DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.003

缺氧对肺动脉内皮细胞 PDGF-A -B链及其受体α、β亚基基因表达的影响

刘 健 王培勇 罗德成 孙秉庸 (第三军医大学基础部病理生理学教研室) 重庆, 630038
苟 俊 (第三军医大学基础部中心实验室) 重庆, 630038

提 要 为了研究缺氧性肺动脉高压形成的机理,采用核酸分子杂交技术观察缺氧对肺动脉内皮细胞(PAEC)血小板源性生长因子(PDGF)-A链、-B链及其受体α、β亚基基因表达的影响。结果表明低氧和无氧(2.5% O_2和0% O_2) 1.5~3h PAEC的 PDGF-A链 mRNA表达显著增加($P < 0.01$, vs常氧组),而 6~48h PDGF-A链 mRNA表达水平无明显改变。低氧和无氧 1.5~48 h均能显著地增加 PAEC的 PDGF-B链 mRNA表达($P < 0.05$)。常氧条件下 PAEC均能低水平地表达 PDGF-α亚基受体和β亚基受体,低氧和无氧则上调此两受体 mRNA表达水平($P < 0.05$)。由此说明缺氧不仅能使 PAEC"旁分泌" PDGF参与肺动脉平滑肌细胞增殖调节,也使 PAEC通过"自分泌" PDGD及上调其膜上的 PDGF受体基因表达,参与缺氧肺动脉内皮细胞自身功能调节,从而在缺氧性肺动脉高压肺血管收缩反应增强及肺血管结构改建中发挥重要作用。

关键词 缺氧;肺动脉;内皮细胞;血小板源性生长因子;受体
中图法分类号 R594.3

血管内皮细胞能合成并分泌多种血管活性物质,通过"自分泌"或"旁分泌"机理影响血管壁中各组成细胞的功能。内皮细胞位于血管的表面,能敏感地感受缺氧并通过尚不十分清楚的机理上调血管内皮生长因子(VEGF)[1],内皮素(ET)、红细胞生成素(Epo)、白介素-1α(IL-1α)等的基因表达[2],从而调节新血管生成、血管平滑肌细胞舒缩和增殖等,并参与缺氧性肺动脉高压发生过程。内皮细胞能分泌血小板源性生长因子(PDGF), PDGF是一多功能因子,主要对血管平滑肌细胞产生丝裂作用、收缩反应和趋化功能[3],缺氧能否通过影响肺动脉内皮细胞(PAEC)的 PDGF及其受体的基因表达,调节 PAEC自身功能,尚不十分清楚。本实验研究旨在探讨缺氧肺动脉内皮细胞功能改变及其在缺氧肺动脉高压形成中的作用。

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 1400、鲑鱼精子 DNA、异硫氰酸胍(GIT)、硝酸纤维素膜(NC膜 45μm)等,均系 Sigma公司产品,人 PDGF-A/B链 cDNA和人 PDGFα β受体 cDNA探针由美国 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 新生小牛肺动脉内皮细胞培养鉴定及实验分组

无菌条件下取出肺内动脉,采用改良的无创法将肺动脉翻面,D-Hanks液冲洗数次后,用 0.25%胰蛋白酶消化法收集肺动脉内皮细胞(PAEC),接种于含 20%新生小牛血清的 RPMI-1640常规培养基的培养瓶中,置 37℃ 5% CO_2培养箱中培养,每 3天换培养液一次,细胞生长融合成层时,经 0.25%胰蛋白酶消化传代。根据细胞呈单层铺路石状生长及兔抗人第Ⅷ因子相关抗原免疫组化染色阳性鉴定为内皮细胞。

选用 7~10代生长良好的 PAEC,每瓶按 $10^4/cm^2$细胞密度接种,待细胞长满融合后,换含 1%无血小板的血清培养基使细胞处于静止状态,随机分为常氧对照组(21% O_2)、无氧组(0% O_2)、低氧组(2.5% O_2),常氧组置 21% O_2, 5% CO_2, 74% N_2下培养,无氧和低氧组分别置 0% O_2或 2.5% O_2、5% CO_2, 95%或 92.5% N_2的缺氧密闭小室中培养,每组 3个样本,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 D-Hanks液(pH7.2)冲洗,离心后将细胞沉淀速冻于-196℃的液氮中保存备用。

