DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.019
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
410 2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)04-0410-03

心肌组织内IGF-1和TGF-β_1在高血压不同发病阶段的表达及意义

于学军[1],何作云[1],戚文航[2] ([1]第三军医大学附属新桥医院心血管内科,重庆 400037;[2]上海第二医科大学附属瑞金医院心脏科,上海 200025)

提 要:目的 探讨心肌组织内胰岛素样生长因子-1(IGF-1)和转化生长因子-β_1(TGF-β_1)在自发性高血压大鼠(SHR)不同发病阶段的表达及其与心肌肥厚及心肌纤维化的关系。方法 应用RT-PCR方法检测IGF-1和TGF-β_1在SHR心肌组织内的表达;应用大体及病理组织学检查结合图像分析和生化测定等方法检测SHR心肌肥厚和心肌纤维化的动态改变。结果 IGF-1在SHR心肌组织内的表达在第6周时无明显改变,第14周时开始增高,24周时仍持续增高,与心肌肥厚同步,但与代表心肌纤维化的参数呈非同步现象;TGF-β_1的表达与对照组WKY大鼠相比,则无明显差异。结论 IGF-1在SHR心肌组织内的表达增高,且与心肌肥厚同步,提示其参与心肌肥厚的发生及发展;TGF-β_1可能不参与SHR心肌肥厚及心肌纤维化的发生及发展。

关键词:胰岛素样生长因子-1;转化生长因子-β_1;自发性高血压大鼠;左室肥厚;心肌纤维化
中图法分类号:R392.11;R544.1 文献标识码:A

Expressions of IGF-1 and TGF-β_1 at different stages of spontaneously hypertensive rats and their relationship with the left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis

YU Xue-jun, HE Zuo-yun, QI Wen-hang (Deptartment of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of IGF-1 and TGF-β_1 at different stages of hypertension in the spontaneously hypertensive rats (SHR) and their relationship with ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis in the left ventricle. **Methods** The expression of IGF-1 and TGF-β_1 mRNA were measured with RT-PCR. Dynamic changes of the left ventricular hypertrophy and myocardial fibrosis were examined by biochemical assay and image analysis. **Results** Increased expression of IGF-1 was observed from the 14 th to the 24 th week which coincided with the progress of the left ventricular hypertrophy (LVH), but not with that of myocardial fibrosis (MF). No significant change was observed in the expression of TGF-β_1 in SHR group when compared with that of control. **Conclusion** Increased expression of IGF-1 in the left ventricle of SHR is probably associated with the progress of LVH.

Key words: insulin-like growth factor-1; transforming growth factor-β_1; spontaneously hypertensive rat; left ventricular hypertrophy; myocardial fibrosis

胰岛素样生长因子-1(Insulin-like growth factor-1,IGF-1)和转化生长因子-β_1(Transforming growth factor-β_1,TGF-β_1)是两类不同的生长因子,但均可促进细胞增生和蛋白分泌[1,2]。研究表明,在一些高血压模型中,二者在多种器官和组织内的表达均有增加[3,4]。然而,在自发性高血压大鼠(SHR)模型中,二者在心肌组织内表达的变化,尤其是动态变化如何,以及这些变化与心肌组织的两种主要病理改变——左室肥厚(Left ventricular hypertrophy,LVH)及心肌纤维化(Myocardial fibrosis,MF)的关系如何,尚不十分清楚。为此,在本实验中,应用SHR模型,检测心肌组织IGF-1和TGF-β_1的mRNA表达在SHR高血压不同发病阶段的动态改变,并分析它们与心肌肥厚及心肌纤维化相关参数的关系,以探讨这两种生长因子在高血压左室重构中的意义。

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组

实验所用SHR和WKY大鼠,由上海市高血压研究所动物室提供。所有大鼠均为雄性,用标准鼠食喂养。分为两组:①SHR 18只,分别于6、14、24周处死,进行检测,每组6只。②WKY 18只,分别于6、14、24周处死,进行检测,每组6只。

1.2 检测内容

1.2.1 收缩压(Systolic blood pressure,SBP)测定 大鼠40 ℃预热15 min,用大鼠电脑血压心率仪(上海高血压研究所研制),测量大鼠清醒状态下尾动脉的收缩压。

1.2.2 左室重量(Left ventricular weight,LV,即左室+室间隔重量) 断头处死大鼠,分离左心室,称取左室+室间隔湿重,并计算左室重量指数(Left ventricular weight index,LVI=左室重量/体重)。

