维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2003)03-0296-04

阈下电刺激促大鼠缺血心肌毛细血管新生的研究

佘 强[1],陈运贞[2]

(1.重庆医科大学第二临床学院心内科,重庆 400010;2.重庆医科大学临床学院心内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨不同频率的阈下电刺激促缺血心肌毛细血管新生的作用及其发生机制。方法:给心肌梗死大鼠发放不同频率的阈下电刺激,观察缺血心肌中毛细血管新生情况,以及血管内皮生长因子(VEGF)的表达、一氧化氮合酶(NOS)活性的变化。结果:(1)25Hz 频率的阈下电刺激组,大鼠缺血心肌中毛细血管密度、VEGF mRNA 及蛋白质表达、NOS 活性均比其它电刺激组及对照组增加。(2)25Hz 频率阈下电刺激基础上加用 VEGF 中和抗体干预后,大鼠缺血心肌毛细血管密度明显减少,NOS 活性降低。(3)25Hz 频率阈下电刺激基础上加用 NOS 抑制剂 L-NAME 干预后,大鼠缺血心肌中 VEGF mRNA 及蛋白质表达没有改变,但毛细血管密度显著减少。结论:25Hz 频率的阈下电刺激可以促进缺血心肌中 VEGF 表达的上调,导致毛细血管新生;NO 可能介导 VEGF 促血管内皮细胞增殖作用。

【关键词】血管新生;电刺激;血管内皮细胞生长因子

【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2002-09-17

The study of angiogenesis induced by electrical stimulation below contraction threshold, in ischemic myocardium

SHE Qiang, et al

(*Department of Cardiology, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the ischemic myocardial angiogenesis induced by electrical stimulation below contraction threshold. *Methods*: 24 infarcted rats were given electrical stimulation below contraction threshold for 5 days with 10Hz, 15Hz, 25Hz, 50Hz stimulus frequencies. 12 other infarcted rats were electrically stimulated with effective stimulus frequency which induced myoardial angiogenesis and treated with VEGF neutralizing antiboby, L-NAME for 5 days. Capillary density(CD), activity of NOS, expression of VEGF mRNA and protein, were detected. *Results*: CD, activity of NOS, expression of VEGFmRNA and protein in ischemic myocardium were significantly augmented in the 25Hz group compared with the other groups. CD and activity of NOS in ischemic myocardium significantly decreased in 25Hz + VEGF neutralizing antibody group compared with that of the 25Hz group. CD in ischemic myocardium significantly decreased in the 25Hz + L-NAME group compared with that of the 25Hz group, but expression of VEGF mRNA and protein were in the absence of changes the 2 groups. *Conclusion*: Myocardial angiogenesis induced by electrical stimulation below contraction threshold at 25Hz frequeney is dependent on the expression of VEGF. Nitric oxide can mediate nitogenic effect of VEGF on capillary endothelial cells.

【Key words】Angiogenesis; Electrical stimulation; Vascular endothelial growth factor

血管新生治疗正成为以心肌缺血为主要特征的冠心病治疗的新方向。近来,有报道发现适当频率的阈下电刺激可以促进缺血的骨骼肌毛细血管新生[1]。但阈下电刺激是否可以促进缺血心肌中的毛细血管新生,尚未见报道。为此,本课题拟观察应用不同频率的阈下电刺激是否有促缺血心肌血管新生的作用,并进一步探讨其发生机制,旨在寻找促进缺血心肌血管新生的简便、实用的新方法。

作者介绍:佘 强(1966-),男,副教授,博士,主要研究方向:冠心病。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Wistar 大鼠 42 只,雄性,250~350g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 引物:参照文献设计 VEGF[2] 及阳性对照 GAPDH[3] 引物,由上海基康公司合成。

维普资讯 http://www.cqvip.com

VEGF

上游引物序列:5′-CCATGAACTTTCTGCTCTCTTG-3′

下游引物序列:5′-GGTGAGAGGTCTAGTTCCCGA-3′

GAPDH

上游引物序列:5'-TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTG-3'

