

[文章编号] 1007-3949(2003)11-04-0291-04

• 实验研究 •

碱性成纤维细胞生长因子基因对心肌梗死后 冠状血管新生及血管结构的影响

谭强¹, 李易¹, 张小勇¹, 光雪峰¹, 孙林¹, 熊国昌¹, 马雁冰², 张光明²

(1. 昆明医学院附属第二医院心内科, 云南省昆明市 650101;

2. 中国医学科学院昆明生物研究所分子生物研究室, 云南省昆明市 650031)

[关键词] 分子生物学; 碱性成纤维细胞生长因子对血管重塑的影响; 兔急性心肌梗死模型和免疫组织化学法; 血管新生; 血管重塑; 心肌梗死

[摘要] 为探讨心肌内注射碱性成纤维细胞生长因子基因对心肌梗死后冠状血管新生和血管结构的影响。以碱裂解法大量制备质粒; 采用开胸结扎兔冠状动脉左前室间支法, 建立兔急性前壁心肌梗死模型。模型制备成功后将动物分为治疗组($n=19$)和对照组($n=18$), 并于心肌内分别注射 pcDNA3-碱性成纤维细胞生长因子 100 μg 和 pcDNA3 100 μg , 饲养至第 2、6 和 12 周末处死; 免疫组织化学法观察蛋白表达; 病理切片观察梗死心肌组织学变化、缺血心肌内血管新生和血管管壁及管腔变化情况。结果发现: (1) 实验中描记的心电图证实兔急性心肌梗死模型制作成功。(2) 免疫组织化学观察注射 pcDNA3-碱性成纤维细胞生长因子处心肌组织在 6 周内有碱性成纤维细胞生长因子蛋白的表达。(3) 病理切片行图象分析计算血管密度发现: 治疗组毛细血管密度和小动脉密度显著高于对照组。(4) 实验第 6 周治疗组与对照组动脉平均管壁厚度分别为 $19.8 \pm 9.9 \mu\text{m}$ 比 $18.9 \pm 9.6 \mu\text{m}$ ($P > 0.05$); 12 周分别为 $28.3 \pm 11.5 \mu\text{m}$ 比 $24.1 \pm 11.3 \mu\text{m}$ ($P < 0.01$); 6 周比值分别为 0.31 ± 0.16 比 0.24 ± 0.12 ($P < 0.01$); 12 周分别为 0.34 ± 0.15 比 0.25 ± 0.09 ($P < 0.01$)。实验结果提示, 心肌内注射碱性成纤维细胞生长因子基因能促进缺血心肌内血管新生并引起血管重塑, 有可能成为一种新的冠心病治疗方法。

[中图分类号] R541

[文献标识码] A

Intramyocardial Injects Naked DNA Encoding Basic Fibroblast Growth Factor to Promote Angiogenesis and Induce the Changes of Coronary Artery Structure in Rabbits with Acute Myocardial Infarction

TAN Qiang, LI Yi, ZHANG XiaoYong, GUANG XueFeng, SUN Lin, XIONG GuoChang, MA Yan Bing,
and ZHANG GuangMing

(Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650101, China)

[KEY WORDS] Fibroblast Growth Factor, Basic; Gene Therapy; Angiogenesis; Myocardial Infarction, Acute; Vascular Remodelling; Disease Model/Rabbits

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of naked DNA encoding basic fibroblast growth factor (bFGF) for treatment acute myocardial infarction in rabbits model. **Methods** 42 rabbits underwent left thoracotomy followed by the ligation of left anterior or descending coronary artery. After model reproducing, the rabbits were randomized to receive a directly intramyocardial injection of either pcDNA3-bFGF ($n=19$) or pcDNA3 ($n=18$). 2, 6 or 12 weeks later, immunohistologic analysis was performed to study expression of bFGF gene at protein level. Histologic analysis was performed to evaluate angiogenesis induced by gene therapy. Observing the changes of artery wall by pathology image analysis. **Results** Changes of electrocardiogram testify that the model of AMI is successful. immunohistologic analysis shows that bFGF gene can express in ischemic myocardial in 6 weeks.

