DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.007
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2177-04

论著

腺病毒介导gax基因转染抑制血管平滑肌细胞增殖

王 耿[1],何国祥[1],徐晓辉[2],冉擘力[1],张 萍[1],陈 渝[1] ([1]第三军医大学附属西南医院心血管内科,重庆 400038,[2]哈尔滨医科大学第一附属医院呼吸科,哈尔滨 150000)

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增殖的变化。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;应用四唑盐(MTT)比色试验、^{3}H标记的胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)掺入试验和流式细胞仪检测观察gax基因表达增强对VSMC增殖的影响。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。②AdCMV-gax转染使VSMC表达gax增强后,VSMC的MTT吸光度值和^{3}H-TdR掺入量均较未转染组显著降低,G_0-G_1期的VSMC比例较未转染组显著增高($P<0.01$),G_2-M期和S期细胞比例显著降低($P<0.01$)。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增殖。

关键词:gax基因;血管平滑肌细胞;细胞增殖
中图法分类号:R322.74;R373.1;R394.2 文献标识码:A

Effect of adenovirus-mediated gax gene transfection on the inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation

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

Abstract: Objective To explore the effect of gax gene overexpression mediated by adenovirus transfection on vascular smooth muscle cells(VSMC) proliferation. Methods The expression of GAX protein was evaluated by immunocytochemical staining and the effect of gax overexpression on VSMCs proliferation was observed by 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)2,5-diphenytertrazolium bromide (MTT) colorimetric analysis and ^{3}H-thymidine incorporation and flow cytometry after replication-defective adenovirus type 5 (Ad5) vector encoding the rat gax gene (AdCMV-gax) was transfected to VSMCS. Results ① Before AdCMV-gax was transfected to VSMCs, GAXprotein could be down-regulated by platelet-derived growth factor (PDGF) BB at the dose of 2 ng/ml from 36.42% to 22.83%($P<0.05$). This concentration was within physiological range. Gax expression was down-regulated in a dose-dependent manner. After AdCMV-gax was transfected to VSMCs, the level of gax expression was significantly higher than that before transfection, but no correlation with the stimulation of PDGF-BB was found. ② The optical density (OD) of MTT and ^{3}H-thymidine incorporation decreased significantly in VSMCs transfected with AdCMV-gax compared with that in VSMCs without being transfected. The rate of VSMCs during G_0-G_1 period was higher, while that of VSMCs during G_2-M and S period was lower in cells transfected than that in cells without being transfected($P<0.01$). Conclusion Overexpression of gax can inhibit VSMCs proliferation stimulated by mitogen.

Key words: gax; vascular smooth muscle; cell; proliferation

血管平滑肌细胞(VSMC)增殖是动脉粥样硬化及血管成形术后再狭窄(Restenosis, RS)病灶形成的重要病理机制[1]。同源盒基因在胚胎发育中调节细胞的生长和分化[2]。Gax(Growth-arrest specific homeobox)基因是一个主要存在于心血管系统的同源盒基因,在球囊损伤血管壁后其表达快速下调,在受到有丝分裂原刺激后的VSMC中也明显降低[2,3]。这说明gax基因对VSMC的生长和增殖可能起着抑制作用。本实验利用携带gax基因的腺病毒(AdCMV-gax)转染VSMC,增强其gax基因表达,探讨gax基因表达增强对VSMC增殖的影响。

作者简介:王 耿(1969-),男,重庆市南川县人,博士,主治医师,主要从事冠心病方面的研究,发表论文6篇。电话:(024)23051915
收稿日期:2002-08-05;修回日期:2003-06-04

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

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)由作者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。VSMC由作者以大鼠主动脉经组织块贴壁法原代培养获得，并经平滑肌肌动蛋白免疫细胞化学鉴定，第6~8代细胞应用于本实验。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)，氚标记胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)(上海原子能研究所)。

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3孔。当细胞80%融合时，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 MOI，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3个视野(×100)，取平均值。

1.3 MTT比色试验

分组及转染方法同前。以每孔3×10^3个细胞将VSMC接种于96孔培养板中，各组每个实验条件设3孔，贴壁后无血清培养24 h，以AdCMV-gax转染，培养板中每孔终体积200 μl；检测时，每孔加入MTT溶液(5 mg/ml) 20 μl，37 ℃继续孵育4 h；吸弃培养孔内上清液，每孔加入150 μl DMSO，振荡10 min，使结晶物完全溶解；选择490 nm波长，在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值(*A*值)。

