

[文章编号] 1007-3949(2006)14-02-0111-04

• 实验研究 •

# 组织因子途径抑制物基因转移对血管平滑肌细胞迁移的影响

傅羽<sup>1</sup>, 尹新华<sup>1</sup>, 张一娜<sup>2</sup>, 李呼伦<sup>3</sup>, 周令望<sup>4</sup>(哈尔滨医科大学附属第二医院 1. 心血管内科, 2. 老年病科; 哈尔滨医科大学  
3. 神经生物学教研室, 4. 克山病研究所; 黑龙江省哈尔滨市 150086)

[关键词] 内科学; 血管成形术后狭窄的基因治疗; 逆转录聚合酶链反应; 组织因子途径抑制物; 血管平滑肌细胞; 基因转移; 细胞培养

[摘要] 目的 研究组织因子途径抑制物基因转移对兔血管平滑肌细胞迁移的影响, 探讨其抑制再狭窄的机制。方法 将含有人组织因子途径抑制物基因的重组腺病毒和含 $\beta$ -半乳糖苷酶基因的重组腺病毒在体外分别转染兔血管平滑肌细胞, 用 X-gal 染色法检测腺病毒的转染率, 用逆转录聚合酶链反应方法检测转染后平滑肌细胞中组织因子途径抑制物 mRNA 的表达, 于第 1、3、5 及 7 天用玻片法检测血管平滑肌细胞迁移距离。结果 感染指数为 100, 腺病毒的转染率可达到 95%; 基因转移后 3 天在血管平滑肌细胞中检测到组织因子途径抑制物 mRNA 的表达; 同一浓度下转染组织因子途径抑制物基因重组腺病毒组和对照组相比迁移距离显著减少 ( $P < 0.001$ ), 并具有浓度依赖性。结论 腺病毒具有较高的转染培养的血管平滑肌细胞的能力, 组织因子途径抑制物基因转移能够显著抑制体外培养的兔血管平滑肌细胞迁移, 并且这种抑制作用具有浓度依赖性。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

## Effect of Tissue Factor Pathway Inhibitor Gene on the Migration of Vascular Smooth Muscle Cell

FU Yu, YIN XinHua, ZHANG YiNa, LI HuLun, and ZHOU LingWang

(Department of Cardiology, the Second Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

[KEY WORDS] Tissue Factor Pathway Inhibitor; Vascular Smooth Muscle Cell; Gene Transfer; Cell Culture; Migration; Restenosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of tissue factor pathway inhibitor (TFPI) gene transfer on the migration of vascular smooth muscle cell and the mechanism of its inhibition on the restenosis. **Methods** Human tissue factor pathway inhibitor recombinant adenovirus and LacZ recombinant adenovirus were used to infect rabbit aortic vascular smooth muscle cell respectively in vitro. The transfection efficiency was examined by X-gal staining. The exogenous tissue factor pathway inhibitor gene expression in transfected cell was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and its effect on migration was tested with slide method. **Results** When multiplicity of infection was 100, the transfection efficiency was 95 percent. Expression of tissue factor pathway inhibitor mRNA was detected in TFPI gene transfected vascular smooth muscle cell at 3rd day after gene transfer. At the same concentration, the migration distances were remarkably reduced in tissue factor pathway inhibitor gene transfected groups compared with the control group ( $P < 0.001$ ), and had a dependence of concentrations.**Conclusions** Adenovirus has a higher transfection efficiency on the cultured vascular smooth muscle cell. Tissue factor pathway inhibitor gene transfer mediated by adenovirus can greatly inhibit the migration of cultured rabbit vascular smooth muscle cell and have a dependence of concentration.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 从血管中膜向内膜迁移是经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 后再狭窄形成过程中最具特征性的生物学事件之一, 因此 VSMC 迁移在再狭窄的发生中发挥了重要的作用<sup>[1]</sup>。已有报道许多生长因子和一些凝血

因子能够刺激 VSMC 迁移<sup>[1,2]</sup>。Sato 等<sup>[3]</sup>证明组织因子 (tissue factor, TF) / 因子 a (F a) 复合物是一个很强的 VSMC 趋化因子。

