

[文章编号] 1007-3949(2011)19-11-0911-04

• 实验研究 •

血小板源生长因子对大鼠血管平滑肌细胞 表达基质金属蛋白酶 2 的影响

于悦卿¹, 郭文潮², 郝玉宾³

(河北省人民医院 1. 检验科, 2. 三优中心, 3. 临床医学研究中心, 河北省石家庄市 050051)

[关键词] 炎症反应; 血小板源生长因子; 血管平滑肌细胞; 基质金属蛋白酶 2

[摘要] 目的 研究血小板源生长因子对血管平滑肌细胞迁移的影响和细胞产生基质金属蛋白酶 2 的变化。

方法 体外培养的血管平滑肌细胞经血小板源生长因子处理 0 min、20 min 和 6 h 后进行如下检测: 迁移实验观察细胞在盖玻片上的迁移情况; 明胶酶谱检测血管平滑肌细胞分泌基质金属蛋白酶 2 活性; 基因芯片和逆转录-聚合酶链反应技术检测血管平滑肌细胞表达基质金属蛋白酶 2 mRNA 的变化。结果 细胞迁移实验显示随着作用时间的延长, 血小板源生长因子明显促进细胞的迁移, 血小板源生长因子处理 20 min 和 6 h 后迁移距离 (分别为 4.9 ± 0.5 、 $7.1 \pm 1.2 \mu\text{m}$) 是对照组 ($2.3 \pm 0.15 \mu\text{m}$) 的 2.13 倍和 3.09 倍, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 明胶酶谱测定表明: 血小板源生长因子显著提高血管平滑肌细胞分泌的基质金属蛋白酶 2 的活性, 作用 20 min 与 6 h 后 (分别为 480.7 ± 27.3 和 851.5 ± 56.4) 是对照组 (296.7 ± 15.8) 的 1.62 倍和 2.87 倍 ($P < 0.01$); 血小板源生长因子对血管平滑肌细胞表达基质金属蛋白酶 2 有明显的诱导作用, 作用 20 min 与 6 h 后的表达 (分别为 0.54 ± 0.09 和 0.77 ± 0.04) 是对照组 (0.35 ± 0.04) 的 1.54 倍和 2.2 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表达基质金属蛋白酶 2, 促进血管平滑肌细胞迁移。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Platelet-derived Growth Factor on Expression of Matrix Metalloproteinases-2 in Vascular Smooth Muscle Cell of Rat

YU Yue-Qing¹, GUO Wen-Chao², and HAO Yu-Bin³

(1. Department of Clinical Laboratory, 2. Department of Improvement Birth Quality, 3. Clinical Medical Research Center, Hebei General Hospital, Shijiazhuang, Hebei 050051, China)

[KEY WORDS] Inflammatory Reaction; Platelet Derived Growth Factor; Vascular Smooth Muscle Cells; Matrix Metalloproteinases-2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of platelet-derived growth factor (PDGF) on migration and matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) expression in vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** After treated with PDGF 0 min, 20 min and 6 hours, the ability of cell migration was measured using microscope, and MMP-2 activity was assayed by gel zymography.

Furthermore the expression of MMP-2 was screened by using Chip and confirmed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The ability of cell migration was improved by PDGF. It was 2.13-fold for 20 min treatment and 3.09-fold for 6 h treatment compared to without PDGF treatment, respectively ($P < 0.05$, $n = 3$). The activity of MMP-2 was also significantly increased 1.62-fold and 2.87-fold for 20 min and 6 h treated by PDGF compared with 0 min, respectively ($P < 0.01$, $n = 3$). The mRNA expression of MMP-2 was 1.54-fold, 2.2-fold higher in cultured with PDGF at 20 min and 6 h than 0 min, respectively ($P < 0.05$, $n = 3$).

Conclusion Our data indicate that PDGF improve vascular smooth muscle cell migration via inducing MMP-2 expression and enhancing MMP-2 activity.

