

• 实验研究 Experimental research •

转化生长因子 $\beta 1$ 和纤溶酶原激活物抑制因子 1 促进创伤性深静脉血栓形成的实验研究

胡继红, 吴雪梅, 李兴国, 李宏昆, 郑宏宇, 赵学凌, 王 兵

【摘要】目的 研究深静脉血栓(DVT)大鼠模型股静脉内皮组织中转化生长因子(TGF)- $\beta 1$ 和纤溶酶原激活物抑制因子1(Serpine1)的表达变化,及在血栓形成中的作用。方法 将60只SD大鼠随机分为对照组(A组,10只)和实验组(50只)。实验组采用股静脉钳夹联合下肢石膏制动构建大鼠DVT模型。于不同时间点(创伤后2.5h和25h)解剖股静脉观察血栓发生率、严重程度,并将实验组分为B组(血栓形成前组,创伤后2.5h)、C组(血栓形成组,创伤后25h)和D组(血栓不形成组,创伤后25h)。分离股静脉内皮组织,提取总RNA,采用Genechip Rat Genome 230 2.0基因芯片筛查差异表达的基因,进而采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)验证这些基因的表达变化,并针对上述基因进行Pathway等生物信息学分析。结果 基因芯片分析及实时PCR结果均发现创伤后2.5h大鼠股静脉内皮组织中TGF- $\beta 1$ 和Serpine1表达均上调,且B组高于A组和D组($P < 0.05$);血栓形成时,两者亦显著上调,且C组高于A、B、D组($P < 0.05$),而A、D组间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。Pathway分析提示TGF- $\beta 1$ 是Serpine1的上游调控基因,可诱导Serpine1的过度表达,抑制纤溶,促进血栓形成。结论 局部静脉内皮组织中TGF- $\beta 1$ 和Serpine1表达水平上调可能在创伤性DVT形成中发挥重要作用。

【关键词】深静脉血栓;转化生长因子- $\beta 1$;纤溶酶原激活物抑制因子1;纤维溶解

中图分类号:R543.6 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2011)-11-0890-05

The predisposing effect of TGF- $\beta 1$ and serpine-1 on the formation of traumatic deep vein thrombosis: an experimental study in rats HU Ji-hong, WU Xue-mei, LI Xing-guo, LI Hong-kun, ZHENG Hong-yu, ZHAO Xue-ling, WANG Bing. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, China

Corresponding author: WANG Bing, E-mail: wangbingdoctor@126.com

【Abstract】Objective To investigate the changes of TGF- $\beta 1$ and serpine-1 expression in femoral vein endothelial tissue in the experimental rat models with traumatic deep vein thrombosis (DVT) and to study the effect of expression level on the formation of traumatic deep vein thrombosis. Methods A total of 60 SD rats were randomly divided into control group ($n = 10$) and experimental group ($n = 50$). Rat model of DVT used in experimental group was established by clamping the femoral vein together with the fixation of the lower extremity with plaster splint. The femoral arteries were dissected at 2.5 and 25 hours after trauma to observe the occurrence of thrombus and its severity. Based on the degree of thrombus formation, the rats in the experimental group was divided into group B (pre-thrombogenesis, 2.5 hours after trauma), group C (thrombogenesis, 25 hours after trauma) and group D (non-thrombogenesis, 25 hours after trauma). Then total RNA was extracted from the local femoral venous tissue. The different expressed genes were screened by adopting a special gene chip, Rat Genome 230 2.0. These gene expressions were further identified by real-time PCR. In addition, these genes were further analyzed by using Pathway technique and other biological information analysis. Results The results of both gene chip hybridization analysis and real-time PCR showed that the mRNA expressions of both TGF- $\beta 1$ and serpine-1 in rat femoral vein endothelial tissue were

significantly up-regulated at 2.5 hours after trauma, in addition, the expressions of group B were significantly higher than those of group A and group D ($P < 0.05$). When the thrombus was formed, the up-regulating expressions of both TGF- $\beta 1$ and

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960389,81060151);
云南省科技厅-昆明医学院联合项目(2009cd159)

