文章编号:1000-5404(2006)19-1949-03

论著

静脉移植物中整合素 α5β1 的表达及其与再狭窄的关系

伍校琼,蔡维君,罗学港 (中南大学湘雅基础医学院人体解剖学与神经生物学系,长沙 410013)

提 要: 目的 检测人静脉移植物中整合素 α5β1 的表达。**方法** 应用免疫荧光组织化学技术对30个静脉移植物再狭窄标本中整合素 α5β1 和 α-smooth muscle actin(α-SMA)的表达进行了检测,用激光共聚焦显微镜拍片,图片用 Silicon Graphics Octane 进行处理。**结果** 在正常静脉血管中,整合素 α5β1 在中膜平滑肌细胞和内皮细胞呈微弱表达;α-SMA 在中膜平滑肌细胞表达;在病变静脉血管,整合素 α5β1 在中膜平滑肌细胞、内膜内皮细胞中的表达呈强阳性,在内膜平滑肌细胞中也有弱表达。α-SMA 除在中膜平滑肌细胞表达外,在内膜平滑肌细胞也有表达。**结论** 静脉移植物整合素 α5β1 在中膜平滑肌细胞、内膜内皮细胞表达显著上调,提示整合素 α5β1 参与静脉移植物再狭窄的形成。

关键词: integrin α5β1;α-SMA;静脉移植物;共聚焦免疫荧光术
中图法分类号: R392.13; R543.602; R654.3 **文献标识码**: A

Relation of integrin α5β1 expression in human vein grafts to restenosis

WU Xiao-qiong, CAI Wei-jun, LUO Xue-gang (Department of Anatomy & Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To detect the expression of integrin α5β1 in restenosed human vein grafts. **Methods** The expression of integrin α5β1 and α-smooth muscle actin (α-SMA) in 30 resected restenosed human vein grafts (from Kerfuff clinical hospital of Germany) was detected by confocal immunofluorescence with specific antibodies against α5β1 and α-SMA. Images were processed with Silicon Graphics Octane. **Results** In normal veins, integrin α5β1 expression was very weak in media smooth muscle cells and in endothelium, and α-SMA expression was present in media smooth muscle cells. In the restenosed vein grafts, integrin α5β1 was strongly stained in the media smooth muscle cells and intimal endothelial cells, and moderately in the intimal smooth muscle cells, α-SMA was present in media smooth muscle cells and in the intimal smooth muscle cells. **Conclusion** Our research reveals that integrin α5β1 is significantly upregulated in the media smooth muscle cells and intimal endothelial cells in the restenosed human vein grafts, suggesting the participation of integrin α5β1 in the restenosis formation of human vein grafts.

Key words: integrin α5β1; α-smooth muscle actin; vein graft; confocal microscopy

静脉移植物失败的主要原因是由于早期炎症的出现、血栓形成、新内膜增生和随之而来的动脉粥样硬化的形成[1,2]。而内膜增生被认为是静脉移植物再狭窄发生的主要原因。新内膜的形成主要是由于循环中的白细胞黏附到内皮并迁移至内皮下,以及血管平滑肌细胞从中膜向内膜迁移所致。有研究表明在高血压、动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄的病理过程中,整合素介导血管平滑肌细胞与细胞外基质结合,并引起细胞内信号传导,最终导致血管平滑肌细胞大量迁移和增殖[3]。然而在静脉移植物中整合素是否调节血管平滑肌细胞增殖和迁移呢?在本实验中,我们用特异性的抗整合素 α5β1 和 α-SMA 抗体并结合共聚焦免疫荧光术对30个静脉移植物再狭窄标本进行研究,以探讨人静脉移植物整合素 α5β1 的表达以及与静脉移植物再狭窄的关系。

1 材料与方法

1.1 静脉移植再狭窄标本的来源

标本来源于德国 Kerkuff 临床医院。患者在冠状动脉旁路移植手术中接受了动脉和静脉的双重移植,手术2年后将静脉移植物取出,静脉移植再狭窄血管共30根,正常静脉血管10

