

# 血小板源性生长因子影响血管弹性蛋白酶表达

蒋 健<sup>1</sup>, 舒 强<sup>2</sup>, 凌光烈<sup>2</sup>

(1. 上海中医药大学附属曙光医院内科, 上海市 200021;

2. 中国医科大学附属第一医院外科局部解剖教研室, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 分子生物学; 血小板源性生长因子诱导血管弹性蛋白酶表达; 原位杂交; 血小板源性生长因子; 细胞增殖; 细胞迁移; 动脉粥样硬化

[摘要] 探讨球囊损伤后血管平滑肌细胞丝氨酸弹性蛋白酶表达增加的机理。用球囊导管损伤 Wistar 系雄性大鼠主动脉或颈总动脉。以血小板源性生长因子 A 和大鼠胰脏丝氨酸弹性蛋白酶的地高辛标记 RNA 探针进行原位杂交, 并用抗 5-溴脱氧尿嘧啶抗体进行双重染色。用抗血小板源性生长因子 AA、抗血小板源性生长因子 BB、抗胰脏弹性蛋白酶、抗人增殖细胞核抗原等抗体进行免疫染色或免疫双重染色。电镜观察细胞的超微结构。结果发现: 在球囊损伤后 0.5~4 h, 血小板源性生长因子 mRNA 表达细胞多于弹性蛋白酶 mRNA 表达细胞; ④增殖细胞和迁移细胞既有血小板源性生长因子 mRNA 和其蛋白表达, 又有弹性蛋白酶 mRNA 和其蛋白表达; ④迁移细胞多为增殖细胞核抗原染色阳性, 细胞内可见到核分裂像。提示血小板源性生长因子可能是刺激中膜平滑肌细胞增殖、迁移并使其弹性蛋白酶增加的影响因子之一。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

## Primary Study on Effect of Platelet-derived Growth Factor on the Expression of the Vascular Elastase

JIANG Jian<sup>1</sup>, SHU Qiang<sup>2</sup>, and LING Guang-Lie<sup>2</sup>

(1. Department of Internal Medicine, Shuguang Hospital of Shanghai Chinese Traditional Medicine University, Shanghai 200021; 2. Department of Regional Anatomy of Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Platelet-derived Growth Factor; Cell Proliferation; Cell Migration; Arteriosclerosis; In Situ Hybridization; Vascular Elastase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the mechanism of the expression increase of the vascular serine elastase after the vascular injury by balloon catheter from the point of view of platelet-derived growth factor (PDGF). **Method** The rat abdominal aorta and carotid arteries of the male Wistar rats were injured by balloon catheters. In situ hybridization was performed by the RNA probe of PDGF-A and rat pancreatic elastase which was labeled with digoxin, and the double immunostaining for 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) was performed. The immunostaining or double immunostaining had been done with the antibodies against PDGF-A, B, pancreatic elastase, proliferating cell nuclear antigen. The ultramicrostructure of the vascular cells was observed with transmission electron microscope. **Results** In the very early stage of balloon injury, the cells of expressing PDGF-A mRNA were more than those of expressing elastase mRNA. The proliferating cells and migrating cells not only expressed PDGF-A mRNA and PDGF-A protein, but also expressed elastase mRNA and elastase protein. Most of the migrating cells were positive for proliferating cell nuclear antigen, the karyomitosis in the cells could be observed. **Conclusion** PDGF may be a factor that stimulate the proliferation, the migration and the expression increase of elastase of the medial smooth muscle cells.

在平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖性血管疾病的形成过程中,中膜 SMC 增殖并向内膜迁移是主要的病理环节。研究发现,球囊损伤大鼠动脉后,SMC 血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)及其受体增加<sup>[1]</sup>而呈现增殖态势<sup>[2]</sup>,并且其丝氨酸弹性蛋白酶 mRNA<sup>[3]</sup>、蛋白及其

活性表达也增加<sup>[4]</sup>;当给予血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)后,不仅抑制了 PDGF,也抑制了弹性蛋白酶 mRNA、蛋白及其活性<sup>[4]</sup>。其原因尚不明了。本研究试图探讨影响血管弹性蛋白酶表达增强的机理。

## 1 材料与方

### 1.1 动脉壁损伤模型

用 2F 球囊导管(美国 Baxter Healthcare 公司)损伤 Wistar 系雄性大鼠(12 周龄,体重 220~250 g)主动脉或右颈总动脉,用未损伤动脉作为对照。分批