作者单位:650032 昆明医学院第一附属医院影像中心(胡继红),骨科(吴雪梅、李兴国、李宏昆、郑宏宇、赵学凌、王 兵)

通信作者:王 兵 E-mail: wangbingdoctor@126.com

serpine-1 were also seen, which was remarkably higher in group C than those in groups A, B and C ($P < 0.05$), although no significant difference in expression level existed between group A and group D ($P > 0.05$). Pathway analysis showed that TGF- β 1 was the epistatic regulatory gene of serpine-1, as it could induce the over-expression of serpine-1, inhibit fibrinolysis and promote thrombosis. **Conclusion** The results obtained from the present study indicate that the up-regulated TGF- β 1 and serpine-1 in local femoral venous endothelial tissue may play a crucial role in the formation of traumatic deep venous thrombosis in experimental rats. (J Intervent Radiol, 2011, 20: 898-894)

【Key words】 deep vein thrombosis; Transforming growth factor-beta 1; serpine-1; fibrinolysis

深静脉血栓(deep vein thrombosis, DVT)是创伤或骨科手术后的常见并发症,随着预防和治疗方法的进展,其发生率已明显下降,但对于严重创伤或大手术后的老年患者,卧床或制动时间较长,下肢静脉淤滞,易发生 DVT^[1-2]。DVT 的早期预测诊断和预防显得非常重要,但目前对血栓形成早期局部深静脉内皮细胞、血小板、炎性细胞 3 个重要组织间的相互作用及其调控,诱导局部静脉微环境失衡,促使血栓形成的机制尚不完全清楚,仍未发现较可靠的预诊标志物。本研究重点针对 DVT 形成早期,筛选局部股静脉内皮组织中差异表达基因,探讨它们在 DVT 形成中的作用,为探寻预诊标志提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物

所有动物协议都经当地动物实验和伦理委员会批准。60 只 8~12 周龄、重(235 ± 35)g 的 SD 大鼠购自昆明医学院动物中心(批号:2005-0008),不考虑性别及特殊病原体。

1.2 大鼠创伤性 DVT 模型的建立及分组^[3-4]

将 60 只 SD 大鼠随机分为对照组(A 组,10 只)和实验组(50 只),对照组切开大腿皮肤后缝合创口作假手术处理,实验组采用蚊式钳钳夹双侧股静脉联合石膏制动双下肢构建大鼠 DVT 模型。于不同时间点(创伤后 2.5 h 和 25 h)处死大鼠,解剖股静脉,观察血栓发生率、严重程度,并将实验组分为 B 组(血栓形成前组,创伤后 2.5 h,10 只)、C 组(血栓形成组,创伤后 25 h,22 只)和 D 组(血栓不形成组,创伤后 25 h,18 只)。将钳夹部位的股静脉(约 2 cm 长)连同周围组织一同取下,用生理盐水漂洗,去除

血管内的血栓和杂质,显微镜下分离静脉内皮组织,裂解组织,提取总 RNA。

1.3 RNA 提取和大鼠基因芯片杂交

设计能检测与氧化应激、内皮细胞凋亡、凝血级联反应活化、血小板活化、炎症细胞活化等高度相关的候选基因。用一步法提取总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳和分光光度计测量其数量、质量,稳定后置于 -80°C 保存,有效的 RNA 样本于 48 h 内送往上海 Ltd 生物芯片公司杂交检测。

1.4 基因组数据分析

基因组的数据分析用美国昂飞公司开发的分析软件(V 5.0,上海 Ltd 生物芯片公司),筛选出不同组之间的差异表达基因[TGF- β 1 和纤溶酶原激活物抑制因子 1(Serpine1/PAI-1)]。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 TGF- β 1 和 Serpine1 表达

采用美国 ABI 7900HT Fas 进行实时 PCR 分析,大鼠 GAPDH 作为对照。引物设计用加拿大 Premier 公司开发的 primer 5.0,PCR 引物设计软件,见表 1。TGF- β 1 和 Serpine1 基因的相对表达量按公式 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = 2^{[\text{CtN}(\text{T-gene}) - \text{CtN}(\text{GAPDH})] - [\text{CtA}(\text{T-gene}) - \text{CtA}(\text{GAPDH})]}$ 计算^[5]。引物设计见表 1。

