维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2002)04-0406-03

大鼠缺血心肌中VEGF表达及毛细血管新生的动态变化

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：观察不同时期缺血心肌中VEGF mRNA及蛋白质表达及毛细血管新生的变化规律。方法：雄性Wistar大鼠30只，分别检测心肌梗塞后24h、1W、2W、3W、4W缺血心肌中内皮细胞数，毛细血管密度和VEGF mRNA及蛋白质表达情况。结果：(1)心肌梗塞1周后缺血心肌中毛细血管密度、内皮细胞数均明显增加，2周后达高峰，3周后开始下降，4周后下降到1周时水平。(2)心肌梗塞24h后，VEGF mRNA表达开始增加，1周后达高峰，2周后开始逐渐下降，4周后几乎无表达；VEGF蛋白质的表达从1周后增加，2周后达高峰，3周后开始下降，4周降低到1周时水平。结论：心肌梗塞后缺血心肌中毛细血管密度、VEGF mRNA及蛋白质表达均显著增加；缺血心肌中毛细血管密度与VEGF表达的变化相一致。

【关键词】毛细血管新生；心肌；VEGF

【中国图书分类法分类号】R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2001-12-20

The changing trends of expression of VEGF and angiogenesis in ischemic myocardium

SHE Qiang, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the changes of expression of VEGF and angiogenesis in ischemic myocardium of rats in various periods. *Methods*: 30 male infarcted rats were divided into 24h group, 1w group, 2w group, 3w group and 4w group. The myocardial samples from all groups were taken for detecting the numbers of endothelial cell (EC), capillary density (CD), and expression of VEGFmRNA and protein. *Results*: (1) ECs and CD increased at 1 week after AMI, and peaked at 2 weeks after AMI, while gradually decreased at 3 weeks after AMI, decreased at 4weeks after AMI to the same level with that at 1 week after AMI. (2) Expression of VEGFmRNA in ischemic myocardium increased at 24 hours after AMI, peaked at 1 week after AMI, gradually decreased at 2 weeks after AMI, and little expression was found at 4 weeks after AMI. Expression of VEGF protein increased at 1 week after AMI, peaked at 2 weeks after AMI, gradually decreased at 3 weeks after AMI, decreased at 4 weeks to the same level with that at 1 weeks after AMI. *Conclusion*: CD, expression of VEGF increased in ischemic myocardium of infarcted rats, and the changing trend of these two variables is comparable.

【Key words】Angiogenesis; VEGF; Myocardium

应用大鼠心肌梗塞模型，观察不同时期缺血心肌中血管内皮生长因子（VEGF）mRNA及蛋白质表达及变化规律；分析它们与心肌中毛细血管新生之间的关系，探讨缺血促心肌毛细血管新生的发生机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar大鼠36只，雄性，250～350g。全部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[1]及阳性对照GAPDH[2]引物，由上海基康公司合成。

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 大鼠心肌梗塞模型的制作[3] 用戊巴比妥钠(30mg/kg)行腹腔注射麻醉，行气管切开及气管插管后，采用呼吸机进行人工控制呼吸，呼吸频率60次/min，潮气量4～6ml。左正中旁切开皮肤，逐层分离皮下组织，肌肉，剪断第3、4肋骨，暴露心脏，切开心包，在左心耳与肺动脉圆锥间用眼科缝针穿线结扎左冠脉前降支。然后迅速将心脏复位，关闭胸

作者介绍：佘 强（1966- ），男，副教授，博士，
主要研究方向：冠心病基础与临床。

维普资讯 http://www.cqvip.com

腔，恢复大鼠自主呼吸，拔出气管内插管，并缝合气管。以上手术均在严格无菌条件下进行。术后腹腔内注射青霉素钠80万单位/d，连续3天抗感染。以心电图肢导联ST段弓背向上抬高持续0.5h以上作为梗塞模型复制成功的标志。假手术(Sham)组大鼠只在冠脉下穿线，不结扎冠脉，其余步骤同上。

1.2.2 实验分组 将心肌梗塞的大鼠随机分成梗塞后24h、1周、2周、3周、4周5个组，每组6只，Sham组只设术后1周(6只)一个时相点作总体对照。于各相应点活杀动物取左室梗塞区及相邻区域心肌分别放入10%甲醛溶液中和液氮中待测。