[收稿日期] 2003-06-23

[修回日期] 2003-12-15

[作者简介] 蒋健,博士,主任医师,研究方向为血管细胞病理学和中西医结合消化内科学,联系电话为 021-53824307, E-mail 为 jiangjian426@sohu.com。舒强,博士,副教授,研究方向为外科解剖学和血管细胞生物学。凌光烈,博士,教授,研究方向为外科解剖学和血管细胞生物学。

处死动物前 30 min, 按 50 mg/kg 体重静脉注射 5-溴脱氧尿嘧啶 (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU)<sup>[3]</sup>。

## 1.2 血小板源性生长因子 A 和弹性蛋白酶 RNA 探针制备及原位杂交

人 PDGF-A cDNA 用 Betsholtz 等<sup>[5]</sup>报道的 pD1 中 1.3 kb EcoR Ⅳ片段, 插入到 pGEM-3Z (Promeg 公司) 进行克隆。大鼠丝氨酸胰弹性蛋白酶<sup>④</sup>的克隆详见文献[3]。将 PDGF (1.3 kb) 和弹性蛋白酶 (525 bp) cDNA 用地高辛标记的 mRNA 试剂盒 (Boehringer 公司) 进行转录、标记, 分别制成反义和正义 RNA 探针。在进行原位杂交 (in situ hybridization, ISH) 前, 将 1.3 kb PDGF-A 的 RNA 探针以碱加水分解<sup>[6]</sup>, 使之变成 150 bp。腹主动脉用 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, pH7.4) 固定, 制成石蜡切片, 按文献[7]的方法进行 ISH。

## 1.3 原位杂交与 5-溴脱氧尿嘧啶免疫组织化学双重染色

原位杂交完毕后, 将切片以 121℃、1.2 kg/cm<sup>2</sup> 进行 10 min 高压蒸汽处理, 之后用抗 BrdU 抗体进行免疫组织化学染色<sup>[3]</sup>。

## 1.4 免疫组织化学染色

腹主动脉灌流固定、取材和切片制作方法详见文献[4]。用抗人 PDGF-AA (1:100, Genzyme 公司)、抗大鼠胰弹性蛋白酶 (1:300, 美国 Elastin 公司)、抗人增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) (1:200, DAKO 公司) 等抗体以卵白素-生物素法行免疫染色, 联苯二胺 (3,3'-diaminobenzidine

tetrahydrochloride, DAB) 发色, 亮绿或苏木精染核。

## 1.5 免疫组织化学双重染色

颈总动脉用抗人 PDGF-BB (PGF007, 1:100, 日本持田制药) 与抗 PCNA 抗体、抗人胰弹性蛋白酶<sup>④</sup> B<sup>[8,9]</sup> (1:100, 日本三共株式会社) 与抗 PCNA 抗体双重染色。均先以 ABC 法行 PCNA 染色, 镍 DAB 显色 (黑色), 继以碱性磷酸酶抗碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase antialkaline phosphatase, APAAP) 法行 PDGF-BB 或弹性蛋白酶染色 (红色), 亮绿染核。

## 1.6 透射电子显微镜观察

动脉用 2.5% 戊二醛以 110 mm Hg 加压灌流固定, 用 1% 锇酸后固定, 1% 鞣酸、2% 乙酸双氧铀进行组织块染色后, Epon812 包埋, 超薄切片行铀铅染色, 电子显微镜观察 (H-600 型, 日本产品)<sup>[3]</sup>。

## 1.7 细胞计数和统计学处理

每时间点取 3 只大鼠, 每只大鼠取 5 个血管横断面, 即每个时点观察 15 个标本。每张切片的血管阳性 SMC 数除以 SMC 总数, 求出平均每张切片中膜的阳性细胞百分率。多组比较用 Fisher 法。

## 2 结果

### 2.1 腹主动脉血小板源性生长因子 A 和弹性蛋白酶 mRNA 阳性细胞率的动态变化

血小板源性生长因子 A mRNA 阳性细胞率于术后 30 min 即有增加, 与正常动脉相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。2 h 有所减少, 以后逐渐增加, 至 1 d 达

