

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2000)-01-0026-06

凝血酶对大鼠血管平滑肌细胞血小板源性生长因子基因表达的影响

王启贤¹, 吕俊升²

(1. 昆明医学院第一附属医院心内科, 昆明 650031; 2. 浙江医科大学第二附属医院心内科, 杭州 310009)

[关键词] 凝血酶; 肌, 平滑, 血管; 血小板源性生长因子; 基因表达; 大鼠

[摘要] 为了研究凝血酶对血管平滑肌细胞血小板源性生长因子基因表达的影响, 探讨凝血酶刺激血管平滑肌细胞增殖的机制, 通过培养 SD 大鼠胸主动脉血管平滑肌细胞, 以³H-TdR 掺入率作为评价凝血酶促血管平滑肌细胞增殖的指标; 用反转录聚合酶链反应检测凝血酶对血管平滑肌细胞血小板源性生长因子 A 链 mRNA 表达的影响; 用 Dot blot 检测凝血酶对血管平滑肌细胞血小板源性生长因子 B 链 mRNA 表达的影响。结果表明, 凝血酶促血管平滑肌细胞增殖呈浓度依赖性和时间依赖性, 血管平滑肌细胞在基础状态下可检测到血小板源性生长因子 A 和 B 链 mRNA 表达, 凝血酶刺激血管平滑肌细胞后 2 h 血小板源性生长因子 A 链 mRNA 表达开始增加, 4~6 h 达高峰, 持续 12 h, 24~48 h 恢复正常。提示凝血酶对血管平滑肌细胞具有较强的促增殖作用, 凝血酶促血管平滑肌细胞的增殖作用部分可能是通过诱导血管平滑肌细胞血小板源性生长因子 A 链 mRNA 的表达来实现的。

[中图分类号] Q786

[文献标识码] A

Influence on Platelet-Derived Growth Factor Ligand Gene Expression by Thrombin in Rat Vascular Smooth Muscle Cells

WANG Qi-Xian, and LU Jun-Sheng

(Department of Medicine, the First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650031, China)

MeSH Thrombin; Vascular; Muscle, Smooth; Platelet Derived Growth Factor; Gene Expression; Mice

ABSTRACT **Aim** To study the influence of thrombin on gene expression of platelet derived growth factor (PDGF) in cultured vascular smooth muscle cells and probe into the mechanism of proliferation of vascular smooth cells induced by thrombin.

Methods Take the incorporation of ³H-thymidine as the target to evaluate vascular smooth muscle cells proliferation; thrombin-induced expression of PDGF-A mRNA in the vascular smooth muscle cells was detected by RT-PCR, while PDGF-B mRNA expression by Dot blot hybridization.

Results Thrombin remarkably stimulated proliferation of SD rat vascular smooth muscle cells in a dose-dependent and a time-dependent manner; PDGF-A and PDGF-B mRNA was detected in quiescent cultured vascular smooth muscle cells in serum-free medium for 48 hours, the expression of PDGF-A mRNA was increased in VSMC after exposure to thrombin for two hours, and reached a peak levels after 4~6 hours exposure to thrombin. The rising level of PDGF-A mRNA continued for 12 hours, and fell to the base level 24~48 hours afterwards.

Conclusion Thrombin remarkably stimulated proliferation of SD rat vascular smooth muscle cells in a dose-dependent and a time-dependent manner, thrombin-induced vascular smooth muscle cells proliferation was partially mediated by expression of PDGF-A mRNA.

经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄是以血管损伤部位血栓形成及血管平滑肌细胞(vascular smooth cells, VSMC)增殖为主要病理特征。近来研究表明, 凝血酶除有促血凝作用之外, 还具有许多细胞效应, 如激活血小板使其粘附聚集, 并释放 5-羟色胺、血

