

·血管介入 Vascular intervention·

TGF- β 1、Serpine1、vWF、PF4 在深静脉血栓患者血白细胞和血小板中的表达

胡继红, 赵学凌, 李宏昆, 吴雪梅, 王 兵

【摘要】 目的 研究转化生长因子(TGF)- β 1、纤溶酶原激活物抑制因子 1(Serpine1)、血管性血友病因子(vWF)、血小板第 4 因子(PF4) mRNA 在深静脉血栓患者血白细胞和血小板中的表达变化及在血栓形成中的作用。**方法** 将患者分为血栓形成组 15 例和无血栓形成组 15 例,另选正常对照组 15 例。采集患者血栓形成和不形成时相应状态的血液样本,提取血白细胞和血小板中总 RNA,并反转录为 cDNA,采用 PCR 和实时-PCR 技术,检测 TGF- β 1、Serpine1、vWF、PF4 mRNA 在各组中的表达。**结果** PCR 和实时-PCR 的检测结果一致,TGF- β 1、Serpine1、vWF、PF4 mRNA 在血栓形成组中的表达明显高于无血栓形成组和正常对照组($P < 0.05$),而在无血栓形成组和正常对照组间则差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 血白细胞和血小板中 TGF- β 1、Serpine1、vWF、PF4 mRNA 表达上调可能在深静脉血栓形成中发挥了重要作用。

【关键词】 深静脉血栓;转化生长因子- β 1;纤溶酶原激活物抑制因子 1;血管性血友病因子;血小板第 4 因子

中图分类号:R641 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2013)-03-0185-05

The TGF- β 1, serpine1, vWF and PF4 expression of leucocytes and platelets in patients with deep vein thrombosis HU Ji-hong, ZHAO Xue -ling, LI Hong-kun, WU Xue -mei, WANG Bing. Department of Radiology and Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming, Yunnan Province 650032, China.

Corresponding author: ZHAO Xue-ling, E-mail: zhaoxuelingdoctor@126.com

【Abstract】 Objective To study the change of transformation growth factor- β 1 (TGF- β 1), serpine1, von Willebrand (vWF) and platelet factor 4 (PF4) expression of leucocytes and platelets in patients with deep vein thrombosis (DVT) and its role in the formation of thrombosis. **Methods** A total of 45 patients were enrolled in this study. The patients were divided into normal control group ($n = 15$), thrombosis group ($n = 15$) and non-thrombosis group ($n = 15$). Blood samples were collected in the thrombosis state as well as in the non-thrombosis state in all patients, at the same time the total RNA was extracted from the leukocytes and platelets, and its reverse transcription to cDNA was conducted. By using PCR and real-time PCR technique, the expression of TGF- β 1, serpine1, vWF and PF4 in each group was determined separately. The results were analyzed. **Results** The results obtained from PCR technique were consistent with those obtained from real-time PCR technique. The TGF- β 1, serpine1, vWF and PF4 mRNA expression of leukocytes and platelets in thrombosis group was significantly higher than that in non-thrombosis group as well as in normal

control group ($P < 0.05$), while no statistically significant difference in the expression existed between the non-thrombosis group and normal control group ($P > 0.05$). **Conclusion** The results from present study indicate that the up-regulated TGF- β 1, serpine1, vWF and PF4 expression in leukocytes and platelets may

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30960389, 81060151, 81160236); 云南省科技厅-昆明医学院联合项目 (2009cd159); 云南省重点新产品项目开发计划项目 (2010BC010)

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2013.03.003

作者单位: 650032 昆明医学院第一附属医院放射科 (胡继红), 骨科 (赵学凌、李宏昆、吴雪梅、王 兵)

通信作者: 赵学凌 E-mail: zhaoxuelingdoctor@126.com

play an important role in the formation of deep vein thrombosis.(J Intervent Radiol, 2013, 22: 185-189)

【Key words】 deep vein thrombosis; tra-nsformation growth factor- β 1; serpinel; von Willebrand; platelet factor 4

深静脉血栓形成(deep venous thrombosis,DVT)指血液在深静脉内异常凝集。随着预防和治疗方法的发展,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,下肢静脉血流淤滞,易发生 DVT 而阻塞静脉,严重者可发生下肢股青肿、缺血坏死,若血栓脱落,可导致大面积肺栓塞(pulmonary embolism,PE)而危及生命,慢性期常伴发 DVT 后综合征^[1]。因此,DVT 的早期预测诊断和预防显得非常重要,但对于血栓形成早期,静脉内皮细胞调控、白细胞和血小板功能变化、诱导凝血/抗凝、纤溶/抗纤系统失衡及促进血栓形成的机制尚不完全清楚,目前仍未发现较可靠的预诊标志物^[2-3]。本研究拟检测白细胞聚集、血小板活化相关基因转化生长因子(TGF)- β 1、纤溶酶原激活物抑制因子 1 (Serpine1)、血管性血友病因子(vWF)、血小板第 4 因子(PF4)在 DVT 患者血液中的表达变化,为探寻预诊标志物提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象与分组

