

[文章编号] 1007-3949(2002)10-03-0221-04

• 实验研究 •

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

王 伟, 谭孝厚¹, 庄汉屏¹

(湖南省肿瘤医院内科, 湖南省长沙市 410006; 1. 中南大学湘雅医院老年心血管内科, 湖南省长沙市 410008)

[主题词] 表皮样生长因子; 血小板源生长因子; 动脉粥样硬化; 生长因子

[摘要] 探讨结合肝素的表皮样生长因子及血小板源生长因子 A 与动脉粥样硬化的关系, 将 16 只中华本兔随机分为普通饲料组和高脂饲料组, 喂养 12 周形成动脉粥样硬化模型后, 运用内参比法逆转录聚合酶链反应对动脉壁中结合肝素的表皮样生长因子、血小板源生长因子 A 基因表达进行定量分析。结果发现, 普通饲料组主动脉正常, 高脂饲料组主动脉均有粥样斑块形成, 脂质斑块面积占主动脉面积百分比为 27.80 ± 13.97 , 斑块最大厚度为 $21.17 \pm 7.63 \mu\text{m}$ 。普通饲料组动脉壁中结合肝素的表皮样生长因子含量较高脂饲料组显著降低, 而血小板源生长因子 A 含量则较高脂饲料组显著升高。结果提示, 结合肝素的表皮样生长因子与动脉粥样硬化的形成与发展关系密切, 血小板源生长因子 A 在动脉粥样硬化的形成与发展中可能不起主要作用。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

Expression of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor and Platelet Derived Growth Factor in Arterial Walls of Atherosclerotic Rabbits

WANG Wei, TAN Xiao-Hou¹, and ZHUANG Han-Ping¹

(Department of Clinical Oncology, Hunan Cancer Hospital, Changsha 410006, China; 1. Department of Geriatric Cardiology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[MeSH] Epidermal Growth Factor; Platelet Derived Growth Factor; Atherosclerosis; Growth Substances

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate whether Heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) and platelet derived growth factor-A (PDGF-A) were implicated in the pathogenesis of atherosclerosis. **Methods** 16 healthy chinese rabbits were randomly divided into common feed group and high lipid feed group. After 12 weeks the levels of HB-EGF mRNA and PDGF-A mRNA in the aortic walls were measured by a reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) assay. **Results** The levels of HB-EGF mRNA were significantly higher in atherosclerotic rabbit aortic walls in high lipid feed group than in common feed group, while the levels of PDGF-A mRNA were significantly lower in atherosclerotic rabbit aortic walls in high lipid feed group than in common feed group. **Conclusion** HB-EGF might play important roles in the formation of atherosclerosis, while PDGF-A might have no effects on the progression of atherosclerosis.

结合肝素的表皮样生长因子 (heparin-binding epidermal growth factor, HB-EGF) 与血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 是目前发现的两种作用最为强大的促有丝分裂因子和趋化因子^[1]。国外学者初步认为结合肝素的表皮样生长因子与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 形成有关^[1~4], 但未能动物模型上进行定量研究, 目前国内有关结合肝素的表皮样生长因子与 As 报道少见。国内外每年都有不少有关血小板源生长因子的报道, 但就其在 As 中的作用存在着分歧: 一种意见认

为血小板源生长因子具有较强的促有丝分裂及趋化活性, 与 As 关系密切^[5,6]; 另一种意见认为血小板源生长因子是 PDGF 中促有丝分裂能力较弱的一种, 与 As 关系并不密切^[7]。本实验运用分子生物学技术对实验性 As 兔血管壁中结合肝素的表皮样生长因子 mRNA、血小板源生长因子 mRNA 作定量分析, 进一步揭示结合肝素的表皮样生长因子及血小板源生长因子与 As 的关系。

