

Carneau 白鸽血管壁细胞外基质的改变 伴有自发性动脉粥样硬化症的发展

宋京都 孙东植 尹正日

(延边医学院病理学教研室, 吉林省延吉市 133000)

Changes in Vascular Extracellular Matrix Are Associated with the Development of Spontaneous Atherosclerosis in White Carneau Pigeons

SONG Jing-Yu, SUN Dong-Zhi and YIN Zheng-Ri
(Department of Pathology, Yanbian Medical College, Yanji 133000, China)

ABSTRACT White Carneau pigeons (WCP) have previously been shown to be genetically susceptible to the development of spontaneous atherogenesis. Analysis of levels of total hydroxyproline and isodesmosine in the thoracic aorta and celiac bifurcation of prelesion, six-week-old WCP and Show Racer pigeons (SRP), revealed an increased accumulation of total collagen and cross-linked elastin in the WCP arterial tissue. Using dot blot hybridization, measurements of steady state levels of several mRNA in total RNA extracted from pigeon aortic tissue were determined. While the increased deposition of extracellular matrix proteins was paralleled by significantly greater recovery of mRNA coding for pro $\alpha 1(1)$ collagen and elastin, in RNA extracted from WCP aortic tissue, increased recovery of mRNA coding for an intracellular protein, γ -actin were observed in WCP aortic tissue. No differences in steady state levels of mRNA coding for pro $\alpha 1(1)$ collagen and elastin were observed in RNA extracted from liver of WCP and SRP. The experiment results indicate that the cell population in WCP aortic tissue exhibits a markedly different phenotype with respect to a capacity for the biosynthesis of extracellular and intracellular proteins.

KEY WORDS Atherosclerosis; Procollagen; Extracellular matrix; Pigeons

摘要 Carneau 白鸽(以下简称白鸽)自发性动脉粥样硬化的发生发展有遗传易感性。在6周的白鸽和Show Racer (SR)鸽胸主动脉和腹主动脉分支中,总羟脯氨酸和异构锁连素水平的分析结果表明,白鸽动脉组织中总胶原和交叉连接的弹性硬蛋白显著增加。斑点杂交分析结果表明细胞外基质蛋白沉积的增加与白鸽主动脉组织 RNA 中编码原 $\alpha 1(1)$ 胶原和弹性硬蛋白 mRNA 回收率增加相一致,并使白鸽主动脉组织中编码细胞内 γ -肌动蛋白 mRNA 回收率增加。在鸽肝脏 RNA 中编码原 $\alpha 1(1)$ 胶原和弹性硬蛋白 mRNA 的稳定状态水平之间未见差异。结果表明在细胞外和细胞内蛋白质生物合成能力方面,白鸽主动脉组织中细胞数表示一种明显不同的表现型。

关键词 动脉粥样硬化; 原胶原; 细胞外基质; 鸽子

Clarckson 等^[1]描述了 Carneau 白鸽(以下简称白鸽)有自发性发生主动脉粥样硬化的倾向,白鸽主动脉粥样硬化性损伤的发生率明显高于 Show Racer (SR) 鸽子。在探讨白鸽动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发病机制时有些学者^[2~4]发现,白鸽发生 As 与高血压及高血脂无关。Prockop 等^[5]提出白鸽自发性发生 As 具有遗传性,而且细胞外基质胶原成分起重要作用。胶原蛋白是血管结缔组织的一个主要成分,与弹性硬蛋白一起在主动脉壁的细胞—基质和基质—脂质相互作用方面起重要作用^[6]。为了证实白鸽细胞外基质蛋白具有遗传性改变,本文探讨了形态学正常的白鸽和 SR 鸽主动脉组织中弹性硬蛋白、胶原沉积及相应

mRNA 量的改变,以及它们在自发性发生 As 过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 白鸽及 SR 鸽的饲养

所有鸽均在鸟笼中喂养,每天至少给 14 h 的光照,并喂 Purina Pigeon Chow 饲料、Palmetto Pigeon Health 去壳谷类和水。6 周时,用断头机处死。在病理剖检中取胸主动脉、腹主动脉和肝脏称重量,部分用 Carson 缓冲甲醛溶液固定,部分在 -70℃ 冰冻保存。按 Boyd 等^[7]的方法进行组织病理学检查。

1.2 总 RNA 和 DNA 的提取

按 Pierce 等^[8]方法,取液氮冷冻的组织,称量后在液氮中用 Polytron 粉碎,分别进行总 RNA 和 DNA 的提取。通过 Slot blot 分析法作 mRNA 和 DNA 定量测定,Northern blot 分析测定羧脯氨酸和异构锁连素。

