论著

文章编号:1000-5404(2006)09-0916-03

阿司匹林对大鼠缺血心肌血管生成及内皮祖细胞动员的影响

周 健,黄 岚,晋 军,武晓静,方玉强,宋明宝,赵 刚,赵晓辉,周音频 (第三军医大学新桥医院全军心血管内科中心,重庆 400037)

提 要: 目的 观察阿司匹林对大鼠缺血心肌血管生成和内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)动员的影响和可能机制。**方法** 实验大鼠分为正常对照组、假手术组、心肌缺血加大剂量阿司匹林组、心肌缺血加小剂量阿司匹林组和单纯心肌缺血组。心肌缺血组和假手术组于术后一周从心腔内取血测血管内皮生长因子(VEGF),外周血分离单个核细胞培养计数EPCs,28 d后取缺血区心肌免疫组化法测毛细血管密度。**结果** 单纯心肌缺血组和假手术组与正常对照组相比,血浆VEGF显著增多[(101.51±16.97)、(94.67±11.78) *vs* (80.07±10.32),($P<0.05$)];心肌缺血加小剂量阿司匹林组与正常对照组相比,外周血EPCs显著增多[(42±7) *vs* (20±6),($P<0.05$)];单纯心肌缺血组与正常对照组相比,毛细血管密度显著增加[(600±104) *vs* (431±73),($P<0.05$)];大剂量阿司匹林抑制了因缺血导致的VEGF、EPCs和毛细血管密度的增加分别由缺血时的(101.51±16.97)、(46±9)、(600±104)降至(70.76±10.15)、(23±6)、(431±80),($P<0.05$)。**结论** 大剂量阿司匹林可通过抑制VEGF的表达,抑制大鼠缺血心肌的血管生成和因缺血和损伤导致的EPCs的动员。

关键词: 心肌缺血;阿司匹林;血管生成;内皮祖细胞;大鼠

中图法分类号: R322.11; R364.12; R971.1 **文献标识码**: A

Effect of aspirin on angiogenesis and endothelial progenitor cell mobilization in rat ischemic myocardium

ZHOU Jian, HUANG Lan, JIN Jun, WU Xiao-jing, FANG Yu-qiang, SONG Ming-bao, ZHAO Gang, ZHAO Xiao-hui, ZHOU Yin-pin (Department of Cardiology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of aspirin on angiogenesis and endothelial progenitor cell mobilization in rat ischemic myocardium. **Methods** SD female rats were randomly divided into 5 groups: control group, sham operation group, only myocardial ischemia group, myocardial ischemia + aspirin of large dose (60 mg·kg^{-1}·d^{-1}) group and myocardial ischemia + aspirin of small dose (5 mg·kg^{-1}·d^{-1}) group. On postoperative day 7, endothelial progenitor cells (EPCs) and plasma VEGF were measured. On postoperative day 28, capillary densities were also detected in ischemic myocardium and normal myocardium of left ventricle. **Results** In only myocardial ischemia group and sham operation group, plasma VEGF [(101.51±16.97) and (94.67±11.78) *vs* (80.07±10.32), $P<0.05$] and EPCs [(46±9) and (38±8) *vs* (20±6), $P<0.05$] increased on the baseline of normal controls. In myocardial ischemia + aspirin of small dose group, EPCs increased more than that of control group [(42±7) *vs* (20±6), $P<0.05$]. In only myocardial ischemia group, capillary densities increased as compared with that of control group [(600±104) *vs* (431±73), $P<0.05$]. The increase of plasma VEGF, EPCs and capillary densities after myocardial ischemia was inhibited by large-dose aspirin but not by small-dose aspirin. **Conclusion** Aspirin of large dose (60 mg·kg^{-1}·d^{-1}) can inhibit angiogenesis and endothelial progenitor cell mobilization by attenuating VEGF in rat ischemic myocardium.

Key words: myocardial ischemia; aspirin; angiogenesis; endothelial progenitor cell; rat

阿司匹林已广泛用于缺血性心脏病的抗血栓治疗,减少缺血性心脏病的病死率。但有研究表明阿司匹林可以明显减少心脏病患者血液中VEGF的含量[1],还可以抑制肿瘤和血管生成性视网膜疾病的血管生成[2,3]。心肌血管生成是心肌保护的重要机制之一,心肌梗死的修复过程也与血管的状态密切相关,梗死区内是否有血管迅速生成,对于心肌梗死后建立良好的侧支循环以改善梗死区血液供应及梗死区心肌

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30270568)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30270568)

