

·论著·

野百合碱诱导大鼠肺高压时韧粘素 mRNA 表达水平的动态变化

沈捷¹, 周爱卿¹, 秦玉明¹, 梁瑛¹, 李奋²

(1. 上海市儿科医学研究所心血管研究室; 2. 上海第二医科大学附属上海儿童医学中心心内科, 上海 200092)

[摘要] 目的 观察野百合碱(MCT)所致肺高压大鼠肺组织和肺动脉中韧粘素(TN)mRNA的动态表达水平,探讨其与肺高压肺血管重建的关系。方法 SD大鼠随机分为MCT组和正常对照组(CON),采用野百合碱皮下注射法诱导建立大鼠肺高压模型,并通过快速竞争性RT-PCR技术检测不同时间点(给药后第7,14,21,28天)大鼠肺组织和肺动脉中TN mRNA的表达水平。结果 TN mRNA水平在给药后第7天即有上调,CON组肺组织TN mRNA为 0.29 ± 0.04 ,MCT组为 0.56 ± 0.08 ,两组间差异有显著性($P < 0.01$);CON组肺动脉TN mRNA为 0.30 ± 0.04 ,MCT组为 0.57 ± 0.05 ,两组间差异有显著性($P < 0.05$)。TN mRNA水平上调早于肺动脉压的升高,随压力上升和时间延长TN mRNA继续增高。结论 TN参与了肺高压肺血管重建过程,在肺高压发病中可能具有重要作用。

[关键词] 韧粘素;细胞外基质;肺动脉高压;血管重建;大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)05-0519-03

Levels of Tenascin mRNA in Monocrataline-Induced Pulmonary Hypertension in Rats

SHEN Jie, ZHOU Ai-Qing, QIN Yu-Ming, et al.

Department of Cardiovascular Diseases, Shanghai Institute for Pediatric Research, Shanghai 200092, China

Abstract: **Objective** To study the levels of Tenascin (TN) mRNA in pulmonary vascular remodeling associated with pulmonary hypertension (PH) induced by monocrataline (MCT). **Methods** SD rats were randomly assigned into the control (CON) group and MCT group. The model of PH was created by injecting hypodermic MCT. Rapid competitive RT-PCR was used to examine the levels of TN mRNA in central pulmonary arteries (PAs) and lungs at different times after MCT or NS injections. **Results** Increased expression of TN mRNA was detected 7 days after the injection of MCT. The expression of TN mRNA in lungs of the MCT group (0.56 ± 0.08) was higher than that of the CON group (0.29 ± 0.04), $P < 0.01$. TN mRNA in PAs of the MCT group (0.57 ± 0.05) was higher than that of the CON group (0.30 ± 0.04), $P < 0.05$. The increase of the level of TN mRNA preceded the elevation of pulmonary pressure (14 days) and continued to increase with the rising of pulmonary pressure. **Conclusions** TN might be involved in the pathogenesis of pulmonary vascular remodeling with PH.

Key words: Tenascin; Extracellular matrix; Pulmonary hypertension; Vascular remodeling; Rat

肺动脉高压(简称肺高压)的发病机理至今尚未阐明。目前已知,肺血管重建是不同原因肺高压的共同病理特征。韧粘素(Tenascin, TN)是一种大分子细胞外基质蛋白,近年来有研究表明,它参与了血

管重建过程^[1]。本研究拟通过快速竞争性逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术,检测野百合碱(Monocrataline, MCT)所致肺高压大鼠肺组织及肺动脉中TN mRNA的动态表达水平,以帮助阐明

[收稿日期] 2001-01-08; [修回日期] 2001-03-14

[基金项目] 上海市高等学校科学技术发展基金资助项目(98B20)

[作者简介] 沈捷(1968-),男,博士,主治医师,现在上海儿童医学中心心内科。

TN 在肺高压肺血管重建中的作用。

1 材料和方法

1.1 肺高压动物模型的建立及肺动脉平均压的测定

雄性 SD 大鼠 72 只,随机分为野百合碱(MCT)组和正常对照(CON)组,每组 36 只。MCT 组大鼠以 2 %野百合碱(Sigma 公司)按 60 mg/ kg 剂量在背部脊柱旁皮下注射,CON 组则同法给予等体积生理盐水。分别于注射后第 7,14,21,28 天按孙波法^[2]采用自制右心测压导管测肺动脉平均压(mPAP),每时间点 9 只。

1.2 TN mRNA 表达水平的检测

大鼠测压后,立即开胸取右上肺叶组织约 50 mg,同时分离肺总动脉及左右分支,置冷无菌生理盐水中漂去血污,-80 保存备用。采用上海华舜生物工程公司提供的试剂盒抽提总 RNA,并用紫外分光光度计测定其纯度和含量。按北京赛百盛公司提供的试剂盒(Bioneer)说明书进行逆转录。