1.2.1 总 RNA 的提取 取 1 g 组织碎块,加 5 体积的 GTC 变性液(4.0 mol/L 异硫氰酸胍,0.1 mol/L Tris-HCl, pH7.5, 1% 巯基乙醇)匀浆,于匀浆中加入 10% 十二烷基肌氨酸钠液至浓度为 0.5%,离心 10 min 去除细胞碎片。加入 5.7 mol/L CsCl-0.01 mol/L EDTA 液 9.7 ml, 20℃ 32 000 r/min 超离心 24 h,吸去上清液,加 150 μ l TE(Tris-HCl 0.01 mol/L pH7.6, EDTA 1.0 mol/L), 30 μ l 3.0 mol/L NaOAc, pH5.2 及 0.9 ml 冷乙醇,混匀,0℃ 放置 30 min 以上,12 000 r/min 4℃ 离心 10 min,去上清。以 70% 冷乙醇沉淀一次,去乙醇后,室温空气干燥,加少量水溶解 RNA,加 3 体积乙醇,于 -70℃ 存放。使用前,在乙醇 RNA 悬液中加入 3.0 mol/L NaOAc, pH5.2, 至 0.3 mol/L 混匀,12 kr/min 离心 5 min,回收 RNA 沉淀。

1.2.2 总 DNA 的提取 取 10 g 组织碎块,加 TES (15 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 15 mmol/L EDTA pH8.0, 15 mmol/L NaCl), 其中 EDTA 浓度增至 40 mmol/L。加 10% SDS 至终浓度 2%,蛋白酶 K 终浓度为 200 mg/L,混匀,50℃ 过夜。加等体积试剂 A 饱和酚(500 mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 10 mmol/L NaCl 0.5% SDS)抽提。4℃ 4000 r/min 离心 20 min,取出上层 DNA 清液后上层清液用氯仿抽提两次。离心后用 TES 透析 DNA 溶液,直至透析外液 OD<0.05。透析后的 DNA 溶液 RNase 至终浓度 50 mg/L, 37℃ 反应 2 h,加 10% SDS 至终浓度 0.5%,蛋白酶 K 至 50 mg/L, 55℃ 保温 3~4 h,冷却后用 TES 饱和酚抽提并用氯仿抽提 DNA 上清液。DNA 溶液对 TES 4℃ 透析 2~3 天,至透

析外液的 OD<0.05, 4℃ 贮存备用。

1.3 ³²P 标记的 RNA 探针与试剂

³²P 标记的弹性硬蛋白、 γ -肌动蛋白和鸡原 α 1(1) 胶原 RNA 探针由 Charles D Boyd 教授和 Richard A Pierce 博士(UMDNJ-Robert Wood Johnson Medical School)提供,与文献[8~10]提到的探针结构完全相同。Tris-HCl、EDTA、RNase、TES、SDS、SSC、SSPE、Formamide、蛋白酶 K 和限制性内切酶(Ava I, Hind III, Kpn I)等均购自 International Biochemicals Inc 和 Sigma Chemical Company。放射性同位素购自 ICN Radiochemicals, 硝酸纤维素膜(Nitrocellulose membrane)购自 Schleicher Company。计算机控制的 β 型扫描器购自 San Diego 的 Automated Microbiology Systems。

1.4 统计学处理

采用 Two-tailed Student's *t*-test 进行统计学处理。

2 结果

2.1 组织病理学检查

6 周时白鸽和 SR 鸽主动脉组织中肉眼及组织病理学检查未见 As 病变。

2.2 DNA、RNA 和蛋白质的测定

两种鸽主动脉组织和肝脏中 DNA 和 RNA 含量的测定结果见 Table 1 和 Table 2。可见在胸主动脉,SR 鸽 DNA 的含量明显高于白鸽($P<0.01$);而在腹主动脉分枝处,SR 鸽明显低于白鸽($P<0.01$)。SR 鸽主动脉组织之间 DNA 含量没有差别;而在白鸽,腹主动脉分枝处明显高于胸主动脉。两种鸽肝脏中 DNA 含量没有差异(Table 1);主动脉组织中 RNA 含量没有明显差异,而肝脏中 RNA 含量白鸽明显低于 SR 鸽($P<0.01$)(Table 2)。

两种鸽胸主动脉组织中提取的可回收性羧脯氨酸和异构锁连素水平见 Table 3,可见白鸽含量高于 SR 鸽($P<0.05$)。

通过细胞数的直接测定,发现白鸽和 SR 鸽胸主动脉组织中细胞数有显著差异。使用接目镜格子,在 HE 染色的主动脉切片上以 10 个视野为一组,测定每个视野的细胞核数,取其平均数。白鸽胸主动脉平均细胞核数是 182 ± 6

个,而与白鸽同一年龄、同一部位观察的 SR 鸽胸主动脉平均细胞核数是 305 ± 25 个。两种鸽细胞核计数之间有显著性差异 ($P < 0.01$)。

Table 1. Content of DNA in aortic tissue and liver of the pigeon ($\bar{x} \pm s$, mg/g tissue).

