

# 切应力对内皮细胞组织因子表达上调的影响及其作用机制

李黔宁<sup>1</sup>, 应大君<sup>2</sup>, 戴光明<sup>1</sup>, 郑健<sup>1</sup>

(第三军医大学 1. 新桥医院神经内科, 重庆市 400038; 2. 解剖学教研室生物力学实验室, 重庆市 400037)

[关键词] 分子生物学; 切应力对内皮细胞组织因子表达的影响; 原位杂交; 切应力; 内皮细胞; 组织因子; 转录因子

[摘要] 研究切应力对内皮细胞组织因子表达的影响及其作用机制。利用原位杂交和免疫组织化学观察组织因子基因、Sp1 和 Egr-1 的 mRNA 转录及蛋白表达。切应力作用采用平行板流动腔系统给予。结果发现, 在静置培养内皮细胞中, 组织因子基因 mRNA 及蛋白表达极低, 促凝活性也低。Sp1 蛋白表达在胞核较高, Sp1 mRNA 表达在胞浆较高。Egr-1 在胞核和胞浆均无表达或表达极低。在切应力(1.2、2.4 及 4.8 Pa)作用后, 内皮细胞胞浆组织因子基因 mRNA 转录和蛋白合成及组织因子促凝活性升高, 与对照组比较均有显著性差异( $P < 0.05$ )。Sp1 和 Egr-1 基因 mRNA 转录和蛋白合成均有增加( $P < 0.05$ ), 但以 Egr-1 增加更显著( $P < 0.05$ ), 其变化趋势与组织因子基因 mRNA 转录、组织因子基因蛋白合成、组织因子促凝活性的变化趋势相同。结果提示, 切应力是内皮细胞组织因子基因表达上调的触发因素之一, 其触发机制与转录因子 Egr-1 和 Sp1 介导有关。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

## The Effect and Its Mechanism of the Fluid Shear Stress on Expression of Tissue Factor in Endothelial Cells

LI Qian-Ning<sup>1</sup>, YING Da-Jun<sup>2</sup>, DAI Guang-Ming<sup>1</sup>, and ZHENG Jian<sup>1</sup>

(1. The Department of Neurology, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038; 2. Biomechanical Laboratory, Department of Anatomy, The Third Military Medical University, Chongqing 400037; China)

[KEY WORDS] Shear Stress; Endothelial Cell; Tissue Factor; Transcription Factor; Procoagulant Activity

[ABSTRACT] **Aim** to investigate the effect of fluid shear stress on tissue factor (TF) high expression in endothelial cells and discuss its possible mechanism. **Methods** mRNA expression of TF, transcription factors nuclear factor Sp1 and Egr-1 and their relative antigen were analyzed by in situ hybridization and immunohistochemistry staining, respectively. Functional TF activity was assessed by one-step recalcification clotting time assay, meanwhile, a simple parallel flow chamber system, which can produce 0~4.8 Pa steady laminar flow shear stress, was established in order to study the effect of blood flow shear stress on endothelial cells (EC). **Results** In HUVEC, TF functional activity, antigen and mRNA are very low; Sp1 protein expression increased in karyon, but the transcriptional activity of Sp1 is high in cytoplasm; Egr-1 mRNA and protein expression is absent or fewer in karyon and cytoplasm. After 6 h exposed to 1.2, 2.4, 4.8 Pa shear stress, mRNA, protein expression, the procoagulant activity of TF markedly increased comparing with control group ( $P < 0.05$ ). The mRNA and protein expression of Egr-1 and Sp1 increased ( $P < 0.05$ ). However, the change of Egr-1 was more significant than that of Sp1 ( $P < 0.05$ ). The change trend of Egr-1 and Sp1 expression were similar to that of TF. **Conclusion** The shear is one of a starting regulator of TF expression in endothelium. Their effect is mediated by transcription factors nuclear factor Egr-1 and Sp1.