栓素 A₂、血小板因子-4、血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)和许多凝血物质; 刺激血管内皮细胞产生血小板源性生长因子、前列环素、内皮素、血小板活化因子和纤溶酶原激活物; 促进 VSMC 增殖^[1~4]。而在动脉粥样硬化病灶中, 内皮细胞、内膜平滑肌细胞和巨噬细胞的凝血酶受体表达增加^[5], 在球囊导管损伤的动脉血管壁中, VSMC 的凝血酶受体表达也明显上调^[6], 推测凝血酶的增加可能促使 VSMC 迁移增殖。为进一步探讨其机制, 本实验观察了凝血酶对培养的 SD 大鼠胸主动

[作者简介] 王启贤, 男, 1959 年出生, 讲师, 医学博士。吕俊升, 男, 1930 年 5 月出生, 内科学心血管专业教授, 博士生导师, 博士后导师。中华医学会浙江分会副会长, 《中华心血管病杂志》、《中国动脉硬化杂志》编委。

脉 VSMC 中 PDGF 基因表达的影响,旨在从分子生物学水平探讨凝血酶促 VSMC 增殖的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

实验动物为 SD 大鼠;新生牛血清购自杭州四季青公司;DMEM 培养基、Trizol、鲑(鲱)鱼精、MLLV 反转录酶购自 GIBCO-BRL 公司;凝血酶为 Sigma 产品,来源于牛血清;随机引物标记试剂盒、随机引物、ECORI 和 dNTPs 均为 Promega 产品;DEPC 为 Serva 产品;去离子甲酰胺为 CLONTECH 产品; ^3H -TdR 购自上海原子核研究所; α - ^{32}P -dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司;其余材料和试剂均为进口分装或国内产品。重组质粒由中科院上海细胞所提供。

1.2 血管平滑肌细胞培养

按贴块法进行 SD 大鼠胸主动脉 VSMC 原代培养,倒置显微镜下,细胞具有典型的“峰谷”结构。第 4~8 代细胞用于实验。

1.3 重组质粒的制备和 cDNA 插入片段的回收 采用碱裂解法制备小量质粒 DNA^[7]。Pic18-PDGF-BcDNA 用 ECORI 酶切。用上海华顺生物试剂公司柱离心式胶回收试剂盒回收目的 cDNA。

1.4 凝血酶对血管平滑肌细胞 ^3H -TdR 掺入率的影响

1.4.1 细胞处理 用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养液将 VSMC 数调整至 $5 \times 10^7/\text{L}$,加入 24 孔细胞培养板,每孔 1 mL。48 h 后培养板内已有 80% 的细胞呈汇合状态,吸出培养液,改用含 0.4% 小牛血清的 DMEM 培养 48 h。

1.4.2 不同浓度凝血酶对 ^3H -TdR 掺入率的影响

实验组加入含不同浓度凝血酶(100 u/L、500 u/L、1 000 u/L、5 000 u/L 和 10 000 u/L)的培养液,在对照组加入等体积的含 0.4% 小牛血清的 DMEM 培养液。实验组每组为 4 孔,每孔反应体积为 1 mL。加入刺激因素的同时在培养板内加入 ^3H -TdR 37 kBq/孔,作用 24 h 后吸出培养液,用磷酸缓冲生理盐水(phosphate buffer solution, PBS)洗孔三次,每孔用 1 mL 冰冷的 10% 三氯乙酸于 4°C 固定细胞 30 min,再用 10% 三氯乙酸洗孔三次。每孔加入 0.5 mL 1 mol/L NaOH 裂解细胞,显微镜下观察到细胞彻底裂解后,每孔加入 0.5 mL 1 mol/L HCl 中和,最后每孔取 1 mL 加入 5 mL 闪烁液中,用液体闪烁计数器测 cpm 值。

1.4.3 不同时间凝血酶对 ^3H -TdR 掺入率的影响

实验分凝血酶组和对照组,凝血酶组每孔加入

每升含凝血酶 5 000 u 的 DMEM 培养液(DMEM 内含 0.4% 小牛血清);对照组加入等体积的含 0.4% 小牛血清的 DMEM。凝血酶组和对照组各 4 孔,每孔培养液量为 1 mL,分别加入凝血酶作用 24 h、48 h 和 72 h,同时每孔加入 ^3H -TdR 37 kBq,作用不同时间后按前述方法终止 ^3H -TdR 掺入实验。