1.6 TGF- β 1 和 Serpine1 之间的信号通路分析

采用 KEGG PATHWAY Database 对 TGF- β 1 和 Serpine1 进行等信号通路生物信息学分析,并查阅相关信号通路参考文献。

1.7 统计学分析

实验重复 3 次,使用 SPSS11.5 统计学软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析(q 检验)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 TGF- β 1 和 Serpine1 引物设计

基因	正义链(5'-3')	反义链(5'-3')	产物大小(bp)	温度($^{\circ}\text{C}$)
TGF- β 1	GAGGATGAAAGAAACAGCCAGCT	CTGATCCCATTGATTTCAC	155	52
Serpine1	GAGGATGAAAGAAACAGCCAGCT	CCCCTATGAAATTAGATTTCACGT	145	56
GAPDH	AACCTGCCAAGTATGATGACATCA	TGTTGAAGTCACAGGAGACAACCT	111	55

2 结果

2.1 基因芯片杂交分析

创伤后 2.5 h, 大鼠股静脉内皮组织中 TGF- β 1 和 Serpine1 表达上调, B 组高于 A、D 组 ($P < 0.05$), 血栓形成时, 两者亦显著上调, 且 C 组高于 A、B、D 组 ($P < 0.05$), 而 A、D 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1)。

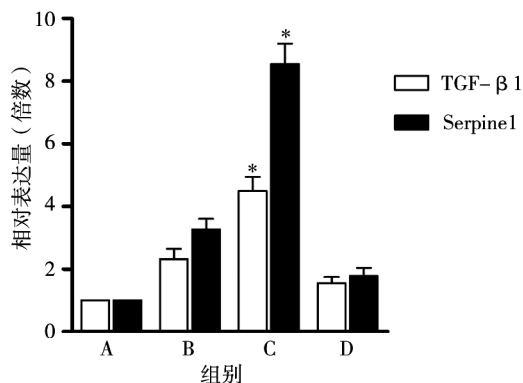
2.2 实时 PCR 结果

实时 PCR 与基因芯片的检测结果一致, 创伤后 2.5 h, 大鼠股静脉内皮组织中 TGF- β 1 和 Serpine1 表达上调, B 组高于 A、D 组 ($P < 0.05$), 血栓形成时, 亦显著上调, C 组高于 A、B、D 组 ($P < 0.05$), 而 A、D 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2 和图 1。

表 2 TGF- β 1 和 Serpine1 的相对表达量

组别	TGF- β 1		Serpine1	
	Δ CT 值	与 A 组相比 (倍数)	Δ CT 值	与 A 组相比 (倍数)
A	15.46 \pm 0.46	1	11.05 \pm 0.61	1
B	14.26 \pm 0.28	2.32 \pm 0.32	9.34 \pm 0.74	3.27 \pm 0.33
C	13.30 \pm 0.42	4.49 \pm 0.45 ^a	7.95 \pm 0.54	8.55 \pm 0.65 ^a
D	14.84 \pm 0.30	1.55 \pm 0.19	10.23 \pm 0.51	1.78 \pm 0.26

