

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0869-04

• 实验研究 •

移植活化富血小板血浆上清液促进实验性大鼠心肌梗死后组织修复

李晓红^{1,2}, 周欣¹, 恽佳例¹, 曾山¹, 庞伟¹, 李玉明¹

(1. 中国人民武装警察部队医学院附属医院心血管病研究所 心内科, 天津市 300162

2. 华中科技大学同济医学院病理生理教研室, 湖北省武汉市 430030)

[关键词] 内科学; 血小板; 心肌梗死; 心室重塑; 组织修复

[摘要] 目的 检测移植活化富血小板血浆上清液对心肌梗死后组织修复过程的影响。方法 105只雄性Wistar大鼠随机分为富血小板组、贫血小板组和假手术组。经腹主动脉取血后采用二次离心法和凝血酶激活制作活化富血小板血浆上清液和活化贫血小板血浆上清液。采用酶联免疫吸附试验测定活化富血小板血浆上清液和活化贫血小板血浆上清液中血管内皮生长因子的浓度。建立急性心肌梗死模型即刻,于梗死周边注射活化富血小板血浆上清液(富血小板组)和活化贫血小板血浆上清液(贫血小板组)。心肌梗死后7d和28d处死动物,取出心脏行离体心脏压力-容积曲线测定、天狼猩红染色和荧光检测。结果 富血小板组心肌梗死后28d离体心脏压力-容积曲线较贫血小板组左移;梗死周边区注射活化富血小板血浆上清液可在一定程度上减小梗死面积,增加梗死游离壁厚度并缓解非梗死区肥厚,同时促使心肌梗死区小动脉和毛细血管的新生。结论 移植活化富血小板血浆上清液可加速心肌梗死后愈合并改善心室重塑。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Transplantation of Activated Platelet-Rich Plasma Supernatant Improves Ventricular Remodeling after Myocardial Infarction

LIXiaoHong^{1,2}, ZHOU Xin¹, YUN Jiale¹, ZENG Shan, PANG Wei¹, and LIYuming¹

(1. Institute of Cardiovascular Disease, Division of Cardiology, Affiliated Hospital, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China; 2. Pathophysiology Department, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

[KEY WORDS] Platelet; Myocardial Infarction; Ventricular Remodeling; Healing

[ABSTRACT] **Aim** We applied transplantation of activated platelet-rich plasma supernatant (APRPS) to the infarcted region to investigate its role in the ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. **Methods** 105 Wistar male rats were randomized to platelet-rich group that received APRPS, platelet-poor group that received activated platelet-poor plasma supernatant (APPPS), and sham operation group. Platelet-rich plasma (PRP) and platelet-poor plasma (PPP) were harvested from healthy rats by centrifugation and activated with thrombin. After thrombin activation, the level of vascular endothelial growth factor (VEGF) in PRP and PPP was measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Ligation of the left anterior descending coronary artery (LAD) was performed and 100 μL APRPS or APPPS was injected in five different sites at the infarcted border zone immediately after ligation of LAD. Rats were sacrificed in 7 and 28 days for determination of left ventricular passive pressure-volume relationship and prepared for picrosirius red staining and fluorescence analysis. **Results** Compared with platelet-poor group, platelet-rich group was associated with a leftward shift of diastolic pressure-volume curve in 28 days. APRPS transplantation may limit infarct size, thicken left ventricular free wall and attenuate hypertrophy of viable cardiomyocytes, which accompanied by increased arteriogenesis and angiogenesis. **Conclusions** Transplantation of activated platelet-rich supernatant could accelerate healing process and improve ventricular remodeling after myocardial infarction.

[收稿日期] 2008-07-20 [修回日期] 2008-11-12

[基金项目] 中国人民武装警察部队医学院重点基础研究项目(WJZ2007-3)

[作者简介] 李晓红, 博士研究生, 主要从事心肌梗死后心室重塑方面的研究, E-mail为 lixchen@gmail.com。周欣, 博士, 主治医师, 主要从事心肌梗死后心室重塑方面的研究, E-mail为 zhouxinwj@gmail.com。通讯作者李玉明, 博士, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要从事高血压和心肌梗死后心室重塑方面的研究, 联系电话为 022-60578746, E-mail为 cardiola@gnail.com。