1.5 凝血酶对血小板源性生长因子基因表达的影响

1.5.1 细胞处理 用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养液将细胞数调整为 $5 \times 10^7/\text{L}$,于 100 mL 培养瓶中培养,第 3~4 天生长达汇合状态,然后用含 0.4% 小牛血清的 DMEM 培养液培养 48 h 后,吸出培养液,分为 8 组,每组两瓶细胞。第一组用凝血酶(5 000 u/L)作用 0 h,第 2~8 组分别作用 2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h 后提取总 RNA。

1.5.2 总 RNA 提取及鉴定 用 Trizol 试剂,按试剂说明书方法提取 VSMC 的总 RNA。取 RNA 样品 4.5 μL ,加入 $5 \times$ 甲醛凝胶电泳缓冲液 2 μL 、甲醛 3.5 μL 和甲酰胺 10 μL ,于 65°C 温育 15 min,冰育冷却,离心 5 s,使管内所有液体集中于管底,加含 EB 0.5 mg/L 的甲醛凝胶上样缓冲液 2 μL 。加样前将凝胶预电泳 5 min,电压降为 5 V/cm。随后将样品加入凝胶加样孔中,将凝胶浸入 $1 \times$ 甲醛凝胶电泳缓冲液中,3~4 V/cm 电压下进行电泳 1 h 左右,用鹰眼静态成像系统观察并摄片。

1.5.3 反转录聚合酶链反应 引物采用文献[8]报导 PDGF-A 链特引序系列,扩增片段为 220 bp, PDGF-A Upstream: 5'-CCT GCC CAT TCG GAG GAA GAG-3', PDGF-A Downstream: 5'-TTG GCC ACC TTG ACG CTG CG-3'; β -actin 引物扩增片段为 310 bp。④PDGF-A 链 cDNA 第一链的合成:样本总 RNA (对照组和凝血酶组) 2 μg ,随机引物 0.3 μg ,先加 DEPC 水 10 μL ,70°C 温育 50 min,置冰上后按顺序加入: $5 \times$ buffer 5 μL , dNTP 1 μL , Rnasin 25 u, MMLV 1 μL ,加 DEPC 水至 25 μL ,混匀后置 37°C 90 min 95°C 灭活反转录酶 10 min。⑤PCR: 反转录产物(cDNA) 2.5 μL , dNTP 1 μL (10 mm), $10 \times$ buffer 5 μL , MgCl_2 5 μL , PDGF-A 上游引物: 2 μL (10 pmol), 下游引物 2 μL (10 pmol), β -actin 上游引物 1 μL (10 pmol), 下游引物 1 μL (10 pmol)。Taq DNA Polymerase 0.5 μL (5×10^6 u/L),加灭菌去离子水至 50 μL ,混匀后加液体石蜡 50 μL ,短暂离心 15 s。PCR 扩增首轮循环: 94°C 5 min, 58°C 35 s, 72°C 1 min; 后续循环: 94°C 1 min, 58°C 35 s, 72°C 1 min; 末轮循环: 94°C 1 min, 58°C 35 s, 72°C 10 min; 共 25~35 个循环。实验组和

对照组比较用 31 个循环。PCR 扩增产物用 4% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外线灯观察结果, 鹰眼静态成像系统摄像。PCR 像片经照相机翻拍后, 再经激光光密度扫描, 与内参照 β -actin 表达进行对比(PDGF-A/ β -actin), 分析凝血酶刺激血管平滑肌细胞 PDGF-A mRNA 相对表达量。