组织因子途径抑制物 (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) 是一种 Kunitz 型蛋白酶抑制剂, 通过形成 TFPI / F a / F a / TF 复合物抑制 FXa 和 TF / a 复合物, 调节 TF 的活性, 发挥抗凝、抗血栓作用。我们的前期工作已经证明 TFPI 基因转移能够明显减少血管成形术后新生内膜增厚、抑制血栓形成、减轻血管重塑和管腔再狭窄<sup>[4]</sup>。TFPI 对 VSMC 迁移的抑制作用国内尚未见相关报导。本研究将 TFPI 重组腺病毒 (Ad-TFPI) 转染体外培养的兔 VSMC, 观察外

[收稿日期] 2005-04-30 [修回日期] 2005-11-25

[基金项目] 黑龙江省自然科学基金 (D00-20) 和黑龙江省教育厅海外学人资助 (1053HQ021)

[作者简介] 傅羽, 硕士, E-mail 为 fuyu1004@yahoo.com.cn。尹新华, 博士后, 教授, 博士研究生导师, 主要从事再狭窄基因治疗研究, E-mail 为 harbin0910@yahoo.com。张一娜, 教授, 博士研究生导师, 主要从事心血管疾病的基因治疗。

源性 TFPI 基因对 VSMC 迁移的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

DMEM 培养基 (Hycloned); 优级胎牛血清 (灏洋生物);  $\alpha$  型胶原酶 (Sigma); X-gal 染液 (上海华舜生物公司); Trizol (Invitrogen); 聚合酶链反应试剂盒和逆转录试剂盒 (Promega); LacZ 重组腺病毒 (Ad-LacZ, 滴度为  $5 \times 10^{10}$  pfu/L) 和 TFPI 引物均由尹新华教授提供。

### 1.2 组织因子途径抑制物重组腺病毒载体的构建

将目的基因片断入 TFPI 插入到 pAdE1CMV 质粒中, 连接成 pAdCMV-TFPI 重组质粒, 以此质粒与质粒 pJM17 共转染 293 细胞, 筛选并克隆复制缺陷型重组腺病毒载体, 经 293 细胞扩增得到病毒颗粒, 经鉴定正确后进行扩增, 扩增后病毒滴度为  $5 \times 10^9$  pfu/L。

### 1.3 兔主动脉平滑肌细胞的培养

原代 VSMC 培养采用胶原酶消化法。用 2 周龄日本雄性大耳兔, 取胸主动脉, 去掉内层和外层, 将中膜用 0.2%  $\alpha$  型胶原酶消化, 用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养, 取第 3~5 代用于实验。

### 1.4 LacZ 重组腺病毒转染血管平滑肌细胞效率的测定

在 24 孔培养板中每孔接种  $5 \times 10^4$  个 VSMC, 生长占底面积 70%~80% 时弃掉培养基, 分别转染感染指数 (multiplicity of infection, MOI) 为 25、50、100、200 的 Ad-LacZ 病毒液, 37 °C 培养箱中吸附 2 h, 每 15 min 摇 1 次, 用 PBS 洗 3 次后继续培养; 培养 48 h 后弃培养基, 4 °C 固定细胞 2 h, PBS 洗固定液 3 次; 每孔加 X-gal 染液 0.5 mL [K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mmol/L, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, X-gal 1 g/L], 37 °C 染色 6 h 至过夜, 镜下观察每组细胞的转染效率并照相。

### 1.5 血管平滑肌细胞迁移距离的测定

参照 Sarkar 等<sup>[5]</sup>建立的玻片法进行。将盖玻片做好标记后置于 12 孔板中, 每孔接种  $5 \times 10^4$  个 VSMC 进行培养, 细胞长满玻片后再以无血清的 DMEM 培养基培养 24 h, 取出盖玻片, 在显微镜下用无菌刀片将盖玻片上的 VSMC 沿直线刮除一侧, 放到新的 12 孔培养板中, 分别转染不同浓度 Ad-TFPI (50、100 及 200 MOI)、Ad-LacZ (50、100 及 200 MOI) 和 PBS, 每组设 3 个复孔, 37 °C 吸附 2 h, 每 15 min 轻摇

1 次, 然后吸去培养基, 用 PBS 洗 3 次, 加入含 20% FCS 的 DMEM 培养基继续培养。转染后 1、3、5、7 天分别在显微镜下观察细胞迁移情况, 以测定迁移最远的 VSMC 细胞核至刮线边缘的距离作为 VSMC 的迁移距离。每组观察 10 个视野, 取均值。