1.2.3 大鼠心肌细胞的定性及定量分析 取左室中段横截面心肌组织,常规固定、包埋和制片,进行HE染色和VG染色,以显示心肌细胞和胶原组织。应用德国Zisse公司VMSP30型显微分光光度计和KS400型图像分析仪,采用我们以前描述的方法[5],测量心肌细胞的横断面积(CA)及心肌胶原容积分数(CVF)和心肌血管周围胶原面积和管腔面积比例(PVCA)。

1.2.4 测定大鼠心肌内羟脯氨酸浓度(Hydroxylproline concentration,HC) 分别称取左室游离壁约100 mg湿重的心肌组织,应用2∶1氯仿甲醇混合液进行脱脂,烘干后称取约6 mg,采用分光测定法测定羟脯氨酸含量,以已知不同浓度的羟脯氨酸作标准曲线。

1.2.5 心肌组织内TGF-β_1和IGF-1的mRNA表达 采用RT-PCR法,以β-actin作为内对照。引物合成:根据文献[6,7]报道特异性引物序列,由中国科学院上海植物生理研究所DNA合成仪合成。具体序列:

作者简介:于学军(1963-),男,河北省承德市人,博士,主治医师,主要从事高血压左室重构方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)65222730
收稿日期:2000-09-10;修回日期:2000-12-20

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

IGF-1 PCR 产物长度 152 bp
上游: 5' -GACCGAGGGGCTTTTAC-3'
下游: 5' -TGCTTTTGTAGGCTTCAGTGG-3'
TGF-β1 PCR 产物长度 298 bp
上游: 5' -GGACTACTACGCCAAAGAAG-3'
下游: 5' -TCAAAAGACAGCCACTCAGG-3'
β-actin PCR 产物长度 310 bp
上游: 5' -GAGCACCCTGTGCTGCTCACCCTAGG-3'
下游: 5' -GTGGTGGTGAAGCTGTAGCCACTCT-3'

1.3　统计学处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行检验。

2　结果

各组大鼠的收缩压(SBP), 左室重量(LV)及重量指数(LVI)和心肌细胞横断面积(CA), 见表 1。各组大鼠心肌组织内羟脯氨酸浓度(HC)、PVCA、CVF 及 TGF-β_1、IGF-1 的表达, 见表 2。

表 1　各组动物的收缩压、左室重量、左室重量指数及心肌细胞横截面积($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　SBP, LV, LVI and CA of different groups($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group		SBP(p/KPa)	LV(g)	LVI(ω_B/mg·g^{-1})	CA(μm^2)
SHR	6 W	19.50±1.50 *	0.31±0.06	2.89±0.41	135.77±19.02
	14 W	22.90±1.11 **△△	0.85±0.17 **△△	3.66±0.33 **△△	273.85±36.80 **△△
	24 W	25.70±1.88 ***#	1.02±0.19 ***#	4.14±0.52 ***##	450.92±50.07 ***###
WKY	6 W	15.73±0.85	0.31±0.08	2.83±0.22	135.47±25.98
	14 W	16.49±1.09	0.71±0.11	2.76±0.30	170.85±24.14
	24 W	17.18±2.20	0.74±0.07	2.61±0.42	172.87±18.77

W: weeks; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ *vs* WKY group; △△: $P<0.01$ *vs* 6 W; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$, ###: $P<0.001$ *vs* 14 W; CA: 心肌细胞横截面积

表 2　各组动物的心肌胶原含量、心肌胶原容积分数、面积管腔比例及 TGF-β_1、IGF-1 的 mRNA 表达($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　HC, PVCA, CVF level and mRNA expression of TGF-β_1, IGF-1($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group		HC(μg/100 mg)	PVCA(%)	CVF(%)	TGF-β_1(%)	IGF-1(%)
SHR	6 Weeks	2.55±0.54	1.02±0.14 *	3.96±0.45	0.705±0.078	0.513±0.087
	14 Weeks	3.17±0.86 *	1.43±0.21 *△	4.09±1.06	0.523±0.074△	0.389±0.020 *△
	24 Weeks	4.42±0.65 **#	1.59±0.26 **#	6.77±1.55 **##	0.503±0.056	0.365±0.049 **
WKY	6 Weeks	2.46±0.48	0.76±0.08	3.91±0.52	0.689±0.079	0.508±0.022
	14 Weeks	2.45±0.96	0.63±0.18	3.89±0.83	0.512±0.07	0.211±0.023
	24 Weeks	2.97±0.83	0.78±0.25	4.05±0.81	0.501±0.085	0.201±0.025

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$ *vs* WKY group; △: $P<0.05$ *vs* 6 W; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* 14 W

