

血管组织中Plaur和Plat诱导血管性血友病因子释放促血栓形成****

胡继红¹, 吴雪梅², 李宏昆², 李兴国², 周如丹², 赵学凌², 王 兵²

Plaur and Plat in vascular tissues induce von Willebrand factor release to promote deep venous thrombosis

Hu Ji-hong¹, Wu Xue-mei², Li Hong-kun², Li Xing-guo², Zhou Ru-dan², Zhao Xue-ling², Wang Bing²

Abstract

BACKGROUND: At present, the core control network, molecular etiology and mechanism of deep vein thrombosis is still not completely clear, furthermore, there is no ideal method for early diagnosis of deep venous thrombosis.

OBJECTIVE: To observe the prothrombotic role of Plaur and Plat in the vein endothelial cells in rats with traumatic deep vein thrombosis.

METHODS: Clamps plus lower limb immobilization with plaster spica were used to establish rat traumatic deep vein thrombosis models. Based on time points and whether thrombosis occurred, the experiment animals were divided into pre-thrombosis, thrombosis, and non-thrombosis groups, and then femoral vein endothelial cells were harvested at 2.5 and 25 hours after modeling.

RESULTS AND CONCLUSION: Gene chip analysis and real-time PCR results showed that after trauma 2.5 hours, mRNA expressions of Plaur, Plau and von Willebrand factor in the femoral vein were raised. In the process of thrombosis, Plaur, Plau and Von Willebrand factor mRNA expressions were significantly increased. Signal path analysis showed that the Plaur and Plau were upstream regulation genes for von Willebrand factor, and von Willebrand factor was the key gene for triggering platelet adhesion, aggregation and thrombosis. These findings imply that Plaur and Plau can be raised by up-regulation of von Willebrand factor expression, further to cause platelet adhesion and aggregation, and to promote traumatic deep vein thrombosis in rats.

Hu JH, Wu XM, Li HK, Li XG, Zhou RD, Zhao XL, Wang B. Effects of brain microvascular endothelial cells and astrocytes following treatment with baicalin on neural stem cell differentiation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(24): 4417-4421. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 目前, 深静脉血栓形成的分子病因学机制及其形成的核心调控网络仍未完全阐明, 对于深静脉血栓的早期诊断预测也无理想的方法。

目的: 观察创伤性深静脉血栓形成大鼠静脉内皮细胞中 Plaur 和 Plat 的促血栓形成作用。

方法: 采用股静脉钳夹联合下肢石膏制动构建大鼠创伤性深静脉血栓模型。依据取材时间及是否有血栓形成分为血栓形成前组、血栓形成组和血栓不形成组, 分别于造模后 2.5, 25 h 取大鼠股静脉内皮细胞用于实验。

结果与结论: 基因芯片分析及 real-time PCR 结果均显示创伤后 2.5 h, 大鼠股静脉 Plaur、Plau 及血管性血友病因子基因表达上调; 血栓形成时, Plaur、Plau 及血管性血友病因子基因表达上调更显著。信号通路分析显示 Plaur、Plau 为血管性血友病因子的上游调控基因, 血管性血友病因子为触发血小板黏附、聚集及血栓形成的关键基因。提示 Plaur、Plau 可通过上调血管性血友病因子表达, 引发血小板黏附、聚集, 促进大鼠创伤性深静脉血栓形成。

关键词: 深静脉血栓; Plat; Plaur; 血管性血友病因子; 信号通路; 内皮细胞

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.24.010

缩略语: DVT: deep venous thrombosis, 深静脉血栓形成; vWF: von Willebrand factor, 血管性血友病因子; t-PA: tissue type plasminogen activator, 组织纤溶酶原激活物

胡继红, 吴雪梅, 李宏昆, 李兴国, 周如丹, 赵学凌, 王兵. 血管组织中 Plaur 和 Plat 诱导血管性血友病因子释放促血栓形成[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(24): 4417-4421. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

¹Department of Radiology,
²Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China

Hu Ji-hong★, Master, Associate professor, Department of Radiology, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China 67420jhj@sohu.com

Corresponding author: Zhao Xue-ling, Doctor, Chief physician, Department of Orthopedics, First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China akenika@hotmail.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30960389*, 81060151*; the Collaborative Project of Yunnan Provincial Science and Technology Department & Kunming Medical College, No. 2009cd159*

