

动脉硬化闭塞症患者股动脉粥样硬化斑块中血小板源生长因子 A 链的表达

张立燕¹, 张大伟², 吴学君¹, 张精勇¹, 王瑞华¹, 金星¹

(1. 山东省立医院血管外科, 山东省济南市 250021; 2. 山东中医药大学附属医院周围血管科, 山东省济南市 250014)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉硬化闭塞症; 血小板源生长因子 A 链; 动脉粥样硬化斑块; 免疫组织化学; 血管平滑肌细胞

[摘要] 目的 探讨血小板源生长因子 A 链与动脉硬化闭塞症发生的关系。方法 应用免疫组织化学技术测定 31 例动脉硬化闭塞症患者股动脉粥样硬化斑块中血小板源生长因子 A 链的表达。结果 HE 染色显示动脉硬化闭塞症患者动脉壁内膜不完整甚至缺失, 平滑肌层细胞紊乱, 其内有大量泡沫细胞堆积。正常人动脉壁结构完整, 内膜光滑, 内皮下无脂质沉积, 平滑肌层细胞排列整齐。免疫组织化学检测结果发现动脉硬化闭塞症患者动脉壁粥样硬化斑块内细胞胞浆中血小板源生长因子 A 链呈强阳性表达, 而正常人动脉壁中血小板源生长因子 A 链仅在中膜有微量表达。结论 动脉硬化闭塞症患者动脉壁粥样硬化斑块中血小板源生长因子 A 链表达增高与动脉硬化闭塞症的发生有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Platelet-Derived Growth Factor-A in Atherosclerosis Plaque of Arteriosclerosis Obliterans Patient

ZHANG Li-Yan¹, ZHANG Da-Wei², WU Xue-Jun¹, ZHANG Jing-Yong¹, WANG Rui-Hua¹, and JIN Xing¹

(1. Department of Vascular Surgery, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021; 2. Department of Vascular Surgery, Affiliated Hospital of Shandong University of TCM, Jinan 250014, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Platelet-Derived Growth Factor-A; Immunohistochemistry; Smooth Muscle Cell; Arteriosclerosis Obliterans; Foam Cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship of platelet-derived growth factor (PDGF-A) and the pathogenesis of atherosclerosis (As), the expression of PDGF-A in atherosclerosis (As) plaque of arteriosclerosis obliterans (ASO) patient and normal arterial wall were studied. **Methods** The protein level and area of PDGF-A in As plaques and normal artery of human were studied by means of immunohistochemistry. **Results** The arterial wall of ASO patient wasn't smooth, and there were very few normal endothelial cell but a lot of foam cell. In contrast, the normal arterial wall was very perfect, endothelial cell and smooth muscle cell stood on line. The data of immunohistochemistry showed that the expression of PDGF-A was augmented significantly in As plaque of ASO patient. In contrast, in normal arterial wall the expression of PDGF-A was very low ($P < 0.01$).

Conclusions The data suggests that the increased expression of PDGF-A in As plaques of ASO related to the pathogenesis of ASO. PDGF-A play very important roles in the formation and progression of atherosclerosis.

动脉硬化闭塞症(arteriosclerosis obliterans, ASO)是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)病变在肢体血管的表现,而动脉中膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖是动脉粥样硬化病变的病理基础。SMC从动脉中膜向内膜下迁移并增殖的过程受多种因素的影响,其中各种生长因子起着重要的作用。以往国内外有关研究其对象多为动物或离体细胞,

本文以 ASO 患者的病变动脉为研究对象,通过检测血小板源生长因子 A 链(platelet-derived growth factor-A chain, PDGF-A)在 ASO 患者动脉壁 As 斑块中的表达,探讨其与 As 发生的关系。

1 对象与方法

1.1 对象及分组

实验组标本取自 ASO 截肢患者的股动脉,共 31 例,平均 72 ± 13 岁,男 19 例,女 12 例,其中合并高血压者 28 例,合并冠心病者 17 例,排除其他合并疾病,病例来自 2002 年 11 月~2004 年 10 月山东省立医院血管外科与山东中医药大学附属医院周围血管

