

血小板源生长因子对大鼠血管平滑肌细胞表达血管细胞粘附分子 1 的影响

于悦卿, 史英钦, 郭文潮, 余小平, 郝玉宾

(河北省人民医院遗传研究室, 河北省石家庄市 050051)

[关键词] 病理学与病理生理学; 炎症反应; 血小板源生长因子; 血管平滑肌细胞; 血管细胞粘附分子 1; 单核细胞

[摘要] 目的 本实验研究血小板源生长因子对血管平滑肌细胞表达血管细胞粘附分子 1 的影响以及对血管平滑肌细胞与单核细胞粘附的作用。方法 利用基因芯片和 RT-PCR 技术检测鼠主动脉血管平滑肌细胞经血小板源生长因子处理 0 min、20 min、6 h 后血管平滑肌细胞表达血管细胞粘附分子 1 的 mRNA 表达变化; 细胞粘附实验观察血管平滑肌细胞经血小板源生长因子分别处理 0 min、20 min、6 h 后与单核细胞粘附情况。结果 血小板源生长因子对鼠血管平滑肌细胞表达血管细胞粘附分子 1 的表达有显著的诱导作用, 其诱导作用在 20 min 即已出现 ($P < 0.05$), 6 h 时明显增强 ($P < 0.01$)。细胞粘附实验显示随着血小板源生长因子的作用时间的延长, 血管平滑肌细胞与单核细胞的粘附率增高, 血小板源生长因子处理 20 min 和 6 h 后粘附率是对照组的 1.92 倍和 3.04 倍 ($P < 0.05$)。结论 血小板源生长因子明显诱导血管平滑肌细胞中血管平滑肌细胞表达血管细胞粘附分子 1 的表达, 促进血管平滑肌细胞与单核细胞的粘附, 从而参与了损伤早期, 白细胞向内膜下迁移的炎症反应。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Platelet-derived Growth Factor on Expression of Vascular Cell Adhesion Molecular 1 in Vascular Smooth Muscle Cell

YU Yue-Qing, SHI Ying-Qin, GUO Wen-Chao, YU Xiao-Ping, and HAO Yu-Bin

(The Research Institution of Heredity, Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang, 050051, China)

[KEY WORDS] Inflammatory Reaction; Platelet Derived Growth Factor; Vascular Smooth Muscle Cells; Vascular Cell Adhesion Molecular; Monocyte

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of platelet derived growth factor (PDGF) on the expression of vascular cell adhesion molecular 1 (VCAM-1) and the adhesion of monocyte-VSMC. **Methods** GEArray Gene Array and RT-PCR technique were used to analyse the mRNA expression of VCAM-1 in VSMC after incubated with PDGF for 0 min, 20 min, 6 h. Meanwhile, the adhesion of monocyte-VSMC was detected by adhesion assay. **Results** The mRNA expression of VCAM-1 was significantly induced by PDGF, as compared with control group. PDGF-induced VCAM-1 accumulation was appeared at 20 min, and significantly increased at 6 h. PDGF also enhanced the adhesion rate of monocyte and VSMC. **Conclusions** The results demonstrated that PDGF significantly induced the expression of VCAM-1 in VSMC and enhanced monocyte bind to VSMC. This suggested that PEGF played an important role in early injured lesion and contribution to monocytes in circulation adhesion and migration across the endothelium.

再狭窄是经皮腔内冠状动脉成形术(percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA)后最常见的并发症, 目前尚缺乏有效的防治措施。PTCA 对血管内膜、甚至对中膜造成一定损伤后, 白细胞引起的炎症反应对再狭窄的发生起了促进作用。Danenbergl^[1]证实在新生内膜内, 巨噬细胞显著增多, 并且表达多种生长因子、细胞因子和酶, 参与新生内

膜的形成。白细胞跨内皮迁移至血管壁间隙是引起组织损伤和炎症反应的必要步骤, 而血管细胞粘附分子 1 (vascular cell adhesion molecular, VCAM-1) 在介导此过程中起了重要的作用。VCAM-1 的表达水平受许多因素调节, 如白细胞介素-1 β 、肿瘤坏死因子和血管紧张素 α 。血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)是一种重要的促细胞分裂剂和趋化剂, 在再狭窄的形成中起了重要的作用, 可由血小板释放和血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)“自分泌”产生。本实验研究 PDGF 对鼠主动脉 VSMC 与单核细胞粘附的影响及 VSMC 分泌 VCAM-1 的变化, 为再狭窄的发病机制和