Groups	TA	CB	liver
WCP	$0.19 \pm 0.02(11)$	$3.38 \pm 0.04(5)^a$	$6.25 \pm 0.45(5)$
SRP	$0.69 \pm 0.07(14)^b$	$0.76 \pm 0.07(6)^a$	$5.56 \pm 0.59(5)$

The number in parentheses refer to the number of pigeons used to obtain tissue samples, the same below.

TA: thoracic aorta, CB: celiac bifurcation, WCP: White Carneau pigeon, SRP: Show Racer pigeon, the same below.

a: $P < 0.01$, compared with WCP group, b: $P < 0.01$, compared with TA of WCP and SRP.

Table 2. Content of RNA in aortic tissue and liver of the pigeon ($\bar{x} \pm s$, mg/g tissue).

Groups	TA (n=17)	CB (n=17)	liver (n=5)
WCP	0.28 ± 0.00	0.23 ± 0.00	1.92 ± 0.28
SRP	0.30 ± 0.02	0.26 ± 0.01	$3.08 \pm 0.80^*$

* compared with WCP group, $P < 0.01$.

Table 3. The protein content in tissue of thoracic aortic of the pigeon ($\bar{x} \pm s$, mg/g protein).

Groups	n	OH-protein	desmosine
WCP	7	41.90 ± 1.70	1.91 ± 0.02
SRP	7	$35.50 \pm 0.70^*$	$1.56 \pm 0.10^*$

* compared with WCP group, $P < 0.05$.

2.3 mRNA 定量

用编码人类弹性硬蛋白 mRNA 及鸡原 $\alpha_1(1)$ 胶原 mRNA 和人类 γ -肌动蛋白 mRNA 的 3' 端未转移部位序列的放射标记探针, 通过 Northern blot 和 slot blot 分析, 检测了胸主动脉和腹主动脉分支的总 RNA 含量。

Northern blot 分析结果见 Figure 1。用人类弹性硬蛋白 mRNA 探针在鸽总 RNA 中检测到 3.5 kb mRNA (Figure 1, 泳道 A)。说明此 mRNA 来自编码弹性硬蛋白原 mRNA^[11]。用原 $\alpha_1(1)$ 胶原 cDNA 检测到了一种 4.8 kb



Figure 1. Northern blot analysis of total RNA from aorta of six-week-old white Carneau pigeons. The position of 28 S rRNA is indicated and was determined by hybridization of Northern blots of total human skin fibroblast RNA, electrophoresed in parallel with pigeon RNA samples, with a human 28 S rRNA clone, pA4. Lane A: 3 μ g of total pigeon aortic RNA probed with radiolabelled RNA transcripts obtained from a human elastin cDNA clone. Lane B: 3 μ g of total pigeon aortic RNA was analysed using 32 P-labelled RNA transcripts obtained from a chicken pro $\alpha_1(1)$ collagen cDNA. Lane C: 3 μ g of total pigeon aortic RNA probed and radiolabelled RNA transcripts from a human γ -actin cDNA.

显性的 mRNA (Figure 1, 泳道 B)。它是由曾特征化的原 $\alpha_1(1)$ 胶原 mRNA 序列组成的^[12], 此种 mRNA 与 28 S rRNA 相符合。在鸟纲总 RNA 中, 高分子量核糖体的 RNA 仅为 26 S。因此, 说明鸡原 $\alpha_1(1)$ 胶原 cDNA 探针不与任何 rRNA 产生交叉杂交。用人类 γ -肌动蛋白 mRNA 检测到 2.2 kb 鸽 γ -肌动蛋白 mRNA (Figure 1, 泳道 C)^[13]。

使用这些探针对所有鸽主动脉和肝脏中 RNA 的 Slot blot 分析结果参见 Figure 2 和 Figure 3。比较 SR 鸽与白鸽主动脉中分离出的总 RNA 结果, 发现在白鸽主动脉组织总 RNA