1 材料与方法

1.1 引物及其序列

β -actin 上下游引物分别为: 5'-TGACGGTCAGGT-CATCACTATCGGCAATGA-3', 5'-TTGATCTTCATGGTG (AGC)TAGGAGCCAGGGCA-3'; 结合肝素的表皮样生长因子上下游引物^[8]分别为: 5'-AAAAGAAAGAA

[收稿日期] 2001-11-05 [修回日期] 2002-04-22

[作者简介] 王伟, 男, 1973 年 2 月出生, 湖南沅江人, 现从事化疗药物的心血管毒副作用及其防治的研究。谭孝厚, 男, 1939 年 4 月出生, 湖南长沙人, 教授, 现从事老年性心血管疾病的防治研究。庄汉屏, 男, 1945 年 8 月出生, 浙江奉化人, 教授, 现从事老年性心血管疾病的防治研究。

(GA)AA(AG)GG(CA)-3', 5'-CCT(GA)TG(GA)TAC-CT(GA)AACAT-3'; 血小板源生长因子上下游引物分别为: 5'-TGC GGA TAC CTC GCC CAT-3', 5'-GGT CGA CCT GAC TCC GAG-3'。β-actin 引物和血小板源生长因子引物均按 Gene Bank 设计, 由上海生工生物公司合成。

1.2 动物模型制备

健康雄性中华本兔 16 只, 体重 1.46 ± 0.21 kg, 4~6 月龄, 由中南大学湘雅医学院动物学部提供。按体重随机分为两组: 普通饲料组 8 只, 喂基本颗粒饲料; ④高脂饲料组 8 只, 每兔每天加喂胆固醇 0.7 g 及猪油 2.8 g^[9]。各组每兔每天给食量相等, 限制为 140 g, 分笼饲养, 自由饮水, 每 2 周测体重一次。12 周后用 3% 苯戊巴比妥按 1 mg/kg 行腹腔内麻醉, 开胸开腹, 分离并离断主动脉直至髂动脉分支处, 纵行切开, 生理盐水冲洗两次, 再用 DEPC 水冲洗一次。取 400 mg 组织用于提取 RNA, 其余用于动脉形态学观察。

1.3 主动脉形态学观察

将主动脉标本平铺在滤纸上, 10% 福尔马林固定, 油红 O 染色后, 肉眼观察 As 病变, 用透明方格纸(1 mm × 1 mm) 采取数格子法^[9] 测量每条主动脉总面积及粥样斑块面积, 计算斑块面积占总面积的百分比。自主动脉弓部取材做石蜡切片, HE 染色, 光镜下观察主动脉壁形态, 并用测微尺测量斑块最厚处厚度。

1.4 内参比法逆转录聚合酶链反应

先按 Trizol 试剂盒(GIBCO 公司) 说明书方法进行总 RNA 抽提, 再按常规方法将 mRNA 逆转成 cDNA, 而后将结合肝素的表皮样生长因子与 β-actin 共体系扩增。扩增条件: 94℃变性 5 min; 94℃30 s, 50℃40 s, 72℃50 s, 循环 35 次, 最后 72℃延伸 5 min, 4℃保存^[8]。扩增片段长度 β-actin 为 260 bp, 结合肝素的表皮样生长因子为 288 bp。血小板源生长因子与 β-actin 的共体系扩增条件为: 94℃变性 5 min, 94℃30 s, 54℃40 s, 72℃50 s, 35 个循环, 最后 72℃延伸 5 min, 4℃保存。扩增片段长度 β-actin 为 260 bp, 血小板源生长因子为 300 bp。

1.5 反应产物电泳、照相及定量分析

取 PCR 产物 10 μL, 3% 琼脂糖凝胶电泳, 以 Gene Ruler™ 100 bp DNA ladder plus(MBI 产品) 为分子量标准, 照相后经美国 STATAGENE 公司 EAGLE EYE II 型图像处理系统分析, 测得 PCR 产物各条带光密度值, 而后计算出每例样本血小板源生长因子/β-actin 及结合肝素的表皮样生长因子/β-actin 的比