[收稿日期] 2005-02-26

[修回日期] 2005-11-02

[作者简介] 张立燕,硕士,住院医师,研究方向为血管外科疾病临床与基础, E-mail 为 zhangliyanjin@126.com。张大伟,硕士,主治医师,研究方向为血管外科疾病临床与基础, E-mail 为 zhangdawei@126.com。金星,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向为血管外科疾病临床与基础, E-mail 为 jinxing@163.com。

科住院病人。对照组动脉标本取自外伤截肢患者的股动脉,共 10 例,平均 24 ± 8 岁,其中男 8 例,女 2 例,单纯外伤无其他合并疾病,病例来自 2002 年 11 月~2004 年 10 月山东省立医院创伤外科住院病人。

1.2 试剂

Rabbit Anti-PDGF-A、SABC 试剂盒、正常山羊血清封闭液、二抗(广谱)、DAB 显色剂和 SABC(链霉亲和素-过氧化物酶复合物)均购自北京中山生物工程公司。

1.3 HE 染色

动脉标本取下放入 4% 多聚甲醛固定 24 h 后,上行梯度酒精脱水,标本长期保存于 70% 酒精中备用。标本常规石蜡包埋切片,以备 HE 染色和免疫组织化学检测用。将标本石蜡切片,脱蜡至水,水洗后,浸染苏木素 10 min, 10% 盐酸酒精分化 10 s, 0.5% 氨水返蓝,浸染伊红 3~6 min,上行梯度酒精脱水,二甲苯透明后,中性树脂封片,显微镜下观察并照相。

1.4 免疫组织化学检验

免疫组织化学检验采用 SABC 法。将标本石蜡切片,脱蜡至水,放入枸橼酸钠抗原修复液中,微波修复 10 min,冷却至 40°C 度左右,滴加正常山羊血清封片 30 min,不洗,滴加 PDGF-A 单克隆抗体(工作液浓度为 1:200),置 4°C 湿盒过夜,依次滴加二抗、三抗,DAB 显色,上行梯度酒精脱水,二甲苯透明后中性树脂封片。两组均设对照标本用 PBS 代替一抗。免疫组织化学结果判断:阳性信号染色为棕黄色。 40×10 倍镜下,采用 IMAGE-PRO PLUS 图像系统(美国 Media Cybernetics 公司),对两组玻片进行图像分析,测定阳性染色的平均光密度与面积。

1.5 统计学处理

应用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用两组独立样本的 t 检验,以双侧 $P < 0.01$ 为检验标准。

2 结果

2.1 HE 染色结果

动脉硬化闭塞症患者动脉壁 As 斑块中血管内膜不完整甚至缺失,平滑肌细胞紊乱,其内有大量泡沫细胞堆积,并可见少量胆固醇结晶析出。正常人动脉壁结构完整,内膜光滑,内皮下无脂质沉积,平滑肌层细胞排列整齐(图 1)。

2.2 免疫组织化学检测结果

动脉硬化闭塞症患者动脉壁 As 斑块中 PDGF-A

染色呈强阳性,棕色阳性颗粒位于斑块内增殖的 SMC 胞浆中,以核周最明显。正常人动脉壁组织中 PDGF-A 染色呈弱阳性,仅见于动脉中膜的 SMC 核周胞浆中(图 2)。实验组和对照组平均光密度分别为 $(44.09 \pm 25.27) \times 10^{-5}$ 和 $(5.95 \pm 1.13) \times 10^{-5}$ ($P < 0.01$)。对照标本染色均呈阴性。

