论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1694-04

趋化因子受体4与血管内皮生长因子在兔动脉粥样硬化斑块演进中的表达变化及意义

刘 宏,高云华,夏红梅 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院超声科)

【摘要】 **目的** 检测兔动脉粥样斑块中趋化因子受体4(chemokine receptor 4, CXCR4)蛋白表达与血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor receptor, VEGF)mRNA表达变化及其相关性分析,探讨CXCR4在粥样斑块血管生成中的作用及可能机制。**方法** 15只新西兰大白兔高脂饲料喂养+球囊拉伤腹主动脉建立动脉粥样硬化模型,分别于4、8、12周末处死动物,截取动脉血管,采用Western blot法检测CXCR4蛋白含量变化;实时荧光定量PCR检测VEGF mRNA表达变化,对两者结果进行相关性统计学分析;免疫组织化学法检测动脉粥样硬化斑块CXCR4、CD34表达与定位。**结果** 第4、8、12周3个时相点动脉血管CXCR4蛋白含量分别为(0.46±0.03)、(0.58±0.05)、(0.65±0.07),VEGF mRNA表达分别为(1.04±0.24)、(1.99±0.21)、(3.97±0.75),两者之间呈显著正相关(Pearson相关系数 $r=0.869$, $P<0.05$)。免疫组织化学CXCR4染色在血管内膜及斑块内部可见多处阳性染色;CD34染色在血管内膜斑块部位可见丰富的新生血管,棕黄色阳性表达。**结论** 兔腹主动脉粥样硬化进程中,CXCR4和VEGF表达含量呈正相关,可能在动脉粥样硬化斑块的血管生成中具有重要作用。

【关键词】 趋化因子受体4;血管内皮生长因子;动脉粥样硬化斑块;兔
【中图法分类号】 R543.5;R341;R363.25 【文献标志码】 A

Role of chemokine receptor CXCR4 in atherosclerosis angiogenesis and its possible mechanism in rabbit model of atherosclerotic plaques

Liu Hong, Gao Yunhua, Xia Hongmei (Department of Ultrasonography, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the expressions of vascular endothelial growth factor receptor (VEGF) and chemokine receptor 4 (CXCR4) and their relationship in rabbit model of atherosclerotic plaques in order to explore the role of CXCR4 in atherosclerosis angiogenesis and its possible mechanism. **Methods** The 15 rabbit model of atherosclerotic plaques was established through aortic balloon injury and high cholesterol diet. Levels of CXCR4 protein and VEGF gene was detected by Western blotting and fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR), respectively at 4, 8 and 12 weeks, and the results were analyzed statistically. Immunohistochemical staining was used to detect the expression and location of atherosclerotic plaque CXCR4 and CD34. **Results** At the 3 time points, the level of CXCR4 was 0.46±0.03, 0.58±0.05, 0.65±0.07, and the level of VEGF mRNA was 1.04±0.24, 1.99±0.21, 3.97±0.75, respectively. The level of CXCR4 was positively correlated with that of VEGF (correlation coefficient $r=0.869$, $P<0.05$). Immunohistochemical staining showed that CXCR4 was expressed in the vascular intima and plaque. CD34-positive staining was seen in vascular endothelial cells. There were rich new blood vessels in arterial intima plaque with CD34 expression. **Conclusion** The expression of CXCR4 is positively related with that of VEGF in the plaque progression, suggesting it may play an important role in angiogenesis.

【**Key words**】 chemokine receptor 4; vascular endothelial growth factor receptor; atherosclerosis; rabbits

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772059). Corresponding author: Gao Yunhua, Tel: 86-23-68774698, E-mail: xqgaoyh@yahoo.com.cn

【基金项目】 国家自然科学基金(30772059)
【通信作者】 高云华,电话:(023)68774698,E-mail:xqgaoyh@yahoo.com.cn