作者简介:周 健(1964-),男,四川省遂宁市人,博士研究生,主治医师,主要从事冠心病方面的研究。电话:13648388001

通讯作者:黄 岚,电话:(023)68755601

收稿日期:2005-10-24;**修回日期**:2006-03-24

的存活均具有非常重要的意义。已知 VEGF 在血管生成和 EPCs 动员、归巢中起重要作用[4]。为此,我们推测阿司匹林可能对心肌血管生成和 EPCs 的动员有影响。本研究观察了不同剂量的阿司匹林对缺血心肌血管生成和 EPCs 的动员的作用并为阿司匹林在缺血性心脏病合理应用提供研究证据。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

FITC 标记的荆豆凝集素 I(FITC-UEA-I)购自美国 Sigma 公司;DiI 标记的乙酰化低密度脂蛋白(acLDL-DiI)购于美国 Molecular Probe 公司;阿司匹林原料药由西南制药有限公司赠送;大鼠淋巴细胞分离液 LS-1083 购自中国医学科学院生物医学工程研究所;抗大鼠 CD31 抗体购自武汉博士德生物医学公司;抗大鼠 VEGF 抗体购自晶美生物工程公司;优级胎牛血清购自美国 HyClone 公司。

1.2　方法

1.2.1　大鼠心肌梗死模型的建立　　48 只 SD 雌性大鼠,体质量 220 ~ 270 g(购于第三军医大学实验动物中心),用乙醚吸入麻醉,左正中旁切开皮肤,于 3 ~ 4 肋间,心脏搏动最明显处,用止血钳撑开胸腔,挤压出心脏,在左心耳与肺动脉圆锥间于左心耳下 1 mm 处用带线的无损伤缝合针穿过左冠脉前降支结扎,然后迅速将心脏复位,关闭胸腔,行胸外挤压恢复自主呼吸,以上手术均在严格无菌条件下进行。术后肌肉注射青霉素钠 40×10^4 U/d,连续 3 d 抗感染。以心电图肢体导联 ST 段弓背向上抬高持续 30 min 以上作为梗死模型建立成功的标志。假手术组:16 只 SD 雌性大鼠,只在冠脉下穿线,不结扎冠脉,其余步骤相同。

1.2.2　实验分组　　将 SD 雌性大鼠随机分为心肌缺血加大剂量阿司匹林组(60 mg · kg^{-1} · d^{-1}),心肌缺血加小剂量阿司匹林组(5 mg · kg^{-1} · d^{-1})[5,6],单纯心肌缺血组,假手术组和正常对照组(每组各 16 只)。阿司匹林组于术前 3 d 给阿司匹林灌胃,1 次/d,直至术后 1 周。

1.2.3　EPCs 的分离、培养、鉴定及计数　　术后 7 d 的动物,通过心腔内抽血,肝素抗凝,分离少量血浆后按照参考文献[7 -10]方法进行。

1.2.4　毛细血管密度检测　　术后 28 d 的大鼠,处死后,肉眼可以判断左心室梗死区为薄层的苍白区,其周围为缺血区,取梗死周围 2 mm 缺血区的心肌,用 10% 甲醛固定,以抗大鼠 CD31 抗体和 ABC 试剂盒免疫组织化学方法检测内皮细胞,伊红 Y 复染以鉴别心肌细胞[11],同时 HE 染色,判断心肌缺血情况。口径小于 25 μm 被看作毛细血管,与邻近的微血管、炎症组织或心肌细胞明显区分的任何棕染的内皮细胞和内皮细胞丛都被看成一个可计数的毛细血管。用光学显微镜计数每 200 倍视野中的毛细血管数,每一个切片,选择不同的 4 个视野,取平均值,以毛细血管数/视野表示毛细血管密度。

1.2.5　血浆 VEGF 的检测　　采用双抗体夹心酶联免疫分析技术检测血浆 VEGF,单位为 pg/ml。

1.3　统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$,对资料进行正态分布检验,每组间资料的比较用 q 检验。