Histologic analysis shows: there was a significant increase in the density of capillaries and arterioles in gene therapy group. Calculated the average wall thickness of the big vessels (diameter $\geq 200 \mu\text{m}$) and the ratios of average wall thickness and vessel diameter by image analysis. In bFGF and control groups the average wall thickness 6W were: $19.8 \pm 9.9 \mu\text{m}$ vs $18.9 \pm 9.6 \mu\text{m}$, $P > 0.05$; 12W: $28.3 \pm 11.5 \mu\text{m}$ vs $24.1 \pm 11.3 \mu\text{m}$, $P < 0.01$, respectively; ratios of 6W: 0.31 ± 0.16 , 0.24 ± 0.12 , $P < 0.01$; 12W: 0.34 ± 0.15 , 0.25 ± 0.09 , $P < 0.01$. **Conclusion** Directly intramyocardial injection of bFGF gene can promote angiogenesis and induce vascular remodeling in ischemic myocardium. Suggesting that bFGF gene may have the possibility to become a new treatment strategy for coronary heart disease.

[收稿日期] 2002-12-23 [修回日期] 2003-05-18

[基金项目] 云南省自然科学基金(2000C0109M)资助

[作者简介] 谭强,男,1972年出生,河北省秦皇岛市人,硕士研究生,主要研究方向为介入性心脏病和治疗性血管新生。李易,男,1964年出生,云南省昆明市人,教授,硕士研究生导师,研究方向为治疗性血管新生。张小勇,男,1972年出生,江西省黎川市人,硕士研究生,研究方向为治疗性血管新生。

冠心病严重威胁着人类健康,为缺血心肌重建血液供应成为人们日益关注的热点。对于药物治疗无效并且因冠状动脉病变严重而无法行经皮冠状动脉成形术或冠状动脉搭桥术的患者,应用生长因子基因促血管新生可能成为一种新的治疗方法。然而应用生长因子促血管新生的同时,是否会引起原有血管重塑、血管壁的增厚、导致血管腔的狭窄,医学界仍有争议。本研究应用碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)基因,将其注射入兔急性缺血心肌内,探讨其促冠状动脉血管新生及对冠状动脉血管结构的影响。

1 材料与方法

1.1 pcDNA3-碱性成纤维细胞生长因子真核表达质粒的大量制备

内含 pcDNA3-bFGF 的大肠杆菌 DH5 菌种由中国协和医科大学生物研究所马雁冰副研究员馈赠。以碱裂解法大量制备质粒并采用聚乙二醇沉淀法提纯质粒。采用紫外分光光度仪测定 A260/280 以确定质粒的浓度和纯度。质粒浓度计算公式为 $1\text{ OD} = 50\text{ }\mu\text{g}$ 质粒 DNA。

1.2 急性心肌梗死模型的制备

参照文献[1]制备急性心肌梗死模型。日本大耳白兔(云南省药物研究所提供,合格证号[云动管]9801,经本单位动物管理委员会批准实验)42只,3~4月龄,雌雄不拘,体重2.5~3.0 kg,3%戊巴比妥钠30 mg/kg耳缘静脉麻醉。动物仰卧固定于手术台上,消毒后切开皮肤、钝性分离胸大肌并剪开第二到第四肋软骨,暴露心脏。小心提起心包并剪开,暴露心大静脉,左冠状动脉前室间支即走行于心大静脉深部。以心大静脉为标志,在中上1/3处结扎左冠状动脉前室间支,见心尖部及部分左室前壁心肌变紫。实验过程中行心电图监测,无胸前导联ST段抬高和(或)无病理性Q波者剔除,有37只兔制备成功,继续分笼喂养。

1.3 动物分组及处理

将37只急性心肌梗死模型兔分为两组:治疗组19只,于结扎点以下心肌内四点注射 pcDNA3-bFGF 100 μg (溶于0.1 mL生理盐水中),分别于第2周、第6周和第12周各处死5、7和7只。对照组18只,心肌内四点注射空载质粒 pcDNA3 100 μg ,分别于第2周、第6周和第12周各处死5、7和6只。

1.4 碱性成纤维细胞生长因子基因在心肌组织表达的检测

碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)多克隆抗体和链霉素抗生物素蛋白-过氧化物免疫组织化学超敏试剂盒购自福州迈新生物技术公司。动物处死后,取导入基因或对照质粒处心肌组织,10%中性福尔马林固定48 h后石蜡包埋。采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物免疫组织化学法检测 bFGF 基因在心肌中的表达。具体步骤如下:行厚度5 μm 切片,脱蜡后用PBS冲洗3次,每次3 min;滴加50 μL 过氧化酶阻断溶液,室温孵育10 min, PBS冲洗3次,每次3 min;滴加50 μL 正常非免疫兔血清,室温孵育10 min;滴加 bFGF 多克隆抗体50 μL ,4℃过夜;加入生物素标记的二抗50 μL , PBS冲洗3次,每次3 min;滴加50 μL 链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液,室温下孵育10 min, PBS冲洗3次,每次3 min;滴加100 μL 新鲜配置的DAB溶液(H_2O_2 -二氨基联苯胺)作用3~10 min,经苏木精复染、脱水后封片。免疫组织化学切片经图象分析(云南大学实验中心, Mias-2000 图象分析系统,放大倍数40×33.5)测定 bFGF 灰度值来计算 bFGF 基因的表达量。

