

[文章编号] 1007-3949(2003)12-04-0405-05

·实验研究·

血小板源性生长因子影响血管弹性蛋白酶表达

蒋 健¹, 舒 强², 凌光烈²(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 和大鼠胰腺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、抗胰腺弹性蛋白酶、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 Jian¹, SHU Qiang², and LING Guang-Lie²

(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'-bromodeoxyuridine (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^[1]而呈现增殖态势^[2], 并且其丝氨酸弹性蛋白酶 mRNA^[3]、蛋白及其

活性表达也增加^[4]; 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^[4]。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 材料与方法

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生物病理科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)^[3]。

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^[5]报道的 pD1 中 1.3 kb EcoR I 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^[6]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^[6], 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 °C、1.2 kg/cm² 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^[3]。

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。

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^[8,9](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% 银酸后固定, 1% 鞍酸、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)^[3]。

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

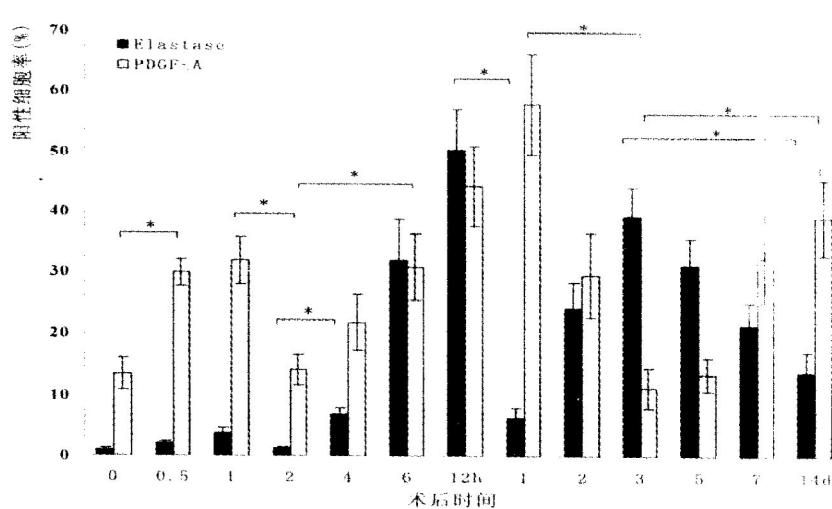


图 1. 球囊损伤后大鼠动脉中膜血小板源性生长因子 A、弹性蛋白酶 mRNA 阳性细胞率的动态变化 a: $P < 0.05$, PDGF 或弹力蛋白酶不同时点之间的比较。

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 a: $P < 0.05$, PDGF or elastase mRNA at different time points.

