维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)02-0145-03

β-受体阻滞剂促大鼠缺血心肌血管新生的实验研究

余 强，陈运贞

（重庆医科大学临床学院心内科 重庆 400016）

【摘 要】目的：评价β-受体阻滞剂是否有促进缺血心肌血管新生的作用并探讨其发生机制。方法：将急性心肌梗塞1周后的大鼠分别用美托洛尔灌胃1－3周，用免疫组织化学法检测缺血心肌中毛细血管内皮细胞及VEGF，并计数毛细血管密度，同时观察心率的变化。结果：服用美托洛尔后的大鼠缺血心肌中毛细血管密度和VEGF蛋白表达明显增加；用美托洛尔后心率下降显著的心肌梗塞大鼠，其缺血心肌中毛细血管密度和VEGF表达又显著高于心率下降不明显的大鼠。结论：β-受体阻滞剂可以促进缺血心肌毛细血管新生，该作用可能是由窦性心动缓触发的内源性VEGF分泌增加所致。

【关键词】血管新生；美托洛尔；血管内皮细胞生长因子；窦性心动过缓

【中国图书分类法分类号】R962；R541.4 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-11-20

Experimental study of myocardial angiogenesis of infarcted rats promoted by beta-receptor blocker

SHE Qiang, et al

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

【Abstract】 *Objective*: We studied expression of Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiogenesis in ischemic myocardium from a group of rats with acute myocardial infarction (AMI) after taking metoprolol---- a beta-receptor blocker, in order to determine if beta-receptor blocker can promote myocardial angiogenesis in rat s with AMI and reveal the mechanism. *Methods*: The infarcted rats received last metoprolol administration for 1-3 weeks. Vascular endothelial cells and VEGF protein in ischemic myocardium were detected by immunohistochemical technique. Capillary density and heart rate were detected too. *Results*: Capillary density and expression of VEGF protein were higher in ischemic myocardium of rats with metoprolol treatment than in ischemic myocardium of rats in control group. Capillary density and expression of VEGF significantly increased in ischemic myocardium with reduction of heart rate in comparison with no reduction of heart rate in rats with metoprolol treatment. *Conclusion*: Beta-receptor blocker may promote capillary angiogenesis in ischemic myocardium of rats. It suggests that VEGF plays a key role in the angiogenic response that occurs with chronic bradycardia.

【Key words】 Angiogenesis; Metoprolol; Vascular endothelial growth factor; Bradycardia

虽然动脉粥样硬化性心脏病的防治已取得重大进展，许多病人也已经接受药物治疗、并通过血管成形术和外科手术进行机械性血管再通，但是仍有许多病人尚未得到有效治疗，改善这些病人局部缺血状况的挑战已经在分子生物学、药物治疗和更为先进的机械技术等领域引发了广泛的研究。近来研究发现许多生长因子均有促进缺血心肌血管新生的作用，其中包括血管内皮细胞生长因子（VEGF)、成纤维细胞生长因子、转化生长因子β，类胰岛素样生长因子以及肝细胞生长因子等[1]。有学者报道心率减慢可使心肌中内源性VEGF分泌增加；β-受体阻滞剂具有明显减慢心率的作用，因而我们假设β-受体阻滞剂也有促进缺血心肌中VEGF分泌增加的作用。本文通过观察一组心肌梗塞后的大鼠，在服用β-受体阻滞剂-美托洛尔(商品名：倍它乐克)后，心肌中VEGF的表达及毛细血管新生情况，以评价β-受体阻滞剂是否有促进缺血心肌血管新生的作用并探讨其发生机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型

健康雄性Wistar大鼠60只，体重200～280g。参照Drexler

作者介绍：余 强（1966- ），男，重庆人，副教授，博士，主要研究方向：冠心病血管新生。

维普资讯 http://www.cqvip.com

等[2]的方法，用戊巴比妥钠（30mg/kg）麻醉大鼠，行胸骨下正中切口，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。术后腹腔内注射青霉素40万U/d，连续3天抗感染。