1.5 血管新生和血管结构观察

取上述心肌组织行石蜡包埋后切片,厚度5 μm ,行HE染色。经图象分析系统计算血管密度。在第6周各取3例心肌组织,经戊二醛固定,电镜(荷兰 Philips CM-120 扫描透射电子显微镜)观察血管超微结构。

在第6周末和第12周末用图象分析系统计算较大血管(管径 $\geq 200\text{ }\mu\text{m}$)平均管壁厚度及管壁与管腔比值。

1.6 统计学分析

所有数据用 SPSS10.0 进行处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 碱性成纤维细胞生长因子基因在心肌的表达

实验第2周,两组免疫组织化学染色均可见棕黄色颗粒,分布于胞浆内。治疗组表达明显,分布范围更广。实验第6周治疗组棕黄色颗粒减少,但仍较对照组表达明显。12周时治疗组和对照组仅见少量棕黄色颗粒,两者无显著性差异。图象分析获得的 bFGF 灰度值见表1(Table 1),灰度值越小代表 bFGF 蛋白含量越高。

2.2 新生血管观察结果

光镜下发现靠近心外膜注射处心肌组织间质内,毛细血管和小动脉增生明显(图1, Figure 1),图

象分析系统计算得出的血管密度见表 2 (Table 2), 可见治疗组血管新生明显好于对照组。

2.3 血管结构观察结果

透射电镜观察缺血心肌超微结构变化及血管新生情况。两组均可见心肌细胞水肿, 部分胞核染色质边集, 空泡变性, 肌原纤维间隙增宽, 肌原纤维断裂, 线粒体数目减少, 大部分线粒体嵴完整, 膜光滑, 双层结构可见。糖原减少或消失, 肌浆网扩张, 间质可见慢性炎性细胞浸润, 胶原纤维增生, 对照组肌微丝断裂及心肌细胞坏死较治疗组明显。治疗组心肌细胞间可见大量毛细血管生长, 包括出芽式生长, 套叠式生长及内皮细胞增生式生长; 新生血管内皮细

胞及平滑肌细胞增生。心肌细胞间还可见增生的纤维母细胞, 新生血管周围可见趋于正常的心肌细胞 (图 2, Figure 2)。病理切片经图象分析系统计算较大动脉(管径 $\geq 200 \mu\text{m}$) 平均管壁厚度及管壁与管腔比值见表 3 (Table 3)。

表 1. 两组心肌内碱性成纤维细胞生长因子基因灰度值

Table 1. Analysis of gray value of bFGF in two groups			
分 组	2 周	6 周	12 周
对照组	116.0 \pm 3.4	146.6 \pm 8.6 ^c	169.5 \pm 10.6
治疗组	96.4 \pm 8.7 ^b	138.8 \pm 7.4 ^{ac}	167.2 \pm 9.6

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.01$, 与 2 周比较。

表 2. 两组心肌血管密度比较

Table 2. Vascular density in two groups

分 组	毛细血管			小动脉		
	2 周	6 周	12 周	2 周	6 周	12 周
对照组	139 \pm 23	140 \pm 27	143 \pm 27	10.4 \pm 3.8	10.7 \pm 4.2	11.2 \pm 5.1
治疗组	151 \pm 21 ^a	167 \pm 35 ^b	168 \pm 37 ^b	14.3 \pm 4.6	15.2 \pm 3.6 ^{bc}	16.2 \pm 4.2 ^{bc}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.01$, 与 2 周比较。

