山医院实验动物部提供。限制性内切酶 Hind III 和 EcoR-I 为美国 Promega 公司产品, 人 IGF-1 受体 cDNA 由上海医科大学儿科研究所杨毅博士提供, 采用德国 Boehringer Mannheim 公司的地高辛-标记试剂盒体外转录标记 cRNA 探针。

1.2 模型的建立及标本制备

将 12 只家兔随机分为正常对照组 (喂饲基础饲料) 及实验组 (基础饲料中加 2% 胆固醇、6% 花生油及 0.3% 胆盐), 每组 6 只, 喂养 12 周, 建立家兔实验性动脉粥样硬化模型。1% 戊巴比妥钠 1.2 mL/kg

体重静脉麻醉,无菌条件下取出胸主动脉,大体观察,然后将每只动物血管分为二部分,一部分用10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,制作切片,行HE染色,显微镜下观察;另一部分用4%多聚甲醛固定4 h,15%蔗糖过夜,OCT包埋,-70℃保存。

1.3 组织原位杂交

厚度为10 μm的冰冻切片空气干燥后,浸入0.2 mol/L的盐酸洗10 min,去污剂TritonX-100处理15 min,蛋白酶K(0.05 g/L)消化30 min,4%多聚甲醛固定5 min,0.25%乙酸酐处理后,37℃预杂交2 h
预杂交液:50%甲酰胺/2×SSC,42℃杂交过夜
杂交液:0.01 mol/L Tris-HCl,1×Denhardt's,2×SSC,50%甲酰胺,0.5%SDS,0.25 g/L tRNA,5 g/L 焦磷酸钠,探针1 mg/L。经0.1 g/L RNase A消化30 min。系列SSC漂洗:2×SSC 30 min→0.1×SSC 42℃40 min→0.1×SSC 37℃ 10 min。加抗地高辛抗体(1:1 000)37℃ 2 h以上。阳性染色为紫蓝色颗粒。对照组杂交前标本用RNase 0.2 g/L处理,杂交液中用PBS代替探针。

2 结果

2.1 动脉粥样硬化家兔主动脉形态学观察

HE染色可见,对照组血管壁组织结构无异常变化。动脉粥样硬化家兔主动脉经高脂饲养4周时,内膜表面出现小的不规则突起,只有散在的含有空泡的泡沫细胞。实验8周时,肉眼即见内膜呈不对称增厚,并有明显的脂质斑块,镜下发现泡沫细胞聚积,平滑肌细胞增殖,细胞外基质增多,病变表面内皮细胞脱落。12周时发现脂质斑块弥漫存在,主动脉管腔明显狭窄,泡沫细胞大量聚积,平滑肌细胞增殖活跃。

2.2 动脉粥样硬化家兔主动脉胰岛素样生长因子-1受体基因表达

如图1A (Figure 1 A),正常对照的家兔主动脉组织仅在外膜显示IGF-1R mRNA阳性杂交信号,中膜及内膜均呈阴性。而在实验组(图1B和C, Figure 1 B and C),动脉粥样硬化家兔主动脉的整个血管壁均能见到IGF-1R基因的表达,包括外膜、中膜、新生内膜及动脉粥样硬化斑块区、泡沫细胞等。经RNA酶处理的阴性对照及不加探针的替代对照,则只能见到本底信号。