经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 是治疗冠心病的重要并有效的方

[收稿日期] 2011-04-23

[作者简介] 于悦卿, 硕士, 主管技师, 研究方向为分子诊断, 电话为 13933079538, E-mail 为 qqyu03@yahoo.com.cn。郭文潮, 学士, 副主任技师, 研究方向为优生优育, 电话为 13223457558, E-mail 为 gwch8704@163.com。通讯作者郝玉宾, 博士, 教授, 研究方向为基因诊断, 电话为 0311-85988415, E-mail 为 ybhao2005@hotmail.com。

法,但术后再狭窄率高,严重地影响了 PCI 的长期疗效。现已知血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 的异常增殖和迁移在 PCI 术后的再狭窄中起非常重要的作用。位于中膜的平滑肌细胞受各种细胞因子、生长因子及炎性介质等的刺激发生表型转换,并向内膜迁移、增殖^[1]。在众多的因子中,血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 是刺激 VSMC 迁移和增殖的强效的细胞因子^[2],其可由激活的血小板及损伤部位的巨噬细胞产生。而 VSMC 向内膜迁移的前提是将细胞周围的基质降解掉。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 由巨噬细胞、VSMC 及其他一些细胞产生,可广泛降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。其中尤以 MMP-2 最为重要,可以降解 ECM 的主要结构成分,为 VSMC 向内膜迁移扫清了障碍。本文通过建立大鼠血管平滑肌细胞实验模型,研究 PDGF 作用的早期,对 VSMC 迁移的影响和细胞产生 MMP-2 的变化,从细胞和分子水平上探讨影响 MMP-2 的相关因素及在防治血管再狭窄的重要意义。

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,聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, 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

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,选 4~8 代细胞进行实验。

1.3 细胞迁移实验

待接种于盖玻片上的 VSMC 生长至“峰和谷”状态后,取出玻片,在显微镜下用无菌刀片将玻片上的 VSMC 沿直线刮除一侧,放回培养瓶中。玻片在含有 15 $\mu\text{g/L}$ ^[3] PDGF 的培养基中培养 0 min、20 min 和 6 h,然后换成 1% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的培养基,继续培养 16 h 后,洗涤、固定和染色。在高倍镜下观察细胞迁移情况,用测微尺量取迁移最远的 VSMC 细胞核至刮线边缘之间的距离,计算相对迁移距离。观察 4 个视野,取均值。

1.4 基质金属蛋白酶 2 活性的检测

用含明胶的十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro-

phoresis, SDS-PAGE) 检测 MMP-2 活性。分离胶浓度为 8% (含 0.2% 明胶),浓缩胶浓度为 5%。分别取 15 $\mu\text{g/L}$ PDGF 刺激 0 min、20 min 和 6 h 的 VSMC 培养基恒压电泳。电泳结束后,凝胶经 2.5% Triton X-100 漂洗两次,洗去凝胶中的 SDS,使酶蛋白复性。随后加入反应缓冲液 37℃ 孵育 9 h。0.5% 考马斯亮蓝染色 1.5~2 h,脱色液脱色至蓝色背景下显现出清晰的白色条带为止。应用数码成像分析软件对酶图明胶降解区带的信号强度进行相对定量分析。

1.5 基因芯片检测

培养的 VSMC 生长至 100% 融合时,换成 1% FBS 培养基培养 24 h,使细胞同步于 G₀ 期,分别加入 15 $\mu\text{g/L}$ PDGF 作用 0 min、20 min 和 6 h。采用异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法从上述时间点的 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脱氧尿苷三磷酸 (deoxyuridine triphosphate, dUTP),合成探针。

按照 SuperArray 说明书进行杂交。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像。运用 ScanAlyze 软件 (SuperArray 公司) 分析结果。

1.6 逆转录-聚合酶链反应检测

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 MMP-2 cDNA 上下游引物:上游引物 5'-ccatgtgtcttccccttcac-3';下游引物 5'-cgatgccatcaagacaatg-3'。MMP-2 cDNA 扩增片段长度 400 bp。以大鼠 β -actin 为内参照。按照 PCR Kit 说明书进行 PCR。取逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, 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。

1.7 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 血小板源生长因子促进血管平滑肌细胞迁移
玻片上的 VSMC 经 PDGF 刺激 0 min、20 min 及

6 h, HE 染色后可看到:随着作用时间的延长,PDGF 明显促进细胞的迁移(测微尺量取数据分别为 $2.3 \pm 0.15 \mu\text{m}$ 、 $4.9 \pm 0.5 \mu\text{m}$ 、 $7.1 \pm 1.2 \mu\text{m}$)。PDGF 作用于细胞 20 min, VSMC 相对迁移距离是对照组的 2.13 倍,作用 6 h 是对照组的 3.09 倍,差异有显著性($P < 0.05$)。箭头所指划痕位置(图 1)。

