

论著·基础研究

PD-ECGF 基因上调在 PCI 术后血管内膜损伤修复中的作用研究*

朱晋坤¹,毛 华¹,尹扬光²,董 文¹,邓梦扬²,鲁玉明¹,熊宗华¹,杜 峰¹,文 美¹,刘廷筑¹

(1. 贵州省贵阳市第一人民医院内科 550002; 2. 重庆市第六人民医院重症医学科 400060)

摘要:目的 通过在兔颈动脉球囊损伤模型中转染血小板衍生内皮细胞生长因子(PD-ECGF)基因使其上调,探讨该基因在预防血管再狭窄中的作用。方法 36 只新西兰白兔(体质量 2.5~3.0 kg)建立兔颈动脉球囊损伤模型,分为实验组($n=18$)和对照组($n=18$):实验组使用病毒进行 PD-ECGF 基因转染;对照组采用交付剂处理。3 周后,采用 Evans 蓝染色和 HE 染色分别检测各组内皮覆盖率及新生内膜的改变情况;采用免疫组化技术和免疫印迹法检测颈动脉组织中 PD-ECGF 蛋白表达情况。结果 实验组内皮覆盖率 $[(72.8\pm 4.0)\%]$ 显著高于对照组 $[(33.6\pm 7.4)\%]$;HE 染色可见实验组内膜及中层平滑肌增生程度较对照组明显减轻;免疫组化及免疫印迹法结果均表明实验组颈动脉组织中 PD-ECGF 蛋白表达显著高于对照组($P<0.05$)。结论 在家兔颈动脉球囊损伤模型中,上调 PD-ECGF 基因具有抑制平滑肌细胞增殖和促进内皮细胞生长以及血管生成的作用。

关键词:血小板衍生内皮细胞生长因子;冠状动脉再狭窄;经皮冠状动脉介入治疗

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.17.014

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)17-2149-03

Preliminary study on repairing effect of up-regulated PD-ECGF gene in intimal injury after PCI*

Zhu Jinkun¹,Mao Hua¹,Yin Yangguang²,Dong Wen¹,Deng Mengyang²,Lu Yuming¹,Xiong Zonghua¹,Du Feng¹,Wen Mei¹,Liu Yanzhu¹

(1. Guiyang Municipal First People's Hospital, Guiyang, Guizhou, 550002, China;

2. ICU, the sixth People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400060, China)

Abstract: Objective To investigate the role of PD-ECGF gene in preventing the vascular restenosis by up-regulating the PD-ECGF gene in the rabbits' carotid artery balloon injury model. Methods 36 New Zealand white rabbits (body weight 2.5-3.0 kg) were established the rabbits' carotid artery balloon injury model and randomly divided into the experimental group ($n=18$) and the control group ($n=18$). The experimental group was received the PD-ECGF gene transfection by virus and the control group was treated with the delivery agent. After 3 weeks, the intima coverage rate was tested by Evans blue staining. HE staining was used to investigate the morphological alteration of neointima and accurately measure the area of arterial intima. Finally, the expression of PD-ECGF protein was determined by the immunohistochemical technique and Western blot. Results The intima coverage rate in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($72.8\pm 4.0\%$ vs. $33.6\pm 7.4\%$, $P<0.05$); the HE staining showed that the hyperplasia degrees of intima and middle-lever smooth muscle in the experimental group were significantly alleviated than the control group; moreover, the immunohistochemical and Western blot results showed that the expression of PD-ECGF protein in the experimental group was significantly higher than that in the control group ($P<0.05$). Conclusion Up-regulating PD-ECGF gene has the role for inhibiting the proliferation of vascular smooth muscle cells and promoting the epithelial cell growth and angiogenesis in rabbits' carotid artery balloon injury model.

Key words: platelet-derived endothelial cell growth factor; coronary restenosis; percutaneous coronary intervention

经皮冠状动脉介入治疗(PCI)是心肌梗死或不稳定型心绞痛血管重建的首选方法,能够有效地恢复冠状动脉血流,降低患者的病死率。然而,由于其术后易发生冠状动脉再狭窄,从而严重影响了该疗法的远期效果。研究表明,早期裸支架植入 PCI 术后血管再狭窄发生率可达 40%;虽然随着药物洗脱支架的运用,这一并发症发生率有所降低,但仍达到 11%^[1]。

