论著

文章编号:1000-5404(2010)14-1542-04

碱性成纤维细胞生长因子及其受体在心肌梗死心脏组织中的分布

徐云云[1],肖践明[2],张瑞云[2],张 敏[2],杨百晖[3] (650032 昆明,昆明医学院第一附属医院:干疗科[1],心内科[2],心外科[3])

[摘要] **目的** 研究碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)及其受体(fibroblast growth factor receptor-1,FGFR-1)在正常及心肌梗死后心脏组织中的分布和变化情况,探讨bFGF在心肌梗死中对心脏的保护作用。**方法** 普通级正常成年西双版纳微型猪11只,实验组($n=6$)通过结扎成年微型猪的左冠状动脉前降支建立心肌梗死模型,对照组($n=5$)模拟开胸手术过程,但不结扎冠状动脉,4周后取出心脏,采用免疫组化法和图像分析方法检测2组实验动物心脏组织中bFGF和FGFR-1的水平。**结果** ①正常对照组的心房心肌细胞内bFGF和FGFR-1的蛋白表达水平高于心室($P<0.05$)。②心肌梗死后,实验组左右室心肌组织的bFGF水平明显高于对照组($P<0.05$),而以受累左室的增加最为明显。同时,受累左心室中的FGFR-1较对照组也升高($P<0.01$),且以梗死边缘区最为显著($P<0.01$)。③梗死区周围组织中的血管内皮细胞、平滑肌细胞内bFGF和FGFR-1表达较对照组增多($P<0.05$)。**结论** 心肌梗死后受累部位心肌bFGF明显增多,同时FGFR-1显著上调,推测bFGF在心肌梗死后的心脏血管新生、侧支循环建立、组织修复、心脏重构及改善心肌梗死预后方面可能起重要作用。

[关键词] 成纤维细胞生长因子2;受体,成纤维细胞生长因子,1型;心肌梗死;免疫组织化学;猪

[中图法分类号] R542.22;R341;R446.8 **[文献标志码]** A

Distribution of basic fibroblast growth factor and its receptor in minipig heart after myocardial infarction

Xu Yunyun[1], Xiao Jianming[2], Zhang Ruiyun[2], Zhang Min[2], Yang Baihui[3] ([1]Department of Cadre Treatment, [2]Department of Cardiology, [3]Department of Cardiac Surgery, First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming, Yunnan Province, 650032, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the distribution and changes of basic fibroblast growth factor (bFGF) and fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1) in normal heart or heart after myocardial infarction (MI), and to explore beneficial effects of bFGF on heart after MI. **Methods** Eleven adult minipigs were randomly divided into 2 groups, control ($n=5$) and MI group ($n=6$). MI was induced by ligating the left anterior descending coronary artery. Sham-operation was carried out on the animals of control. bFGF-like-immunoreactivity (bFGF-ir) and FGFR-1-like-immunoreactivity (FGFR-1-ir) in heart tissues were detected by immunohistochemistry and image analysts in 4 weeks after surgery. **Results** In controls, bFGF-ir and FGFR-1-ir in the atrium showed a considerable high level compared with 2 ventricles ($P<0.05$). In the minipigs after MI, the levels of bFGF-ir and FGFR-1-ir in the left ventricle was significantly increased ($P<0.05$), especially in the area near to MI ($P<0.01$). The levels of bFGF-ir and FGFR-1-ir in the vascular endothelial cells (VEC) and vascular smooth muscle cells (VSMC) adjacent to the infarcted region also significantly increased compared with those in the controls ($P<0.05$). **Conclusion** bFGF and FGFR-1 mostly localize in the atrium in normal heart, and they significantly increase in the infarcted region after MI. The results suggest that bFGF might play an important pathophysiological role in neovascularization, collateral growth, tissue recovery and cardiac remodeling after MI.

