

氨氯地平对急性心肌梗死大鼠血管新生和心功能的影响

孙佳音, 翟琳, 李巧玲, 康丽娜, 徐标

(南京大学医学院附属鼓楼医院心脏科, 江苏省南京市 210008)

[关键词] 氨氯地平; 急性心肌梗死; 血管新生; 心功能

[摘要] **目的** 观察氨氯地平对大鼠急性心肌梗死后血管新生及心功能的影响,并探讨其可能的机制。**方法** 结扎冠状动脉左前降支制造雄性 Sprague-Dawley 大鼠急性心肌梗死模型。术后将大鼠随机分为氨氯地平治疗组和对照组,每组 20 只。CD31 和 α -平滑肌肌动蛋白免疫荧光染色法分别评估急性心肌梗死 14 天后心肌梗死周围区微血管及心肌小动脉新生情况。流式细胞术检测术前及术后 7 天外周血 CD45^{-/low} + CD133⁺ KDR⁺ 内皮祖细胞数量。免疫印迹法测定治疗 14 天心肌梗死周围区血管新生相关通路蛋白的表达。超声心动图评估心功能改变。**结果** 氨氯地平治疗可明显促进急性心肌梗死后心肌微血管 (81.3 ± 4.0 比 69.0 ± 5.6 , $P < 0.05$) 和小动脉 (11.5 ± 3.5 比 6.2 ± 2.3 , $P < 0.05$) 新生,同时伴有循环中内皮祖细胞数量 ($120.3 \pm 18.3/10^6$ 单核细胞比 $42.5 \pm 6.3/10^6$ 单核细胞, $P < 0.01$) 增加,心肌梗死周围区血管新生相关通路的信号分子,如血管内皮生长因子、磷酸化蛋白激酶 B、磷酸化内皮型一氧化氮合酶的表达增加,一氧化氮释放增多 ($P < 0.05$)。与对照组相比,治疗后大鼠左心室射血分数和左心室缩短分数明显改善 ($P < 0.01$),左心室收缩期末内径减小 ($P < 0.05$)。**结论** 氨氯地平能增加心肌梗死后血管新生,并改善心肌梗死后心功能。这种作用可能通过增加循环中内皮祖细胞数量以及活化心肌血管新生相关通路介导。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Amlodipine on Neovascularization and Cardiac Function in Rats after Acute Myocardial Infarction

SUN Jia-Yin, ZHAI Lin, LI Qiao-Ling, KANG Li-Na, and XU Biao

(Department of Cardiology, Affiliated Drum Tower Hospital, Medical School, Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

[KEY WORDS] Amlodipine; Acute Myocardial Infarction; Neovascularization; Cardiac Function

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the beneficial effects of amlodipine on neovascularization and cardiac function in rats after acute myocardial infarction (AMI), and explore the potential underlying mechanism for these effects. **Methods** Left anterior descending coronary artery ligation was performed to induce AMI. Rats post-AMI were randomly assigned into amlodipine group and control group after surgery ($n = 20$ in each group). Capillary density in the peripheral area of infarction and small artery density in myocardium were determined by CD31 and α -SMA staining separately. The percentage of CD45^{-/low} + CD133⁺ KDR⁺ EPC in peripheral blood mononuclear cells was measured by flow cytometry pre-operation and on day 7 post-operation. The expression and phosphorylation of protein associated with neovascularization in the border zone of infarction were determined by Western blot analysis. Echocardiography was performed to evaluate cardiac function. **Results** Amlodipine treatment could notably increase the density of capillary vessels (81.3 ± 4.0 vs 69.0 ± 5.6 , $P < 0.05$) around infarction and small arteries (11.5 ± 3.5 vs 6.2 ± 2.3 , $P < 0.05$) in myocardium. At the same time, elevated circulating EPC count ($120.3 \pm 18.3/10^6$ vs $42.5 \pm 6.3/10^6$, $P < 0.01$) as well as increased expression of VEGF, phosphor-Akt, phosphor-eNOS and NO in the border zone of infarction (all $P < 0.05$) were observed. Compared with controls, post-AMI rats with amlodipine treatment had improved left ventricular ejection fraction and left ve-

[收稿日期] 2013-01-22

[基金项目] 国家自然科学基金(81070195、81000055);江苏省自然科学基金(BK2010107)

[作者简介] 孙佳音,博士,研究方向为糖尿病心肌梗死后内皮祖细胞的动员及血管新生,E-mail 为 sjy616@163.com。翟琳,硕士,研究方向为心肌梗死后血管新生,E-mail 为 indocalamus0527@sina.cn。通讯作者徐标,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向为心脏疾病的介入治疗,E-mail 为 xubiao@medmail.com.cn。

entricular fractional shorting (all $P < 0.01$), so did left ventricular end systolic diameter ($P < 0.05$). **Conclusion**

Amlodipine improves the neovascularization and cardiac function after AMI, which might be associated with increase of circulating EPC count as well as activation of protein in neovascularization related pathway.