心肌梗死后左心室重塑是急性心肌梗死后整个左心室的结构、形态和大小发生的一系列慢性进行性的病理生理变化, 可造成心功能衰竭等严重后果, 由此, 改善心肌梗死后心室重塑显得尤为重要。根据冠心病治疗指南, 抗血小板药物仍然是心肌梗死治疗的基石之一。血小板在激活后可释放多种因子如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth

factor, VEGF)、基质细胞衍生因子 1 (stroma-derived factor-1, SDF-1)、血小板源生长因子和碱性成纤维细胞生长因子等^[1]。富含以上多种生长因子的富血小板血浆 (platelet-rich plasma PRP) 可促进骨骼、牙齿等多种组织的损伤修复^[2-3], 但是其对心肌梗死后的修复是否起着积极的作用, 目前尚未见报道。本实验以急性心肌梗死大鼠为模型, 将活化富血小板血浆上清液 (activated platelet-rich plasma supernatant APRPS) 移植入梗死周边心肌中, 探讨 APRPS 对急性心肌梗死组织修复和心室重塑的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂、实验动物及分组

凝血酶和 α -SMA 抗体 (anti- α -smooth muscle actin) 购自美国 Sigma 公司; VEGF 酶联免疫吸附试剂盒购自 R&D 公司; Goat antimouse IgG-FITC 和 Goat antimouse IgG-HRP 购自美国 Zymed 公司。105 只 180~250 g 雄性 Wistar 大鼠随机分为富血小板组、贫血小板组和假手术组, 所有动物均购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心。

1.2 制作活化富血小板血浆上清液和活化贫血小板血浆上清液

健康成年 Wistar 大鼠在戊巴比妥钠麻醉下腹主动脉取血, 置入装有 3.8% 枸橼酸钠的硅化试管 (血液与枸橼酸钠的体积比为 9:1)。血小板计数仪多次测大鼠全血血小板数, 平均为 $2.5 \times 10^{11}/L$ 。将全血 800 r/min 离心 5 min, 吸取上清液、交界层及交界层下的一少部分红细胞层置于另一支灭菌离心管, 再以 4 k r/min 离心 15 min 沉淀为血小板, 上清液即为贫血小板血浆 (platelet-poor plasma PPP), 置于灭菌试管中; 用 PPP 稀释血小板沉淀至血小板数为 $1.2 \times 10^{12}/L$, 即为 PRP。将凝血酶分别加入 PRP 和 PPP 中 (2 kU/L), 作用数十秒后于低温离心机离心 (12 k r/min \times 10 min, 4°C), 取上清液即分别为 APRPS 和活化贫血小板血浆上清液 (activated platelet-poor plasma supernatant APPPS), 装管 -80°C 保存。取出一部分 APRPS 和 APPPS 采用大鼠 VEGF 酶联免疫吸附试剂盒测定 APRPS 和 APPPS 中 VEGF 的浓度。

1.3 急性心肌梗死模型复制和活化血小板上清液移植

采用结扎冠状动脉前降支的方法建立急性心肌梗死模型^[4]。戊巴比妥钠 (40 g/L) 腹腔注射麻醉大鼠, 颈、胸部术区消毒, 气管插管, 连接呼吸机。在

心电图监护下, 于第四肋间钝性分离肋间肌, 以扩胸器扩张肋间隙, 打开心包, 暴露心脏, 结扎左冠状动脉前降支。手术过程采用心电图持续监测, 以深 S 波和 ST 段动态演变、室性心律失常的出现作为手术成功的标志。10 min 后于梗死周边五个不同部位进行心肌内注射。富血小板组注射 100 μ L APRPS, 贫血小板组注射 100 μ L APPPS, 假手术组只穿线, 不进行冠状动脉结扎和心肌内注射。

1.4 离体心脏压力-容积曲线测定

随机选取 28 d 富血小板组、贫血小板组和假手术组各 5 只大鼠测定离体心脏压力-容积曲线。从大鼠下腔静脉注入 15% KCl 使心脏停搏, 剪下心脏。将连接有压力换能器的 PE50 导管沿主动脉送入左心室, 再以 4-0 丝线结扎房室沟部封闭心室腔。随后将 23 号针头顺 PE50 导管插入左心室, 抽吸形成 -5 mm Hg 的负压, 再以恒定速率 (675 μ L/min) 向心室内注入生理盐水。剪去右心室防止液体滞留。以生理记录仪 (MP150 Biopac) 实时记录压力变化, 并将注射量换算为心室容积。每个心脏在停搏后 10 min 内至少要获得 2 个压力-容积曲线 (-5~40 mm Hg)^[5]。

