DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.002


# PDGF在缺氧肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用及其机理初探*

刘 健** 罗德成 王培勇 孙秉庸 (第三军医大学基础医学部病理生理学教研室)重庆,400038

提 要 目的:研究缺氧性肺动脉高压肺血管结构改建中肺血管平滑肌细胞增殖的机理。方法:采用$^3$H-TdR参入和核酸分子杂交技术观察了缺氧对肺动脉平滑肌细胞(PASM)增殖及血小板源性生长因子(PDGF)-A链、-B链、α、β亚基受体基因表达的影响。结果:低氧6 h使PASM$^3$H-TdR参入减少($P<0.05$),无氧6 h PASM的$^3$H-TdR参入均较常氧对照组明显增多($P<0.001$),而缺氧12 h则促进参入,至24 h末2.5% $O_2$组和0% $O_2$组$^3$H-TdR参入均较常氧对照组明显增多($P<0.05$)。缺氧1.5 h至6 h使PASM的PDGF-A链mRNA表达下调,12 h后其表达显著上调($P<0.05$),缺氧能显著地抑制PASM的PDGF-B链mRNA表达($P<0.05$)。常氧条件下PASM能低水平表达PDGFα、β受体mRNA,缺氧使PASM的PDGF受体α、β亚基mRNA表达均上调($P<0.05$)。结论:缺氧可能通过显著上调PASM的PDGFα、β亚基受体mRNA表达,促进缺氧PASM的增殖,PASM自分泌PDGF-A可能在缺氧肺动脉平滑肌细胞增殖中也起重要作用。

关键词 缺氧;肺动脉;平滑肌细胞;增殖;血小板源性生长因子
中图法分类号 R594.3

慢性缺氧可引起肺血管收缩反应增强和肺血管结构改建,从而导致肺动脉高压。肺血管结构改建又表现为肌型血管中膜增厚,非肌型血管肌化,胞外基质合成增多等变化,其中肺血管平滑肌细胞增殖是血管结构改建的重要环节,其机理尚不十分清楚。培养的人脐静脉血管内皮细胞在缺氧时表达PDGF-B链增加,"旁分泌"血小板源性生长因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)可能对肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary arterial smooth muscle cell, PASM)的增殖起重要作用[1],但缺氧PASM的PDGF-A、-B链及其α、β受体基因表达的变化,PASM自分泌机理在缺氧性PASM增殖中的作用,尚未见报道,我们采用$^3$H-TdR参入和核酸分子杂交技术观察缺氧时PASM的增殖和PASM的PDGF及其受体mRNA表达变化,旨在探讨缺氧性肺动脉高压PASM增殖的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

胰蛋白酶、牛血清白蛋白(BSA)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、Ficoll 400、鲑鱼精子DNA硫膏酸胍(GIT)、硝酸纤维素膜(NC膜 45 μm)等;均系Sigma公司产品,$^3$H-TdR(中国原子能科学研究所),人PDGF-A、-B链-cDNA和人PDGFα、β受体cDNA探针由美国华盛顿大学Daniel F. Bowen-Pope博士惠赠,地高辛配基标记与检测试剂盒为德国Boehringer Mannheim产品。

### 1.2 PASM培养鉴定

采用贴片法[2]进行PASM的原代培养,PASM细胞呈现梭形,"峰-谷"长势,胞内有肌丝及致密体,α-SM actin免疫组化染色为阳性,鉴定为PASM。

### 1.3 $^3$H-TdR参入的增殖分析

8~10代PASM按每孔2万细胞接种于96孔培养板,长成层后换含1%经透析和灭活的去血小板血清RPMI-1640培养基后,分21% $O_2$、2.5% $O_2$和0% $O_2$ 6、12、18、24 h组,$n=6$,低氧组通入含2.5% $O_2$、92.5% $N_2$和5% $CO_2$的低氧混合气体,无氧组通入含0% $O_2$、95% $N_2$和5% $CO_2$的无氧混合气体,常氧对照组含21% $O_2$,待平衡后由血气分析仪(ABL3, Denmark)测定培养介质的氧分压,低氧组的氧分压约为2.99 kPa即2.5%~3% $O_2$,无氧组的氧分压约为0.93 kPa即低于1% $O_2$,最后6 h加入$^3$H-TdR(46.25 Bq/ml),用β-液体闪烁计仪(Rack β LKB-127,芬兰)测dpm。

