文章编号:1000-5404(2005)14-1443-03

论著

腺病毒介导gax基因转染对血管平滑肌细胞迁移的影响

王 耿,何国祥,冉擘力,张 萍,景 涛,陈 渝 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 以腺病毒介导gax基因转染血管平滑肌细胞(VSMC),探讨gax基因表达增强后VSMC迁移的变化。**方法** 以携带大鼠gax基因表达序列的复制缺陷型5型腺病毒载体(AdCMV-gax)常规转染VSMC后,应用免疫细胞化学染色检测gax基因表达的变化,Boyden's小室观察gax基因表达增强对VSMC迁移的影响。**结果** ①AdCMV-gax转染前,PDGF-BB下调Gax蛋白的表达,接近正常生理浓度的PDGF-BB(2 ng/ml)即可使VSMC的Gax蛋白表达率由36.42%显著降低至22.83%($P<0.05$),随着PDGF-BB浓度的升高,gax基因表达下降程度更加显著;AdCMV-gax转染后,无论有无PDGF-BB刺激,VSMC中gax基因的表达均比转染前显著增高。② AdCMV-gax转染使VSMC表达gax增强后,VSMC迁移数较未转染组显著减少。**结论** 增强gax基因表达,可抑制由有丝分裂原刺激所引起的VSMC迁移。

关键词:gax基因;血管平滑肌细胞;细胞迁移;腺病毒
中图法分类号: R322.12; R329.24; R394.2 **文献标识码**: A

Inhibition effect of adenovirus-mediated gax gene transfection on vascular smooth muscle cell migration

WANG Geng, HE Guo-xiang, RAN Bo-li, ZHANG Ping, JING Tao, CHEN Yu (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of gax gene overexpressing mediated by adenovirus transfection on vascular smooth muscle cell (VSMC) migration. **Methods** After replication defective adenovirus type 5 (Ad5) vector encoding the rat gax gene (AdCMV-gax) was transfected to VSMCs, the expression of Gax protein was evaluated by immunocytochemistry, and the effect of gax overexpression on VSMCs migration was observed by Boyden's chamber. **Results** Before AdCMV-gax was transfected to VSMCs, Gax protein could be down-regulated by platelet-derived growth factor (PDGF) BB, and reduced to 22.83% from 36.42% ($P<0.05$) even treated with PDGF-BB of 2 ng/ml that was well within physiological range. The degree of gax down-regulation correlated with the dose of PDGF-BB. After AdCMV-gax was transfected to VSMCs, the gax expression level was significantly higher no matter whether stimulated by PDGF-BB and the number of VSMCs migration decreased significantly than before transfection. **Conclusion** Overexpression of gax can inhibit VSMCs migration stimulated by mitogen.

Key words: gax gene; vascular smooth muscle cell; migration; adenovirus

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)由血管中层向内膜迁移并在内膜聚集是动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄(restenosis, RS)形成过程中内膜增生的重要原因。研究表明同源盒基因对胚胎细胞的迁移具有重要的调控作用[1]。本实验通过构建携带gax基因的重组腺病毒载体(AdCMV-gax)并转染体外培养的VSMC,研究AdCMV-gax转染对VSMC迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

携带大鼠gax基因的重组腺病毒载体(AdCMV-gax)应用位置特异型重组的方法构建,并经PCR鉴定,获得病毒滴度约5×10^{10}空斑形成单位/毫升(pfu/ml),最佳感染复数(MOI)为50[2]。VSMC由作者以大鼠主动脉经组织块贴壁法原代培养获得,并经α-平滑肌肌动蛋白免疫细胞化学鉴定,第6~8代细

作者简介:王 耿(1969-),男,重庆市南川市人,博士,主治医师,主要从事冠心病防治方面的研究,发表论文7篇。电话:(024)23051122,E-mail: wanggeng69@yahoo.com.cn

收稿日期:2004-06-23;修回日期:2004-11-21

胞应用于本实验[2]。免疫组织化学 S-P 试剂盒(北京中山公司)、血小板衍化生长因子 BB(PDGF-BB, R&D System 公司)、DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(FBS, 美国 Hyclone 公司)。

1.2 不同浓度 PDGF-BB 对转染前后 VSMC 的 Gax 蛋白表达率的影响

1.2.1 实验分组 分转染组和未转染组,分别以 PDGF-BB 不同浓度(0、2、5、10、20、30 ng/ml)刺激 24 h。

1.2.2 转染方法 将 VSMC 传入 24 孔板,各组每个实验条件设 5 孔。当细胞 80% 融汇时,无血清培养 24 h,然后将培养板中培养液吸出,加入 AdCMV-gax 转染液 50 mol,置 37 ℃、5% CO_2 培养 1 h,其间每 10 ~ 15 min 摇动培养板 1 次,使其均匀感染,1 h 后去除转染液,加入各浓度 PDGF-BB,继续培养。未转染组除不转染 AdCMV-gax 外,其余同前。

1.2.3 免疫细胞化学检测 按 S-P 试剂盒使用说明进行,兔抗大鼠 gax 多克隆抗体的工作浓度为 1∶100。DAB 显色后镜下计数着色细胞数和未着色细胞数,计算阳性细胞占同类细胞的百分比,每张玻片随机计数 5 个视野(×100),取平均值。

