

血小板衍生生长因子在老年小鼠新血管生成中的作用

关战军¹, 张传森^{2*}, 秦永文¹, 郑 兴¹

(1. 第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433; 2. 基础医学部生物医学工程研究所)

[摘要] 目的:探讨血小板衍生生长因子(PDGF)-AB 促进老年小鼠新血管生成的作用及机制。方法:从年轻成年和老年小鼠心脏中分离心脏血管内皮细胞(CMEC),用 RT-PCR 法分别测定其中 PDGF-BB 和 PDGF-AA mRNA 的表达,然后用 ChemoTX 培养皿测定 PDGF-AB 对 CMEC 迁移的影响。制作小鼠耳部血管生成模型,用激光多普勒测定 PDGF-AB 处理前后血流量的改变。然后,经心脏穿刺注入生物素化的右旋糖苷以活体标记血管,取鼠耳做免疫组化,于数字式显微镜下获取图像并定量分析小鼠耳部血管密度。结果:PDGF-BB 和 PDGF-AA 在年轻成年小鼠 CMEC 中均有较丰富的表达,而 PDGF-BB 在老年小鼠 CMEC 中无表达。PDGF-AB 处理后,培养的老年小鼠 CMEC 的迁徙能力明显增加($P < 0.01$)。PDGF-AB 局部注射后,老年小鼠耳部小血管密度和侧支循环的数目显著增加($P < 0.05$)。结论:PDGF-AB 可促进老年小鼠新血管和侧支循环的形成,其作用可能是通过 PDGF-BB 刺激 CMEC 迁徙来实现的。

[关键词] 血小板衍生生长因子;新血管生成;血管内皮细胞;老年小鼠

[中图分类号] R 541 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)06-0616-04

Angiogenesis stimulated by platelet-derived growth factor in aged mice

GUAN Zhan-Jun¹, ZHANG Chuan-Sen^{2*}, QIN Yong-Wen¹, ZHENG Xing¹ (1. Department of Cardiovasology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Institute of Biomedical Engineering, College of Basic Medical Sciences)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the role of platelet-derived growth factor (PDGF)-AB on angiogenesis in aged mice. **Methods:** Cardiac microvascular endothelial cells (CMEC) from the hearts of young adult and old mice were cultured. Expression of PDGF-BB and PDGF-AA was detected by RT-PCR. The migration of CMEC was determined with ChemoTX Chamber. Ear angiogenesis model was made in mice. Blood flow in neo-microvessels and collateral vessels was measured with Laser Doppler. Then biotin-labeled Dextran-lysine was injected into the mice through cardiac puncture to label vessels. Ears were cut and immunohistochemistry was carried out by ABC method. **Results:** Both PDGF-BB and PDGF-AA were highly expressed in CMEC of young adult mice; expression of PDGF-BB was not detected in aged mice. PDGF-AB reverted the levels of PDGF-BB in aged CMEC to the levels of young adult mice. Migration rate of CMEC in aged mice was significantly increased after stimulation by PDGF-AB ($P < 0.01$). PDGF-AB kept the blood flow in old murine ears, angiogenesis and collateral vessels were also markedly increased in murine ears after stimulation with PDGF-AB ($P < 0.05$). **Conclusion:** PDGF-AB can increase angiogenesis and collateral vessels in aged mice by stimulating CMEC migration with PDGF-BB.

[KEY WORDS] platelet-derived growth factor; angiogenesis; vascular endothelial cells; aged mice

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(6): 616-619]

缺血性心脏病是临床心血管疾病中常见的死亡原因,尤其在老龄急性心肌梗死患者有较高的危险性,且易发展为慢性充血性心力衰竭。基础和临床研究^[1]提示:高龄患者心脏中新血管生成(angiogenesis)潜力的下降是其预后不良的主要原因。已知血小板衍生生长因子(PDGF)具有促多种细胞分裂的作用。PDGF又分为多肽链同聚体 PDGF-AA, BB, CC 和 DD 及异聚体 PDGF-AB, 其生物学活性通过与其相应的受体结合而实现。虽有报道 PDGF 的表达与新血管生成有关,但其作为药用能否在老年动物中促进新血管的形成尚少研究。本研究初步从分子、细胞和动物实验 3 个层次对此问题作一探讨。