1.4 流式细胞仪检测VSMC增殖周期

分转染组和未转染组，每组又分别施加无血清培养和PDGF-BB(10 ng/ml)刺激两种干预因素。细胞80%融合时，无血清培养24 h；转染及施予干预因素后24 h按常规方法收集细胞，制备成单细胞悬液，70%乙醇固定，PI染色，在流式细胞仪中以激发波长488 nm测定所制样品。

1.5 ^{3}H-TdR掺入法测定细胞DNA合成

实验分组及干预因素同流式细胞仪检测VSMC增殖周期。以每孔1×10^5个细胞将VSMC接种于24孔培养板中，各组每个实验条件设3孔。37 ℃、5% CO_2培养24 h后，无血清培养24 h；转染及施予干预因素后24 h加入^{3}H-TdR，使之终浓度为3.7×10^4 Bq/ml；继续培养16 h后，常规消化收集细胞，经微孔滤膜抽滤细胞并用10%三氯乙酸(TCA)破碎细胞膜，滤膜烘干后置于闪烁瓶中，加入闪烁液，用液体闪烁计数仪测定放射性强度。

1.6 统计学分析

数据用$\bar{x}\pm s$表示。采用SPSS10.0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，见图1、2，表1



图1 单纯PDGF-BB刺激后的gax蛋白表达 (S-P×100)

Fig 1 Expression of gax protein in VSMC after simple PDGF-BB stimulation without AdCMV-gax transfection (S-P×100)



图2 AdCMV-gax转染后VSMC的gax蛋白表达 (S-P×200)

Fig 2 Expression of gax protein in VSMC after AdCMV-gax transfection (S-P×200)

表1 PDGF-BB对VSMC的gax蛋白表达的影响(%，$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effect of PDGF-BB on the expression of gax protein in VSMC(%，$\bar{x}\pm s$)

Group	PDGF-BB(-)	Concentration of 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

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　MTT 比色试验见表 2

表 2　AdCMV-gax 转染后 VSMC 的 MTT 值的变化(A, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes by MTT in VSMC after AdCMV-gax transfection(A, $\bar{x}\pm s$)

Group	PDGF-BB(-)	Concentration of PDGF-BB(ng/ml)				
		2	5	10	20	30
Non-transfection	0.23±0.09	0.41±0.04☆	0.45±0.06☆	0.62±0.03△	0.65±0.11△	0.72±0.09△
Transfection	0.19±0.11	0.22±0.08★	0.26±0.07★	0.36±0.12★	0.27±0.03▲	0.33±0.02▲

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

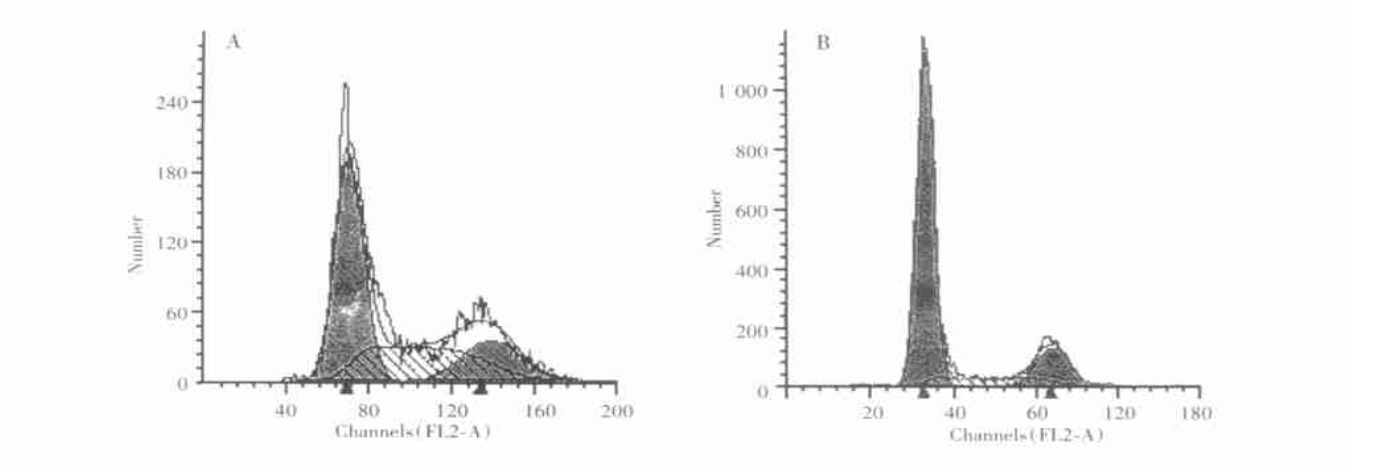
2.3　流式细胞仪检测 VSMC 增殖周期见表 3, 图 3

表 3　AdCMV-gax 转染和有丝分裂原对 VSMC 增殖周期的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effect of AdCMV-gax transfection and mitogen on the cell cycle of VSMC(%, $\bar{x}\pm s$)