a 与其他三组相比, $P < 0.05$



* 与其他三组相比, $P < 0.05$

图 1 大鼠股静脉内皮组织中 TGF- β 1 和 Serpine1 的相对表达量

2.3 TGF- β 1 与 Serpine1 间的 Pathway 分析

TGF- β 1 是 Serpine1 的上游调控基因, 可诱导 Serpine1 的过度表达, 抑制纤溶 (图 2)。

3 讨论

3.1 DVT 危害大、预防困难, 血栓形成早期的分子调控机制尚不完全清楚

近年来, 随着预防和治疗药物的发展, DVT 发生率虽已下降, 但对于严重创伤或大手术后的老年患者, 发生率仍然较高, 全膝关节置换术后的发生率

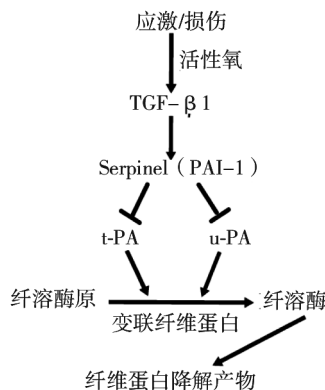


图 2 TGF- β 1 与 Serpine1 间的 Pathway 分析

为 42% ~ 57%, 全髋关节置换术后为 41% ~ 85%^[1]。若血栓形成不稳定, 易脱落导致肺栓塞, 危及生命。结合临床症状、体检、影像学、实验室检查综合判断是前 DVT 诊断的主要方法, 但只有血栓已经形成才能明确诊断^[6-7]。而对于血栓形成早期, 静脉内皮细胞、血小板、炎性细胞之间的相互作用及其调控, 导致凝血/抗凝、纤溶/抗纤系统失衡, 促进局部静脉微环境向利于血栓形成方向发展的分子机制尚不完全清楚, 尚无较可靠的早期诊断和预测 DVT 的分子标志物。

3.2 血栓微环境形成的分子调控机制在 DVT 形成中具有重要意义

局部深静脉微环境功能失调, 局部血流淤滞, 缺氧、酸性代谢产物堆积, 导致内皮细胞活化因子表达增加 (ROS、NF- κ B、IL-6、TNF 等), 内皮细胞活化抑制因子表达下降 (NO、GSH 等), 诱导神经酰胺产生, 损伤细胞膜和内质网、溶酶体、线粒体、细胞 DNA 等结构, 导致静脉内皮细胞老化/凋亡、功能紊乱、细胞骨架的重构和屏障功能障碍、炎症应答, 内皮细胞从静息状态转化为活化状态, 细胞表面促血栓形成因子 [vWF、血小板激活因子 (PAF)、P-选择素、组织因子 (TF)、血栓素 A2、ADP] 表达增加, 抑制血栓形成因子 [(前列环素 (PGI2)、环氧合酶 2、NO、血栓调节蛋白、蛋白 C 受体)] 表达下调, 使静脉内皮细胞表面单位时间内促凝/抗凝物质、纤溶/抗纤物质产生和消耗之间的动态平衡打破, 局部微环境向利于血栓形成方向发展, 进而引发炎症细胞和血小板粘附、活化, 触发凝血级联反应, 促进血栓形成^[8-9]。而早期使内皮细胞静息状态活化, 促进 DVT 微环境形成的上游分子调控机制显得至关重要。

