

文章编号:1005-6947(2005)12-0900-05

· 实验研究 ·

Egr-1, PDGF-B, TGF- β_1 在自体移植静脉中的实验研究

刘程伟, 胡新华, 杨军, 杨德华, 张强, 张志深, 段志泉, 辛世杰

(中国医科大学附属第一医院 血管外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 研究移植静脉中早期生长反应基因(Egr)-1、血小板源性生长因子(PDGF)-B、转化生长因子(TGF)- β_1 的表达,探讨它们之间的关系及其在内膜增生(IH)中的作用。方法 Wistar大鼠90只,建立自体静脉移植模型。术后随机分为1,2,6,24h,3,7,14,28,42d组,分别在相应时点取材,并设正常对照组。应用原位杂交和RT-PCR方法检测Egr-1、PDGF-B、TGF- β_1 的mRNA表达,联合应用Western蛋白印迹和免疫组织化学方法检测两组静脉中Egr-1、PDGF-B、TGF- β_1 蛋白表达情况,同时进行组织形态学研究。结果 正常静脉中未检测到Egr-1、PDGF-B、TGF- β_1 mRNA和蛋白的表达。移植静脉组Egr-1 mRNA在移植28d达高峰(45%±6%);PDGF-B mRNA在14d达高峰(48%±6%);TGF- β_1 mRNA在7d达高峰(46%±9%)。Egr-1蛋白表达在移植28d达高峰(40%±9%);PDGF-B蛋白在28d达高峰(45%±4%);TGF- β_1 蛋白在14d达高峰(41%±7%)。结论 移植静脉内膜增生与Egr-1、PDGF-B、TGF- β_1 的表达关系密切;PDGF-B和TGF- β_1 的激活及表达可能受Egr-1的调节,同时也可能通过反馈机制促进Egr-1的高表达。

关键词:移植,自体;血小板源生长因子;转化生长因子;静脉/移植

中图分类号:R392.4;R617

文献标识码:A

Experimental study of Egr-1, PDGF-B and TGF- β_1 genes in autogenous vein graft

LIU Cheng-wei, HU Xin-hua, YANG Jun, YANG De-hua, ZHANG Qiang, ZHANG Zhi-shen, DUAN Zhi-quan, Xin Shi-jie

(Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression and relationship of early growth response gene-1 (Egr-1), platelet-derived growth factor-B (PDGF-B) and transforming growth factor (TGF- β_1) in autogenous vein graft in rats, and the role in vein graft intimal hyperplasia (IH). **Methods** Autogenous vein graft model was established in 90 wistar rats. The vein graft samples were harvested at 1, 2, 6, 24 hours, and 3, 7, 14, 28, 42 days after surgery. Normal vein was used as control group. Egr-1, PDGF-B, TGF- β_1 mRNA was measured by reverse transcription-PCR and in situ hybridization. Western blotting and immunohistochemistry were used to detect the protein expression of Egr-1, PDGF-B and TGF- β_1 . **Results** Expression of Egr-1, PDGF-B, TGF- β_1 mRNA and protein was not detected in normal vein. In grafting vein, expression level of Egr-1 mRNA reached a peak at 28 days, and the positive rate of Egr-1 mRNA was 45% ± 6%; PDGF-B mRNA reached a peak at 14 days (48% ± 6%); a peak of TGF- β_1 mRNA was 46% ± 9% reached at 7 days; Egr-1 protein expression reached a peak at 28 days, and the positive rate of Egr-1 protein was 40% ± 9%. PDGF-B protein reached a peak at 28 days (45% ± 4%), TGF- β_1 protein reached a peak at 14 days (41% ± 7%). **Conclusions** Intimal hyperplasia of vein graft is closely associated with

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400435);辽宁省博士启动基金资助项目(20041053)。

收稿日期:2005-07-26; **修订日期:**2005-08-16。

作者简介:刘程伟(1976-),男,黑龙江鹤岗人,中国医科大学附属第一医院主治医师,主要从事血管外科方面的研究。

通信作者:刘程伟 电话:024-81916663; E-mail: liucwew@163.com。

expression of Egr-1, PDGF-B and TGF- β_1 ; the activation and expression of PDGF-B and TGF- β_1 may be modulated by Egr-1, and they may contribute to increase expression of Egr-1 by feedback.