[收稿日期] 2007-04-02 [修回日期] 2007-10-06

[作者简介] 于悦卿, 硕士, 检验技师, 研究方向为临床检验, 联系电话为 0311-8598007 或 13933079538, E-mail 为 qqyu03@yahoo.com.cn。史英钦, 学士, 副主任药师, 研究方向为临床药学, 联系电话为 0311-8598007, E-mail 为 sinashiyingqinfx.com.cn。通讯作者郝玉宾, 博士, 主任检验师, 研究方向为疾病基因诊断, 联系电话为 0311-8598704, E-mail 为 ybhao2001@yahoo.com.cn。

治疗提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

SD大鼠由河北省实验动物中心提供, PDGF 购自 Oncogene 公司, 基因芯片购自美国 SuperArray 公司, PCR 引物由上海生物工程公司合成。

1.2 血管平滑肌细胞培养

取5周龄雄性SD大鼠, 取胸腹主动脉, 按贴块法分离、培养 VSMC。运用免疫组化特异性抗鼠 α -actin 抗体鉴定 VSMC。0.25% 胰蛋白酶消化传代, 取4~8代细胞进行实验。

1.3 基因芯片检测

培养的 VSMC 生长至100%融合时, 换成1%新生小牛血清培养基培养24 h, 使细胞同步于G₀期。分别加入15 μ g/L PDGF^[2]作用0 min、20 min和6 h。从上述时间点的 VSMC 中提取总RNA, 以此为模板, 以Oligo(dT)7为引物, 按照 SuperArray 的反转录试剂盒说明书合成cDNA。得到的cDNA经过线性聚合酶反应(linear polymerase reaction, LPR)转录合成反义RNA, 同时加入生物素标记的dUTP, 合成探针。

将变性鲑精DNA以100 mg/L浓度加入至60℃预热的杂交液中, SuperArray 尼龙膜60℃预杂交1.5 h; 弃预杂交液, 将探针加入杂交管中, 60℃杂交过夜; 高张、低张洗液各洗两次, 每次15 min。用封闭液Q进行膜封闭40 min。加入含有链亲和素偶联的碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)的结合缓冲液, 孵育10 min。再次洗膜后, 加入CDP-Star 化学发光底物至杂交管中, 室温孵育2 min。将杂交膜沥干后, 用X-射线胶片曝光。用扫描仪扫描胶片上的图象, 转换为灰度TIFF格式的图片。运用 ScanAlyze 软件(SuperArray 公司提供) 分析结果。

1.4 RT-PCR 检测结果

培养的 VSMC 生长至100%融合时, 细胞同步于G₀期后, 采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法分别从PDGF处理0 min、20 min和6 h的 VSMC 中提取总RNA。以上述RNA为模板, 反转录合成cDNA。以cDNA为模板, 分别加入大鼠VCAM1 cDNA上下游引物: 上游引物为5'-CGG TCA TGG TCA AGT GTT TG-3'; 下游引物为5'-GAG ATC CAG GGG AGA TGT CA-3'。VCAM cDNA扩增片段长度570 bp。以大鼠 β -actin为内参照。按照PCR Kit说明书进行PCR。取RT-PCR产物在1.5%琼脂糖凝胶(上电泳, 用UVP凝胶图像成像系统拍摄, 并用凝胶图像分析系

统(Gel-Pro Analyzer Version 3.0)分析结果。

1.5 单核细胞的分离

无菌取抗凝血, 加等量D-Hanks液稀释。小心缓慢加在淋巴细胞分离液上, 离心。小心吸取中间淋巴细胞层, 加D-Hanks液混匀后离心, 将上清弃掉, 洗涤两次, 弃上清。加入1640(含20%胎牛血清), 转至培养瓶, 培养约2 h后, 弃悬浮细胞, 继续加入1640培养单核细胞。

1.6 单核细胞-血管平滑肌细胞黏附实验^[3,4]