有研究证实斑块内血管生成在动脉粥样硬化形成与发展中具有重要作用，动脉粥样硬化中的新生血管大部分不成熟，缺乏周细胞和平滑肌细胞，其通透性较大，有利于巨噬细胞渗透入斑块内，并在斑块内部聚集，促进炎症反应发生，增加斑块的不稳定性，促进斑块的进展[1,2]。因此，深入研究斑块内血管生成在动脉粥样硬化发生、发展中的作用及其机制具有重要意义。趋化因子是一类超家族的细胞因子，由于基质细胞衍生因子 1α（stromal cell derived factor 1α，SDF-1α）靠近 N 端的 2 个半胱氨酸被一个其他的氨基酸隔开而被归为 CXC 亚家族。它的唯一受体是趋化因子受体 4（chemokine receptor 4，CXCR4），CXCR4 在单核细胞、淋巴细胞、平滑肌等中均有表达，它们都是与动脉粥样硬化形成过程相关的细胞成分[3-5]。有研究发现 SDF-1α 及其配体 CXCR4 能促进肿瘤组织转移及血管生成[6,7]，但它在动脉粥样硬化血管生成中的研究鲜有报道。本实验通过建立动脉粥样硬化模型，检测不同时间点动脉血管 CXCR4 蛋白表达与 VEGF mRNA 表达变化及其相关性，探讨 CXCR4 在动脉粥样硬化斑块血管生成中的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型的复制、病理取材和斑块形态学观察

新西兰大白兔 15 只（第三军医大学新桥医院实验动物中心提供），雄性，2～4 月龄，体质量 2.0～2.5 kg，给予高脂饲料（1% 胆固醇 +6% 猪油）喂养 + 球囊拉伤腹主动脉。具体方法为：速眠新（0.15 ml/kg）麻醉动物后进行右股动脉分离、穿刺，将内径 3～5 mm、长 15 mm 的球囊导管送入降主动脉约 20 cm，推注 8 个大气压充盈球囊后回拉至髂总动脉，反复回拉 3 次造成动脉内膜损伤，关闭切口，术后常规抗感染。分别于 4、8、12 周末动脉血管取材，标本分为两部分：一部分置于 4% 中性甲醛液中固定，组织脱水，石蜡包埋备用免疫组织化学；另一部分血管组织，锡纸包裹，标记迅速保存于 -80 ℃冰箱保存待检测。

1.2 荧光定量 PCR 检测动脉血管 VEGF mRNA 表达

引物由上海生工合成，GAPDH-1：5′-ACCCATCACCATCTTCCAGGAG-3′，GAPDH-2：5′-GAAGGGGCGGAGATGATGAC-3′，产物大小 159 bp；VEGF-1：5′-CGATCGAGACCTTGGTGGACAT-3′，VEGF-2：5′-TGCATGGTGACGTTGAACTCCT-3′，产物大小 154 bp。动脉血管组织提取总 RNA 并计算浓度，逆转录反应体系 40 μl 按逆转录酶试剂说明步骤。用去离子水稀释成 10 μl，DNA 将管家基因 GAPDH 作为内参照，荧光定量 PCR 反应体系 20 μl：cDNA 模板 1 μl，荧光定量 PCR 试剂 10 μl，上下游引物（10 mol/L）各 0.5 μl 每个样品均做 2 个复孔，于美国应用生物系统中国公司（AB Applied Biosystems）实时定量 PCR 仪器进行检测。应用 7500 System SDS Software 软件对 VEGF mRNA 熔解曲线、扩增曲线、表达特异性及含量变化进行分析。

1.3 Western blot 检测动脉血管 CXCR4 蛋白表达

动脉血管组织总蛋白提取，测定总蛋白含量，取一定量蛋白质加入 5% 的浓缩胶缓慢加入内外槽样缓冲液中，在 100 ℃加热 3 min 以使蛋白质变性。按预定顺序加样，每个电泳道加样约 25 μl，待溴酚蓝迁移到分离胶底部 0.5 cm 处，停止电泳。转移至 PDVF 膜，丽春红染色观察转移效果。将电转膜置于 5% 的脱脂奶粉封闭，4 ℃过夜。漂洗后加入一抗（CXCR4 1∶500），4 ℃孵育过夜，摇床洗涤后加入二抗 4 ℃过夜。将膜风干加底物，化学发光，得到胶片。阳性条带以 Gel pro 4.0 版凝胶光密度分析软件进行分析，测其积分光密度值并进行半定量分析。