Key words: Transplantation, Autologous; Platelet-Derived Growth Factor; Transforming Growth Factors; Veins/transplan

CLC number: R392.4; R617

Document code: A

目前移植静脉狭窄的主要原因是内膜增生(intimal hyperplasia, IH),而IH主要是血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)增殖、迁移和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)堆积的结果。已有研究^[1]表明:血小板源性生长因子-B(Platelet derived growth factor-B, PDGF-B)是一种与VSMCs增殖迁移关系密切的生长因子;转化生长因子- β_1 (Transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)是与细胞外基质(ECM)关系最密切的生长因子^[2];早期生长反应基因-1(Early growth response gene-1, Egr-1)能够激活多种基因的转录。本文旨在探讨Egr-1, PDGF-B, TGF- β_1 在IH中的作用以及它们在自体移植静脉中的关系。

1 材料与方 法

1.1 动物模型的建立及标本收集

Wistar大鼠90只(中国医科大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体重200~250g,10%水合氯醛溶液300mg/kg腹腔注射麻醉,在SXP-1B型显微镜下(10 \times)行无菌显微外科手术:取大鼠右颈总静脉长约5mm,肝素盐水冲洗后,用11-0血管缝合线端-端吻合置于肾下腹主动脉,手术前后均不用抗凝剂。实验动物随机分为9组(10只/组):分别为移植术后第1,2,6,24h,3,7,14,28,42d组。按期放血后处死实验动物,切取移植静脉(包括吻合口),同时取对侧颈总静脉作为对照组,液氮中冻存。

1.2 组织形态学染色

移植静脉置于10%中性福尔马林溶液固定24h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋制成蜡块,取移植静脉中段切成5 μ m厚切片,行HE和Masson染色,计算机图像分析系统采集图像,测量增生内膜厚度。

1.3 原位杂交

标本用0.1%焦磷酸二乙酯(DEPC)配制的4%多聚甲醛固定2h,梯度蔗糖脱水,冰冻切片包埋,恒冷切片机制成5 μ m厚切片。Egr-1, PDGF-B,

TGF- β_1 mRNA原位杂交试剂盒购自武汉博士德公司,采用地高辛标记的寡核苷酸探针,操作步骤参照试剂盒说明进行,DAB显色,400倍光镜下计数单位视野内阳性细胞百分比。

1.4 RT-PCR

试剂盒购自上海生工公司,软件Jellyfish结合Gene Bank序列设计由上海生工公司合成。

Egr-1 (448bp)	上游引物:5'-CAGTCGTAGTGACCACCTTACCA-3' 下游引物:5'-AGGTTGCTGTCATGCTGAAAGAC-3'
PDGF-B (284bp)	上游引物:5'-ATGATGAAGCCCTGGACTGC-3' 下游引物:5'-GCGGATCTGGACCAACAAAT-3'
TGF- β_1 (462bp)	上游引物:5'-CTGAACCAAGGAGACGGAATACA-3' 下游引物:5'-CAAAGCCTGCGGCACG-3'
β -actin (668bp)	上游引物:5'-TTGTAACCAACTGGGACGATA-3' 下游引物:5'-GATCTTGATCTTCATGCTGCT-3'

按试剂盒说明提取总RNA并逆转录成cDNA,PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C变性2min后,94 $^{\circ}$ C 30s,58 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min顺序循环30次,最后72 $^{\circ}$ C延伸10min,4 $^{\circ}$ C 10min。电泳后凝胶成像系统上摄像并分析各条带吸光度值。

1.5 免疫组织化学染色

抗Egr-1, PDGF-B, TGF- β_1 单克隆抗体均为武汉博士德公司产品(工作浓度1:100),按试剂盒说明行常规SABC染色,PBS代替一抗作阴性对照。400倍光镜下观察:细胞核或胞浆出现棕黄色(DAB显色)或红色(AEC显色)颗粒为阳性,不论染色强度,凡显色者均为阳性,计数单位视野内阳性细胞占总细胞百分数。