### 1.4 PASM总RNA抽提

选用8~10代生长良好的PASM,换含1%经透析和灭活的去血小板血清,随机分为常氧对照组、无氧组、低氧组,$n=3$,每组细胞数约为$3\times10^6$,培养介质的氧分压同1.3所述,各组分别于1.5、3、6、12、24、48 h末用0.1%胰蛋白酶消化收集细胞,冷的PBS液(pH7.2)冲洗,离心后将细胞沉淀速冷于-196℃的液氮中保存冷冻。按Chomczynski所述方法[3]抽提细胞总RNA,经多功能紫外分光光度扫描仪(UV 240,日本岛津)测定,

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39270316
** 刘 健,女,28岁,住院医师,硕士,现在附属新桥医院心血管内科 重庆,400037
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

其 OD260/OD280比值均在 1.8以上。

### 1.5 PDGF cDNA探针标记及斑点印迹杂交

PDGF-A链、B链及其受体α、β亚基 cDNA探针的标记按地高辛配基标记与检测试剂盒说明书进行。所提 PASM总 RNA经充分变性后点于硝酸纤维素膜上,依次进行烤膜、预杂交、杂交、洗膜、封阻、与抗地高辛抗体(1∶5000)反应、漂洗、显色,湿膜用薄层色谱扫描仪(CS-910日本岛津)和图像分析仪(C-RIB日本岛津)进行光密度扫描和分析。

### 1.6 统计学分析

$^3$H-TdR参入数据采用单因素方差分析,所得斑点印迹杂交数据以常氧 1.5 h组 mRNA量作为100%,计算各组 mRNA的相对含量,进行 SuperANOVA分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,并作 FLSD显著性检验,以 $P<0.05$ 为统计学上相差有显著意义,$P<0.01$ 为相差有非常显著意义。

## 2 结果

### 2.1 缺氧对 PASM $^3$H-TdR参入的影响

低氧 6 h组可见 PASM的 $^3$H-TdR参入受抑制($P<0.05$),无氧 6 h可非常显著地抑制 PASM的 $^3$H-TdR参入($P<0.05$),12 h以后 $^3$H-TdR的参入量逐渐增多,其中 12 h无氧组与常氧对照组相比 $^3$H-TdR的参入增加显著($P<0.01$),至 24 h末低氧组和无氧组均较常氧对照组的 $^3$H-TdR参入增多($P<0.05$),见图 1。

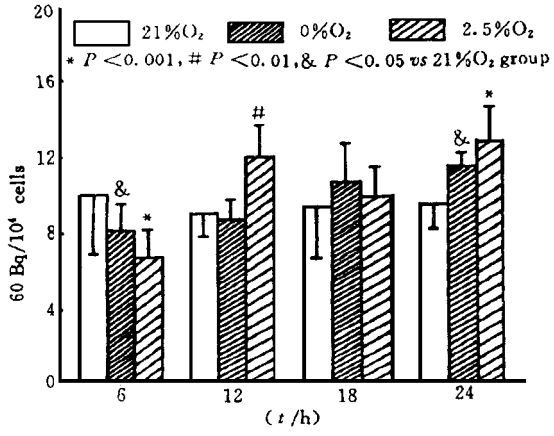



图 1 缺氧对 PASM $^3$H-TdR参入的影响

**Fig 1 Effects of hypoxia on PASM $^3$H-TdR incorporation**

### 2.2 缺氧对 PASM的 PDGF-A链、-B链、PDGF-α和β受体 mRNA表达的影响

斑点杂交显示常氧和缺氧条件下,PASM均有 PDGF-A链、-B链、PDGF-α受体和β受体 mRNA的表达。缺氧使 PASM的 PDGF-A链的表达呈先降后升趋势,与常氧组相比,缺氧 3 h、6 h使 PASM的 PDGF-A链 mRNA的表达降低($P<0.05$),而 12 h至 48 h使 PASM的 PDGF-A链 mRNA表达明显升高($P<0.05$)。缺氧 1.5 h至 24 h抑制 PASM的 PDGF-B链 mRNA的表达($P<0.05$)。常氧条件下 PASM均能低水平地表达 PDGF-α和β受体,缺氧能非常显著地上调 PASM的 PDGF-α、β受体亚基的 mRNA表达($P<0.01$),见图 2,3。