1.4 免疫组织化学检测动脉粥样斑块 CXCR4、CD34 表达与定位

切片经脱水后 PBS 漂洗 10 min，依次抗原修复，血清封闭 37 ℃温箱孵育 30 min，PBS 漂洗 15 min，滴加一抗（CXCR4 1∶200，CD34 1∶100，福州迈新公司），以 PBS 代替一抗反应作为阴性对照，依次滴加二抗，显色剂显色 5～10 min，苏木精对比染核，经脱水，二甲苯透明，树脂封片，光镜下观察，粥样硬化斑块呈棕黄色为阳性染色。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 13.0 统计软件完成。CXCR4 蛋白含量与 VEGF mRNA 表达水平之间的相互关系采用 Pearson 相关分析及一元线性回归分析，并进行曲线估计。

2 结果

2.1 病理形态学观察

肉眼大体观察内膜可见白色条纹或大小不等黄白色斑块隆起。HE 染色观察腹主动脉层次不清，厚薄不均，可见纤维斑块突入管腔引起管壁狭窄，斑块中可见新生血管及类毛细血管结构。

2.2 荧光定量 PCR 检测 VEGF mRNA 表达

荧光定量 PCR 的结果显示，熔解曲线分析未见杂峰，说明扩增产物单一特异，没有非特异性扩增（图 1）。扩增曲线平滑，每条曲线均有明显的指数扩增期（图 2）。使用 7500 System SDS Software 软件检测 3 个时间点（4、8、12 周）VEGF mRNA 的表达含量，动脉斑块血管在各个时间点都有表达（分别为 1.04 ± 0.24、1.99 ± 0.21、3.97 ± 0.75），并随时间点的增加表达逐渐增加。

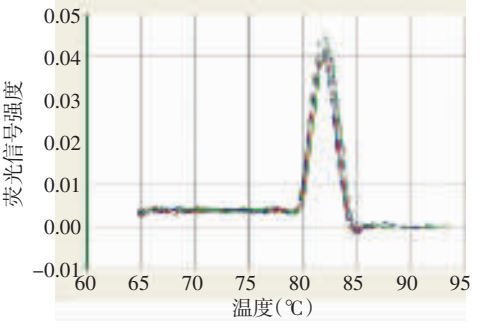


图 1 荧光定量 PCR 检测动脉血管 VEGF mRNA 熔解曲线

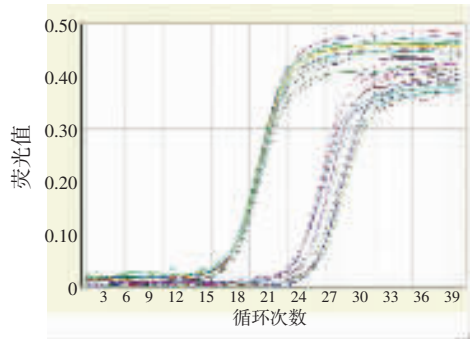
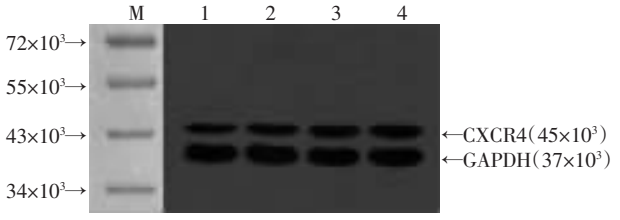


图2　荧光定量PCR检测动脉血管VEGF mRNA扩增曲线

2.3　Western blot检测CXCR4蛋白的表达

Western blot结果显示：第0、4、8、12周动脉血管斑块显示单一条带，说明其在以上4个时期都表达CXCR4，分别为0.43±0.02、0.46±0.03、0.58±0.05、0.65±0.07，呈现逐渐增加的趋势（图3）。



M：标准；1：0周；2：4周；3：8周；4：12周

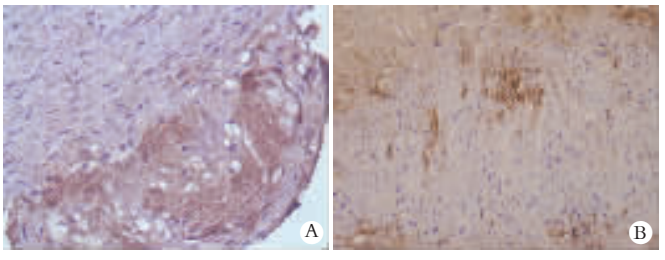
图3　Western blot检测动脉血管斑块CXCR4蛋白的表达

2.4　CXCR4蛋白表达与VEGF mRNA表达相关性分析

在动脉粥样硬化斑块模型中，3个时间点（第4、8、12周）CXCR4蛋白表达与相应的VEGF mRNA表达呈显著正相关（Pearson相关系数$r=0.869$，$P<0.05$）；VEGF mRNA为自变量x，CXCR4蛋白表达量为因变量y，拟合的回归方程为$y=0.421\pm0.066x$。