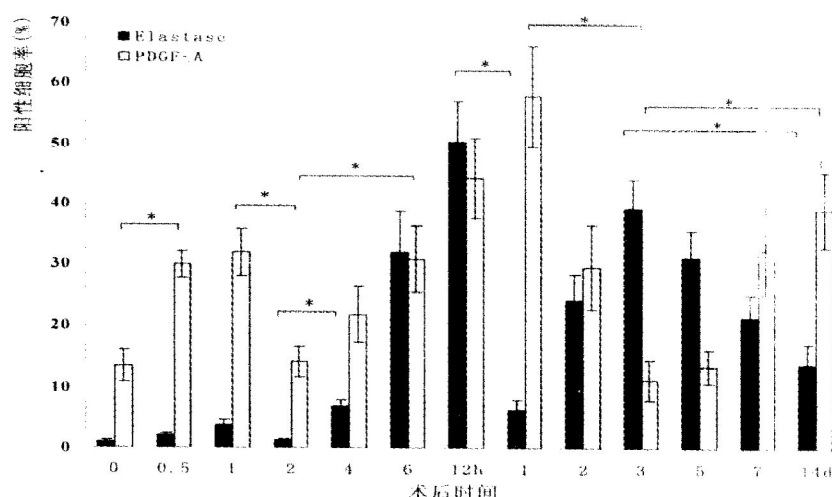


图 1. 球囊损伤后大鼠动脉中膜血小板源性生长因子 A、弹性蛋白酶 mRNA 阳性细胞率的动态变化 a:  $P < 0.05$ , PDGF 或弹性蛋白酶不同时间点的比较。

Figure 1. The dynamic change of the percentages of the positive cells for PDGF-A mRNA and elastase mRNA in the medias of the rat arteries after balloon injury

到顶峰,以后又减少,至 7~14 d 又有所增加,其增减呈波浪型,波峰在 0.5~1 h、1 d 和 14 d。而弹性蛋白酶 mRNA 阳性细胞率于术后 6 h 才开始有显著意义的增加( $P < 0.05$ ),于 1 d 减少以后又逐渐增加,其增减亦呈波浪型,波峰在 12 h 和 3 d,在时间上均迟于 PDGF-A (图 1, Figure 1)。

## 2.2 增殖细胞的血小板源性生长因子和弹性蛋白酶表达

原位杂交与 BrdU 免疫组织化学双重染色发现,几乎所有的 BrdU 标记细胞均有 PDGF-A 和弹性蛋白酶 mRNA 表达,阳性率分别达 99.88% (863/864 个) 和 99.78% (918/920 个)。在连续切片上,同一个 BrdU 阳性细胞既有 PDGF-A mRNA 表达,又有弹性蛋白酶 mRNA 表达。免疫组织化学双重染色发现,多数 PCNA 阳性细胞既有 PDGF-BB 蛋白表达,又有弹性蛋白酶蛋白表达(图 2, Figure 2)。

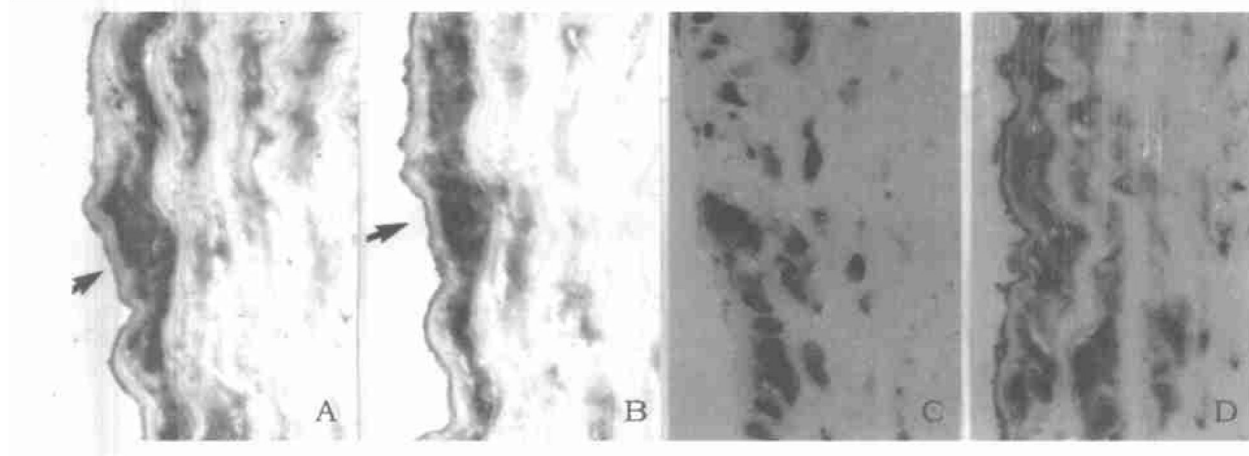


图 2. 球囊损伤后大鼠动脉增殖细胞血小板源性生长因子 A、弹性蛋白酶 mRNA 及其蛋白表达 原位杂交与免疫组织化学双重染色显示, BrdU 标记细胞有很强的 PDGF-A mRNA 表达(A 图箭头所示,  $\times 400$ ); 在 A 图组织标本的连续切片上, 该 BrdU 标记细胞同时又有较强的弹性蛋白酶 mRNA 表达(B 图箭头所示,  $\times 400$ )。免疫组织化学双重染色显示多数 PCNA 阳性细胞既有 PDGF-BB 蛋白表达(C 图,  $\times 320$ ), 又有弹性蛋白酶蛋白表达(D 图,  $\times 320$ )。