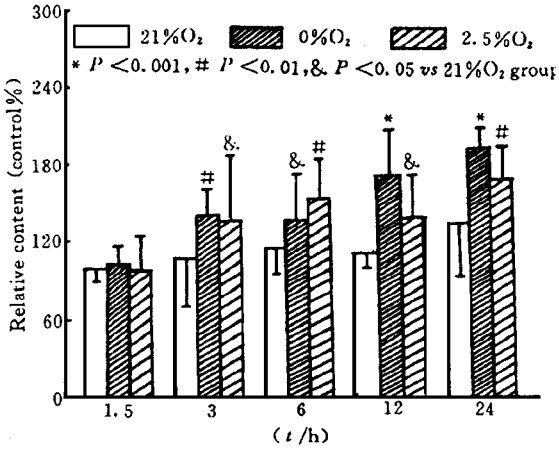



图 2 缺氧对 PASM的 PDGF-α 受体 mRNA表达的影响

**Fig 2 The effect of hypoxia (2.5% $O_2$ and 0% $O_2$) on PDGF-α receptor mRNA expression in PASM**

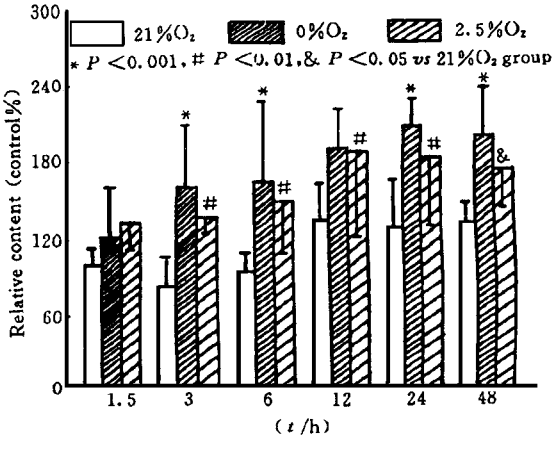



图 3 缺氧对 PASM的 PDGFβ受体 mRNA表达的影响

Fig 3 The effect of hypoxia (2.5% $O_2$ and 0% $O_2$) on PDGFβ receptor mRNA expression in PASM

## 3 讨论

缺氧可引起肺血管平滑肌细胞增殖、肺血管收缩反应增强和肺血管结构改建,是导致缺氧性肺动脉高压形成的重要因素,然而对缺氧是否刺激 PASM增殖的研究报道尚不尽一致。本实验采用 $^3$H-TdR参入和核酸分子杂交技术,对缺氧时 PASM的增殖变化及其部分可能机理进行了实验研究。各实验组均置于 1%经

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

透析和灭活的去血小板血清培养液中培养,排除了血清中生长因子对 PASM增殖的影响。结果表明缺氧 6 h末 PASM的 $^3$H-TdR参入量降低,之后随缺氧时间的延长,$^3$H-TdR的参入逐渐增加,至缺氧 24 h末 $^3$H-TdR参入明显高于常氧组,说明缺氧早期 PASM增殖受抑制,缺氧 12 h后则刺激 PASM增殖。