下游引物序列:5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌梗死模型的制作及电极的植入

用戊巴比妥钠(30mg/kg)麻醉大鼠,行胸骨下正中切口,左正中旁切开皮肤,于左肋间近胸骨处打开胸腔,暴露心脏,在动脉起始点下方 2~3mm 处结扎左冠状动脉前降支(LAD)建立心肌梗塞模型,以心电图上 ST 段持续抬高作为模型复制成功的标志。再将两根同样的电极导管(自制)用无损伤缝合针缝置在左心室前壁心肌的心外膜,两电极相距 1cm 左右。然后在大鼠的皮下打一隧道,将两电极导管从大鼠的后背引出。术后腹腔内注射青霉素钠 80 万 V/d,连续 3 天抗感染。

1.2.2 分组及电刺激

将已植入电极的心肌梗死大鼠随机分成 5 组,每组 6 只。参照前人的研究和我们预实验结果,第 1~4 组在梗死后第 2 天开始分别给予 10Hz、15Hz、25Hz、50Hz 不同频率的电刺激,用日本光电的电刺激仪,将刺激电压固定在 0.4V(低于阈电压的 1/2,本组大鼠平均阈电压在 1.5V 左右),脉宽 0.3ms,每日连续刺激 6h,刺激 5 天,每次电刺激前均记录心电图,测量阈电压并记录刺激信号以确保电刺激的成功发放。第 5 组为对照组,未给电刺激。以上大鼠均在梗死后第 7 天活杀取材。

再根据以上各组促血管新生的情况,确定有效电刺激频率,将 12 只已植入电极的心肌梗死大鼠,随机分成 2 组,每组 6 只,以该频率作电刺激,方法同上,在电刺激的同时,第 1 组给予 VEGF 中和抗体,腹腔注射,每日 0.3mg/100g,连续 5 天;第 2 组给予 NOS 抑制剂 L-NAME 灌胃,50mg/kg,每日一次,共 5 天;于第 7 天活杀取材。

1.2.3 检测指标

1.2.3.1 缺血心肌组织中 VEGF 蛋白质表达: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)冲洗三次,每次 3-5min(3×5′);每张切片加 50μl 过氧化酶阻断溶液;以阻断内源性过氧化物酶的活性,室温下孵育 10min;PBS(pH7.4)冲洗(3X5′下同);每张切片加 50μl 的非免疫性动物血清;室温下孵育 5min,PBS 冲洗一次即可;每张切片加 50μl 的 VEGF 兔多克隆抗体(一抗),室温下孵育 60min;PBS 冲洗 3×5′;每张切片加 50μl 生物素标记的第二抗体(试剂 C),室温下孵育 10min;PBS 冲洗 3×5′;每张切片加 50μl 链霉素抗生物素蛋白—过氧化物酶溶液,室温下孵育 10min;PBS 冲洗 3×5′;每张切片加 100μl 新鲜配制的 DAB 溶液,显微镜下观察 5~10min;自来水冲洗,苏木素复染,中性树胶封固;光镜下观察以定性及定位。采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图像测量系统,在 400× 视野下,测定平均光密度值作半定量分析。

1.2.3.2 缺血心肌中毛细血管密度(CD):以Ⅷ因子相关抗原抗体免疫组化检测各组心肌石蜡切片中血管内皮细胞,并计数毛细血管(直径<20μm),以毛细血管数/mm^2 表示毛细血管密度。

1.2.3.3 缺血心肌中 VEGFmRNA 表达:用 RT-PCR 法。

首先用 Tripure 分离法抽提总 RNA。然后建立两个反应混合物,混合物 1 由以下组成:总 RNA 2μl、dNTP 0.8μl(0.4mM)、DTT 2.5μl(5mM)、DMSO 2.5μl(7%)、RNase inhibitor 0.5μl(20U)、上、下游引物各 1 μl(0.3uM)及消毒水 14.7μl;混合物 2 由以下组成:消毒水 13μl、5×RT-PCR-buffer 10μl、C-therm-poly mix 2μl。将 25μl 混合物 1 及 2 加入 0.2ml 薄壁管(在冰上),充分混匀,离心,在 60℃ 孵育 30min;再放入 PE2400 型 PCR 仪进行 PCR 反应,先 94℃ 变性 5min,再按下列程序进行 35 个循环:94℃ 1min、55℃ 1min、72℃ 1min30s,完成循环后于 72℃ 延伸 7min。PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶上电泳(80V,1h),在紫外灯下检测,并用凝胶成像分析系统测量光密度值。VEGF 分子量为 45KD,PCR 产物大小为:698bp($VEGF_{188}$)、626bp($VEGF_{164}$)、493bp($VEGF_{120}$)。