1 材料和方法

- 1.1 实验动物 3 个月龄和 18 个月龄 FVB 小鼠各 8 只,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。
- 1.2 心肌微血管内皮细胞(CMEC)的培养 取 3 个月龄和 18 个月龄 FVB 小鼠,断头后迅速取出心脏,置冰冷的 ADS 液中,用刀片切碎,加入胶原酶和 DNA 酶,室温下消化 45 min,离心后分别加入 40% Percoll、20% Percoll 和 PBS, 400×g 离心 15 min,

[基金项目] 国家自然科学基金(30171029)。
[作者简介] 关战军(1961-),男(汉族),博士,主治医师。
*Corresponding author. E-mail:Guanzj@yahoo.com

从20%和40%层间吸取CMEC,用PBS洗涤后加入含PDGF的FMNE培养液(Promega),置CO₂孵箱中培养,取第3代细胞用于实验。

1.3 RT-PCR检测PDGF-AA和PDGF-BB的表达 用RNA试剂盒(Qiagen)抽提CMEC总RNA,用下列引物扩增PDGF-AA和PDGF-BB。小鼠PDGF-AA 5'端:5'-CTC TCT GTG ACA AGG AAG CT-3';3'端:5'-TCA AGG TGG CCA AAG TGG AG-3'。小鼠PDGF-BB 5'端:5'-GTG GAG GAG CAG ACT GAA GG-3';3'端:5'-CCC ACA GTG GCT TTT CAT TT-3'。PCR条件:95 C 30 s,58 C 30 s,72 C 90 s,30个循环。取15~20 μl PCR产物与6倍稀释的上样缓冲液混匀,然后在2%的琼脂糖凝胶上电泳,检测各个基因的表达情况。

1.4 CMEC迁移测定 取第3代CMEC,更换培养液后加入DiI(5 μg/ml,Sigma)37 C 5% CO₂孵箱过夜以标记细胞,收集细胞待用。取ChemoTX双层培养皿(Neuro Probe Inc,Gaithersburg,MD),下层加入含PDGF-AB(30 ng/ml或等量的VEGF)的FMNE培养液,同时设空白对照组。将硝酸纤维素滤膜平铺其上,注意避免产生气泡,紧固螺子,然后将CMEC加入上层培养皿,37 C 5% CO₂孵箱过夜。取下滤膜,10%甲醛溶液固定后,刮去上层细胞,下层细胞即为迁移过去的CMEC,将滤膜置于载玻片上,在荧光显微镜下计数各孔细胞数,重复3次取平均值。

1.5 激光多普勒测定小鼠耳部血流 小鼠耳部主要由前、中和后3支动脉供血,如阻断中支和后支动脉,则耳郭后部的血供主要依靠前动脉和下部残余小血管间的侧支循环或新生的血管。设3个月龄和18个月龄FBV小鼠左耳为生理盐水处理的对照组,右耳为PDGF-AB处理组。PDGF-AB(20 ng/耳)和等量生理盐水在小鼠耳背经皮下注射给予。处理7 d后,将小鼠耳部由前向后分为6个区,用激光多普勒(ALF 21/21D,Advance,Tokyo)测定各区的血流量。然后从后向前剪断耳廓的2/3,重复测定以上各区的血流量,4、5和6区剪断后的血流量即可反映该区域新血管生长情况和侧支循环形成情况。

1.6 免疫组化检测小鼠耳部血管密度 完成激光多普勒测定后,经心脏穿刺注入生物素化的右旋糖酐(200万,Oregon,USA,5 mg/kg)的分子探针以活体标记血管,然后取完整鼠耳置4%多聚甲醛溶液中固定,从耳软骨部分钝性分离表层皮肤,使血管附着于表层皮肤,经双氧水和Triton X-100处理后,置辣根过氧化物酶(HRP)中孵育,用DAB染色后于数字化显微镜下获取图像,于计算机上计算各区