防治 PCI 术后靶血管再狭窄及重建靶血管生物学功能的关键在于加速靶血管段的内皮覆盖、抑制局部平滑肌细胞过度增殖及促进受损血管的修复。最近的研究表明,使用促进血管生长的基因可加快和增加局部缺血患者侧支动脉的发展和促进血管再生^[2-3]。血小板衍生内皮细胞生长因子(PD-ECGF)又被称为胸苷磷酸化酶(TP),其具有趋化内皮细胞和促进血管生成的作用。在活体动物血管疾病研究中发现,PD-ECGF

基因转染具有促进血管生成的作用^[4]。本研究将 PD-ECGF 基因转染入兔颈动脉球囊损伤模型,探讨 PD-ECGF 基因是否拥有促进损伤血管再内皮化、抑制内膜增生及改善 PCI 术后靶血管再狭窄的作用,也为将来降低 PCI 术后靶血管不良重构和再狭窄提供一种新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 36 只雄性新西兰白兔,6 月龄,体质量 2.5~3.0 kg,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 家兔颈总动脉球囊损伤模型的建立及干预 动物适应性喂养 2 周后,分为对照组($n=18$)和实验组($n=18$),并行左颈总动脉球囊损伤术,具体步骤和方法参阅文献^[4-5]报道。实验组新西兰白兔于损伤颈总动脉内注入 PD-ECGF 基因(病

毒含量 1×10^{10} cfu/100 μ L, 共 0.1 mL, 由上海吉凯基因生物技术公司合成), 保留 10 min; 对照组则注入同等体积的交付剂无菌生理盐水保留 10 min。为了更好地促进 PD-ECGF 基因的转染, 实验组损伤动脉外膜给予含 PD-ECGF 基因(病毒含量 1×10^{10} cfu/100 μ L, 共 0.1 mL) 的 40% gel F-127 促进转染; 对照组则给予不含病毒的 0.1 mL 40% gel F-127 处理。随后, 生理盐水清洗手术切口, 逐层缝合皮下组织与皮肤。术后给予青霉素 10×10^4 U/kg 肌肉注射预防感染。

1.2.2 病理组织学检查 Evans 蓝染色: 3 周后, 取实验组和对照组家兔各 6 只, 经耳缘静脉注入 0.5% Evans 蓝, 取颈动脉损伤节段, 沿血管长轴剪开, 平铺观察着色情况(着色部分为损伤后仍未修复的内皮), 并计算内皮细胞覆盖率[内皮细胞覆盖率 = 内皮细胞覆盖面积(IA)/总面积(TA)]。HE 染色: 3 周后, 两组各取家兔 6 只, 收集颈动脉损伤节段约 1.5~2.0 cm, 甲醛溶液固定, 梯度脱水, 石蜡包埋并切片(5 μ m)。HE 染色后测量平均内膜厚度、平均中膜厚度及内膜面积与中膜面积比值(I/M)。内膜面积 = 内弹力膜包绕面积 - 管腔面积, 中膜面积 = 外弹力膜包绕面积 - 内弹力膜包绕面积。

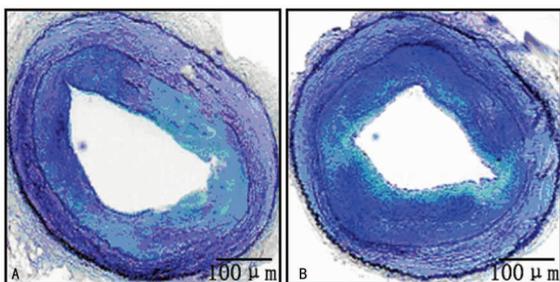
1.2.3 PD-ECGF 免疫组化染色 各组石蜡切片(5 μ m, $n=6$)行 PD-ECGF 免疫组化染色, 具体方法见参考文献[6], 一抗为鼠单克隆 PD-ECGF(Santa 公司, 1:500), 二抗为山羊抗小鼠(北京中杉公司, 1:3000), 以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。免疫组化结果判定: PD-ECGF 表达阳性和阴性, 根据细胞染色强度和染色细胞所占面积二者积分之和来判断。染色强度积分为: 不染色 = 0, 轻度染色 = 1, 中度染色 = 2, 强染色 = 3; 染色面积积分为: 无细胞染色 = 0, <25% 细胞染色 = 1, 25%~50% 细胞染色 = 2, >50% 细胞染色 = 3。若两种积分之和大于 2, 则为 PD-ECGF 表达阳性, ≤ 2 则为表达阴性[7]。