3.3 Serpine1 在静脉内皮组织中表达上调, 抑制纤溶活性, 促进 DVT 形成

纤溶系统由纤维蛋白溶解酶 (纤溶酶), 纤溶酶

激活物和纤溶酶抑制物组成。纤溶抑制物包括纤溶酶原激活抑制剂(PAI)、 $\alpha 2$ 抗纤溶酶($\alpha 2$ -AP)和凝血酶激活的纤溶抑制物(TAFI)。Serpine1 也称纤溶酶原激活物抑制因子 1(PAI-1), 是目前丝氨酸蛋白酶抑制剂基因家族(serpins)100 多个成员中研究最为深入的成员之一。Serpine1(PAI-1)基因位于人类染色体 7q21.3-q22, 编码相对分子质量为 48 000 ~ 50 000 u 的多肽。主要由血管内皮细胞、脂肪细胞、巨噬细胞、心肌细胞、成纤维细胞和肝细胞合成, 近来发现血小板也能合成和储存 PAI-1, 且当血小板活化后可释放 PAI-1, 抑制血栓降解, 促进稳定血栓的形成^[10-11]。PAI-1 主要的生理作用是抑制丝氨酸蛋白酶, 尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)和组织型纤溶酶原激活物(tPA), 调控纤溶/抗纤系统平衡。整个纤溶过程包括纤溶酶原的激活和纤维蛋白或纤维蛋白原的降解。而纤维蛋白溶解起始于 t-PA、u-PA 和纤溶酶, 纤溶酶原可以通过血管内途径被 u-PA 激活或通过血管外途径被 t-PA 激活而转化成有活性的纤溶酶。纤溶酶原、t-PA、纤维蛋白结合形成复合物, 促进纤溶酶产生, 降解交联的纤维蛋白。而 PAI-1 能与 uPA/tPA 相互作用, 阻断 uPA/tPA 的激活、抑制纤溶酶形成及血栓溶解。Serpine1 是血纤维蛋白溶解细胞外蛋白水解级联反应的主要生理调控分子, 可调控血管平滑肌细胞的迁移, 在血管损伤老化、内皮细胞凋亡、炎症反应、组织器官纤维化、动脉粥样硬化、肥胖、糖尿病胰岛素抵抗、肿瘤等疾病的发生中发挥了重要作用^[10]。Serpine1 在损伤的血管组织和动脉粥样硬化斑块中表达明显上调, 而 PAI-1 缺陷的小鼠白细胞介素(IL)-6 的表达水平明显降低。近来发现, 血清 PAI-1 升高所导致的低纤溶能力, 可能是 DVT 的高危因素之一, 且 Serpine1 基因 4G/5G 的多肽性与 DVT 发生密切相关^[12-13]。而本实验也发现, 创伤后 2.5 h, 大鼠股静脉内皮组织中 Serpine1 表达上调, 当血栓形成时, 上调显著, 而其表达在对照组和血栓不形成组之间无明显差异(图 1、2, 表 2), 提示局部静脉内皮组织中 Serpine1 表达水平上调可能在创伤性 DVT 形成中发挥了重要作用。

3.4 TGF- β 1 调控静脉内皮组织分泌 Serpine1, 抑制纤溶活性, 促进 DVT 形成

Serpine1 基因表达受到肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-1、低密度脂蛋白(VLDL)、游离脂肪酸、胰岛素、胰岛素原、葡萄糖、活性氧(ROS)、雌激素、血管紧张素 II 等上游因子的调控^[10]。葡萄糖可诱导人血

管内皮细胞和平滑肌细胞合成和释放 PAI-1; 胰岛素和胰岛素原也可增加肝细胞中 PAI-1 的表达; VLDL 和游离脂肪酸可刺激内皮细胞分泌 PAI-1; TNF- α 和 IL-1 可刺激脂肪细胞表达 PAI-1。而 TGF- β 家族对下游基因的调控作用越来越受到人们的关注, 它可通过调控一些相关基因的表达, 参与高血压、糖尿病、动脉粥样硬化和心肌肥厚及纤维化等心脑血管疾病的病理进程^[14]。近来发现, TGF- β 家族重要成员之一的 TGF- β 1 可刺激血管平滑肌细胞分泌 PAI-1^[15]。本实验也发现创伤后 2.5 h, 大鼠股静脉内皮组织中 TGF- β 1 和 Serpine1 均表达上调, 血栓形成时, 亦显著上调, 而两者的表达在 A 组和 D 组间差异无统计学意义。Pathway 分析提示 TGF- β 1 是 Serpine1 的上游调控基因, 可诱导 Serpine1 的过度表达, 抑制纤溶, 提示在 DVT 形成早期, TGF- β 1 表达上调, 可能使局部静脉内皮组织分泌 Serpine1 增多, 在抑制纤溶活性, 促进血栓微环境形成中发挥了重要作用。