[Key words] fibroblast growth factor 2; receptor, fibroblast growth factor, type 1; myocardial infarction; swine; immunohistochemistry

Corresponding author: Xu Yunyun, Tel:86-871-5324888-2605, E-mail:xuyunyun09@126.com

[通信作者] 徐云云,电话:(0871)5324888-2605,E-mail:xuyunyun09@126.com

碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)既具有促进细胞分化、发育、迁移、增殖、血管生成等与丝裂作用有关的生物学效应,同时还具有抑制细胞凋亡、促进 NO 生成、拮抗心肌细胞损伤等非丝裂效应[1,2]。在心血管系统中, bFGF 存在于心肌细胞、非心肌细胞的细胞质、胞核和细胞外基质中,血管内皮细胞、平滑肌细胞、心肌细胞、巨噬细胞均有合成 bFGF 的能力。缺血、缺氧等损伤刺激可以使其从细胞内和细胞外基质中释放出来,并通过与细胞表面的特异性高亲和性成纤维细胞生长因子受体(fibroblast growth factor receptors,FGFRs)结合而实现其生物学作用,其中 FGFR-1 与 bFGF 的亲和性最高,是其发挥作用的主要受体,也是存在于胚胎和成年心肌中唯一高亲和性受体。研究证实 bFGF 可促进心肌梗死后心脏血管再生和侧支循环的建立,改善心肌血供,缩小心肌梗死面积[3,4],同时拮抗心肌缺血再灌注损伤,调节细胞外基质代谢,促进损伤血管内皮再生修复等[5,6]。因此,bFGF 对改善冠心病心肌梗死后心脏重构以及预防血管成形术后再狭窄等方面起着重要的作用,成为近年来受到广泛重视的治疗心肌梗死的生长因子。然而,由于 bFGF 生物学效应的广泛性和复杂性,目前仍有许多问题未能阐明,其中之一是内源性 bFGF 在心肌梗死后的确切改变及其调控等问题还不完全清楚。本实验对正常和心肌梗死后心脏各房室中 bFGF 和 FGFR-1 的分布及改变进行研究,以此进一步探讨 bFGF 在心肌梗死后对心脏的保护效应。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 普通级正常成年西双版纳微型猪,年龄 8~15 个月(平均 11.6 个月),雄性 8 只,雌性 3 只,体质量 23~49 kg(平均 32.5 kg),由云南农业大学育种系提供。

1.1.2 试剂和仪器 bFGF 多克隆抗体(Cat. No. AB1458,美国 Chemicon 公司)。FGFR-1 多克隆抗体(SC-121,美国 Santa Cruz 公司)。链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫组化染色超敏试剂盒(Ultra Sensitive™,S-P kit,福州迈新生物试剂有限公司,产品编号 KIT-9720)。Mias-2000 图像分析系统(四川大学图像所研制)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及分组 将 11 只猪用单纯随机抽样方法分配为实验组($n=6$)及对照组($n=5$)。手术时用氯胺酮、安定、芬太尼作静脉麻醉。实验组开胸后切开心包暴露心脏,分离冠状动脉左前降支,用无创针带 2/0 锦纶单线在其中下 1/3 交界处部分结扎,观察 20 min 如未出现恶性心律失常,则行完全结扎,然后关闭胸腔。对照组除不结扎冠状动脉外,其余手术步骤同实验组。4 周后再次开胸,取出心脏,迅速称量,然后从左心房(LA)、右心房(RA)、右心室(RV)、左心室梗死中心(LVMIC)、梗死边缘区(LVMIB)及非梗死区(LVN)各取数块组织放入 10% 甲醛溶液中固定,石蜡包埋。对照组分别取左右心房及左右心室组织固定包埋。