血管相对狭窄、弯曲、分叉或粥样硬化斑块的溪谷处, 形成血栓的起因是目前研究热点之一。文献[1-3]报道, 这些部位的管壁切应力变化最大, 但这种变化在血栓形成中的作用则无明确定论。文献[4]认为, 组织因子(tissue factor, TF)的作用不容忽视

视。生理状态下, 血管内皮细胞不表达 TF。但在许多异常情况, 如细菌内毒素作用下, 内皮细胞大量表达 TF, 启动外源性凝血系统, 导致血管表面微血栓形成。文献[5, 6]报道, 切应力对内皮细胞 TF 表达和血管平滑肌细胞增殖有影响。本文对切应力变化诱导内皮细胞 TF 基因表达及其可能机制进行研究。

[收稿日期] 2003-07-30 [修回日期] 2003-12-31

[基金项目] 国家自然科学基金(39970269)资助

[作者简介] 李黔宁, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事脑血管疾病、内皮细胞基因的切应力调控机制研究。E-mail: llqqnn@hotmail.com。应大君, 博士研究生导师, 长期从事血管生物学及分子生物学研究。戴光明, 硕士研究生导师, 长期从事脑血管病临床诊治研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

组织因子(TF)、Sp1 和 Egr-1 型原位杂交检测试

剂盒、免疫组织化学染色试剂盒、DAB 显色试剂盒 (ED1022 和 ED1025) 为武汉博士德生物工程公司产品; 抗 TF 抗体及人工合成 TF 为 Calbiochem 产品; 考马斯亮兰法 G250 为上海生物工程公司产品; Sp1 抗体及 Egr-1 抗体为 Santa 产品。内皮细胞系 ECV304 (ATCC CRF-1998) 系第三军医大学新桥医院心内科高凌云博士和李福平博士惠赠。

## 1.2 细胞培养及切应力作用

**1.2.1 内皮细胞培养** ECV304 细胞与含 10% 新生小牛血清、双抗(青霉素 100 ku/L, 链霉素 100 mg/L) 的 M199 培养基(Gibco 产品) 混匀, 置于 100 mL 培养瓶中, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 孵箱(湿度为 95%) 内培养, 每 2~3 天换液 1 次, 约 5 天经 0.5% 胰酶消化后传代, 进行如下相关处理。

**1.2.2 切应力作用** ECV304 细胞培养至 50% 汇合时, 用 Hank's 液洗两次, 胰酶消化, 计数。用含有 10% 小牛血清的 M199 培养基调节细胞密度至 10<sup>9</sup>/L, 取 400 μL, 置于 24 × 24 mm 盖玻片上培养 24 h。倒置显微镜下观察, 照相。如果细胞生长良好, 直接将载有 ECV304 细胞的 24 × 24 mm 盖玻片置于平行板流动腔系统<sup>[7]</sup>, 接受切应力(1.2、2.4 和 4.8 Pa) 作用, 分别观察 0、1、3、6 及 12 h。

## 1.3 原位杂交染色法及图像分析

内皮细胞组织因子基因 mRNA 表达采用原位杂交试剂盒检测。阳性结果为细胞浆出现蓝色颗粒。用 TIGER 920G 细胞图像分析仪(重庆大学泰格路图形图像工程技术研究所) 进行图像分析。测定条件:

表 1. 切应力对组织因子 mRNA 及蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1. Effect of shear on expression of TF mRNA and protein

时间	1.2 Pa 切应力		2.4 Pa 切应力		4.8 Pa 切应力	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
0 h	0.174 ± 0.041	0.174 ± 0.036	0.156 ± 0.063	0.144 ± 0.065	0.159 ± 0.0205	0.134 ± 0.046
1 h	0.279 ± 0.025	0.354 ± 0.056	0.354 ± 0.052	0.426 ± 0.039	0.684 ± 0.080 <sup>ab</sup>	0.698 ± 0.127 <sup>ab</sup>
3 h	0.395 ± 0.063	0.401 ± 0.059	0.571 ± 0.025 <sup>ab</sup>	0.589 ± 0.136 <sup>ab</sup>	0.576 ± 0.062	0.561 ± 0.098
6 h	0.548 ± 0.0205 <sup>ab</sup>	0.491 ± 0.065 <sup>ab</sup>	0.526 ± 0.024	0.472 ± 0.161	0.485 ± 0.052	0.445 ± 0.067
12 h	0.262 ± 0.0205	0.309 ± 0.062	0.275 ± 0.062	0.303 ± 0.024	0.264 ± 0.024	0.388 ± 0.029