氨氯地平是治疗高血压的常用药物。与其他钙离子拮抗剂不同,氨氯地平可以部分抑制血浆血管紧张素转换酶(angiotensin converting enzyme, ACE)的活性,增加血管内皮一氧化氮(nitric oxide, NO)的释放^[1],而后者在组织缺血后血管新生中有重要作用^[2]。研究报道,氨氯地平可以减轻心肌缺血再灌注损伤并且减少非高血压冠心病患者心血管事件的发生^[3,4],但具体机制尚不明确。本研究利用大鼠急性心肌梗死模型,观察氨氯地平治疗是否可以改善急性心肌梗死后左心室收缩功能,以及血管新生在此过程中的作用,并探讨其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

雄性SD大鼠购自南京大学模式动物研究所;苯磺酸氨氯地平受赠于美国辉瑞制药有限公司;大鼠淋巴细胞分离液购自天津市灏洋生物制品科技有限公司;FITC标记的小鼠抗大鼠CD45单克隆抗体和PE-Cy5.5标记的抗兔荧光二抗购自Invitrogen公司;兔抗大鼠CD133单克隆抗体和小鼠抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)多克隆抗体购自Abcam公司;小鼠生物素标记的抗大鼠血管内皮生长因子2(vascular endothelial growth factor-2, VEGF-2)单克隆抗体购自Novus Biologicals公司;APC标记的抗生物素荧光二抗购自eBioscience公司;红细胞裂解液购自Biolegend公司;小鼠抗大鼠一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, eNOS)、蛋白激酶B(Akt)及其相应磷酸化产物p-eNOS、p-Akt以及CD31多克隆抗体购自BD公司;羊抗大鼠VEGF多克隆抗体购自Santa Cruz公司;兔抗大鼠GAPDH多克隆抗体购自Bioworld公司;NO试剂盒购自南京建成生物制品有限公司。

1.2 实验设计

SD大鼠经结扎冠状动脉左前降支制造急性心肌梗死模型,之后随机分至对照组和氨氯地平治疗组,疗程4周。在治疗14天后,通过CD31和 α -SMA荧光染色法检测氨氯地平对大鼠心肌梗死周围区血管新生的影响,同时检测心肌梗死周围区血管新生相关通路VEGF/Akt/eNOS/NO的表达和活化。此外,通过检测治疗7天后大鼠外周血中内皮祖细胞(endo-

thelial progenitor cell, EPC)的表达情况来明确氨氯地平对与血管新生相关的其他因素的影响。最后,通过对治疗4周的大鼠行心脏超声检测来明确氨氯地平对大鼠心肌梗死后心功能的影响。

1.3 心肌梗死模型的制备及分组

180~200 g SPF大鼠用地西洋联合氯胺酮1:1混合麻醉后,气管插管,呼吸机辅助通气。左胸开口,结扎冠状动脉左前降支,超声心动图及肉眼观察证实心肌梗死模型制备成功,大鼠心肌梗死模型死亡率 $< 15\%$ 。随机将大鼠分成对照组(予0.5%羧甲基纤维素钠1 mL/d灌胃治疗)和氨氯地平治疗组[予氨氯地平2 mg/(kg·d)灌胃治疗],每组20只,疗程4周。每周测量大鼠体重,并检测心率和收缩压。

1.4 心肌梗死周围区血管新生的检测

在治疗14天后将大鼠处死($n=5$),取出心脏制成5 μ m冰冻切片。冰冻切片用4%多聚甲醛固定15 min后,按1:200稀释CD31一抗进行标记,4℃过夜。之后用1:200稀释的荧光二抗常温孵育2 h, DAPI染核后用荧光显微镜观察心肌梗死周围区毛细血管密度。部分冰冻切片固定后用1:500稀释的 α -SMA一抗标记,4℃过夜后用1:400稀释的荧光二抗孵育2 h,观察小动脉密度。