域的血管密度。

1.7 统计学处理 数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用*t*检验。

2 结果

2.1 PDGF-BB和PDGF-AA的表达 PDGF-BB和PDGF-AA在年轻成年小鼠CMEC中均有较高的表达,而PDGF-BB在老年小鼠CMEC中没有表达(图1)。

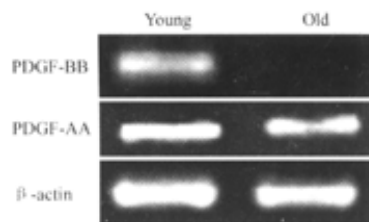


图1 PDGF-AA和PDGF-BB在年轻成年小鼠和老年小鼠CMEC中的表达

Fig 1 Expression of PDGF-AA and PDGF-BB in CMEC of young adult and aged mice

2.2 CMEC的迁移 PDGF-AB促进年轻成年小鼠CMEC迁徙的能力明显强于老年小鼠CMEC($P < 0.01$),而且,其促CMEC迁徙的能力强于VEGF($P < 0.01$,图2)。

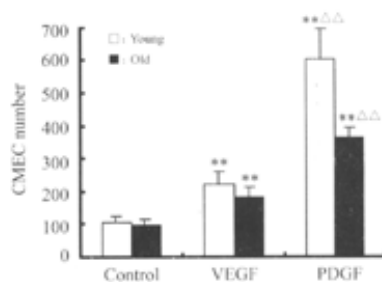


图2 CMEC迁移结果

Fig 2 Migration of CMEC after treatment with PDGF-AB

* $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs VEGF group

2.3 小鼠耳部血流量 老年小鼠耳部的血流量较年轻成年小鼠为低,局部注射PDGF-AB后,尽管耳部中动脉和后动脉没有血供,耳郭的后部区域仍可测得较高的血流量($P < 0.05$,图3)。

2.4 小血管密度 图4示对照组和PDGF-AB处理组小鼠耳部血管情况,PDGF-AB明显增加小血管的密度($P < 0.05$),大血管和中血管密度则无明显改变。

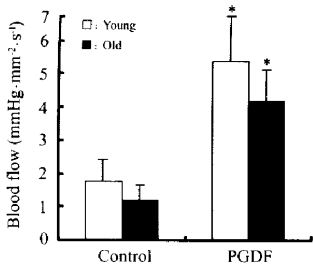


图3 激光多普勒检测小鼠耳部小血管血流量

Fig 3 Blood flow in murine ear measured with laser Doppler

*P<0.05 vs control group

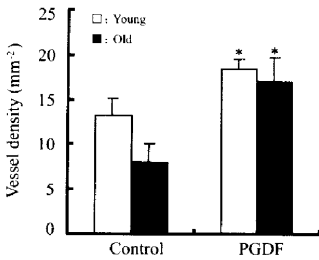


图4 小鼠耳部小血管密度

Fig 4 Small vessel density in young and aged murine ears

*P<0.05 vs control group

3 讨论

老年心脏中新血管生成能力的下降是一个复杂过程,可能包括了从分子、细胞到生理调节等一系列变化。研究老年心脏中新血管生成受抑制的最佳途径可能是分析心血管内皮细胞的调节。目前的研究多集中在 VEGF 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 促新血管生成方面^[2~4],而对 PDGF 的促新血管生成作用较少报道。

本研究发现 PDGF-AA 在年轻及老年小鼠心脏均有表达,而 PDGF-BB 仅在年轻心脏表达。由于 PDGF- α 受体 (PDGF-R α) 在年轻和老年大鼠心脏均有同样的基础表达^[5],故本研究结果表明老年小鼠心脏中 PDGF-BB 表达不足可能与 CMEC 活性下降有关。也可能与老年小鼠心脏缺乏一类特殊的有旁分泌作用的内皮细胞有关。另外,也可能在老年小鼠心脏中存在一类“抑制性生长因子”,后者可以抑制 PDGF-BB 在内皮细胞中的表达。这有待于在以后的实验中进一步证实。

细胞迁移 (migration) 能力是血管内皮细胞活性和新血管形成的关键因素。为了进一步理解

PDGF 的作用机制,我们研究了 PDGF-AB 对老年小鼠 CMEC 迁徙的影响,结果发现 PDGF-AB 可明显提高老年小鼠 CMEC 的迁徙能力。此外,我们在小鼠耳部局部给予 PDGF-AB,然后用激光多普勒测定血流量,并用免疫组化方法检测新生血管和侧支循环。结果显示,PDGF 明显增加小鼠耳部的血流量,组织学分析证实 PDGF-AB 处理可明显增加小血管 (侧支循环) 的密度。这些结果表明 PDGF-AB 通过增加血管内皮细胞的活性,从而促进老年小鼠的新血管生成。同时本组结果还显示 PDEF 在调节老年心脏心血管形成的作用强于 VEGF,这与 Unger 等^[6]的结果相一致。