1.2.2 HE 染色 常规石蜡切片,行 HE 染色,以观察心脏各房室的病理改变。

1.2.3 免疫组织化学染色及图像分析 免疫组化染色操作按 S-P 试剂盒说明书进行,行 bFGF 和 FGFR-1 免疫组化染色后,各组免疫组化切片应用 Mias-2000 图像分析系统对阳性反应产物进行半定量检测分析。每张切片在 400 倍放大下,随机选 10 个位点测量 bFGF 或者 FGFR-1 免疫组化染色灰度值,然后取其平均值。灰度值越小表示免疫组化染色越深,抗原物质含量越高,反之亦然。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 统计软件用单因素方差分析及两两比较、成组设计两样本均数比较的 t 检验。

2 结果

2.1 动物造模后心脏组织的大体形态和 HE 染色观察

肉眼观察到实验组动物心脏左室前壁靠近心尖处梗死区呈灰白色,壁明显变薄。显微镜下可见大量疤痕组织,有炎性细胞浸润。实验组心脏质量/处死前体质量比值(HW/BW)明显高于对照组[$(5.60 \pm 1.33) \times 10^{-3}$ *vs* $(4.08 \pm 2.17) \times 10^{-3}$, $P<0.05$]。

2.2 免疫组织化学染色

bFGF 和 FGFR-1 阴性对照组未见非特异性染色。

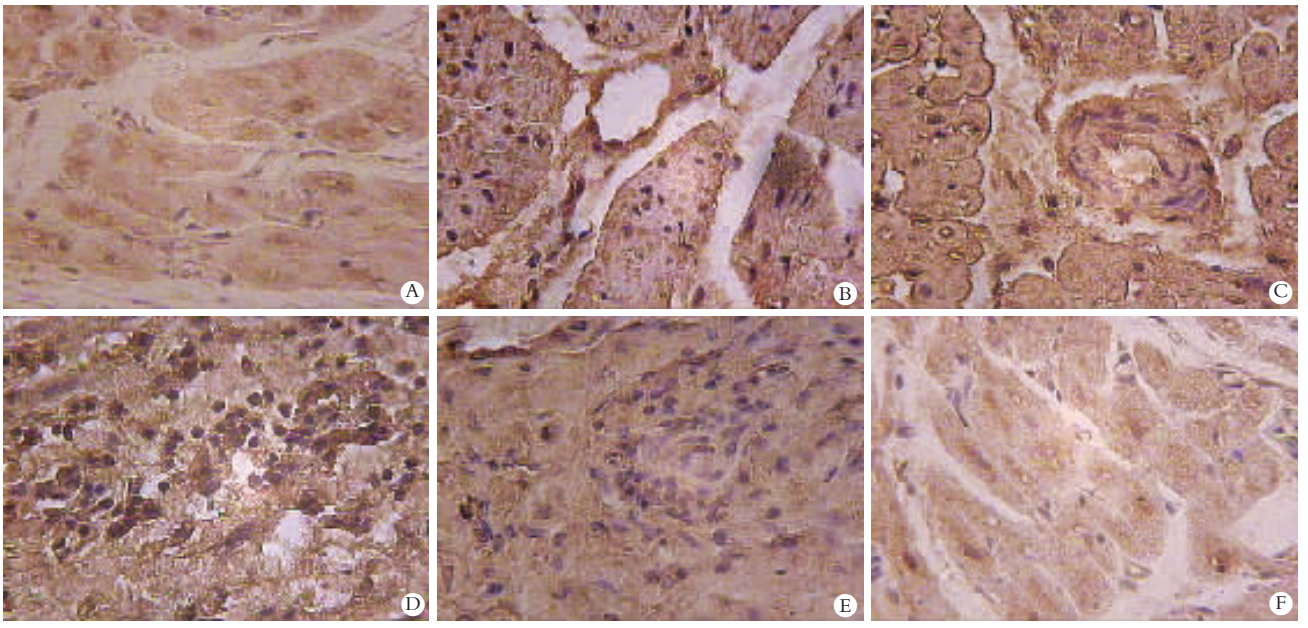
2.2.1 bFGF 表达 对照组各房室心肌细胞染色呈弱阳性、阳性,实验组心肌细胞特异性棕黄色染色比对照组增强,左室尤其受累明显,梗死区及其周围组织中的血管内皮细胞、平滑肌细胞、炎性细胞、纤维细胞染色也呈阳性、强阳性(图 1A~E)。

