

大鼠自体移植静脉中转化生长因子 $\beta 1$ 和基质金属蛋白酶 1 及其抑制剂的基因表达

孙达欣, 张 强, 郎晓讴, 刘明辉

(中国医科大学附属第一医院血管外科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 外科学; 自体移植静脉内膜增生的机理; 静脉移植; 基质金属蛋白酶 1; 基质金属蛋白酶组织抑制剂 1; 转化生长因子 $\beta 1$; 基因

[摘要] 目的 观察转化生长因子 $\beta 1$ 和基质金属蛋白酶 1 及其抑制剂在大鼠自体移植静脉中的动态表达, 探讨它们与移植静脉内膜增生之间的关系。方法 建立大鼠自体静脉移植模型, 随机分成 3、7、14 和 28 天组。行苏木素—伊红及 Verhoeff 染色, 计算机图像分析系统测量不同时间点的内膜和血管壁厚度。采用 Western 印迹和逆转录—聚合酶链反应测定转化生长因子 $\beta 1$ 、基质金属蛋白酶 1 及基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 的蛋白及 mRNA 表达。结果 术后 7 天内膜明显增厚, 与对照组比较有统计学意义 ($P < 0.05$), 术后 14 天内膜增生达到高峰。转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达在术后第 3 天开始增加, 第 7 天达到高峰, 第 28 天回到基线水平。3 天和 7 天组基质金属蛋白酶 1 的蛋白水平与对照组比较没有明显差别, 14 和 28 天组比对照组明显减少。基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 的蛋白表达在第 14 和 28 天明显增加。三者 mRNA 水平的变化趋势与蛋白表达结果相似。结论 转化生长因子 $\beta 1$ 通过破坏基质金属蛋白酶 1 与基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 之间的平衡, 从而使细胞外基质过量堆积, 是内膜增生和血管狭窄形成的机制之一。

[中图分类号] R6

[文献标识码] A

Gene Expression of Transforming Growth Factor- $\beta 1$, Matrix Metalloproteinase-1, and Matrix Metalloproteinase Tissue Inhibitor-1 in Autogenous Vein Grafts in Rats

SUN Da-Xin, ZHANG Qiang, LANG Xiao-Ou, and LIU Ming-Hui

(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

[KEY WORDS] Matrix Metalloproteinase-1; Matrix Metalloproteinase-1 Tissue Inhibitor; Transforming Growth Factor- $\beta 1$; Gene; Vein Grafting; Intimal Hyperplasia

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the dynamic expression of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), and matrix metalloproteinase tissue inhibitor-1 (TIMP-1), and their relations with intimal hyperplasia in autogenous vein grafts in rats. **Methods** Animal models were constructed. The vein grafts were collected on day 3, day 7, day 14, and day 28 after operations. HE and Verhoeff staining and computer image analysis system were used to explore the thickness changes of intima and wall at different time points. Western blot and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were used to detect the protein and mRNA level of TGF- $\beta 1$, MMP-1, and TIMP-1 in vein grafts and controls. **Results** Histomorphological analysis showed that the intimal thickness increased remarkably on day 7 after operation compared with control ($P < 0.05$), and reached a peak on day 14. Western blot revealed that protein level of TGF- $\beta 1$ increased on day 3, peaked on day 7 and returned to the baseline on day 28. MMP-1 protein was not significantly different with control on day 3 and 7 respectively, but decreased significantly on day 14 and 28. TIMP-1 protein increased significantly on day 14 and 28. Their mRNA level had similar tendency with the results of Western blot. **Conclusions** TGF- $\beta 1$ decreased MMP-1 activity by increasing TIMP-1 expression, and facilitate the excessive accumulation of ECM so as to cause intimal hyperplasia and stenosis.

