

# Correlation of Placental Growth Factor Expression in Arterial Plaque of Lower Extremity

Kaikai Wei, Shengyun Wan, Lingshang Kong, Yang Ding

The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei Anhui  
Email: 1653226186@qq.com, wshy63@sina.com

Received: Oct. 25<sup>th</sup>, 2019; accepted: Nov. 7<sup>th</sup>, 2019; published: Nov. 14<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

**Objective:** To investigate the expression of placental growth factor in human femoral atherosclerotic plaque and its clinical significance. We hope to further explore the pathogenesis of ASO. **Methods:** A total of 30 lower extremity arterial plaque specimens (15 males and 15 females, mean age: 66 years) were included in the study. All patients had a history of intermittent claudication before operation. All patients were confirmed as arteriosclerosis obliterans by lower extremity CTA or angiography before operation. Meanwhile, 10 cases (7 males and 3 females, mean age: 61) of femoral artery specimens removed during femoral artery bypass grafting after femoral artery injury were selected as the control group. The expression of PLGF protein was detected by immunohistochemistry. **Result:** The PLGF levels of each group were significantly different from those of the normal control group ( $(0.0005 \pm 1.52 \times 10^{-7})$  vs. the arterial plaque group  $(0.0388 \pm 1.1 \times 10^{-3})$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Our study found that PLGF levels in lower extremity artery disease patients are much higher than those in normal controls, which may be related to the role of PLGF in promoting the growth of atherosclerotic plaques and leading to plaque instability.

## Keywords

Peripheral Arterial Diseases, Arterial Plaque, Placental Growth Factor

# 胎盘生长因子在下肢动脉斑块中表达的相关性研究

魏凯凯, 万圣云, 孔令尚, 丁洋

安徽医科大学第二附属医院, 安徽 合肥  
Email: 1653226186@qq.com, wshy63@sina.com

收稿日期：2019年10月25日；录用日期：2019年11月7日；发布日期：2019年11月14日

## 摘要

目的：探讨人股动脉粥样硬化斑块中胎盘生长因子表达水平及临床意义。希望进一步探讨下肢动脉疾病的发病机制。方法：研究共纳入下肢动脉斑块标本30例(其中男性15例，女性15例，平均年龄：66岁)，所有病例术前均有间歇性跛行病史，术前均经下肢动脉CTA或血管造影等检查，证实为下肢动脉硬化闭塞症。同时选取因外伤损伤股动脉后，行股动脉搭桥术中切除的股动脉标本10例(男性7例，女性3例，平均年龄：61岁)作为对照组。采用免疫组化方法检测PLGF蛋白表达含量水平。结果“各组PLGF水平比较((正常对照组( $0.0005 \pm 1.52 \times 10^{-7}$ ) vs.动脉斑块组( $0.0388 \pm 1.1 \times 10^{-3}$ ),  $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。结论：我们的研究发现，下肢动脉疾病患者动脉斑块PLGF水平明显高于正常对照者，这可能与PLGF可以促进动脉粥样硬化斑块的增长和导致斑块不稳定有关。

## 关键词

外周动脉疾病，动脉斑块，人胎盘生长因子

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

外周动脉疾病(Peripheral arterial diseases, PAD)与高临床和社会经济负担有关，是继冠心病和脑卒中之后与动脉粥样硬化相关的心血管疾病的第三大发病原因[1]。流行病学研究强调了这种疾病的全球影响，表明PAD的流行率最近急剧上升。在低收入和中等收入国家，我们正面临一场全球性的流行病，影响到高收入国家和发展中国家2亿多男女[2]。考虑到PAD的死亡率、发病率和致残率，迫切需要制定新的治疗策略，以防止疾病的发展和进展，并治疗危及生命或危及肢体的并发症。

一些生长因子已经显示出在动物模型中刺激血管生成的潜力。因此，它们的使用作为一种有前途的治疗PAD的策略出现[3]。近年来研究发现[4]，PLGF (Placental growth factor, PLGF)是血管内皮生长因子(VEGF)家族成员之一，最初发现于胎盘，主要由胎盘和脐静脉内皮细胞分泌，可刺激血管平滑肌细胞生长，具有单核细胞趋化作用，通过巨嗜细胞正调节肿瘤坏死因子和单核细胞趋化蛋白，参与血管内皮生长的调节。PLGF与颈动脉粥样硬化斑块的易损性密切相关，在颈动脉斑块中检测到了PLGF的高表达[5]。然而，在下肢动脉疾病患者的股动脉粥样硬化斑块中，PLGF的表达水平是否存在变化，以及二者之间是否有一定关联性，目前未见相关文献报道。通过本实验检验PLGF在人下肢动脉斑块中的表达，探讨PLGF的表达是否与炎症、局部病理性血管生成有关，为下肢缺血性疾病的治疗提供了新的方向和思路。