1.6 Western blot 检测

标本经细胞裂解液后,考马氏亮蓝R250染色法测总蛋白质浓度,电泳、转膜、封闭,一抗1:200稀释,室温下摇2h,1:500加入过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG, β -Naphthylacid phosphate和O-Dianisidine tetrazotized(sigma公司)显色,凝胶成像分析系统上摄像后计算光密度值。

1.7 统计学方法

SPSS10 统计软件处理数据,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内差异显著性采用方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 组织形态学变化

HE 及 Masson 染色显示,正常静脉内膜只覆盖着单层内皮细胞,中膜很薄由 2~3 层平滑肌细胞及胶原组成。移植 24h~3d 静脉管壁有大量炎性细胞浸润。移植 7~14d,内膜和中膜有大量增殖的 VSMCs,增生内膜中的 VSMCs 排列紊乱。移植 28d,血管基本完成内皮化,内膜增生达到高峰。这与笔者以往的研究^[3,4]一致。

2.2 RT-PCR 结果

正常静脉中未检测到 Egr-1, PDGF-B, TGF- β_1 的 mRNA 表达,在移植静脉中 Egr-1 mRNA 的表达具有双相变化。移植 1h Egr-1 mRNA 迅速升高,6h~3d 表达下降,7d 时重新升高,28d 时达高峰。移植 6h 出现 PDGF-B mRNA 的表达,24h~7d 逐渐增加,14d 时达高峰,28d 以后有所下降。移植 6h TGF- β_1 mRNA 出现表达,24h~3d 逐渐增多,7d 时 TGF- β_1 mRNA 的表达达到高峰,14d 以后逐渐降低(图 1)。

M: Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Marker; 1: 正常静脉

图 1 Egr-1 mRNA, PDGF-B mRNA, TGF- β_1 mRNA RT-PCR 扩增电泳图

2.3 原位杂交

移植 1h 移植静脉中膜部分 VSMCs 即出现 Egr-1 mRNA 阳性表达,28d 时阳性细胞表达最强(45% \pm 6%),主要位于新生内膜的 VSMCs(图 2),与其它各时点比较差异有非常显著意义($P < 0.01$); PDGF-B mRNA 和 TGF- β_1 mRNA 的阳性细胞移植 6h 在中膜部分的 VSMCs 中出现表达,以后都逐渐升高,PDGF-B mRNA 在 14d 时达高峰(48% \pm 6%)(图 3),TGF- β_1 mRNA 的表达 7d 达高峰(46% \pm 9%)(图 4),阳性细胞主要位于新生内膜的 VSMCs(表 1)。

图 2 Egr-1 mRNA 原位杂交可见新生内膜大量 VSMCs 细胞核和少量细胞浆呈现阳性表达(DAB \times 400)

图 3 PDGF-B mRNA 原位杂交可见新生内膜 VSMCs 细胞浆呈现阳性表达(DAB \times 400)

图 4 TGF- β_1 mRNA 原位杂交可见新生内膜 VSMCs 细胞浆呈现阳性表达(DAB \times 400)

表 1 原位杂交检测 Egr-1 mRNA, PDGF-B mRNA, TGF- β_1 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$, %)

分组	鼠数	正常静脉	1h	2h	6h	24h	3d	7d	14d	28d	42d
Egr-1	10	0	35 \pm 7 ¹⁾	17 \pm 3	8 \pm 2	8 \pm 6	8 \pm 4	15 \pm 5	25 \pm 3	45 \pm 6 ²⁾	28 \pm 2
PDGF-B	10	0	0	0	6 \pm 2	9 \pm 5	11 \pm 3	25 \pm 7	48 \pm 6 ²⁾	38 \pm 4	27 \pm 5
TGF- β_1	10	0	0	0	5 \pm 1	8 \pm 3	22 \pm 4	46 \pm 9 ²⁾	40 \pm 8	32 \pm 6	25 \pm 3

注:1)与移植 2h~14d 比较, $P < 0.01$; 2)与其它各时点比较, $P < 0.01$

2.4 Western 蛋白印迹

正常静脉中未检测到 Egr-1, PDGF-B, TGF-β₁ 阳性细胞。移植早期 2h 即有 Egr-1 蛋白的表达,并持续至 6h,移植 24h~3d 其表达下降,7d 时 Egr-1 蛋白表达重新增加,28d 达高峰;PDGF-B 在移植 6h 出现表达,并持续升高,28d 达高峰;移植 24h 检测到 TGF-β₁ 阳性细胞,之后逐渐增多至 14d 时达高峰(图 5)。

