

血管内皮生长因子预防血管成形术后再狭窄的机理

刘启功¹, 陆再英¹, 周洪莲¹, 张卫东², 颜 进²

(华中科技大学同济医学院 1. 附属同济医院心内科,

2. 医学病毒室, 湖北省武汉市 430030)

[主题词] 内皮生长因子; 再狭窄; 细胞凋亡; 细胞增殖; 肌, 平滑, 血管

[摘 要] 为探讨血管内皮生长因子预防血管成形术后再狭窄的机理, 构建含人血管内皮生长因子 165 基因的重组腺病毒, 感染体外培养的血管平滑肌细胞, 将人脐静脉内皮细胞和血管平滑肌细胞分别分成对照组、 H_2O_2 处理组和 H_2O_2 + 血管内皮生长因子处理组, 采用 WST-1 比色法、原位末端标记法及流式细胞术检测各组细胞光密度值和凋亡发生情况。结果发现, 人脐静脉内皮细胞中, 与对照组和 H_2O_2 + 血管内皮生长因子处理组比较, H_2O_2 处理组光密度值降低, 凋亡细胞明显增加; 血管平滑肌细胞中上述改变相反。提示 H_2O_2 能促进平滑肌细胞增殖, 诱导内皮细胞凋亡, 抑制内皮细胞增殖及平滑肌细胞凋亡, 促进再狭窄的发生, 而血管内皮生长因子能拮抗 H_2O_2 的作用, 有利于再狭窄的防治, 为血管内皮生长因子预防再狭窄提供新的理论依据。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

The Mechanical Study of Vascular Endothelial Growth Factor on the Prevention of Restenosis after Angioplasty

LIU Qi- Gong, LU Zai- Ying, ZHOU Hong- Lian, ZHANG Wei- Dong, and YAN Jin

(Department of Cardiology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Hubei Wuhan 430030, China)

MeSH Endothelial Growth Factor; Restenosis; Apoptosis; Proliferation; Muscle, Smooth, Vascular

ABSTRACT **Aim** To evaluate the mechanism of vascular endothelial growth factor (VEGF) on prevention of restenosis after angioplasty. **Methods** The recombinant adenovirus containing the cDNA for hVEGF165 was constructed and infected vascular smooth muscle cell (VSMC) in vitro. 72 hours after the infection the conditioned medium containing VEGF was collected. Then the VSMC and human umbilical vein endothelial cell (hUVEC) were divided into control group, H_2O_2 -treated group and H_2O_2 + VEGF-treated group to observe the proliferation and apoptosis by WST-1 method, TUNEL and FCM. **Results** To hUVEC, the OD value was less frequent in the H_2O_2 -treated group than that in the control and H_2O_2 + VEGF-treated group, the apoptosis was markedly superior in H_2O_2 -treated group compared with control and H_2O_2 + VEGF-treated group. To VSMC, the changes of OD value and apoptosis were contrary to hUVEC. **Conclusions** H_2O_2 stimulated the proliferation of VSMC and induced the apoptosis of hUVEC, inhibited the proliferation of hUVEC and the apoptosis of VSMC, improved the restenosis. VEGF inhibited the effect of H_2O_2 on hUVEC and VSMC, and prevented restenosis. These results offered further theoretical evidence for VEGF on the prevention of restenosis after angioplasty.

经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后再狭窄是目前心血管病研究热点和难点, 其机制不很清楚, 但血管内皮损伤是再狭窄的始动因素, 血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)过度增殖和凋亡减

少是再狭窄发生发展的重要因素。因此, 促进 PTCA 后损伤内皮的迅速修复, 抑制 VSMC 过度增殖, 诱导 VSMC 凋亡可能是防止再狭窄的关键所在。已经证实, 血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能预防实验性血管成形术后再狭窄, 但其机理还很不全面^[1~3]。本研究观察 H_2O_2 对培养的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, hUVEC)和兔主动脉 VSMC 增殖与凋亡的影响, 并进一步观察 VEGF 对上述结果的干预作用, 为

[作者简介] 刘启功, 男, 1968 年出生, 湖北咸宁人, 心血管内科博士学位, 副教授, 研究方向为心脏电生理和心血管疾病的分子生物学研究, 对射频导管消融治疗快速心律失常有特长。陆再英, 女, 1934 年出生, 心血管内科博士, 教授, 博士生导师, 博士后流动站心血管专业负责人, 研究方向为心脏电生理和冠心病的防治。