由表 1 可见, 在第 6 周时 SHR 的收缩压即已较 WKY 增高($P<0.05$), 在 14 和 24 周则持续增高($P<0.01$)。代表左室心肌肥厚的参数 LV、LVI 及 CA 在第 6 周时无明显变化, 14 周时开始增加($P<0.01$), 24 周时, 变化更为显著; 在这 3 个参数中, 以 CA 的变化最为明显($P<0.001$)。由表 2 可见, 6 周时 SHR 的 PVCA 已较 WKY 增高($P<0.05$), 以后持续增加, 14 周前较为明显($P<0.05$), 以后则较为缓慢($P>0.05$)。CVF 在 6、14 周时无明显变化, 但在 24 周时则明显增加($P<0.01$)。HC 则在 6 周无明显改变, 14 周时开始增加($P<0.05$), 24 周时更为明显($P<0.01$)。心肌组织内 TGFβ$_1$ 的表达在 SHR 呈逐渐下降的趋势, 但与 WKY 比较, 各组差异均无显著性。而 IGF-1 的表达从 14 周起, 明显高于 WKY($P<0.05$)。

3　讨论

SHR 是一慢性高血压模型。因其与人类原发性高血压在发病过程及发病机制上有许多相似之处, 因此, 探讨其发病机制尤其是靶器官损害的发病机制具有十分重要的意义。目前, 对高血压左室重建的病理变化已经进行了较深入的研究。LVH 和 MF 是它的两个重要的病理表现[3]。但引起高血压 LVH 和 MF 的机制还不十分清楚, 有人发现, 除血压增高外, 心肌组织内生物活性物质的变化是引起上述变化的重要原因。基于此, 我们检测了心肌组织内两种重要的生物活性物质——TGF-β_1 和 IGF-1 的表达情况, 并探讨它们与 LVH 及 MF 的关系。

3.1　SHR 心脏内 TGF-β_1 的 mRNA 的表达与 LVH 及 MF 的关系

TGF-β 在体内的分布和作用十分广泛。在哺乳类动物体内, 主要存在 3 个亚型: TGF-β_1、TGF-β_2 和 TGF-β_3, 其中 TGF-β_1 起主要的生物学作用。体内和体外试验都表明[2,8], TGF-β_1 可引起心肌细胞肥厚和'胎儿化表型'的出现, 促进心肌成纤维细胞分裂增生和胶原分泌增加, 加速 LVH 和 MF 的发生和发展。在一些实验性高血压模型中, 心脏组织内 TGF-β_1 的表达有所增加; 在 SHR 的主动脉和肾脏内, TGF-β_1 的表达亦有明显增高[8], 提示其在高血压的发展过程和局部病变中亦有重要作用。但在本试验中, SHR 的 TGF-β_1 在心肌组织内的表达与 WKY 一样, 呈逐步下降的趋势, 二者之间并无明显的差异。这说明在 SHR, 心肌组织内 TGF-β_1 对高血压 LVH 和 MF 的形成过程并不起主要的作用。

3.2　IGF-1 的动态改变及其与 LVH 及 MF 的关系

IGF-1 因其与胰岛素具有较高的同源性而得名。但它虽与胰岛素有一些相似的功能, 却有更强的促进细胞增生、分化的生理和病理作用。近来发现[1], IGF-1 对心血管系统具有广泛的影响, 它不但可促进细胞增生、蛋白分泌增加, 还可影响离子代谢和一氧化氮的生成, 并可引起心肌、血管平滑肌细胞和心肌成纤维细胞肥厚、增生, 胶原分泌增加。在多种高血压动物模型, 心脏和主动脉内 IGF-1 的表达增加[9]。这些均提示 IGF-1 参与 VH 和 MF 的形成过程。本实验显示, 在 LVH 和 MF 形成之前, IGF-1 的表达无异常。在 LVH 和 MF 确立以后, IGF-1 的表达则持续增高。显示出与左室肥厚形成过程比较一致的变化趋势, 提示其与 LVH 发生明显相关。但在 LVH 的形成阶段, 它们的变

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

化以哪者为先,即哪一因素是始动因子,因本试验观测时间的间隔较长,未能发现它们的先后顺序,不能作出肯定的结论。但在LVH的持续阶段,二者可以互为因果,加速LVH的发展。

心肌组织内羟脯氨酸的浓度可代表MF的病变程度,而PVCA和CVF则分别代表MF病变的两种主要形式——血管周围纤维化和间质纤维化的病变程度[5]。在本实验中,PVCA在6周即已增高,以后持续增加;CVF在6周及14周均无明显变化,24周时则明显增高,均与IGF-1呈非同步变化。HC在14周开始增加,24周更加明显,似与IGF-1的变化趋势一致,但HC是PVCA和CVF动态变化的综合反应,不能得出与IGF-1呈非同步变化的结论。因此,IGF-1与MF的关系比较复杂,尚有待进一步探讨。

参考文献:

[1] Discussant P, Sowers J R. Insulin and insulin-like growth factor in normal and pathological cardiovascular physiology[J]. Hypertension, 1997, 29(5): 691-699.