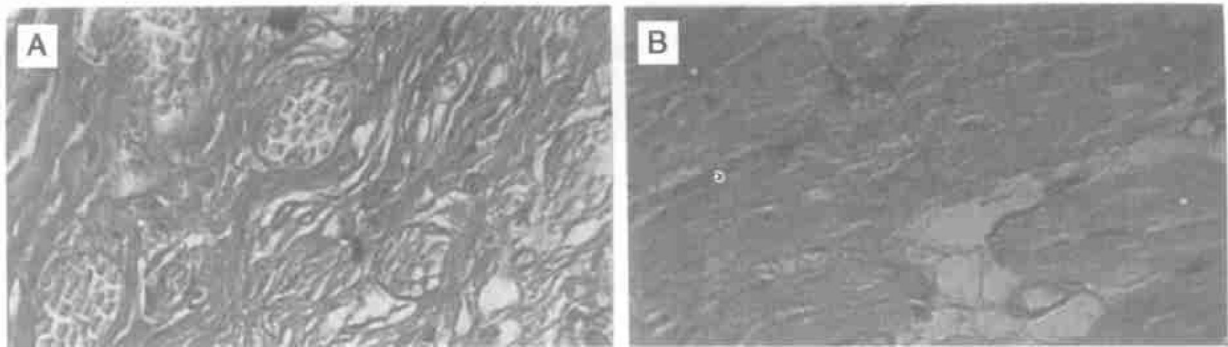


图 1. 第 6 周两组兔心肌组织的光学显微镜观(HE 染色, $\times 250$) A. 治疗组血管新生明显; B. 对照组血管新生不明显。

Figure 1. Micrograph of myocardial in two groups of the sixth week

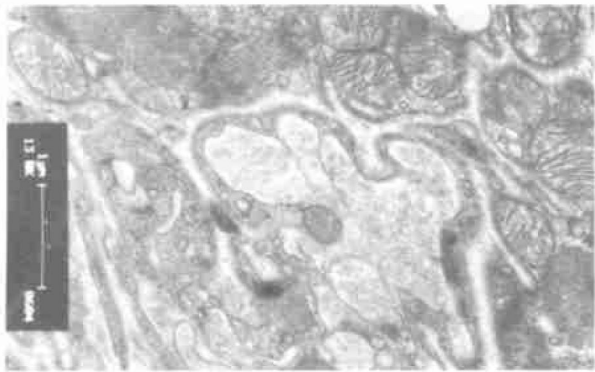


图 2. 第 6 周治疗组兔心肌组织的扫描电镜观 毛细血管生长明显。

Figure 2. Electronic micrograph of myocardial in gene therapy group of the sixth week

表 3. 兔心脏动脉平均管壁厚度及管壁与管腔比值

Table 3. Analysis of average wall thickness of the big vessels and the ratios of average wall thickness and vessel diameter

分 组	管壁厚度(μm)		管壁/管腔	
	6 周	12 周	6 周	12 周
对照组	18.9 \pm 9.6	24.1 \pm 11.3	0.24 \pm 0.12	0.25 \pm 0.09
治疗组	19.8 \pm 9.9 ^c	28.3 \pm 11.5 ^b	0.31 \pm 0.16 ^b	0.34 \pm 0.15 ^b

b: $P < 0.01$, 与对照组比较; c: $P < 0.01$, 与 12 周比较。

3 讨论

近年来的研究发现碱性成纤维细胞生长因子具有促血管内皮细胞和平滑肌细胞增殖、分化和迁移的作用^[2-4], 是参与血管新生的重要生物活性物质。

研究表明^[5,6],冠状动脉内、心包内和心肌内注射外源性碱性成纤维细胞生长因子蛋白,可提高梗死心肌的收缩功能,减少梗死面积,促进梗死区小动脉和毛细血管新生。我室^[7]的前期研究发现,碱性成纤维细胞生长因子蛋白有促进血管新生的作用。由于碱性成纤维细胞生长因子蛋白在血液中半衰期短(50 min),全身应用效果有限,因此目前国外学者已将重点转移到应用其基因进行心肌转染的动物和人体研究。但碱性成纤维细胞生长因子及其基因对血管结构和重塑的影响存在着争议。严格的说,血管重塑就是指血管大小和结构的改变,它分为有利重塑和不利重塑^[8],前者是指一种正常适应性或补偿性改变,后者指适应不良性改变。Tapon 等^[9]认为,碱性成纤维细胞生长因子除了能促内皮细胞增殖外,还能促平滑肌细胞增殖,可以促使血管再狭窄导致不利重塑,而抑制碱性成纤维细胞生长因子可防止再狭窄的发生。但国内外多数报道认为碱性成纤维细胞生长因子无引起血管再狭窄的作用^[10],当然这与所用碱性成纤维细胞生长因子剂量有关。

本实验于急性心肌梗死的兔心肌中注射 pcDNA3-碱性成纤维细胞生长因子,通过免疫组织化学图象分析,我们发现:心肌内注射裸质粒-DNA,可在一定时间内(6周内)表达碱性成纤维细胞生长因子蛋白。2周时碱性成纤维细胞生长因子蛋白表达量最高,以后随着时间延长表达量逐渐减少,12周时已和对照组无明显差异。2周时对照组缺血心肌也有碱性成纤维细胞生长因子蛋白的表达,推测其原因是在缺血、缺氧等应激下,碱性成纤维细胞生长因子在心肌内的表达上调^[11]。本研究也证实心肌内注射碱性成纤维细胞生长因子裸质粒-DNA可以促进毛细血管和小动脉新生。我们于2周、6周、12周处死动物并行病理切片检查发现:2周时治疗组毛细血管和小动脉密度开始增加,6周时毛细血管密度和小动脉密度达到高峰,12周时毛细血管和小动脉密度与6周相比无明显差异,血管不再进一步增加。说明心肌内注射碱性成纤维细胞生长因子基因可以发挥生物学效应,促进血管新生,从而对缺血心肌产生保护作用。