VEGF 预防血管成形术后再狭窄进一步提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 质粒

含 hVEGF165 cDNA 的质粒 pSVI21 由美国 Boston 大学惠赠, 腺病毒载体 pACCMV·pLpA 和 pJM17 由美国 Vanderbilt 大学惠赠。pJM17 质粒为 E1 区缺失的 5 型腺病毒基因组 DNA; pACCMV·pLpA 含有 CMV 启动子和猿猴病毒 40 的 PolyA 尾, 中间插入 PUC19 的多克隆位点, 两侧为 5 型腺病毒部分基因组 DNA, 与 pJM17 的部分 DNA 序列完全相同。

1.2 主要试剂

EcoR IV、Nco IV、Hind Ⅲ、Taq DNA 聚合酶、小牛碱性磷酸酶、T4 DNA 连接酶、AMV 逆转录酶、蛋白质 Marker 和 λ DNA/Hind Ⅲ (Promega), 胎牛血清、RPMI1640 和 DMEM (高糖, 4.5 g/L) (Sigma), 兔抗人 VEGF 多抗和生物素标记的羊抗兔 IgG (Santa Cruz), TRIzol 试剂 (Gibco), 地高辛标记的 DNA 检测试剂盒和四氮唑盐 WST-1 (Boehringer Mannheim, BM)。

1.3 携带人血管内皮生长因子 165 基因的重组腺病毒载体的构建及鉴定^[4]

pSVI21 经 EcoRI 酶切后回收 VEGF cDNA 片段, 并亚克隆到腺病毒中间载体 pACCMV·pLpA 中, 经 EcoRI 和 NcoI 酶切筛选出正确克隆 —pACCMV·hVEGF。pJM17 经 Hind Ⅲ酶切鉴定后按碱裂解法大量提取 pJM17 和 pACCMV·hVEGF, 再采用磷酸钙介导转染法共转染人胚肾 293 细胞 (ATCC), 经同源重组形成携带 hVEGF165 基因的缺失 E1 区的复制缺陷型重组腺病毒, 聚合酶链反应和斑点杂交鉴定后大量扩增并测定其滴度为 2×10^{12} pfu/L, 备用。通过逆转录聚合酶链反应和 Western blot 证实该腺病毒感染培养的兔主动脉 VSMC 48 h 后即有 VEGF mRNA 的转录和蛋白质的表达。

1.4 兔主动脉血管平滑肌细胞的培养和鉴定

采用胶原酶消化法^[4], 第 2~3 代细胞用于实验。

1.5 H₂O₂ 对脐静脉内皮细胞和血管平滑肌细胞增殖的影响及血管内皮生长因子的干预作用

将对数生长期的 VSMC 和 hUVEC (ATCC) 制成细胞悬液, 接种于 96 孔板, 4×10^3 细胞/孔, 分 8

组, 每组 8 孔。第 1~4 组为 hUVEC, 第 5~8 组为 VSMC, 第 1、2、5、6 组加入 CM1, 第 3 和 7 组加入 CM2, 第 4 和 8 组加入 CM3 (CM1、CM2 和 CM3 分别为用 0、5 和 20 pfu/细胞浓度的重组腺病毒感染对数生长期的 VSMC 72 h 后收集的上清), 第 2~4 和 6~8 组同时加入 H₂O₂, 终浓度为 200 μ mol/L, 每孔终体积为 100 μ L, 置 37℃、5% CO₂ 培养 48 h 后, 每孔加入 WST-1 10 μ L, 继续培养 4 h, 振荡混匀测光密度值 (波长为 450 nm)。

1.6 H₂O₂ 对脐静脉内皮细胞和血管平滑肌细胞凋亡的影响及血管内皮生长因子的干预作用

将对数生长期的 VSMC 和 hUVEC 制成细胞悬液, 接种于 12 孔板, 每孔放一约 0.5 cm \times 0.5 cm 大小的盖玻片, 置 37℃、5% CO₂ 培养, 待细胞完全融合后分组并加入 CM 和 H₂O₂, 方法同上, 每组 6 孔, 继续培养 12 h, 取出盖玻片行原位末端标记检查, 剩余细胞消化后行流式细胞术检测。

1.6.1 原位末端标记 原位末端标记试剂盒由 Boster 公司提供, 主要试剂有末端脱氧核糖核酸转移酶 (Promega 公司)、DIG-dUTP、蛋白酶 K (B. M 公司)、生物素化抗地高辛抗体 (Sigma 公司) 和链霉亲和素-过氧化物酶 (Boster)。按说明书进行操作, 镜下细胞核出现棕黄色颗粒者为凋亡细胞。用计算机图像分析系统随机计数 5 个高倍视野 (high power field, HP, $\times 400$) 中的凋亡细胞数, 求其均值。