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30540064);湖南省自然科学基金资助项目(02JJY2047)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30540064) and the Natural Science Foundation of Hunan Province(02JJY2047)
作者简介:伍校琼(1968-),女,湖南省新宁市人,硕士研究生,实验师,主要从事血管生物学和神经生物学方面的研究。电话:(0731)2650426
通讯作者:蔡维君,电话:(0731)2650422
收稿日期:2005-11-21;**修回日期**:2006-03-21

根来自非心血管疾病死亡的患者。

1.2 方法

标本从手术室取出后立即用液氮冷冻，OCT 包埋。置 -80 ℃冰箱保存备用。用 Leika 冰冻切片机切片，片厚 6 μm，切片用冷的 4 % 多聚甲醛固定 12 min，用 1% BSA 孵育 30 min，之后加入 α5β1（1∶100，DAKO 公司），切片置湿盒入 4 ℃冰箱过夜，加入驴抗鼠 IgG（1∶100），室温孵育 1 h，加入链霉素连接的 cy3 + 连接 FITC 的 α-SMA（1∶50，标记平滑肌细胞）+ TOTO3（1∶100，分子探针，标记细胞核，呈蓝色），室温孵育 40 min，除用 1 % BSA 孵育 30 min 之外，其余各步均需用 0.01 mol/L PBS 洗 3 次，每次 5 min，封片。用 Leika 激光共聚焦显微镜观察照相，图片用 Silicon Graphics Octane 进行处理。

以 PBS 代替一抗，其余各步均同，以排除二抗的非特异性染色。

1.3 整合素 α5β1 免疫荧光强度的定量测量

整合素 α5β1 免疫荧光强度的定量测量是在 Leica TCSSP 共聚焦显微镜上完成。采用单通道和 512 格式及适宜的滤片，在整个测量过程中，灰质值被设定在 0 ~ 255 pixel 强度水平。采用 Leica 的定量测量软件对正常血管和病变血管整合素 α5β1 的荧光强度进行测量。荧光强度以每平方微米的 Arbitrary Units（AU）表示。