1.2.3.4 缺血心肌中 NOS 活性:用化学比色法,按 NOS 检测试剂盒(购于南京生物建成)操作。

1.3 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,$P<0.05$ 为有统计学差异,$P<0.01$ 为有显著差异。

2 结果

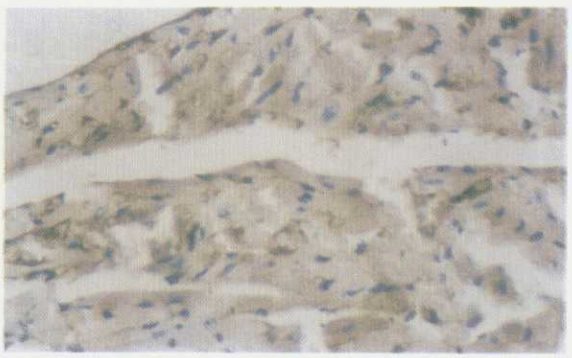


图 1 25Hz 阈下电刺激组缺血心肌中内皮细胞
(免疫组化染色,SP 法,×400)

2.1 不同频率电刺激对缺血心肌中毛细血管密度的影响(表 1,图 1)

维普资讯 http://www.cqvip.com

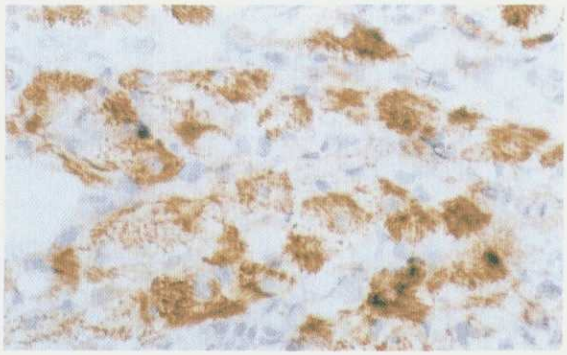


图 2 25Hz 阈下电刺激组缺血心肌免疫组化
(VEGF 呈棕黄色阳性染色,SP 法,×400)

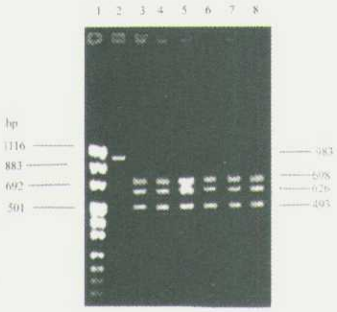


图 3 VEGFmRNA 在不同电刺激组缺血心肌中的表达
lane1:Marker,lane2:GAPDH,lane3:10Hz;lane4:15Hz,lane5:25Hz,lane6:50Hz;lane7:Control,lane8:25Hz+L-NAME

用 25Hz 刺激频率连续电刺激大鼠心肌 5 天后,缺血心肌中毛细血管密度与对照组和其它刺激频率组比较显著增加($P<0.01$)。

2.2 不同频率电刺激对缺血心肌中 VEGFmRNA 和 VEGF 蛋白质表达的影响(表 1,图 2、3)

25Hz 频率组,VEGFmRNA 及 VEGF 蛋白质表达均较对照组及其它频率组显著增高($P<0.01$)。

2.3 不同频率电刺激对缺血心肌中 NOS 活性的影响(表 1)

25Hz 频率组缺血心肌中 NOS 活性显著高于对照组及其它频率组($P<0.01$)。

2.4 VEGF 中和抗体对 25Hz 频率电刺激促血管新生及 NOS 活性的影响(表 2)

在 25Hz 频率阈下电刺激大鼠心肌的同时,给予 VEGF 中和抗体后,缺血心肌中毛细血管密度显著低于 25Hz 频率组($P<0.01$),且比对照组还低($P<0.05$);而缺血心肌中 NOS 活性也显著低于 25Hz 频率组($P<0.01$)。

