

颅内动脉瘤雌激素受体与血管平滑肌细胞表型蛋白的表达^{*}

★ 邓志刚 高永中 张猛 丁建军 伍健明 (深圳市第二人民医院神经外科 深圳 518035)

摘要:目的:探讨正常人体动脉血管和颅内动脉瘤的血管平滑肌(VSMC)雌激素受体(ERs)和VSMC表型蛋白的表达变化。方法:采用免疫组化法检测了15例颅内动脉瘤和7例正常对照动脉血管中ERs、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和结蛋白(Desmin)的表达。结果:颅内动脉瘤VSMC的ER α 和ER β 表达均高于对照动脉血管表达水平,具有显著性差异;颅内动脉瘤VSMC的 α -SMA和Desmin表达均低于对照动脉血管表达水平,具有显著性差异。结论:人类颅内动脉瘤VSMC表达ERs水平升高与VSMC表型蛋白表达降低,可能与颅内动脉瘤的形成有关。

关键词:颅内动脉瘤;雌激素受体;血管平滑肌细胞

中图分类号:R 743.4 **文献标识码:**A

The Expression of Estrogen Receptors and Vascular Smooth Muscle Phynotype Protein in Human Intracranial Aneurysms

DENG Zhi-gang, GAO Yong-zhong, ZHANG Meng, DING Jian-jun, WU Jian-ming

Department of Neurosurgery, The Second people's Hospital, Shenzhen 518035

Abstract: Objective: To investigate the expression of estrogen receptors (ERs) and phynotype protein on smooth muscle cell (VSMC) of intracranial aneurysms and normal artery. Methods: The expression of ERs, α -SMA and Desmin in samples from the fifteen cases of Human Intracranial Aneurysms and seven cases of normal control group was examined with the immunohistochemical method. Results: The value of ER α and ER β expression in aneurysms more than in normal artery, there are significant statistical differences. The value of α -SMA and Desmin expression in aneurysms less than in normal artery, there are significant statistical differences. Conclusion: the elevated expression of ERs and down-regulation of VSMC phynotype protein in aneurysms, which may correspond to the formation of aneurysms.

Key words: Intracranial Aneurysms; Vascular Smooth Muscle Cell; Estrogen receptors

颅内动脉瘤的分子病理基础和机制尚不十分清楚,但很多与动脉瘤形成有关的病理因素已被证实。面对诸多损害因素,健全的血管需要有完整的损伤修复机制才得以维持稳定。颅内动脉瘤的形成过程正是打破了这种血管自身稳定机制,使损伤的血管

向不可逆的方向发展。那么对于患颅内动脉瘤的人群而言,研究血管自身修复机制失效的原因与研究血管损伤因素具有同等重要的地位。研究表明血管平滑肌细胞(Vascular Smooth Muscle Cell, VSMC)的凋亡和雌激素受体(Estrogen Receptors, ERs)的表达

* 基金项目:深圳市科技计划项目(200802026)

可能与颅内动脉瘤的形成有关。为了进一步探讨血管自身修复机制失效的原因,我们对照研究了正常人体动脉血管和颅内动脉瘤组织 ER α 以及 VSMC 表型蛋白的表达变化。

1 材料

实验标本取自 2007 年 2 月~2008 年 6 月在深圳市第二人民医院行颅内动脉瘤夹闭术和动脉瘤瘤壁部分切除术的病例。所有病例在术前均进行全脑 DSA 检查,确认动脉瘤部位和形状,并在术中进一步证实。病例均具有完整的临床资料,共 15 例;男性 10 例,女性 5 例;破裂动脉瘤 12 例,未破裂动脉瘤 3 例;平均年龄(45.64 ± 11.02)岁

对照标本,取自同期颅内病变手术相应手术入路区域颞浅动脉分支或急诊颅脑外伤术中减压的脑组织动脉血管。术前均进行 MR 或 CT 检查,排除颅内动脉瘤性占位或动脉瘤性蛛网膜下腔出血所致病变,术中进一步证实病变性质。病例均具有完整的临床资料,共计 7 例;男 4 例,女 3 例;脑实质血管 2 例(外伤内减压脑实质血管),颞浅动脉 5 例;平均年龄(46.55 ± 10.56)岁。