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)。

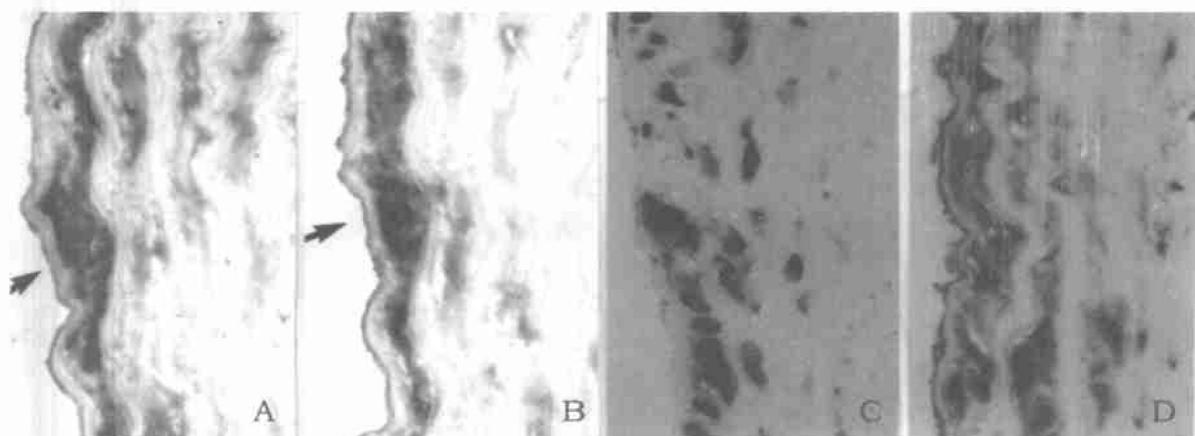


图2. 球囊损伤后大鼠动脉增殖细胞血小板源性生长因子A、弹性蛋白酶mRNA及其蛋白表达 原位杂交与免疫组织化学双重染色显示,BrdU标记细胞有很强的PDGF-A mRNA表达(A图箭头所示, $\times 400$) ;在A图组织标本的连续切片上,该BrdU标记细胞同时又有很强的弹性蛋白酶mRNA表达(B图箭头所示, $\times 400$)。免疫组织化学双重染色显示多数PCNA阳性细胞既有PDGF-BB蛋白表达(C图, $\times 320$),又有弹性蛋白酶蛋白表达(D图, $\times 320$)。

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

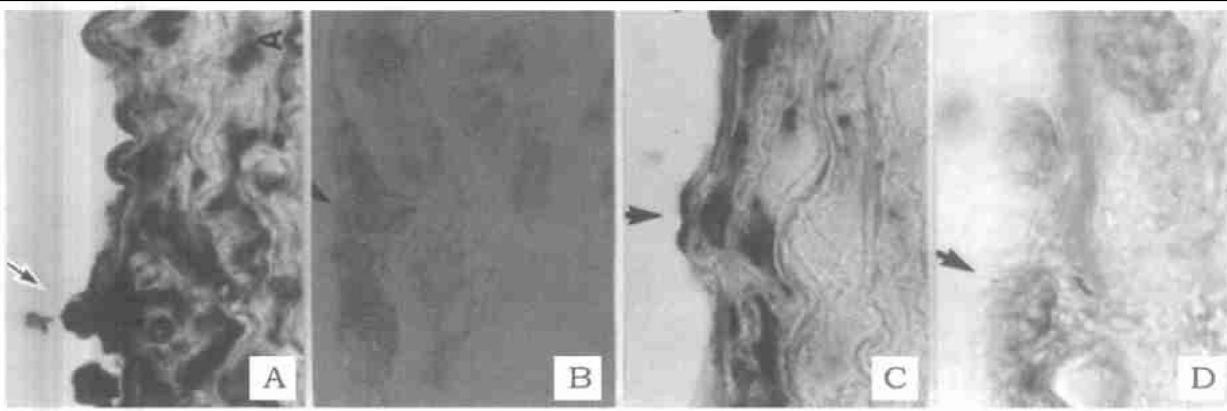


图3. 球囊损伤后大鼠动脉迁移细胞血小板源性生长因子A、弹性蛋白酶mRNA及其蛋白表达 迁移细胞有较强的PDGF-A mRNA(A图箭头所示, $\times 400$)和其蛋白表达(B图箭头所示, $\times 400$) ;同时,又有较强的弹性蛋白酶mRNA(C图箭头所示, $\times 400$)和其蛋白表达(D图箭头所示, $\times 600$)。

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2d和3d

达82.86%(29/35个),在术后5d和7d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)。

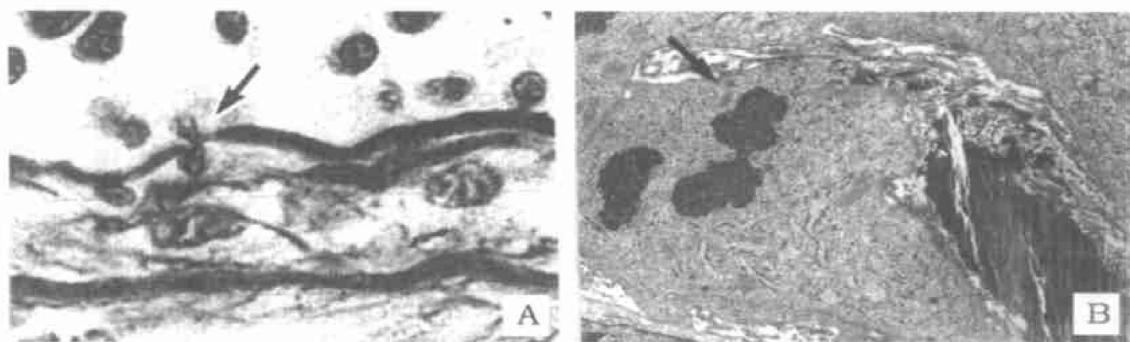


图4. 球囊损伤后大鼠动脉增殖性迁移细胞
迁移细胞显示为PCNA染色阳性(A图箭头所示, $\times 400$)。透射电镜下,迁移细胞富有粗面内质网和线粒体,并可见核分裂像(B图箭头所示, $\times 6000$)。