将传代培养的VSMC接种于96孔板, 待细胞生长至80%融合时, 换成含1%的新生小牛血清培养基培养过夜。之后, 将VSMC与15 μ g/L PDGF分别孵育0 min、20 min和6 h后, 弃培养液, 用D-Hanks液洗涤细胞2次。用培养液将单核细胞稀释成 5×10^9 /L的细胞悬液, 混匀, 取100 μ L加入生长有VSMC的96孔板中。使VSMC与单核细胞粘附2 h后, 弃孔内液体, 用37℃预温的生理盐水洗去未粘附的单核细胞。每孔加入2%刚果红100 μ L, 室温染色20 min, 弃染液, 生理盐水洗2次, 加PBS-乙醇液脱色后, 用酶标仪于570 nm测定各孔OD值。设VSMC孔和单核细胞孔为对照。每组实验设3复孔, 每一实验重复3次。粘附率的计算方法为:

$$\text{粘附率} = \frac{\text{实验组 OD 值} - \text{VSMC 对照组 OD 值}}{\text{单核细胞对照组 OD 值}} \times 100\%$$

1.7 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 统计结果以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血小板源生长因子明显促进体外培养大鼠主动脉血管平滑肌细胞中血管细胞粘附分子1 mRNA的表达

基因芯片试验结果, 用15 μ g/L的PDGF作用VSMC 20 min和6 h后, 与对照组相比, VCAM-1的mRNA含量明显增加(软件GEArray Analyzer分析数据为: 0 min处理组为0.11, 20 min处理组为0.577, 6 h处理组为1.06)。20 min组的为对照组的5.25倍, 6 h组是对照组9.64倍。(图1)

RT-PCR显示: PDGF分别培养VSMC 20 min和6 h后, RT-PCR检测VCAM-1的mRNA表达变化, 经Gel-Pro Analyzer Version 3.0分析(PDGF作用0 min、20 min和6 h, 数据分别为 0.12 ± 0.06 、 0.36 ± 0.10 和 0.70 ± 0.14), PDGF培养VSMC 20 min, VCAM-1 mRNA表达是对照组的3.00倍, 6 h组是对照组5.83

倍,其结果与基因芯片一致(图2)。

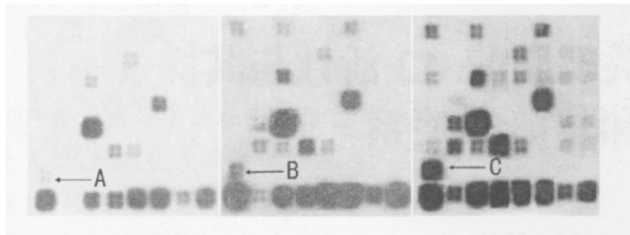


图1. 基因芯片检测结果 箭头A、B、C分别为血小板源生长因子作用0 min、20 min、6 h的VCAM-1 mRNA含量。

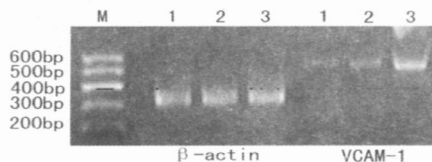


图2. RT-PCR检测结果 M为maker; 1~3分别为血小板源生长因子作用0 min、20 min、6 h的mRNA含量。

2.2 血小板源生长因子提高单核细胞与血管平滑肌细胞粘附

血小板源生长因子(PDGF)作用VSMC 0 min, 20 min和6 h后,可看到随着PDGF作用时间的延长,VSMC与单核细胞的粘附增强(0 min, 20 min和6 h的粘附率分别为 $0.07\% \pm 0.01\%$ 、 $0.14\% \pm 0.03\%$ 和 $0.22\% \pm 0.03\%$)。20 min组、6 h组的粘附率分别为对照组的1.92倍、3.04倍,差异有显著性($P < 0.05$,表1)。

表1. 血小板源生长因子作用不同的时间对单核细胞与血管平滑肌细胞粘附的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