PDGF可由血管平滑肌细胞(VSMC)和血管内皮细胞(VEC)表达和分泌,PDGF对 VSMC具有强烈的促增殖作用,PDGF能引起 VSMC从收缩表型向合成表型转换,PDGF不仅能作为启动因子使 VSMC从 GO期向 G1期穿越,且在启动期和进展期均能刺激 VSMC的 DNA合成[4]。除此之外 PDGF还能通过增加 SMC内的 $Ca^{2+}$、$Na^+/H^+$ 交换加强和 $TXA_2$生成增多,刺激血管收缩[5],并增加胞外基质的合成[6]。PDGF的分泌及表达受多种因素的影响,迄今对平滑肌细胞尤其是缺氧肺动脉平滑肌细胞 PDGF-A、-B链及其相应受体的基因表达的研究,PASM自分泌 PDGF在缺氧肺血管结构改建中是否也起重要作用,报道尚少。我们实验显示缺氧 1.5 h至 6 h使 PASM的 PDGF-A链 mRNA表达下调,而 12 h至 48 h使 PASM的 PDGF-A链 mRNA表达明显升高,这与缺氧 PASM的增殖先受抑制后受刺激的表现相一致,说明 PASM自分泌 PDGF-A链能调节缺氧 PASM的增殖。实验还发现缺氧抑制 PASM的 PDGF-B链的基因表达,这与 Kourembanas等[1]发现的缺氧使血管内皮细胞(VEC)的 PDGF-B链的 mRNA表达增加[1]的结果相反。采用 VEC和 VSMC联合培养发现 PDGF-B链的转录和蛋白分泌均较单独培养时下降[7],揭示 VEC和 VSMC表达分泌 PDGF-B链之间可能存在不同的调节机理,且相互制约。

PDGF必须与靶细胞上的相应受体结合,才能产生生物效应,PDGF受体由 α、β 亚基组成,也存在于血管平滑肌细胞上,PDGF受体的表达在调控细胞生长增殖中起重要作用[8]。本实验研究发现常氧情况下,PASM的 PDGF-A、-B链均有高表达,而 PDGF-α、β 亚基受体 mRNA表达水平较低,因此对 PASM不产生促增殖作用。缺氧 12 h后 PASM的 PDGF-A链 mRNA表达显著上调,且缺氧 PASM的 PDGF-α、β 亚基受体 mRNA表达也显著上调,从而促进缺氧 PASM的增殖,虽然缺氧 12 h后 PASM的 PDGF-B链 mRNA表达相对减少,但仍有足够的 PDGF-B链与上调的 PDGF-α、β 亚基受体结合,参与缺氧 PASM增殖和缺氧肺血管结构改建的调控。缺氧性肺动脉高压大鼠肺中的 PDGF-A和 PDGF-B链基因均有高表达,说明在机体缺氧 PASM增殖可能与缺氧肺动脉内皮细胞及其它细胞高表达 PDGF[9]及 PASM高表达 PDGF受体密切有关。

## 参考文献


1 Kourembanas S, Hannan R L, Faller D V. Oxygen tension regulates the expression of the platelet-derived growth factor-B chain gene of human endothelial cells. J Clin Invest, 1990, 86(2): 670

2 王培勇,孙秉庸.缺氧对肺动脉平滑肌细胞细胞内游离及环磷酸腺苷浓度的影响。第三军医大学学报,1995, 17(1): 11

3 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162(1): 156

4 Kimura M, Kimura I, Okabe M *et al*. Dual modes of action of platelet-derived growth factor and its inhibition by trichostation-A for DNA synthesis in primary cultured smooth muscle cells of rat aorta. Biol Pharm Bull, 1994, 17(3): 399

5 Sachinidis A, Locher R, Hoppe J *et al*. The platelet-derived growth factor isomers, PDGF-AA, PDGF-AB and PDGF-BB induce contraction of vascular smooth muscle cells by different intracellular mechanisms. FEBS, 1990, 275(1,2): 95

6 Narayanan A S, Page R C. Biosynthesis and regulation of type V collagen in diploid fibroblasts. J Biol Chem, 1983, 258(19): 11694

7 Bonin L R, Damn D H. Vascular cell interactions modulate the expression of endothelin-1 and platelet-derived growth factor BB. Am J Physiol, 1994, 267(5Pt2): H1698

8 Koyama N, Hart C E, Clowes A W. Different function of the platelet derived growth factor-α and -β receptors for the migration and proliferation of cultured baboon smooth muscle cells. Circ Res, 1994, 75(4): 682

9 Katayose D, Ohe M, Yamauchi K *et al*. Increased expression of PDGF-A and B-chain genes in rats lungs with hypoxic pulmonary hypertension. Am J Physiol, 1993, 264(2Pt1): L100


(收稿: 1996-10-13;修回: 1997-06-18)