目前对动脉粥样硬化闭塞症尚无有效的药物治疗方法, 利用自体静脉行旁路转流手术是改善患者生活质量的一种重要手段, 但移植静脉经常发生狭

窄和闭塞, 其主要的病理过程包括血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 的迁移、增殖以及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的过量堆积。本实验研究 ECM 的主要降解酶基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1) 及其抑制剂基质金属蛋白酶组织抑制剂 1 (metalloproteinase tissue inhibitor-1, TIMP-1), 以及调控两者平衡的关键因子转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)^[1,2] 的蛋白及 mRNA 在 Wistar 大鼠自体移植静脉

[收稿日期] 2004-08-25

[修回日期] 2005-01-24

[基金项目] 国家自然科学基金资助 (30371401)

[作者简介] 孙达欣, 博士研究生, 主要从事血管外科研究, 联系电话为 13700039127, E-mail 为 sd26138@yahoo.com。张 强, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事血管外科基础和临床研究, 联系电话为 024-23256666-6240, E-mail 为 qzhang@mail.sy.ln.cn。郎晓讴, 博士, 主要从事血管外科研究, 联系电话为 024-23256666-6239, E-mail 为 langxiaouwu@hotmail.com。

中的表达,以及三者与血管狭窄之间的关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型建立及标本收集

48 只雄性 Wistar 大鼠(250-300 g, 中国医科大学实验动物中心提供),腹腔注射 10% 水合氯醛(每公斤体重 30 mg)麻醉。颈前部消毒后作颈部正中纵行切口,手术显微镜下(SXB-1, 上海)分离右侧颈静脉的内侧支(长约 4~5 mm),结扎切断,肝素盐水冲洗备用。分离同侧颈动脉,分别在近、远心端用动脉夹阻断,剪除长约 5 mm 的动脉。将切下来的静脉用 11/0 的显微缝合线端端吻合到颈动脉上,每端缝 8 针。确信通畅后关闭切口。术后单笼、常规饮食饲养,随机分成 3、7、14 和 28 天组,每组 12 只,6 只用于组织形态学染色,6 只用于分子生物学检测。在不同的时间点杀鼠,收获移植静脉,同时取对侧的正常颈静脉作对照。标本保存到液氮里备用。

1.2 组织形态学染色

标本在 4% 中性多聚甲醛中固定 24 h 后,脱水、石蜡包埋。连续切片,厚约 4 μ m,行苏木素-伊红(haematoxylin-eosin, HE)和 Verhoeff 染色。Verhoeff 使弹力纤维呈黑色,用 Van Gieson 染液使胶原纤维呈红色。内膜的范围界定:内缘为血管腔,外缘为内弹力板。每条静脉选取 5 个不连续的位置由一位不关心本实验结果的技术员利用计算机图像分析系统(Meta Morph BX41, OLYMPUS)测量内膜及血管壁的厚度。

1.3 Western 印迹

将剪碎的静脉放入裂解液,超声匀浆,4℃下每分钟 12 000 转离心 15 min,取上清,考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,并将蛋白浓度调至同一水平。取 25 μ g 蛋白,15% SDS-PAGE 电泳,转到硝酸纤维素膜上,用 TBS(20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 7.4)配制的 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。兔抗大鼠 TGF- β 1、MMP-1 和 TIMP-1 一抗(Santa Cruz, 1:400)4℃孵育过夜。用 TTBS(TBS 加入 1%Tween 20)洗膜,二抗(辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 1:2 000)室温孵育 1 h。加入显色液 15~30 min 后终止,凝胶成像系统上分析,用与对照组的光密度比值对蛋白表达进行量化。

1.4 逆转录-聚合酶链反应

TRIzol(Gibco, USA)液提取血管组织中总 RNA,按照 TaKaRa 逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒

(大连宝生物)说明将 RNA 逆转录合成 cDNA。PCR 扩增:2 μ L 逆转录产物,1.25 mmol/L MgCl₂, 250 nmol/L 正、反义引物,2.5 U/100 μ L taq DNA 聚合酶。扩增条件为:94℃预热 2 min \rightarrow 94℃变性 30 s \rightarrow 56℃~62℃退火 30 s(TGF- β 1 56℃, MMP-1 60℃, TIMP-1 62℃) \rightarrow 72℃延伸 1 min,进行 30 个循环。PCR 产物行凝胶电泳, β -actin 作内对照,用与 β -actin 的光密度比值对 mRNA 的表达进行半定量分析。

逆转录-聚合酶链反应中用来扩增的大鼠寡核苷酸引物是:TGF- β 1(324 bp) 正义:5'-GCC CTG GAC ACC AAC TAT TGC-3'; 反义:5'-GGA GCG CAC GAT CAT GTT GG-3'。MMP-1(251 bp) 正义:5'-GGT GGC CAG AAT AGC TGA ATG-3'; 反义:5'-GCG TTT TGA TAT GCC G-3'。TIMP1(900 bp) 正义:5'-ACC CAC AGA CGG CCT TCT GCA ATT G-3'; 反义:5'-GGC TAT CTG GGA CCG CAG GGA CTG G-3'。 β -actin(540 bp) 正义:5'-GTG GGC CGC TCA AGG CAC CAA-3'; 反义:5'-CTT TAG CAC GCA CTG TAG TTT CTC-3'。