2.5 NOS 抑制剂(L-NAME)对 25Hz 频率电刺激促血管新生及 VEGF 表达的影响(表 2)

表 1 不同频率电刺激后各参数变化($\bar{x}\pm s$)

Group	n	CD (number/mm^2)	VEGFmRNA (optical density)	VEGF protein (optical density)	NOS (U/mg.pro)
10Hz	6	996.23±67.59	0.82±0.05	0.19±0.06	1.08±0.11
15Hz	6	1023.54±58.73	0.79±0.04	0.21±0.05	1.10±0.16
25Hz	6	1917.66±70.69▲▲	2.63±0.08▲▲	0.38±0.06▲▲	1.47±0.13▲▲
50Hz	6	1036.47±63.52	0.83±0.06	0.20±0.07	1.06±0.15
Control	6	1012.19±71.86	0.81±0.07	0.19±0.05	1.12±0.21

▲▲与其它各组比较 $P<0.01$

表 2 25Hz 频率组在各种干预后相应参数的变化($\bar{x}\pm s$)

Group	n	CD (number/mm^2)	VEGFmRNA (optical density)	VEGF protein (optical density)	NOS (U/mg.pro)
25Hz	6	1917.66±70.69○○	2.63±0.08○○	0.38±0.06○	1.47±0.13
25Hz+VEGF antibody	6	890.27±68.31★★○	——	——	0.81±0.18★★○
25Hz+L-NAME	6	923.64±67.92★★○	2.61±0.07○○	0.37±0.05○	——
Control	6	1012.91±78.6	0.81±0.07	0.19±0.05	1.12±0.21

★★与 25Hz 组比较 $P<0.01$;○与 Control 比较 $P<0.05$,○○与 Control 比较 $P<0.01$。

25Hz 频率阈上电刺激大鼠心肌的同时给予 L-NAME 干预后,缺血心肌中毛细血管密度比 25Hz 频率组显著下降($P<0.01$),且低于对照组($P<0.05$)。但 L-NAME 干预后,VEGFmRNA 及蛋白质表达与单纯 25Hz 频率电刺激组比较,没有统计学差异($P>0.05$)。

3 讨 论

本文分别用 10Hz、15Hz、25Hz、50Hz 四种不同的频率连续刺激梗死后心肌,刺激电压为 0.4V,远远低于阈电压(本实验所测大鼠左室心肌电压阈值在 1~3V 之间),不会引起心肌动作电位,不会干扰心肌的收缩及心脏的正常搏动。通过每日 6h,连续

维普资讯 http://www.cqvip.com

5 天的阈下电刺激后，缺血心肌中毛细血管密度与对照组比较均明显增高，显示 25Hz 频率的电刺激有显著促缺血心肌毛细血管新生的作用，而其它刺激频率却无此现象。说明阈下电刺激促缺血心肌血管新生呈频率相关性，在 25Hz 左右的一个相对狭窄的频率范围的阈下电刺激才能促缺血心肌的血管新生。

以往研究已显示用电刺激骨骼肌或支配骨骼肌的运动神经，可促进骨骼肌中血管新生[1,4]。可是，在这些报告中所用的电刺激均产生了最大的肌肉收缩反应，他们使用的电刺激强度均为大于 2V 以上的阈上刺激。毛细血管密度的增加可能与肌肉收缩引起的缺氧有关。肌肉的强力收缩可能影响肌肉的血供，加重肌肉的疲劳，造成肌肉萎缩[5]。最近，Kanno 等[6]发现用 0.1V 的低强度的阈下电刺激，在 50Hz 频率下可以促进缺血大鼠后肢骨骼肌中毛细血管新生。至今对缺血心肌血管新生的电刺激研究尚未见报道。本文首次发现，对缺血心肌发放适当频率的低强度的阈下电刺激，在不加重心肌缺氧及不干扰心肌正常收缩的前提下，也能促进心肌中内皮细胞的增殖及增加毛细血管密度。同时发现电极植入处心肌与其它地方缺血心肌中血管新生指标并没有明显差异，说明这种血管新生反应并非仅局限于电极植入区域。