1.5 组织学处理及病理染色

分别于心肌梗死后第 7 天 (各组 $n=8$) 和 28 天 (各组 $n=8$) 处死动物, PBS 灌流后取出心脏, 制作 5 μ m 石蜡切片。石蜡切片进行天狼猩红染色, 用于分析梗死面积、梗死游离壁厚度和心肌横断面积。在偏振光显微镜 10 倍视野下, 应用 Image Pro Plus 4.5 图像分析软件分别计算梗死游离壁厚度和梗死面积^[4], 梗死面积 = (梗死区内径 + 梗死区外径) / (左心室内径 + 左心室外径); 在偏振光显微镜 400 倍视野下, 随机选取 8 个非梗死区胞膜完整、胞核位于中间的视野, 应用 Image Pro Plus 4.5 图像分析软件计算心肌细胞横断面积 (cross-sectional area CSA)。

1.6 免疫荧光检测

小动脉长度密度: 200 倍视野下, 分别在距离梗死边缘 2 mm 以内和室间隔随机选取 8 个视野, 测量视野的面积 (A), 计数视野中 α -SMA 染色阳性、外径在 6~50 μ m 之间的小动脉 (N), 测量其长轴 (a) 和短轴 (b), 根据文献 [6] 计算小动脉长度密度 (length density of arteriole LDA), $LDA = (\sum a/b) / N \times N/A$ 。④毛细血管密度: 400 倍视野下, 分别在距离梗死边缘 2 mm 以内和室间隔随机选取心肌和毛细血管均为横切的 8 个视野, 测量视野面积 (A), 计数假性血友病因子染色阳性、外径小于 6

μm 的毛细血管, 根据以下公式计算毛细血管密度 (capillary density, CD), $CD = N/A$ 。

1.7 统计学处理

统计方法采用单因素方差分析, 组间两两比较在方差齐时用 LSD-t 检验法, 以 $P < 0.05$ 作为差异具有显著性的标准。

2 结果

2.1 血小板血浆上清液中血管内皮生长因子浓度的比较

据酶联免疫吸附试验结果, 富血小板血浆上清液中 VEGF 的水平明显高于贫血小板血浆上清液, 差异有统计学意义 ($187.5 \pm 45.5 \text{ ng/L}$ 比 $30.1 \pm 7.8 \text{ ng/L}$, $P < 0.01$)。

2.2 移植富血小板血浆对离体心脏压力-容积曲线的影响

相对于贫血小板组, 富血小板组舒张压力-容积曲线左移, 提示移植富血小板血浆上清液可减小急性心肌梗死后左心室整体扩张的程度 (图 1)。

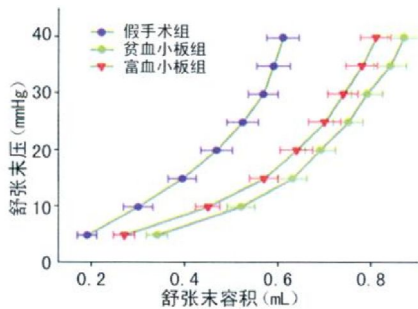


图 1 心肌梗死后 28 d 离体心脏压力-容积曲线

2.3 移植富血小板血浆对梗死面积、梗死游离壁厚度和心肌肥厚的影响

与贫血小板组比, 富血小板组心肌梗死后 28 d 梗死面积虽无显著变化, 但有缩小的趋势 ($42.34\% \pm 4.62\%$ 比 $45.60\% \pm 5.72\%$)。心肌梗死后 7 d 富血小板组梗死游离壁厚于贫血小板组 ($1.93 \pm 0.20 \text{ mm}$ 比 $1.75 \pm 0.15 \text{ mm}$, $P < 0.01$)。心肌梗

死后 28 d 富血小板组的梗死游离壁厚度与贫血小板组比较, 虽无统计学意义, 但仍有增厚的趋势 ($1.75 \pm 0.12 \text{ mm}$ 比 $1.59 \pm 0.25 \text{ mm}$)。梗死后 7 d 和 28 d 富血小板组非梗死区心肌细胞横断面积明显低于贫血小板组 ($419.38 \pm 63.65 \mu\text{m}^2$ 比 $448.52 \pm 79.45 \mu\text{m}^2$, $P < 0.01$; $446.05 \pm 87.82 \mu\text{m}^2$ 比 $490.63 \pm 83.44 \mu\text{m}^2$, $P < 0.01$; 表 1)。