值。

1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析, 所有实验数据以均数 ± 标准差表示, 两组间比较用 *t* 检验, 以双向 *P* < 0.01 为检验标准。

2 结果

在实验第一周每组各有 1 只动物死亡, 予以排除。普通饲料组 7 号样本所提取的 RNA 质量不纯, 故予以剔除。12 周后两组体重均增加, 但组间无明显差异。

2.1 主动脉病理形态学改变

普通饲料组主动脉正常, 无一例有粥样斑块或脂质斑点, 镜检内膜结构完整, 内皮下无脂质沉积。而高脂饲料组均有粥样斑块形成, 镜检有大量泡沫细胞堆积及粥样硬化病灶形成, 并可见泡沫细胞崩解, 少数胆固醇结晶析出。高脂饲料组脂质斑块面积占主动脉面积百分比为 27.80 ± 13.97 , 其斑块最大厚度为 21.17 ± 7.63 μm。

2.2 结合肝素的表皮样生长因子及血小板源生长因子 A 基因表达

各组动物血管壁内均有结合肝素的表皮样生长因子及血小板源生长因子基因表达, 高脂饲料组结合肝素的表皮样生长因子 mRNA 含量较普通饲料组显著增高, 但血小板源生长因子 mRNA 含量较普通饲料组显著降低(表 1、图 1 和 2, Table 1 and Figure 1 and 2)。

表 1. 血管壁结合肝素的表皮样生长因子及血小板源生长因子 A 基因表达。

Table 2. Expression of HB-EGF, PDGF-A in Arterial Walls ($\bar{x} \pm s$, %).

Groups	<i>n</i>	Ratio of HB-EGF to β-actin	Ratio of PDGF-A to β-actin
Common feed	6	34.56 ± 7.16	63.34 ± 7.38
High lipid feed	7	88.15 ± 6.01 ^a	40.74 ± 10.00 ^a

a: *P* < 0.01, compared with common feed group.

3 讨论

体外实验已经证明, 与动脉粥样硬化形成有关的几乎所有细胞类型如平滑肌细胞、单核-巨噬细胞、内皮细胞等均可产生结合肝素的表皮样生长因子^[1~4], 这些细胞受氧化型低密度脂蛋白、血管紧张素 II 等刺激后结合肝素的表皮样生长因子的表达