## 2. 材料与方

### 2.1. 一般材料

#### 2.1.1. 患者和标本

收集自2017年9月至2019年3月在安徽医科大学第二附属医院行下肢股腘动脉斑块旋切术后动脉粥样硬化斑块标本30例(其中男性15例，女性15例，平均年龄：66岁)，所有病例术前均有间歇性跛行

病史,术前均经下肢动脉 CTA 或血管造影等检查证实为下肢动脉硬化闭塞症。同时选取因外伤损伤股动脉后,行股动脉搭桥术中切除的股动脉标本 10 例(男性 7 例,女性 3 例,平均年龄:61 岁)作为对照组。术前排除门静脉高血压,全身性炎症性疾病,肿瘤史。本研究已获得安徽医科大学第二附属医院伦理委员会批准,纳入试验患者均已签署知情同意书。

### 2.1.2. 实验主要试剂

① 一抗: PLGF (Bs-0281R), 博奥森; ② 二抗: HRP 标记山羊抗兔(G23303), Servicebio; ③ 组化试剂盒 DAB 显色剂(G1211), Servicebio。

### 2.1.3. 实验主要仪器

① 包埋机, JB-P5, 武汉俊杰电子有限公司; ② 组织摊片机, KD-P, 浙江省金华市科迪仪器设备有限公司; ③ 显微镜, XSP-C204, CIC; ④ 分析软件: Image-pro plus 6.0 (Media Cybernetics, inc, Rockville, MD, USA)。⑤ 涡旋混合器, MX-F, Servicebio。

## 2.2. 方法

1) 手术切除标本在离体 10~20 min 中内,经冰冷的生理盐水处理血污后立即装入冻存管管中并置于液氮罐中,然后转移至 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中冻存。

2) 将切片依次放入二甲苯 I 20 min——二甲苯 II 20 min——无水乙醇 I 5 min——无水乙醇 II 5 min——75%酒精 5 min,自来水洗涤。然后放入苏木素染液染 3~5 min,自来水洗,分化液分化,自来水洗,返蓝液返蓝,流水冲洗。之后切片依次放入 85%、95%的梯度酒精脱水各 5 min,入伊红染液中染色 5 min。最后切片依次放入无水乙醇 I 5 min——无水乙醇 II 5 min——无水乙醇 III 5 min——二甲苯 I 5 min——二甲苯 II 5 min 透明,中性树胶封片。

3) 石蜡切片厚度 5 mm,常规脱蜡至水,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 min,抗原修复 10 min,一抗  $4^{\circ}\text{C}$  过夜,二抗  $37^{\circ}\text{C}$  30 min, DAB 显色,苏木素复染,常规脱色,二甲苯透明、树脂胶封固,显微镜观察。采用图像分析系统,每组选取 6 张切片,每张切片随机挑选至少 3 个 400 倍视野进行拍照。拍照时尽量让组织充满整个视野,保证每张照片的背景光一致。应用 image-Pro plus 6.0 软件选取相同的棕黄色作为判断所有照片阳性的统一标准,对每张照片进行分析得出每张照片阳性的累计光密度值(IOD)以及组织的像素面积(AREA)。并求出平均光密度值(average optical, AO 值), $\text{AO} = \text{IOD}/\text{AREA}$ 。

## 2.3. 统计学分析方法

采用 SPSS 16.0 软件处理,实验数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多个样本均数比较采用单因素方差分析,组间方差分析用 F 检验, $P \leq 0.05$ ,表示差异有统计学意义; $P \leq 0.01$  表示差异有显著统计学意义; $P > 0.05$  表示差异无统计学意义。