Figure 2. The expressions of the PDGF-A mRNA, elastase mRNA and their proteins in the proliferating cells of the rat arteries after balloon injury

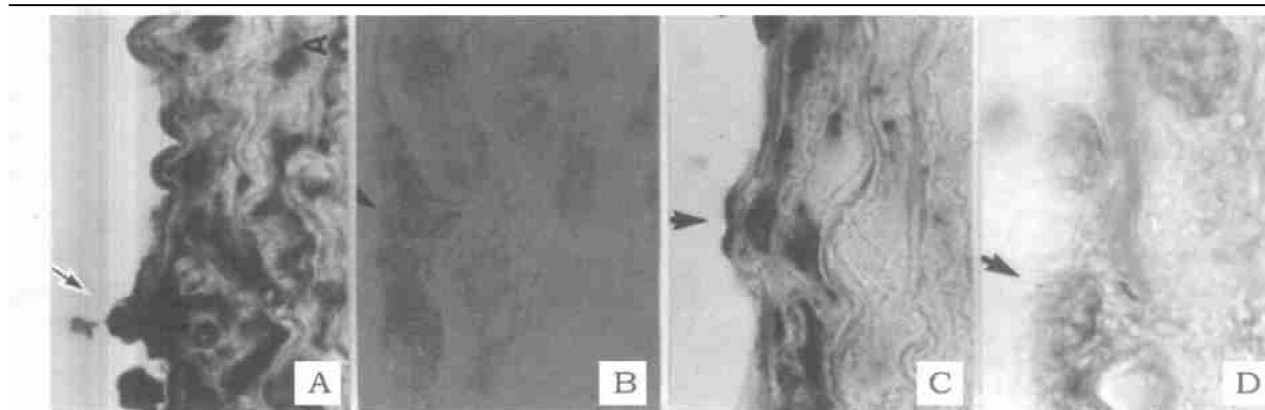


图 3. 球囊损伤后大鼠动脉迁移细胞血小板源性生长因子 A、弹性蛋白酶 mRNA 及其蛋白表达 迁移细胞有较强的 PDGF-A mRNA(A 图箭头所示,  $\times 400$ ) 和其蛋白表达(B 图箭头所示,  $\times 400$ ); 同时, 又有较强的弹性蛋白酶 mRNA(C 图箭头所示,  $\times 400$ ) 和其蛋白表达(D 图箭头所示,  $\times 600$ )。

Figure 3. The expressions of the PDGF-A mRNA, elastase mRNA and their proteins in the migrating cells of the rat arteries after balloon injury

## 2.3 迁移细胞的血小板源性生长因子和弹性蛋白酶表达

迁移细胞(指正在通过内弹性板窗口或其断裂部,同时横跨中膜与内膜的细胞)均有较强的 PDGF-A mRNA 及其蛋白表达,同时,又有较强的弹性蛋白酶 mRNA 及其蛋白表达(图 3, Figure 3)。

#### 2.4 迁移细胞与增殖细胞的关系

迁移细胞中 PCNA 阳性细胞在术后 2 d 和 3 d

达 82.86% (29/35 个),在术后 5 d 和 7 d 达 39.39% (13/33 个)。在普通免疫组织化学染色切片上,迁移细胞显示为 PCNA 染色阳性。电镜下,迁移细胞富含粗面内质网和线粒体,并可见核分裂像(图 4, Figure 4)。