1.2.3 组织学观察 取缺血区心肌组织1块，用10%的甲醛溶液固定，按常规方法切片行HE染色，用BH-2型Olympus光镜观察组织学改变。

1.2.4 检测指标

1.2.4.1 内皮细胞计数及毛细血管密度：以Ⅷ因子相关抗原抗体作内皮细胞免疫组化染色，方法同上。在400×视野下计数内皮细胞，取5个连续缺血区域视野下的均值。同时计数毛细血管(直径<20μm)，以毛细血管数/mm^2表示毛细血管密度。

1.2.4.2 VEGF蛋白质表达：用免疫组化染色方法，操作步骤按SP试剂盒说明进行。

1.2.4.3 VEGFmRNA表达：用RT-PCR方法检测。

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RNA2μl、dNTP0.8μl（0.4mmol/L）、DTT2.5μl（5mmol/L）、DMSO2.5μl（7%）、RNase inhibitor0.5μl（20μmol/L）、上、下游引物各1μl（0.3μmol/L）及消毒水14.7μl；混合物2由以下组成：消毒水13μl、5×RT-PCR-buffer10μl、C-therm-poly mix2μl。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（$VEGF_{120}$）。

1.2.5 统计学分析

所有数据均以$\bar{x}\pm S$表示，多组间比较采用方差分析，两组间比较采用t检验，所有统计分析均在SPSS软件上进行。$P<0.05$为有统计学差异，$P<0.01$认为具有显著差异。

2 结 果

2.1 组织形态学改变

肉眼观察：心肌梗塞后24h，心脏大体形态无明显变化。而梗塞1～4周的大鼠可见左室壁梗塞区变薄，心肌呈灰白或浅黄色，其周边与非梗塞心肌间分界不清且不规则，梗塞与非梗塞心肌组织常有相互参杂。

HE染色显示：心肌梗塞24h组，可见梗塞区心肌细胞核的溶解，以及中性粒细胞及单核细胞的浸润。梗塞1周后各组均可见梗塞区肌纤维溶解断裂，大量炎性细胞、成纤维细胞浸润，以及肉芽组织的形成。

2.2 缺血心肌中内皮细胞数、毛细血管密度的动态变化(表1，图1)

表1 心肌梗塞后缺血心肌中内皮细胞数、毛细血管密度变化（$\bar{x}\pm S$）

组别	动物数	EC(N/400HP)	CD(N/mm^2)
Sham	6	19.2 ± 4.1	404.60 ± 47.56
AMI_{24h}	6	20.4 ± 5.5	430.29 ± 53.95
AMI_{1W}	6	34.8 ± 6.7*	1002.11 ± 85.04**
AMI_{2W}	6	60.8 ± 8.0**	1658.23 ± 101.27**
AMI_{3W}	6	47.6 ± 7.1*	1291.14 ± 64.55**
AMI_{4W}	6	31.3 ± 8.3**	949.37 ± 69.33*

*与前一组比较$P<0.05$，**与前一组比较$P<0.01$

心肌梗塞后24h，缺血心肌中内皮细胞数(EC)、毛细血管密度(CD)均未见明显改变，1周时两者均明显增加，2周时达高峰，3周时开始下降，但仍高于1周时水平，4周时下降到1周时水平，两者的变化趋于同步。1周后各时段的内皮细胞数及毛细血管密度与Sham组比较均有显著差异（$P<0.01$）。而同一心肌组织中，正常区及梗塞区内皮细胞数、毛细血管密度均大大低于缺血区，且变化相对较小，本文将不作研究。

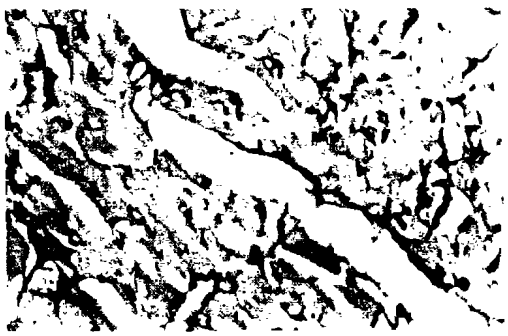


图1 AMI2周后缺血心肌中内皮细胞及毛细血管分布（免疫组化染色，SP法，×400）

2.3 缺血心肌中VEGFmRNA及蛋白质的变化规律(表2，图2、3)

心肌梗塞24h后，缺血心肌中VEGFmRNA表达(包括$VEGF_{120}$、$VEGF_{164}$ $VEGF_{188}$三个亚型)开始增

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 心肌梗塞后缺血心肌中VEGFm RNA、蛋白质的变化（$\bar{X}\pm S$）