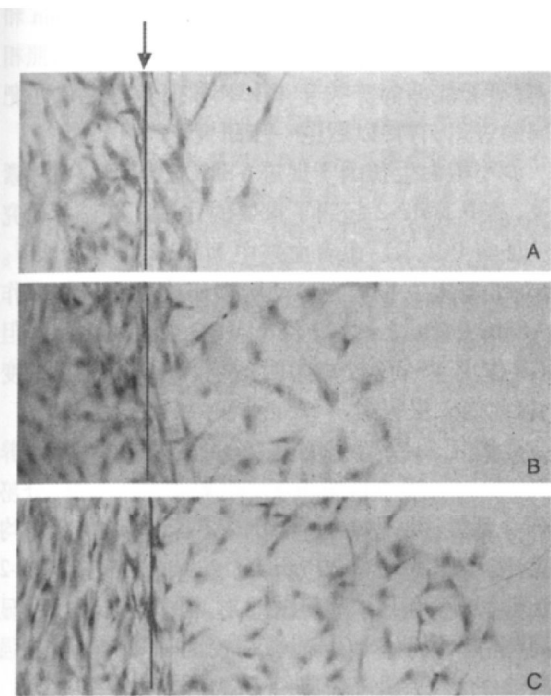


图 1. 细胞迁移实验结果($\bar{x} \pm s, n = 3$) A、B、C 分别为 PDGF 作用 0 min、20 min 和 6 h 的细胞迁移情况。

Figure 1. The effect of PDGF on VSMC migration by cell migration test

2.2 血小板源生长因子显著提高血管平滑肌细胞分泌的基质金属蛋白酶 2 的活性

明胶酶谱测定体外培养 VSMC 培养基中 MMP-2 的活性,结果表明:在凝胶的蓝色背景上见到 3 条透亮带,可见 MMP-2 在 3 个时间点中均有表达(0 min 条带灰度为 296.7 ± 15.8 , 20 min 为 480.7 ± 27.3 , 6 h 为 851.5 ± 56.4)。其中用 PDGF 刺激 20 min 及 6 h 后,培养基中 MMP-2 的活性,与不用 PDGF 刺激的对照细胞(0 min)比较呈明显升高趋势。经图像分析系统对酶图进行分析的结果显示,分别升高 1.62 倍、2.87 倍,差异有显著性($P < 0.01$;图 2)。

2.3 血小板源生长因子促进基质金属蛋白酶 2 基因转录

血小板源生长因子作用 VSMC 不同时间点后,基因芯片筛查发现 PDGF 促进 MMP-2 mRNA 的表

达(经 GEArray Analyzer 分析为:0 min 处理组为 0.11, 20 min 处理组为 0.57, 6 h 处理组为 0.74)。跟对照(0 min)相比,20 min 的 MMP-2 mRNA 表达量与 6 h 的表达量呈逐渐增加趋势。PDGF 作用于细胞 20 min, MMP-2 mRNA 表达量是对照组的 5.18 倍,6 h 是对照组的 6.73 倍(图 3)。

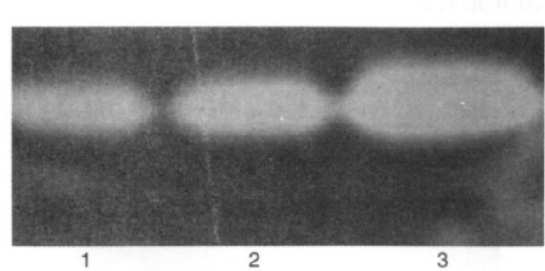


图 2. MMP-2 活性检测的结果($\bar{x} \pm s, n = 3$) 1、2、3 分别为 PDGF 作用 0 min、20 min 和 6 h 的细胞分泌 MMP-2 活性情况。