1.5 外周血内皮祖细胞检测

于急性心肌梗死术前及术后7天采血($n=8$),用大鼠淋巴细胞分离液密度梯度离心分离外周血单个核细胞。加入CD45、CD133和KDR等三种标记大鼠早期EPC的单克隆抗体各0.5 μ L,避光孵育20 min,清洗后加入相应荧光二抗,避光孵育15 min。加入红细胞裂解液避光孵育10 min后,用BD公司的FACS Calibur流式细胞仪检测外周血CD45^{-low}+CD133⁺KDR⁺早期EPC水平。

1.6 心肌梗死周围区Akt和eNOS磷酸化水平的测定

在治疗14天后将大鼠处死($n=5$),留心肌梗死周围区组织100 mg,匀浆留取上清后,用蛋白裂解液提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,凝胶电泳,转膜。5%脱脂奶粉封闭2 h后,分别用Akt(1:2000稀释)、p-Akt(1:2000稀释)、eNOS(1:1000稀释)、p-eNOS(1:500稀释)、VEGF(1:500稀释)及GAPDH(1:8000稀释)等多克隆抗体4℃孵育过夜,洗膜后加入相应辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的

二抗,常温孵育 2 h,洗膜后加入发光液暗室显影。用 Quantity One 图像分析软件分析,将待测蛋白条带与同一泳道 GAPDH 条带光密度比值或待测蛋白磷酸化条带与待测蛋白总蛋白条带光密度比值作为结果。留取上清用酶联免疫吸附法检测 NO 水平。

1.7 心功能的检测

治疗 4 周后将大鼠麻醉,用二维超声心动图检测大鼠心功能($n = 10$)。将探头放置在胸骨左缘 3~4 肋间,指向左上方显示左心室长轴断面,测量左心室舒张期末内径(left ventricular end-diastolic diameter,LVEDD)和左心室收缩期末内径(left ventricular end-systolic diameter,LVESD),舒张期末和收缩期末室间隔厚度(interventricular septal thickness,IVST),舒张期末和收缩期末左心室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness,LVPWT),左心室

缩短分数(left ventricular fractional shortening,LVFS)和左心室射血分数(left ventricular systolic ejection fraction,LVEF)等参数。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠基本生理情况

入组时两组间大鼠的体重、心率和收缩压水平均无统计学差异。心肌梗死后,氨氯地平治疗组和对照组大鼠的心率、收缩压均有所下降,但组间仍无明显差异(表 1)。

表 1. 大鼠基本情况($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 1. Characteristic changes of rats

分 组	体重 (g)			心率 (beat/min)			收缩压 (mmHg)		
	术前	术后 14 天	术后 28 天	术前	术后 14 天	术后 28 天	术前	术后 14 天	术后 28 天
对照组	233.2 \pm 7.7	291.1 \pm 15.7	361.2 \pm 24.4	427.4 \pm 8.8	416.2 \pm 13.8	418.8 \pm 17.6	129.0 \pm 3.3	121.2 \pm 6.8	122.8 \pm 5.6
氨氯地平治疗组	228.9 \pm 9.5	289.0 \pm 14.3	360.7 \pm 22.5	423.4 \pm 11.0	415.2 \pm 18.7	412.6 \pm 17.1	133.2 \pm 6.3	117.4 \pm 9.1	118.0 \pm 4.0

2.2 氨氯地平治疗促进大鼠心肌缺血诱导的血管新生

经氨氯地平治疗后,心肌梗死周围区毛细血管

密度较对照组明显增加(81.3 ± 4.0 比 69.0 ± 5.6 , $P < 0.05$),心肌小动脉密度亦为对照组的 2 倍(11.5 ± 3.5 比 6.2 ± 2.3 , $P < 0.05$;图 1)。