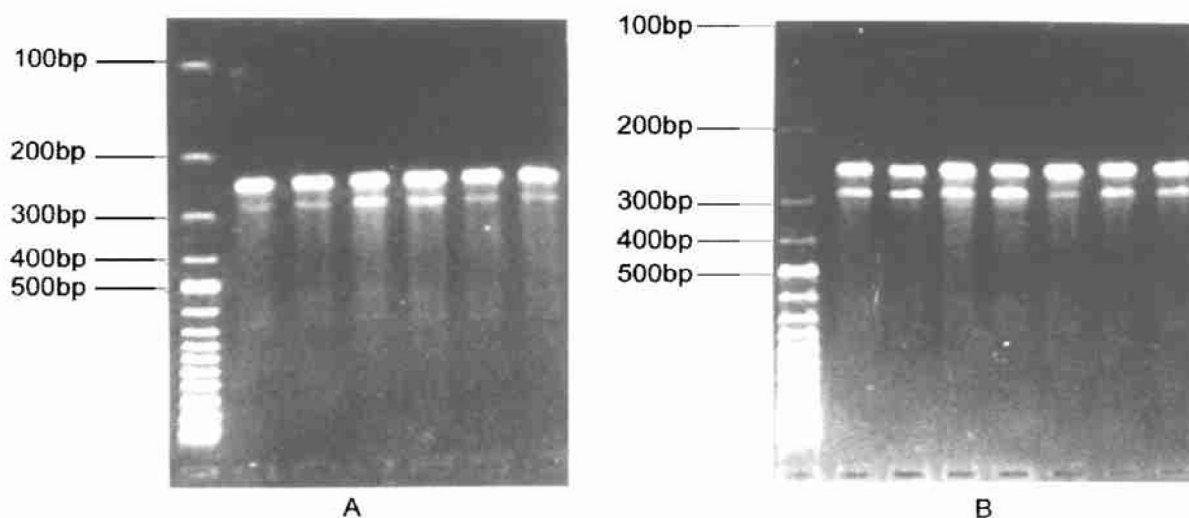


图 1. 结合肝素的表皮样生长因子逆转录聚合酶链反应产物电泳图.

Figure 1. Analysis of RT-PCR of HB-EGF. A: common feed group; B: high lipid feed group.

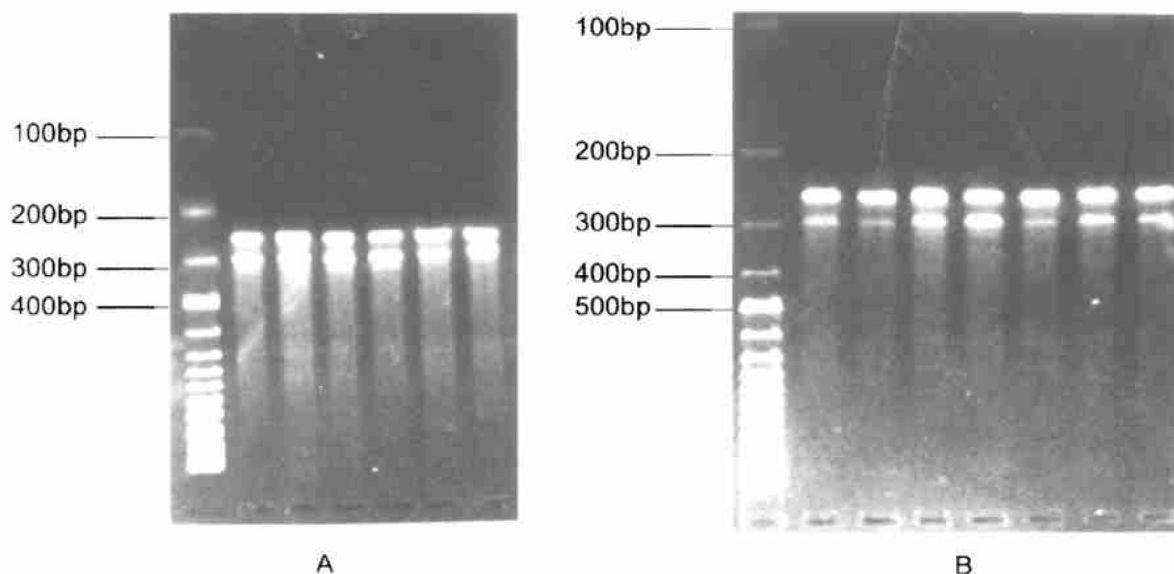


图 2. 血小板源生长因子 A 逆转录聚合酶链反应产物电泳图.

Figure 2. Analysis of RT-PCR of PDGF-A. A: common feed group; B: high lipid feed group.

量将明显增加^[2]。本研究对普通饲料组及高脂饲料组血管壁结合肝素的表皮样生长因子 mRNA 分析发现, 高脂饲料组兔血管壁结合肝素的表皮样生长因子 mRNA 显著增高, 血管壁内膜有大量泡沫细胞堆积及粥样硬化病灶形成, 由此推测高脂饲料组动物在长期高脂饮食等因素刺激下导致血管内皮损害、单核细胞浸润、平滑肌细胞由中膜向内膜移行并

增殖, 使结合肝素的表皮样生长因子产生增多, 结合肝素的表皮样生长因子反过来又刺激上述细胞进一步迁移及增殖, 提示结合肝素的表皮样生长因子可能在动脉粥样硬化的形成与发展中发挥重要作用。