1.3 PAEC总 RNA抽提

每组细胞数约 3×10^6,按 Chomczynski所述方法[4]抽提每组细胞总 RNA,用 pH7.0的 GIL溶液(4 mol/L异硫氰酸胍、25 mmol/L柠檬酸钠、0.5%十二烷酰肌氨酸钠、0.1 mol/L,β-硫基乙醇)溶解细胞,反复用水饱和酚、氯仿/异戊醇(49:1, V:V)抽提,用无水乙醇-20℃沉淀过夜,沉淀经离心真空干燥后用 0.1% DEPC处理双蒸水溶解,经多功能紫外分光光度扫描仪(UV 240,日本岛津)测定, A(OD)260/A(OD)280比值均在 1.9以上。所提的 RNA置-70℃冰箱保存,一月内用完。

1.4 PDGF-A链、-B链 cDNA探针标记

将 1.3 kb人 PDGF-A链 cDNA和 2.2 kb人 PDGF-B链 cDNA, 4.05 kb人 PDGF受体α亚基 cDNA和 5.57 kb亚基 cDNA分别煮沸变性后,在冰浴中加入六聚核苷酸混合物及 dNTP标记用混合物,在 Klenow大片段酶存在下,37℃反应 20~24 h,煮沸 5 min后-20℃保存备用。

1.5 斑点印迹杂交

从3组 PAEC的总 RNA中分别取 20μg,用样品稀释液(20× SSC、37%甲醛=1:1)稀释至 10μl, 65℃水浴 15 min使 RNA充分变性后点于硝酸纤维素膜上,80℃真空烤膜 2 h。烤好的 NC膜放入 20 ml预杂交液(50%甲酰胺, 5× Denhardt、6× SSPE、0.1%十二烷酰肌氨酸钠(Sarcosyl)、0.02% SDS)中 42℃震荡预杂交 6 h,将膜取出置入杂交液中(预杂交液成分加地高

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

辛配基标记 cDNA探针 25 ng/ml及经超声打碎热变性鲑鱼精 DNA 100μg/ml)42℃杂交 24~36 h,杂交后的 NC膜室温下于大量 2× SSC、0.1% SDS液体中洗膜 5 min×2次,68℃ 0.1× SSC、0.1% SDS漂洗 15 min×2次,室温下 2× SSC漂洗一次。用 5× Denhardt再次封阻后,与抗地高辛抗体(1∶5000) 37℃反应 30 min,用缓冲液洗去多余抗体,于含有 100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L $MgCl_2$, 4.5μl/ml NBT和 3.5 μl/ml X-磷酸盐 pH9.5的溶液中显色 6~8 h,终止显色后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,测定 mRNA相对含量。

1.6 统计学分析

所得数据以常氧 1.5 h作为 100%,采用多因素方差分析,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,并作 FLSD显著性检验。

2 结果

2.1 缺氧对肺动脉内皮细胞 PDGF-A链和-B链 mRNA表达的影响

低氧和无氧(2.5% O_2和 0% O_2) 1.5 h~3h PAEC的 PDGF-A链 mRNA表达显著增加($P<0.01$, *vs*常氧组),而 6 h至 48h PDGF-A链 mRNA表达水平无明显改变(图 1)。低氧和无氧 1.5~48 h均能显著地增加 PAEC的 PDGF-B链 mRNA表达($P<0.05$)(图 2)。

