DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.03.029

文章编号:1000-5404(2000)03-0275-03

论著

PKC信号传导通路在缺氧心肌细胞表达VEGF中的作用

晋 军,黄 岚,李 红,向常青 (第三军医大学附属新桥医院心血管内科,重庆 400037)

提 要 目的:明确缺氧对心肌细胞表达血管内皮生长因子(VEGF)的影响及蛋白激酶C(PKC)信号传导通路在其中的作用。方法:将原代培养大鼠心肌细胞模型分组:①正常缺氧4组:A组正常对照;B组缺氧6 h;C组缺氧12 h;D组缺氧24 h。②PKC激动剂4组:A组缺氧24 h对照;B组加入PMA 10 ng/ml缺氧24 h;C组加入PMA 100 ng/ml缺氧24 h;D组加入PMA 1 000 ng/ml缺氧24 h。③PKC抑制剂2组:A组缺氧24 h对照;B组加入Chelerythrine 10 mmol/L缺氧24 h。免疫组化方法检测各组心肌细胞中VEGF的表达,经计算机图像处理,定量分析。结果:缺氧刺激心肌细胞VEGF表达上调,PMA与Chelerythrine分别增强及减弱VEGF在缺氧心肌细胞中的表达。结论:缺氧是心肌细胞表达VEGF的强烈刺激因素之一。缺氧诱导VEGF在心肌细胞中的表达,其信号传导途径部分是通过PKC通路实现的。

关键词 血管内皮生长因子;蛋白激酶C;心肌细胞;缺氧
中图法分类号 R322.11;R392.13;R845.22 文献标识码 A

Study of the role of PKC signaling pathway in VEGF expression in cardiac myocytes under hypoxia in rats

JIN Jun, HUANG Lan, LI Hong, XIANG Chang-qing (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract **Objective**: To study the effects of hypoxia on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cardiac myocytes in rats and the role of protein kinase C (PKC) signal transduction pathway in this event. **Methods**: The primary culture of the cardiac myocytes of rats was used. The effects of hypoxia were observed after the cardiac myocytes were cultured under hypoxia for 6, 12 and 24 hours. The role of PKC was determined after different concentrations of PMA (a PKC activator) or chelerythrine (a PKC inhibitor) were added to the medium of cardiac myocytes and cultured under hypoxia for 24 hours. VEGF protein was determined with immunohistochemical assay and image processing and quantitative analysis were done with a computer. **Results**: The expression of VEGF in the cardiac myocytes of rats increased after culture under hypoxia ($P<0.01$) and after the administration of PMA ($P<.01$) and decreased after the treatment of chelerythrine ($P<0.01$). **Conclusion**: Hypoxia is a powerful factor to increase the expression of VEGF in cardiac myocytes of rats and the activation of PKC is an essential component of the signal transduction pathway to increase the expression of VEGF in the cardiac myocytes.

Key words vascular endothelial growth factor; protein kinase C; cardiac myocyte; hypoxia

血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是一种分子量为46×10^3的分泌性糖蛋白,1989年被分离纯化[1],被认为是一种肝素结合分子,与其受体结合后能特异地作用于血管内皮细胞,强烈刺激其增殖,促进侧支血管形成,并对缺血心肌具有保护作用[2]。而缺血缺氧作为一种损伤因素是否能够引起心肌分泌VEGF增加从而启动心肌自我保护机制以及在此过程中的信号传导机制还不完全清楚。本实验旨在探讨PKC通路在缺氧诱导心肌细胞VEGF表达中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

新生Wistar乳大鼠(3 d)。原代乳鼠心肌细胞的培养,参考Simpson等[3]的方法,分离心室肌,去掉心外膜和大血管,剪

作者简介:晋 军(1969.09),男,山西省太原市人,博士研究生,主治医师,主要从事缺血性心脏病方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68755114-74601

收稿日期:1999-05-25;修回日期:2000-01-11

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

碎心室肌，0.1%胰蛋白酶37℃消化5~10 min。将收集的细胞悬液用100 μm孔径的尼龙滤网过滤并离心(800转10 min)，弃上清液，加入M199培养基悬浮分散细胞，接种到100 mm培养皿中，送入培养箱(5%CO_2-95%空气，37℃)培养。60 min后，吸出尚未贴壁的细胞悬液，倒置显微镜观察，可见单个细胞或成团细胞呈现不同频率的自发搏动(50~160次/min)。

1.2 心肌细胞缺氧模型

取出原代培养5 d的心肌细胞，更换为无血清培养液，每一培养皿为一观察单位，将实验组放入缺氧培养罐中，持续通入5%CO_2-95%N_2混合气体(5 L/min)，多次抽取罐内气体作血气分析，至P_{O2}为(6.5±0.4) mmHg，37℃培养24 h。