本研究在正常动物血管壁也检测到少量的结合肝素的表皮样生长因子 mRNA, 而运用免疫组织化学、Northern 杂交及原位杂交等方法在正常血管壁中

未能检测出结合肝素的表皮样生长因子^[4]。这可能是由于正常动脉血管壁中结合肝素的表皮样生长因子的表达量低于免疫组织化学、原位杂交及 Northern 杂交所能检测出的浓度,但能被高灵敏的 RT-PCR 方法所检测的缘故。正常动脉壁中也存在低浓度的结合肝素的表皮样生长因子,提示结合肝素的表皮样生长因子除参与动脉粥样硬化等病理过程外,它的促有丝分裂作用可能在正常细胞的再生以及维护正常动脉血管壁的完整性等其他方面起积极作用。

PDGF 具有两条不同的多肽链,即 A 链和 B 链,由此构成不同的同聚体与异聚体。本研究结果发现,普通饲料组兔血管壁中血小板源生长因子基因表达较高脂饲料组显著增高。之所以出现上述实验结果,一方面可能是由于,血管壁血小板源生长因子的急性增高期未能捕捉到的缘故,一些学者发现血小板源生长因子只在动脉粥样斑块形成的初始阶段起作用^[10],因此错过血小板源生长因子的急剧增长后期后只会检测到低浓度的血小板源生长因子 mRNA;另一方面也可能由于血小板源生长因子的主要作用并非促进动脉粥样硬化的形成,血小板源生长因子在动脉粥样硬化的形成与发展中可能并不起重要作用。关于血小板源生长因子在动脉粥样硬化血管中的表达尚须大样本的实验来进行进一步的动态研究。

[致谢] 本实验得到中南大学湘雅医学院病理生理教研室尤家驛教授、分子生物学研究中心陈汉春副教授以及药理学教研室方云祥教授的悉心指导和大力帮助,在此一并致谢。

[参考文献]

- [1] Higashiyama S, Abraham JA, Miller J, et al. A Heparin-binding growth factor secreted by macrophage-like cells that is related to EGF. *Science*, 1991, **251**: 936-939
- [2] Miyagawa JI, Higashiyama S, Kawata S, et al. Location of heparin-binding EGF-like growth factor in the smooth muscle cells and macrophages of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1995, **268**: 18 330-334
- [3] Nakata A, Miyagawa JI, Yamashita S, et al. Location of heparin-binding EGF-like growth factor in human coronary arteries. *Circulation*, 1996, **94** (11): 2 778-786
- [4] Reape TJ, Wilson VJ, Kanczler JM, et al. Detection and cellular location of heparin-binding EGF-like growth factor mRNA and protein in human atherosclerotic tissue. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, **29**: 1 639-648
- [5] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: an update. *N Engl J Med*, 1986, **314**: 488
- [6] Lamb DJ, Avades TY, Ferns CA. Endogenous neutralizing antibodies against platelet-derived growth factor-A inhibit atherogenesis in the cholesterol-fed rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (6): 997-1 003
- [7] Rekhter MD, Gordon D. Does platelet derived growth factor-A chain stimulate proliferation of arterial mesenchymal cells in human atherosclerotic plaques. *Circ Res*, 1994, **75**: 410-417
- [8] Vaughan TJ, Pascall JC, Brown KD. Tissue distribution of mRNA for heparin-binding epidermal growth factor. *Biochem J*, 1992, **287**: 681-684
- [9] 张均田. 现代药理实验方法. 第一版, 北京: 北京医科大学协和医科大学联合出版社, 1998, 1 266-268.
- [10] Andreas S, Viviani H, Dieter T, et al. PDGF-A effectively stimulates early events but has no mitogenic activity in AKR-2B mouse fibroblasts. *Exp Cell Res*, 1992, **201** (1): 192-199

(此文编辑 文玉珊)