

•实验研究•

[文章编号] 1007-3949(2004)12-05-0562-03

大鼠缺血心肌中碱性成纤维细胞生长因子的动态变化及其对血管新生的影响

余 强¹, 陈运贞²

(重庆医科大学 1. 附属第二医院心内科, 重庆市 400010; 2. 附属第一医院心内科, 重庆市 400016)

[关键词] 病理生理学; 碱性成纤维细胞生长因子对血管新生的影响; 免疫组织化学; 心肌梗死; 小动脉; 毛细血管密度; 大鼠

[摘要] 为观察心肌梗死后不同时期心肌中碱性成纤维细胞生长因子表达的变化规律, 评价碱性成纤维细胞生长因子对血管新生的影响, 采用免疫组织化学方法分别检测大鼠心肌梗死后 24 h 及 1、2、3 和 4 周时缺血心肌中碱性成纤维细胞生长因子蛋白质的表达情况; 另将 6 只心肌梗死大鼠给予碱性成纤维细胞生长因子中和抗体腹腔注射, 2 周后检测缺血心肌中毛细血管及小动脉密度的变化。结果发现, 心肌梗死 24 h 后, 缺血心肌中碱性成纤维细胞生长因子蛋白质的表达明显增加, 1~2 周达高峰, 3 周后开始下降, 4 周时下降更明显, 但仍高于正常大鼠; 心肌梗死 2 周时缺血心肌中毛细血管密度和小动脉密度均显著增加, 给予碱性成纤维细胞生长因子中和抗体后小动脉密度显著减少, 毛细血管密度没有变化。结果提示, 大鼠急性心肌梗死后缺血心肌中碱性成纤维细胞生长因子持续升高达 1 月以上, 其主要作用为调控缺血心肌中小动脉的新生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Changes of the Activity of Basic Fibroblast Growth Factor and Its Effect on Angiogenesis in Ischemic Myocardium of Rats

SHE Qiang¹, and CHEN Yur Zhen²

(1. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010; 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Arteriole; Capillary Density; Rats; Basic Fibroblast Growth Factor; Angiogenesis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the changes of expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) and to evaluate the effect of bFGF on angiogenesis in ischemic myocardium after acute myocardial infarction. **Methods** 30 male infarcted rats were divided into 24h group, 1w group, 2w group, 3w group and 4w group, expression of bFGF protein in ischemic myocardium was detected with immunohistochemical staining. Another 6 infarcted rats were treated with bFGF neutralizing antibody for 2 weeks. Capillary density and arteriolar density were detected in ischemic myocardium. **Results** Expression of bFGF protein in ischemic myocardium increased at 24 hours after acute myocardial infarction, and peaked at 1~2 weeks after acute myocardial infarction, while gradually decreased at 3 weeks after acute myocardial infarction. The expression of bFGF at 4 weeks after acute myocardial infarction still was above normal level. Capillary density and arteriolar density were significantly augmented at 2 weeks after acute myocardial infarction. Arteriolar density in ischemic myocardium was greatly decreased, but capillary density was in absence of change, after action of bFGF was blocked. **Conclusions** Expression of bFGF protein in ischemic myocardium after acute myocardial infarction was increased continuously for 1 months or more. bFGF mediates proliferation of arterioles in ischemic myocardium.

对心肌缺血的适应性反应, 机体通过血管数量增加来促进冠状动脉侧枝循环的建立。许多生长因子参与了此过程, 其中包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)、血小

板源性生长因子、胰岛素样生长因子 1 和转移生长因子 β 等, 它们都有促进血管新生的作用^[1]。碱性成纤维细胞生长因子作为成纤维细胞生长因子家族中的一员, 其促进冠状血管新生的作用近来已成为研究热点。本文将评价急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)大鼠缺血心肌中碱性成纤维细胞生长因子的变化规律, 并探讨其对冠状动脉血管新生的影响。