2.5 免疫组织化学染色

移植早期 Egr-1 蛋白表达主要位于中膜的 VSMCs 和单核细胞/巨噬细胞;移植后期(28d) Egr-1 阳性表达达高峰(40% ± 9%),主要位于新生内膜的 VSMCs,同时部分内皮细胞也有 Egr-1 蛋白的阳性表达(图 6)。移植早期 PDGF-B, TGF-β₁ 蛋白表达主要位于中膜的 VSMCs,移植后期 PDGF-B,

TGF-β₁ 蛋白表达主要位于新生内膜的 VSMCs(图 7~8),PDGF-B 蛋白表达在移植 28d 达高峰(45% ± 4%),TGF-β₁ 蛋白表达在移植 14d 达高峰(41% ± 7%)。阳性细胞的变化趋势与 Western 蛋白印迹结果基本一致(表 2)。

1: 正常静脉

图 5 Egr-1 蛋白, PDGF-B 蛋白, TGF-β₁ 蛋白 Western blot 结果

图 6 Egr-1 蛋白产物免疫组化染色, 阳性表达主要位于新生内膜的 VSMCs (DAB × 40)

图 7 PDGF-B 蛋白产物免疫组化染色, 阳性表达主要位于新生内膜的 VSMCs (DAB × 200)

图 8 TGF-β₁ 蛋白产物免疫组化染色, 阳性表达主要位于新生内膜的 VSMCs (AEC × 200)

表 2 免疫组织化学检测 Egr-1, PDGF-B, TGF-β₁ 蛋白质表达比较($\bar{x} \pm s$, %)

分组	鼠数	正常静脉	1h	2h	6h	24h	3d	7d	14d	28d	42d
Egr-1	10	0	0	30 ± 5 ¹⁾	29 ± 2 ¹⁾	7 ± 3	7 ± 8	10 ± 6	21 ± 7	40 ± 9 ²⁾	24 ± 4
PDGF-B	10	0	0	0	4 ± 2	8 ± 5	14 ± 3	20 ± 8	35 ± 2	45 ± 4 ²⁾	37 ± 6
TGF-β ₁	10	0	0	0	0	6 ± 2	14 ± 4	28 ± 4	41 ± 7 ²⁾	25 ± 4	14 ± 2

注:1)与移植 24h~14d 比较, P < 0.01; 2)与其它各时点比较, P < 0.01

3 讨论

静脉移植后可出现内皮剥脱、中膜损伤、血管平滑肌细胞(VSMCs)向内膜迁移和增殖,导致内膜增生(IH),从而导致移植血管狭窄、闭塞。Egr-1 是一种由 533 个氨基酸构成的 80~82kD 核磷酸蛋白。近来的研究发现:Egr-1 基因的功能主要表现在细胞内信号传递方面及参与多种基因的调控,包括生长因子基因、信号传导基因、转录因子

基因和癌基因等,对细胞生长、发育、分化和损伤修复起重要作用^[5]。PDGF-B 是一种碱性蛋白质生长因子,其主要靶细胞为中胚层来源的细胞,PDGF-B 的表达对血管平滑肌细胞具有促有丝分裂和趋化效应,参与血管损伤的再生过程。目前的研究表明 TGF-β₁ 是与细胞外基质(ECM)关系最密切的生长因子,它通过促进 ECM 的合成,抑制 ECM 降解酶(基质金属蛋白酶)的活性,促进细胞表面表达 ECM 受体(整合素)等作用,使 ECM 发生