选取下肢静脉曲张患者 58 例为 DVT 观察对象,其中 10 例患者术前发生股静脉血栓者纳入血栓形成组,行抗凝加溶栓规范治疗,待血栓消退,深静脉血流通畅,能保证肢体静脉回流后,再行浅静脉抽剥术,48 例术前未发现深静脉血栓者均行浅静脉抽剥术,术后 5 例发生 DVT,亦纳入血栓形成组,故血栓形成组共纳入 15 例患者。43 例未发生 DVT 者,随机选取 15 例纳入无血栓形成组。另选 15 名健康志愿者作为正常对照组。

DVT 观察、诊断考虑以下几个方面及要点:由一组高年资医生实施,系统掌握深静脉血栓相关理论;能够准确动态观察症状变化及进行正确的体格检查;掌握相关手术技术,能保证手术质量;结合相应情况及时行超声检查,筛查有无血栓形成;必要

时再行静脉造影确诊,确保所采集到的血液样本与相应状态尽可能相符。

1.2 方法

1.2.1 血液样本采集、保存和总 RAN 的提取 确保所采集血液样本与相应状态尽可能相符,按不同组别采血,每例研究对象在相应状态,每次从肘静脉采集静脉血 10 ml(真空枸橼酸钠抗凝抽血管,每管约 2.7 ml),立即颠倒混匀 20 次以便充分混匀,避免血液部分凝固、血栓形成。采用血液样本保存试剂盒(PAXgene Blood RNA Tube,BRT,美国 QIAGEN 公司)保存样本,并于 30 min 内将血样(2.5 ml)倒入 BRT 管中,立刻盖上盖颠倒 20 次充分混匀血样。然后,将 BRT 管置室温(18 ~ 25℃)静置 2 h 以上(但不超过 24 h),以便血样与 BRT 管中试剂充分反应,达到最佳 RNA 提取效率。采用血白细胞和血小板中总 RNA 提取试剂盒(PAXgene Blood RNA Kit,美国 QIAGEN 公司)提取血白细胞和血小板中总 RAN 约 45 μ l,具体操作按说明书进行。从每份 RNA 样本中取 5 μ l 按 1:200 稀释,检测吸光度 260/280(A260/A280)比值均在 1.8 ~ 2.0。

1.2.2 cDNA 合成 取 8 μ l RNA 模板,加入实时-PCR 反应体系,低温(4℃)离心 15 s(3 000 g)后放入 PCR 仪,实时-PCR 反应条件为 37℃ 60 min,将 RNA 反转录为 cDNA (Quantscript RT kit Quant cDNA 第一链合成试剂盒,天根生化科技公司)。从每份 cDNA 中取出 0.5 μ l 为模板,行 PCR 扩增内参基因 GAPDH,经凝胶电泳检测,条带较亮、大小正确,然后将剩余的 cDNA 模板(约 19 μ l)置于-80℃储存备用。

1.2.3 PCR 和实时-PCR 引物设计 引物设计采用 Primer 5.0 软件,要求必须跨越内含子,避免基因组污染,由上海生工生物工程技术有限公司合成(表 1)。

1.2.4 PCR 检测 TGF- β 1、Serpine1、vWF、PF4 表

表 1 人 TGF- β 1、Serpine1、vWF、PF4 基因引物序列

目的基因	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')	产物大小(bp)	退火温度(℃)
TGF- β 1	AGTGGTTGAGCCCTGGAGG	AGGCAGAAGTTGGCATGGTAG	352	57.8
Serpine1	GTGCTGGTGAATGCCCTCT	GCAGTTCCAGGATGTCGT	190	54.0
vWF	CAGAGTGACAGTGTTCCTATT	CATTCCCATCCTCATCCA	203	53.3
PF4	TTCCTGCCCGATCAGATGC	CGGTAGTGCCTGGTCAGTTCA	216	54.8
GAPDH	AGCCCAGCAAGGATACTAGAG	GAGGGTGCAGCGAAGTTTA	252	62