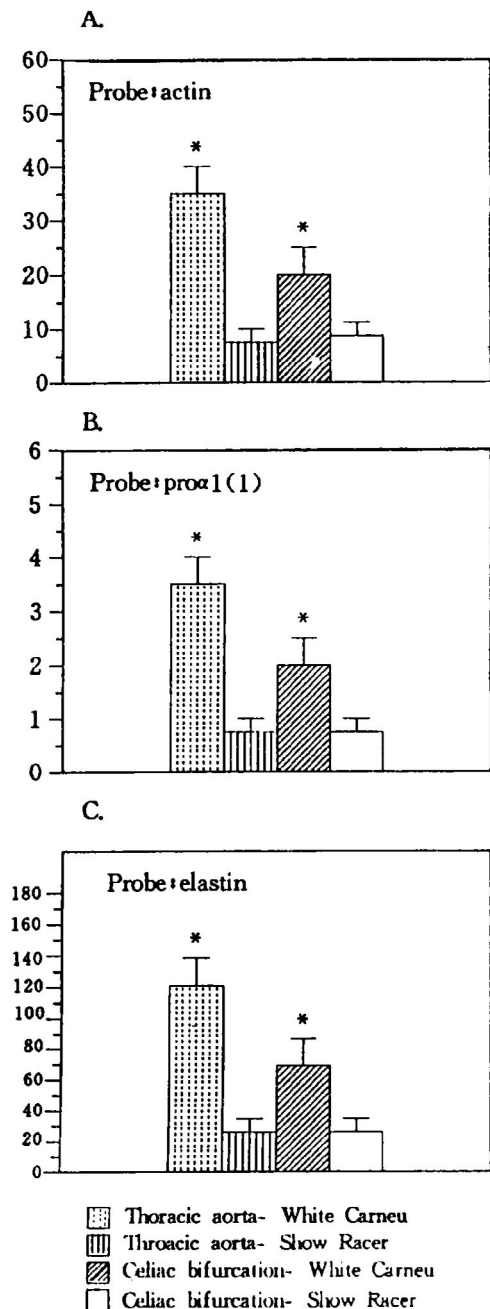


Figure 2. Slot blot hybridization of radiolabelled RNA probes to total RNA isolated from pigeon aortic tissue. Results are expressed as picograms probe bound permicrogram total genomic DNA. * $P < 0.01$, indicates a statistically significant difference between White Carneu pigeon and Show Racer pigeon thoracic aorta or celiac bifurcation.

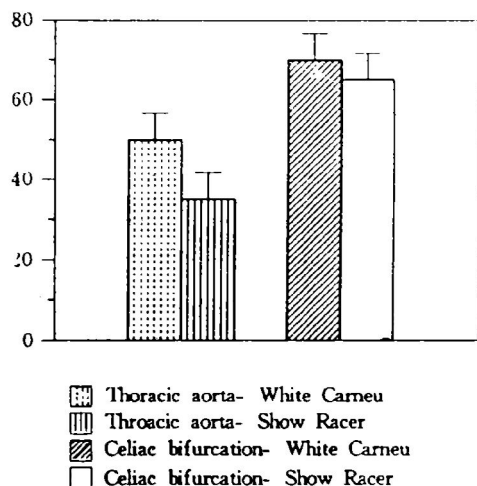


Figure 3. Slot blot hybridization of radiolabelled RNA probes to total RNA isolated from pigeon liver. Results are expressed as picograms probe bound permicrogram total genomic RNA.

中编码原 $\alpha 1(1)$ 胶原、弹性硬蛋白和 γ -肌动蛋白 mRNA 水平明显增高 (Figure 2; $P < 0.01$)。白鸽和 SR 鸽肝脏中分离的总 RNA 中未见编码原 $\alpha 1(1)$ 胶原和弹性硬蛋白 mRNA 水平的差异 (Figure 3)。

3 讨论

众所周知,白鸽 As 表现型的加速发展具有基因遗传。在本研究中我们得到的结果是在白鸽主动脉组织中编码原 $\alpha 1(1)$ 胶原和弹性硬蛋白原 mRNA 稳定状态水平增高和总羟脯氨酸、异构锁连素显著的增加。虽然这提示白鸽主动脉中 I 型胶原积聚和合成的增加,但对沉积的基质蛋白量和基质 mRNA 回收水平相对不同的原因尚不清楚。因为白鸽胸主动脉原 $\alpha 1(1)$ 胶原 mRNA 水平比 SR 鸽几乎高出 4 倍,但在白鸽主动脉中羟脯氨酸水平仅增加了 18%。在沉积的弹性硬蛋白和弹性硬蛋白原 mRNA 水平中也存在类似的不同点。对这个问题的可能解释是在白鸽主动脉中细胞外基质成分的倒转加速或相对于生物合成和沉积短暂的不同所致。在鸽肝脏稳定状态 mRNA 水平上未发现差异,因此在白鸽主动脉中编码原 $\alpha 1(1)$