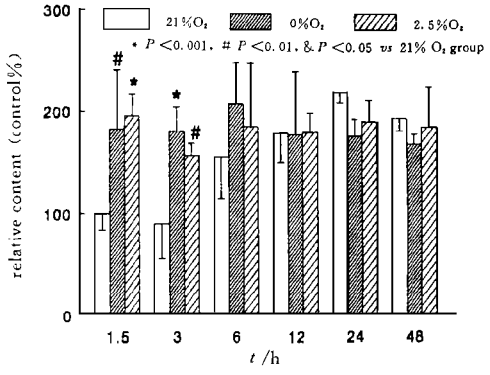


图 1 低氧和无氧对肺动脉内皮细胞 PDGF-A链 mRNA表达的影响

Fig 1 Effects of hypoxia and anoxia on PDGF-A chain mRNA expression in PAEC

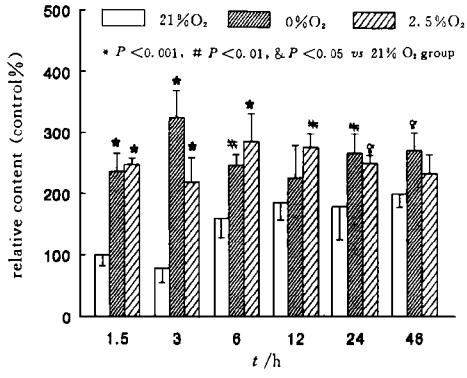


图 2 低氧和无氧对肺动脉内皮细胞 PDGF-B链 mRNA表达的影响

Fig 2 Effects of hypoxia and anoxia on PDGF-B chain mRNA expression in PAE

2.2 缺氧对肺动脉内皮细胞 PDGF受体 α-亚基、β亚基 mRNA表达影响

常氧条件下 PAEC均能低水平地表达 PDGF-α亚基受体和 β亚基受体,低氧和无氧则上调此两受体 mRNA表达水平,低氧和无氧(2.5% O_2和 0% O_2) PDGFα亚基受体 mRNA的表达以 1.5~6 h时增加尤为显著($P<0.001$)(图 3),无氧(0% O_2) PDGFβ亚基受体 mRNA的表达以 6~24 h时增加显著($P<0.05$),低氧(2.5% O_2) PDGFβ亚基受体 mRNA的表达以 3~6 h时增加显著($P<0.01$)(图 4)。

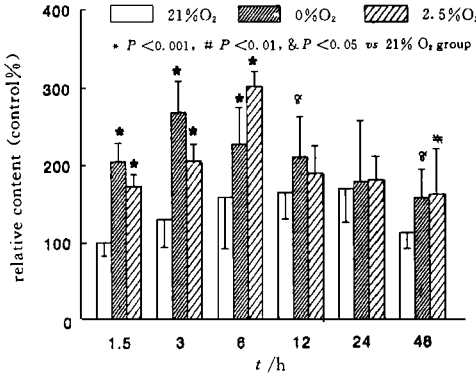


图 3 低氧和无氧对肺动脉内皮细胞 PDGF-α受体 mRNA表达的影响

Fig 3 Effects of hypoxia and anoxia on PDGF-α receptor mRNA expression in PAEC

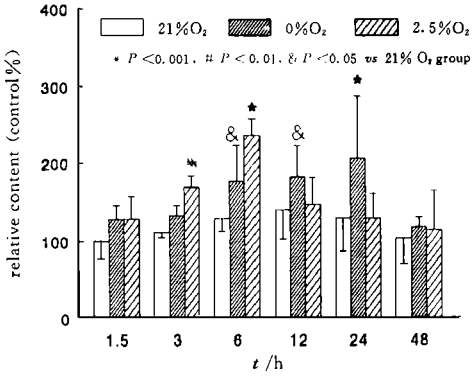


图 4 低氧和无氧对肺动脉内皮细胞 PDGF-β受体 mRNA表达的影响

Fig 4 Effects of hypoxia and anoxia on PDGF-β receptor mRNA expression in PAEC

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

3 讨论

肺血管收缩反应增强和肺血管结构改建是缺氧性肺动脉高压形成的主要血管变化特征[5],其中血管内皮细胞对血管平滑肌细胞舒缩和增殖功能的调节作用以及血管内皮细胞自身功能变化,与肺动脉高压形成密切相关。本实验证明低氧和无氧能引起 PAEC的 PDGF-B链 mRNA表达增加,PDGF-A链 mRNA表达呈一过性增加,而 PDGF主要作用的靶细胞是血管平滑肌细胞,能对其产生丝裂、趋化、收缩和刺激胞外基质合成等作用[3],缺氧时 PAEC表达 PDGF增多,可能通过"旁分泌"机理作用于肺动脉平滑肌细胞,产生一系列生物效应,是缺氧性肺动脉高压肺动脉平滑肌细胞增殖、肌型动脉中膜增厚、非肌型动脉肌化等血管结构改建的重要分子机理之一。