at:  $P < 0.05$ , 与同切应力下其它时间组比较; b:  $P < 0.05$ , 与同时间下其它切应力组比较。

## 2.2 切应力对组织因子促凝活性的影响

切应力作用后 TF 促凝活性变化趋势与 TF mRNA 及蛋白表达类似。TF 促凝活性在切应力作用 1~12 h 均存在。随着切应力增加, 其活性的高峰时间逐渐缩短, 即切应力为 1.2 Pa 时, 促凝活性的高峰时间为 6 h; 切应力为 2.4 Pa 时, 为 3 h; 而切应力

为 4.8 Pa 时, 为 1 h ( $P < 0.05$ )。随着作用时间延长, 维持 TF 高峰促凝活性所需的切应力越小, 即切应力作用 1 h 时, 维持高峰促凝活性的切应力为 4.8 Pa; 作用 3 h 时为 2.4 Pa; 作用 6 h 时只需 1.2 Pa (表 2, Table 2)。

## 1.4 免疫组织化学染色法及图像分析

内皮细胞组织因子基因蛋白表达采用免疫组织化学染色试剂盒检测, 阳性结果为细胞浆出现棕色细颗粒。图像分析同原位杂交。

## 1.5 组织因子促凝活性测定

组织因子(TF) 促凝活性采用裂解内皮细胞一步复钙凝块时间测定法测定。

## 1.6 统计学处理

所有计量数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SSPS 统计程序包的双因素方差分析, 进行各均数间的显著性检验。

## 2 结果

### 2.1 切应力对组织因子 mRNA 和蛋白表达的影响

ECV304 细胞经切应力作用后, TF mRNA 和蛋白在 1~12 h 均有表达。随着切应力加大, 表达高峰时间逐渐缩短。当切应力为 1.2 Pa 时, 表达高峰时间为 6 h; 切应力为 2.4 Pa 时, 表达高峰时间为 3 h; 切应力为 4.8 Pa 时, 表达高峰时间为 1 h ( $P < 0.05$ )。随着作用时间延长, 维持 TF mRNA 和蛋白表达高峰所需的切应力减小, 当切应力作用 1 h 时, 维持 TF mRNA 和蛋白高峰表达的切应力为 4.8 Pa; 作用 3 h 时, 维持的切应力为 2.4 Pa; 作用 6 h 时, 维持切应力只有 1.2 Pa ( $P < 0.05$ ; 表 1, Table 1)。

为 4.8 Pa 时, 为 1 h ( $P < 0.05$ )。随着作用时间延长, 维持 TF 高峰促凝活性所需的切应力越小, 即切应力作用 1 h 时, 维持高峰促凝活性的切应力为 4.8 Pa; 作用 3 h 时为 2.4 Pa; 作用 6 h 时只需 1.2 Pa (表 2, Table 2)。

### 2.3 切应力对 Sp1 mRNA 转录及蛋白表达的影响

切应力作用后, Sp1 mRNA 和蛋白表达趋势与 TF mRNA 和蛋白表达趋势类似。Sp1 mRNA 和蛋白表达在切应力后 1~12 h 均有表达。随着切应力加大, 其高峰表达时间逐渐缩短, 即切应力为 1.2 Pa 时, Sp1 mRNA 和蛋白的高峰表达时间为 6 h; 切应力为 2.4 Pa 时为 3 h; 切应力为 4.8 Pa 时只需 1 h ( $P < 0.05$ )。随着作用时间延长, 维持 Sp1 mRNA 和蛋白表达高峰所需的切应力减小, 即切应力作用 1 h 时, 维持 Sp1 mRNA 和蛋白高峰表达的切应力为 4.8 Pa; 作用 3 h 时为 2.4 Pa; 作用 6 h 时只需 1.2 Pa ( $P < 0.05$ ; 表 3, Table 3)。