Received: 2012-03-09
Accepted: 2012-04-20

昆明医学院第一附属医院,¹放射科,²骨科, 云南省昆明市 650032

胡继红★, 男, 1967年生, 云南省昆明市人, 汉族, 1993年昆明医学院毕业, 硕士, 副教授, 主要从事深静脉血栓的基础及临床研究。67420jhj@sohu.com

通讯作者: 赵学凌, 博士, 主任医师, 昆明医学院第一附属医院骨科, 云南省昆明市 650032 akenika@hotmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 1673-8225 (2012)24-04417-05

收稿日期: 2012-03-09
修回日期: 2012-04-20
(20111212006/
WLM · S)

0 引言

深静脉血栓形成 (deep venous thrombosis, DVT) 涉及凝血、纤溶、炎症、免疫等多个系统。其中, 纤溶、抗纤溶系统的失衡是其形成的重要原因^[1], 但纤溶、抗纤溶相关基因在血栓形成过程中的动态变化仍不清楚。探讨纤溶、抗纤溶基因表达的变化, 研究重要基因对血栓形成的作用, 最终找到预测诊断、预后判断标志物成为需要解决的重要课题。

血小板与内皮细胞之间的黏附是导致血栓形成的最早反应之一, 其黏附作用依赖于血小板膜上、血浆中、细胞外基质上的黏附分子, 其中包括纤连蛋白、胶原、血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 和脂联素^[2-3]。组织纤溶酶原激活物 (tissue type plasminogen activator, t-PA) 可激活纤溶酶原使之成为纤溶酶, 降解纤维蛋白形成可溶性产物, 抑制血栓形成, Plat通过与t-PA形成1:1复合物而抑制纤溶酶的激活^[4-5]。Plaur主要由血管内皮细胞合成并释放入血, 可导致t-PA酰基化而失活^[6], 促进血栓形成。

可以看出, Plat、Plaur、vWF在血栓形成过程中起重要的作用, 如能通过检测其在血栓形成中表达的变化情况, 可能达到早期诊断血栓的目的。

实验在建立创伤性DVT动物模型的基础上^[7], 观察Plaur和Plat基因在创伤性DVT大鼠静脉壁内皮细胞中表达的变化, 探讨它们促进内皮细胞vWF表达及对血栓形成的作用。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 于2011-10在昆明医学院动物实验室完成。

材料: 健康清洁级8~12周龄SD大鼠50只, 雌雄不限, 体质量(240±30) g, 购自昆明医学院动物中心, 许可证号: SCXK (滇)2005-0008。

方法:

大鼠创伤性DVT模型的建立及分组: 将50只SD大鼠随机分为对照组($n=10$)、血栓形成前组

($n=10$, 创伤后2.5 h取材)、血栓形成组(创伤后25 h有血栓形成)、血栓不形成组(创伤后25 h无血栓形成), 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创伤性DVT模型^[7]。模型大鼠双侧大腿内侧脱毛, 称质量后用体积分数3%的戊巴比妥钠溶液1 mL/kg腹腔内注射麻醉, 取仰卧位, 于腹股沟内侧纵行切开约1 cm皮肤, 分离皮下组织, 显露并游离股静脉血管, 运用12号蚊式钳紧扣于股静脉血管不同的3个部位, 力量为血管钳紧一扣持续3 s, 钳夹造模后用一号丝线全层间断缝合切口, 同法处理另一侧后行髌人字石膏固定。造模后大鼠正常饲养, 不使用抗生素。

静脉内皮标本的制备: 于相应时间处死模型大鼠, 解剖观察股静脉有无血栓形成, 将造模部位的股静脉(约2 cm)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细胞, 裂解细胞后提取总RNA。

基因芯片检测: Trizol法提取各组静脉血管的总RNA。琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量。将质检合格的RNA样品试管标记后, 置于试管盒中, 再包埋于5 kg干冰泡沫盒中, 48 h内送至上海沪晶生物科技有限公司, -80 °C深低温冰箱保存备用。按照Genechip Rat Genome 230 2.0表达谱芯片操作流程(生物芯片由上海国家工程中心提供), 经cDNA探针制备、杂交、洗脱、染色、扫描, 完成芯片检测。