1.5.4 RNA 斑点杂交^[7] 将一张尼龙膜在水中浸泡片刻使之湿润, 再用 $20 \times \text{SSC}$ 于室温浸泡 1 h; 用 0.1 mol/L NaOH 溶液清洗多孔过滤点样器, 用 $10 \times \text{SSC}$ 清洗每个加样孔, 上面铺上尼龙膜。将 $10 \mu\text{L}$ RNA 水溶液与下述溶液混和: 100% 甲酰胺 $20 \mu\text{L}$, 37% 甲醛 $7 \mu\text{L}$, $20 \times \text{SSC}$ $2 \mu\text{L}$, 于 68°C 温育 15 min, 水浴冷却样品; 每一份 RNA 样品加 2 倍体积 $20 \times \text{SSC}$, 混匀后加于孔中, 每孔用 $1 \text{ mL } 10 \times \text{SSC}$ 清洗 2 次并继续抽吸 5 min; 取出尼龙膜, 室温晾干后, 夹在 2 张新华 3 号纸中间, 置烤箱 80°C 干烤 2 h 固定 RNA。④预杂交: 预杂交液用 $6 \times \text{SSC}$ 、 $5 \times \text{Denhardt}$ 、 0.5% SDS 和 $100\% / \text{mL}$ 经变性断裂成片段的鲑鱼精或鲱鱼 DNA、 50% 甲酰胺。预杂交体积为 10 mL , 当尼龙膜置入杂交管后加入预杂交液, 42°C 杂交炉内滚动预杂交 12~16 h。(四)探针标记: 按 Prime-a-Gene Labeling 试剂盒说明进行操作。杂交: 预杂交后, 倾出预杂交液, 换为新配制的杂交液, 加入上法制备的变性 cDNA 探针, 杂交炉内杂交 24~48 h。洗膜并放射自显影。尼龙膜的重复使用按分子克隆实验指南方法进行^[7]。

1.6 统计学处理

实验所得数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两样本均数比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 总 RNA 质量鉴定

用 DNA/RNA 测定仪检测 RNA 的 $260 \text{ nm}/280 \text{ nm}$ 比值在 $1.6 \sim 1.8$ 之间, 符合 Trizol 试剂要求。 1% 琼脂糖凝胶电泳显示 28S 和 18S 两条电泳带清晰, 前者约为后者的两倍, 说明所提 VSMC RNA 无降解(图 1, Figure 1), 可用于反转录聚合酶链反应和核酸杂交实验。

2.2 不同浓度凝血酶对血管平滑肌细胞增殖的作用

从表 1 (Table 1) 中可以看出, 随着凝血酶浓度的增加, 血管平滑肌细胞 ^3H -TdR 掺入率也增加。每升培养液内含 500 u 凝血酶时, ^3H -TdR 掺入率就明显增加($P < 0.01$), 每升培养液内含 5000 u 凝血酶

时, ^3H -TdR 掺入率达高峰。但当每升培养液内含 10000 u 凝血酶时, ^3H -TdR 掺入率较前反而降低。

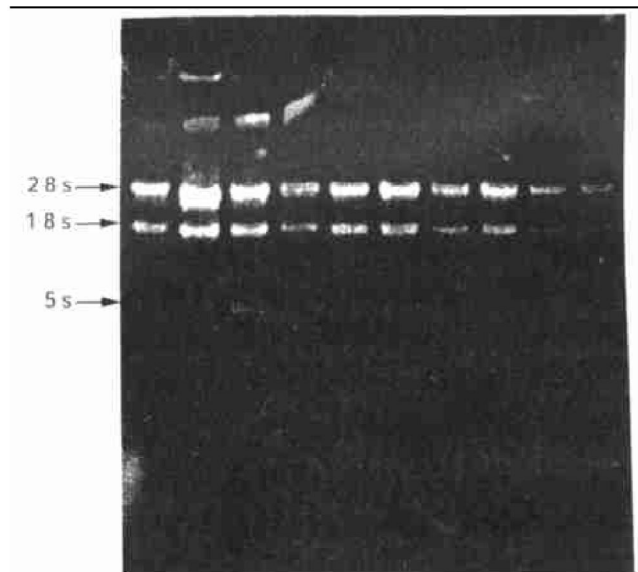


图 1. RNA 琼脂糖凝胶电泳

Figure 1. Agarose electrophoresis of RNA

表 1. 不同浓度凝血酶对平滑肌细胞 ^3H -TdR 掺入率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Effect of thrombin on VSMC ^3H -TdR incorporation in different concentration