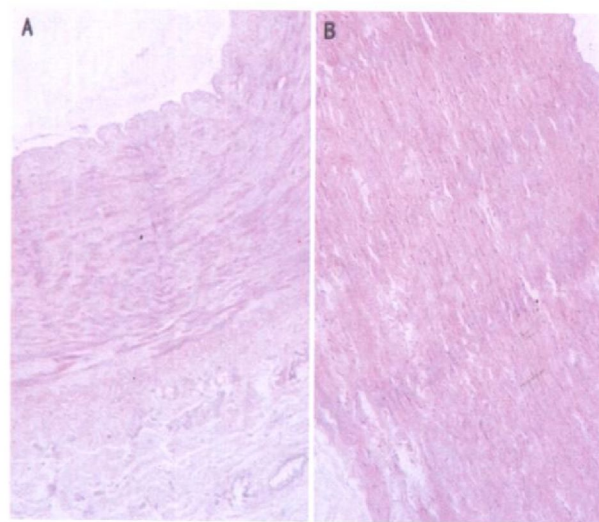


图 1. 动脉硬化闭塞症患者动脉壁和正常动脉壁 HE 染色结果($\times 4$ 镜) A 为动脉硬化闭塞症患者动脉壁 As 斑块, B 为正常动脉壁。

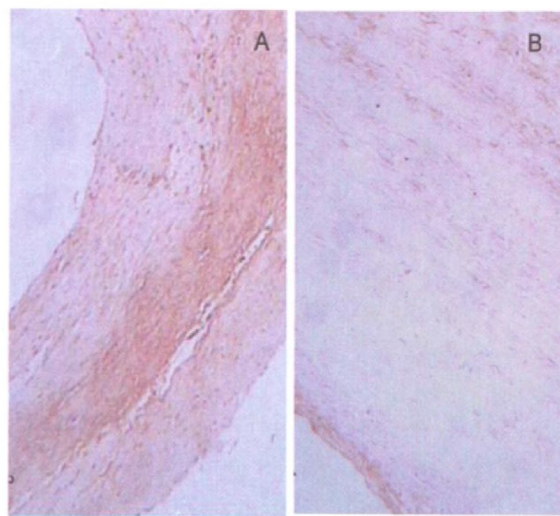


图 2. 动脉硬化闭塞症患者动脉壁和正常动脉壁血小板源生长因子 A 链表达($\times 4$ 镜) A 为动脉硬化闭塞症患者动脉壁 As 斑块, B 为正常动脉壁。

3 讨论

血小板源生长因子是由 A、B 两条链组成的 AB、AA、BB 三种二聚体构成,被认为是第一个具有趋化作用的生长因子,能刺激中膜 SMC 收缩表型(contractile phenotype)向合成表型(synthetic phenotype)转变并具增殖能力。机体的多种细胞有合成与

分泌 PDGF 的能力,如血小板、单核巨噬细胞、内皮细胞和血管平滑肌细胞等。正常情况下,PDGF-A 由 SMC 和受 IL-1 刺激的成纤维细胞分泌,而 PDGF-B 则主要由巨噬细胞和内皮细胞产生^[1]。在 As 发生过程中,各种原因所致的内皮受损和功能异常导致损伤的内皮细胞、激活的血小板、移行于内皮下的单核巨噬细胞以及表型转化后的合成型平滑肌细胞都能以自分泌和旁分泌形式释放大量的 PDGF,PDGF 与相应的细胞受体结合能促进大量单核细胞粘附、增殖及向内膜下迁移,促进内皮细胞、成纤维细胞、血管平滑肌细胞生长和增殖^[2],促进平滑肌细胞迁移,促进单核巨噬细胞、平滑肌细胞内吞脂质形成泡沫细胞,以及促进平滑肌细胞胆固醇合成、LDL 受体表达及细胞外基质沉积^[3]。PDGF-A 的产生主要是在血管内膜损伤增生时其 SMC 合成与分泌所致^[4]。

我们所取实验组标本为 ASO 患者截肢股动脉,全部标本均肉眼可见 As 斑块;对照组动脉标本取自外伤截肢患者的股动脉,全部标本肉眼见血管内膜光滑,均未见 As 斑块。HE 染色结果发现:ASO 患者动脉壁 As 斑块中血管内膜不完整甚至缺失,平滑肌细胞紊乱,其内有大量泡沫细胞堆积,并可见少量胆固醇结晶析出。正常人动脉壁结构完整,内膜光滑,内皮下无脂质沉积,平滑肌层细胞排列整齐。说明动脉随年龄的增长发生退行性变逐渐加重,内膜不断受到损害,内皮细胞屏障功能降低,抗凝物质减少,促凝物质增多,故容易发生动脉硬化闭塞症。