2.4 移植富血小板血浆对心肌梗死后小动脉新生的影响

心肌梗死后 7 d 和 28 d 富血小板组梗死区小动脉的数量和直径均大于贫血小板组 (图 2); 梗死后 7 d 和 28 d 富血小板组梗死区 ($165.5 \pm 32.1 \text{ mm}^2$ 比 $84.2 \pm 29.3 \text{ mm}^2$, $P < 0.05$; $116.9 \pm 2.4 \text{ mm}^2$ 比 $88.1 \pm 5.4 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$) 和非梗死区 ($79.4 \pm 8.2 \text{ mm}^2$ 比 $44.1 \pm 6.4 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$; $63.8 \pm 6.0 \text{ mm}^2$ 比 $47.4 \pm 4.5 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$) 小动脉长度密度均大于贫血小板组 (表 2), 提示 PRP 在活化后所释放的生长因子可明显促进心肌梗死后小动脉新生。

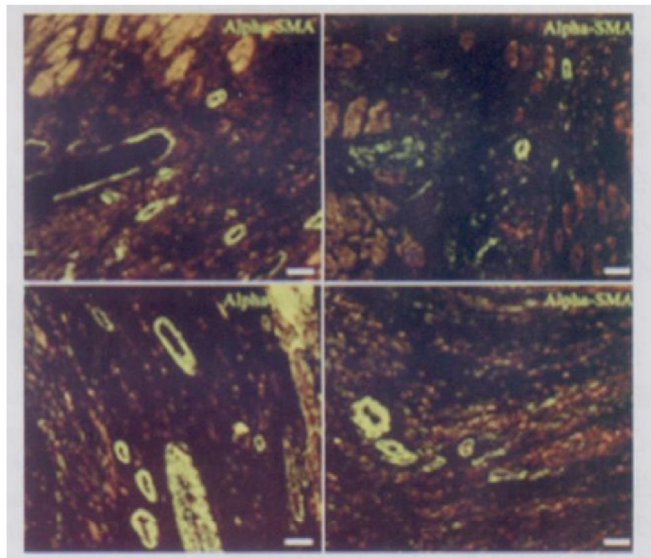


图 2 心肌梗死后第 7 天 (上图)、28 天 (下图) 梗死区小动脉 ($\alpha\text{-SMA}$ 免疫荧光染色, $\times 200$) 左为富血小板组, 右为贫血小板组。

表 1 各组梗死面积、梗死厚度和非梗死区心肌横断面积的比较

分 组	梗死面积		梗死游离壁厚度 (mm)		心肌横断面积 (μm^2)	
	28 d	7 d	28 d	7 d	28 d	7 d
富血小板组	$42.34\% \pm 4.62\%$	1.93 ± 0.20^a	1.75 ± 0.12	419.38 ± 63.65^a	446.05 ± 87.82^a	
贫血小板组	$45.60\% \pm 5.72\%$	1.75 ± 0.15	1.59 ± 0.25	448.52 ± 79.45	490.63 ± 83.44	
假手术组	—	2.45 ± 0.15^a	2.55 ± 0.25^a	64.85 ± 74.95^a	379.65 ± 82.85^a	

a 为 $P < 0.01$, 与贫血小板组比较。

2.5 移植富血小板血浆对心肌梗死后毛细血管新生的影响

心肌梗死后 7 d 和 28 d 富血小板组梗死区 ($82.9 \pm 12.5 \text{ mm}^2$ 比 $43.9 \pm 11.5 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$);

$67.1 \pm 9.8 \text{ mm}^2$ 比 $33.4 \pm 9.1 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$) 和非梗死区 ($64.8 \pm 12.4 \text{ mm}^2$ 比 $36.2 \pm 8.7 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$); $54.4 \pm 10.0 \text{ mm}^2$ 比 $29.6 \pm 8.0 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$) 毛细血管密度均大于贫血小板组 (表 2)。

表 2 心肌梗死后 7 d、28 d 梗死区和非梗死区小动脉长度密度及毛细血管密度 (mm^2)

分组	梗死区 LDA		非梗死区 LDA		梗死区 CD		非梗死区 CD	
	7 d	28 d	7 d	28 d	7 d	28 d	7 d	28 d
富血小板组	165.5 ± 32.1^a	116.9 ± 2.4^b	79.4 ± 8.2^b	63.8 ± 6.0^b	82.9 ± 12.5^b	67.1 ± 9.8^b	64.8 ± 12.4^b	54.4 ± 10.0^b
贫血小板组	84.2 ± 29.3	88.1 ± 5.4	44.1 ± 6.4	47.4 ± 4.5	43.9 ± 11.5	33.4 ± 9.1	36.2 ± 8.7	29.6 ± 8.0
假手术组	49.9 ± 8.1	50.4 ± 3.1	37.2 ± 7.6	26.3 ± 2.8	27.8 ± 6.6	24.9 ± 6.6	27.8 ± 6.6	21.3 ± 8.6