缺氧可引起肺腺泡内皮水肿、增生和肥厚,我们以前的实验观察到缺氧能显著地增加 PAEC细胞周期 G_2/M期的细胞比例,缺氧所致的单核吞噬细胞酸性/碱性成纤维生长因子和 PDGF的产生可介导内皮细胞增生[6],说明缺氧不仅能引起血管平滑肌细胞增殖,也能促进内皮细胞增生。缺氧致 PAEC增殖机理尚不十分清楚,我们的实验证明低氧和无氧能使 PAEC PDGF-A mRNA的表达一过性增加及 PDGF-B链、PDGF-α 和 β 受体亚基 mRNA的表达持续增加,提示低氧和无氧 PAEC的 PDGF及其受体表达增多,可能通过自分泌机理参与 PAEC自身增殖的调节。有学者实验证明,虽然 PDGF不是血管内皮细胞强有力的丝裂源,但也能促进其生长增殖[7],PDGF-BB通过与 PDGFβ 受体结合,促进体外培养的牛的主动脉内皮细胞增殖和血管生成[8],因此推测缺氧 PAEC的 PDGF及其受体高表达可能是缺氧 PAEC体外增生的机理之一。

参考文献

1 Shweiki D, Itin A, Soffer D *et al*. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature, 1992; 359(29): 834

2 Goldberg MA, Schneider. Similarities between the oxygensensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin. J Biol Chem, 1994; 269(6): 4355

3 Bobik A, Campbell JH. Vascular derived growth factors: cell biology, pathophysiology, and pharmacology. Pharmacol Rev, 1993; 45(1): 1

4 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extraction. Anal Biochem, 1987; 162 156

5 Hurewitz AN, Bergofsky EH. Pathogenitic mechanisms in chronic pulmonary hypertension. Heart or Lung, 1986; 15(4): 327

6 Kuwabara K, Ogawa S, Matsumoto M *et al*. Hypoxia-mediated induction of acidic/basic fibroblast growth factor and platelet derived growth factor in mononuclear phagocytes stimulate growth of hypoxic endothelial cells. Proc Natl Acad Sci, 1995; 92 4606

7 Zetter BR, Antoniades HN. Stimulation of human vascular endothelial cell growth by a platelet-derived growth factor and thrombin. J Supramol Struct, 1979; 11 361

8 Battegay EJ, Rupp J, Iruela-Arispe L *et al*. PDGF-BB modulates endothelial proliferation and angiogenesis *in vitro* via PDGFβ-receptors. J Cell Biol, 1994; 125(4): 917

(收稿: 1996-03-25;修回: 1996-07-17)

(编辑　张大春)

Effects of hypoxia on expression of A and B chains of platelet-derived growth factor and their α and β subunit receptors in cultured pulmonary arterial endothelial cells

Liu Jian, Wang Peiyong, Luo Decheng, Sun Bingyong (Department of Pathophysiology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Gou Jun (Central Lab, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract In order to explore the mechanisms of hypoxic pulmonary artery hypertension (HPAH), the effects of hypoxia on the expression of the A and B chains of platelet-derived growth factor (PDGF) and their α and β subunit receptors in cultured pulmonary arterial endothelial cells (PAECs) were observed with dot blot hybridization. It was found that mRNA expression of A chain of PDGF was significantly increased when PAECs were incubated under hypoxic (2.5% O_2) and anoxic (0% O_2) condition for 1.5 to 3 h ($P < 0.01$),

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

but it remained unchanged when PAECs were incubated likewise for 6 to 48 h. The mRNA expression of the B chain of PDGF was significantly increased from 1.5 to 48 h after the incubation ($P < 0.05$). PAECs could express α and β subunit receptors of PDGF in low level under normoxia but hypoxia and anoxia significantly upregulated mRNA expression of the two receptors ($P < 0.05$). Our findings suggest that hypoxia play an important role not only in modulating the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells through stimulating the paracrine of PDGF by PAECs but also in regulating the functions of PAECs through stimulating the autocrine of PDGF by PAECs and upregulating gene expression of PDGF receptors on the membrane of PAECs. This may contribute to the increase of contractility and structural changes of pulmonary arteries in HPAH.