Thrombin (u/L)	Incorporation
0	12257 ± 3724
100	12845 ± 4168
500	19001 ± 6985^a
1000	22910 ± 8277^a
5000	26226 ± 6746^a
10000	13618 ± 5302^a

a: $P < 0.01$, compared with 0 u/L thrombin group

2.3 凝血酶不同作用时间对 ^3H -TdR 掺入率的影响

从表 2 (Table 2) 中可以看出, 凝血酶刺激 VSMCs 24 h ^3H -TdR 掺入率就较对照组明显增加($P < 0.01$), 48 h ^3H -TdR 掺入率较 24 h 下降, 72 h ^3H -TdR 掺入率较 24 h 下降更明显。

2.4 凝血酶对血小板源性生长因子-A 链 mRNA 表达的影响

为了建立 PDGF-A 链和 β -actin 特异序列指数扩增条件, 我们从 25 个循环开始, 对凝血酶刺激后 4 h 提取的 SD 大鼠胸主动脉 VSMC 总 RNA 经反转录

为 cDNA, 用 PDGF- A 和 β - actin 引物在同一管内进行扩增, 分析在一定模板量的条件下循环数与 PCR 产物的关系。结果表明在 25~ 35 个循环之间扩增反应处于指数增长期; 然后将凝血酶刺激培养的 VSMC 后不同时间(0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h) 提取的总 RNA 经反转录为 cDNA, 在同样条件下(31 个循环) 扩增, 结果如图 2 (Figure 2)。

表 2. 不同作用时间凝血酶对平滑肌细胞³H- TdR 掺入率的影响

Table 2. The influence of thrombin on VSMC ³H- TdR incorporation at different time

Groups	24 h	48 h	72 h
Control	100%	100%	100%
Thrombin	198% ^a	138%	42%

a: $P < 0.01$, compared with control group

从图 2 (Figure 2) 和表 3 (Table 3) 中可以看出,

凝血酶刺激后 2 h VSMCs PDGF- A 链 mRNA 较对照组表达开始增加, 4~ 6 h 较对照组表达明显增加, 持续至 12 h, 24~ 48 h 恢复到刺激前水平。

表 3. 凝血酶诱导平滑肌细胞血小板源性生长因子- A 链 mRNA 的相对表达量

Table 3. The relative expression quantity of VSMC PDGF- A mRNA induced by thrombin

Time(h)	PDGF- A/ β - actin
0	0.39
2	0.79
4	0.88
6	0.85
8	0.73
12	0.77
24	0.57
48	0.49