1.6.2 流式细胞术分析 收集的细胞以 PBS 洗涤 2 次, 用预冷的 70% 乙醇固定, 4℃过夜。离心去掉固定液, 加入 RNase 200 μ L (1 g/L), 37℃作用 30 min 后, 再加入 800 μ L PI 染色液 (100 mg/L, PI, Sigma; 1.0% Triton X 100, Serva; 0.9% NaCl) 4℃避光染色 30 min, 行流式细胞术 (FACSort, 美国 B. D. 公司) 分析, 每份样品计数 8 000 个细胞, 计算凋亡细胞的百分比。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 有显著性差异; $P < 0.01$ 有极显著性差异。

2 结果

从表 1 (Table 1)、图 1 (Figure 1) 和图 2 (Figure 2) 可见, H₂O₂ 能促进 VSMC 增殖和诱导 hUVEC 凋亡, 抑制 hUVEC 增殖和 VSMC 凋亡, 而 VEGF 能拮抗上述作用, 并呈剂量相关性。

表 1. H₂O₂ 及血管内皮生长因子对血管平滑肌细胞和人脐静脉内皮细胞增殖与凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1. The effects of H₂O₂ and VEGF on proliferation and apoptosis of VSMC and hUVEC in vitro

Groups	OD value (n= 8)	Number of apoptosis cells/ HP (n= 6)	Rate of apoptosis(%) (n= 6)
hUVEC+ CM1	0. 54 ±0. 02 ^b	3. 83 ±0. 75 ^b	1. 60 ±0. 17A ^b
hUVEC+ H ₂ O ₂ + CM1	0. 50 ±0. 01	23. 83 ±4. 02	7. 45 ±0. 94
hUVEC+ H ₂ O ₂ + CM2	0. 52 ±0. 02 ^a	12. 17 ±2. 32 ^b	3. 87 ±0. 47 ^b
hUVEC+ H ₂ O ₂ + CM3	0. 55 ±0. 02 ^{b, c}	5. 17 ±1. 47 ^{b, c}	2. 34 ±0. 42 ^{b, c}
VSMC+ CM1	0. 47 ±0. 01 ^e	4. 17 ±0. 75 ^d	1. 71 ±0. 21 ^d
VSMC+ H ₂ O ₂ + CM1	0. 52 ±0. 02	3. 00 ±0. 89	1. 49 ±0. 10
VSMC+ H ₂ O ₂ + CM2	0. 50 ±0. 01 ^d	5. 50 ±1. 22 ^d	2. 41 ±0. 37 ^e
VSMC+ H ₂ O ₂ + CM3	0. 48 ±0. 01 ^{e, f}	7. 50 ±1. 05 ^{e, f}	2. 96 ±0. 46 ^{e, f}

a: $P < 0. 05$, b: $P < 0. 01$, compared with hUVEC+ H₂O₂+ CM1 group; c: $P < 0. 05$, compared with hUVEC+ H₂O₂+ CM2 group; d: $P < 0. 05$; e: $P < 0. 01$, compared with VSMC+ H₂O₂+ CM1 group; f: $P < 0. 05$, compared with VSMC+ H₂O₂+ CM2 group.