1.2.4 免疫印迹法检测 PD-ECGF 蛋白表达 3 周后, 处死 2 组各 6 只家兔, 收集颈动脉损伤节段约 2~3 cm, 提取组织总蛋白并测定蛋白浓度, 各组取 40 μ g 全蛋白在 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳, 随后, 蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 加一抗[小鼠单克隆 PD-ECGF (1:1000) 和小鼠单克隆 β -actin (1:2000)], 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜, 加辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗(1:4000), 室温孵育 2 h, 洗膜后使用化学发光法在 Bio-Rad 分子成像仪上成像。

1.3 统计学处理 采用统计学软件 SPSS 16.0 进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Evans 蓝染色 动物喂养 3 周后实验组和对照管壁均有白色不着色部分, 呈斑片状, 内皮覆盖率为 (72.8 \pm 4.0)% 和 (33.6 \pm 7.4)%; 实验组内皮覆盖率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 见图 1、2。

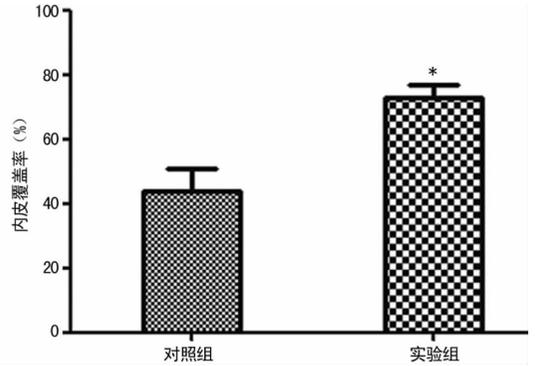


A: 实验组; B: 对照组。

图 1 典型颈动脉 Evans 蓝染色

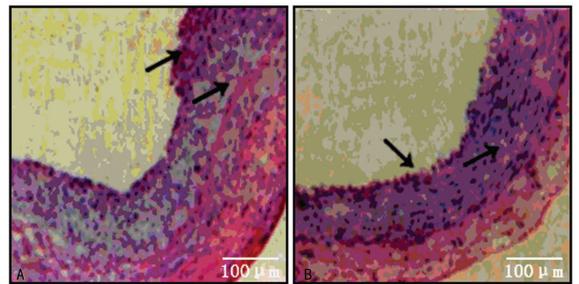
2.2 HE 染色 HE 染色显示, 3 周后对照组血管内膜明显增

厚, 平滑肌细胞排列紊乱, 而实验组血管内膜增生显著减轻, 中膜平滑肌及胶原组织增生均无对照组明显(图 3)。两组平均内膜厚度、平均中膜厚度及 I/M 见表 1。



*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 2 对照组和实验组内皮覆盖率情况



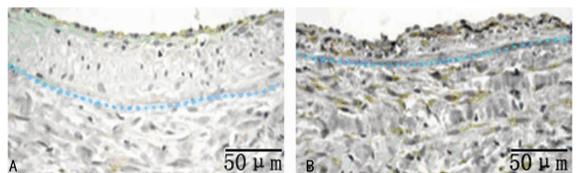
A: 对照组; B: 实验组。

图 3 颈动脉 HE 染色 ($\times 100$)

表 1 两组平均内膜厚度、平均中膜厚度及 I/M ($\bar{x} \pm s$)

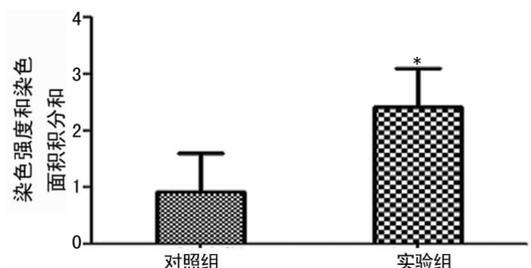
项目	n	实验组	对照组
平均内膜厚度(μ m)	6	66.5 \pm 2.5*	98.4 \pm 4.6
平均中膜厚度(μ m)	6	99.1 \pm 9.3*	139.2 \pm 1.2
I/M(%)	6	41.2 \pm 7.0*	90.3 \pm 6.9

*: $P < 0.05$, 与对照组比较。



A: 对照组; B: 实验组。

图 4 PD-ECGF 在颈动脉组织中的表达 ($\times 200$)