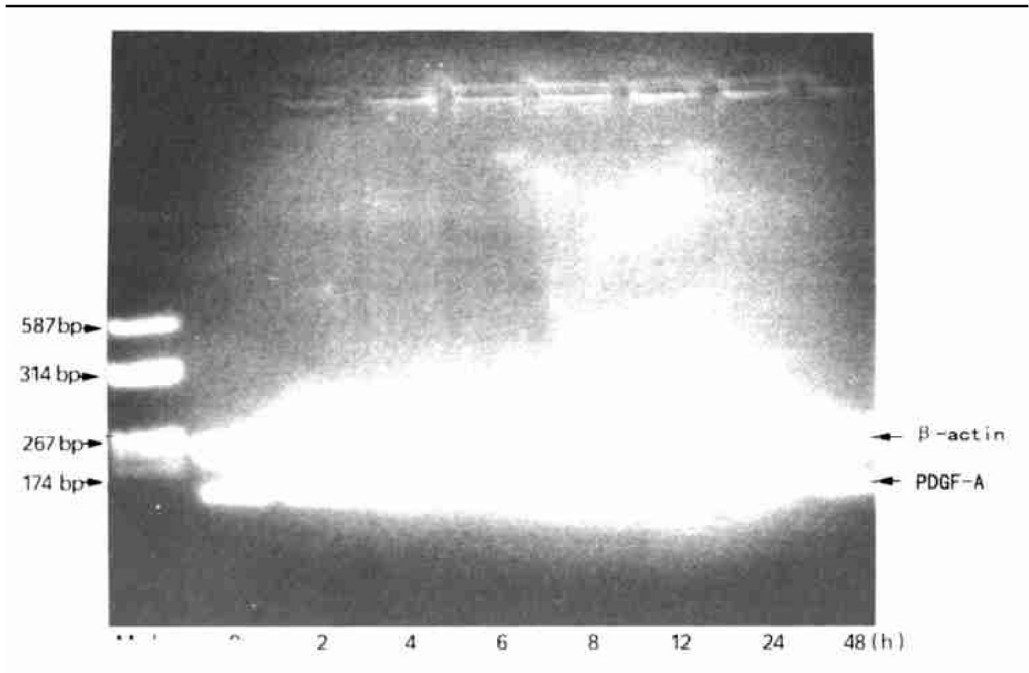


图 2. 聚合酶链反应检测凝血酶诱导平滑肌细胞血小板源性生长因子- A 链 mRNA 的表达
Figure 2. Effect of thrombin on PDGF- A mRNA expression in rat cultured VSMC

2.5 凝血酶对血小板源性生长因子- B 链 mRNA 表达的影响

从图 3 (Figure 3) 和表 4 (Table 4) 可见, 凝血酶作用不同时间(0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 和

48 h) 后 PDGF- B 链 mRNA 的表达在 2~ 8 h 明显下降, 12 h 后恢复到凝血酶作用前水平。图 3 B 为同一张膜的 β - actin DNA 探针 Dot blot 杂交图。

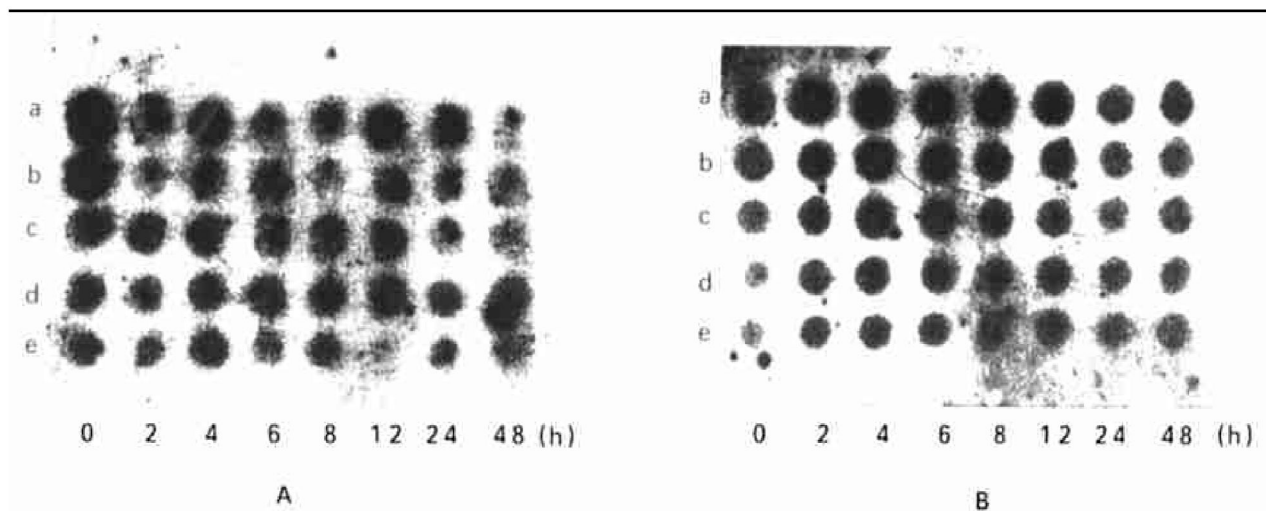


图 3. 凝血酶刺激平滑肌细胞血小板源性生长因子- B 链 mRNA 表达的 Dot blot 杂交图。 A: PDGF- B 链 cDNA 探针杂交图; B: β -actin cDNA 探针杂交图。 RNA: a. 20 μ g, b. 10 μ g, c. 5 μ g, d. 2.5 μ g, e. 1.25 μ g

Figure 3. Effect of thrombin on PDGF- B mRNA expression in rat cultured VSMC. A: PDGF- B cDNA probe hybridization; B: β -actin cDNA probe hybridization. RNA: a. 20 μ g, b. 10 μ g, c. 5 μ g, d. 2.5 μ g, e. 1.25 μ g