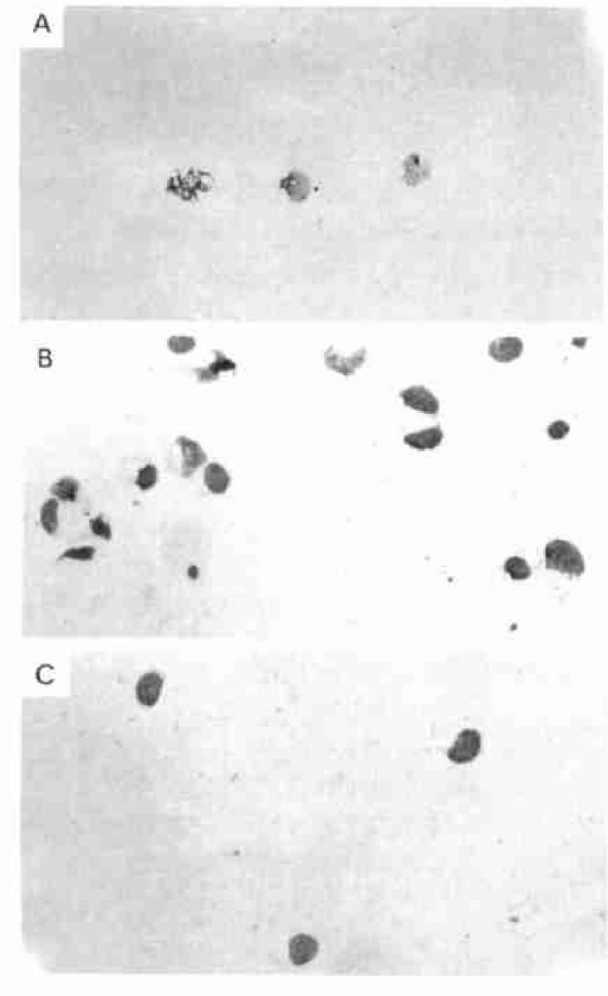


图 1. H₂O₂ 及血管内皮生长因子对人脐静脉内皮细胞凋亡的影响(原位末端标记). A: 对照组, B: H₂O₂ 处理组, C: H₂O₂+ VEGF 处理组

Figure 1. The effects of H₂O₂ and VEGF on apoptosis of hUVEC in vitro(TUNEL). A: control group, B: H₂O₂-treated group, C: H₂O₂+ VEGF-treated group

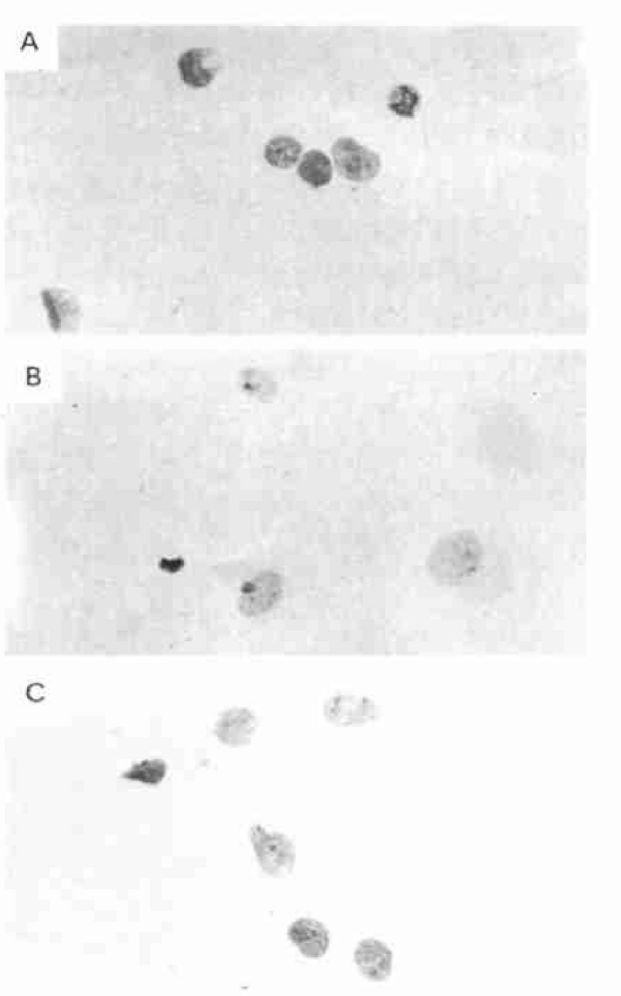


图 2. H₂O₂ 及血管内皮生长因子对血管平滑肌细胞凋亡的影响(原位末端标记). A: 对照组, B: H₂O₂ 处理组, C: H₂O₂+ VEGF 处理组

Figure 2. The effects of H₂O₂ and VEGF on apoptosis of VSMC in vitro(TUNEL) A: control group, B: H₂O₂-treated group, C: H₂O₂+ VEGF-treated group

3 讨 论

经皮冠状动脉腔内成形术已成为治疗冠心病的重要手段,然而术后再狭窄率高达 30%~50%,且目前尚无有效解决方法,已严重限制了 PTCA 的远期疗效和应用。大量研究认为,再狭窄是动脉损伤后的愈合反应,是一个十分复杂的生物学过程,有多种因素参与,其中血管内皮受损是再狭窄的始动因素,VSMC 过度增殖和凋亡减少是主要因素,因此,促进 PTCA 术后损伤内皮的迅速修复,抑制 VSMC 过度增殖,诱导 VSMC 凋亡可能达到预防再狭窄的目的。

