

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2000)-02-0096-03

血管再狭窄发生过程中血浆组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂活性与胶原转换的变化

周秀霞, 温进坤, 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 血管再狭窄; 骨桥蛋白; 纤溶酶原激活物, 组织型; 纤溶酶原激活物抑制剂; 胶原

[摘要] 为探讨血管再狭窄发生过程中血浆组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂活性与胶原转换及骨桥蛋白基因表达的变化, 采用发色底物法检测组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂活性; 应用 Northern 印迹观察骨桥蛋白基因表达活性。结果表明, 大鼠主动脉内皮剥脱后 3 天, 血浆组织型纤溶酶原激活物活性开始升高, 第 7 天达高峰, 由对照组的 296.1 ± 120.2 IU/L 上升为 856.2 ± 195.3 IU/L, 之后随内皮剥脱时间的延长虽有所下降, 但在所观察的时间范围内, 均显著高于对照水平 ($P < 0.05$)。羟脯氨酸测定结果显示, 内皮剥脱后 3 天血管壁胶原降解开始增加, 第 7 天达高峰, 是对照组的 1.6 倍。此外, 大鼠主动脉内皮剥脱诱导了骨桥蛋白基因表达, 内皮剥脱后 3 天其表达活性为对照组的 5 倍。提示在血管再狭窄发生过程中, 血浆组织型纤溶酶原激活物和骨桥蛋白参与血管重构过程。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

The Changes of Plasma Tissue Plasminogen Activator and its Inhibitor Activity and Collagen Turnover during Vascular Restenosis Development

ZHOU Xiu-Xia, WEN Jin-Kun, and HAN Mei

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

MeSH Vascular Restenosis; Osteopontin; Alteplase; Plasminogen Activator Inhibitor; Collagen

ABSTRACT **Aim** To explore the changes of plasma tissue plasminogen activator (tPA), plasminogen activator inhibitor (PAI) activity, collagen degradation and osteopontin gene expression during vascular restenosis development. **Methods** The activities of tPA and PAI were measured by tPA and PAI kits, Northern blotting was used to detect osteopontin gene expression.

Results The activity of tPA increased at 3 d after de-endothelialization, and peaked at 7 d, the level of tPA increased from 296.1 ± 120.2 IU/L (control group) to 856.2 ± 195.3 IU/L (7 d). The results of hydroxyproline concentration showed that the collagen degradation increased at 3 d and peaked at 7 d after de-endothelialization, about 1.6 times compared with the control.

Osteopontin gene expression was remarkably induced by de-endothelialization, the peak expression was at 3 d after operation, and was about 5 times comparing with the control, then osteopontin gene expression decreased and returned to the control level at 14 d after operation.

Conclusions Osteopontin, collagen turnover and tPA take part in the process of vascular remodeling during vascular restenosis development.

血管内皮损伤所引发的中膜血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 增殖、向内膜下迁移及分泌细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是血管成形术后再狭窄的病理基础。已经证明, VSMC 从中膜向内膜迁移除需要对 ECM 进行降解外, 还需要 ECM 中的粘附蛋白—骨桥蛋白的介导^[1]。近年

发现, VSMC 合成与分泌的丝氨酸蛋白酶 (如纤溶酶) 和基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 均可降解 ECM^[2]。在正常情况下, 两类蛋白酶均以酶原形式存在, 纤溶酶原被组织型纤溶酶原激活物 (tissue plasminogen activator, tPA) 激活后, 既可直接作用于 ECM, 又可通过激活 MMP 而间接对 ECM 发挥降解作用, 因此, tPA 及其抑制剂 (plasminogen activator inhibitor, PAI) 对 ECM 降解具有重要调节作用。了解血管再狭窄发生过程中骨桥蛋白基因表达和 tPA、PAI 活性变化的规律, 对进一步认识血管再狭窄的发生机制具有重要意义。

[基金项目] 国家自然科学基金 (39770312) 及河北省自然科学基金 (398284) 资助

[作者简介] 周秀霞, 女, 1965 年 10 月出生, 博士。温进坤, 男, 1954 年出生, 教授, 博士研究生导师, 主攻心血管的分子生物学研究, 现任河北医科大学校长、河北省生物化学学会理事长等职务。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠, 体重 300~ 350 g, 由河北省实验动物中心提供, 骨桥蛋白 cDNA 探针为本室保存, 随机引物标记试剂盒为 Promega 公司产品, α -³²P-dCTP 购自北京亚辉生物医学公司, 血浆 tPA、PAI 测定试剂盒由上海亚都生物技术公司提供, 其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 大鼠主动脉内皮剥脱模型的制备

参照 Bendeck 等^[3]方法制备, 分别于术后第 3、7、14 及 21 天取血分离血浆, 取损伤部位血管分别用于总 RNA 提取及胶原降解测定, 每个时间点标本数为 6, 对照组行左颈总动脉结扎术。

1.3 血浆组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂活性测定

分别于内皮剥脱后第 3、7、14 及 21 天从大鼠心脏取血, 置于含 1/10 体积抗凝剂(0.109 mmol/L 枸橼酸钠)的试管中, 混匀, 4℃, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆, 用发色底物法测定 tPA 和 PAI 活性。