达 采用 PCR 试剂盒 (2 × Taq PCR MasterMix, 天根生化科技公司) 检测血白细胞和血小板中 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 表达。将血液 0.5 μl cDNA 模板, 加入 RCR 反应体系, PCR 反应条件为: 预变性 95℃, 3 min; 扩增条件: 变性 95℃ 30 s, 退火 60° 30 s, 72℃, 延伸 30 s, 循环 35 次; 72℃, 10 min 充分延伸。

1.2.5 实时-PCR 检测 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 表达 采用荧光实时-PCR 试剂盒 (Platinum® SYBR® Green qPCR 试剂盒, 美国 Invitrogen 公司) 检测血白细胞和血小板中 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 表达。采用荧光实时定量 PCR 仪 7300 (美国 ABI 公司) 和 Power SYBR® Green 实时-PCR Master Mix 进行实时-PCR, 操作按试剂盒说明书进行, 设定扩增程序如下: 预变性 95℃ 2 min; 变性 95℃ 5 s, 退火 60℃ 30 s, 循环 40 次。溶解曲线阶段: 变性 95℃ 15 s; 退火 60℃ 30 s; 延伸 72℃ 30 s。以 GAPDH 作为内参照。TGF-β1 等目的基因的相对表达量按公式 $2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{[CtN(T\text{-gene}) - CtN(GAPDH)] - [CtA(T\text{-gene}) - CtA(GAPDH)]}$ 计算^[4]。

1.3 统计学方法

重复检测 3 次, 用 SPSS11.5 统计学软件进行分析, 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。

2 结果

2.1 PCR 检测 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 mRNA 在各组中的表达

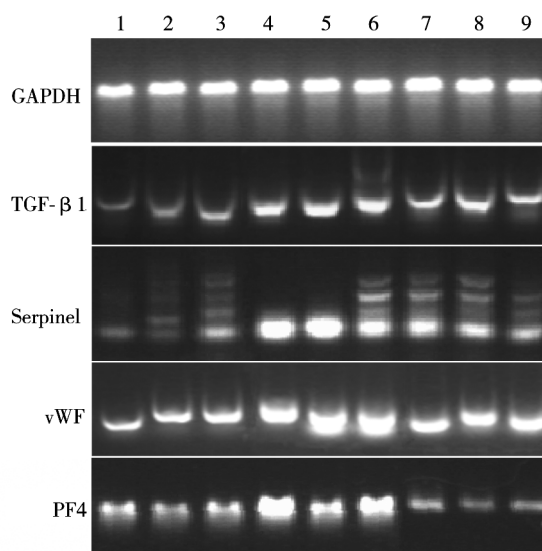
从凝胶电泳结果可见, 血栓形成组中所检测 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 RNA 条带灰度值明显较正常对照组及无血栓形成组增高, 提示 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 在血栓形成组表达明显增高。

2.2 各组 PCR 电泳结果 A 值分析

TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 的 A 值在血栓形成组中明显高于正常对照组和无血栓形成组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2), 提示 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 在血栓形成组表达升高。

2.3 实时-PCR 检测 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 mRNA 在各组中的表达

TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 mRNA 在血栓形成组中的表达明显高于无血栓形成组和正常对照组 ($P < 0.05$), 后两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 3、4; 图 2 ~ 3)。



泳道 1 ~ 3 为正常对照组, 泳道 4 ~ 6 为血栓形成组, 泳道 7 ~ 9 为无血栓形成组

图 1 PCR 检测 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 mRNA 在各组中的表达

表 2 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 mRNA 在各组中的表达

组别	A 值			
	TGF-β1	Serpine1	vWF	PF4
正常对照组	45.8 ± 12.7	19.7 ± 6.4	73.6 ± 19.3	46.8 ± 11.4
血栓形成组	114.5 ± 14.7 ^a	133.1 ± 7.2 ^a	120.4 ± 18.2 ^a	129.7 ± 18.1 ^a
无血栓形成组	59.4 ± 15.9	66.9 ± 15.6	91.5 ± 26.7	45.4 ± 13.2

^a 与其他两组比较, $P < 0.05$

表 3 TGF-β1 和 Serpine1 在各组间的相对表达量

组别	TGF-β1		Serpine1	
	ΔCT	相对表达量	ΔCT	相对表达量
正常对照组	5.48 ± 0.68	1	6.32 ± 0.54	1
血栓形成组	4.19 ± 0.49	2.45 ± 0.29 ^a	4.68 ± 0.72	3.12 ± 0.48 ^a
无血栓形成组	5.20 ± 0.33	1.21 ± 0.08	5.93 ± 0.37	1.31 ± 0.08