表 3. 切应力对 Sp1 mRNA 及蛋白表达的影响 ( $\bar{A}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 3. Effect of shear on expression of Sp1 mRNA and protein

时间	1.2 Pa 切应力		2.4 Pa 切应力		4.8 Pa 切应力	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
0 h	0.166 $\pm$ 0.007	0.166 $\pm$ 0.006	0.157 $\pm$ 0.008	0.180 $\pm$ 0.008	0.164 $\pm$ 0.012	0.134 $\pm$ 0.046
1 h	0.269 $\pm$ 0.016	0.289 $\pm$ 0.026	0.310 $\pm$ 0.016	0.448 $\pm$ 0.027 <sup>ab</sup>	0.344 $\pm$ 0.015	0.241 $\pm$ 0.007
3 h	0.301 $\pm$ 0.010	0.339 $\pm$ 0.011	0.371 $\pm$ 0.015	0.505 $\pm$ 0.018 <sup>ab</sup>	0.395 $\pm$ 0.028	0.284 $\pm$ 0.017
6 h	0.374 $\pm$ 0.011 <sup>a</sup>	0.454 $\pm$ 0.016 <sup>ab</sup>	0.472 $\pm$ 0.016 <sup>ab</sup>	0.421 $\pm$ 0.011	0.367 $\pm$ 0.013	0.257 $\pm$ 0.010
12 h	0.213 $\pm$ 0.005	0.248 $\pm$ 0.012	0.698 $\pm$ 0.127 <sup>ab</sup>	0.561 $\pm$ 0.098	0.445 $\pm$ 0.067	0.388 $\pm$ 0.029

a:  $P < 0.05$ , 与同切应力下其它时间组比较; b:  $P < 0.05$ , 与同时间下其它切应力组比较。

#### 2.4 切应力对 Egr-1 蛋白表达及 mRNA 转录的影响

切应力作用后, Egr-1 mRNA 和蛋白表达趋势与 TF 和 Sp1 mRNA 和蛋白表达趋势类似。Egr-1 mRNA 和蛋白表达在切应力后 1~12 h 均存在。随着切应力加大, 其高峰表达时间逐渐缩短。当切应力为 1.2 Pa 时, Sp1 mRNA 和蛋白的高峰表达时间为 6 h; 切

表 2. 切应力作用后组织因子促凝活性变化 (Mu/ value)

Table 2. Effect of shear on procoagulant activity of tissue factor

时间	1.2 Pa	2.4 Pa	4.8 Pa
0 h	948 $\pm$ 85	899 $\pm$ 41	940 $\pm$ 88
1 h	1782 $\pm$ 199	1879 $\pm$ 208	3083 $\pm$ 292 <sup>ab</sup>
3 h	1953 $\pm$ 149	2726 $\pm$ 292 <sup>ab</sup>	2104 $\pm$ 124
6 h	2660 $\pm$ 227 <sup>ab</sup>	2192 $\pm$ 189	1948 $\pm$ 131
12 h	1834 $\pm$ 158	1786 $\pm$ 150	1811 $\pm$ 194

a:  $P < 0.05$ , 与同切应力下其它时间组比较; b:  $P < 0.05$ , 与同时间下其它切应力组比较。

应力为 2.4 Pa 时为 3 h; 切应力为 4.8 Pa 时只需 1 h ( $P < 0.05$ )。随着作用时间延长, 维持 Egr-1 mRNA 和蛋白表达高峰所需的切应力减小, 即切应力作用 1 h 时, 维持 Egr-1 mRNA 和蛋白高峰表达的切应力为 4.8 Pa; 作用 3 h 时为 2.4 Pa; 作用 6 h 时只需 1.2 Pa ( $P < 0.05$ ; 表 4, Table 4)。