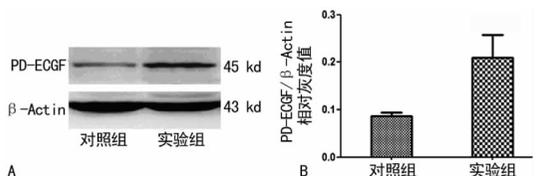
*: $P < 0.05$, 与对照组比较。

图 5 PD-ECGF 在颈动脉中染色面积和染色强度积分和改变情况

2.3 免疫组织化学染色分析 PD-ECGF 在颈动脉组织中主要表达于血管内皮细胞、间质细胞, 染色主要在细胞质和细胞

核内(图 4、5)。实验组中 PD-ECGF 阳性表达率显著高于对照组($P < 0.05$)。

2.4 免疫印迹法检测 PD-ECGF 表达 免疫印迹法检测证实实验组 PD-ECGF 蛋白在受损颈动脉细胞中的表达明显高于对照组($P < 0.01$),见图 6。



A: 3 周后 PD-ECGF 蛋白表达, B: PD-ECGF/ β -Actin 相对灰度值。

图 6 免疫印迹法检测 PD-ECGF 表达

3 讨 论

PCI 术后血管内皮细胞层不可避免地受到损伤,内皮层完整性的破坏是血栓形成的起始环节,这也将启动血管壁粥样斑块的进程,并导致内膜反应性增生^[8]。内皮损伤的自我修复是个漫长的过程,在内皮层修复前,血液中的血管活性物质与内皮下血管壁接触,一方面引起血栓形成,另一方面,血管平滑肌细胞在这些活性物质的刺激下也发生反应性的增生,结局是血管再狭窄的发生。

PD-ECGF 最早于 1987 被提取出,大量的实验证明了 PD-ECGF 与肿瘤血管生成之间的关系^[9-10]。PD-ECGF 是一个相对分子质量 55×10^3 的多肽,在体内是常以 110×10^3 的二聚体存在,是内皮细胞的有丝分裂原,而 PD-ECGF 作为一种血管生长因子,在体内与体外都被证实有血管新生作用^[9-11]。PD-ECGF 也是嘧啶核苷合成和分解代谢中一个重要的酶,能同时催化胸腺嘧啶核苷去磷酸化为胸腺嘧啶和 2-脱氧-核糖-1-磷酸并且催化以上 2 种物质代谢为 β -氨基异丁酸和 2-脱氧-D-核糖,这些物质都具有明显刺激血管生成和促进血管延长作用^[12-13]。目前对于 PD-ECGF 促进血管生成作用的机制公认为:(1)PD-ECGF 促进血管生成作用是通过其酶活性而达到的;(2)酶活性作用降低了细胞内外胸腺嘧啶核苷及其他抑血管生成物的浓度;(3)PD-ECGF 的代谢产物中含有促进血管生成的物质^[14]。体外实验研究表明,受损的内皮细胞可通过摄取血小板内的 PD-ECGF 调节自身内环境的平衡,从而使损伤得以修复。另外,在体外实验中 PD-ECGF 能抑制平滑肌细胞的增殖^[15-16]。这些研究充分提示了 PD-ECGF 在预防损伤血管再狭窄中可能发挥较大的作用。

本实验发现,与对照组相比,家兔颈动脉球囊损伤后转染 PD-ECGF 基因,能明显提高损伤动脉的内皮覆盖率。此外,HE 染色发现血管内膜增生显著减轻,中膜平滑肌及胶原组织增生均不明显,管腔狭窄率与对照组相比也显著减低。以上表明,PD-ECGF 基因能有效促进损伤后血管内皮细胞的修复,同时也能有效抑制平滑肌细胞的过度活化增殖,从而使血管发生再狭窄的比例也显著下降。本研究通过免疫组化染色和免疫印迹法分析发现,3 周后实验组 PD-ECGF 表达水平明显高于对照组,可见,PD-ECGF 基因通过简单的转染方式在实验组家兔颈动脉中也得到了有效的表达。事实上,PD-ECGF 除了能促进血管生成外,还能抑制血管平滑肌细胞增殖和促进其凋亡。作者推测,PD-ECGF 可能通过多种途径来促进内皮细胞和血管的生成,以及抑制血管平滑肌细胞增殖,其具体的分子机制作者将在下一步的研究中深入阐述。

综上所述,PD-ECGF 基因的转染在损伤血管中表现出了

趋化内皮细胞、促进血管生成和抑制平滑肌细胞增殖的作用,这提示 PD-ECGF 基因转染治疗对颈动脉球囊损伤后预防血管再狭窄有较好的疗效。PD-ECGF 基因转染可为 PCI 术后防治血管再狭窄提供新的思路、观念。

参考文献:

- [1] Teeuwen K, Adriaenssens T, Henriques JP, et al. A randomized multicenter comparison of hybrid sirolimus-eluting stents with bioresorbable polymer versus everolimus-eluting stents with durable polymer in total coronary occlusion: rationale and design of the Primary Stenting of Occluded Native Coronary Arteries IV study[J]. *Trials*, 2012(13):240.
- [2] Eibel B, Rodrigues CG, Giusti II, et al. Gene therapy for ischemic heart disease: review of clinical trials[J]. *Rev Bras Cir Cardiovasc*, 2011, 26(4):635-646.
- [3] Yla-Herttuala S. Cardiovascular gene therapy with vascular endothelial growth factors[J]. *Gene*, 2013, 525(2):217-219.
- [4] Yamada N, Li W, Ihaya A, et al. Platelet-derived endothelial cell growth factor gene therapy for limb ischemia[J]. *J Vasc Surg*, 2006, 44(6):1322-1328.
- [5] Ward MR, Agrotis A, Kanellakis P, et al. Inhibition of protein tyrosine kinases attenuates increases in expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors following arterial injury[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, 17(11):2461-2470.
- [6] Ramakrishnan R, Chaudhry IH, Ramdial P, et al. Primary cutaneous adenoid cystic carcinoma: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 27 Cases[J]. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37(10):1603-1611.
- [7] Mattern J, Koomagi R, Volm M. Biological Characterization of subgroups of squamous cell lung carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5:1459-1463.
- [8] Kipshidze N, Dangas G, Tsapenko M, et al. Role of the endothelium in modulating neointimal formation: vasculo protective approaches to attenuate restenosis after percutaneous coronary interventions [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 44(4):733-739.
- [9] Miszczak-Zaborska E, Smolarek M, Bartkowiak J. Influence of the thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) on tumor angiogenesis[J]. *Catalytic activity of enzyme inhibitors* [J]. *Postepy Biochem*, 2010, 56(1):61-66.
- [10] Zhang SH, Zhang H, He HW, et al. Lidamycin up-regulates the expression of thymidine phosphorylase and enhances the effects of capecitabine on the growth and pulmonary metastases of murine breast carcinoma[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72(4):777-788.
- [11] Bronckaers A, Gago F, Balzarini J, et al. The dual role of thymidine phosphorylase in cancer development and chemotherapy[J]. *Med Res Rev*, 2009, 29(6):903-953.
- [12] Bera H, Tan BJ, Sun L, et al. A structure-activity relationship study of 1,2,4-triazolo[1,5-a] (下转第 2154 页)

2.5 免疫组织化学检测结果 NF- κ B 和 α -SMA 在正常肝组织的所有细胞中均微量表达。NF- κ B 主要分布在细胞核内及部分胞质,而 α -SMA 主要在肝细胞的胞质中表达。镜下观察模型组大鼠肝组织中 NF- κ B 和 α -SMA 蛋白表达广泛,其阳性染色面积均高于正常对照组、APA 组和三七丹参组 ($P < 0.01$),且呈现深棕黄色。而 APA 组与三七丹参组比较,NF- κ B 蛋白阳性染色面积表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), α -SMA 蛋白阳性染色面积表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$),见表 3。

表 3 各组大鼠肝组织中 NF- κ B 和 α -SMA 阳性表达面积的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	NF- κ B	α -SMA
正常对照组	10	13.620 \pm 4.963	22.990 \pm 1.185
模型组	9	44.900 \pm 5.143 Δ	63.020 \pm 5.366 Δ
APA 组	9	25.410 \pm 3.073 \blacktriangle	32.400 \pm 2.721 \blacktriangle
三七丹参组	10	27.330 \pm 5.168 \blacktriangle	43.410 \pm 4.335 $\blacktriangle\blacktriangle$

Δ : $P < 0.01$,与正常对照组比较; \blacktriangle : $P < 0.01$,与模型组比较。

3 讨 论

肝纤维化是多种因素作用的结果,越来越多的国内外学者认为肝纤维化主要是由于多种细胞因子激活肝星状细胞,导致细胞外基质的沉积和降解减少。本实验主要观察了 NF- κ B 和 α -SMA 两个因子在肝脏中的表达情况,并探讨 APA 抗大鼠实验性肝纤维化的作用机制。