1.3 模型分组

①正常缺氧分4组：A组正常对照；B组缺氧6 h；C组缺氧12 h；D组缺氧24 h。②PKC激动剂4组：A组缺氧24 h对照；B组加入PMA 100 ng/ml缺氧24 h；C组加入PMA 10 ng/ml缺氧24 h；D组加入PMA 1 000 ng/ml缺氧24 h。③PKC抑制剂2组：A组缺氧24 h对照；B组加入Chelerythrine 10 mmol/L缺氧24 h。

1.4 免疫组化测定VEGF表达

心肌细胞经PBS冲洗后，以冷丙酮固定15 min，按SP免疫组化试剂盒使用方法检测，DAB显色，中心树脂封片。

1.5 统计学处理

图像分析软件系统图像处理定量(灰度值与阳性强度呈反比)，计量数据均以$\bar{x}\pm s$表示，组间比较用t检验。

2 结果

2.1 缺氧对心肌细胞VEGF表达的影响

缺氧6、12、24 h培养的大鼠心肌细胞(B、C、D组)与常氧条件下培养的心肌细胞(A组)相比较，其VEGF蛋白表达经图像分析处理定量，前者明显高于后者(27.286±0.756、25.190±0.663、23.571±0.957 *vs* 31.381±0.912 $P<0.01$)，且B、C、D组间比较差异显著(27.286±0.756 *vs* 25.190±0.663 *vs* 23.571±0.957)。表1说明在缺氧条件下心肌VEGF表达增强，且随缺氧时间延长而增加，两者存在正相关趋势。

表1 缺氧对VEGF表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The effect of hypoxia on the expression of VEGF($\bar{x}\pm s$)

Group	VEGF expression(Grey degree value)
A	31.381±0.912
B	27.286±0.756*
C	25.190±0.663*△
D	23.571±0.957*△#

*：$P<0.01$ *vs* A；△：$P<0.01$ *vs* B；
#：$P<0.01$ *vs* C

2.2 PKC激动剂与抑制剂对缺氧时心肌细胞VEGF表达的影响

PMA加入组(B、C、D组)心肌细胞在缺氧培养24 h后，其VEGF表达较A组(单纯缺氧)升高(21.381±1.615、19.476±1.152、17.381±1.508 *vs* 23.571±0.957 $P<0.01$)，且随PMA剂量增加而增加。Chelerythrine加入组心肌细胞VEGF表达量降低(27.619±0.731 *vs* 23.571±0.957，$P<0.01$)，见表2。

表2 PKC活性剂对VEGF表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 The effect of PKC activator on the expression of VEGF ($\bar{x}\pm s$)

Group	VEGF expression(Grey degree value)	
	PMA	Cherythrine
A	23.571±0.597	23.571±0.597
B	21.381±1.651*	27.619±0.731*
C	19.476±1.152*△	
D	17.381±1.508*△#	

*：$P<0.01$ *vs* A；△：$P<0.01$ *vs* B；
#：$P<0.01$ *vs* C

3 讨论

心肌组织需氧与供氧的不平衡，是冠心病最基本的病理生理基础，由此引发一系列的临床病状，如心绞痛、心肌梗塞等。已经发现，组织缺血、缺氧会导致新生血管的增多，以增加血流量，提高缺血组织的氧供，如：高原生活的人群、动物，其肺毛细血管密度增加，增强了氧的摄取量。这一过程可以看做是机体在外界环境刺激下的一种自我保护的反馈性调节反应。VEGF作为一种内皮细胞的有丝分裂原和促血管形成因子，直接特异地作用于血管内皮细胞，引起内皮细胞的增殖，在新生血管生成过程中起着“扳机”样作用。因而有理由推测VEGF也参与了急性心肌缺血、缺氧时的血管再生过程。本实验在培养心肌细胞缺氧模型中应用免疫组化方法探测缺氧对心肌细胞产生VEGF的影响。发现VEGF在心肌细胞中的表达，缺氧组较对照组显著升高(27.868±0.756、25.190±0.663、23.571±0.597 *vs* 31.381±0.912 $P<0.01$)，在缺氧6、12、24 h不同时段，VEGF的产生随时间延长而增加，证实缺氧是心肌细胞产生VEGF的强烈刺激因素之一，是机体在外界环境影响下自身反馈性的保护反应。缺氧反馈性地刺激VEGF产生增加，而VEGF与其受体结合后，产生一系列的生物效应，最终促进内皮细胞的有丝分裂，毛细血管生成增多，心肌侧支循环增加，其意义在于增加梗塞缺血区心肌的血液供应，挽救濒死心肌。

Mukhopadhy等[4]的研究显示：人内皮细胞在缺氧条件下产生VEGF是通过酪氨酸激酶途径传导的，Src家族成员的活化，可激活Raf-lk，从而启动Raf-lk介导的细胞内信号传导通路。更多的研究证实，缺氧诱导VEGF的表达还存在其它途径，Takagi等[5]证实：缺氧诱导视网膜微血管细胞产生VEGF，是由腺苷的释放以及腺苷激活cAMP依赖的蛋白激酶A所介