Sjölund 等^[5]发现,培养的动脉 SMC、内皮细胞 (endothelial cell, EC) 及未成年大鼠的动脉平滑肌中均有 PDGF 及其受体基因的表达,但成年大鼠动脉平滑肌细胞中无或仅有微量 PDGF 及其受体基因的表达,说明平滑肌细胞合成与分泌 PDGF 样物质的量与细胞的不同发育阶段、细胞表型及细胞是否受到机械损伤有关。从胚胎发育到成年, VSMC 要经历由合成表型到收缩表型的转换,正常成年机体的 VSMC 几乎皆为收缩表型,主要执行舒张和收缩功能,而在 As 的病理状态下, VSMC 发生表型转换,即收缩表型向合成表型转换。与此相应,平滑肌细胞的合成与分泌功能增强,分泌物包括大量的 PDGF

样物质。PDGF 与相应受体结合,促进大量单核细胞粘附,血管平滑肌细胞增殖、迁移,并在内膜下沉积,形成 As 斑块,进一步表现临床症状。本实验发现, ASO 患者动脉壁组织 As 斑块中 PDGF-A 染色呈强阳性,棕色阳性颗粒位于斑块内增殖的 SMC 的胞浆中,以核周最明显。正常人动脉壁组织中 PDGF-A 染色呈弱阳性,仅见于动脉中膜的平滑肌细胞核周胞浆中。与李静等^[6]通过原位杂交技术表明 As 斑块边缘区及新生斑块区平滑肌细胞内存在大量 PDGF-A mRNA 表达阳性颗粒的结果相一致。亦与 Parker 等^[7]与晋军等^[8]实验结果相符合。

以上结果发现:PDGF-A 在 ASO 患者动脉壁 As 斑块中较正常人动脉壁中表达增高,提示 ASO 患者动脉壁 As 斑块中 PDGF-A 表达增高与 ASO 的发生有关,进一步印证了 PDGF-A 与 As 的发生有密切的关系^[9,10]。但与 Rekhter 等^[11]和王伟等^[12]试验结果不相符,有待进一步进行探讨。

[参考文献]

- [1] 余漫. 血小板源生长因子及其受体的研究进展[J]. 国外医学生理·病理科学与临床分册, 1995, 15 (2): 98-101
- [2] Abedi H, Zachary I. Signalling mechanisms in the regulation of vascular cell migration[J]. Cardiovasc Res, 1995, 30 (4): 544-556
- [3] 武湘兵. 血小板源生长因子与疾病[J]. 国外医学生理·病理科学与临床分册, 1999, 19 (1): 54-57
- [4] 杨国君. 血小板源生长因子及其与动脉粥样硬化的关系[J]. 中国循环杂志, 1994, 9 (8): 497-499
- [5] Sjölund M, Hedin U, Sejesen Y. Arterial smooth muscle Cell express PDGF A chain mRNA, secrete a PDGF like mitogen, and bind exogenous PDGF in a phenotypic and growth state-dependent manner[J]. J Cell Biol, 1988, 106: 403-413
- [6] 李静, 陈可冀, 丁大成. 动脉粥样硬化斑块组织中血小板衍化生长因子基因表达的研究[J]. 中华心血管病杂志, 1995, 23 (6): 453-455
- [7] Parker SB, Dobrian AD, Wade SS. Am I Physiol Heart Circ[J]. Physiol, 2000, 278 (2): 613-622
- [8] 晋军. 血小板源生长因子在血管平滑肌细胞异常增殖中的作用[J]. 国外医学生理·病理科学与临床分册, 2001, 21 (4): 286-288
- [9] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis update[J]. N Engl J Med, 1986, 314: 488
- [10] Lamb DJ, Avades TY, Ferns GA. Endogenous neutralizing antibodies against platelet-derived growth factor-A inhibit atherogenesis in the cholesterol-fed rabbit[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001, 21 (6): 997-1003
- [11] Rekhter MD, Gordon D. Does platelet derived growth factor-A chain stimulate proliferation of arterial mesenchymal cell in human atherosclerotic plaques[J]. Circ Res, 1994, 75: 410-417
- [12] 王伟, 谭孝厚, 庄汉屏. 结合肝素的表皮样生长因子及血小板源生长因子 A 在动脉粥样硬化血管壁中的表达[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (3): 221-224

(此文编辑 朱雯霞)