NF- κ B 是众多细胞因子和炎症介质表达的主要转录因子,是多种信号转导途径的汇聚点^[2]。NF- κ B 蛋白正常情况下与 I κ Ba 结合存在于肝脏多种细胞的细胞质中,当 NF- κ B 受到一些反式信号通路激活时(主要是 I κ B 激酶),它可以使 I κ Ba 蛋白泛素化和降解,导致 NF- κ B 激活并向细胞核移位,从而导致肝星状细胞(HSC)活化并呈现 NF- κ B 的核转位活性^[3]。活化的 HSC 内 NF- κ B 活性增强,导致肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、细胞间黏附分子(ICAM)-1、转化生长因子(TGF)- β 1 等 NF- κ B 下游致炎因子表达增强,放大了肝脏炎症损伤反应^[4]。长时间的炎症反应导致肝脏的纤维化。

α -SMA 被视为肝纤维化的一个很好的标志物,有研究表明氧化应激在 HSC 活化过程中起了重要的作用,可以刺激 HSC 活化并转化为 α -SMA 阳性的成纤维细胞^[5]。此外,虽然 α -SMA 也可以由其他类型的细胞来表达,但是 α -SMA 被称为

HSC 活化的一个可靠标志^[6]。HSC 在正常情况下是静态的,它的激活使过量的胶原蛋白沉积在肝脏而导致肝纤维化^[7]。

本实验病理形态学和血液生化检查结果表明,APA 能显著降低肝纤维化分期程度和改善肝功能,对四氯化碳所致的大鼠肝纤维化有一定的防治作用。本研究尚发现 NF- κ B 和 α -SMA 在模型组中高度表达,而在 APA 组和三七丹参组中表达相对较少,即纤维化程度越高,NF- κ B 和 α -SMA 表达水平相对较高。由此可以推断 APA 抗纤维化作用可能与其可以降低肝纤维化组织中 NF- κ B 和 α -SMA 的表达水平有关。进一步深入研究 APA 与肝纤维化的关系及其潜在的机制具有深远意义,将为治疗肝纤维化药物开拓新的道路。

参考文献:

- [1] 李武,段丽芳,何贵清,等.不同剂量美洲大蠊提取物抗小鼠实验性肝纤维化的研究[J].中华肝脏病杂志,2009,17(12):948-951.
- [2] 张彩华,姜妙娜,李寒妹,等.肝复康对肝纤维化大鼠肝组织 NF- κ B、MMP-2 和 TIMP-2 表达的影响[J].临床肝胆病杂志,2011,14(3):169-172.
- [3] Watson MR,Wallace K,Gieling RG,et al. NF-kappaB is a critical regulator of the survival of rodent and human hepatic myofibroblasts[J].J Hepatol,2008,48(4):589-597.
- [4] 周宇,陈科全,叶石才,等.核因子- κ Bp65 反义寡核苷酸对肝纤维化作用的实验研究[J].中华肝脏病杂志,2009,29(4):254-257.
- [5] 张志勇,金武丕,许晓俊.核转录因子- κ B 与酒精性肝病的研究进展[J].临床肝胆病杂志,2010,26(3):269-271.
- [6] Leung TM,Fung ML,Liong EC et al. Role of nitric oxide in the regulation of fibrogenic factors in experimental liver fibrosis in mice[J].Histol Histopathol,2011,26(2):201-211.
- [7] Wu LM,Wu XX,Sun Y,et al. A novel synthetic oleanolic acid derivative(CPU-II2) attenuates liver fibrosis in mice through regulating the function of hepatic stellate cells [J].J Biomed Sci,2008,15(2):251-259.

(收稿日期:2013-10-01 修回日期:2014-02-23)

(上接第 2151 页)

- [1,3,5] triazin-5,7-dione and its 5-thioxo analogues on anti-thymidine phosphorylase and associated anti-angiogenic activities[J].Eur J Med Chem,2013(67):325-334.
- [13] Haraguchi M,Miyadera K,Uemura K,et al. Angiogenic activity of enzymes[J].Nature,1994,368(6468):198.
- [14] 李冰.血小板衍生内皮细胞生长因子的研究进展[J].国际妇产科学杂志,2008,35(2):86-88.
- [15] Li W,Tanaka K,Morioka K,et al. Long-term effect of

gene therapy for chronic ischemic myocardium using platelet-derived endothelial cell growth factor in dogs [J].J Gene Med,2008,10(4):412-420.

- [16] Li W,Tanaka K,Ihaya A,et al. Gene therapy for chronic myocardial ischemia using platelet-derived endothelial cell growth factor in dogs[J].Am J Physiol Heart Circ Physiol,2005,288(1):408-415.

(收稿日期:2013-09-24 修回日期:2014-02-11)