表 4. 凝血酶诱导平滑肌细胞血小板源性生长因子- B 链 mRNA 的相对表达量

Table 4. The relative expression quantity of VSMC PDGF- B mRNA induced by thrombin

Time(h)	PDGF- B/ β -actin
0	1.26
2	0.54
4	0.63
6	0.56
8	0.59
12	1.01
24	1.03
48	0.88

3 讨论

近年来人们发现凝血酶具有促进 VSMC 增殖作用^[1~4], 凝血酶诱导 VSMC 增殖依赖于其催化活性, 凝血酶受体激活多肽在刺激 VSMCs 增殖方面与凝血酶同样有效。虽然已经知道凝血酶诱导 VSMC 增殖是通过类似于已经克隆的人和仓鼠的凝血酶受体来实现的, 但参与调节受体介导的 VSMC 增殖机制尚未完全阐明。

最近研究发现, 在凝血酶作用后 10 min 内, 凝血酶剪切巨核细胞和成纤维细胞表面的凝血酶受体。此外, 凝血酶作用 VSMC 后数秒钟内可提高细胞内游

离钙浓度^[9,10]。我们研究发现, 凝血酶刺激 VSMC 增殖呈浓度依赖性, 在一定范围内 VSMC 增殖随凝血酶浓度的增加而递增, 当凝血酶浓度达到 10 000 u/L 时, VSMC 增殖反而下降。凝血酶诱导的 VSMC 的增殖显示了一个延迟的分裂作用, 其最大延迟分裂作用发生在凝血酶作用后 48~72 h^[10]。我们的研究结果显示凝血酶作用后 24 h, VSMC 内³H-TdR 掺入率较对照组明显增加, 凝血酶作用后 48 h, VSMC 内³H-TdR 掺入率较前开始下降, 说明凝血酶促 VSMC 增殖作用在 24 h 后达到最大, 与前面的研究有所不同。总之, 凝血酶刺激 VSMC 的这种延迟性增殖效应可能是诱导了 VSMC 内自分泌和/或旁分泌生长因子所致。

血小板源性生长因子(PDGF)是机体普遍存在的促分裂剂。PDGF 在正常生理情况下存在于血小板的颗粒内。当血小板与凝血酶、胶原、ADP 等接触时便聚集脱颗粒将 PDGF 释放入血。由于血小板不具备合成蛋白质的能力, 所以它可能只是 PDGF 的储存场所, 其储存的 PDGF 来自骨髓的巨核细胞。此外, 巨噬细胞、内皮细胞、VSMC 等也能合成释放 PDGF。人 PDGF 是由两条不同的多肽链组成, 分别称 A 链和 B 链。A 链和 B 链的氨基酸序列约有 60% 同源性。PDGF 具有广范的生物学活性, PDGF 对成纤维细胞、VSMC 和中性粒细胞有趋化作用, PDGF 诱导 VSMCs 和成纤维细胞的趋化性在损伤修复过程中极为重要, 它能刺激多种细胞如平滑肌细胞、成纤维细胞、胶质细胞的分裂增殖, 通过刺激胶原合成和胶原酶的活化