芯片数据整理和分析: 差异基因筛选采用Affymetrix扫描仪扫描芯片结果, Microarray Suite 5.0软件读取、处理数据。将上调、下调标准设定为Ratio值大于或小于1, 即2倍数。以“纤溶、抗纤溶”为关键词在NCBI数据库、CNKI数据库中搜寻纤溶-抗纤溶相关基因, 与Affymetrix RAT 230A芯片检测各试验组所得UniGene数据库中查询到的基因编号相结合。采用倍数变化分析纤溶系统相关基因在各个时相点的表达变化情况。分析、归纳、总结纤溶-抗纤溶系统相关基因表达变化, 找出表达变化显著基因, 在NCBI等数据库中分析与血栓形成的关系。

real-time PCR检测Plat、Plaur和vWF的表达: 使用美国ABI 7900HT Fas进行real-time PCR

分析,以GAPDH作为对照。使用美国Fermentas公司的Oligo 6.69引物设计软件设计PCR引物。

PCR引物序列:

Gene	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')	Product size (bp)	Tm (°C)
Plat	CAT CGA ATT CTC ATA CGC	CTG GAA CCC TTG TTG GTC	179	52.5
Plaur	GCA GCC GCT TGT AAC TGA	AAG TGC GGG CTG AGG TAG	148	53.1
vWF	ATC GTG CTC GGC ATG AAC	CCA AGG TAA CGC CAG GAA	212	52.5
GAPDH	GCA AGT TCA ACG GCA CAG	GCC AGT AGA CTC CAC GAC AT	140	53

在RT-PCR管中按上述体积加入相应的溶液,震荡均匀并离心将管壁上液体甩下,将RT-PCR管移至荧光定量PCR仪模块上,设定扩增程序如下: 95.0 °C 变性 4 min, 94.0 °C 30 s, 60.0 °C 20 s, 72.0 °C 30 s, 72.0 °C 4 min, 共39个循环, 72.0 °C 延伸7 min。对60.0~94.0 °C的溶解曲线进行分析。每个标本重复3次,以消除PCR本身和样品本身的误差所有PCR产物均经溶解曲线分析以分辨目的产物、引物二聚体和非特异性产物。

Plat、Plaur和vWF之间的信号通路分析:应用KEGG Pathway database对Plat、Plaur和vWF进行信号通路生物信息学分析,并进行相关信号通路文献检索及整理。

主要观察指标:大鼠静脉内皮细胞Plat、Plaur、vWF基因的表达情况。

统计学分析:实验重复检测3次,使用SPSS 11.5统计学软件进行统计学分析,组间比较采用单因素用方差分析(q 检验)。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