积聚。

本研究结果表明: Egr-1, PDGF-B, TGF- β_1 在 VSMCs 的增殖和内膜增生过程中起重要作用。在移植静脉中 Egr-1 mRNA 的表达具有双相变化, 移植 1 h Egr-1 mRNA 迅速升高, 2 h 开始下降, 7 d 再次升高至 28 d 达高峰; PDGF-B 和 TGF- β_1 mRNA 的阳性细胞在移植 6 h 中膜部分 VSMCs 出现表达, PDGF-B mRNA 在 14 d 时达到高峰; 7 d 时 TGF- β_1 mRNA 的表达达到高峰。作为上游基因 Egr-1 的表达早于 PDGF-B 和 TGF- β_1 , 说明 PDGF-B 和 TGF- β_1 的激活及表达可能受 Egr-1 基因的调控, 其机制可能是 Egr-1 与 PDGF-B 和 TGF- β_1 启动子附近特殊的识别区域相结合后, 启动了 PDGF-B 和 TGF- β_1 的表达^[6]。已有研究^[7]表明, 转染 Egr-1 decoy 能够有效的减少 PDGF-B, TGF- β_1 表达的增加。移植早期 Egr-1, PDGF-B, TGF- β_1 主要在中膜 VSMCs 表达, 而移植后期 Egr-1, PDGF-B, TGF- β_1 则主要在新内膜 VSMCs 表达。移植 7 ~ 28 d 是移植静脉中 VSMCs 增殖、内膜增生的活跃时期。

Egr-1 蛋白在移植 2 h 即出现表达, 并持续至 6 h。这期间 Egr-1 蛋白的高表达可能是由于手术期间移植血管壁缺血和操作本身对血管内膜的损伤, 自体移植静脉血管壁承受高压的动脉血流冲击, 以及血管壁剪切力的改变, 引起细胞膜去极化, 使本来处于休眠的 Egr-1 基因迅速被激活, 细胞由 G₀ 期进入 G₁ 期导致细胞增殖。本研究证实, Egr-1 的高表达可以使其下游基因被激活并表达。有研究^[8]证实, PDGF-B 和 TGF- β_1 是由激活的巨噬细胞、VSMCs、血管内皮细胞产生或者由栓子内的血小板释放。本实验中, 移植静脉在移植 24 h 至 3 d Egr-1 蛋白表达下降, 可能是因为 Egr-1 蛋白通过与 Egr-1 基因启动子区域相结合而下调自身的表达, 这是一种自身调节的作用^[9]。移植 7 d Egr-1 蛋白的重新增加, 可能与新内膜 VSMCs 分泌的 PDGF-B, TGF- β_1 等多种生长因子通过反馈

机制刺激 Egr-1 增多有关。所以 Egr-1 与 PDGF-B, TGF- β_1 之间可能有相互促进作用。

参考文献:

- [1] Nishishita T, Lin PC. Angiopoietin 1, PDGF-B, and TGF-beta gene regulation in endothelial cell and smooth muscle cell interaction [J]. J Cell Biochem, 2004, 91(3): 584 - 593.
- [2] Mawatari K, Liu B, Kent KC. Activation of integrin receptors is required for growth factor-induced smooth muscle cell dysfunction [J]. J Vasc Surg, 2000, 31(2): 375 - 381.
- [3] 胡新华, 张强, 孙达欣, 等. 核转录因子 κ B 及其抑制基因在自体移植静脉中的表达 [J]. 中华医学杂志, 2002, 82(22): 1546 - 1549.
- [4] 胡新华, 杨军, 杨德华, 等. p38 MAPK 在自体移植静脉中的表达及其意义 [J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(1): 29 - 33.
- [5] Blaschke F, Bruemmer D, Law RE. Egr-1 is a major vascular pathogenic transcription factor in atherosclerosis and restenosis [J]. Rev Endocr Metab Disord, 2004, 5(3): 249 - 254.
- [6] Khachigian LM, Lindner V, Williams AJ, et al. Egr-1 induced endothelial gene expression: a common theme in vascular injury [J]. Science, 1996, 271(5254): 1427 - 1431.
- [7] Ohtani K, Egashira K, Usui M, et al. Inhibition of neointimal hyperplasia after balloon injury by cis-element 'decoy' of early growth response gene-1 in hypercholesterolemic rabbits [J]. Gene Therapy, 2004, 11(2): 126 - 132.
- [8] Kamimura M, Bea F, Akizawa T, et al. Platelet-derived growth factor induces tissue factor expression in vascular smooth muscle cells via activation of Egr-1 [J]. Hypertension, 2004, 44(6): 944 - 951.
- [9] Fahmy RG, Khachigian LM. Locked nucleic acid modified DNA enzymes targeting early growth response-1 inhibit human vascular smooth muscle cell growth [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(7): 2281 - 2285.