1.5 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。检测方法用 Student's *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织形态学分析

光学显微镜下观察,7 天组、14 天组和 28 天组移植静脉的内膜明显增厚,可见大量迁移并增殖的 VSMC 和丰富的 ECM,内膜增厚处可见弹力纤维断裂的痕迹。计算机图像分析系统测量并计算内膜和血管壁的厚度,结果发现与对照组比较,7 天组内膜增生显著($P < 0.05$),并于术后 14 天达到高峰(表 1 及图 1, Table 1 和 Figure 1)。

表 1. 各组移植静脉内膜及管壁厚度的比较($\bar{x} \pm s$, μ m)

Table 1. Comparison of the intima and wall thickness of grafted veins

分 组	<i>n</i>	内膜厚度	管壁厚度
对照组	6	6.0 \pm 1.3	138.5 \pm 10.7
3 天组	6	7.2 \pm 2.1	142.2 \pm 18.4
7 天组	6	18.5 \pm 2.7 ^a	405.6 \pm 30.5 ^a
14 天组	6	45.2 \pm 4.8 ^a	389.4 \pm 35.8 ^a
28 天组	6	40.9 \pm 3.5 ^a	399.6 \pm 32.1 ^a

a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

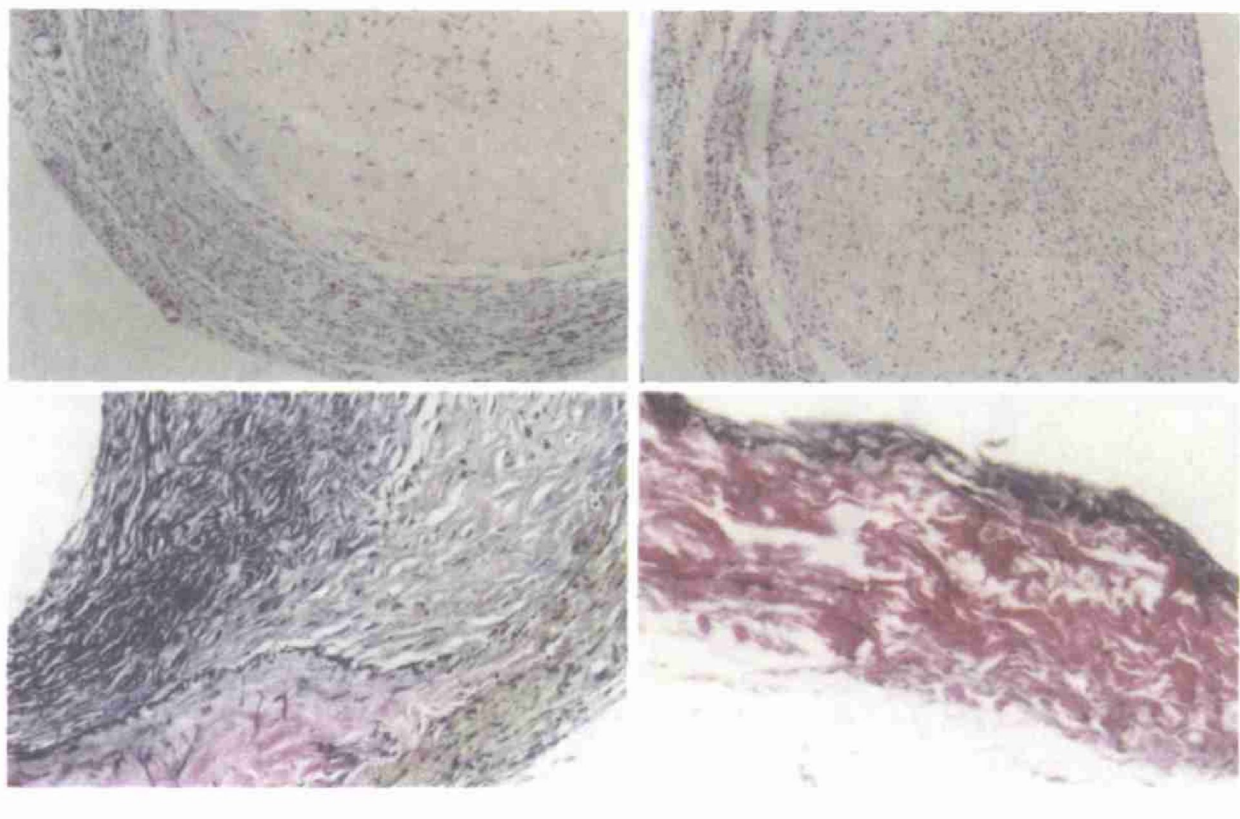


图 1. 光学显微镜下移植静脉在各时间段内膜增生的情况 A 为术后 7 天内膜增生伴血栓形成(HE, ×100), B 为术后 14 天内膜显著增厚(HE, ×100), C 为术后 28 天内膜增生明显(Verhoeff, ×200), D 为正常静脉内膜无增生(Verhoeff, ×200)。