### 1.6 组织因子途径抑制物基因表达的检测

用 MOI 为 100 的 Ad-TFPI、Ad-lacZ 转染 VSMC, 3 天后提取细胞总 RNA, 行逆转录聚合酶链反应扩增。采用 Trizol 法提取细胞总 RNA。取 5  $\mu$ L 总 RNA, 加 4  $\mu$ L 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、2  $\mu$ L 10 $\times$  Buffer、2  $\mu$ L dNTP (Mix)、0.5  $\mu$ L RNasin、0.7  $\mu$ L AMV 酶、1  $\mu$ L Oligo (dT) 引物, 加水补足至 20  $\mu$ L, 按下列条件行逆转录反应: 42 °C 水浴 40 min, 95 °C 水浴 5 min。反应结束后取逆转录产物 5  $\mu$ L 用于聚合酶链反应扩增 TFPI 目的基因, 反应条件: dNTP 1.6  $\mu$ L, 10 $\times$  Buffer 2  $\mu$ L, Taq 酶 0.1  $\mu$ L, 上游引物 0.5  $\mu$ L, 下游引物 0.5  $\mu$ L, 补水至 20  $\mu$ L, 按下列条件行聚合酶链反应: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 27 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。取 5  $\mu$ L 聚合酶链反应产物上样于 2% 琼脂糖凝胶上进行电泳分析, 100 mV, 45 min。凝胶图像处理系统摄片保存。TFPI 基因引物序列: 上游引物为 5'-CCITTTTACATGCCCTCAG-3', 下游引物为 5'-GAACATTTGTGAAGATGGTCC-3'。

### 1.7 统计学处理

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 对所获得的结果进行方差分析。

## 2 结果

### 2.1 LacZ 重组腺病毒转染血管平滑肌细胞的效率

当 MOI 为 100 时, 95% 的 VSMC 被转染 (表 1)。图 1 显示的是 Ad-LacZ 转染率为 100% 时的图像, 可见 VSMC 均被染成蓝色。

表 1. LacZ 重组腺病毒转染率

感染指数	转染率
25	40%
50	80%
100	95%
200	100%

### 2.2 组织因子途径抑制物基因的表达

用 Ad-TFPI 转染的 VSMC 在 300 bp 处出现特异性条带, 而用 Ad-LacZ 转染的 VSMC 和加入 PBS 的

VSMC 均未见特异性条带(图 2)。



图 1. LacZ 重组腺病毒转染血管平滑肌的 X-gal 染色 ( $\times 100$ , MOI 为 200)

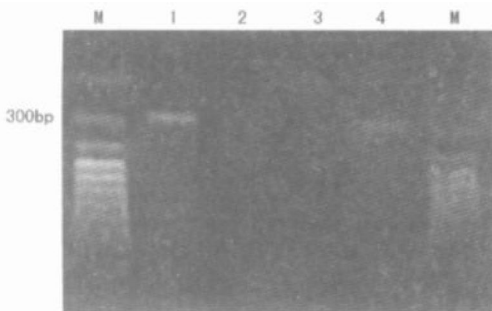


图 2. 组织因子途径抑制物表达的检测 1 为 AdTFPI 转染的血管平滑肌细胞, 2 为 AdLacZ 转染的血管平滑肌细胞, 3 为 PBS 对照的血管平滑肌细胞, 4 为 pcDNA3.1-TFPI, M 为 Marker。

### 2.3 重组腺病毒对平滑肌细胞迁移距离的影响

在同一浓度下, AdTFPI 组的迁移距离明显少于 AdLacZ 组和 PBS 组 ( $P < 0.001$ ), 随 AdTFPI 浓度的增加其对迁移的抑制作用增强(表 2)。

## 3 讨论

目前治疗 PTCA 术后再狭窄主要包括物理技术、药物治疗和基因治疗。通过转基因方法抑制 VSMC 迁移, 从而干预血管内膜增殖、新生内膜形成和血管重构, 是治疗 PTCA 术后再狭窄和防治动脉硬化的新方向。目前研究表明 TFPI 在预防血栓形成、溶栓后血管再闭塞及 PTCA 术后再狭窄方面具