1 材料与方

[收稿日期] 2003-10-17

[修回日期] 2004-09-10

[作者简介] 余 强, 博士, 副教授, 主要从事高血压及冠心病的研究, 电话为 023-63849075, E-mail 为 qshe98@sina.com。陈运贞, 教授, 博士研究生导师, 主要从事高血压及冠心病的研究。

1.1 心肌梗死动物模型的建立

健康雄性 Wistar 大鼠 42 只, 体重 250~350 g。用戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 行腹腔注射麻醉, 气管切开及气管插管后, 采用呼吸机进行人工控制呼吸, 呼吸频率 60 次/min, 潮气量 4~6 mL。左正中旁切开皮肤, 逐层分离皮下组织和肌肉, 剪断第 3、4 肋骨, 暴露心脏, 切开心包, 在左心耳与肺动脉圆锥间穿线结扎冠状动脉前降支。然后迅速将心脏复位, 关闭胸腔, 恢复大鼠自主呼吸, 拔出气管内插管并缝合气管^[2]。以上手术均在严格无菌条件下进行。术后腹腔内注射青霉素钠 80 万单位/天, 连续 3 天抗感染。以心电图肢导联 ST 段弓背向上抬高持续半小时以上作为梗死模型复制成功标准。假手术 (Sham) 组大鼠术中只在冠状动脉下穿线, 不结扎冠状动脉, 其余步骤同上。

1.2 实验分组

实验分为 3 组。心肌梗死组 (AMI 组) 为 30 只心肌梗死大鼠, 随机分成梗死后 24 h、1 周、2 周、3 周和 4 周 5 个亚组, 每组 6 只。AMI+ 抗体组为 6 只心肌梗死后大鼠, 给予腹腔内注射 bFGF 中和抗体 (Santa Cruz), 第一天以 0.3 mg/100 g 剂量注射, 然后分别在第 3、6、9 和 12 天以 0.6 mg/100 g 的剂量注射, 于第 14 天取材。假手术组只设术后 2 周 (6 只大鼠) 一个时间点作总体对照。于各相应时间点活杀动物取左室梗死区及相邻区域心肌分别放入 10% 甲醛溶液中和液氮中待测。

1.3 缺血心肌中碱性成纤维细胞生长因子蛋白质表达的检测

用免疫组织化学方法, 按 SP 试剂盒说明进行, 主要过程如下: 石蜡切片脱蜡和水化后, 用 PBS (pH = 7.4) 冲洗 3 次, 每次 3~5 min; 每张切片加 50 μ L 过氧化物酶阻断溶液, 室温下孵育 10 min; PBS 冲洗 3 \times 5 min; 加 50 μ L 的非免疫性动物血清, 室温下孵育 5 min, PBS 冲洗 1 次; 加 50 μ L bFGF 兔多克隆抗体 (一抗), 室温下孵育 60 min; PBS 冲洗 3 \times 5 min; 加 50 μ L 生物素标记的第二抗体, 室温下孵育 10 min; PBS 冲洗 3 \times 5 min; 加 50 μ L 链霉素抗生物素蛋白—过氧化物酶溶液, 室温下孵育 10 min; PBS 冲洗 3 \times 5 min; 加 100 μ L 新鲜配制的 DAB 溶液, 显微镜下观察 5~10 min; 自来水冲洗, 中性树脂封固。光镜下观察以定性及定位。每只大鼠取 8 张缺血心肌连续切片, 采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图像测量系统, 在 400 \times 视野下, 每张切片取 8 个视野, 测定平均光密度值作半定量分析。

1.4 缺血心肌中毛细血管密度及小动脉密度测定

以 (11) 因子相关抗原抗体免疫组织化学检测各组心肌石蜡切片 (均为横切) 中血管内皮细胞, 并计数毛细血管 (直径 < 20 μ m) 和小动脉 (直径 30~60 μ m), 以毛细血管数/mm² 表示毛细血管密度, 以小动脉数/mm² 表示小动脉密度 (400 高倍视野等于 0.152 mm²)。