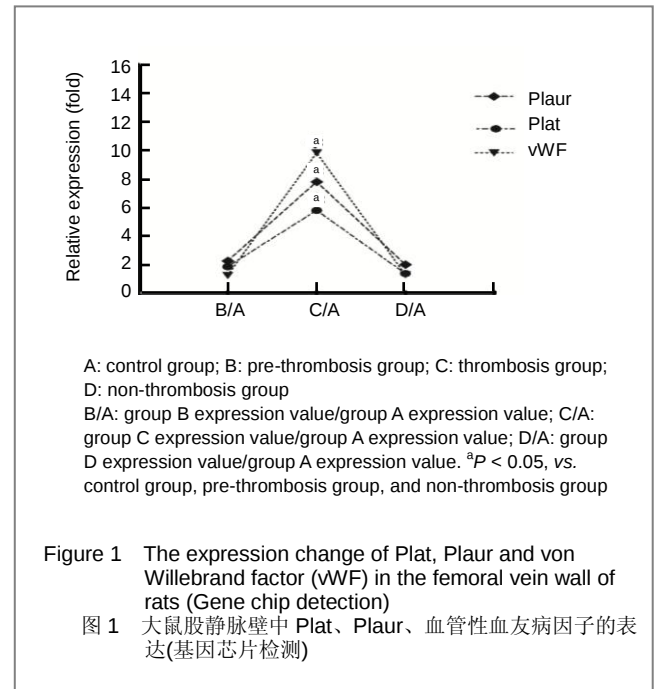
2 结果

2.1 实验动物数量分析 实验共纳入50只SD大鼠均进入结果分析。

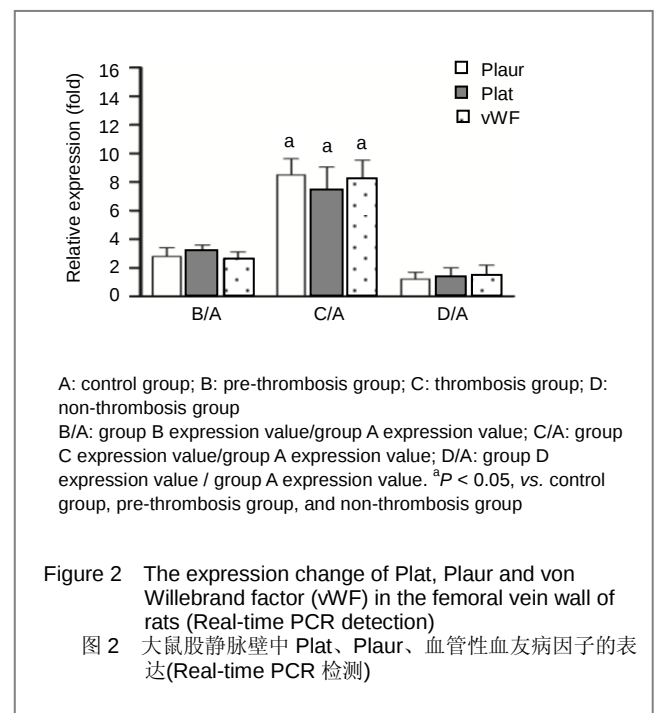
2.2 大鼠创伤性深静脉血栓的发生率 创伤后25 h,模型组大鼠中有17只股静脉有血栓形成(血栓形成组),13只未形成股静脉血栓(血栓不形成组)。而创伤后2.5 h,血栓形成前组中无深静脉血栓形成。

2.3 基因芯片杂交分析结果 基因芯片杂交结果显示,Plat、Plaur、vWF基因表达均于创伤后2.5 h显著上调($P < 0.05$);创伤后25 h,Plat、Plaur、vWF基因表

达上调更明显,以血栓形成组上调最显著($P < 0.05$),见图1。



2.4 Real-time PCR检测结果 Real-time PCR与基因芯片的检测结果一致,Plat、Plaur、vWF的表达水平于创伤后2.5 h分别增加到2.8, 3.2和2.6倍($P < 0.05$);创伤后25 h,血栓形成组分别增加到8.5, 7.4和8.2倍,明显高于血栓形成前组和血栓不形成组($P < 0.05$),见图2。



2.5 Plat、Plaur、vWF之间的信号通路分析 见图3。

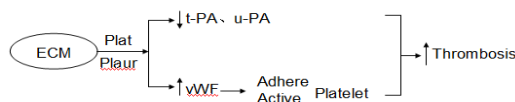


Figure 3 The signal pathway of Plat, Plaur and von Willebrand factor (vWF) in vascular endothelial cells
图3 血管内皮细胞中Plat、Plaur、血管性血友病因子的信号分析

从图3信号通路中可以看出,血管内皮细胞分泌Plat和Plaur,其主要作用为:①下调纤溶酶原激活物t-PA,尿激酶型纤溶酶原激活物的表达。②促进vWF的分泌,从而使血小板聚集和活化增加。通过二者的作用,促进血栓形成。

3 讨论

DVT是临床常见病和多发病,具有发病率高、危害性大、容易漏诊、误诊、缺乏特异性治疗等特点,其最大的危害在于可导致肺栓塞而危及患者生命。据统计,美国每年有(25~50)万人患静脉血栓性疾病,而死于肺栓塞的人可达35%~52%,估计全世界每年死于肺栓塞者超过500万^[8-9]。

临床症状、体检、影像学、实验室检查相结合综合判断是前DVT诊断的主要方法,但只有血栓已经形成才能明确诊断。而在血栓形成后即使采取规范化的治疗措施,仍有部分患者并发肺栓塞或血栓复发、迁延,导致患者死亡或残疾^[10]。如能在血栓形成之前进行预测,就能对患者进行有针对性的预防,避免了预防药物使用的盲目性和扩大化,更有效的降低DVT的发生率,极大的降低死亡率和致残率。预测诊断DVT,首先应该锁定与血栓形成前某一过程密切相关的分子标志物,并针对锁定的分子标志物探索有效、方便,适用于临床的检测手段和方法^[11]。其关键点在于研究血栓形成早期,调控静脉内皮细胞、血小板、炎性细胞之间相互作用,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。