^a 与其他两组相比 $P < 0.05$

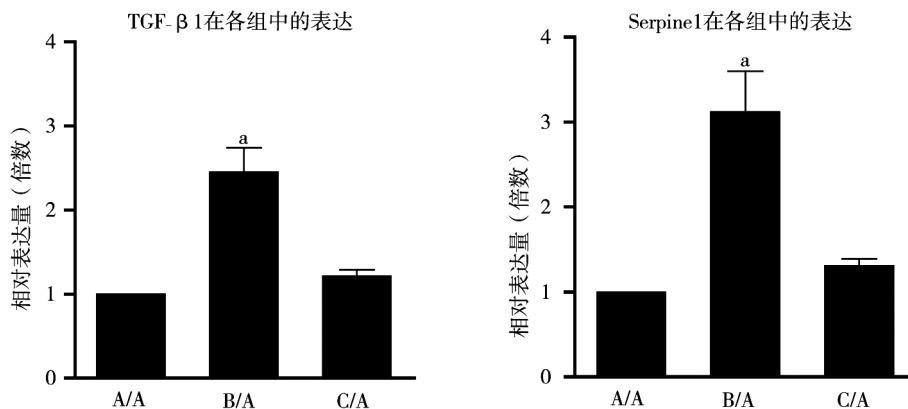
表 4 vWF 和 PF4 在各组间的相对表达量

组别	vWF		PF4	
	ΔCT	相对表达量	ΔCT	相对表达量
正常对照组	6.83 ± 0.77	1	5.37 ± 0.63	1
血栓形成组	5.06 ± 0.52	3.41 ± 0.31 ^a	4.03 ± 0.57	2.53 ± 0.35 ^a
无血栓形成组	6.47 ± 0.43	1.28 ± 0.08	5.15 ± 0.36	1.16 ± 0.07

^a 与其他两组相比 $P < 0.05$

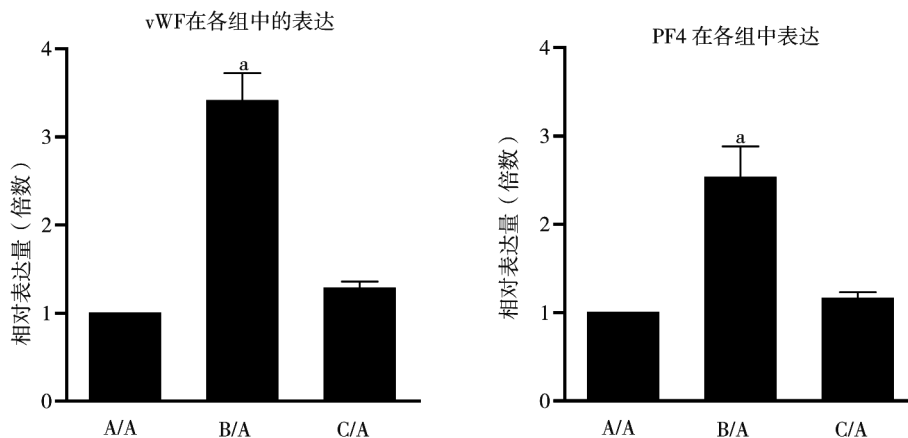
3 讨论

DVT 形成过程是动态变化过程, 涉及多系统、多因素, 调控机制复杂。参与 DVT 形成的血管内皮细胞、血白细胞、血小板、粘附因子、炎症因子、血流动力学等因素彼此相互影响, 错综复杂, 凝血/抗凝、纤溶/抗纤溶系统生理状态下保持动态稳定并相互制约, 一旦平衡打破, 在分泌的各种细胞因子调控下, 内皮细胞、血白细胞、血小板之间相互粘附、聚集, 启动凝血级联反应, 促使局部分子微环境向血



注: B/A=血栓形成组/正常对照组; C/A = 无血栓形成组/正常对照组; ^a 与其他两组相比 $P < 0.05$

图2 TGF-β1(左)和 Serpine1(右)在各组中的相对表达



注: B/A = 血栓形成组/正常对照组; C/A = 无血栓形成组/正常对照组; ^a 与其他两组相比 $P < 0.05$

图3 vWF(左)和 PF4(右)在各组中的相对表达

栓形成方向发展,致血栓形成^[3]。其中 TGF-β1、Serpine1、vWF、PF4 对白细胞粘附聚集、血小板活化具有重要调控作用。本研究探讨它们在 DVT 患者血白细胞和血小板中表达变化及在血栓形成中的作用。

vWF 主要在内皮细胞和巨核细胞内合成,在血小板 α 颗粒、血浆和内皮下连接组织也能产生。vWF 能与血小板糖蛋白 I b-IX 和内皮下胶原结合,成为血小板粘附在内皮下的桥梁,桥接血小板与静脉内皮间的粘附;还能与血小板糖蛋白 II b/III a 结合,桥接血小板与血小板间的粘附,诱导血小板聚集,参与血栓形成。最近的研究发现,vWF 水平增加与动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合征、心肌梗死的发生密切相关^[5-6],但在 DVT 中的研究较少。本研究发现 vWF mRNA 在 DVT 患者血白细胞和血小板中表达上调,可能通过诱导血小板粘附、聚集,促进了 DVT 形成。