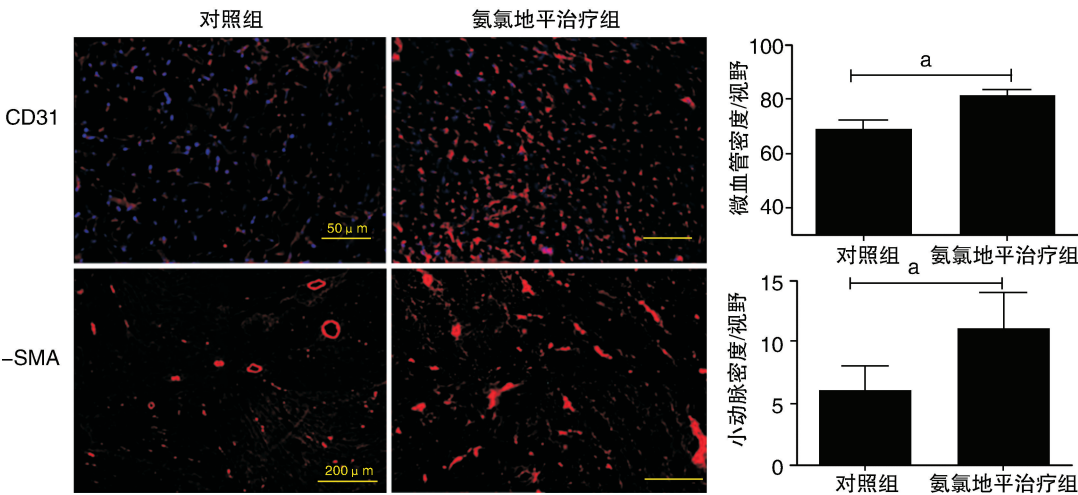


图 1. 大鼠心肌梗死 14 天后梗死周围区毛细血管和心肌小动脉新生情况($n = 5$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

Figure 1. Ischemia-induced blood capillaries and small arteries formation in rats without treatment or treated with amlodipine for 14 days

2.3 氨氯地平治疗促进大鼠心肌缺血诱导的 EPC 动员

在急性心肌梗死术前,氨氯地平治疗组与对照

组大鼠外周血 EPC 数量相近($28.7 \pm 3.0/10^6$ 单核细胞比 $29.5 \pm 3.1/10^6$ 单核细胞, $P > 0.05$)。大鼠急性心肌梗死后予氨氯地平治疗 7 天,外周血 EPC

数量显著高于对照组 ($120.3 \pm 18.3/10^6$ 单核细胞比 $42.5 \pm 6.3/10^6$ 单核细胞, $P < 0.01$)。表明氨氯

地平治疗组大鼠心肌梗死后血管新生增强与其外周血 EPC 增多有关(图 2)。

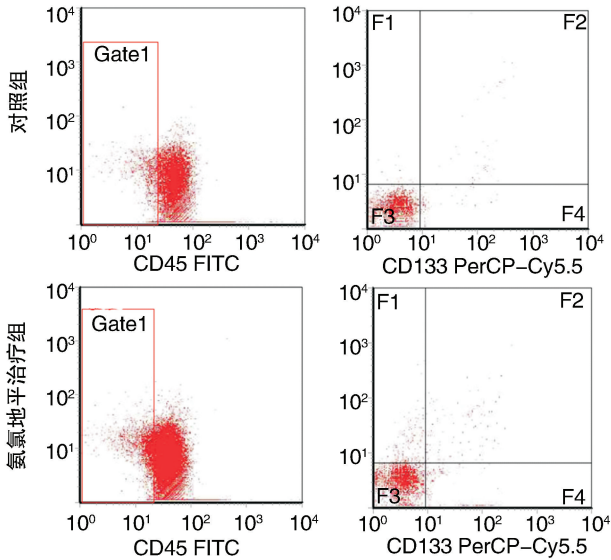
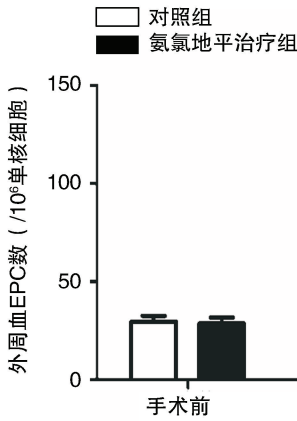


图 2. 大鼠急性心肌梗死术前和术后 7 天外周血 EPC 水平变化及术后 7 天流式细胞仪检测($n=8$) a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。
Figure 2. Circulating EPC count pre-operation and on day 7 post-operation as well as the detection of flow cytometry on day 7 post-operation

2.4 氨氯地平治疗改善大鼠缺血组织 VEGF/Akt/eNOS/NO 信号通路的活化

蛋白免疫印迹结果显示,氨氯地平治疗 14 天后,可显著改善心肌梗死大鼠梗死周围区 VEGF、p-Akt 及 p-eNOS 的表达。酶联免疫吸附法结果亦显示,心肌梗死大鼠经氨氯地平治疗后心肌 NO 的表达也明显升高(表 2)。

表 2. 氨氯地平治疗 14 天后梗死周围区 VEGF、p-Akt 和 p-eNOS 的表达及一氧化氮水平($n=5$)