分 组	粘 附
0 min	$0.07\% \pm 0.01\%$
20 min	$0.14\% \pm 0.03\%^a$
6 h	$0.22\% \pm 0.03\%^b$

a为 $P < 0.05$,与0 min组比较; b为 $P < 0.01$,与0 min组比较。

3 讨论

经腔内冠状动脉成形术后,由于机械性损伤,导致内膜的完整性被破坏,引起血小板在损伤处聚集,随后巨噬细胞和白细胞向内膜入侵,表达和释放多种生长因子和细胞因子,使VSMC表型转化、向内膜迁移、增殖等促成了再狭窄的发生^[5,6]。可见损伤引起的炎症反应是再狭窄的启动因素。

白细胞跨内皮迁移至血管壁间隙是炎症反应的必要步骤,这一过程受许多趋化因子的影响,其中

VCAM-1是一种重要的细胞粘附分子,又称可诱导性细胞粘附分子,可因细胞因子的诱导而高水平地表达。VCAM-1的受体是整合蛋白 $\alpha 4\beta 1$ 和 $\alpha 4\beta 7$ 。实验表明,动脉内皮下间隙的单核细胞量与血管壁VCAM-1表达呈正相关^[7]。VSMC中VCAM-1的表达与内膜中巨噬细胞的含量显著关联^[8]。由此可见,在损伤后,炎症反应中VCAM-1可能起重要作用。

血小板源生长因子(PDGF)在血管重建和动脉粥样硬化的形成中起着重要的作用,它能有效地诱导VSMC表型转化,迁移和增殖^[9]。PDGF对VSMC表达VCAM-1以及VSMC与单核细胞粘附的影响,目前尚未见明确的报道。

本研究基因表达芯片和RT-PCR结果显示,在未经PDGF作用的VSMC中,有少量的VCAM-1的表达,PDGF刺激VSMC后,VCAM-1 mRNA表达在20 min就明显提高,且随着时间的延长,呈持续增高趋势。VSMC和单核细胞的粘附实验表明PDGF显著促进单核细胞与VSMC粘附。PDGF处理VSMC 6 h,VSMC与单核细胞的粘附率达到对照组的3.04倍。研究结果证实PDGF通过诱导VSMC表达VCAM-1,提高单核细胞与VSMC的粘附。即通过促进VCAM-1的表达,参与损伤后炎症反应的发生,如对炎症细胞吸引和募集。可见PDGF在PTCA后再狭窄形成中发挥了重要的作用。因此可以通过抑制PDGF的效应,来达到预防再狭窄的目的。

[参考文献]

- [1] Danenberg HD, Fishbein I, Gao J, Monkkenon J, Reich R, Gati I, et al. Macrophage depletion by clodronate-containing liposomes reduces neointimal formation after balloon injury in rats and rabbits [J]. *Circulation*, 2002, **106** (5): 599-605.
- [2] 郝玉宾,温进坤,韩梅. $\beta 3$ 整合素在生长因子促血管平滑肌细胞粘附和迁移中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, **20** (3): 335-338.
- [3] 张梅,温进坤,韩梅. 一氧化氮对肿瘤坏死因子- α 诱导的大鼠血管平滑肌细胞间粘附分子-1表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 377-379.
- [4] 王利民,蔡生业,姚成芳,王丽,周宪宾,王华亭,等. 花刺参粘多糖对大鼠血管平滑肌细胞粘附分子表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, **14** (7): 565-568.
- [5] WRP Agema, JW Jukema, SN Pimstone, JJP Kastelein. Genetic aspects of restenosis after percutaneous coronary interventions: towards more tailored therapy [J]. *European Heart Journal*, 2001, **22**: 2 058-074.
- [6] Balram Bhargava, Ganesan Karthikeyan, Alexandre S Abizaid, Roxana Mehran. New approaches to preventing restenosis [J]. *BMJ*, 2003, **327**: 274-279.
- [7] Fruebis J, Gonzalez V, Silvestre M, Palinski W. Effect of probucol treatment on gene expression of VCAM-1, MCP-1, and M-CSF in the aortic wall of LDL receptor-deficient rabbits during early atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17** (7): 1 289-302.
- [8] Huo Y, Ley K. Adhesion molecules and atherosclerosis [J]. *Acta Physiol Scand*, 2001, **173** (1): 35-43.
- [9] Weiss D, Sorescu D, and Taylor WR. Angiotensin II and atherosclerosis [J]. *Am J Cardiol*, 2001, **87** (8A): 25C-32C.

(此文编辑 李玲玲)