表 4. 切应力对 Egr-1 mRNA 及蛋白表达平均吸光度的影响 ( $\bar{A}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

Table 4. Effect of shear on expression of Egr-1 mRNA and protein

时间	1.2 Pa 切应力		2.4 Pa 切应力		4.8 Pa 切应力	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
0 h	0.173 $\pm$ 0.016	0.185 $\pm$ 0.008	0.173 $\pm$ 0.017	0.162 $\pm$ 0.004	0.162 $\pm$ 0.014	0.173 $\pm$ 0.007
1 h	0.259 $\pm$ 0.012	0.245 $\pm$ 0.015	0.322 $\pm$ 0.012	0.271 $\pm$ 0.012	0.422 $\pm$ 0.018 <sup>ab</sup>	0.393 $\pm$ 0.083 <sup>ab</sup>
3 h	0.313 $\pm$ 0.012	0.278 $\pm$ 0.019	0.393 $\pm$ 0.013 <sup>ab</sup>	0.337 $\pm$ 0.031 <sup>ab</sup>	0.323 $\pm$ 0.014	0.374 $\pm$ 0.082
6 h	0.358 $\pm$ 0.018 <sup>ab</sup>	0.311 $\pm$ 0.049 <sup>a</sup>	0.301 $\pm$ 0.017	0.281 $\pm$ 0.024	0.274 $\pm$ 0.017	0.312 $\pm$ 0.012
12 h	0.264 $\pm$ 0.014	0.215 $\pm$ 0.008	0.251 $\pm$ 0.012	0.225 $\pm$ 0.007	0.238 $\pm$ 0.012	0.245 $\pm$ 0.008

a:  $P < 0.05$ , 与同切应力下其它时间组比较; b:  $P < 0.05$ , 与同时间下其它切应力组比较。

### 3 讨论

多种因素使内皮细胞 TF 基因表达上调<sup>[8]</sup>。Houston 等<sup>[9]</sup>用 1.5 Pa 切应力作用 1 h 和 3 h, TF mRNA 分别升高 3.6 倍和 5.2 倍。而 TF mRNA 的基础

表达水平在静止状态下几乎检测不到。Lin 等<sup>[10]</sup>用 1.2 Pa 切应力作用后, TF 促凝活性 4~6 h 达高峰, 10~12 h 回到静止水平; TF mRNA 1 h 开始表达, 2 h 达到高峰, 6 h 几乎检测不到。本实验发现, 当模拟

切应力为 1.2 Pa 时, TF mRNA、蛋白表达及 TF 促凝活性均在 6 h 左右达高峰; 当切应力为 2.4 Pa 时, 上述三项指标的高峰时间缩短到 3 h; 当切应力为 4.8 Pa 时, 在 1 h 左右就可见到三项指标的高峰显现。但 TF mRNA、蛋白表达及 TF 促凝活性的高峰时间均只持续 1~3 h 左右。与 Houston 等<sup>[9]</sup>和 Lin 等<sup>[10]</sup>的结果比较, 本研究结果不但提示切应力与 TF 基因表达有关, 而且显示 TF 基因的表达时间与切应力大小有关, 但高峰持续时间并未与切应力大小成正比。