Table 2. The expression of VEGF, p-Akt and p-eNOS and the level of NO in the border zone of infarction 14 days after myocardial infarction

指 标	对照组	氨氯地平治疗组
VEGF/GAPDH	0.71 ± 0.10	0.47 ± 0.08 ^a
p-Akt/Akt	1.14 ± 0.13	0.58 ± 0.07 ^b
p-eNOS/eNOS	0.68 ± 0.07	0.39 ± 0.02 ^b
NO (μmol/g)	1.87 ± 0.74	2.33 ± 0.82 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.5 氨氯地平治疗可明显改善大鼠心肌梗死后心功能

与对照组相比,急性心肌梗死大鼠经氨氯地平治疗后左心室心肌收缩功能得到明显改善,表现为 LVESD 降低 ($P < 0.05$), LVEF 和 LVFS 升高 ($P < 0.01$),而其他指标如 LVEDD、收缩期末 IVST、舒张

期末 IVST、舒张期末 LVPWT、收缩期末 LVPWT 在两组间则无显著差别(表 3)。

表 3. 氨氯地平对心肌梗死 4 周后大鼠心脏结构及功能的影响($n=10$)

Table 3. Effects of amlodipine on cardiac structure and function 4 weeks after myocardial infarction in rats

指 标	对照组	氨氯地平治疗组
LVEDD(mm)	7.52 ± 0.68	7.13 ± 0.77
LVESD(mm)	5.46 ± 0.47	4.94 ± 0.31 ^a
舒张期末 IVST(mm)	1.18 ± 0.36	1.37 ± 0.29
收缩期末 IVST(mm)	1.55 ± 0.43	1.78 ± 0.38
舒张期末 LVPWT(mm)	1.98 ± 0.35	2.15 ± 0.46
收缩期末 LVPWT(mm)	2.81 ± 0.83	3.12 ± 0.67
LVEF	54.5% ± 3.8%	67.4% ± 3.2% ^b
LVFS	25.9% ± 2.4%	36.7% ± 3.1% ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

3 讨 论

在急性心肌梗死后,心肌梗死面积的大小、心室重构的程度以及心功能的改变与缺血区血管新生和侧枝循环的水平相关。血管新生对于心肌梗死后心功能的保护体现在如下两点:一方面,解除缺血是防止缺血钝抑心肌坏死和凋亡以及减少梗死面积的最重要的手段^[5-7]。另一方面,非缺血区的血管新生对于增加正常心肌细胞的氧供,抑制心肌细胞代偿性肥大之后所出

现的凋亡有着重要作用。本研究中,氨氯地平可以显著增加大鼠心肌梗死后梗死周围区毛细血管及小动脉的数量,同时增加外周血 EPC 水平并促进靶组织 VEGF/Akt/eNOS/NO 信号通路的活化,最终改善大鼠心肌梗死后心功能。

新近研究显示,心肌缺血后会释放许多信号分子,促进损伤处 VEGF 的表达及释放^[8]。增多的 VEGF 与细胞表面受体结合后激活 PI3K/Akt 信号通路,进而使 eNOS 酶活性增强,增加血管内皮合成与释放 NO,从而在组织缺血损伤后的内皮修复及血管新生过程中发挥重要作用^[9,10]。氨氯地平作为有心脏保护作用的钙离子拮抗剂,已被证明可以通过分离与质膜微囊中的小凹蛋白结合的 eNOS 来加强 VEGF 诱导的 NO 释放^[11,12]。同时,氨氯地平还被证明可以促进心肌细胞中 PI3K/Akt 通路的活化^[13]。我们的实验结果也证实氨氯地平治疗 14 天后可显著增加大鼠心肌梗死周围区 VEGF 的表达以及 Akt, eNOS 的活化,同时增加 NO 的释放,进而修复损伤内皮,诱导血管新生及侧支形成,增加局部血流。

此外,血管阻塞后侧枝循环的形成,不仅仅依赖于局部血管的出芽,血液循环中骨髓来源 EPC 也参与这个过程^[14]。心肌损伤后,骨髓中 EPC 会动员至外周血并归巢至缺血心肌,参与损伤内皮的修复^[15,16],同时亦促进缺血区血管新生,增加缺血周围区血供,最终减小心肌梗死面积,改善心肌梗死后心功能和心室重构^[17]。在本研究中我们也发现应用氨氯地平治疗 7 天可显著增加循环中 EPC 数量,显示出 EPC 在氨氯地平促进心肌梗死后血管新生中的重要作用。