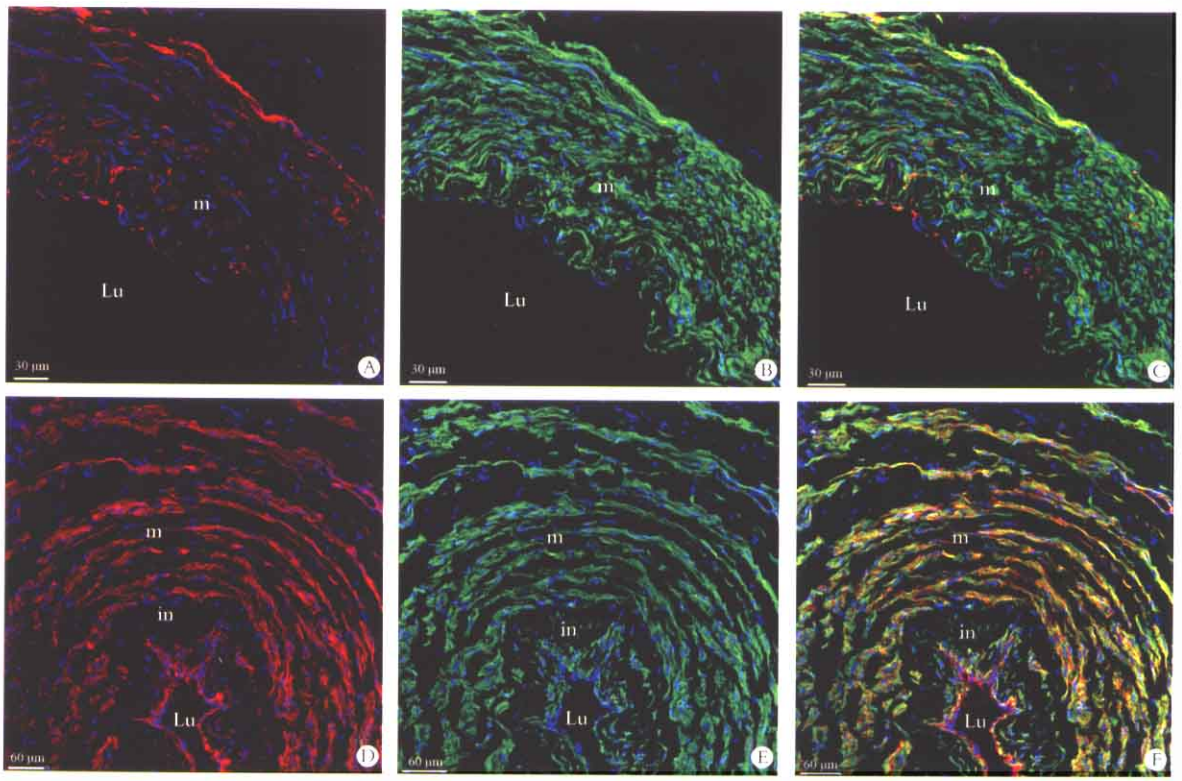
1.4 统计学处理

实验数据 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件，两组间比较用 t 检验。

2 结果

在正常静脉血管中，整合素 α5β1 只在中膜平滑肌细胞和内皮细胞呈很弱表达（图 1A、C）；α-SMA 在中膜平滑肌细胞表达呈强阳性表达（图 1B、C）。在病变的静脉移植物中，整合素 α5β1 在中膜平滑肌细胞的表达显著上调，是正常静脉血管的 4 倍，差异有显著性（$P<0.05$），在内皮细胞中的表达呈强阳性，在新内膜平滑肌细胞中也有表达（图 1D、F）；α-SMA 除在中膜平滑肌细胞呈强阳性表达外，在新内膜平滑肌细胞也有一定程度的表达（图 1 E、F）。

免疫双重染色显示，α5β1 和 α-SMA 共同定位在中膜平滑肌细胞，在新内膜的平滑肌细胞也有 α-SMA 的表达，整合素 α5β1 的表达较弱。



A：整合素 α5β1 在正常血管的表达（红色荧光）；B：α-SMA 在正常血管的表达（绿色荧光）；C：整合素 α5β1 + α-SMA 在正常血管的免疫双标；D：整合素 α5β1 在病变血管的表达（红色荧光）；E：α-SMA 在病变血管的表达（绿色荧光）；F：整合素 α5β1 + α-SMA 在病变血管的免疫双标；m：中膜；Lu：管腔；in：新内膜

图 1 整合素 α5β1 和 α-SMA 在正常血管和病变血管的表达

3 讨论

整合素 α5β1 是细胞外基质纤维连接蛋白（FN）的主要受体，通过与配体结合把整合素与细胞骨架联系起来，促进细胞移动[4]。在血管损伤、动脉粥样硬化和肺动脉导管闭塞后，整合素 α5β1 参与了血管平