## 3. 结果分析

### 3.1. 一般资料比较

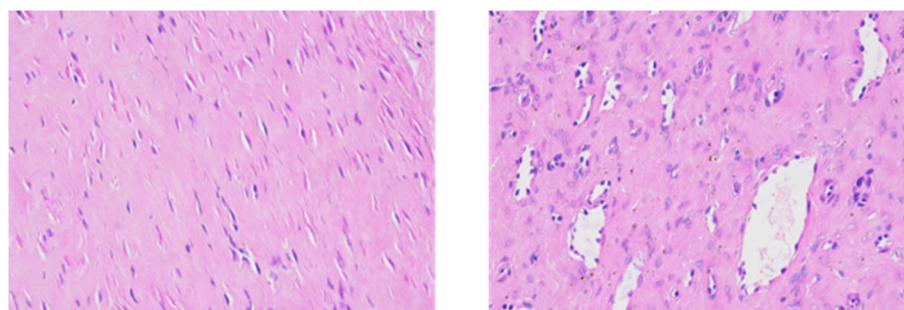
对各组一般资料进行比较发现(见表 1),其中血胆固醇含量,实验组与对照组相比,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );其余血脂等各项指标组间均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3.2. 病理形态学观察

结合 HE 染色结果,动脉斑块组组织排列较紊乱,而且斑块内伴有炎性细胞、泡沫细胞浸润。正常股动脉内膜、中膜、外膜结构完整,细胞为多层环状排列。见图 1。

**Table 1.** Comparison of general conditions of each group [ $(\bar{x} \pm s)$ , n(%)]**表 1.** 各组一般情况比较[( $\bar{x} \pm s$ ), n(%)]

	正常对照组	实验组	P 值
年龄/岁	61.00 ± 9.26	65.97 ± 6.64	0.072
男性	15 (50)	7 (70)	0.271
吸烟率/%	43.33	40.00	0.853
收缩压/(mmHg)	120.20 ± 28.84	142.30 ± 30.56	0.052
舒张压/(mmHg)	71.30 ± 16.357	72.17 ± 13.62	0.869
血脂/(mmol/L)	1.17 ± 0.43	1.51 ± 0.72	0.158
血胆固醇/(mmol/L)	3.73 ± 1.08	4.71 ± 1.23	0.031
血尿素氮/(mmol/L)	7.16 ± 2.65	7.47 ± 3.61	0.806
白细胞/( $\times 10^9/L$ )	8.40 ± 4.01	9.26 ± 4.22	0.572
血小板/( $\times 10^9/L$ )	198.10 ± 103.95	237.37 ± 89.314	0.255



正常组

动脉斑块组

**Figure 1.** HE staining results in plaque group and normal group ( $\times 400$ )**图 1.** 动脉斑块组与正常组 HE 染色结果( $\times 400$ )

### 3.3. 免疫组化检测人胎盘生长因子在斑块组织与正常组织表达

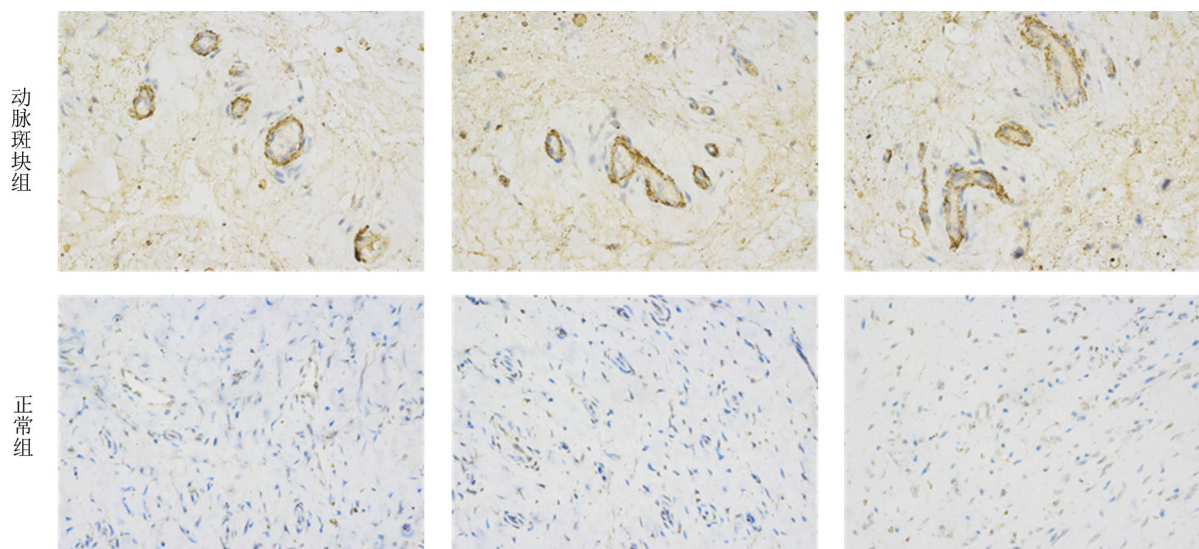
与对照组比较, 动脉斑块中 PLGF 表达显著高于对照组, 差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ ), 推测局部 PLGF 的高表达可能通过促进局部血管新生, 从而导致斑块的不稳定性, 见表 2, 图 2。