2.5　兔腹主动脉粥样斑块CXCR4、CD34表达免疫组织化学结果

普通显微镜下观察动脉血管斑块处CXCR4染色阳性表达呈现棕红色，血管内膜及斑块内部可见多处阳性染色（图4A）；CD34阳性染色于血管内皮细胞，动脉血管内膜斑块部位可见多处CD34棕色或棕黄色颗粒沉淀（图4B）。



A：CXCR4在动脉血管斑块、内膜可见多处呈阳性表达；B：CD34在动脉斑块、内膜处呈阳性表达，斑块内新生血管丰富

图4　免疫组化染色观察动脉血管斑块CXCR4、CD34的表达　（S-P ×100）

3　讨论

近年来大量研究表明斑块内血管生成是动脉粥样硬化重要的病理学特征，并与斑块的稳定性、发生和发展密切相关[1,2]。除动脉粥样斑块大的脂质核、丰富炎细胞浸润及纤维帽厚度之外，新生血管的多少亦是衡量斑块稳定性的一项新的指标[8]。因此，深入研究斑块内血管生成在动脉粥样硬化发生、发展中的作用及其机制具有广阔的临床治疗、诊断应用前景。虽然目前对于动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）中血管内皮生长因子VEGF的研究很多，但还存在很多问题没有解决，例如粥样斑块中VEGF的表达与周围环境其他细胞因子的关系，这些因子是如何参与斑块血管生成的。

趋化因子是一类超家族的细胞因子，基质细胞衍生因子1α（SDF-1α）的受体CXCR4是G蛋白偶联7次跨膜受体[9]。最近的研究表明CXCR4在动脉粥样硬化形成过程有关的主要细胞成分如单核细胞、淋巴细胞、内皮祖细胞、平滑肌祖细胞等中均有表达[3-5]，使得CXCR4在动脉粥样硬化中的作用与机制已经日益引起研究者重视。在以往的研究中发现其与肿瘤生长、血管生成等存在密切关系[6,7]，但尚少见其与动脉粥样硬化血管生成关系的研究。本研究采用Western blot检测3个时间点（4、8、12周）CXCR4蛋白表达，荧光定量PCR检测3个时间点VEGF mRNA表达，并运用Pearson相关分析及一元线性回归分析，进行曲线估计，比较CXCR4与VEGF相关性，从而探讨CXCR4在动脉粥样硬化血管生成中的作用。结果提示随时间点的增加CXCR4蛋白表达逐渐增多，与VEGF mRNA表达具有良好的相关性（Pearson相关系数分别是$r=0.869$，$P<0.05$）。免疫组织化学CD34染色在动脉斑块、内膜多处呈阳性表达，斑块内新生血管丰富。以上结果提示CXCR4与斑块发展、斑块血管生成及新生血管形成中存在密切的相关性，并具有重要作用。最近有学者证明，斑块内血管生成主要与斑块内炎性细胞聚积程度有关[1,10]。SDF-1α不仅呈浓度依赖性诱导单核细胞迁移，更重要的是这种诱导是有方向性的。使炎症细胞被趋化到病灶，从而促进或加重血管壁的炎症病变。募集到血管壁中的炎细胞可分泌大量的粘附分子、趋化因子及炎性因子，从而介导病变局部细胞间免疫应答，促进血管壁炎症反应的发生发展[11,12]。CXCR4增加可促进巨噬细胞和单核细胞等向斑块内迁移，增加斑块炎性反应，这些组织细胞又分泌VEGF

和其他细胞因子,反过来再促进斑块内血管生成,进而促进动脉粥样硬化斑块的演进与发展,而斑块中的新生血管在动脉粥样硬化的发生发展、易损机制中起重要作用。已有研究显示,许多内皮细胞存在CXCR4表达,包括人脐带血管、内皮细胞、牛动脉内皮细胞、牛肺动脉内皮细胞等[4,13]。我们推测,CXCR4促进粥样斑块中VEGF表达上调,因此这可能是VEGF参与粥样斑块的血管生成和侵袭发展过程的另外一种机制。CXCR4在动脉粥样硬化中的作用将会越来越明朗,并可能成为动脉粥样硬化血管生成防治的一个新靶点。

参考文献:

[1] Fleiner M, Kummer M, Mirlacher M, *et al*. Arterial neovascularization and inflammation in vulnerable patients: early and late signs of symptomatic atherosclerosis[J]. Circulation, 2004, 110(18): 2843-2850.