1.4 羟脯氨酸含量测定

按文献[4]方法, 将损伤部位血管经丙酮-乙醚(1:1)脱脂、干燥后称取 3~ 5 mg, 加 0.9% NaCl 制成匀浆, 用 2 mol/L HCl 调 pH 值至 2~ 2.5, 胃蛋白酶消化 72 h, 加 50 μ L 1 mol/L pH 8.0 的 Tris-Cl 终止反应后, 加入 200 μ L 1.2 mol/L 高氯酸, 4 000 r/min 离心 10 min, 上清即为降解的小分子胶原。置 110℃烤箱干燥后, 6 mol/L HCl 110℃水解 24 h, 4 mol/L NaOH 调 pH 值至 5.0~ 7.0, 定容, 过滤。取滤液 0.2 mL, 加入 0.5 mol/L 氯胺 T 0.5 mL, 室温氧化 6 min, 高氯酸终止反应。加入 0.5 mL 10% 对二甲氨基苯甲醛, 75℃~ 80℃显色 20 min, 冷却后于波长 560 nm 比色测定羟脯氨酸含量。

1.5 Northern 印迹分析

用异硫氰酸胍一步法^[5]分别从对照及内皮剥脱不同时间的大鼠主动脉中提取 RNA, 各取 30 μ g, 进行 1% 琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳, 转移至尼龙膜上后, 按文献[6]方法与用随机引物法标记的骨桥蛋白 cDNA 探针进行杂交及放射自显影。

1.6 统计学方法

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 血浆组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂活性的变化

大鼠血浆 tPA 活性于主动脉内皮剥脱后 3 天开始升高, 第 7 天达高峰, 之后随内皮剥脱时间的延长, tPA 活性逐渐下降, 但在所观察的时间范围内, 各时间点的 tPA 活性均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。在本实验条件下, 各时间点的血浆 PAI 活性虽有所升高, 但无统计学意义(图 1, Figure 1)。

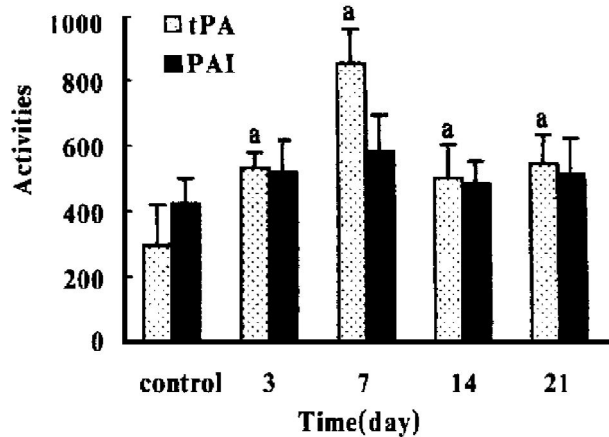


图 1. 血管内皮剥脱后血浆组织型纤溶酶原激活物及其抑制剂活性的变化

Figure 1. The changes of plasma tPA and PAI activity in control and de-endothelialized rats. a: $P < 0.05$, compared with the control. tPA: IU/L; PAI: AU/L.

2.2 胶原降解的变化

胶原降解于大鼠主动脉内皮剥脱后 3 天开始增加, 第 7 天达到高峰, 分别为对照组的 1.3 倍和 1.6 倍。之后, 随内皮剥脱时间延长, 胶原降解程度逐渐减低。内皮剥脱后 14 天及 21 天胶原降解略高于对照组, 无统计学差异(图 2, Figure 2)。

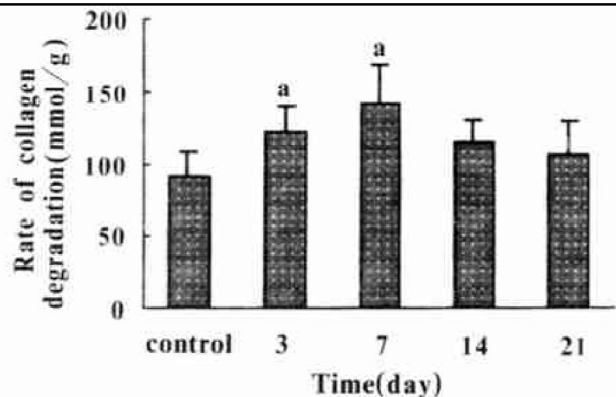


图 2. 血管内皮剥脱后胶原降解的测定。

Figure 2. Measurement of collagen degradation in control and de-endothelialized rat aortas. a: $P < 0.05$, compared with the control.