1.5 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有非常显著性。

2 结果

2.1 心肌梗死后碱性成纤维细胞生长因子表达的变化规律

心肌梗死 24 h 和 1、2、3、4 周时缺血心肌中 bFGF 蛋白质表达量 (光密度值) 分别为 0.18 ± 0.03 、 0.34 ± 0.05 、 0.36 ± 0.05 、 0.21 ± 0.04 和 0.15 ± 0.03 。假手术组为 0.09 ± 0.02 。心肌梗死 24 h 后 bFGF 蛋白质表达明显增加, 1~2 周达高峰, 3 周后开始下降, 4 周时下降更明显, 但仍高于正常 (除 1 周与 2 周时比较 $P > 0.05$ 外, 余各组间比较 $P < 0.01$) (图 1, Figure 1)。

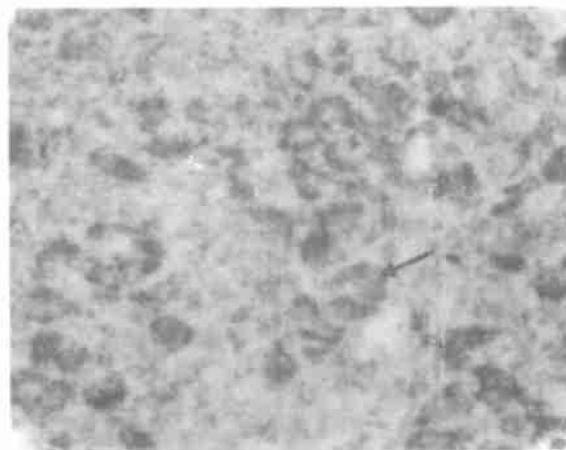


图 1. 急性心肌梗死 2 周时大鼠缺血心肌免疫组织化学结果 ($\times 200$) \rightarrow : bFGF 蛋白质呈棕黄色阳性染色。

Figure 1. Immunohistochemical staining for bFGF protein in ischemic myocardium at 2 weeks after acute myocardial infarction

2.2 毛细血管密度和小动脉密度变化及其与碱性成纤维细胞生长因子表达的关系

心肌梗死 2 周时大鼠缺血心肌中毛细血管密度和小动脉密度与假手术组比较均有显著增加 ($P < 0.01$)。给予 bFGF 中和抗体后, 缺血心肌中小动脉密度显著下降 ($P < 0.01$), 但毛细血管密度没有明

显改变(表 1, Table 1)。

表 1. 心肌梗死 2 周后缺血心肌中毛细血管密度和小动脉密度的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Changes of capillary density and arteriolar density in ischemic myocardium in 2 weeks after AMI

分 组	n	毛细血管密度 (n/mm ²)	小动脉密度 (n/mm ²)
假手术组	6	417 ± 45	129 ± 22
心肌梗死组	6	1 595 ± 127 ^a	539 ± 49 ^a
AMI+ 抗体组	6	1 561 ± 114	124 ± 21 ^b