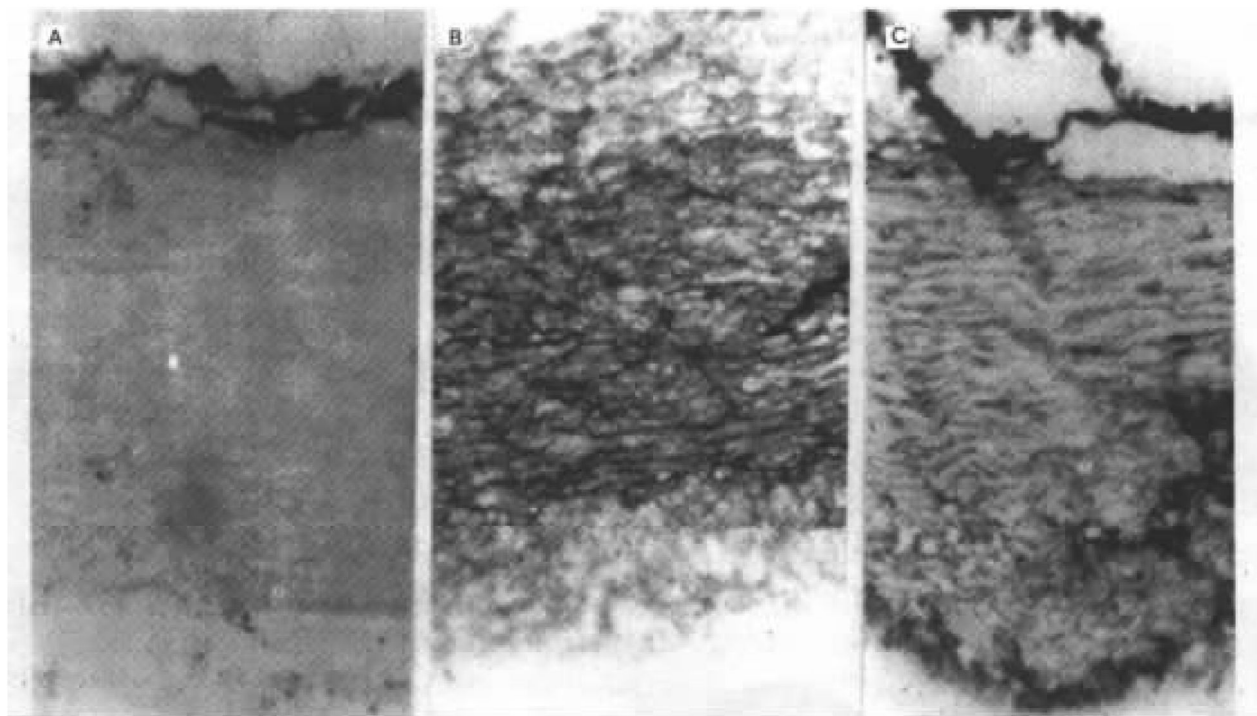


图1. 原位杂交检测胰岛素样生长因子-1受体基因在动脉粥样硬化组织中的表达(×50)。A:对照主动脉,B:高脂饲养8周的动脉粥样硬化组织,C:高脂饲养12周的动脉粥样硬化斑块组织

Figure 1. Expression of IGF-1R mRNA in experimental atherosclerotic rabbits by in situ hybridization (×50). A: Control aorta, B: Experimental atherosclerotic plaque at 8 weeks with high-cholesterol diet, C: Experimental atherosclerotic plaque at 12 weeks with high-cholesterol diet

3 讨论

动脉粥样硬化性疾病是一类以血管平滑肌细胞增殖为主要病理改变的疾病。而血管平滑肌细胞的生长分化,离不开 IGF-1 的参与^[4]。正常情况下,成年家兔的血管平滑肌细胞呈静止状态,当受到细胞外因素(如高脂血清等)刺激时,IGF-1R 被激活,细胞进入 G1 期,此时细胞内 DNA 含量由于有丝分裂而成倍增加,细胞经过获能后进入 S 期。若无 IGF-1 的存在,细胞不能进入 S 期^[5]。

血管平滑肌细胞表面的 IGF-1R 是由两条 α 链($100 \sim 135 \times 10^3$)和两条 β 链($90 \sim 95 \times 10^3$)通过二硫键结合而成的四聚体。 α 链组成胞外配体结合区, β 链组成跨膜区和酪氨酸激酶区。当 IGF-1 与受体结合后,酪氨酸激酶区发生自身磷酸化,激活蛋白质酪氨酸激酶,使细胞发生一系列生物学反应。