Figure 2. The effect of PDGF on MMP-2 activity by gel zymography

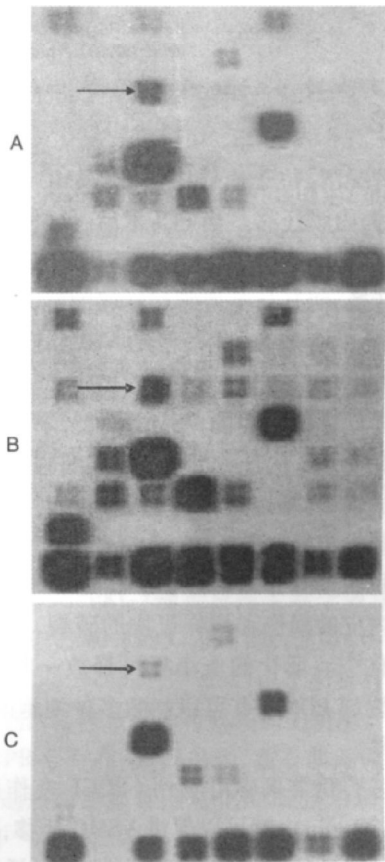


图 3. 基因芯片检测结果 A、B、C 分别为 PDGF 作用 0 min、20 min 和 6 h 的 MMP-2 mRNA 的表达量。

Figure 3. Expression of MMP-2 mRNA induced with PDGF by chip detection

相同处理的 VSMC 中,用 RT-PCR 进一步检测 MMP-2 的基因表达。PCR 产物电泳后经 Gel-Pro Analyzer Version 3.0 分析,PDGF 作用 0 min、20 min 和 6 h,数据分别为 0.35 ± 0.04 、 0.54 ± 0.09 和 0.77 ± 0.04 ,跟基因芯片表达趋势一致。PDGF 作用于细胞 20 min,基因表达量是对照组 (0 min) 的 1.54 倍,6 h 是对照组的 2.2 倍 ($P < 0.05$)。证实 PDGF 具有促进 MMP-2 基因表达的作用 (图 4)。

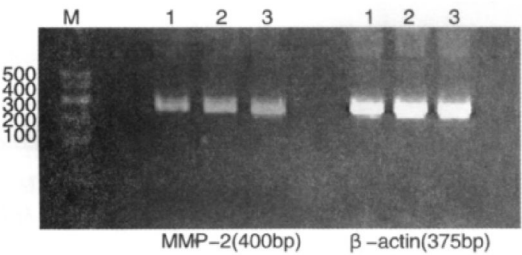


图 4. RT-PCR 检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$) M 为 Maker, 1、2、3 分别为 PDGF 作用 0 min、20 min 和 6 h 的 MMP-2 mRNA 的表达量。

Figure 4. Expression of MMP-2 mRNA induced with PDGF by RT-PCR

3 讨论

正常情况下,位于血管中层的 VSMC 处于收缩表型,不会向内膜迁移。当 PCI 术后,伴随着血管损伤,可激活多种细胞因子,这些细胞因子刺激 VSMC 发生表型转换,使其具备增殖和迁移的能力,同时可以调控 ECM 的合成和降解,帮助 VSMC 迁移,促进再狭窄的发生。

我们建立体外培养的 VSMC 模型,不仅可以更直观的研究 VSMC 的迁移变化,而且细胞从收缩表型变为合成表型(增殖型),与血管损伤时 VSMC 表型的转换非常相似。

经皮冠状动脉介入治疗在扩张冠脉的同时,也造成动脉内皮的损伤和粥样斑块的破裂,加强了血小板的活化^[4]。活化的血小板可释放一种重要的促细胞分裂剂 PDGF,其可以刺激多种细胞的分裂、增殖和迁移。

从迁移实验结果中可看到,PDGF 在作用较短的时间内 (20 min),就可以促进 VSMC 迁移,并且随着作用时间的延长,VSMC 迁移活性增强,迁移距离越远,证实 VSMC 在 PDGF 作用下,很短的时间内就可发生表型转化,从而使细胞具备了迁移的能力。PDGF 对于 VSMC 迁移能力的调控,是 PDGF 与细胞膜上的受体 PDGFR 相结合,通过激活细胞内多条信

号转导通路,活化信号分子蛋白,再将信号转移到核内,催化转录因子的磷酸化启动靶基因的表达,从而使细胞发生迁移等生物学效应。武衡等利用 Boyden 迁移小室研究 PDGF 作用细胞 24 h 后,VSMC 迁移的情况,证实信号分子黏着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 磷酸化是 PDGF 诱导 VSMC 迁移的重要因素^[5]。本实验从更早的时间点 (20 min 和 6 h),研究了 PDGF 对 VSMC 迁移的影响,与对照相比,有显著性差异。关于 PDGF 如何快速启动了靶基因的表达,有待以后进一步研究。