表 2. 重组腺病毒对血管平滑肌细胞迁移距离的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{m}$ )

分 组	1 天	3 天	5 天	7 天
PBS	747 $\pm$ 19	955 $\pm$ 21	1154 $\pm$ 34	1397 $\pm$ 24
AdTFPI				
50 MOI	393 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	552 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	703 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	890 $\pm$ 17 <sup>a</sup>
100 MOI	298 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	448 $\pm$ 28 <sup>a</sup>	605 $\pm$ 23 <sup>a</sup>	772 $\pm$ 26 <sup>a</sup>
200 MOI	207 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	380 $\pm$ 18 <sup>a</sup>	476 $\pm$ 20 <sup>a</sup>	699 $\pm$ 19 <sup>a</sup>
AdLacZ				
50 MOI	692 $\pm$ 13 <sup>b</sup>	897 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	1084 $\pm$ 45 <sup>b</sup>	1379 $\pm$ 19
100 MOI	681 $\pm$ 15 <sup>b</sup>	880 $\pm$ 17 <sup>b</sup>	1054 $\pm$ 37 <sup>b</sup>	1355 $\pm$ 29 <sup>b</sup>
200 MOI	645 $\pm$ 18 <sup>b</sup>	845 $\pm$ 25 <sup>b</sup>	1029 $\pm$ 23 <sup>b</sup>	1313 $\pm$ 34 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.001$ , 与 PBS 及 AdLacZ 组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 PBS 组比较。

有广阔的应用前景。

在细胞培养实验中已经证明 TF/F $\alpha$  复合物对于 VSMC 的迁移很关键<sup>[6]</sup>。TFPI 是 TF 的唯一生理抑制物, 其结构包括三个 Kunitz 结构域。TFPI 通过 F $\alpha$  形成 TFPI/F $\alpha$ /F $\alpha$ /TF 四位体复合物抑制病变部位的 TF/F $\alpha$ , 从而抑制外源性凝血途径。较高水平的 TFPI 能够在无 F $\alpha$  的情况下抑制 TF/F $\alpha$  复合物。Sato 等<sup>[3,7,8]</sup> 也报道 TFPI 可能通过 TF/F $\alpha$  复合物的途径抑制 VSMC 迁移。

为了研究 TFPI 基因对 VSMC 迁移的抑制作用, 构建 AdTFPI 并将其转染体外培养的兔 VSMC。目前研究者多采用 Boydon 小室方法检测 VSMC 的迁移及不同因素对 VSMC 迁移的影响<sup>[9]</sup>, 此方法需要特殊的培养器皿和经胶原处理的滤膜, 操作复杂。本实验采用 Sarkar 建立的玻片法<sup>[5]</sup> 检测 AdTFPI 对 VSMC 迁移距离的影响, 结果发现转染 TFPI 基因组 VSMC 的迁移距离明显小于未转染组 ( $P < 0.001$ ), 并有明显的浓度依赖性。实验中 AdTFPI 转染的 VSMC 迁移的距离小于 AdLacZ 转染的 VSMC, 说明 AdTFPI 对 VSMC 迁移的抑制不是腺病毒本身的毒性作用, 而主要是 TFPI 基因的作用。

有关外源性 TFPI 基因表达抑制 VSMC 迁移的机制尚不甚明了。Hasenstab 等<sup>[10]</sup> 证明在体外和体内过度表达 TF 的 VSMC 的迁移较对照组快, 并推论 TF 表达能够以自分泌的方式直接促进迁移。Hasenstab 等曾设想 TF 在体内通过凝血—依赖和凝血—非依赖机制促进迁移, 后者可能包括细胞内信号传递途径。尽管 TF/F $\alpha$  介导的 VSMC 迁移的机制仍未被证实, 但 Sato 等<sup>[3]</sup> 研究提示一种可能性, 即 TF/F $\alpha$  复合物除了激活 FX、FIX 和凝血酶外可能还激