实验组和对照组各房室心肌细胞内 bFGF 免疫反应产物的灰度值(gray level,GL)比较见表 1。对照组中心房心肌细胞 bFGF 的 GL 值低于心室心肌细胞($P<0.05$),两心房或两心室之间比较无差别($P>0.05$)。实验组左右心室 bFGF 的 GL 值均低于对照组($P<0.05$),其中以受累左心室 3 个部位(梗死中心区、梗死边缘区及非梗死区)bFGF 的 GL 值降低最为明显($P<0.01$),且均低于同组中其他部位的心肌组织($P<0.01$)。

表 1 实验组和对照组各房室心肌细胞内 bFGF 免疫产物的灰度值比较

组别	RA	LA	RV	LVN	LVMIB	LVMIC
对照组	182.82 ± 8.31	178.22 ± 7.01	204.69 ± 8.34^{ab}	202.28 ± 5.13^{ab}	-	-
实验组	185.69 ± 7.32	183.18 ± 6.74	181.93 ± 5.24^{c}	166.59 ± 9.64^{abc}	165.92 ± 7.28^{bc}	164.49 ± 6.63^{bc}

a:$P<0.05$,与 RA 比较;b:$P<0.01$,与 LA 比较;c: $P<0.05$,与对照组比较



A:心肌细胞 bFGF 呈阳性、强阳性表达;B:内皮细胞 bFGF 呈阳性、强阳性表达;C:平滑肌细胞 bFGF 呈阳性、强阳性表达;D:炎性细胞 bFGF 呈阳性表达;E:成纤维细胞 bFGF 呈阳性表达;F:心肌细胞 FGFR-1 呈阳性、强阳性表达

图 1 免疫组织化学观察实验组心脏组织 bFGF、FGFR-1 的表达 (S-P ×400)

表 2 2 组各房室心肌细胞内 FGFR-1 免疫产物的灰度值比较

组别	RA	LA	RV	LVN	LVMIB	LVMIC
对照组	189.83 ± 8.27[ab]	179.83 ±8.04[b]	192.78 ±7.82[ab]	205.32 ±8.66	-	-
实验组	186.11 ± 6.03[c]	190.87 ±7.18[e]	196.60 ±4.62	156.43 ±3.20[ace]	149.01 ±4.76[ace]	158.45 ±4.35[acde]

a: $P<0.05$,与 LA 比较; b: $P<0.05$,与 LVN 比较; c: $P<0.05$,与 RV 比较;d: $P<0.05$,与实验组 LVMIB 比较; e: $P<0.05$,与对照组比较

2.2.2 FGFR-1 表达 对照组与实验组各房室心肌细胞部分呈阳性反应,梗死周围组织中内皮细胞,平滑肌细胞呈阳性、强阳性染色(图 1F)。

2 组各房室心肌细胞 FGFR-1 免疫组化染色的 GL 值比较见表 2。对照组中,左房 GL 值最低,其次是右房和右室,左室最高(除 RA *vs* RV $P>0.05$ 外,其余 $P<0.05$)。实验组中,左室梗死边缘区 GL 值最低,其次是左室非梗死区和梗死中心区。实验组左室各部位 GL 值均比对照组降低($P<0.01$),尤以梗死边缘区显著,左房比对照组升高($P<0.05$),右房和右室与对照组相比无明显升高($P>0.05$)。

2.2.3 左室梗死周围组织中的血管内皮细胞(EC)和平滑肌细胞(SMC)内 bFGF 和 FGFR-1 表达 实验组左室梗死周围组织中的血管内皮细胞(EC)和平滑肌细胞(SMC)内 bFGF 和 FGFR-1 的 GL 值均比对照组 GL 值低($P<0.05$,表 3)。