作用调节细胞外基质的更新, 最终 DNA 合成和细胞裂解、增殖。PDGF 还可诱导诸如 *c-myc* 和 *c-fos* 等原癌基因的表达^[11]。

研究发现多种因素都可刺激 VSMC 血小板源性生长因子基因的表达, 如生长因子、细胞因子和一些兴奋剂。我们的研究发现, 培养的 VSMC 在基础状态下可表达 PDGF- A mRNA, 在凝血酶刺激培养 VSMCs 后 2 h PDGF- A mRNA 表达开始增加, 4~ 6 h 达高峰, 持续到 12 h, 24~ 48 h 恢复到正常, 与 Okazaki 等^[12]用 Northern 印迹杂交显示的凝血酶体外培养的 VSMC 表达 PDGF- A mRNA 而非 PDGF- B mRNA 结果基本一致。Kanthou 等^[4]研究发现凝血酶促进了血管平滑肌 DNA 合成和细胞增殖, 以时间依赖的方式诱导 PDGF- A mRNA 表达, Bydlowski 等^[13]研究发现凝血酶以剂量依赖的方式诱导促进了血管平滑肌细胞 DNA 合成和细胞增殖, 他认为凝血酶同时促进了血管平滑肌细胞 DNA 合成和细胞增殖, 部分是由于增加了血管平滑肌细胞内源性 PDGF- A 产生。由此可见, 凝血酶刺激 VSMC 增殖, 部分可能是诱导 VSMC 内自分泌和/或旁分泌生长因子所致。国外一些研究发现凝血酶还可诱导血管平滑肌细胞表达表皮生长因子和碱性纤维母细胞生长因子^[14, 15], 这进一步说明凝血酶促 VSMC 的增殖机制。

参考文献

- [1] McNamara CA, Sarenbock IJ, Gimple LW, et al. Thrombin stimulates proliferation of cultured rat aortic smooth muscle cells by a proteolytically activated receptor [J]. *J Clin Invest*, 1993, **91**: 94- 98
- [2] Graham DJ, Alexander IJ. The effects of thrombin on bovine aortic endothelial and smooth muscle cells [J]. *J Vasc Surg*, 1990, **11**: 307- 310
- [3] Herbert JM, Lamarche I, Dol F. Induction of vascular smooth muscle cell growth by selective activation of the thrombin receptor: effect of heparin [J]. *FEBS Lett*, 1992, **301**: 155- 159
- [4] Kanthou C, Parray G, Wijelath E, et al. Thrombin- induced proliferation and expression of platelet- derived growth factor A- chain gene in human vascular smooth muscle cells [J]. *FEBS Lett*, 1992, **314**: 143- 148
- [5] Nelken NA, Soifer SJ, O'Keefe J, et al. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries [J]. *J Clin Invest*, 1992, **90**(4): 1 614- 621
- [6] Wilcox JN, Rodriguez J, Subramanian R, et al. Characterization of thrombin receptor expression during vascular lesion formation [J]. *Circulation Research*, 1994, **75**(6): 1 029- 038
- [7] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, 2nd ed[M], Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [8] Koster R, Windstetter U, Gulizia JM, et al. Quantitative Polymerase Chain Reaction(PCR) to Analyze messenger- RNA expression in tissue obtained by directional atherectomy [J]. *Angiology*, 1994, **45**: 911- 916
- [9] Chen LB, Buchanan JM. Mitogenicity activity of blood components, I: thrombin and prothrombin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1975, **72**: 131- 135
- [10] Chen LB, Teng NNH, Buchanan JM. Mitogenicity of thrombin and surface alteration on mouse spenocyte [J]. *Exp Cell Res*, 1976, **101**: 41- 46
- [11] Kelly JD, Haldeman BA, Grant FG, et al. Platelet- derived growth factor(PDGF) receptor subunit dimerization and intersubunit trans- phosphorylation [J]. *J Biol Chem*, 1991, **266**(14): 8 987- 992
- [12] Okazaki H, Majesky MW, Harker LA, et al. Regulation of platelet- derived growth factor ligand and receptor gene expression by a- thrombin in vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation Research*, 1992, **71**: 1 285- 293
- [13] Bydlowski SP, Pares MM, Soares RP, et al. Stimulation of human smooth muscle cell proliferation by thrombin involves increased synthesis of platelet- derived growth factor [J]. *Chest*, 1998, **114**(1): 236- 240
- [14] Nakano T, Raines EW, Albraham JA, et al. Glucocorticoid inhibits thrombin induced expression of platelet- derived growth factor A- chain and heparinbinding epidermal growth factor in human aortic smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268**(22): 941- 947
- [15] Weiss RH, Maduri M. The mitogenic effect of thrombin in vascular smooth muscle cells is argely due to basic fibroblast growth factor [J]. *J Biol Chem*, 1993, **268**(5): 724- 727

(此文 1999- 07- 28 收到, 2000- 01- 15 修回)

(此文编辑 朱雯霞)