为观察氨氯地平对心肌梗死后心功能的影响,本研究选取 LVFS 和 LVEF 作为反映左心室收缩功能的指标,发现心肌梗死大鼠服用氨氯地平后,心肌梗死周围区血管密度显著增加的同时,LVEF 和 LVFS 较对照组亦有明显改善,说明氨氯地平可以通过增加心肌缺血区血管新生来保护糖尿病大鼠心肌梗死后左心室收缩功能^[17]。此外,超声心动图也显示氨氯地平治疗组大鼠心肌梗死后 LVESD 明显降低,表明氨氯地平也可以减轻心肌梗死后失代偿性的心室扩张,改善心肌重构。

参考文献

- [1] Xu B, Li XH, Gao L, et al. Amlodipine, but not verapamil or nifedipine, dilates rabbit femoral artery largely through a nitric oxide- and kinin-dependent mechanism[J]. Br J Pharmacol, 2002, 136 (3): 375-382.
- [2] Mendoza MG, Robles HV, Romo E, et al. Nitric oxide-dependent neovascularization role in the lower extremity disease[J]. Curr

- Pharm Des, 2007, 13 (35): 3 591-596.
- [3] Khan NA, Chattopadhyay P, Abid M, et al. Protective effects of amlodipine on mitochondrial injury in ischemic reperfused rat heart[J]. Environ Biol, 2012, 33: 591-595.
- [4] Nissen SE, Tuzcu EM, Libby P, et al. Effect of antihypertensive agents on cardiovascular events in patients with coronary disease and normal blood pressure: the CAMELOT study: a randomised controlled trial[J]. JAMA, 2004, 292 (18): 2 217-225.
- [5] Zhang J, Ding L, Zhao Y, et al. Collagen-targeting vascular endothelial growth factor improves cardiac performance after myocardial infarction[J]. Circulation, 2009, 119: 1 776-784.
- [6] Tuo QH, Zeng H, Stinnett A, et al. Critical role of angiopoietins/Tie-2 in hyperglycemic exacerbation of myocardial infarction and impaired angiogenesis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294: H2 547-557.
- [7] Virag JA, Rolle ML, Reece J, et al. Fibroblast growth factor-2 regulates myocardial infarct repair: effects on cell proliferation, scar contraction, and ventricular function[J]. Am J Pathol, 2007, 171: 1 431-440.
- [8] Poynter JA, Manukyan MC, Wang Y, et al. Systemic pretreatment with dimethylxalylglycine increases myocardial HIF-1 α and VEGF production and improves functional recovery after acute ischemia/reperfusion[J]. Surgery, 2011, 150 (2): 278-283.
- [9] 董莉, 刘莹, 沈宇, 等. 胰岛素对糖尿病小鼠缺血诱导的血管新生障碍的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (9): 691-695.
- [10] Thirunavukkarasu M, Juhasz B, Zhan L, et al. VEGFR1 (Flt-1 + / -) gene knockout leads to the disruption of VEGF-mediated signaling through the nitric oxide/heme oxygenase pathway in ischemic preconditioned myocardium[J]. Free Radic Biol Med, 2007, 42 (10): 1 487-495.
- [11] Sharma A, Trane A, Yu C, et al. Amlodipine increases endothelial nitric oxide release by modulating binding of native eNOS protein complex to caveolin-1[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 659 (2-3): 206-212.
- [12] Batova S, DeWever J, Godfraind T, et al. The calcium channel blocker amlodipine promotes the unclamping of eNOS from caveolin in endothelial cells[J]. Cardiovasc Res, 2006, 71 (3): 478-485.
- [13] Li XQ, Cao W, Li T, et al. Amlodipine inhibits TNF- α production and attenuates cardiac dysfunction induced by lipopolysaccharide involving PI3K/Akt pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2009, 9 (9): 1 032-041.
- [14] 肖坚, 肖振军, 彭军. 内脏脂肪素对内皮祖细胞血管形成能力的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19 (10): 1 502-505.
- [15] 张美华, 张艳萍, 盖凌, 等. 内皮祖细胞临床应用的研究进展[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2012, 32 (4): 356-360.
- [16] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. N Engl J Med, 2003, 348: 593-600.
- [17] Thal MA, Krishnamurthy P, Mackie AR, et al. Enhanced angiogenic and cardiomyocyte differentiation capacity of epigenetically reprogrammed mouse and human endothelial progenitor cells augments their efficacy for ischemic myocardial repair[J]. Circ Res, 2012, 111: 180-190.

(此文编辑 文玉珊)