

## 凝血酶对大鼠血管平滑肌细胞血小板源生长因子受体基因表达的影响

王启贤<sup>1</sup>, 周兰清<sup>1</sup>, 赵媛<sup>2</sup>, 吕俊升<sup>3</sup>

(1. 昆明医学院附属第一医院心血管内科, 昆明 650032。

2. 云南省建工医院民航路社区卫生服务中心。3. 浙江大学医学院附属第二医院心内科)

[主题词] 凝血酶; 肌, 平滑, 血管; 受体, 血小板源生长因子; 基因表达

[摘要] 为了研究凝血酶对血管平滑肌细胞血小板源生长因子受体基因表达的影响, 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, 用斑点杂交检测凝血酶对血管平滑肌细胞血小板源生长因子受体 mRNA 的表达。结果发现培养的血管平滑肌细胞在基础状态下可表达血小板源生长因子  $\alpha$  受体和  $\beta$  受体 mRNA, 凝血酶在作用于血管平滑肌细胞 2~ 12 h 抑制了血管平滑肌细胞血小板源生长因子  $\alpha$  受体  $\beta$  受体 mRNA 的表达, 24~ 48 h 后血管平滑肌细胞血小板源生长因子  $\alpha$  受体  $\beta$  受体 mRNA 的表达恢复到基础状态。提示凝血酶对血管平滑肌细胞具有较强的促增殖作用; 凝血酶显著降低了血管平滑肌细胞血小板源生长因子  $\alpha$  受体  $\beta$  受体 mRNA 的表达。

[中图分类号] R363.2

[文献标识码] A

经皮冠状动脉腔内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 muscle cell, VSMC)增殖为主要病理特征之一<sup>[1]</sup>。研究表明凝血酶在再狭窄起到关键作用<sup>[2]</sup>。因此从分子生物学水平探讨凝血酶促 VSMC 增殖的机制十分必要。本文探讨凝血酶对 VSMC 中血小板源生长因子受体(platelet derived growth factor receptor, PDGF-R)基因表达的影响。

### 1 材料与方法

实验参考文献[1]进行, 现简述。

#### 1.1 材料

实验动物为 8~ 10 周龄 SD 大鼠; 新生牛血清购自杭州四季青公司; DMEM 培养基、Trizol 购自 GIBCOL-BRL 公司; 凝血酶为 Sigma 产品, 来源于牛血清; DEPC 为 Serva 产品; [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司; 含重组质粒大肠杆菌的培养和

质粒提取试剂: 胰蛋白胍(Tryptone), 酵母提取物(Yeast Extract)为 Oxiod 产品, 琼脂粉, 溶菌酶(Lysozyme)由 BIB 分装; 其余材料和试剂均为进口分装或国内产品。

#### 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, 倒置相差显微镜下观察, 细胞为梭形, 细胞间多有突起相连, 大部分细胞呈汇合状态, 多层重叠生长, 具有典型的峰谷(hills and valleys)生长状态。传代培养至 4~ 8 代时用于实验。

#### 1.3 重组质粒制备和 cDNA 插入片段的回收

用碱裂解法进行小量质粒 DNA 制备。puc18-PDGF- $\beta$  受体 cDNA 用 ECOR I 酶切, Bluescript SK + -PDGF- $\alpha$  受体 cDNA 用 Not I 酶切, 37℃过夜, 用 1%~ 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 1~ 3 h, 使酶切片断充分分离, 在紫外灯下用刀片切取含目的片断的琼脂糖凝胶条。采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 血小板源生长因子受体基因的表达

1.4.1 细胞处理 用第 4~ 8 代 VSMC 进行实验, 用含 15% 小牛血清的 DMEM 培养液将细胞数调整为  $5 \times 10^7/L$ , 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, 此后分为 8 组, 每组两瓶细胞, 第 1 组用作对照, 第 2 到第 8 组分别用

[作者简介] 王启贤, 男, 1959 年 8 月出生, 云南省昭通市人, 医学博士, 副教授。1983 年毕业于昆明医学院, 获学士学位; 1994 年获硕士学位, 1997 年在浙江大学医学院获博士学位, 现主要从事心血管病临床、介入心脏病和心血管分子生物学研究。周兰清, 男, 1944 年出生, 云南省巧家人, 主任医师, 教授; 1967 年毕业于昆明医学院, 1993 年 10 月至 1994 年 9 月受国家教委派遣赴荷兰鹿特丹伊拉士马斯大学胸科中心进修介入性心脏病学技术, 现主要从事心血管病教学与临床, 重点是冠心病的介入性治疗。