Hang 等[7]和 Annex 等[4]对骨骼肌的电刺激研究中，均发现频率为 10Hz 的电刺激可使骨骼肌中 VEGFmRNA 及蛋白质表达增加，而 Kanno 等[6]在培养的骨骼肌和血管平滑肌中发放阈下电刺激，50Hz 频率的电刺激可使骨骼肌细胞中 VEGFmRNA 及蛋白质表达增加，而 25Hz 频率的电刺激可使血管平滑肌细胞中 VEGFmRNA 及蛋白质表达增加。本文研究发现，在 25Hz 频率组，缺血心肌中 VEGFmRNA 及蛋白质表达均高于对照组，而其它频率组与对照组比较无明显差异。说明 25Hz 频率的阈下电刺激可促缺血心肌 VEGF 表达增高，从免疫组化切片观察，VEGF 主要定位在心肌细胞浆中。我们进一步研究发现，在给梗死大鼠心肌 25Hz 阈下电刺激的同时，腹腔内注射 VEGF 中和抗体，1 周后缺血心肌中毛细血管密度与单纯 25Hz 电刺激组比较显著减低，血管新生受到抑制。以上结果说明 25Hz 的阈下电刺激促使心肌中 VEGF 表达增加，从而促进血管新生。

NO 是由左旋精氨酸(L－Arg)和分子氧作为底物在其限速酶 NOS 的作用下生成的；NOS 活性增加可促使 NO 合成的增加，故检测 NOS 活性可间接反映 NO 活性的高低。本研究显示，在 25Hz 频率组，缺血心肌中 NOS 活性高于其它频率组及对照组。说明 25Hz 频率的阈下电刺激可促缺血心肌 NOS 活性增高，NO 的合成增多。同时我们发现，加用 VEGF 中和抗体后 25Hz 频率阈下电刺激组的大鼠缺血心肌中 NOS 活性受到显著抑制，提示 NOS 活性增加与 VEGF 的表达有关，与 Hood 的报道一致[8]。为了进一步明确 NO 与心肌血管新生之间的关系，我们在用 25Hz 频率的阈下电刺激心肌同时，给予 NOS 抑制剂 L－NAME，发现此阈下电刺激促血管新生的作用受到显著抑制。但 VEGFmRNA 及蛋白质表达并未受到影响。说明 NOS 抑制剂 L－NAME 使 NO 生成减少，阻碍了 VEGF 的促血管新生作用。因此，我们进一步证实，NO 介导了 VEGF 的促血管新生作用，NO 可能是 VEGF 的下游效应器[9]。但是否 NO 一定是 VEGF 促血管新生的最后通路，尚有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Hang J, Lan K, Jian WG, et al. VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle[J]. Am J Physiol, 1995; 269: H1827－1831.

[2] Ladoux A, Frelin C. Expression of vascular endothelial growth factor by cultured endothelial cells from brain microvessels[J]. Bioche Biophys Res Commun, 1993; 194(2): 799, 803.

[3] Belle EV, Witzenbichler B, Chen DH, et al. Potentiated angiogenic effect of scatter facto/hepatocyte growth factor via induction of vascular endothelial growth factor[J]. Circulation, 1998; 98: 381－390.

[4] Annex BH, Torgan CE, Lin P, et al. Induction and maintenance of increased VEGF protein by chronic motor nerve stimulation in skeletal muscle[J]. Am J Physiol, 1998; 274: H860－H867.

[5] Chekanov VS, Maternowski MA, Eisenstein R, et al. Angiogenesis in the latissimus dorsi muscle using different regimens of electrical stimulation and pharmaceutical support[J]. ASAIO Journal, 2000; 46: 305－312.

[6] Kanno S, Oda N, Abe M, et al. Establishment of a simple and practical procedure applicable to therapeutic angiogenesis [J]. Circulation, 1999; 99: 2682－2687.

[7] Hang J, Kong L, Gu L, et al. VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. Am J Physiol[J]. 1995; 269: H1827－1831.

[8] Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, et al. VEGF upregulates ecNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells[J]. Am J Physiol, 1998; 274: H1054－1058.

[9] Morhidelli L, Chang CH, Douglas JG, et al. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium[J]. Am J Physiol, 1996; 270: H411－H415.