血小板 α 颗粒中 25% 的蛋白质是 PF4,它是血小板活化后释放最多的蛋白,被认为是血小板活化

的标志物,活化的血小板可以分泌 PF4,并诱导 CD40L 释放,通过 CD40-CD40L 结合促进内皮细胞与血小板间的相互粘附,进而介导内皮细胞从静息状态转化为活化状态。PF4 可通过上调 TLR2 表达激活核转录因子(NF)-κB,从而促进内皮细胞表达粘附分子(ICAM-1、E-selectin、VCAM-1)、趋化因子(MCP-1、MIP-1)和炎症因子(TNF、IL-1)促进炎症反应,进而通过趋化因子诱导单核细胞、中性粒细胞募集、粘附于静脉壁内皮,通过 E-selectin/ESG-L 介导血小板与内皮细胞间的粘附作用,进而促进血栓形成及动脉粥样硬化^[7-8],但在 DVT 形成中的研究较少。本研究发现 PF4 mRNA 在 DVT 患者血白细胞和血小板中表达上调,可能通过介导白细胞粘附和血小板活化,促进了血栓形成。

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)、α2 抗纤溶酶(α2-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),主要由血管内皮细

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以释放 PAI-1,它通过抑制 u-PA 和 t-PA 的活性,阻断或减缓纤溶酶原活化为纤溶酶,抑制血栓降解,促进稳定血栓的形成^[9]。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 的多态性与 DVT 发生密切相关^[10-11]。前期动物实验发现,DVT 模型大鼠股静脉内皮组织中 Serpine1 表达水平明显上调^[12]。本研究发现 Serpine1 mRNA 在 DVT 患者血白细胞和血小板中表达明显上调,可能通过抑制纤溶而促进了血栓形成。Serpine1 在不同组织中的产生和释放受到多种刺激因素,如内毒素、炎症因子(IL-1 等)、TGF- β 家族、TNF 所调节。

其中,TGF- β 家族重要成员 TGF- β 1 可刺激血管平滑肌细胞分泌 PAI-1^[13]。TGF- β 可以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。但在 DVT 中的作用研究较少,而本研究发现 TGF- β 1 及其下游基因 Serpine1、vWF、PF4 mRNA 在 DVT 患者血白细胞和血小板中表达上调,TGF- β 1 可能通过调控下游基因 Serpine1、vWF、PF4 表达,参与白细胞粘附、血小板活化而促进血栓形成。

【参 考 文 献】

- [1] 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.
- [2] 李炯,唐博.静脉血栓栓塞生物标志物的研究进展[J].重庆医学,2012,41:2326-2328.
- [3] Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis[J]. Blood Rev, 2009, 23: 225-229.

- [4] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method [J]. Nat Protoc, 2008, 3: 1101-1108.
- [5] Xu AG, Xu RM, Lu CQ, et al. Correlation of von willebrand factor gene polymorphism and coronary heart disease [J]. Mol Med Report, 2012, 6: 1107-1110.
- [6] van Galen KP, Tuinenburg A, Smeets EM, et al. Von willebrand factor deficiency and atherosclerosis [J]. Blood Rev, 2012, 26: 189-196.
- [7] Aidoudi S, Bikfalvi A. Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature; a role in atherosclerosis and angiogenesis [J]. Thromb Haemost, 2010, 104: 941-948.
- [8] Kowalska MA, Rauova L, Poncz M. Role of the platelet chemokine platelet factor 4 (PF4) in hemostasis and thrombosis [J]. Thromb Res, 2010, 125: 292-296.
- [9] Brogren H, Karlsson L, Andersson M, et al. Platelets synthesize large amounts of active plasminogen activator inhibitor 1 [J]. Blood, 2004, 104: 3943-3948.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 胡继红,吴雪梅,李兴国,等.转化生长因子 β 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[J].介入放射学杂志,2011,20:890-894.
- [13] Samarakoon R, Higgins SP, Higgins CE, et al. TGF- β 1-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:2013-01-12)

(本文编辑:侯虹鲁)