组别	动物数	VEGF protein (optical density)	VEGFmRNA (optical density)
Sham	6	0.094 ± 0.01	0.125 ± 0.01
AMI_{24h}	6	0.096 ± 0.01	0.368 ± 0.02**
AMI_{1w}	6	0.162 ± 0.02**	0.806 ± 0.03**
AMI_{2w}	6	0.265 ± 0.01**	0.652 ± 0.03*
AMI_{3w}	6	0.208 ± 0.02**	0.354 ± 0.02*
AMI_{4w}	6	0.154 ± 0.01**	0.126 ± 0.01**

*与前一组比较 $P<0.05$, **与前一组比较 $P<0.01$

加，1周达高峰，2周开始逐渐下降，4周后表达接近正常水平。VEGF蛋白质的表达从1周后增加，2周时达高峰，3周后开始下降，4周降低到1周时水平。VEGF主要存在于心肌细胞浆以及毛细血管周围。在同一心肌组织中，正常区及梗塞区VEGFmRNA及蛋白质表达远远低于缺血区，且变化相对较小，本文将不作研究。

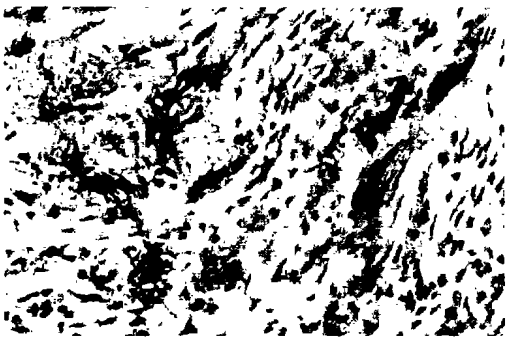


图2 AMI2周后缺血心肌免疫组化，VEGF蛋白呈棕黄色阳性染色（SP法，×400）

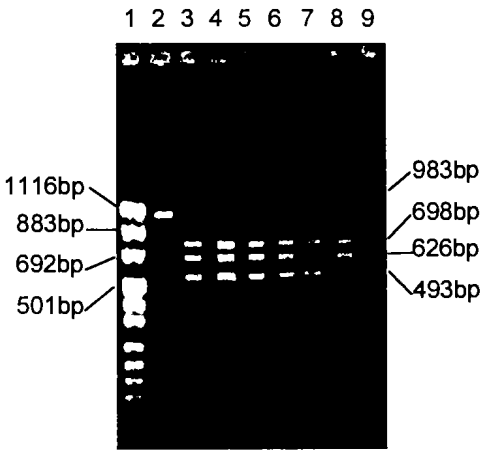


图3 VEGF mRNA在缺血心肌中的表达

lane1: Marker, lane2: GAPDH, lane3: AMI24h, lane4: AMI1w, lane5: AMI2w, lane6: AMI3w, lane7: AMI4w, lane8: sham,lane9: negative cont

3 讨 论

血管新生(angiogenesis)，又称真性血管新生，是从原有毛细血管发芽长出新的毛细血管和小的非肌性血管。在正常成年的个体几乎不会发生血管新生，只有在胚胎发育期，或在某些病理状态下才能激活血管新生。心肌缺血就是心肌中毛细血管新生的触发因素之一[4]。Schaper首先提出心肌局部缺血与血管内皮细胞和平滑肌细胞有丝分裂之间有相关关系。后来的研究发现，反复发生的冠状动脉闭塞所持续的时间与侧枝血管形成密切相关。心肌缺血可刺激内皮细胞增殖，导致心肌毛细血管新生[5]。

本研究也得出相同的结果，在大鼠心肌梗塞后1个月内，左室心肌中毛细血管密度及内皮细胞数均显著增加，且主要发生在正常心肌与坏死心肌之间的移行区。本实验还从不同时段的研究中发现了毛细血管新生的变化规律，在梗塞后24h内，内皮细胞及毛细血管并无太大变化，1周时才显著增加，2周达高峰，1个月后已明显减少。说明心肌缺血引起的内皮细胞增殖可能在24h后才开始发生，而这种促增殖作用持续时间并不长，且新生的毛细血管后期还会出现退化减少。该结果说明作为对心肌缺血的适应性反应，机体通过毛细血管增殖来促进冠状动脉侧枝循环的建立，此代偿适应过程是不完全的、短暂的，且发生速度较慢。