血小板源生长因子促进 VSMC 迁移与多种因素有关,其中 MMP-2 起到了重要的作用。在临床研究中已证实 PCI 术后患者血浆中 MMP-2 含量增加^[6]。Bendeck 等人^[7]报道在鼠动脉损伤模型中,PDGF 作用 VSMC 24 h 之后,分泌 MMP-2 活性的变化,但 PDGF 作用 VSMC 较短的时间内,MMP-2 发生的变化,目前尚未见报道。

我们用明胶酶谱方法,分别检测 PDGF 培养 VSMC 0 min、20 min、6 h 后,培养基中 VSMC 分泌 MMP-2 活性,结果显示:MMP-2 在三个时间点中均有表达。PDGF 培养 20 min、6 h 的培养基中 MMP-2 的活性,与不用 PDGF 刺激的对照细胞比较呈明显升高趋势。说明 PDGF 能够在较短时间内显著增强 MMP-2 的活性,提高其降解 ECM 的能力。

本实验中基因芯片和 RT-PCR 结果显示,PDGF 培养 VSMC 20 min 及 6 h 后,MMP-2 的 mRNA 表达显著高于对照组 (0 min) 并随培养时间延长呈增加趋势。表明 PDGF 作用 VSMC 后,通过转录水平参与了 MMP-2 活性的调节。

对于 VSMC 在 PDGF 作用下很短的时间内就使 MMP-2 的活性和基因表达量增高,我们分析可能与 PDGF 的信号转导中存在快速调节途径有关。

现已知在 PDGF 的信号转导途径中,PDGF 与其 PDGFR 受体结合后,使受体二聚体化,导致受体磷酸化和酪氨酸激酶激活,使得酪氨酸残基 SH2 结构域暴露。此结构域可以与许多信号分子结合,如 Ras、Src、PI3K、SHP2 和 PLC γ ,从而激活细胞内信号转导通路。在众多的 PDGFR 介导的信号通路中,最经典的是 MAPK 通路 (Erk1/2 通路),其他的信号通路 (包括 Src、PI3K、PLC γ 和 SHP2 通路) 与 Erk1/2 通路之间可以相互作用。Aleksandra Jurek 等研究报道在 Erk1/2 激活的早期,Src 蛋白是非常重要的,其能使 Erk1/2 快速磷酸化^[8]。我们推测 PDGF 作用 VSMC 早期,可能通过上述途径快速调节了 (下转第 918 页)

(上接第 914 页)

MMP-2 的转录水平,从而短时间内增强 MMP-2 的活性,提高其降解 ECM 的能力。

经皮冠状动脉介入治疗术后,在各种细胞因子,包括 PDGF 的作用下,VSMC 表型转换,具备迁移能力;同时 MMP-2 的活性增加,通过降解 ECM,帮助 VSMC 从中膜向内膜迁移。由此可见,MMP-2 在再狭窄的进展中起到了十分重要的作用。因此,可通过使用抑制 MMP-2 活性的药物和试剂来到达预防再狭窄的目的。

[参考文献]

- [1] Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23 (9) : 1 510-520.
- [2] Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84 (3) : 767-801.
- [3] 郝玉宾,温进坤,韩 梅. β_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.

- [4] 徐新生,沈彦明,宋建军,等. 冠状动脉支架术对冠心病患者血小板活化功能的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 14 (11) : 959-962.
- [5] 武 衡,钟 杨,汤显靖,等. 黏着斑激酶对血小板源生长因子刺激的血管平滑肌细胞迁移和黏附的调控 [J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2010, 12 (7) : 648-651.
- [6] 李 昭,李 梦,胡 健. 冠状动脉支架植入对冠心病患者血清基质金属蛋白酶 2 表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16 (5) : 392-394.
- [7] Bendeck MP, Zempo N, Clowes AW, et al. Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat [J]. *Circ Res*, 1994, 75 (3) : 539-545.
- [8] Aleksandra Jurek, Carl-Henrik Heldin, Johan Lennartsson. Platelet-derived growth factor-induced signaling pathways interconnect to regulate the temporal pattern of Erk1/2 phosphorylation [J]. *Cellular Signalling*, 2011, 23 (1) : 280-287.

(此文编辑 曾学清)