除了新血管形成潜力的下降,老年心脏中血管内皮细胞功能失调也使老年人易罹患各种血管性疾病。以往的研究表明,高龄人群中血管内皮细胞的纤溶能力明显降低,易于发生血栓形成^[7,8]。另外,老年人血管张力的改变亦与血管内皮细胞基因表达异常有关,导致内皮依赖性的血管舒张^[9,10]。除了对血供的影响,老年心脏血管内皮细胞活性的改变还可以直接或间接地损害心肌细胞,从而加重老年心脏的病理改变。

在本研究中,我们采用小鼠耳部血供为观察对象,研究 PDGF-AB 促进新血管生成的能力。从二维角度来分析,小鼠耳部的 3 条动脉——耳前动脉、耳中动脉和耳后动脉的分布和左冠状动脉的左旋支、左冠状动脉的前降支和右冠状动脉在心脏的分布相似,两条动脉之间的血供有赖于侧支循环。由于正常情况下小鼠耳部的侧支循环较少,所以便于观察给药后侧支循环的变化,也即新血管生成的情况。综上所述,PDGF-AB 依赖性的调节途径在老年心脏新血管形成中起重要作用,本研究为将来发展促进老年心脏新血管形成的治疗方法提供了理论依据。

[参考文献]

[1] Iwasaka T, Nakamura S, Karakawa M, et al. Cardioprotective effect of unstable angina prior to acute anterior myocardial infarction[J]. *Chest*, 1994, 105(1): 57-61.

[2] Edelberg JM, Aird WC, Wu W, et al. PDGF mediates cardiac microvascular communication[J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(4): 837-843.

[3] Epstein SE, Fuchs S, Zhou YF, et al. Therapeutic interventions for enhancing collateral development by administration of growth factors: basic principles, early results and potential hazards[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 49(3): 532-542.

[4] Su H, Lu R, Kan YW. Adeno-associated viral vector-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer induces neovascular formation in ischemic heart[J]. *Proc Natl Acad Sci*

USA, 2000, 97(25): 13801-13806.

- [5] Fenton RA, Dickson EW, Meyer TE, et al. Aging reduces the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in the rat heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32(7): 1371-1375.
- [6] Unger EF, Goncalves L, Epstein SE, et al. Effects of a single intracoronary injection of basic fibroblast growth factor in stable angina pectoris[J]. *Am J Cardiol*, 2000, 85(12): 1414-1419.
- [7] Edelberg JM, Guan ZJ, Tang LL, et al. Endothelial dysfunction underlying cardiac angiogenic depression[J]. *Cir Res*, 2004, in press.

- [8] Gleeurp G, Winther K. The effect of aging on platelet function and fibrinolytic activity[J]. *Angiology*, 1995, 46(8): 715-718.
- [9] Rydholm H, Bostrom S, Eriksson E, et al. Different fibrinolytic potentials between human umbilical vein endothelial cells and human adult vein endothelial cells[J]. *Eur Surg Res*, 1996, 28(5): 380-387.
- [10] Barton M, Cosentino F, Brandes RP, et al. Anatomic heterogeneity of vascular aging; role of nitric oxide and endothelin[J]. *Hypertension*, 1997, 30(4): 817-824.