[2] Kolodgie F D, Gold H K, Burke A P, *et al*. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma[J]. N Engl J Med, 2003, 349(24): 2316-2325.

[3] Damas J K, Waehre T, Yndestad A, *et al*. Stromal cell-derived factor-1 alpha in unstable angina: potential antiinflammatory and matrix-stabilizing effects[J]. Circulation, 2002, 106(1): 36-42.

[4] Li F, Guo W Y, Li W J, *et al*. Cyclic stretch upregulates SDF-1 alpha/CXCR4 axis in human saphenous vein smooth muscle cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 386(1): 247-251.

[5] Noels J, Bernhagen J, Weber C. Macrophage migration inhibitory factor: a noncanonical chemokine important in atherosclerosis[J]. Trends Cardiovasc Med, 2009, 19(3): 76-86.

[6] 臧文巧, 轩小燕, 杜英, 等. 靶向CXCR4的siRNA对人食管鳞癌EC9706细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2140-2142.

[7] 赵林涛, 卞修武, 姜建勇, 等. 下调CXCR4表达对胶质瘤干细胞侵袭能力和VEGF分泌量的影响[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(11): 1049-1052.

[8] Naghavi M, Libby P, Falk E, *et al*. From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part Ⅱ[J]. Circulation, 2003, 108(15): 1772-1778.

[9] 谭毅, 蔡绍皙, 马伟峰, 等. SDF-1和及其受体CXCR4的结构与功能[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(1): 1-5.

[10] Barger A C, Beeuwkes R 3rd, Lainey L L, *et al*. Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis[J]. N Engl J Med, 1984, 310(3): 175-177.

[11] Olson T S, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002, 283(1): R7-R28.

[12] 田国平, 李国华, 邹正生, 等. 基质细胞衍生因子1α通过上调CXCR4表达促进单核—内皮细胞粘附[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(7): 523-526.

[13] Zheng H, Dai T, Zhou B, *et al*. SDF-1 alpha/CXCR4 decreases endothelial progenitor cells apoptosis under serum deprivation by PI3K/Akt/eNOS pathway[J]. Atherosclerosis, 2008, 201(1): 36-42.

(收稿 2010-01-26 修回 2010-02-16)

(编辑 张 维)

王正国院士当选国际交通医学学会候任主席

日前,王正国院士在国际交通医学学会执委会上以全票当选国际交通医学学会候任主席,同时国际交通医学学会现任主席Lars Englund博士发来贺电预祝2011年重庆举办的第22届国际交通医学大会取得圆满成功。

国际交通医学学会(International Association for Traffic Medicine, ITMA)的前身是1960年成立的国际意外事故和交通医学会(International Association for Accident and Traffic Medicine, IAATM),至今已有50年的历史,召开过21届国际大会,并于1973年创办了《国际交通医学杂志》。

王正国院士至今已连续参加了9届国际交通医学会议,并于1992年在中华医学会创伤学分会下成立了交通医学学组,担任大会主席先后组织召开了四次全国交通医学会议,1999年在重庆成功主办了第十六届国际意外事故与交通医学会议,2000年荣获学会颁发的国际交通医学重大成就奖,2003年当选国际交通医学学会西亚地区负责人和国际交通医学杂志副主编。

王院士还于2001年作为世界卫生组织暴力和损伤预防处(Department of Injuries and Violence)特邀临时顾问参加了在瑞士日内瓦召开的世界卫生组织道路交通事故预防战略研讨会,参与制订了WHO道路交通事故伤预防五年策略,并被指定为WHO预防道路交通伤世界报告提供帮助。

此次王院士毫无争议的当选国际交通医学学会候任主席,是我国交通医学发展中具有深刻意义的一件大喜事,不仅是王院士个人学识和魅力所致,更代表着国际交通医学学术界对我国交通医学与交通安全取得巨大进步的认可和推崇。

(供稿 肖 凯)