**Table 2.** Comparison of PLGF expression in arterial plaque and normal human blood vessels [ $(\bar{x} \pm s)$ ]**表 2.** 人胎盘生长因子在动脉斑块和人正常血管中 PLGF 的表达含量比较 [( $\bar{x} \pm s$ )]

组别	面密度
正常组	0.0005 ± 1.52 × 10 <sup>-7</sup>
动脉斑块组	0.0388 ± 1.1 × 10 <sup>-3</sup>

注:  $F = 150.048$ ,  $P = 0.000$ ; 与动脉斑块组比较,  $P < 0.01$ 。





**Figure 2.** Immunohistochemical expression of PLGF in plaque group and normal group ( $\times 400$ )

**图 2.** 动脉斑块组与正常组 PLGF 免疫组化表达结果( $\times 400$ )

#### 4. 讨论

下肢动脉疾病是一种相对罕见的死亡原因，2013 年全球心血管死亡仅约占 1% 至 2% [6]。一项荟萃分析[2]从 1997 年至 2011 年进行的 34 项基于人群的研究中估计了下肢 PAD 的全球患病率(使用踝臂收缩压指数阈值  $\leq 0.9$ )。在高收入国家，按年龄划分的平均患病率，从 40 岁到 49 岁的 5%，到 70 岁到 79 岁的 13% 不等(不分性别)。在低收入和中等收入国家，妇女的特定年龄患病率与高收入国家相似，但男子的特定年龄患病率略低：40 至 49 岁的妇女为 6%，70 至 79 岁的妇女为 12%，40 至 49 岁的男子为 3%，70 至 79 岁的男子为 9%。在 1999 年至 2000 年的全国健康和营养检查调查中，美国 PAD (踝臂收缩压指数  $< 0.9$ ) 的患病率在 40 至 49 岁之间为 1%。年龄  $\geq 70$  岁时为 15%，无性别差异。间歇性跛行的患病率研究倾向于发现男性高于女性，但这种差异在使用踝臂收缩压指数的研究中并不明显[1]。这类疾病因其高发病率、高病死率和高致残率，而成为现代医学的重要研究课题。

正常情况下 PLGF 在胎盘表达丰富，PIGF 也在其他组织中有少量表达，包括心脏、肺、甲状腺和骨骼肌中，而在病理条件下，表达 PLGF 的细胞类型有血管内皮细胞、造血干细胞、视网膜色素上皮细胞以及不同肿瘤细胞[7] [8]。研究发现胎盘生长因子(PLGF)是一种血管内皮生长因子(VEGF)家族成员，是一种盐皮质激素受体调控的血管基因，在损伤后的醛依赖性血管重构中发挥作用[9]。Korpisalo 等[10]研究显示，腺病毒胎盘生长因子血管生成基因治疗在对兔后肢缺血模型有氧能力和运动耐受性的影响中，能显著改善缺血肢体的功能。另研究发现 PLGF 在表达缺陷的小鼠的中，相比与野生型小鼠，PLGF 缺陷的小鼠皮肤伤口延迟愈合，行股动脉结扎后，侧支血管生成能力下降、血管渗透性下降和巨噬细胞趋化减少[11]。

我们的研究发现，下肢动脉疾病患者动脉斑块 PLGF 水平远高于正常对照者，这可能与 PLGF 可以促进动脉粥样硬化斑块的增长，刺激血管平滑肌细胞增殖引起斑块不稳定导致斑块不稳定的作用有关。其促进动脉粥样硬化斑块增长和导致斑块不稳定的作用机制可能为[7]：① PLGF 刺激血管生成，从而使炎症细胞(如单核细胞和白细胞)的获取和募集成为可能，这些炎症细胞产生胶原降解酶；② PLGF 也是一种有丝分裂和趋化因子，刺激炎症细胞增殖和血管壁内的粘附；引起血管平滑肌细胞增殖，促进斑块内新生血管形成造成斑块内出血；③ 促进组织因子分泌，形成血栓。由于本研究依托于安徽医科大学第