Figure 1. The intimal hyperplasia of grafted veins at different time points

2.2 转化生长因子 β_1 、基质金属蛋白酶 1 及其抑制剂的蛋白表达

转化生长因子 β_1 (25 kDa) 的蛋白表达于术后 3 天即开始增高, 与对照组光密度比值为 1.59 ($t=21.887$, $P<0.05$); 于术后 7 天达到高峰, 与对照组的光密度比值为 2.39 ($t=27.135$, $P<0.05$); 术后 28 天回到基线水平。3 天组和 7 天组的 MMP-1 蛋白 (55 kDa) 与对照组的光密度比值分别为 1.05 和 0.99, 与对照组比较差异无显著性, 14 天组和 28 天组与对照组的光密度比值为 0.75 和 0.63, t 值分别为 7.217 和 9.155, 差异有显著性。TIMP-1 (28 kDa) 的蛋白表达在第 14 和 28 天明显增加(图 2, Figure 2)。

2.3 转化生长因子 β_1 、基质金属蛋白酶 1 及其抑制剂的 mRNA 表达

如图 3(Figure 3) 所示, 转化生长因子 β_1 mRNA 于术后 3 天开始增加, 7 天达高峰, 在第 14 天有所减少, 而在第 28 天回到基线水平。基质金属蛋白酶 1 mRNA 在 14 和 28 天表达减少; TIMP-1 mRNA 在第 14 和 28 天明显增加。

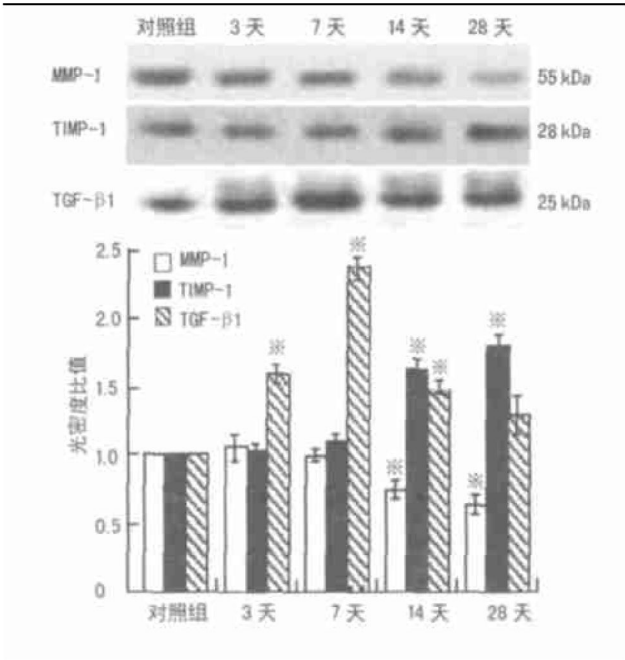


图 2. 在移植术后不同时间点的转化生长因子 β_1 、基质金属蛋白酶 1 及其抑制剂的蛋白表达 ※: $P<0.05$, 与对照组比较。

Figure 2. Protein expression of MMP-1, TIMP-1 and TGF- β_1 at different time points