引物由上海 Sangon 公司合成,目的基因序列为:上游(b)5'-CAGAAGCTGA ACCGGAAGTTG-3',下游(c)5'-GGCTGTTGTTGCTATGGCACT-3',扩增产物为 278 bp;竞争性内参照(internal standard, IS)序列为:上游同目的基因(b),下游(a)为目的基因下游引物加上 GGGAGGG TTATTCTTGTGG-3',产物为 178 bp。

内参照(IS)制备参照文献^[3]进行:首先利用 b,a 引物进行第 1 次 PCR 扩增,产物用胶回收试剂盒(华舜公司)回收后,用 b,c 引物进行第 2 次扩增,以

提高其产量和纯度;用不同稀释度的 IS(160,80,40,20,10,5,2.5,1.25 fg)与一定量的目的 cDNA 进行竞争性 PCR 扩增,以选择 IS 的最佳竞争浓度。

取 4 μl RT 产物(cDNA)在 PCR 扩增仪上进行扩增。总反应体系为 50 μl,包括:10 ×PCR 缓冲液(内含 25 mmol/L 的 MgCl₂)5 μl,4 ×10 nMd NTP 2 μl,12.5 pmol/μl 的引物 b,c 各 2 μl,Taq 酶 1 μl(5 U/μl),目的 cDNA 4 μl,IS 1 μl(5 fg/μl),灭菌去离子水 33 μl,覆盖一滴轻质石蜡油后稍离心。反应条件:94 预变性 5 min,继之 94 变性 30 s,55 退火 30 s,72 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 1 个循环后 72 再延伸 7 min,4 保存产物。取 10 μl PCR 产物以 2 %琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像仪观测结果,目的 cDNA 产物与 IS 的灰度比值作为 TN 基因的相对表达水平。每样本测量 2 次,取平均值。

1.3 数据统计

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。结果分析采用 STATISTICA 5.1 统计软件进行,两组各对应时间点间比较用配对 *t* 检验,各组内差异行 ANOVA 检验。

2 结果

2.1 肺动脉平均压测定情况

MCT 组大鼠 mPAP 于给药后第 14 天开始升高,与同时点对照组相比差异有显著性(*P* < 0.01),并随时间延长继续上升,至第 28 天趋于稳定。CON 组各时间点间差异均无显著性(*P* > 0.05),MCT 组各时间点间差异有显著性(*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 两组大鼠各时间点 mPAP 值
Table 1 Values of mean pulmonary pressure (n = 9, $\bar{x} \pm s$, mmHg)

组别	7 d	14 d	21 d	28 d	F 值	P 值
CON 组	14.89 ±1.16	14.33 ±1.00	14.67 ±1.32	14.78 ±1.39	0.34	> 0.05
MCT 组	15.22 ±1.71	18.89 ±2.57	22.44 ±2.55	26.78 ±4.60	23.56	< 0.01
<i>t</i> 值	- 0.40	- 4.56	- 8.41	- 6.71		
<i>P</i> 值	> 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.01		

2.2 TN mRNA 在大鼠肺组织及肺动脉中表达的动态变化

MCT 处理后第 7 天,肺组织、肺动脉 TN mRNA 表达水平即有显著上调,并随时间延长而继续增高,至第 21 ~ 28 天达到高峰。肺

组织 CON 组各时间点 TN mRNA 差异有显著性(*P* < 0.01),第 14 天 TN mRNA 水平高于第 7 天,但不随时间延长而继续增长;肺动脉 CON 组各时间点间差异无显著性(*P* > 0.05)。见表 2。

表 2 不同时间点 TN mRNA 的相对表达水平

Table 2 The levels of expression of TN mRNA

($\bar{x} \pm s$)

	肺组织 (n=6)		t 值	P 值	肺动脉 (n=3)		t 值	P 值
	CON 组	MCT 组			CON 组	MCT 组		
第 7 天	0.29 ±0.04	0.56 ±0.08	- 10.16	< 0.01	0.30 ±0.04	0.57 ±0.05	- 4.99	< 0.05
第 14 天	0.38 ±0.03	0.94 ±0.13	- 10.92	< 0.01	0.36 ±0.09	0.94 ±0.07	- 6.25	< 0.05
第 21 天	0.41 ±0.07	1.07 ±0.17	- 7.16	< 0.01	0.37 ±0.10	1.11 ±0.16	- 5.94	< 0.05
第 28 天	0.45 ±0.08	1.19 ±0.21	- 8.23	< 0.01	0.38 ±0.09	1.16 ±0.14	- 6.14	< 0.05
F 值	6.97	18.59			0.59	17.07		
P 值	< 0.01	< 0.01			> 0.05	< 0.01		