2.3 骨桥蛋白基因表达活性的变化

如图 3(Figure 3) 所示, 从对照和内皮剥脱不同时间的主动脉提取的 RNA 与骨桥蛋白 cDNA 探针

杂交后,在 18S 附近出现一条杂交区带。从杂交信号的强度可知,对照血管骨桥蛋白表达活性很低,而主动脉内皮剥脱后该基因的表达被显著诱导,术后第 3 天达到高峰,其强度约是对照组的 5 倍,之后其表达活性逐渐下降,术后第 7 天为对照组的 2.7 倍,第 14 天恢复到对照水平。

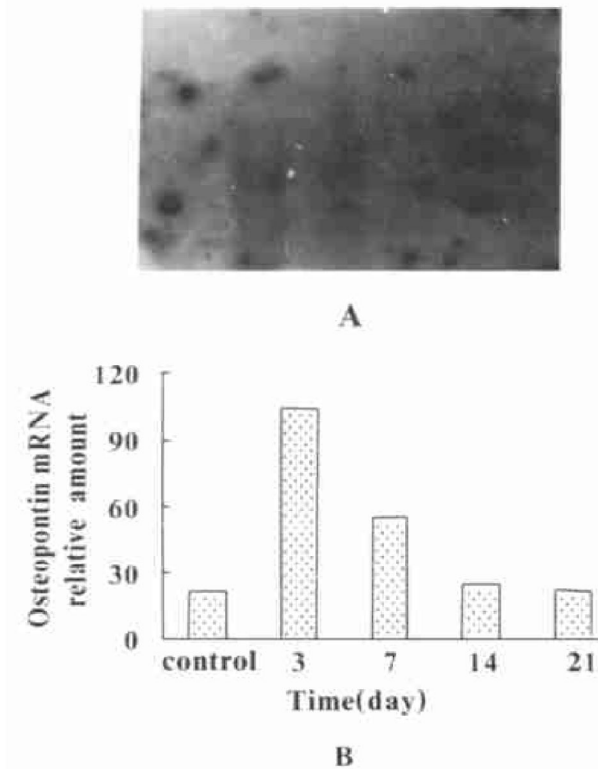


图 3. 血管内皮剥脱后骨桥蛋白基因表达的变化。

Figure 3. Northern blot analysis of osteopontin mRNA expression in control and de-endothelialized rat aorta. A: autoradiogram; B: densitometric scanning.

3 讨论

正常情况下,动脉壁中层的 VSMC 处于分化状态,呈收缩表型,没有增殖和迁移的能力。在一些刺激因素影响下,VSMC 可由分化状态转变为去分化状态,即由收缩表型转变为合成表型,并从中膜迁移至内膜下进行大量增殖,这是导致动脉粥样硬化斑块形成及血管成形术后再狭窄的主要原因。已经证明,细胞外基质降解是 VSMC 迁移的必要条件,tPA 通过调节纤溶酶和基质金属蛋白酶的活性对细胞外基质降解发挥调节作用^[2]。本实验结果显示,血管内皮剥脱后 3 天 tPA 活性开始增加,第 7 天达高峰。

但在此期间,PAI 活性的升高远不像 tPA 那样显著。可见,在血管内膜损伤早期 tPA 活性的升高和 tPA 与 PAI 之间的平衡失调造成纤溶酶和基质金属蛋白酶的激活,从而导致胶原降解速度明显加快,为 VSMC 从中膜向内膜下迁移创造了条件。骨桥蛋白是一种细胞粘附蛋白,通过识别整合素 $\alpha\beta_3$ 而介导细胞的粘附与迁移过程^[7]。我们曾报道,血管内皮损伤部位释放的多种细胞因子和生长因子均可刺激骨桥蛋白表达^[8]。本文发现,血管内皮剥脱后 3 天,骨桥蛋白基因表达活性达到高峰,约为对照血管的 5 倍,该蛋白的合成与分泌为 VSMC 的迁移提供了外部环境。可见,细胞外基质的降解与骨桥蛋白的合成共同参与血管新生内膜的形成及再狭窄的发生发展过程。然而,血管成形术后再狭窄的发生机制十分复杂,VSMC 的迁移与增殖除需一定的外部条件外,细胞本身也起着非常重要的作用。

参考文献

- [1] Liaw L, Almeida M, Hart CE, et al. Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth vascular cell in vitro [J]. *Circ Res*, 1994, **74**: 214-224
- [2] Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 1995, **77**: 863-868
- [3] Bendeck MP, Irvin C, Reidy MA. Inhibition of matrix metalloproteinases activity inhibits smooth muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury [J]. *Circ Res*, 1996, **78**: 38-43
- [4] 李玉瑞(主编). 细胞外基质的生物化学及研究方法 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1988
- [5] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. *Anal Biochem*, 1987, **162** (1): 156-159
- [6] 乔亚明,温进坤. 脂多糖对血管平滑肌细胞一氧化氮合酶基因表达及细胞增殖的影响 [J]. *生物化学杂志*, 1997, **13** (4): 401-405
- [7] 石纓,温进坤. 新生小牛血清,碱性成纤维细胞生长因子和肝素对大鼠血管平滑肌细胞骨桥蛋白基因表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (1): 1-3
- [8] 周秀霞,温进坤,韩梅. 白细胞介素-1 β 及肿瘤坏死因子- α 对血管平滑肌细胞基质金属蛋白酶-2及骨桥蛋白基因表达的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 292-295

(此文 2000-03-06 收到, 2000-06-04 修回)

(此文编辑 文玉珊)