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(0.5~4h)明显早于弹性蛋白酶mRNA的波峰出现时间(12h);PDGF-A mRNA的3个表达峰(0.5~1h,1d,14d)均早于弹力蛋白酶mRNA的2个表达峰(12h,3d)。由于观察时间截止到14d,无法知道弹力蛋白酶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(extra-cellular 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^[10]。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^[4],但主要为抑制了血管中膜术后2d的SMC增殖所致^[2],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增殖到一定程度的密度以后,才向内膜迁移^[11]。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^[2],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^[12]。

血管壁受损是导致血管平滑肌细胞增殖的起始

原因。损伤刺激通过细胞内的信号转导可引起许多原癌基因的表达和细胞因子生成,从而使血管平滑肌细胞增殖和凋亡的平衡被打破,导致血管平滑肌细胞过度增殖^[13],γ干扰素还可抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖及增殖细胞核抗原表达^[14],因此由增生导致弹性蛋白酶的过度表达的机制仍需进一步研究。综上所述,推测球囊损伤后首先引起PDGF增加,然后刺激SMC增殖并可能诱导SMC合成、分泌弹性蛋白酶。对此,以后尚需进行细胞培养实验加以证实。

[参考文献]

- [1] Yoshida Y, Mitsumata M, Ling CL, Jiang J, Shu Q. Migration of medial smooth muscle cells to the intima after balloon injury. *Ann NY Acad Sci*, 1997, **90** (1): 459-470
 - [2] 舒强, 石恩金, 蒋健, 凌光烈. 抑制大鼠动脉损伤后早期中膜平滑肌细胞增殖可降低内膜肥厚. 中国病理生理杂志, 2002, **18** (5): 462-465
 - [3] 蒋健, 舒强, 凌光烈. 球囊损伤后血管迁移平滑肌细胞弹性蛋白酶 mRNA 的表达. 中华心血管病杂志, 2001, **29** (5): 306-308
 - [4] 舒强, 凌光烈, 蒋健. 血管紧张素转换酶抑制剂对损伤后动脉弹性蛋白酶的影响. 中国病理生理杂志, 2001, **17** (12): 1172-1174
 - [5] Betsholtz C, Johnsson A, Hedin CH, Westermark B, Lind P, Urdea MS, et al. cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature*, 1986, **320** (6 064): 695-699
 - [6] 野村慎太郎. In situ • テ リ • • 4 • ア . 实验医学, 1989, **17** (13, 增刊): 1 593-599
 - [7] 蒋健. 弹力蛋白酶 mRNA 在肝细胞中的表达. 临床肝胆病杂志, 2002, **18** (6): 338-340
 - [8] Tani T, Ohsumi J, Mita K, Takiguchi Y. Identification of a novel class of elastase isozyme, human pancreatic elastase (α₁) by cDNA and genomic gene cloning. *J Biol Chem*, 1988, **263** (3): 1 231-239
 - [9] 吉田洋二, 凌光烈, 蒋健, 王速, 李宗铉, 三吴昌子. チ - • • • • やホ・ 系 - • による动脉损伤と内膜肥厚. 动脉硬化, 1994, **21** (11·12): 691-697
 - [10] Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res*, 1991, **68** (1): 106-113
 - [11] Fingerle J, Muller RM, Kuhn H, Pech M, Baumgartner HR. Mechanism of inhibition of neointimal formation by the angiotensin-converting enzyme inhibitor cilazapril: A study in balloon catheter-injured rat carotid arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15** (2): 1 945-950
 - [12] Varghese S, Delany AM, Liang L, Gabbitas B, Jeffrey JJ, Canalis E. Transcriptional and posttranscriptional regulation of interstitial collagenase by platelet-derived growth factor BB in bone cell cultures. *Endocrinology*, 1996, **137** (2): 431-437
 - [13] 李元建, 廖端芳, 秦旭平. 血管平滑肌细胞增殖及其调控. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** (5): 450-454
 - [14] 丁钢, 祝之明, 祝善俊, 杨永健, 钟健, 王海燕, 等. γ干扰素对大鼠血管平滑肌细胞增殖及增殖细胞核抗原表达的影响. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (5): 411-413
- (本文编辑 曾学清, 胡必利)