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与贫血小板组比较。

3 讨论

本实验以急性心肌梗死大鼠为模型, 将活化富血小板血浆上清液移植入梗死周边心肌中, 发现富血小板血浆上清液可有效改善心肌梗死后心室重塑。Ma 等^[2]报道, 抗血小板药物可抑制胃溃疡的愈合, 其机制是抗血小板药物抑制了血小板释放生长因子。这篇文献给予的干预条件是抑制血小板, 结果抑制了损伤的愈合。而本实验给予的干预条件是激活血小板, 结果促进了损伤的愈合。Ma 的实验和本实验从正反两个方面证明了血小板的释放功能在损伤愈合中的重要性, 由此验证了移植活化富血小板血浆上清液可促进心肌梗死后损伤修复和改善心室重构。

活化富血小板血浆上清液中含有多种生长因子, 这些生长因子发挥的作用不同, 其作用的时间和部位也不尽相同。活化血小板释放的生长因子改善心肌梗死后心室重塑的可能机制如下: 促进血管再生, 挽救顿抑心肌^[7]; 直接保护缺血心肌细胞, 如减少细胞凋亡^[8]; 动员骨髓干细胞迁移并分化为内皮和心肌细胞^[9, 10]。VEGF 是富血小板血浆中最有代表性的生长因子之一, 具有促进血管再生的作用^[7]。本实验结果表明, 移植入梗死心肌的富血小板血浆上清液中 VEGF 的浓度显著高于贫血小板血浆上清液中的浓度, 由此可见外源性的生长因子, 即移植入的富血小板血浆中的生长因子, 在改善心肌梗死后心室重塑中发挥至关重要的作用。Jin 等^[11]发现血小板被激活后所释放的 SDF-1 可动员 CXCR4⁺ VEGFR1⁺ 的造血干细胞迁移和募集至缺血区, 从而促进血管形成, 同时 SDF-1 在血浆的表达水平有可能成为评估缺血区血管新生能力的指标。

本研究发 现血小板在激活后可改善心肌梗死后

心室重塑, 但由于观察时间和指标的限制, 没有进一步明确哪一种机制占主要, 在随后的研究中作者会进一步完善, 并且考虑加入抗血小板组, 从激活血小板和抑制血小板两个方面更好地阐明富血小板血浆改善心肌梗死后心室重塑这一现象。

[参考文献]

- [1] Plachokova AS, Nikolidakis D, Muller J, et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review [J]. *Clinic Oral Implants Resear*, 2008, **19** (6): 539-545.
- [2] Ma L, Elliott SN, Cirino G, et al. Platelets modulate gastric ulcer healing: role of endostatin and vascular endothelial growth factor release [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (11): 6470-475.
- [3] 童中艺, 王佐, 姜志, 等. 基质细胞衍生因子 1 α 对大鼠骨髓源内皮祖细胞迁移的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (7): 491-493.
- [4] 周欣, 李玉明, 姬文婕, 等. 苯妥英钠促进心肌梗死后组织修复过程的实验研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2004, **32** (1): 68-73.
- [5] Zhou X, Li YM, Ji W J, et al. Phenytoin can accelerate the healing process after experimental myocardial infarction [J]? *Int J Cardiol*, 2006, **107** (1): 21-29.
- [6] Dedkov EI, Christensen LP, Weiss RM, et al. Reduction of heart rate by chronic beta1-adrenoceptor blockade promotes growth of arterioles and preserves coronary perfusion reserve in postinfarcted heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **288** (6): H2684-693.
- [7] Yla-Herttuala S, Rissanen TT, Vajanto I, et al. Vascular endothelial growth factors: biology and current status of clinical applications in cardiovascular medicine [J]. *J Am College Cardiol*, 2007, **49** (10): 1015-026.
- [8] Bockmarquette I, Saxena A, White MD, et al. Thymosin beta4 activates integrin-linked kinase and promotes cardiac cell migration, survival and cardiac repair [J]. *Nature*, 2004, **432** (7016): 466-472.
- [9] Elhadboub I, Haider H, Jiang S, et al. Ex vivo delivered stromal cell-derived factor-1 α promotes stem cell homing and induces angiogenesis in the infarcted myocardium [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, **42** (4): 792-803.
- [10] Langer H, May AE, Daub K, et al. Adherent platelets recruit and induce differentiation of murine embryonic endothelial progenitor cells to mature endothelial cells in vitro [J]. *Circ Res*, 2006, **98** (2): e2-e10.
- [11] Jin DK, Shido K, Kopp HG, et al. Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4⁺ hemangiocytes [J]. *Nat Med*, 2006, **12** (5): 557-567.

(此文编辑 李小玲)