滑肌细胞的迁移、增殖和血管损伤修复[5,6]。另有研究表明整合素 α5β1 的表达上调是与 FN 表达增加[7]、细胞外基质蛋白水解、新内膜形成[8]相一致的。

在本研究中，我们发现：在正常静脉血管，整合素 α5β1 在血管平滑肌细胞呈低表达，α-SMA 在中膜平滑肌细胞呈高表达；而在病变的静脉移植物中，整合素 α5β1 在中膜平滑肌细胞的表达显著上调，是正常静脉血管的 4 倍，在内皮细胞中的表达呈强阳性，在新内膜平滑肌细胞中也有阳性表达；α-SMA 除在中膜平滑肌细胞呈强阳性表达外，在新内膜平滑肌细胞也有一定程度的表达。整合素 α5β1 在正常血管平滑肌细胞呈低表达，这和正常血管中 FN 在基膜中含量少以及平滑肌细胞处于收缩表型是一致的[9]。说明整合素 α5β1 在正常静脉血管对平滑肌细胞并没有发挥调节作用。而在病变的静脉移植物中，整合素 α5β1 在中膜和内膜的表达均上调，这和静脉移植物中平滑肌细胞和内皮细胞的激活密切相关。当静脉移植到动脉循环中时静脉血管壁承受较静脉压高许多的动脉血流冲击，同时切应力也发生改变，从而激活平滑肌细胞和内皮细胞，引起细胞增殖和移动。我们以前的研究发现在静脉移植物外膜存在大量的炎细胞，特别是巨噬细胞，这些炎细胞从外膜向中膜迁移[10]。众所周知巨噬细胞能分泌大量的细胞因子和蛋白降解酶，包括生长因子 bFGF 以及 MMPs 等，中膜平滑肌细胞受到巨噬细胞分泌的因子刺激后被激活，自身分泌 MMPs 和生长因子等降解细胞外基质，这些变化使得平滑肌细胞和内皮细胞表达整合素 α5β1 和 FN 增加，有利于新内膜形成，最后导致管腔再狭窄。Pickering 等[6]证实在培养的平滑肌细胞，PDGF 和 FGF2 能增加整合素 α5β1 的表达，用炎症因子刺激，平滑肌细胞表达整合素 α5β1 增加。

本研究表明人静脉移植物中整合素 α5β1 的表达上调，揭示了整合素 α5β1 在促进平滑肌细胞迁移和增殖的关系，为进一步阐明整合素 α5β1 在静脉移植物再狭窄过程中的作用打下基础。

参考文献：

[1] BOURASSA M G. Fate of venous grafts: the past, the present, and the future[J]. J Am Coll Cardiol, 1991, 17(5): 1081 - 1083.

[2] FITZGIBBON G M, KAFKA H P, LEACH A J, *et al*. Coronary bypass graft fate and patient outcome: angiographic follow-up of 5065 grafts related to survival and reoperation in 1388 patients during 25 years[J]. J Am Coll Cardiol, 1996, 28(3): 616 - 626.

[3] 凌宏艳，胡　弼. 细胞外基质影响血管平滑肌细胞迁移和增殖的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, 12(6): 740 - 742.

[4] ZETTER B R, BRIGHTMAN S E. Cell motility and the extracellular matrix[J]. Curr Opin Cell Biol, 1990, 2(5): 850 - 856.

[5] AL-FAKHRI N, WILHELM J, HAHN M, *et al*. Increased expression of disintegrin-metalloproteinases ADAM-15 and ADAM-9 following up-regulation of integrins alpha5beta1 and alphavbeta3 in atherosclerosis [J]. J Cell Biochem, 2003, 89(4): 808 - 823.

[6] PICKERING J G, CHOW L H, LI S, *et al*. alpha5beta1 integrin expression and luminal edge fibronectin matrix assembly by smooth muscle cells after arterial injury[J]. Am J Pathol, 2000, 156(2): 453 - 465.

[7] WOLF C, CAI W J, VOSSCHULTE R, *et al*. Vascular remodeling and altered protein expression during growth of coronary collateral arteries [J]. J Mol Cell Cardiol, 1998, 30(11): 2291 - 2305.

[8] CAI W, VOSSCHULTE R, AFSAH-HEDJRI A, *et al*. Altered balance between extracellular proteolysis and antiproteolysis is associated with adaptive coronary arteriogenesis[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32 (6): 997 - 1011.

[9] ROY J, TRAN P K, RELIGA P, *et al*. Fibronectin promotes cell cycle entry in smooth muscle cells in primary culture[J]. Exp Cell Res, 2002, 273(2): 169 - 177.

[10] 伍校琼，蔡维君，罗学港. 静脉移植物巨噬细胞浸润途径的实验研究[J]. 中南大学学报：医学版, 2005, 30(2): 179 - 182.

（编辑　陈聪连）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母“A”；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母“Z”。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部