综上所述, 本研究提示 TGF- β 1、Serpine1 的表达变化与大鼠创伤性 DVT 形成进程一致, 也许可以作为 DVT 形成预测诊断的分子标志物之一, 其可靠性及作用机制还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Calfon M, Seddighzadeh A, Piazza G, et al. Deep vein thrombosis in orthopedic surgery[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2009, 15: 512 - 516.
- [2] 曲洪雪, 刘云鹏. 骨科深静脉血栓形成危险因素及发病机制的研究进展[J]. 中国矫形外科杂志, 2009, 17: 110 - 112.
- [3] Zhang CQ, Huang H, Zhao Z, et al. Gene expression profile related to inflammation in rat model of traumatic deep vein thrombosis[J]. Chin J Traumatol, 2007, 10: 206 - 212.
- [4] 张春强, 黄河, 赵学凌, 等. 两种创伤性深静脉血栓大鼠模型中炎症相关基因的表达研究[J]. 生物医学工程研究, 2007, 26: 66 - 70.
- [5] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3: 1101 - 1108.
- [6] 顾建平, 徐克, 滕皋军. 下肢深静脉血栓形成介入治疗规范的专家共识[J]. 介入放射学杂志, 2011, 20: 505 - 510.
- [7] 庄乃君, 顾建平. 静脉血栓栓龄的影像学诊断[J]. 介入放射学杂志, 2010, 19: 584 - 587.
- [8] Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis[J]. Blood Rev, 2009, 23: 225 - 229.
- [9] López JA, Chen J. Pathophysiology of venous thrombosis [J]. Thromb Res, 2009, 123 Suppl 4: S30 - S34.

- [10] Rau JC, Beaulieu LM, Huntington JA, et al. Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis[J]. J Thromb Haemost, 2007, 5(suppl 1): 102 - 115.
- [11] Brogren H, Karlsson L, Andersson M, et al. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1 [J]. Blood, 2004, 104: 3943 - 3948.
- [12] Meltzer ME, Lisman T, de Groot PG, et al. Venous thrombosis risk associated with plasma hypofibrinolysis is explained by elevated plasma levels of TAFI and PAI-1 [J]. Blood, 2010, 116: 113 - 121.
- [13] Akhter MS, Biswas A, Ranjan R, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene 4G/5G promoter polymorphism is seen in higher frequency in the Indian patients with deep vein thrombosis[J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2010, 16: 184 - 188.
- [14] Goumans MJ, Liu Z, ten Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction[J]. Cell Res, 2009, 19: 116 - 127.
- [15] Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, et al. TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60 (c-src)/EGFR (Y845) and Rho/ROCK signaling[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 44: 527 - 538.

(收稿日期:2011-09-07)

·消 息·

《中国医学影像技术》杂志 2012 年征订启事

《中国医学影像技术》杂志于 1985 年创刊,是由中国科学院主管,中国科学院声学研究所主办的国家级学术期刊,主编为李坤成教授、姜玉新教授。刊号:ISSN 1003-3289,CN 11-1881/R。是中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊、《中文核心期刊要目总览》收录期刊、中国精品科技期刊、荷兰《医学文摘》收录源期刊、英国《科学文摘》收录源期刊、俄罗斯《文摘杂志》收录源期刊、波兰《哥白尼索引》收录源期刊、荷兰《斯高帕斯数据库》收录期刊、《日本科学技术振兴机构中国文献数据库》(JSTChina)收录期刊、英国《物理学、电技术、计算机及控制信息社数据库》INSPEC 数据库)收录期刊。

《中国医学影像技术》杂志刊登放射、超声、核医学、介入治疗、影像技术学、医学物理与工程学等方面的基础研究及临床实验研究最新成果,信息量大、发刊周期短,注重医、理、工的结合,是影像医学发展和学术交流的良好平台,本刊论文是医学影像专业人员晋升中、高级职称和完成硕士、博士学业的重要依据,也是图书馆必备的学术刊物。

《中国医学影像技术》为月刊,160 页,大 16 开本,彩色印刷。单价 20 元,全年定价 240 元。订户可随时向当地邮局订阅,邮发代号 82-509;亦可向编辑部直接订阅,免邮资费(欢迎通过银行转账,附言栏请注明订阅杂志名称)。

编辑部地址:北京市海淀区北四环西路 21 号大猷楼 502

邮 编:100190

联系电话:010-82547903

传 真:010-82547903

编辑部 E-mail:cjmit@mail.ioa.ac.cn

网 址:www.cjmit.com

银行账户名:《中国医学影像技术》期刊社

账 号:110907929010201

开户行:招商银行北京分行清华园支行

联系人:孟辰凤