活一些未知的底物。推测对 TF 的抑制作用可能在血管重建中发挥多因素的效应。VSMC 迁移之初要求细胞外基质复合物的不断降解,而参与基质降解的酶主要是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP),而 TFPI 对此有调节作用。Kopp 等<sup>[11]</sup>研究发现无论在体内和体外,转染 TFPI 基因的 VSMC 中自体的单核细胞趋化蛋白 1 活性降低,而体内血管壁中 MMP-2 mRNA 和抗原表达减少证明球囊损伤的血管转染 TFPI 后其基质的降解减少。因此,TFPI 可能通过减低由 MMP 来介导的 VSMC 迁移活性从而抑制 VSMC 的迁移。

腺病毒载体具有高传染性,可转染增殖和非增殖细胞,携带基因大、滴度高,为心血管疾病基因转移和基因治疗的较理想载体。本研究结果发现当 MOI 为 100 时 Ad-LacZ 的转染率可达 95%。Atsuchi 等<sup>[12]</sup>研究发现,在动脉中转染 Ad-TFPI 后 1~2 天仅能产生中等量的 TFPI,但转染后 3 天动脉中 TFPI 增加了 5 倍。而且值得注意的是,在基因转移后 25 天仍可检测到 TFPI 的表达。

本实验结果表明 TFPI 基因的表达能显著抑制 VSMC 迁移,但其机制仍在研究中。这支持体内应用 TFPI 基因防治动脉粥样硬化和 PTCA 术后再狭窄的可行性,也为血管病变的防治提供了新思路。

#### [参考文献]

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, **362** (6423): 801-809
- [2] Gasic GP, Arenas CP, Gasic GJ. Coagulation factors X, Xa, and protein S as

potent mitogens of cultured aortic smooth muscle cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (6): 2 317-320

- [3] Sato Y, Kataoka H, Asada Y, Marutsuka K, Kamikubo Y, Koono M, et al. Overexpression of tissue factor pathway inhibitor in aortic smooth muscle cells inhibits cell migration induced by tissue factor/factor a complex[J]. *Thromb Res*, 1999, **94** (6): 401-406
- [4] Xinhua Yin, Chikao Yutani, Yoshihiko Ikeda, Keiichi Enjyoji, Hatsue Ishibashi Ueda, Satoshi Yasuda, et al. Tissue factor pathway inhibitor gene delivery using HVJ-AVE liposomes markedly reduces restenosis in atherosclerotic arteries[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, **56** (3): 454-463
- [5] Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, Gordon D, Clinton R. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 1996, **78** (2): 225-230
- [6] Siegbahn A, Johnell M, Rorsman C, Ezban M, Heldin CH, Ronnstrand L. Binding of factor a to tissue factor on human fibroblasts leads to activation of phospholipase C and enhanced PDGF-BB-stimulated chemotaxis[J]. *Blood*, 2000, **96** (10): 3 452-458
- [7] Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. Tissue factor induces migration of cultured aortic smooth muscle cells[J]. *Thromb Haemost*, 1996, **75** (3): 389-392
- [8] Sato Y, Asada Y, Marutsuka K, Hatakeyama K, Kamikubo Y, Sumiyoshi A. Tissue factor pathway inhibitor inhibits aortic smooth muscle cell migration induced by tissue factor/factor a complex[J]. *Thromb Haemost*, 1997, **78** (3): 1 138-141
- [9] 顾有虎, 侯英萍, 李焰, 乔宏庆. 血小板源生长因子 $\beta$ 受体反义寡核苷酸对血小板源生长因子诱导大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 394-397
- [10] Hasenstab D, Lea H, Hart C, Lok S, Clowes AW. Tissue factor overexpression in rat arterial neointima models thrombosis and progression of advanced atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2000, **101** (22): 2 651-657
- [11] Koop CW, Holzenbein T, Steiner S, Marculescu R, Bergmeister H, Seidinger D, et al. Inhibition of restenosis by tissue factor pathway inhibitor: in vivo and in vitro evidence for suppressed monocyte chemoattraction and reduced gelatinolytic activity[J]. *Blood*, 2004, **103** (5): 1 653-661
- [12] Atsuchi N, Nishida T, Marutsuka K, Asada Y, Kamikubo Y, Takeshita A, et al. Combination of a brief irrigation with tissue factor pathway inhibitor (TFPI) and adenovirus-mediated local TFPI gene transfer additively reduces neointima formation in balloon injured rabbit carotid arteries[J]. *Circulation*, 2001, **103** (4): 570-575

(此文编辑 文玉珊)