2　结果

2.1　各组血浆 VEGF 的变化

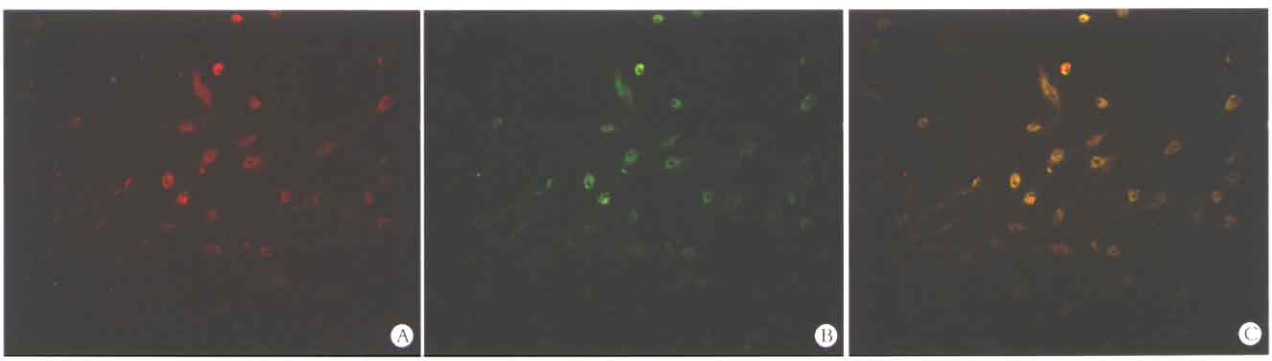
单纯心肌缺血组(101.51 ± 16.97)、假手术组(94.67 ± 11.78)、心肌缺血加小剂量阿司匹林组(87.91 ± 7.79)与心肌缺血加大剂量阿司匹林组(70.76 ± 10.15)比较,血浆 VEGF 明显增高($P < 0.05$)。单纯心肌缺血组、假手术组与正常对照组(80.07 ± 10.32)比较,血浆 VEGF 也显著增高($P < 0.05$)。其余之间比较无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2　不同组间心肌毛细血管的变化

单纯心肌缺血组(600 ± 104)与假手术组(471 ± 69)、正常对照组(431 ± 73)比较,心肌毛细血管密度明显增加($P < 0.05$),而心肌缺血加大剂量阿司匹林组(431 ± 80)与单纯心肌缺血组比较毛细血管密度显著减少($P < 0.05$),其余之间比较无显著性差异($P > 0.05$)。

2.3　EPCs 的形态、染色鉴定结果及各组 EPCs 的变化

EPCs 的形态及染色鉴定见图 1,可见培养 7 d 贴壁的对 acLDL-DiI 的摄取呈红色荧光,与 FITC-UEA-I 结合为绿色荧光的双染阳性梭形样细胞即为正在分化 EPCs;与正常对照组(20 ± 6)比较,单纯心肌缺血组(46 ± 9)、心肌缺血加小剂量阿司匹林组(42 ± 7)、假手术组(38 ± 8)EPCs 明显增多($P < 0.05$);心肌缺血加大剂量阿司匹林组(23 ± 6)与单纯心肌缺血组、心肌缺血加小剂量阿司匹林组、假手术组比较 EPCs 明显减少($P < 0.05$),其余各组比较无显著性差异。



A: DiI 标记的乙酸化低密度脂蛋白(acLDL-DiI); B: FITC 标记的荆豆凝集素 I(FITC-UEA-I); C: acLDL-DiI 和 FITC-UEA-I 双染色

图 1　外周血分离的单个核细胞培养 7 d 后的贴壁细胞正在分化的 EPCs 形态　(倒置显微镜 ×200)

3 讨论

氧化酶(COX)与心血管疾病的关系越来越受到重视,COX2 抑制剂对心血管危害性已基本肯定[12],阿司匹林是被广泛用于缺血性心脏病治疗的唯一一个 COX 抑制剂,它的抗血小板作用是其对 COX1 的抑制发挥作用的,但它对 COX2 也有抑制作用。阿司匹林明显减少心脏病患者血液中 VEGF 的含量[1],抑制肿瘤和血管生成性视网膜疾病的血管生成[2,3],这些作用有可能对缺血性心脏病产生不良影响。

本研究表明单纯心肌缺血、假手术都可以导致大鼠血浆中 VEGF 明显增高,而心肌缺血加大剂量阿司匹林后血浆 VEGF 无明显变化,心肌缺血加小剂量阿司匹林后血浆 VEGF 却仍明显增高。单纯心肌缺血组和假手术组明显增高,说明假手术的手术创伤和心肌缺血都可以导致 VEGF 的释放增多,此研究结果与其他研究者研究吻合[13],而心肌的缺血损伤导致 VEGF 的释放与假手术组相比有增多趋势,但没有显著性差异可能是与样本数较少有关。大剂量阿司匹林对心肌缺血导致的 VEGF 的增加有抑制作用,而小剂量的阿司匹林虽然有减少 VEGF 的趋势但抑制作用不显著。缺血、组织损伤导致的 VEGF 的增加原因尚不清楚,部分研究证实 VEGF 是低氧诱导因子-1α(HIF-1α)的下游基因,缺血缺氧可导致 HIF-1α 的表达上调从而调节 VEGF 的表达增加,引起 VEGF 释放的增多,因此,缺血导致的 VEGF 的增加可能与 HIF-1α 的表达上调有关,组织损伤也可能导致缺血,其 VEGF 的增加也可能与 HIF-1α 的表达上调有关,但损伤时炎性细胞因子也有可能起作用。大剂量阿司匹林抑制 VEGF 的作用加强可能与大剂量阿司匹林主要抑制 COX2 有关。因为有研究表明心肌缺血时 COX2 的表达是增加的[14],COX2 的表达可以导致 VEGF 的表达增加[15]。