[收稿日期] 2003-10-25

[修回日期] 2004-03-30

[本文编辑] 曹 静

• 个案报告 •

以发热、胸痛为主要表现的复发性多软骨炎一例报告

Relapsing polychondritis with fever and chest pain as major symptoms: a case report

徐文胜, 况细平, 蔡 雄(第二军医大学长征医院感染科, 上海 200003)

[关键词] 复发性多软骨炎; 发热; 胸痛

[中图分类号] R 681.3 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2004)06-0619-01

1 临床资料 患者,男,56岁。因“咳嗽、胸痛、进行性消瘦1个月余,发热1周”于2003年2月14日入院。患者于2003年1月起无明显诱因出现咳嗽,咯少量白色黏痰,伴左下胸持续性疼痛,呼吸时加重,于2月9日起发热,无寒战,体温38℃左右,最高达38.6℃,外院曾先后诊断为“支气管炎、肺部感染”,“头孢噻肟钠、甲硝唑、头孢三嗪”等药物治疗效果不佳而入我院。病程中体质量减轻约7kg,无咯血、咯黄脓痰、盗汗及呼吸困难。体检:体温37.8℃,皮肤、巩膜无黄染,双颊下可触及多个黄豆大小淋巴结,质中,无粘连,轻压痛。双侧锁骨中线内第4肋下胸壁压痛,以胸肋关节处为著,无红肿,无胸壁挤压痛,心、肺、腹及神经系统检查无异常。诊断:发热原因待查。入院检查:B超、胸部CT、X线胸片及全身骨核素扫描均未见明显异常。血常规:红细胞 $3.29 \times 10^9/L$,血红蛋白112g/L,白细胞 $7.47 \times 10^9/L$,中性粒细胞0.815。C反应蛋白(CRP)12mg/L,红细胞沉降率(ESR)146mm/h,类风湿因子(RF)阴性,抗“O” $<250U$;抗核抗体、抗线粒体抗体、抗Smith抗体均阴性;肝肾功能正常;冷凝集试验阴性;血及痰细菌培养各2次,均阴性;尿本周蛋白阴性。骨髓象检查:(1)骨髓增生明显活跃;(2)浆细胞比值增高。入院后予左氧氟沙星治疗7d,咳嗽、胸痛、体温无变化,并出现声嘶。予双氯芬酸钠缓释胶囊(英太青)对症治疗后,咳嗽、胸痛减轻,体温渐正常。停用双氯芬酸钠缓释胶囊后,声音嘶哑进行性加重,再次发热,并出现双耳软骨部位紫红色肿胀,无触痛,电子喉镜检查未见异常。确诊为复发性多软骨炎,经泼尼松40mg/d治疗1周后,症状体征缓解出院。出院后1个月复诊,ESR恢复正常,但出现鞍

鼻及耳郭畸形。

2 讨论 复发性多软骨炎(relapsing polychondritis, RPC)是一种少见的全身性多器官损害疾病,临床以软骨及其他结缔组织的复发性、广泛性、破坏性的炎性病变为特征,累及耳、眼、鼻等特殊感觉器官,喉-气管-支气管结构、关节和心血管系统。RPC病变主要发生在各器官的结缔组织,最常见的受累组织为软骨,表现为富有基质成分的软骨发生糖蛋白斑块样的退化变性,该变化可引起对软骨糖蛋白、结缔组织、弹性蛋白的自体免疫反应。由于RPC缺乏特异的实验室诊断指标(常见的是ESR增快和轻中度贫血),因此诊断主要依据临床表现。目前诊断根据1979年Damiani修订的诊断标准:(1)双耳复发性软骨炎;(2)侵蚀性关节炎;(3)鼻软骨炎;(4)眼部炎症;(5)喉和(或)气管软骨炎;(6)耳蜗和(或)前庭功能受损;(7)软骨组织活检证实有软骨炎或多软骨炎。凡具备上述3条或以上,不需组织学证实;或具备1条并经病理组织学证实;或病变累及2个或以上解剖部位,对糖皮质激素治疗有效者,均可确立诊断。由于本病少见且临床表现复杂,诊断仍较困难,易贻误诊断。本例患者以咳嗽、胸痛及发热为主诉入院,入院后曾怀疑恶性实体肿瘤、结核及多发性骨髓瘤,均因证据不足而排除,直至1个月后出现明显耳部及喉-气管-支气管等多部位软骨病变,结合肋软骨炎表现才明确诊断为RPC。由于发热、咳嗽症状不在RPC诊断标准中,且未见文献报道,而延误了该患者的诊断。

[收稿日期] 2003-10-22

[修回日期] 2004-03-07

[本文编辑] 邓晓群

[作者简介] 徐文胜(1970-),男(汉族),硕士,主治医师。

E-mail: xws@medinfect.com