a: $P < 0.01$, 与假手术组比较; b: $P < 0.01$, 与心肌梗死组比较。

3 讨 论

碱性成纤维细胞生长因子是一个 18~ 24 kDa 的多肽, 在体内广泛分布, 许多起源于中胚层及神经外胚层的组织和器官都能大量表达碱性成纤维细胞生长因子, 其中包括心脏。它主要存在于细胞内, 包括细胞质和细胞核内, 也可见于受损细胞和培养细胞的细胞外基质中。碱性成纤维细胞生长因子没有外分泌信号肽, 不能经过核蛋白体—内质网—高尔基复合体途径分泌到细胞外, 而是由于细胞膜的损伤直接释放到细胞外。碱性成纤维细胞生长因子是一种强的血管源性生长因子, 可刺激成纤维细胞、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞及神经细胞的生长^[3]。正常心肌中可见少量碱性成纤维细胞生长因子表达, 缺血、缺氧可以诱导碱性成纤维细胞生长因子表达上调。Xie 等^[4]发现, 无论是短暂还是持续的冠状动脉闭塞, 24 h 内均可在大鼠的一些心肌细胞内和毛细血管周围发现大量的碱性成纤维细胞生长因子 mRNA 及蛋白质的表达, 而 30 天后, 在非缺血区及梗死移行区还能发现碱性成纤维细胞生长因子呈点状分布。Cuevas 等^[5]报道急性心肌梗死患者血清碱性成纤维细胞生长因子水平升高。本研究发现: 大鼠心肌梗死 24 h 后, 缺血心肌中碱性成纤维细胞生长因子蛋白表达明显增加, 1~ 2 周达高峰, 然后

逐渐下降, 4 周后仍高于正常水平。该结果说明心肌梗死后缺血心肌中碱性成纤维细胞生长因子表达增加可持续 1 月以上, 并进一步提示了其变化规律。

既往研究显示, 心肌缺血可刺激内皮细胞增殖, 导致心肌毛细血管新生。碱性成纤维细胞生长因子可能是促进上述血管新生的重要因素之一。碱性成纤维细胞生长因子有强烈促内皮细胞和平滑肌细胞增殖的作用, 此外, 碱性成纤维细胞生长因子可以促进内皮细胞内蛋白酶的分泌, 这也是血管新生的必要条件^[3]。大量研究证实, 外源性的碱性成纤维细胞生长因子可促使心脏缺血和梗死区域的血管新生和侧枝循环形成^[6]。本研究发现急性心肌梗死 2 周后, 大鼠缺血心肌中毛细血管及小动脉的数量均显著增加, 给予碱性成纤维细胞生长因子中和抗体注射的急性心肌梗死大鼠 2 周后, 毛细血管密度没有明显改变, 但小动脉的数量显著减少。说明碱性成纤维细胞生长因子主要参与对小动脉新生的调控。虽然碱性成纤维细胞生长因子可促进缺血心肌中毛细血管和小动脉的新生, 但碱性成纤维细胞生长因子主要作用于血管平滑肌细胞, 所以, 碱性成纤维细胞生长因子的作用被阻断后仅小动脉的新生受到抑制^[7]。

[参考文献]

- [1] Tomanek RJ, Zheng W. Role of growth factors in coronary morphogenesis. *Tex Heart Inst J*, 2002, **29** (4): 250-254
- [2] Li J, Brown LF, Hibberd MG, Grossman JD, Morgan JP, Simons M. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am J Physiol*, 1996, **270**: H1 803-811
- [3] Lee CH, Smits PC. Vascular growth factors for coronary angiogenesis. *J Interv Cardiol*, 2002, **15** (6): 511-518
- [4] Xie ZL, Gao M, Batra S, Koyama. The capillarity of left ventricular tissue of rats subjected to coronary artery occlusion. *Cardiovasc Res*, 1997, **33**: 671-676
- [5] Cuevas P, Barrios V, Gimenez-Gallego G, Martinez-coso V, Cuevas B, Benavides J, et al. Serum level of basic fibroblast growth factor in acute myocardial infarction. *Eur J Med Res*, 1997, **2** (7): 282-284
- [6] Horrigan MC, Malycky JL, Ellis SG, Topol EJ, Nicolini FA. Reduction in myocardial infarct size by basic fibroblast growth factor following coronary occlusion in a canine model. *Int J Cardiol*, 1999, **68** (suppl 1): s85-91
- [7] 潘晓宏, 单江, 罗建红. 碱性成纤维细胞因子和白细胞介素 6 促进大鼠血管平滑肌细胞增殖的协同作用. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (3): 233-236

(此文编辑 朱雯霞)