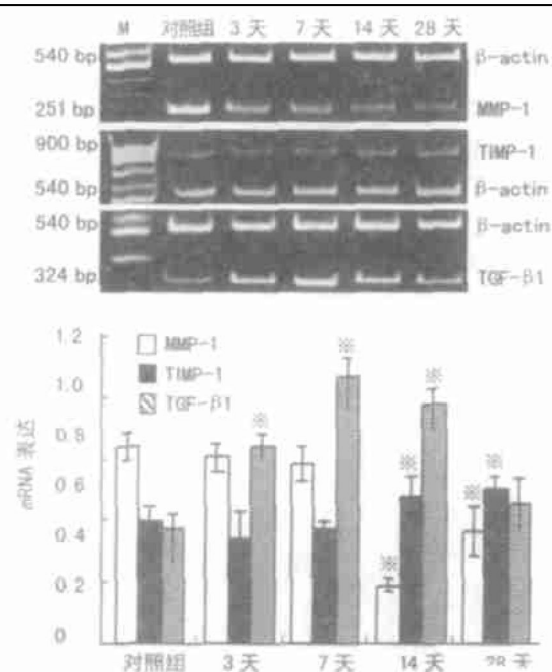


图3. 在移植术后不同时间点的转化生长因子 β 1、基质金属蛋白酶1及其抑制剂的蛋白表达 ※: $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 3. mRNA expression of MMP-1, TIMP-1 and TGF- β 1, at different time points

3 讨论

自体大隐静脉常被用于动脉硬化闭塞症下肢血管重建手术中,但术后移植静脉经常发生狭窄甚至闭塞。静脉移植物在动脉高压、吻合口血流状态改变的条件下,持续产生过量TGF- β 1,导致VSMC迁移、增殖,以及ECM过度沉积和组织纤维化^[3]。Schwartz等^[4]研究发现,在人类的再狭窄组织中,VSMC仅占新生内膜体积的11%,而其余剩下的为ECM。可见,ECM在再狭窄中起了很重要的作用。本实验主要探讨ECM的代谢及其与调控因素之间的变化。

正常情况下ECM处于合成与分解的动态平衡中,MMP/TIMP是主要的调节者之一^[1]。本实验证明,MMP-1在移植术后14和28天表达显著降低,而TIMP-1的表达在第14和28天明显增加。因此,MMP-1和TIMP-1之间的平衡被破坏,ECM的合成多于降解而过量沉积。正如组织形态学分析结果发现,术后14至28天也是内膜增生最明显的时期。

几种生长因子由于调节细胞增殖及ECM沉积,从而参与了血管壁重塑,TGF- β 1就是其中重要一员^[5]。TGF- β 1是一种多功能的生长因子,在许多纤维性疾病如肾脏及肝脏的纤维化中通过调控MMP和TIMP之间的平衡而发挥重要作用^[6]。本研究结果证明,TGF- β 1在移植术后3天表达即有明显升高,在术后一周达高峰。TGF- β 1的过度表达较MMP-1表达减少及TIMP-1表达出现的时间早。这也证明了TGF- β 1通过破坏MMP-1和TIMP-1表达之间的平衡,导致ECM过度沉积,内膜增生。TGF- β 1有可能成为阻止血管再狭窄病理过程的有效靶点。关于它在血管增生性疾病中的作用机理尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Mark DS, Zena W. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2001, **17**: 463-516
- [2] Hall MC, Young DA, Waters JG, Rowan AD, Chantry A, Edwards DR, et al. The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of TIMP-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem*, 2003, **278**: 10 304-313
- [3] Yanhua H, Andrew HB, Yiping Z, Andrew CN, Qingbo X. Local gene transfer of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 influences vein graft remodeling in a mouse model. *Arterio Throm Vasc Biol*, 2001, **21**: 1 275-280
- [4] Schwartz RS, Holmes DR, Topol EJ. The restenosis paradigm revisited: an alternative proposal for cellular mechanisms. *J Am Coll Cardiol*, 1992, **20**: 1 284-293
- [5] Topper JN. TGF-beta in the Cardiovascular system: Molecular mechanisms of a context-specific growth factor. *Trends Cardiovasc Med*, 2000, **10**: 132-137
- [6] Clouthier OE, Comerford SA, Hammer RE. Hepatic fibrosis, glomerulosclerosis, and lipodystrophy-like PEPCK-TGF-beta 1 transgenic mice. *J Clin Invest*, 1997, **100**: 2 697-713

(此文编辑 朱雯霞)