1.3 VSMC 迁移的检测

参照 Postlewalte[3] 的方法制作 Boyden's 趋化小室,上下室间隔 8 μm 孔径的聚碳酸微孔滤膜。实验分组及转染方法同 Gax 蛋白表达的检测。常规消化收集细胞,制成单细胞悬液;调节细胞密度至 1×10^6/ml,在培养液中悬浮 1 h;于放有 Boyden's 趋化小室的培养孔中加入含各浓度 PDGF-BB 的培养液 250 μl,各组每个浓度 5 孔,再加入 250 μl 细胞悬液至上室中;培养 6 h 后,吸去上室中的培养液,擦除滤膜上室面未迁移的 VSMC,取出滤膜,95% 乙醇固定,苏木素染色;镜下计数迁移细胞数,每张滤膜计数 5 个视野(×100),取平均值。

1.4 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行非配对 t 检验。

2 结果

2.1 不同浓度 PDGF-BB 对转染前后 VSMC 的 Gax 蛋白表达率的影响[4]

AdCMV-gax 转染前 2 ng/ml 的 PDGF-BB 刺激即可使 VSMC 的 Gax 蛋白表达率显著降低($P < 0.05$),并且随 PDGF-BB 浓度的增高,Gax 蛋白表达率降低越明显($P < 0.01$);AdCMV-gax 转染后,PDGF-BB 刺激对 VSMC 的 Gax 蛋白表达率无显著影响($P > 0.05$),但均显著高于转染前($P < 0.01$)(表 1)。

2.2 VSMC 迁移的检测

给予 PDGF-BB 刺激后 VSMC 迁移数明显增多(图 1),在 PDGF-BB 浓度为 10 ng/ml 以前,随浓度增加,VSMC 迁移数增多,至 10 ng/ml 时达峰值。转染 AdCMV-gax 后 VSMC 迁移数较未转染组显著减少(表 2、图 2)。

表 1 不同浓度 PDGF-BB 作用下 VSMC 的 Gax 蛋白表达率变化(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Change of Gax protein in VSMCs after treated with PDGF-BB of different concentrations (%, $\bar{x} \pm s$)

Group	PDGF-BB (-)	PDGF-BB (ng/ml)				
		2	5	10	20	30
Non-transfection	36.42 ± 7.14	22.83 ± 3.90☆	14.57 ± 2.87△	7.28 ± 3.23△	3.58 ± 1.64△	2.31 ± 1.08△
Transfection	85.91 ± 11.12▲	82.59 ± 9.64▲	79.73 ± 17.08▲	85.79 ± 9.66▲	76.85 ± 16.56▲	71.91 ± 12.67▲

☆: $P < 0.05$, △: $P < 0.01$, *vs* PDGF-BB(-); ▲: $P < 0.01$, *vs* non-transfection

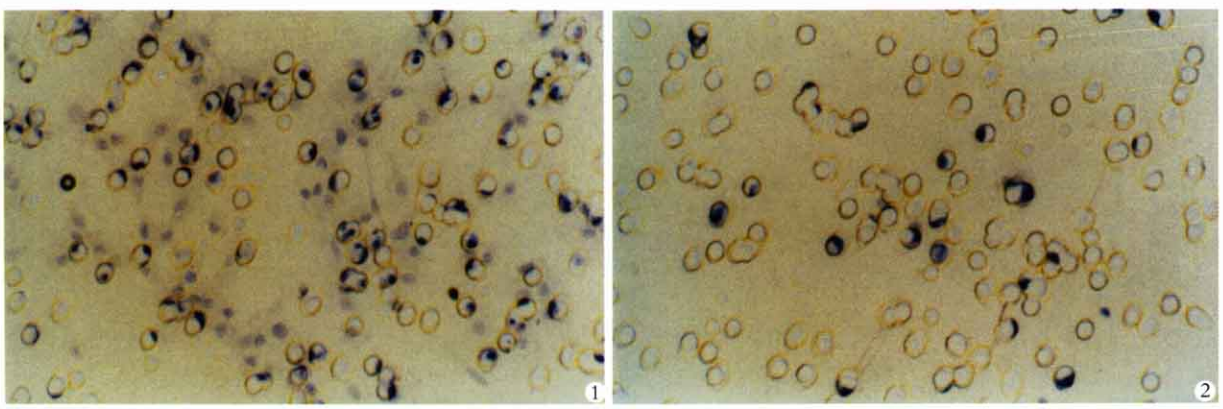


图 1 PDGF-BB 刺激后 VSMC 迁移的检测 (苏木精 ×200)

Fig 1 Migration of VSMCs after PDGF-BB stimulation (haematoxylin ×200)

图 2 AdCMV-gax 转染后 VSMC 迁移的检测 (苏木精 ×200)

Fig 2 Migration of VSMCs after AdCMV-gax transfection (haematoxylin ×200)

表 2　AdCMV-gax 转染前后 VSMC 迁移数比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Change of VSMCs migration after AdCMV-gax transfection ($\bar{x} \pm s$)