胶原和弹性硬蛋白原的 mRNA 水平的增加显然是组织特异性所致而不是饲养的特异性所引起的。

在形态学上 As 性损伤形成之前,在白鸽主动脉中也观察到原 $\alpha 1(1)$ 胶原 mRNA 水平和总胶原回收率的增高。因此,动脉纤维胶原沉积的增加不是以早期 As 性损伤或脂斑、脂纹中纤维性损伤发展为特征的纤维化的结果。

在白鸽中编码细胞外基质成分的 mRNA 水平增加仅表明合成结缔组织上的一种特异性增加。在白鸽主动脉中细胞内肌动蛋白 mRNA 水平增加表明在白鸽主动脉组织中不但细胞外而且细胞内蛋白质合成都增加。

通过白鸽主动脉组织中明显减少的细胞数来决定了 γ -肌动蛋白、 $\alpha 1(1)$ 胶原和弹性硬蛋白原 mRNA 稳定状态水平的增加。不仅从两种鸽主动脉组织直接细胞计数和 DNA 的测定中很明显,而且在白鸽主动脉组织每个细胞总 RNA 回收率增加中也表现出来。因此,白鸽与 SR 鸽主动脉组织中细胞生物合成能力上具有很大区别。这提示白鸽和 SR 鸽之间有明显不同的主动脉细胞表现型。虽然在细胞表现型中对这品种特异不同的机制尚不清楚,但是在白鸽主动脉中细胞表现型存在显著的不同性,说明此敏感品种 WC 鸽从功能上伴有 As。

参考文献

- Clarkson TB, Prichard RW, Netsky NG, et al. Atherosclerosis pigeons: its spontaneous occurrence and resemblance to human atherosclerosis. *Arch Pathol*, 1959, **68**: 143~147.
- Santerre RF, Wight TN, Smith SC, et al. Spontaneous atherosclerosis in pigeons: a model system for studying metabolic parameters associated with atherogenesis. *Am J Pathol*, 1972, **67**: 1~10.
- Hajjar DP, Wight TN, Smith SC. Lipid accumulation and ultrastructural change within the aortic wall during early spontaneous atherogenesis. *Am J Pathol*, 1980, **100**: 683~702.
- Wagner WD, Connor J, Labutta T. Blood pressure in atherosclerosis-susceptible and -resistant pigeons. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1979, **162**: 101~104.
- Prockop DJ, Kivirikko KI. Heritable diseases of collagen. *N Engl J Med*, 1984, **311**: 376~386.
- Barnes MJ. Collagens in atherosclerosis. *Collagen Rel Res*, 1985, **5**: 65~97.
- Boyd CD, Kinie AC, Pierce RA, et al. Increased elastin mRNA levels associated with surgically induced intimal injury. *Conn Tis Res*, 1988, **18**: 65~78.
- Pierce RA, Glaug MR, Greco RS, et al. Increased procollagen mRNA levels in carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats. *J Biol Chem*, 1987, **262**: 1 652~1 658.
- Emanuel BS, Cannizzaro L, Ornstein-Goldstein N, et al. Chromosomal localization of the human elastin gene. *Am J Hum Genet*, 1985, **37**: 873~882.
- Fuller F, Boedtker H. Sequence determination and analysis of the 3' region of chicken pro $\alpha 1(1)$ and pro $\alpha 2(1)$ collagen messenger ribonucleic acids including the carboxy-terminal propeptide sequences. *Biochem*, 1981, **20**: 996~1 006.
- Yoon K, May M, Goldstein N, et al. Characterization of a sheep elastin cDNA clone containing translated sequences. *Biochem Biophys Res Comm*, 1984, **118**: 261~269.
- Chu ML, Myers JC, Bernard MP, et al. Characterization of five overlapping cDNA specific for the human Pro $\alpha 1(1)$ collagen chain. *Nuc Acids Res*, 1982, **10**: 5 925~5 934.
- Ponte P, Gunning P, Blau H, et al. Human actin genes are single copy for α -skeletal and α -cardiac actin but multicopy for β and γ -cytoskeletal gene: 3'-untranslated regions are isotype specific but are conserved in evolution. *Mol Cell Biol*, 1983, **3**: 1 783~1 791.

(1995-07-10 收到, 1996-02-28 修回)