2 方法

2.1 检测方法 检测用生物试剂规格与来源见表 1。

表 1 检测用生物试剂规格与来源

名称	编号	规格	公司
兔抗人 ER α 多克隆抗体	PR-0294	0.1ml	北京中杉金桥生物技术公司
兔抗人 ER β 多克隆抗体	SC-8974	2mg/ml	北京中杉金桥生物技术公司
标记绿色荧光的弹性蛋白抗体	ZA-0351	0.2ml	北京中杉金桥生物技术公司
小鼠抗人 α -SMA 多克隆抗体	ZM-0003	0.2ml	北京中杉金桥生物技术公司
小鼠抗人 Desmin 多克隆抗体	ZM-0091	0.2ml	北京中杉金桥生物技术公司
通用型二步法检测试剂盒	PV6000	6.0ml	北京中杉金桥生物技术公司
0.1M PBS 磷酸盐缓冲液(pH=7.2~7.4)	ZLI-9061	1000ml	北京中杉金桥生物技术公司
DAB 显色试剂盒	ZLI-9018	1.2ml	北京中杉金桥生物技术公司

采用免疫组化链霉菌抗毒素蛋白-过氧化物酶连接法(SP法)。主要步骤为:(1)每例标本作 4 μ m 切片两张,脱蜡水化;(2)过氧化物酶阻断内源性过氧化物酶;(3)非免疫动物血清以减少非特异性背景;(4)分别加 ER α 、ER β 、 α -SMA 和 Desmin 单克隆抗体;(5)加生物素标记第二抗体;(6)加链霉菌抗毒素蛋白-过氧化物酶溶液;(7)PBS 缓冲液漂洗 3 次;(8)新鲜配制的 DAB 溶液显色;(9)以苏木素作对比染色;(10)常规脱水透明封片。

阴性对照设置以 PBS 代替一抗进行上述染色作为空白对照,结果为阴性。

2.2 统计方法 Image-plus pro6.0 软件计算随机 5 个高倍镜下阳性细胞的($\bar{x} \pm s$)值,各组数据比较应用 SPSS13.0 For Windows 软件的方差分析进行处理,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 颅内动脉瘤与对照动脉血管 VSMC 表型蛋白表达情况 (1)VSMC α -SMA 表达水平见表 2。

表 2 颅内动脉瘤与对照组 VSMC α -SMA 表达指数比较

	VSMC α -SMA 表达指数		
	总计	男性	女性
对照组	0.3918 ± 0.0415	0.3825 ± 0.0369	0.4012 ± 0.0441
动脉瘤组	0.1441 ± 0.0409	0.1656 ± 0.0384	0.1227 ± 0.0423

注:方差分析结果,组间比较, $F = 161.254, P < 0.001$;性别比较, $F = 1.528, P > 0.05$ 。

(2)VSMC Desmin 表达指数水平见表 3。

表 3 颅内动脉瘤与对照组 VSMC Desmin 表达指数比较

	VSMC Desmin 表达指数		
	总计	男性	女性
对照组	0.3196 ± 0.0552	0.2869 ± 0.0706	0.3578 ± 0.0416
动脉瘤组	0.1441 ± 0.0409	0.1656 ± 0.0384	0.1227 ± 0.0423

注:方差分析结果,组间比较, $F = 139.226, P < 0.001$;性别比较, $F = 3.157, P > 0.05$ 。

3.2 颅内动脉瘤与对照动脉血管雌激素受体表达 (1)VSMC ER α 表达指数水平见表 4。

表 4 颅内动脉瘤与对照组 VSMC ER α 表达指数水平比较

	VSMC ER α 表达指数		
	总计	男性	女性
对照组	0.1810 ± 0.0432	0.1612 ± 0.0324	0.1986 ± 0.0578
动脉瘤组	0.2835 ± 0.0743	0.2978 ± 0.0836	0.2783 ± 0.0612

注:方差分析结果,组间比较, $F = 10.268, P < 0.05$;性别比较, $F = 0, P > 0.05$ 。

(2)VSMC ER β 表达指数水平见表 5。

表 5 颅内动脉瘤与对照组 VSMC 表达 ER β 的比较

	VSMC ER β 表达指数		
	总计	男性	女性
对照组	0.2356 ± 0.0336	0.2176 ± 0.0406	0.1986 ± 0.0578
动脉瘤组	0.3685 ± 0.0948	0.3465 ± 0.0812	0.3832 ± 0.1158