已经证实 VEGF 与血管生成和 EPCs 的动员明显相关[4],因此我们观察了阿司匹林是否像在肿瘤血管生成中一样对缺血心肌的血管生成起作用以及对 EPCs 的动员也有作用。我们的研究结果表明心肌缺血可以明显诱导毛细血管增生和 EPCs 向外周血动员,此外,组织损伤也可以动员 EPCs,而给予大剂量阿司匹林处理后明显抑制这种诱导的毛细血管的增生和 EPCs 向外周血的动员,小剂量阿司匹林却无明显的影响。观察 VEGF 的变化和与血管生成、EPCs 的关系,可见心肌缺血和组织损伤导致的 EPCs 的增加与心肌缺血导致的毛细血管的增生、VEGF 的表达增加有关,阿司匹林可以抑制缺血心肌的血管生成和 EPCs 的动员,提示这种作用可能是通过影响 VEGF 而起作用。小剂量阿司匹林对血管生成和 EPCs 动员无明显影响可能是这种作用还没达到一定的程度,或者可能是因为小剂量阿司匹林主要是抑制 COX1,而大剂量阿司匹林抑制 COX2 的原因。本研究提示:小剂量阿司匹林可能更利于缺血性心脏病的治疗;选择性 COX1 抑制剂可能更有利于缺血性心脏病的治疗。

参考文献:

[1] GERRAH R, FOGEL M, GILON D. Aspirin decreases vascular endothelial growth factor release during myocardial ischemia[J]. Int J Cardiol, 2004, 94(1): 25 - 29.

[2] YOSHIDA S, AMANO H, HAYASHI I, *et al.* COX-2/VEGF-dependent facilitation of tumor-associated angiogenesis and tumor growth in vivo [J]. Lab Invest, 2003, 83(10): 1385 - 1394.

[3] WILSON H L, SCHWARTZ D M, BHATT H R, *et al.* Statin and aspirin therapy are associated with decreased rates of choroidal neovascularization among patients with age-related macular degeneration[J]. Am J Ophthalmol, 2004, 137(4): 615 - 624.

[4] ASAHARA T, TAKAHASHI T, MASUDA H, *et al.* VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells[J]. EMBO J, 1999, 18(14): 3964 - 3972.

[5] 邱丽颖,余 涓,陈崇宏,等. 阿司匹林对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(2): 177 - 180.

[6] 张 伟,吴本俨,王孟薇. 小剂量阿司匹林胃粘膜损伤与 TNF-α 的表达分析[J]. 北京医学, 2004, 26(3): 186 - 188.

[7] HILL J M, ZALOS G, HALCOX J P, *et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk[J]. N Engl J Med, 2003, 348(7): 593 - 600.

[8] KALKA C, MASUDA H, TAKAHASHI T, *et al.* Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(7): 3422 - 3427.

[9] DIMMELER S, AICHER A, VASA M, *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway[J]. J Clin Invest, 2001, 108(3): 391 - 397.

[10] VASA M, FICHTLSCHERER S, AICHER A, *et al.* Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease[J]. Circ Res, 2001, 89(1): E1 - E7.

[11] HO H K, JANG J J, KAJI S, *et al.* Developmental endothelial locus-1(Del-1), a novel angiogenic protein: its role in ischemia [J]. Circulation, 2004, 109(10): 1314 - 1319.

[12] HOWARD P A, DELAFONTAINE P. Nonsteroidal anti-Inflammatory drugs and cardiovascular risk[J]. J Am Coll Cardiol, 2004, 43(4): 519 - 525.

[13] 张 翼,祁述善,周胜华,等. 急性心肌梗死患者血管内皮生长因子的动态表达[J]. 中国医师杂志, 2003, 5(3): 340 - 341.

[14] SAITO T, RODGER I W, HU F, *et al.* Inhibition of COX pathway in experimental myocardial infarction[J]. J Mol Cell Cardiol, 2004, 37(1): 71 - 77.

[15] CHANG S H, LIU C H, WU M T, *et al.* Regulation of vascular endothelial cell growth factor expression in mouse mammary tumor cells by the EP2 subtype of the prostaglandin E2 receptor[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2005, 76(1 - 4): 48 - 58.

(编辑 薛国文)