[2] Brand T, Schneider M D. The TGF-β superfamily in myocardium: ligand, receptors, transduction and function[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(1): 5-18.

[3] Brand T, Schneider M D. Transforming growth factor-β signal transduction [J]. Circ Res, 1996, 78(2): 173-179.

[4] Ebensperger R, Acevdo E, Melendez J, *et al*. Selective increase in cardiac IGF-1 in a rat model of ventricular hypertrophy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 243(1): 20-24.

[5] 于学军,戚文航,顾德官,等. 自发性高血压大鼠左室肥厚及心肌纤维化的动态变化[J]. 高血压杂志, 1999, 7(2): 159-162.

[6] Qian S W, Kondaiah P, Roberts A B, *et al*. cDNA cloning by PCR of rat transforming growth factor-β_1[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(10): 3 059.

[7] Rajkumar K, Dheen T, Krsek M, *et al*. Impaired estrogen action in the uterus of insulin-like growth factor binding protein-1 transgenic mice[J]. Endocrinology, 1996, 137(7): 1 258-1 264.

[8] Yingling J M, Wang X F, Bassing C H. Signaling by the transforming growth factor-β receptors[J]. Biochim Biophy Acta, 1995, 1 242(2): 115-136.

[9] Guron G, Friberg P, Wickman A, *et al*. Cardiac insulin-like growth factor 1 and growth hormone receptor expression in renal hypertension[J]. Hypertension, 1996, 27(Part 2): 636-642.

(编辑 王 红)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)04-0412-01

上皮钙粘蛋白在原发性肝细胞癌中的表达

E-cadherin expression in primary hepatocellular carcinoma

张艳玲,梁 后杰 (第三军医大学附属西南医院肿瘤科,重庆 400038)

近年来,随着癌浸润、转移的分子生物学机制研究不断加深,细胞粘附分子在其中所起的作用越来越引起人们的关注。本研究细胞粘附分子(E-cadherin)在原发性肝细胞癌中的表达,探讨其与肝癌侵袭转移的关系。

1 材料与方法

1.1 标本

33例肝癌肝癌组织取自西南医院肝胆科1996~1999年手术切除,并经病理证实为原发性肝细胞癌的标本,20例距肝癌2 cm的癌旁肝组织作为对照。标本用福尔马林固定,常规石蜡包埋,连续切片,厚4μm,HE染色。

1.2 免疫组化

采用敏感的链霉菌素-生物素(S-P)法,鼠抗人E-cadherin为美国Santa Cruz产品,S-P免疫组织化学染色试剂盒购自福州迈新生物技术公司,DAB显色试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品。用已知阳性的肝癌标本做阳性对照,用PBS代替一抗做空白对照。

1.3 方法(S-P法)

石蜡切片常规脱蜡至水,1%H_2O_2甲醇封闭内源性过氧化物酶30 min,经微波炉抗原修复后,依次加入正常工作血清,10 min,加一抗(1∶50,4 ℃过夜),二抗(生物素化兔抗鼠IgG 1∶100,30 min),S-P/HRP复合物(1∶100,30 min),上述步骤均以PBS缓冲液振洗3次,5 min/次,DAB显色,苏木精复染细胞核,常规脱水、透明、封片。

1.4 结果判断及统计学处理

以细胞呈清晰棕色为阳性,每张切片分别观察10个高倍视野,每个高倍视野计数100个肿瘤细胞或非肿瘤肝细胞内免疫染色阳性细胞数,计算出每张切片的阳性细胞百分数,按阳性细胞百分数分为4个等级,低于5%为阴性(-),5%~25%为(+),26%~50%为(++),51%以上为(+++)。统计学处理采用χ^2检验。

2 结果

2.1 E-cadherin在肝癌及癌旁组织中的表达

E-cadherin呈棕黄色颗粒,主要分布在胞膜和胞浆中。在33例肝细胞癌组织中E-cadherin染色阳性11例,表达总阳性率为33.33%,其中阳性强度以(+)~(++)为主;癌旁组织阳性率为77.78%,癌组织与癌旁组织阳性率差异有显著性($P<0.05$)。

2.2 E-cadherin表达与肝细胞癌转移的关系

将未转移组与转移组作比较,未转移组肝癌中E-cadherin的阳性率为42.9%;已转移组则为16.7%,两组比较,差异有显著性($P<0.05$)。

(下转415页)

作者简介:张艳玲(1966-),女,云南省昆明市人,硕士研究生,主治医师,主要从事肿瘤的放疗化疗方面的研究。电话:(023)68752516

收稿日期:2000-07-12;修回日期:2000-12-20

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