	Non-transfection			Transfection		
	G_0-G_1	G_2-M	S	G_0-G_1	G_2-M	S
Serum(-)	83.66±2.13	8.82±3.13	7.17±1.59	83.34±2.97	8.74±2.49	7.88±1.60
PDGF-BB	56.05±5.27△	9.07±3.25	34.87±2.30△	81.53±1.72▲	7.86±1.58	10.61±1.24▲

△: $P<0.01$ *vs* serum(-); ▲: $P<0.01$ *vs* non-transfection



A: Non-transfection and PDGF-BB; B: Transfection and PDGF-BB

图 3　AdCMV-gax 转染和 PDGF-BB 对 VSMC 增殖周期的影响

Fig 3　Effect of AdCMV-gax transfection and mitogen on the cell cycle of VSMC

2.4　^{3}H-TdR 掺入法测定细胞 DNA 合成见表 4

表 4　AdCMV-gax 和有丝分裂原对 VSMC ^{3}H-TdR 掺入的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effect of AdCMV-gax transfection and mitogen on the ^{3}H-TdR of VSMC($\bar{x}\pm s$)

	Non-transfection	Transfection
Serum(-)	5 816.67±1 178.10	3 620.67±2 263.46
PDGF-BB	14 696.00±3 535.77☆	3 991.00±566.19▲

☆: $P<0.05$ *vs* serum(-); ▲: $P<0.01$ *vs* non-transfection

3　讨论

动脉粥样硬化和血管成形术后 RS 最重要的病理特征就是 VSMC 的增殖。VSMC 与不能再分裂、分化的骨骼肌和心肌细胞不同, 当接受有丝分裂原刺激后可发生表型转变, 重新进入细胞周期进行有丝分裂, 从而发生增殖。众多生长因子对 VSMC 增殖的作用及其信号传导途径已有广泛的研究报道[4,5], 但是在这个过程中关于细胞核内基因改变和调控的研究却相对较少。

目前研究表明在大多数真核细胞中存在与细胞生长和分化有关的同源盒基因, 其编码蛋白通过对下游靶基因的表达进行调节, 控制胚胎的发育及细胞的分化。它是机体形态发生的各基本通路所必需的, 能在生命发生后决定细胞的表型[6]。各种同源盒基因对细胞生长和增殖的调节不尽相同, 一些促进细胞增殖和肿瘤的发生, 而另一些则抑制细胞生长和增殖[7,8]。

Gax 基因是一个主要存在于心血管系统的同源盒

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

基因，血小板衍化生长因子 BB（PDGF-BB）是促进 VSMC 增殖能力最强的细胞因子[9,10]，我们在实验中发现PDGF-BB 下调 gax 基因表达，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。随着 PDGF-BB 浓度的升高，刺激细胞 DNA 合成能力的增强，VSMC 中 gax 表达降低更加明显。Weir 等[3] 在球囊损伤后的大鼠颈动脉中也观察到 gax 基因表达的降低。这说明 gax 基因对 VSMC 而言，可能是一个抑制性的同源盒基因。

本研究 MTT 比色试验表明，在 PDGF-BB 刺激后，VSMC 增殖能力比刺激前明显升高，并且随 PDGF-BB 浓度增加，VSMC 增殖越明显；以腺病毒为载体对 VSMC 进行转染，使 gax 基因表达增强后，VSMC 增殖能力较转染前显著降低，对 PDGF-BB 浓度增加所引起的增殖作用反应不敏感，在 gax 基因表达较高时其增殖能力没有随 PDGF-BB 浓度增加而升高的趋势。流式细胞仪检测细胞周期变化的结果提示，PDGF-BB 刺激使处于静止的 G_0-G_1 期 VSMC 比例显著降低，G_2-M 和 S 期的 VSMC 比例明显增高；转染 AdCMV-gax 使 gax 基因表达增强以后，PDGF-BB 的上述作用显著减弱。以上实验说明 gax 基因可抑制由有丝分裂原刺激所引起的 VSMC 表型、DNA 合成和增殖能力的改变，使 VSMC 维持收缩型表型的特征。本实验以 ^{3}H-TdR 掺入法测定细胞 DNA 合成所得结果也说明 gax 基因对 VSMC 增殖起抑制作用。