VEGF又称血管通透因子，是一类分子量为34～45KD的糖蛋白。它特异作用于血管内皮细胞上的VEGF酪氨酸激酶受体，发挥其生物学效应。是特异性的内皮细胞促有丝分裂剂，具有强烈的促血管内皮增殖作用。VEGF除由内皮细胞分泌外，也还可由血管平滑肌细胞及心肌细胞分泌。正常心肌中VEGF可见表达，缺血、缺氧可以使VEGF表达上调，因而，有人提出心肌缺血引起的心肌血管新生可能与VEGF上调密切相关[6]。Banai等[7]发现，体外培养的心肌细胞缺氧2～4h，细胞内VEGFmRNA的水平增高6～10倍；而在体内，当心肌缺血时心肌细胞中的VEGFmRNA水平可以增高3～5倍。Li等[3]又报道在大鼠心肌梗塞后，梗塞与非梗塞区均有VEGFmRNA表达，不过非梗塞区只持续3～7天，随即下降到正常，而梗塞区及其周边部位的高水平表达可持续7天以上。本文也作了类似的研究，结果发现，在大鼠心肌梗塞后24h，缺血心肌中

维普资讯 http://www.cqvip.com

VEGFmRNA(包括$VEGF_{120}$、$VEGF_{164}$、$VEGF_{188}$三个亚型)表达已明显增加，1周左右达高峰，并一直维持较高水平，4周左右才降至正常。由于未对24h以内的时段作进一步的分组研究，VEGFmRNA表达增加最早发生的时间尚不能完全确定。而VEGFmRNA表达持续时间与Li等的报道稍有差异，可能由不同的实验方法和不同的取材部位造成。我们还用免疫组化方法研究了左室心肌中VEGF蛋白表达及分布情况。VEGF的蛋白表达量在梗塞24h内并未增加，1周左右才明显增加，2周左右达高峰，然后逐渐下降，4周时降到1周时的水平。VEGFmRNA与蛋白质的表达不完全同步，表现为分子水平的表达在先，蛋白质水平表达在后。

研究还发现，缺血心肌中VEGF蛋白质表达的变化规律与毛细血管密度及内皮细胞数的演变规律完全一致，进一步证实VEGF与心肌中血管新生有密切联系，提示VEGF可能介导了缺血心肌血管新生。

参 考 文 献

[1] Adoux 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.

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

[3] Li J, Brown LF, Hibberd MG, et al. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis [J]. Am J Physiol, 1996; 270: H1803-1811.

[4] Ware JA, Siimons M. Angiogenesis in ischemic heart disease[J]. Nature Med, 1997; 3: 158-164.

[5] Xie ZL, Gao M, Koyama T, et al. Effects of transient coronary occlusion on the capillary network in the left ventricle of rat[J]. Japaneses Journal of physiology, 1997; 47: 537-543.

[6] Nomura M, Yamagishi SI, Harada SI, et al. Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cell and pericytes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995; 270(47): 28316-28342.

[7] Banai S, Shweiki D, Pinson A, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis [J]. Cardiovasc Res, 1994; 28: 1176-1179.

(上接第395页)

酸和胃蛋白酶的分泌，由于G细胞数量的增加，致使胃酸分泌增多而反馈调节5-HT细胞数量增加；2. 胃泌素 5-HT能够增加幽门粘蛋白分泌，刺激胃泌素的释放，减少生长抑素的分泌[6]，所以5-HT细胞数量增加，可使能分泌胃泌素的G细胞数量也同时增加。

综上讨论认为胃窦粘膜5-HT细胞和G细胞参与了消化性溃疡的内分泌调节。

参 考 文 献

[1] 周济远，石爱荣，刘鼎新. 大鼠实验性胃溃疡自愈期间胃窦粘膜胃泌素细胞免疫组织化学和放射自显影研究[J]. 解剖学报，1988;19(1):68-73.

[2] 刘桂香，苑普庆，郑国钧，等. 大鼠实验性胃溃疡自愈过程中胃窦粘膜5-HT免疫反应细胞的定量研究[J]. 解剖学报，1995;26(1):91-93.

[3] 高增贺，周济远，任君旭，等. 溃疡病胃窦G和D细胞的体视学分析[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志，1997;6(1):104-108.

[4] Zhou Jiyuan, Ren Junxu, Bai Xuemei, et al. Immunohistochemical double staining of D and G cells, serum and antral mucous radioimmunoassay on gastrin and somatostatin in patients with peptic ulcer[J]. Chinese J, Histochem, Cytochem. 1993;2(Suppl):213.

[5] Wong SH, Cho CH, Ogle CW. The role of serotonin in ethanol-induced gastric glandular damage in rats[J].digestion, 1990;45(1):52-54.

[6] Koop K, Arnold R. Control of rat gastric somatostatin and gastrin release by serotonin[J]. Gastroenterol, 1983;84(5):1214-1217.