表 3 对照组和实验组 EC、SMC 内 bFGF 和 FGFR-1 免疫反应产物的灰度值比较 ($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	血管内皮细胞		平滑肌细胞	
	bFGF	FGFR-1	bFGF	FGFR-1
对照组	189.50 ±7.33	191.05 ±7.57	184.37 ±9.90	191.37 ±7.01
实验组	175.72 ±9.04[a]	182.16 ±6.50[a]	171.89 ±5.96 *	182.01 ±8.38[a]

a: $P<0.05$,与对照组比较

3 讨论

本实验建立了猪心肌梗死模型,并且观察至 1 个月时间,较全面了解了内源性 bFGF 在心肌梗死后侧支血管形成和心脏重构等方面的作用。结扎猪冠状动脉 1 个月后,肉眼观察到左室前壁靠近心尖处呈灰白色,壁变薄,显微镜下该处为疤痕组织,有炎性细胞浸润。梗死周围区域心脏壁则明显增厚,心肌梗死后心脏质量/处死前体质量比值(HW/BW)实验组较对照组明显增高。这些现象显示左室前壁发生了透壁性心肌梗死,使室壁变薄,非梗死区则有心肌壁肥厚,心脏发生了重构。

通过测定免疫组化染色灰度值提示:在正常对照组中,bFGF 和 FGFR-1 在心房心肌细胞内含量最高,心室内含量低,这与其他报道相似[7]。这种分布究竟有何生理意义尚不清楚,类似的报道还比较少,需要进一步研究。在实验组中,左右心室内 bFGF 的含量均升高,而以受累左心室(包括梗死中心、梗死边缘区、非梗死区)升高最为明显。同时,受累左心室中的

FGFR-1 也升高,且以梗死边缘区最为显著。这种分布特点推测与 bFGF 对心肌组织的作用密切相关。首先,bFGF 对缺血的心肌有保护作用。研究证实 bFGF 通过 PKCe 促进心肌缝隙连接处的 Cx43 蛋白丝氨酸残基磷酸化,以及减轻心肌组织脂质过氧化和细胞钙超负荷程度等作用来诱导心肌保护效应,抵抗心肌细胞坏死及凋亡[2,8]。其次,bFGF 有促进心肌细胞分化、增殖的作用,它可诱导培养的心肌细胞的基因表达模式由"成熟型"向"胚胎型"转变,引起心肌细胞出现以苯丙氨酸摄入、总细胞蛋白浓度及细胞大小均增加为特征的肥大反应,因此,本实验中受累左室 bFGF 的增多可能与其介导了非梗死区室壁的增厚过程有关。此外,在心肌梗死修复过程中,bFGF 能刺激纤维细胞增殖、移行,促进纤维化和肉芽组织形成,利于组织修复,同时调节胶原含量及Ⅰ、Ⅲ型胶原比例,从而改善细胞间质的重构[9,10]。Scheinowitz 等[11]在大鼠心肌梗死模型上的研究证实了 bFGF 对心脏重构的上述影响,发现心肌梗死后 bFGF 治疗组与未用 bFGF 的心肌梗死对照组相比,左室非梗死区室壁增厚,但是其左室腔内径/非梗死区室壁厚度比值小于对照组,说明左室的扩张不明显,而对照组左室扩大明显。因此,bFGF 虽然介导了心肌肥厚的过程,但最终效应是改善了心脏重构。