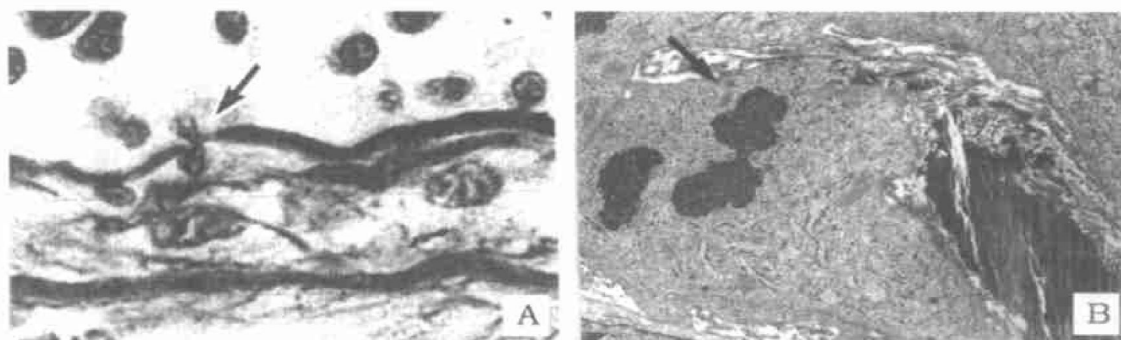


图 4. 球囊损伤后大鼠动脉增殖性迁移细胞 迁移细胞显示为 PCNA 染色阳性(A 图箭头所示,  $\times 400$ )。透射电镜下,迁移细胞富有粗面内质网和线粒体,并可见核分裂像(B 图箭头所示,  $\times 6000$ )。

Figure 4. The proliferative migrating cells of the rat arteries after balloon injury

### 3 讨论

根据本研究的实验结果,推测 PDGF 可能会刺激 SMC 产生弹性蛋白酶,这种推测虽然并无直接证据,但有以下间接依据。球囊损伤后,PDGF-A mRNA 阳性细胞率的波峰出现时间(0.5~4 h)明显早于弹性蛋白酶 mRNA 的波峰出现时间(12 h);PDGF-A mRNA 的 3 个表达峰(0.5~1 h、1 d、14 d)均早于弹性蛋白酶 mRNA 的 2 个表达峰(12 h、3 d)。由于观察时间截止到 14 d,无法知道弹性蛋白酶 mRNA 是否存在第 3 峰以及其是否同样迟于 PDGF-A mRNA 的表达峰。虽然 ISH 的 mRNA 阳性细胞率欠缺精确的定量,但其增减变化仍可提示 PDGF-A mRNA 表达也许是导致弹性蛋白酶 mRNA 表达的诱因。

5-溴脱氧尿嘧啶和 PCNA 均是反应细胞增殖的指标。增殖细胞既有 PDGF mRNA 和蛋白表达,又有弹性蛋白酶 mRNA 和蛋白表达。球囊导管在剥离内皮、使血小板凝集于血管壁并释放出血小板源性生长因子的同时,又引起 SMC 及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)物理性损伤,SMC 内及与 ECM 结合的碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)因纤维蛋白溶解酶而游离,刺激周围的 SMC 产生 PDGF,通过自分泌及旁分泌机制促进 SMC 增殖<sup>[10]</sup>。弹性蛋白酶的合成与分泌增加是 SMC 增殖的结果,而 SMC 增殖是由于 PDGF 刺激

的结果。给球囊损伤后的大鼠投以血管紧张素转换酶抑制剂后,虽然也抑制了弹性蛋白酶<sup>[4]</sup>,但主要为抑制了血管中膜术后 2 d 的 SMC 增殖所致<sup>[2]</sup>,所以有理由认为 PDGF 是引起 SMC 合成弹性蛋白酶增加的诱发因素。

迁移细胞同增殖细胞一样,既有 PDGF mRNA 和蛋白表达,同时又有弹性蛋白酶 mRNA 和蛋白表达。一般而言,PDGF 主要与增殖有关,而弹性蛋白酶主要与迁移有关。就细胞迁移与细胞增殖的关系而言,增殖是迁移的前提,只有当 SMC 增殖到一定密度的密度以后,才向内膜迁移<sup>[11]</sup>。增殖细胞虽不全是迁移细胞,但相当部分迁移细胞的 PCNA 染色阳性,超微结构见核分裂像,呈现合成型细胞的特征,属于增殖细胞或是具有增殖潜能的细胞。血管紧张素转换酶抑制剂通过抑制球囊损伤后早期 SMC 增殖,从而阻抑了细胞迁移以及内膜肥厚<sup>[2]</sup>,表明迁移细胞是依靠自身合成与分泌的弹性蛋白酶(此外也包括金属蛋白酶)降解 ECM、溶解内弹性板来实现迁移的。没有合成型的增殖性细胞,便无法合成与分泌弹性蛋白酶,也就无法实现迁移。从这一点来看,也提示 PDGF 对弹性蛋白酶的表达具有调控作用。体外实验发现,培养骨母细胞的胶原酶 mRNA 可被 PDGF-BB 刺激而产生<sup>[12]</sup>。

血管壁受损是导致血管平滑肌细胞增殖的起始