(编辑　冯崇英)

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

# Role of PDGF in the proliferation of cultured pulmonary arterial smooth muscle cells under hypoxic condition and its mechanism*

Liu Jian, Luo Decheng, Wang Peiyong, Sun Binyong (Department of Pathophysiology, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

**Abstract** Objective: To investigate the mechanism of the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASM) under hypoxic condition. Methods: The effects of hypoxia on the proliferation of PASM and PDGF gene expression were observed with $^3$H-TdR incorporation and dot blot hybridization. Results: The amount of $^3$H-TdR incorporation with PASM was significantly decreased at the end of the 6th hour after hypoxia ($P < 0.05$) and then increased gradually at the end of the 12th hour. DNA synthesis in PASM was remarkably enhanced at the 24th hour after hypoxia ($P < 0.05$). PDGF-A chain mRNA expression in PASM was significantly decreased when the cells were incubated under 2.5% $O_2$ and 0% $O_2$ hypoxic condition from 1.5 to 6 h ($P < 0.05$, *vs* 21% $O_2$ control) and then up-regulated till the 48th hour. However, PDGF-B chain mRNA was markedly reduced from 1.5 to 24h ($P < 0.05$). Under normoxic condition (21% $O_2$), PASM could express PDGF-α and -β receptor mRNA at a low level and they were up-regulated under hypoxic condition (2.5% $O_2$ and 0% $O_2$). Conclusion: Hypoxia can enhance the proliferation of PASM through obvious up-regulation of the expression of PDGF-α and β receptor mRNA. The autocrine of PDGF-A may play an important role in the proliferation of PASM under hypoxic condition.

**Key words** hypoxia; pulmonary arterial smooth muscle cell; proliferation; PDGF; PDGF receptor

* Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39270316

# 个案与短篇

## 泛影葡胺肾盂灌注治疗乳糜尿21例

## Treatment of 21 cases of chyluria by renal pelvis perfusion of meglucamine diatrizoate

田 进* 岑 松** 卢根生 (第三军医大学附属西南医院泌尿外科) 重庆,400038

1991~1995年我们用76%泛影葡胺肾盂灌注治疗乳糜尿21例,效果满意。报告如下:

### 1 临床资料

21例中男13例,女8例;年龄19~54岁,平均38.5岁;病史8月至11年,平均3.1年。患者均有典型的间隙性乳糜尿发作史,尿乙醚试验阳性。膀胱镜检发现乳糜尿来自左肾11例,右肾7例,双肾3例。

### 2 方法和结果

治疗前4 h高脂饮食,诱发乳糜尿后行膀胱镜检,选F$_5$输尿管导管插至肾盂后,用76%泛影葡胺20 ml于30 s内灌注肾盂。双侧者同时灌注。无效者1周后再次灌注。同时予海群生及低脂饮食。本组18例灌注1次乳糜尿消失。无效3例中,1例第2次灌注后乳糜尿消失,2例多次灌后仍无显效。乳糜尿消失的19例(90.95%)中,随访8例6月至5年,复发1例。灌注后部分病人出现腰胀痛,恶心及血尿,均较轻。

### 3 讨论

宋世德等[1]曾报道用硝酸银肾盂灌注治疗乳糜尿。用高浓度泛影葡胺肾盂灌注治疗乳糜尿,目前国内未见报道。原理与高渗葡萄糖 iv引起静脉蛋情况类似。它在充盈肾盂后逆流入淋巴管,使之产生广泛无菌性炎症反应,组织增生并纤维化而使瘘管闭合,乳糜尿消失。本法安全、有效、无损伤,同传统的硝酸银灌注等比较,毒性小,病人易于接受。

关键词 泛影葡胺;乳糜尿

中图法分类号 R696.8

### 参考文献

1 宋世德,丁 波,王纪三.硝酸银肾盂灌注加腹股沟淋巴静脉分流治疗乳糜尿.临床泌尿外科杂志,1996,11(1):57

(收稿:1997-05-12;修回:1997-09-07)

(编辑 冷怀明)

* 田 进,男,35岁,主治医师,学士,现在武警海南总队医院 海口,570203

** 海南省人民医院泌尿外科 海口,570203

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