本研究应用透射电镜观察新生血管结构发现,一些新生血管既有内皮细胞增殖又有平滑肌细胞增殖。通过病理图像分析,实验第12周,治疗组较大动脉平均管壁厚度大于对照组,提示碱性成纤维细胞生长因子基因促血管新生的同时使原有血管壁增厚、血管结构发生改变,使血管发生了重塑。治疗组

实验第6周及第12周比较,管壁与管腔比值无统计学差异,而平均管壁厚度后者大于前者,表明血管壁增厚的同时管腔也增大,重塑为壁厚腔大、功能更强大的血管。以上研究显示碱性成纤维细胞生长因子基因能促进血管管壁平滑肌细胞的增殖,引起血管管壁重塑,但无引起血管进一步狭窄的证据。

这些结果提示碱性成纤维细胞生长因子基因促血管新生的同时也引起血管的有利重塑,考虑可能是碱性成纤维细胞生长因子下列作用的结果:促进血管内皮细胞的有丝分裂及增殖;促进内皮细胞的迁移;促进具有降解基底膜作用的蛋白激酶的释放;促进内皮细胞形成管腔;促进平滑肌细胞的增殖。血管增生到一定时期(6周),血管数量不再增长,只是血管管腔增大,管壁增厚,重塑为有明显功能的血管。

本研究发现心肌内注射碱性成纤维细胞生长因子基因引起血管新生的同时使血管重塑,但无引起冠状动脉血管过度增生的证据,为碱性成纤维细胞生长因子基因的临床应用建立了一定基础。

[参考文献]

- [1] 孙林,李易,曾河,光雪峰,徐章. 开胸结扎兔冠状动脉致急性心肌梗死实验模型的研究. 昆明医学院学报, 2001, 22(1): 39-41
- [2] Scott RJ, Morrow LA. Growth factors and angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 1993, 27(7): 1155-161
- [3] 石纓,温进坤. 碱性成纤维细胞生长因子、新生小牛血清和肝素对大鼠血管平滑肌细胞迁移的影响. 中国动脉硬化杂志, 1998, 6(3): 189-192
- [4] 欧大明,刘革修,刘江华,唐振旺,陈临溪,黄红林,廖端芳. 碱性成纤维细胞生长因子反义寡脱氧核苷酸抑制胰岛素诱导动脉平滑肌细胞增殖. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7(2): 99-102
- [5] Yang HT, Deschenes MR, Olilive RW, Terjung RL. Basic fibroblast growth factor increase collateral blood flow in rat with femoral arterial ligation. *Circ Res*, 1996, 79(1): 62-69
- [6] Hornig MC, Mac Isaac AI, Nicolin FA, Vince DG, Lee P, Elliss G, et al. Reduction in myocardial infarct size by basic FGF after temporary coronary occlusion in a canine model. *Circulation*, 1996, 94(8): 1927-933
- [7] 李易,孙林,马雁冰,江宏映,光雪峰,孙茂盛,等. 重组人碱性成纤维细胞生长因子促冠状动脉血管新生的实验研究. 中华医学杂志(网络版), 2001, 3: 17
- [8] Paxon DP, Coats W, Currier J. Remodeling of the coronary artery after vascular injury. *Procardiovas Dis*, 1997, 40(2): 129-140
- [9] Taporr Bretauiere J, Drouet B, Matou S, Mourao PA, Brous A, Letourneur D, et al. Modulation of vascular human endothelial and rat smooth muscle cell growth by a fucosylated chondroitin sulfate from echinoderm. *Thromb-Haemost*, 2000, 84(2): 332-337
- [10] Lazarus DF, Shou M, Scheinowitz M, Hodge E, Thirumurti V, Kitsiou AN, et al. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation*, 1996, 94(5): 1074-082
- [11] Cohen MV, Hatcher VB, Yaghdjian V, Hatcher VB. Longitudinal changes in myocardial basic fibroblast growth factor (FGF-2) activity following coronary artery ligation in the dog. *J Moll Cell Cardiol*, 1994, 26(5): 683-690

(此文编辑 胡必利)