本实验发现切应力及同样时间的大致, 均为转录因子 Sp1 和 Egr-1 可能与切应力诱导 TF 基因激活有关。TF 基因的启动子区 -14~-111 间, 有 3 个 Egr-1/Sp1 位点, 每个 Egr-1/Sp1 位点长 12 bp, 其中 6 bp 为 Egr-1 与 Sp1 位点的重叠部分<sup>[9,10]</sup>。转录因子 Sp1 或 Egr-1 调节 TF 表达的机制有两种: 转录因子 Sp1 超磷酸化。Lin 等<sup>[10]</sup>研究发现 Sp1 有磷酸化 Sp1 和非磷酸化 Sp1(95 kDa) 两种形式。其中磷酸化 Sp1, 经切应力 1.2 Pa 作用后显著升高, 达 35% 左右, Sp1 转录活性显著升高, 约高 8 倍以上。说明磷酸化 Sp1 的进一步超磷酸化与 TF 基因表达上调有关。转录因子 Egr-1 可竞争性取代 Sp1。Houston 等<sup>[9]</sup>利用 Egr-1 取代预先与靶序列结合的 Sp1 时, 只需要相同的摩尔数。而用 Sp1 取代预先与靶序列结合的 Egr-1 时, 则需超过 30 倍以上的摩尔数才能完全取代。而且没有检测到两个转录因子同时结合在同一部位的情况。将外源性 Egr-1 和 TF 启动子的报告基因同时转染人脐静脉内皮细胞或大鼠颈动脉血管狭窄处, 在人脐静脉内皮细胞或狭窄处血管内膜可见到 Egr-1 和 TF 的表达。说明转录因子 Egr-1 对 TF 基因启动子区 Egr-1/Sp1 位点的亲和力比转录因子 Sp1 大, 有利于与 Egr-1/Sp1 位点结合, 竞争性取代 Sp1。本课题免疫组织化学结果表明, 在静止细胞的

细胞核和胞浆中, Sp1 的 mRNA 和蛋白均有较高表达; 而 Egr-1 的 mRNA 和蛋白的表达极低或不表达。在切应力诱导的内皮细胞, Egr-1 胞浆表达过渡到胞核表达。Sp1 蛋白胞核分布, 在切应力作用下其表达进一步增加。Wusteman 等<sup>[11]</sup>的免疫荧光结果与此类似。因此, 我们认为, 切应力诱导 TF 表达的可能机制为: 静息状态时, 转录因子 Sp1 与 TF 基因启动子区的三个 Sp1/Egr-1 位点的 12 bp 核心序列结合。当细胞受到切应力作用时, 首先诱导转录因子 Egr-1

发因素之一, 其触发机制与转录因子 Egr-1 和 Sp1 激活有关。

#### [参考文献]

- [1] Hademenos GJ. Biophysical mechanisms of stroke. *Stroke*, 1997, **28**: 2067
- [2] 汪俊军, 史利宁, 张春妮. 低密度脂蛋白自身免疫在动脉粥样硬化发生中的作用. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**: 545-548
- [3] Ravensbergen J, Ravensbergen JW, Krijger JKB. Localizing role of hemodynamics in atherosclerosis in several human vertebrobasilar junction geometries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1998, **18**: 708-716
- [4] Martin DMA, Wiiger MT, Prydz H. Tissue factor and biotechnology. *Thrombosis Research*, 1998, **90**: 1-25
- [5] 李黔宁, 应大君, 戴光明, 郑健, 肖道虹, 邓志宽, 等. 形成三螺旋 DNA 的寡核苷酸抑制内皮细胞组织因子基因的表达. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10**: 190-194
- [6] 韩林, 张宝仁, 覃开荣, 朱家麟, 柳兆荣. 不同切应力下的内皮细胞条件培养基对平滑肌细胞增殖和胶原合成的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8**: 206-208
- [7] 李黔宁, 应大君, 戴光明, 郑健. 一种简易的平行板流动腔系统的应用. *医用生物力学*, 2002, **17**: 7-12
- [8] 李黔宁, 应大君. 组织因子基因的顺式调节元件. *国外医学分子生物学分册*, 1999, **21**: 202-237
- [9] Houston P, Dickson MC, Ludbrook V. Fluid shear stress induction of the tissue factor promoter in vitro and in vivo is mediated by Egr-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 281-289
- [10] Lin MC, Jacobs FA, Chen HH. Shear stress induction of the tissue factor gene. *J Clin Invest*, 1997, **99**: 737-744
- [11] Wusteman MC, Pegga DE, Wanga LH. Vitrification of ECV304 cell suspensions using solutions containing propan-1,2-diol and trehalose\* 1. *Cryobiology*, 2003, **46**: 135-145

(此文编辑 文玉珊)