3 讨论

肺高压是心脏病和慢性缺氧性肺病等常见而严重的并发症,是决定其预后的重要因素之一,其发病机理尚未阐明。肺血管重建是不同原因肺高压的共同病理特征,为近年肺高压发生机制的主要研究方向之一。一系列研究表明,细胞外基质的异常合成、分布及平滑肌细胞的增殖、迁移是肺血管重建的主要原因。TN 是一种细胞外基质糖蛋白,最初被认为是一种肌腱蛋白抗原,随后逐年来的研究发现,TN 在某些正常和病理组织生长、再生过程如胚胎发生、上皮-间充质相互作用、伤口愈合、肿瘤发生等方面有重要作用,并认为它参与了细胞活动的一系列调节机制,包括粘附、增殖、迁移、分化、细胞间相互作用以及细胞凋亡,近年又有研究表明它参与了血管重建过程^[1]。Hedin 等^[4]采用球囊导管损伤大鼠颈动脉,造成内膜剥脱模型,两周后免疫组化显示新生内膜中 TN 表达呈强阳性染色,动脉中层则见少量阳性斑点;而在正常大鼠主动脉及颈动脉,仅内膜可见极少量 TN 表达。Chen 等^[5]观察到 TN 在人体移植聚四氟乙烯 (PTFE) 血管环的增生内膜中有阳性表达。

最近, Jones 等^[6]采用分子生物学技术结合免疫组化方法,进行了 TN 在肺高压大鼠肺血管中的定位及半定量分析,结果显示肺高压时 TN 转录水平上调,蛋白沉积增加。本研究表明 MCT 皮下注射后第 7 天即可检测到肺组织和肺动脉中均有 TN mRNA 表达水平的显著上调,出现在肺动脉压力升高之前;并随时间延长和肺动脉压力的升高而继续上升。本课题组同时还观察了部分心脏病并肺高压患者肺小动脉中 TN 的表达情况,结果表明,肺高压时患者肺小动脉中 TN 蛋白表达明显增加,表达强度与肺动脉压力、病理分级呈正相关,且其分布多与 α-平滑肌肌动蛋白 (SMA) 及细胞增殖核抗原 (PC-

NA) 表达部位一致^[7]。另外,在平滑肌细胞培养中,有研究者观察到 TN 合成与平滑肌细胞表型有关^[4];TN 可促进某些生长因子对平滑肌细胞的促增殖、迁移作用^[8]。根据上述结果,有理由推测 TN 参与了肺高压肺血管重建过程,其作用机制可能是直接构成重建血管的成分或通过调节血管平滑肌细胞的形态和功能而影响重建过程。

目前, TN 结构与功能的关系尚未完全明了,故对其参与肺血管重建的机理有待进一步深入研究。但根据上述结果,可以肯定 TN 在肺血管重建中的重要作用,针对它及其受体的治疗可能成为控制血管重建的一条新途径。

参 考 文 献

[1] 沈捷,周爱卿. Tenascin 与血管重建 [J]. 国外医学心血管病分册,1999, 26(6): 323 - 325.

[2] 孙波,刘文利. 右心导管测定大鼠肺动脉压的实验方法 [J]. 中国医学科学院学报,1984, 6(6): 465 - 467.

[3] Jiang YH, Laurie A, Dacidson JR, et al. Rapid competitive PCR determination of relative gene expression in limiting tissue samples [J]. Clin Chem, 1996, 42(2): 227 - 233.

[4] Hedin U, Holm J, Hansson GK. Induction of tenascin in rat arterial injury. Relationship to altered smooth muscle cell phenotype [J]. Am J Pathol, 1991, 139(3): 649 - 656.

[5] Chen C, Ku DN, Kikeri D, et al. Tenascin: a potential role in human arteriovenous PTFE graft failure [J]. J Surg Res, 1996, 60(2): 409 - 416.

[6] Jones PL, Rabinovitch M. Tenascin - C is induced with progressive pulmonary vascular disease in rats and is functionally related to increased smooth muscle cell proliferation [J]. Circ Res, 1996, 79(6): 1131 - 1142.

[7] 沈捷,周爱卿. 黏蛋白在先天性心脏病合并肺高压患儿肺血管中的表达 [J]. 临床儿科杂志,2000, 18(2): 105 - 107.

[8] Jones PL, Crack J, Rabinovitch M. Regulation of tenascin - c, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha beta3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth [J]. J Cell Biol, 1997, 139(1): 279 - 293.

(本文编辑:俞燕)

• 521 •