Key words hypoxia; pulmonary arterial endothelial cell (PAEC); platelet-derived growth factor (PDGF); α subunit receptor; β subunit receptor

博士生论文摘要

猪源杀菌性/通透性增加蛋白(BPI)的提取、纯化及其体内外生物活性的研究

Extraction and purification of bactericidal/permeability increasing protein (BPI) from pig polymorphonuclear leukocytes (PMN), and study of its bio-activities *in vivo* and *in vitro*

周 红 肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆, 630038

革兰氏阴性杆菌感染能导致机体严重的病理改变,包括发热、低血压、休克、DIC、ARDS、MOF甚至死亡。作为革兰氏阴性菌外膜主要成分的内毒素(LPS),近来被认为是导致革兰氏阴性菌脓毒血症中最主要的介质,内毒素可触发一系列机体效应分子的释放(包括 TNF、IL-6、IL-1等),这些效应分子可介导内毒素血症的致死效应。虽然有效的抗生素可杀灭大部分细菌,但抗生素在杀灭细菌的同时也促使内毒素的释放,使得革兰氏阴性菌脓毒血症的治疗更为棘手。因此寻找一种既能杀菌又能中和内毒素的制剂显得越来越重要。

杀菌性/通透性增加蛋白(BPI)就是一种既能杀菌又能中和内毒素的蛋白质,它存在于哺乳动物 PMN 的嗜天青颗粒中。本研究试图建立从猪 PMN 中提取、纯化 BPI 的方法,这在国外文献中尚未见报道。

实验结果表明采用大肠杆菌 J5亲和纯化法或凝胶层析法均可得到纯度较高的蛋白质,该蛋白质具有:(1)增加革兰氏阴性菌外膜通透性和杀灭革兰氏阴性菌的作用;(2)能与革兰氏阴性菌的 LPS结合;(3)特异地与抗人 BPI多克隆及单克隆抗体相结合;(4)其分子量为 55× 10^3 u,与人及兔 BPI的相似;(5)其氨基酸含量与人及兔 BPI的相似。以上结果表明该蛋白即为 BPI,猪 PMN 中确实存在 BPI。虽然两种纯化方法均可得到纯度较高的蛋白质,相比较 J5亲和纯化法较简单,但纯化倍数较低(103);凝胶层析法步骤繁锁,工作量大,但纯化倍数高(170)。

对 BPI进行的体外实验结果表明:(1)猪源 BPI对许多革兰氏阴性杆菌(包括大肠杆菌、绿脓杆菌,肺炎杆菌、沙雷氏菌等),具有增加其外膜通透性和杀灭革兰氏阴性菌的作用,对革兰氏阳性菌无作用;(2)透射电镜下可见早期(15 min内)J5菌的变化主要局限在细菌外膜,细菌无明显改变,细菌内膜保存完好,高浓度 Mg^{2+} 的加入可使外膜基本恢复正常;稍后(30 min)细菌外膜完全破裂,胞质浊化,胞质外流,呈现不可逆的变化;(3)猪源 BPI能与革兰氏阴性菌的 LPS结合,并能抑制 LPS诱导的 TNFα 升高,抑制作用随浓度的增加而增加;(4)LPS、FMLP刺激后,人 PMN 膜表面 BPI的表达明显增加,但 BPI并未释放出来,因此在革兰氏阴性菌感染情况下补充外源 BPI是必需的。

对 BPI进行的体内生物活性研究在大白鼠内毒素血症、脓毒血症、烧伤脓毒血症模型上进行。结果表明:① BPI可明显提高大白鼠 5 h存活率;② BPI能够明显降低全血中细菌数量;③ BPI能够明显降低血浆内毒素水平;④ BPI能够明显降低 TNFα 峰值浓度;⑤ BPI能够明显改善 LPS诱导的葡萄糖代谢改变,表现为逆转 LPS引起的葡萄糖早期升高和此后的持续降低。说明 BPI对内毒素血症及脓毒血症大鼠具有明显的保护作用,说明猪源 BPI的体内、体外生物活性是一致的。

通过对猪源 BPI的体内、体外生物活性的研究得出以下结论:BPI是一种既可杀灭革兰氏阴性菌又可中和内毒素的蛋白质,具有广阔的应用前景,如果应用于临床,无疑将给治疗革兰氏阴性菌脓毒血症带来新的希望。

关键词 BPI;革兰氏阴性杆菌;内毒素
中图法分类号 Q51
(收稿:1996-07-16;修回:1996-07-22)
(编辑 王 红、沈锡庚)

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