缺血、缺氧、缺血-再灌注及血管成形术时均可产生超氧化物,而超氧化物对内皮细胞和 VSMC 增殖与凋亡的影响少见报道。本研究以 H_2O_2 为例,发现 H_2O_2 能促进 VSMC 增殖,诱导内皮细胞凋亡,抑制内皮细胞增殖及 VSMC 凋亡,VEGF 能部分拮抗上述作用,并呈剂量相关性。超氧化物能促进损伤血管的内膜过度增生^[5],可能与它的上述作用有关。 H_2O_2 可使内皮细胞脂质过氧化,蛋白质变性、交联,DNA 断裂、变性,并抑制损伤 DNA 的修复,从而抑制内皮细胞增殖,甚至促其死亡^[6];VSMC 的不同反应可能与 H_2O_2 使原癌基因 *c-myc* 和 *c-fos* 表达上调有关^[7]。VEGF 能高效迅速促进内皮细胞分裂和增殖,可部分拮抗 H_2O_2 对内皮细胞的抑制作用;VEGF 拮抗 H_2O_2 对 VSMC 的促增殖作用的机理尚不清楚。 H_2O_2 可使内皮细胞生存增殖所必需的细胞粘附分子表达下调诱导其凋亡^[8],而 VEGF 可使其表达上调抑制这一过程^[9]。 H_2O_2 抑制 VSMC 凋亡可能与 Bcl-2 基因表达上调有关^[10],而 VEGF 诱导 VSMC 凋亡的机理尚不清楚,可能与 Bcl-2 基因表达下调有关。

血管内皮生长因子是近几年来发现的一种糖蛋白,对内皮细胞具有特异性,能有效促进内皮细胞分裂和增殖,有利于 PTCA 后损伤内皮的迅速修复,有望在预防再狭窄中发挥重要作用。有限的实验研究和临床试验也证明了这一点^[1~3],但其机理还知之不多,可能与 VEGF 促进内皮细胞增殖并调节其分泌功能有关^[11]。本研究进一步证实:血管成形术时所产生的

超氧化物能促进 VSMC 增殖,诱导内皮细胞凋亡,抑制内皮细胞增殖及 VSMC 凋亡,有利于再狭窄的发生,而 VEGF 能抑制超氧化物对内皮细胞和 VSMC 的不利影响,为其预防再狭窄提供了新的理论依据。

参考文献

- [1] Asahara T, Chen DH, Tsurumi Y, et al. Accelerated restitution of endothelial integrity and endothelium-dependent function after hVEGF165 gene transfer [J]. *Circulation*, 1996, **94**: 3 291-302
- [2] 刘启功,陆再英,岳远坤,等. 腺病毒载体介导 hVEGF165 基因预防血管成形术后再狭窄的实验研究 [J]. *国际心血管杂志*, 2000, **2**(2): 147-149
- [3] Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, et al. Catheter-mediated VEGF gene transfer to human coronary arteries after angioplasty [J]. *Hum Gene Ther*, 2000, **11**(1): 263-270
- [4] Liu QG, Lu ZY, Zhang WD, et al. Construction and identification of recombinant adenovirus vector containing the hVEGF165 gene [J]. *J Tongji Medical University*, 2000, **20**(3): 186-189
- [5] Gong KW, Zhu GY, Wang LH, et al. Effect of active oxygen species on intimal proliferation in rat aorta after arterial injury [J]. *J Vasc Res*, 1996, **33**(1): 42-46
- [6] Janssen YMW, Houten BV, Borm PJA, et al. Biology of disease: Cell and tissue responses to oxidative damage [J]. *Lab Invest*, 1993, **69**(3): 261-271
- [7] Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression [J]. *Circ Res*, 1992, **70**(3): 593-599
- [8] Marui N, Offermann MK, Swerlick R, et al. Vascular cell adhesion molecule-1 gene transcription and expression are regulated through an antioxidant-sensitive mechanism in human vascular endothelial cell [J]. *J Clin Invest*, 1993, **92**: 1 866-874
- [9] Watanabe Y, Dvorak HF. VEGF inhibits anchorage disruption-induced apoptosis in microvessel endothelial cells by inducing scaffold formation [J]. *Exp Cell Res*, 1997, **233**(2): 340-349
- [10] Tsai JC, Jain M, Hsieh CM, et al. Induction of apoptosis by pyrrolidinedithiocarbamate and N-Acetylcysteine in vascular smooth muscle cell [J]. *J Biol Chem*, 1996, **271**(7): 3 667-670
- [11] 刘启功,颜进,张卫东,等. hVEGF165 基因转移对血管内皮细胞增殖及分泌功能的影响 [J]. *中华血液学杂志*, 2000, **21**(9): 489-490

(此文 2000-10-30 收到, 2001-04-19 修回)

(此文编辑 朱雯霞)