含 5 000 u/L 凝血酶的 DMEM 培养液作用 2 h、4 h、6 h、8 h、12 h、24 h 和 48 h 后提取总 RNA。

1.4.2 RNA 斑点杂交 预杂交液用 6×SSC、5×Denhardt、0.5% SDS、鲑鱼 DNA 和 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℃杂交炉内滚动预杂交 12~16 h 后,按 Prime-α Gene Labeling 试剂盒说明进行标记。倾出预杂交液,换为新配制的杂交液,加入制备的变性 cDNA 探针,杂交炉内杂交 24~48 h。经洗膜,放射自显影。

2 结果

2.1 凝血酶对血小板源生长因子 α 受体基因表达的影响

血小板源生长因子(PDGF)-α 受体 mRNA 在凝血酶刺激后 2 h 就开始下降,刺激后 6 h 下降最明显,24 h 后开始恢复,48 h 后基本恢复到凝血酶刺激前的水平。

2.2 凝血酶对血小板源生长因子 β 受体基因表达的影响

血小板源生长因子(PDGF)-β 受体 mRNA 在凝血酶刺激后 2 h 就明显下降,刺激后 2~6 h 下降最明显,24 h 后开始恢复,48 h 后基本恢复到凝血酶刺激前的水平。

2.3 血小板源生长因子受体 mRNA 相对表达量

放射自显影胶片经激光光密度仪扫描,以内参照 β-actin 表达量为对照,分析凝血酶刺激 VSMC 后不同时间相对表达量,结果见表 1。

表 1. 凝血酶诱导的血小板源生长因子 α 和 β 受体 mRNA 相对表达量

时间(h)	PDGF-α/β-actin	PDGF-β/β-actin
0	1.93	2.01
2	1.02	0.64
4	0.95	0.69
6	0.69	0.51
8	0.64	0.79
12	1.05	0.84
24	2.02	2.09
48	1.90	1.22

3 讨论

研究结果发现,凝血酶在作用于 VSMC2~12 h 抑制了 VSMCPDGF-α 和 PDGF-β 受体 mRNA 的表达,24~48 h 后 VSMCPDGF-α 和 PDGF-β 受体 mRNA 的表达恢复到基础状态。至于凝血酶刺激 PDGF 受体下降的机制尚不完全清楚。Majesky 等报导在球囊导管损伤大鼠颈动脉模型中,亦检测到 PDGF-A mRNA 表达增加而 PDGF-β 受体 mRNA 表达下降;Okazaki 等在培养的大鼠 VSMC 内加入 α 凝血酶、血管紧张素 Ⅱ、内皮素、去甲肾上腺素、异丙肾上腺素、苯肾上腺素、组织胺、5-羟色胺、PDGF-AA、PDGF-BB、bFGF、IGF-1、EGF 等刺激 VSMC,只有 α 凝血酶同时诱导 PDGF-A mRNA 表达增加和 PDGF-α、PDGF-β 受体 mRNA 表达下降,可见凝血酶诱导的 VSMCPDGF 配体与受体的改变与球囊损伤动脉后血管壁内 PDGF 配体与受体的改变基本相同,因而,凝血酶在血管病变形成(特别是 PTCA 术后再狭窄)过程中起重要作用。凝血酶下调 PDGF-α 受体 mRNA 可能是由于其诱导 VSMC 表达 PDGF-AA,PDGF-AA 与细胞膜上 PDGF-α 受体结合,反馈抑制了 VSMC 膜上 PDGF-α 受体基因表达,但 Okazaki 等认为可能是 α 凝血酶直接抑制了 PDGF 受体表达。凝血酶下调 PDGF-β 受体 mRNA 可能是由于 VSMC 表达 PDGF-A 链与 VSMC 膜上 PDGF-β(αβ)受体结合反馈抑制了 VSMC 膜上 PDGF-β 受体表达或或与 PDGF-A 链相互结合为 PDGF-AB,PDGF-AB 与 VSMC 膜上 PDGF-β 受体(αβ)结合反馈抑制了 VSMC 膜上 PDGF-Rβ 表达。

参考文献

[1] 王启贤,吕俊升. 凝血酶对大鼠血管平滑肌细胞血小板源生长因子基因表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2000, 8(1): 26-31

[2] Agnelli G. Thrombin plays a pivotal role in vascular re-occlusion after PTCA and coronary thrombolysis[J]. Circ Res, 1996, 31: 232-234

[3] 王启贤,吕俊升. 凝血酶与血管平滑肌细胞增殖研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 1997, 5(2): 177-180

[4] Bydlowski SP, Papers MM, Albraham JA, 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

[5] Koyama NK, Hart CE, Clowes AW. Different functions of the platelet-derived growth factor- and receptors for the migration and proliferation of cured baboon smooth muscle cells[J]. Circ Res, 1994, 75(4): 682-691

(此文 2000-07-19 收到, 2001-04-30 修回)  
(此文编辑 胡必利)