Group	PDGF-BB (-)	PDGF-BB (ng/ml)				
		2	5	10	20	30
Non-transfection	22.33 ± 2.35	48.67 ± 2.52△	128.38 ± 7.02△	210.54 ± 21.22△	149.33 ± 9.24△	80.26 ± 8.74△
Transfection	20.33 ± 2.52	26.67 ± 8.74★	87.06 ± 3.21▲△	107.00 ± 9.00▲△	76.67 ± 5.69▲△	39.00 ± 4.00▲△

△: $P<0.01$, *vs* PDGF-BB(-); ★: $P<0.05$, ▲: $P<0.01$, *vs* non-transfection

3　讨论

在血管成形术导致血管内皮细胞损伤后 3 d,一些增生的中膜 VSMC 便开始向内膜下迁移。迁移至内膜的 VSMC 有一半可以进一步复制、增殖,另一半迁移至内膜下层的 VSMC 则不再增殖,所以 VSMC 迁移在血管成形术后 RS 的形成中,与 VSMC 增殖具有同样重要的病理作用[5]。血小板衍化生长因子(PDGF)是强有力的促 VSMC 迁移因子[6]。在球囊损伤后形成的新生血管内膜以及人的动脉粥样硬化斑块中,PDGF 及其受体的 mRNA 和蛋白质表达均有上调[7]。

本实验表明现 PDGF-BB 下调 gax 基因的表达,接近正常生理浓度的 PDGF-BB(2 ng/ml)即可使 VSMC 的 Gax 蛋白表达率由 36.42% 显著降低至 22.83%,说明在 PTCA 术血管受损后,PDGF-BB 稍有增多的情况下,gax 表达即有下调。转染 AdCMV-gax 后,VSMC 的 Gax 蛋白表达率显著增高,且其受 PDGF-BB 刺激的影响不显著。

本实验结果显示给予 PDGF-BB 刺激后 VSMC 迁移数明显增多,在 PDGF-BB 浓度为 10 ng/ml 以前,随浓度增加,VSMC 迁移数增多,至 10 ng/ml 时达峰值。转染 AdCMV-gax 使 gax 基因表达增强以后,VSMC 迁移数显著减少,说明 gax 基因抑制 VSMC 的迁移。

有研究表明 gax 基因对细胞迁移的抑制可通过对细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂的直接转录调节和影响整合素的表达而实现。整合素是一种跨膜的细胞表面受体家族,在粘着斑处介导细胞外基质与细胞内骨架的连接,在不同的细胞类型和细胞的不同发育阶段具有特异性,可以介导细胞与细胞、细胞与基质、细胞外配体与细胞骨架的相互联系,在调节细胞骨架动态组装和细胞迁移的信号转导过程中起着重要作用。目前已发现 VSMC 上存在 β_1、β_3 整合素家族,它们对 VSMC 的迁移都有重要影响,特别是 $\alpha_v\beta_3$。gax 表达增强可使 $\alpha_v\beta_3$ mRNA 和蛋白质水平均下降。gax 基因对细胞迁移的抑制作用至少部分与整合素调节的信号途径有关[8]。

本研究结果表明 AdCMV-gax 转染使 VSMC 表达 gax 增强,可减少 VSMC 的迁移,对动脉粥样硬化和血管成形术后 RS 的防治具有有益的作用。

参考文献:

[1] Fu H, Qiu M. Migration and differentiation of Nkx-2. 2 + oligodendrocyte progenitors in embryonic chicken retina[J]. Brain Res Dev Brain Res, 2001, 129(1): 115 - 118.

[2] 王　耿,何国祥,张　萍, 等. 腺病毒介导 gax 基因转染在培养的血管平滑肌细胞中的表达[J]. 高血压杂志, 2003, 11(2): 173 - 177.

[3] Postlethwaite A E, Snyderman R, Kang A H. The chemotactic attraction of human fibroblasts to a lymphocyte-derived factor[J]. J Exp Med, 1976, 144(5): 1188 - 1203.

[4] 王　耿,何国祥,徐晓辉, 等. 腺病毒介导 gax 基因转染抑制血管平滑肌细胞增殖[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(24): 2177 - 2180.

[5] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. Nature, 1993, 362(6423): 801 - 809.

[6] Englesbe M J, Deou J, Bourns B D, *et al*. Interleukin-1 beta inhibits PDGF-BB-induced migration by cooperating with PDGF-BB to induce cyclooxygenase-2 expression in baboon aortic smooth muscle cells[J]. J Vasc Surg, 2004, 39(5): 1091 - 1096.

[7] Palumbo R, Gaetano C, Antonini A, *et al*. Different effects of high and low shear stress on platelet-derived growth factor isoform release by endothelial cells: consequences for smooth muscle cell migration[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(3): 405 - 411.

[8] Witzenbichler B, Kureishi Y, Luo Z, *et al*. Regulation smooth muscle cell migration and integrin expression by the Gax transcription factor [J]. J Clin Invest, 1999, 104(10): 1469 - 1480.

(编辑　陈聪连)