综上所述，AdCMV-gax 转染使 VSMC 表达 gax 增强，有利于维持 VSMC 的收缩表型及血管壁 VSMC 数量的平衡，对 PTCA 术后 RS 的防治具有有益的作用。

参考文献：

[1] Buchwalow I B, Podzuweit T, Bocker W, *et al*. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase[J]. FASEB J, 2002, 16(6): 500－508.

[2] Gorski D H, LePage D F, Patel C V, *et al*. Molecular cloning of a diverged homeobox gene that is rapidly down-regulated during the G_0/G_1 transition in vascular smooth muscle cells[J]. Mole Cell Biol, 1993, 13(6): 3722－3733.

[3] Weir L, Chen D, Pastore C, *et al*. Expression of gax, a growth arrest homeobox gene, is rapidly down-regulated in the rat carotid artery during the proliferative response to balloon injury[J]. J Biol Chem, 1995, 270(10): 5457－5461.

[4] Fagin J, Forrester J S. Growth factors, cytokines, and vascular injury[J]. Trends Cardiovasc Med, 1992, 2(1): 90－94.

[5] Ross R, Bowen P, Raines E W. Platelet-derived growth factor and its role in health and disease[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1990, 327(1239): 155－169.

[6] McGinnis W, Krumlauf R. Homeobox genes and axial patterning[J]. Cell, 1992, 68(2): 283－302.

[7] Deguchi Y, Kehrl J H. High level expression of the homeobox gene HB24 in a human T-cell line confers the ability to form tumors in nude mice[J]. Cancer Res, 1993, 53(2): 373－377.

[8] Gastrillo J L, Theill L E, Karin M. Function of the homeodomain protein GHF1 in pituitary cell proliferation[J]. Science, 1991, 253(5016): 197－199.

[9] Kingsley K, Huff J L, Rust W L, *et al*. ERK1/2 mediates PDGF-BB stimulated Vascular smooth muscle cell proliferation and migration on laminin-5[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293(3): 1000－1006.

[10] Claesson Welsh L. Platelet-derived growth factor receptor signals[J]. J Biol Chem, 1994, 269(51): 32023－32026.

（编辑 薛国文）

（上接2176页）

讨论

淋巴细胞性垂体炎的特点：①好发于育龄期妇女；②年龄为（35.4±13.0）岁；③发病多在妊娠后期和产后；④垂体大多增大，少数病程长者可出现垂体萎缩；⑤多以垂体功能减退为主要表现，有时也可出现垂体激素增多的表现，其中以泌乳素增多为最常见。本病由于缺乏特异性的临床表现，诊断上需与垂体腺瘤、细菌性垂体炎、垂体增生、席汉综合征、坏死性漏斗垂体炎进行鉴别[1]，确诊有赖于病理。垂体炎的大体形态表现为不同程度的肿胀、质地较坚韧，颜色变化较大，从灰白到黄色不等。正常垂体中几乎没有淋巴细胞，假如仅仅是淋巴细胞浸润，还不能证明是垂体炎，只有镜下观察到数个淋巴细胞攻击一个正常的垂体细胞才能得出自身免疫反应的病理诊断，本例的病理改变与此点符合。目前尚缺乏特异性的治疗方案，糖皮质激素可使增大的垂体缩小并改善垂体功能。本病病因尚未完全阐明，可能与自身免疫有关。有关淋巴细胞浸润垂体发生自身免疫性改变的观点越来越得到重视，如过去认为席汉综合征的病因是产后大出血导致垂体坏死，现在也有研究表明可能与淋巴细胞性垂体炎有关[2]。目前看来自身免疫性病变是内分泌系统腺体功能低下的常见病因之一，值得临床重视。

关键词：垂体炎；淋巴细胞

中图法分类号：R584 文献标识码：B

参考文献：

[1] Patel M C, Guneratne N. Peripartum hypopituitarism and lymphocytic hypophysitis[J]. QJM, 1995, 88(8): 571－580.

[2] Crock P. Cytosolic autoantigens in lymphocytic hypophysitis[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1998, 83(2): 609－618.

（编辑 王 红）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net