因此,实验通过构建大鼠DVT模型,采用基因芯片检测技术,检测DVT模型大鼠血管壁中基因表达的变化,希望能找到预测诊断DVT的分子标志物。结果发现:创伤后2.5 h,Plaur、Plau表达上调,Ratio值>2,vWF表达上调,Ratio>1;血栓形成时,Plaur、Plau表达显著上调,Ratio值>3.2,vWF表达上调,Ratio>2。

通过查阅相关文献发现,Plat、Plaur在各种细胞生

长、增殖、分化、凋亡、迁移及生殖系统、消化系统、神经系统等肿瘤病程中发挥了重要作用^[12-13]。共同调控着vWF等靶基因的表达,在血小板、血管内皮细胞等各种细胞应激反应中发挥了重要作用^[14]。Plat、Plaur通过细胞外基质-受体相互作用信号通路诱导鼠脑血管内皮细胞内皮因子mRNA和蛋白质表达^[15-16]。而vWF与血小板的结合对于血小板黏附于受损的血管表面、血小板的激活和血流状态下的血栓形成都是必须的^[17]。

纤维蛋白溶解系统简称纤溶系统,是指纤溶酶原在纤溶酶原激活剂作用下转变为纤溶酶,进而由纤溶酶降解纤维蛋白及其他蛋白的系统^[18-19]。目前已知的纤溶酶原激活剂主要包括两类:t-PA和尿激酶型纤溶酶原激活物^[20],t-PA主要由血管内皮细胞合成,可激活纤溶酶原变为纤溶酶^[21-22]。

实验通过对经典补体与凝血通路中的功能分析,发现Plat、Plaur的作用为直接抑制纤溶酶原激活剂以及促进vWF的分泌。处于纤溶系统中的中心环节。它通过抑制t-PA和尿激酶型纤溶酶原激活物的活性,来阻断或减缓纤溶酶原活化为纤溶酶,达到抗纤溶作用;并促进血小板的聚集和活化,最终促进血栓形成。

实验结果提示,DVT大鼠静脉壁组织中Plat、Plaur mRNA的表达在创伤即刻和血栓形成时明显上调,通过上调vWF表达,促进血栓形成,有可能成为预测诊断DVT量化的分子标志物。

4 参考文献

- [1] Esmon CT. Basic mechanisms and pathogenesis of venous thrombosis. *Blood Rev.* 2009;23(5):225-229.
- [2] Dimitrov JD, Roumenina LT, Plantier JL, et al. A human FVIII inhibitor modulates FVIII surface electrostatics at a VWF-binding site distant from its epitope. *Thromb Haemost.* 2010;8(7):1524-1531.
- [3] Koprivica Z, Djordjevic D, Vuletic M, et al. Von Willebrand factor and oxidative stress parameters in acute coronary syndromes. *Oxid Med Cell Longev.* 2011;2011:312-318.
- [4] Campbell J, Hilleman D. Recombinant peptides in thrombolysis. *Semin Thromb Hemost.* 2010;36(5):529-536.
- [5] Kołodziejczyk J, Wachowicz B. Dysfunction of fibrinolysis as a risk factor of thrombosis. *Pol Merkur Lekarski.* 2009;27(160):341-345.
- [6] Ragni MV, Journeyake JM, Brambilla DJ. Tissue plasminogen activator to prevent central venous access device infections: a systematic review of central venous access catheter thrombosis, infection and thromboprophylaxis. *Haemophilia.* 2008;14(1):30-38.
- [7] He F, Wang B, Zhao HB, et al. Zhongguo Linchuang Kangfu. 2005;9(22):112-113.
何飞,王兵,赵宏斌,等.构建创伤性肢体深静脉血栓动物模型及其应用评价[J].中国临床康复,2005,9(22):112-113.