本研究还发现心肌梗死 4 周后,梗死周围组织中平滑肌细胞及内皮细胞的 bFGF 和 FGFR-1 蛋白表达水平比对照组升高,可能是因为 bFGF 可刺激血管内皮细胞、平滑肌细胞增殖、移行,诱导心肌缺血区血管新生,提高内皮依赖性和非依赖性血管舒张功能[12,13],从而在促进心肌梗死后心肌血管重塑,侧支循环的建立,以及通过改善心肌血供,挽救濒死心肌,限制和缩小梗死面积来预防和减轻心室重构中起重要作用。这在 Iwakura 等[14,15]的研究中得到了很好的证实,他们在大鼠和猪的心肌梗死模型中运用 bFGF,4 周后发现 bFGF 组心肌毛细血管数量比对照组增多,非梗死区域心肌血流增加,梗死面积缩小,心室收缩能力改善。

心肌梗死与炎性细胞浸润有关,而局部炎症本身也可刺激血管新生,结合本实验中心肌梗死区域炎性细胞对 bFGF 呈阳性反应,推测炎性细胞可能是通过释放 bFGF 等生长因子来发挥刺激新生血管形成的作用。

参考文献:

[1] Beeken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy[J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8 (3): 235 - 251.

[2] Kardami E, Detillieux K, Ma X, *et al*. Fibroblast growth factor-2 and cardioprotection[J]. Heart Fail Rev, 2007, 12(3/4): 267 - 277.

[3] Shao Z Q, Takaji K, Katayama Y, *et al*. Effects of intramyocardial administration of slow-release basic fibroblast growth factor on angiogenesis and ventricular remodeling in a rat infarct model[J]. Circ J, 2006, 70(4): 471 - 477.

[4] Wang Y, Liu X C , Zhao J , *et al* . Degradable PLGA scaffolds with basic fibroblast growth factor: experimental studies in myocardial revascularization [J]. Tex Heart Inst J, 2009, 36 (2): 89 - 97.

[5] Jiang Z S, Srisakuldee W, Soulet F, *et al*. Non-angiogenic FGF-2 protects the ischemic heart from injury, in the presence or absence of reperfusion[J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(1): 154 - 166.

[6] Qian R Z, Yue F, Zhang G P, *et al*. Roles of cyclooxygenase-2 in microvascular endothelial cell proliferation induced by basic fibroblast growth factor [J]. Chin Med J (Engl) , 2008, 121 (24): 2599 - 2603.

[7] 崔建奇, 柳川, 周廷冲, 等. 成纤维细胞生长因子与心血管疾病[J]. 生理科学进展, 1994, 25(1): 76 - 79.

[8] Liu X, Wu X, Cai L, *et al*. Calreticulin downregulation is associated with FGF-2-induced angiogenesis through calcineurin pathway in ischemic myocardium[J]. Shock, 2008, 29 (1): 140 - 148.

[9] 周大燕, 黄晶, 盛娓娓, 等. 成纤维细胞生长因子对大鼠急性心肌梗死后心室重构的影响[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(6): 691 - 694.

[10] Virag J A, Rolle M L, 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(5): 1431 - 1440.

[11] Scheinowitz M, Kotlyar A, Zimand S, *et al*. Basic fibroblast growth factor induces myocardial hypertrophy following acute infarction in rats [J]. Exp Physiol, 1998, 83(5): 585 - 593.

[12] Wang H H, Kung C I, Tseng Y Y, *et al*. Activation of endothelial cells to pathological status by down-regulation of connexin43[J]. Cardiovasc Res, 2008, 79(3): 509 - 518.

[13] Boodhwani M, Voisine P, Ruel M, *et al*. Comparison of vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 in a swine model of endothelial dysfunction[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2008, 33 (4): 645 - 652.

[14] Iwakura A, Fujita M, Kataoka K, *et al*. Intramyocardial sustained delivery of basic fibroblast growth factor improves angiogenesis and ventricular function in a rat infarct model[J]. Heart Vessels, 2003, 18(2): 93 - 99.

[15] 王晓艳, 苏又苏, 苏卓娃, 等. hbFGF 基因治疗心肌梗死的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 7(6): 707 - 709.

(**收稿**:2010-01-06;**修回**:2010-03-05)

(编辑 吴培红)