注:方差分析结果,组间比较, $F = 16.532, P < 0.05$;性别比较, $F = 1.963, P > 0.05$ 。

4 讨论

4.1 颅内动脉瘤与 VSMC 表型改变 国外文献已

证实颅内动脉瘤基础实验和临床研究中均可看到动脉壁中层大量平滑肌细胞凋亡,降低了血管壁承受张力的能力,从而诱发颅内动脉瘤的形成。血管平滑肌细胞是动脉中膜的主要细胞成分,在维持血管稳定过程中并非一直处于生物学上的静止状态,而是存在动态改变的。这种动态改变表现为细胞凋亡与增殖的平衡和细胞表型的平衡。当血管受损时,VSMC 迅速发生变化,肌纤维骤减,收缩功能消失,粗面内质网、核糖体和高尔基体等细胞器增多,收缩型 VSMC 向合成型 VSMC 转化。转变后的 VSMC 合成细胞外基质能力增强,并能分泌胶原等蛋白以加强血管壁的修复。VSMC 还能合成、释放多种水解酶以及炎症因子,一方面促进 VSMC 向损伤部位游走,通过增殖弥补丢失的细胞成分,另一方面通过炎症反应加速修复过程。当损伤的血管壁重新修复后,VSMC 在调控下又逐渐恢复到初始状态的收缩型,这个过程称为 VSMC 的表型转化过程^[1~3]。VSMC 收缩表型在颅内动脉瘤壁与正常脑血管组织中的差别在于,部分或全部向合成型平滑肌转变。因此,VSMC 表型转化所引发的血管重构可能是颅内动脉瘤的形成原因之一。

4.2 VSMC 表型转型有关的蛋白 收缩型 VSMC 通过表达一系列特异的收缩蛋白和骨架蛋白来维持其收缩及调节血管张力的功能,其中 α -SMA、SM-MHC 和 Desmin 表达是 VSMC 收缩型的重要标志^[4]。本实验中,颅内动脉瘤组织内 α -SMA 和 Desmin 表达水平平均比对照动脉血管组织减少,表明这两种蛋白有维持血管张力的作用。 α -SMA 和 Desmin 在 VSMC 表型变化中,含量变化大,容易通过简单的实验方法加以区分。通过对二者含量的测定可以确定 VSMC 所处的细胞类型,有利于结果判断,并且这两种蛋白的抗体商业化程度较好,实验方法成熟稳定,便于应用。

4.3 雌激素、雌激素受体与颅内动脉瘤的关系 流行病学资料调查显示,颅内动脉瘤患者 39 岁以下女性占 44%,40~49 岁女性占 55%,50~59 岁女性占到 77%^[5]。这组数据表明随着年龄增加,女性颅内

动脉瘤发病率也明显上升,绝经前妇女颅内动脉瘤的发病率和破裂率显著低于绝经后妇女。雌激素可以活化内皮细胞和 VSMC,抑制平滑肌细胞的增殖和迁移,减少炎症因子表达,应用雌激素替代治疗可以减少高血压诱导大鼠颅内动脉瘤的发生率。说明雌激素及受体可以抑制动脉瘤的形成。

本研究结果显示:(1)动脉瘤和非动脉瘤患者 ERs 表达水平在不同性别间无统计学差异。(2)对于非动脉瘤对照组而言,脑血管 VSMC 表达 ERs 水平在不同性别间存在统计学差异,男性低于女性。(3)ERs 表达水平在颅内动脉瘤中高于对照动脉血管组织。在动脉瘤组织中 VSMC 处于合成表型状态,并没有出现雌激素抑制 VSMC 表型变化。这反应动脉瘤组织中 VSMC 处于持续的损伤状态,细胞持续处于应激,ERs 的表达升高也不能逆转动脉瘤病理过程。因此,ERs 的作用可能存在于动脉损伤早期修复过程,而对于已经形成的动脉瘤组织修复作用是无效的,或是促进了动脉瘤组织新生血管形成,使动脉瘤内出现结构完整的动脉血管以代替变形的动脉瘤组织。

参考文献

- [1] Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall[J]. J Vasc Res, 1999,36(1):2-27.
- [2] Turley EA. Extracellular matrix remodeling: multiple paradigms in vascular disease[J]. Circ Res, 2001,88(1):2-4.
- [3] Rong JX, Berman JW, Taubman MB, et al. Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002,22(10):1 617-1 623.
- [4] Kataoka K, Taneda M, Asai T, et al. Structural fragility and inflammatory response of ruptured cerebral aneurysms. A comparative study between ruptured and unruptured cerebral aneurysms[J]. Stroke, 1999,30(7):1 396-1 401.
- [5] Stober T, Sen S, Anstatt T, et al. Direct evidence of hypertension and the possible role of post-menopause oestrogen deficiency in the Pathogenesis of berry aneurysms[J]. J Neurol, 1985,232(2):67-72.

(收稿日期:2008-07-01)

征稿启事

《江西中医药》所设的重点栏目有《明医心鉴》、《滕王阁医话》等。《明医心鉴》以介绍名老中医经验和中医临证心得为主,重点刊载中医关于疑难病的诊疗经验,要求观点、方法新,经验独到。《滕王阁医话》主要反映中医教学、科研、临床的一得之见,要求以小见大,有感而文,语言生动流畅,可读性强,富于知识性、趣味性。