- [8] Al Sayegh F, Almahmeed W, Al Humood S, et al. Global Risk Profile Verification in Patients with Venous Thromboembolism (GRIP VTE) in 5 Gulf countries. Clin Appl Thromb Hemost. 2009;15(3):289-296.
- [9] Piovella F, Wang CJ, Lu H, et al. Deep-vein thrombosis rates after major orthopedic surgery in Asia. An epidemiological study based on postoperative screening with centrally adjudicated bilateral venography. Thromb Haemost. 2005; 3(12):2664-2670.
- [10] Byun SS, Kim JH, Kim YJ, et al. Evaluation of deep vein thrombosis with multidetector row CT after orthopedic arthroplasty: a prospective study for comparison with Doppler sonography. Korean J Radiol. 2008;9(1):59-66.
- [11] Hiroaki N, Hisanori H, et al. Small GTPase Rho Regulates Thrombin-Induced Platelet Aggregation. Biochem Biophys Res Commun. 2001;280(4):970-975.
- [12] Asselbergs FW, Pattin K, Snieder H, et al. Genetic architecture of tissue-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1. Semin Thromb Hemost. 2008;34(6):562-568.
- [13] Montaner J. Blood biomarkers to guide stroke thrombolysis. Front Biosci. 2009;1:200-208.
- [14] Valentijn KM, Sadler JE, Valentijn JA, et al. Functional architecture of Weibel-Palade bodies. Blood. 2011;117(19): 5033-5043.
- [15] Rauschemberger MB, Sandoval MJ, Massheimer VL. Cellular and molecular actions displayed by estrone on vascular endothelium. Mol Cell Endocrinol. 2011;339(1-2):136-143.
- [16] Bouglé A, Duranteau J. Pathophysiology of sepsis-induced acute kidney injury: the role of global renal blood flow and renal vascular resistance. Contrib Nephrol. 2011;174:89-97.
- [17] Hollestelle MJ, Lai KW, van Deuren M, et al. Cleavage of von Willebrand factor by granzyme M destroys its factor VIII binding capacity. PLoS One. 2011;6(9):e24216.
- [18] Manetti L, Bogazzi F, Giovannetti C, et al. Changes in coagulation indexes and occurrence of venous thromboembolism in patients with Cushing's syndrome: results from a prospective study before and after surgery. Eur J Endocrinol. 2010;163(5):783-791.
- [19] Aito S, Abbate R, Marcucci R, et al. Endogenous risk factors for deep-vein thrombosis in patients with acute spinal cord injuries. Spinal Cord. 2007;45(9):627-631.
- [20] Idell S. The pathogenesis of pleural space loculation and fibrosis. Curr Opin Pulm Med. 2008;14(4):310-315.
- [21] Vucković B, Derić M. Influence of fibrinolytic potential reduction in ischemic brain disease development. Med Pregl. 2008;61(5-6):247-251.
- [22] Doolittle RF. Searching for differences between fibrinogen and fibrin that affect the initiation of fibrinolysis. Cardiovasc Hematol Agents Med Chem. 2008;6(3):181-189.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 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)。

作者贡献: 胡继红进行实验设计, 实验实施为李兴国、李宏昆, 实验评估为周如丹, 资料收集为吴雪梅, 胡继红成文, 王兵、赵学凌审校, 胡继红对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

本文创新性: 实验首次采用基因芯片技术, 发现创伤性深静脉血栓模型大鼠静脉血管壁中 Plaur 和 Plat 基因表达上调, 并采用 real-time PCR 进行了验证, 揭示了 Plaur 和 Plat 在创伤性深静脉血栓中发挥了关键作用。与国内外同类研究水平的比较, 研究技术成熟、研究结果国内外未见相关报道。

Mesh 词表主题词扩展: “输卵管造口术- Salpingostomy”

Salpingostomy are often used interchangeably and refer to creating an opening into the tube (e.g. to remove an ectopic pregnancy), but the tube itself is not removed. Technically, the creation of a new tubal opening (os) by surgery would be a salpingostomy, while the incision into the tube to remove an ectopic is a salpingotomy. 输卵管造口术适合于输卵管伞端梗阻(亦称输卵管积水)的患者, 在输卵管伞闭锁端的扩大部最菲薄处用纤维细电刀或显微解剖刀作“十”

字形或“米”字形切开。然后用6号平头针或细硅胶管自切口处插入, 缓缓注入生理盐水, 再进一步检查明确输卵管全段通畅情况注入方法同输卵管吻合术。将切开之粘膜瓣外翻, 用7-0

尼龙线将外翻之伞端呈“花瓣状”。由于管腔较大, 一般不需保留支架, 术后宜早期通液。对粘连较重者, 使用支架可预防新的粘连形成。

英文主题词	Salpingostomy
英文注释	Formation of an artificial opening in a fallopian tube.
中文主题词	输卵管造口术
中文注释	输卵管内人造开口的形成。