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

导的。此外，据报道：在缺氧诱导 VEGF 表达的信号传导中也有 Ca^{2+} 离子流的参与[6]。蛋白激酶 C(Protein kinase C, PKC)参与了体内多种物质的生物合成，是重要的信号传导介质。本实验应用 PKC 激动剂 PMA 及 PKC 抑制剂 Chelerythrine 探讨 PKC 通路在心肌细胞缺氧产生 VEGF 中的作用。结果显示：PMA 刺激组(B、C、D 组)，其 VEGF 表达量与缺氧对照组 A 组相比较，均有非常显著差异($P<0.01$)，且呈剂量相关趋势。而 PKC 抑制剂 Chelerythrine 组 VEGF 表达量与缺氧对照组相比降低($P<0.01$)。说明在缺氧状态下，PMA 促进心肌细胞分泌产生 VEGF，而 PKC 抑制剂则减弱了此作用，但未完全阻断此过程，由此说明：缺氧诱导大鼠心肌细胞分泌产生 VEGF 蛋白，其信号传导部分是通过 PKC 通路完成的。对于其它信号传导通路的存在尚有待进一步证实。

参考文献

[1] Hahimoto E, Teruhiko O, Takaski N, *et al*. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart[J]. Am J Physiol, 1994, 267(4): H1 948—H1 954.

[2] Banai S, Jaklitsh M T, Shou M, *et al*. Angiongenic induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by VEGF in dogs[J]. Circulation, 1994, 89(5): 2 183—2 189.

[3] Simpson P, Savion S. Differentiation of rat myocytes in single cell culture with and without proliferating nonmyocardial cells[J]. Circ Res, 1982, 50(1): 101—116.

[4] Mukhopadhy D, Tsiokas L, Zhou X M, *et al*. Hypoxia induction of human endothelial cell brow th factor expression through c-Src activation[J]. Nature, 1995, 375(2): 577—581.

[5] Takagi H, King G L, Robinson G S, *et al*. Adenosine medited hypoxia induction of vascular endothelial grow th factor in retinal microvascular endothelial cells[J]. Inv Ophtal Vis Sci, 1996, 37(5): 2 165—2 176.

[6] Claffy K, Wilkison W O, Spiegelman B M. Vascular endothelilal grow th factor regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways[J]. J Biol Chem, 1992, 267(16): 16 317—16 322.

(编辑 谢义霞)

文章编号：1000-5404(2000)03-0277-01

经验与短篇

用流式细胞术监测原位心脏移植病人术后的 T 细胞及亚群的变化

Monitoring the changes of T cell and its subgroup after orthotopic cardiac transplantation with flow cytometry

汪志文[1]，马 铮[2]，李 磊[1]，周元国[1] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所：[1] 分子生物学中心；[2] 胸心外科；重庆 400042)

我院于 1998 年 9 月成功地进行了 1 例扩张型心肌病患者的原位心脏移植手术，我们采用流式细胞术对术前、术后淋巴细胞、T 细胞及其亚群进行了详细的监测。

1 资料与方法

1.1 临床资料

患者，男，14 岁，汉族，因扩张性心肌病入院，符合心脏移植条件。供者，男，28 岁，脑死亡者。免疫抑制剂的使用状况：术前 1 d：开始给病人服用环孢素 A 和硫唑嘌呤剂量分别为 150 mg/次、2 次/d，37.5 mg/次、2 次/d；手术当日晨：环孢素 A 150 mg、硫唑嘌呤 37.5 mg 静滴；术后当晚：同手术当日晨，另加甲基强的松龙 1 000 mg 分 2 次静滴。以后：每日均按手术当日用药，术后第 4 天开始减免疫抑制剂用量。手术采用体外循环方法进行全心移植。

1.2 样品采集

于术前和术后 2、3、5、7 d 同法采患者静脉血 2 ml(肝素抗凝)送检。术前血为服免疫抑制剂前采集。

1.3 方法

采集的血液标本用法国 IMMUNOTECH 公司生产的荧光抗体，直接标记。操作步骤为：①20 μl 抗体＋100 μl 全血，混匀，25°C 室温放置 15 min。②加 500 μl 红细胞裂解液，混匀，25°C 放置 10 min。③加 500 μl pH 7.4 磷酸缓冲液，混匀，25°C 放置 10 min 后上机。④检测：采用美国 Coulter 公司生产的 ELITE ESP 型流式细胞仪观测外周血淋巴细胞、单核细胞、粒细胞、T 淋巴细胞及其亚群 CD_3^+、CD_4^+、CD_8^+、CD_4^+/CD_8^+ 的数量变化。每次检测计数 5 万个白细胞，其中 80%以上是单个白细胞，通过设定门通道进行分类计数，少量聚集粘连在一起细胞不能被有效计数，故不列入检测结果。流式细胞仪的光源为氩离子激光器，激发波长 488 nm，发射波长分别为 525 nm(FITC)、575 nm(PE)。

(下转 286 页)

作者简介：汪志文(1963.7)，女，四川省泸州市人，实验师，主要从事生化实验方面的研究，发表论文 5 篇。电话：(023)68757465

收稿日期：1999-01-21；修回日期：1999-08-06

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