我们的结果显示,在动脉粥样硬化斑块组织中,IGF-1R mRNA 的表达增加,提示 IGF-1R 基因参与动脉粥样硬化的发生。据报道,IGF-1R 被激活至少可导致 60~70% 的血管平滑肌细胞复制。因此,许多学者认为 IGF-1 与 IGF-1R 的相互作用是促使血管平滑肌细胞增殖的限速步骤^[6]。

动脉粥样硬化的发生涉及多种生长因子的参与。血小板源性生长因子是目前研究较为深入的生长因子。大量资料表明,血小板源性生长因子促进血管平滑肌细胞增殖是和 IGF-1 协同作用的结果。在对 IGF-1R 的调节方面,血小板源性生长因子能够增加血管平滑肌细胞表面 IGF-1 的结合位点,使 IGF-1R 上调。目前发现这种作用是通过增高 IGF-1R 启动子的活性来实现的^[7]。

本研究还显示,动脉粥样硬化斑块中的泡沫细胞及受到脂质过氧化损伤的内皮细胞也是 IGF-1R 转录产物的来源,提示细胞内脂质及脂蛋白也能诱导 IGF-1R mRNA 的表达^[8]。体外研究表明,在缺乏

脂蛋白的条件下,即使有血小板源生长因子或 IGF-1 存在,血管平滑肌细胞也不能增殖^[9]。该研究提醒人们注意,在高脂饮食诱发的动脉粥样硬化模型中,IGF-1R 的激活,可能对血管平滑肌细胞增殖起了关键性的作用。

参考文献

- 1 Banskota NK, Tanb R, Zellner K, et al. Characterization of induction of protooncogene c-myc and cellular growth in human vascular smooth muscle cells by insulin and IGF-1. *Diabetes*, 1989, **38**: 123-129
- 2 Fath KA, Alexander RW, Delafontaine P. Abdominal coarctation increases insulin-like growth factor 1 mRNA levels in rat aorta. *Circ Res*, 1993, **72**: 271-277
- 3 Delafontaine P, Lou H, Alexander RW. Regulation of insulin-like growth factor 1 messenger RNA levels in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1991, **18**: 742-747
- 4 Clemmons DR, Van Wyk JJ. Evidence for a functional role of endogenously produced somatomedin like peptide in the regulation of DNA synthesis in cultured human fibroblasts and porcine smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1985, **75**: 1914-1918
- 5 Stiles CD, Capone GT, Scher CD, et al. Dual control of cell growth by somatomedins and platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 1279-1283
- 6 Hayry P, Myllymäki M, Aavik E, et al. Stable D-peptide analog of insulin-like growth factor-1 inhibits smooth muscle cell proliferation after carotid ballooning injury in the rat. *FASEB J*, 1995, **9**: 1336-1344
- 7 Rubini M, Werner H, Gamlini E, et al. Platelet-derived growth factor increases the activity of the promoter of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor gene. *Exp Cell Res*, 1991, **211**: 371-379
- 8 Polanco JJ, Berciano MT, Lafarga M, et al. Expression of insulin-like growth factor receptor mRNA in rabbit atherosclerotic lesions. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **209** (1): 182-190
- 9 Björkerud S, Björkerud B. Lipoproteins are major and primary mitogens and growth promoters for human arterial smooth muscle cells and lung fibroblasts in vitro. *Arter Thromb*, 1994, **14** (2): 288-298

此文 1998-06-26 收到,1999-05-24 修回)

此文编辑 朱雯霞)

重 要 更 正

因工作疏忽,我刊在 1999 年第 7 卷第 1 期第 64 页刊载的《中国动脉硬化杂志》第一届编辑委员会组成人员名单中,邓肿端应为邓仲端,林署光应为林曙光,特此更正,并向这两位专家致歉。

编辑部