二附属医院, 病源量充足, 纳入了较多的病例, 因此本研究结果较为可靠。

尽管目前的研究已取得很大进展, 但尚存在争议。PLGF 发挥作用的机制比较复杂, 其机理亦不明确, 后续将集中在 PLGF 介导的治疗方法对增强或抑制血管发生的潜在功能上研究, 并以此为下肢动脉性疾病的治疗和预防提供线索。本文结合国内外研究现状, 分析 PLGF 在下肢缺血性疾病中的临床意义与价值, 旨在为下肢缺血性疾病发病机制的研究与临床治疗药物的研发道明新方向。

## 参考文献

- [1] Willey, J., Mentias, A., Vaughan-Sarrazin, M., *et al.* (2018) Epidemiology of Lower Extremity Peripheral Artery Disease in Veterans. *Journal of Vascular Surgery*, **68**, 527-535.e5. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2017.11.083>
- [2] Fowkes, F.G.R., Rudan, D., Rudan, I., *et al.* (2013) Comparison of Global Estimates of Prevalence and Risk Factors for Peripheral Artery Disease in 2000 and 2010: A Systematic Review and Analysis. *The Lancet*, **382**, 1329-1340. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61249-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61249-0)
- [3] Gorenoi, V., Brehm, M.U., Koch, A., *et al.* (2017) Growth Factors for Angiogenesis in Peripheral Arterial Disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **6**, CD011741. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011741.pub2>
- [4] Jaffe, I.Z., Newfell, B.G., Aronovitz, M., *et al.* (2010) Placental Growth Factor Mediates Aldosterone-Dependent Vascular Injury in Mice. *Journal of Clinical Investigation*, **120**, 3891-3900. <https://doi.org/10.1172/JCI40205>
- [5] 丁语. 人颈动脉粥样硬化斑块中 C-反应蛋白和胎盘生长因子的表达[D]: [硕士学位论文]. 郑州: 郑州大学, 2010.
- [6] Jaffe, I.Z., Newfell, B.G. and Aronovitz, M. (2015) Global, Regional, and National Age-Sex Specific All-Cause and Cause-Specific Mortality for 240 Causes of Death, 1990-2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*, **385**, 117-171. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61682-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61682-2)
- [7] Glaser, R., Peacock, W.F., Wu, A.H.B., *et al.* (2011) Placental Growth Factor and B-Type Natriuretic Peptide as Independent Predictors of Risk from a Multibiomarker Panel in Suspected Acute Coronary Syndrome (Acute Risk and Related Outcomes Assessed with Cardiac Biomarkers [ARROW]) Study. *The American Journal of Cardiology*, **107**, 821-826. <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2010.11.003>
- [8] 李红霞, 宫海叶, 曾萧, 等. TGF- $\beta$ 1 和 PLGF 在不同类型妊娠滋养细胞疾病患者病变组织中的表达及其意义[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(5): 1041-1046+1119.
- [9] McGraw, A.P., Bagley, J., Chen, W.S., *et al.* (2013) Aldosterone Increases Early Atherosclerosis and Promotes Plaque Inflammation through a Placental Growth Factor-Dependent Mechanism. *Journal of the American Heart Association*, **2**, e000018. <https://doi.org/10.1161/JAHA.112.000018>
- [10] Korpisalo, P., Rissanen, T.T., Bengtsson, T., *et al.* (2008) Therapeutic Angiogenesis with Placental Growth Factor Improves Exercise Tolerance of Ischaemic Rabbit Hindlimbs. *Cardiovascular Research*, **80**, 263-270. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvn195>
- [11] Hindryckx, P., Waeytens, A., Laukens, D., *et al.* (2010) Absence of Placental Growth Factor Blocks Dextran Sodium Sulfate-Induced Colonic Mucosal Angiogenesis, Increases Mucosal Hypoxia and Aggravates Acute Colonic Injury. *Laboratory Investigation*, **90**, 566-576. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2010.37>