1.2 用药及分组

将心肌梗塞1周后的大鼠随机分成两组，A组：美托洛尔组，用灌胃方式给予美托洛尔（25mg/kg），每日一次，一周后检测心率的变化，将心率减慢的大鼠又分成三个小组，每组6只，分别用药1周、2周和3周后处死，心率不变的大鼠将被除外；B组：对照组，用水代替美托洛尔，实施方案同A组。另设C组：5只，为服用美托洛尔3周后心率仍无改变的心肌梗塞大鼠。以上各组均取左室梗塞及相邻部位心肌放入10%甲醛中保存备检。

1.3 观察指标

1.3.1 心率：用戊巴比妥钠麻醉后作心电图，通过R-R间期计算心率，分别测量用药前及用药后1周、2周及3周心率。

1.3.2 心肌毛细血管密度：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，以毛细血管数/mm^2表示毛细血管密度。

1.3.3 VEGF蛋白质表达：免疫组织化学法测定，按SP试剂盒说明进行。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，测定平均灰度值。

1.4 统计分析

各指标用$\bar{x}\pm s$表示。两组间比较用t检验，多组间比较用方差分析。

2 结 果

2.1 美托洛尔对心肌梗塞大鼠心率的影响

A组大鼠服用美托洛尔1周、2周及3周后其心率分别下降14%、22%、20%（$P<0.01$），另观察到有5只大鼠在用药3周后心率无明显改变（C组）。对照组（B组）心率无明显改变。

2.2 美托洛尔对心肌梗塞大鼠缺血心肌毛细血管密度的影响（表1，图1）



图1 美托洛尔2周后缺血心肌免疫组化，血管内皮细胞用Ⅷ因子染色呈棕黄色（SP法，×400）

应用美托洛尔后1周，心肌梗塞大鼠缺血心肌中毛细血管密度比用药前显著增加（$P<0.01$），用药2周时又较用药1周时显著增加（$P<0.01$），用药3周时与用药2周时比较无明显差异（$P>0.05$）。同时，美托洛尔组与对照组对应各周比较，美托洛尔组中，缺血心肌的毛细血管密度远远大于对照组（$P<0.01$）。

2.3 美托洛尔对心肌梗塞大鼠缺血心肌VEGF蛋白表达的影响（表2，图2）

表1 缺血心肌中毛细血管密度（$\bar{x}\pm s$）

组别	毛细血管密度（毛细血管数/mm^2）			
	用药前 (n=6)	用药后1周 (n=6)	用药后2周 (n=6)	用药后3周 (n=6)
美托洛尔组	1005.33±54.40	1850.50±82.71**▲▲	2035.33±126.94**▲▲▲	2002.00±95.89▲
对照组	1009.50±66.30	1601.33±62.83**	1265.67±70.78**	968.17±49.17

表2 缺血心肌VEGF蛋白表达（$\bar{x}\pm s$）

组别	VEGF表达量（灰度值）			
	用药前 (n=6)	用药后1周 (n=6)	用药后2周 (n=6)	用药后3周 (n=6)
美托洛尔组	164±10	149±12▲*	131±9▲**	128±9**
对照组	163±11	168±12	177±10▲	188±11▲

▲与前一个时间组比较 $P<0.05$；*与对照组比较 $P<0.05$，**与对照组比较 $P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

表3 心率对缺血心肌毛细血管密度及VEGF蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$）

组别	毛细血管密度（毛细血管数/mm²）	VEGF蛋白表达（灰度值）
心率不变组(n=5)	1276.19±81.74	180±10
心率减慢组(n=6)	2035.33±126.94**	131±9**

**与心率不变组比较 $P<0.01$



图2 美托洛尔2周后缺血心肌免疫组化，VEGF蛋白呈棕黄色阳性染色（SP法，×200）

应用美托洛尔1周后，缺血心肌VEGF蛋白表达比用药前显著增加（$P<0.01$），用药2周时VEGF表达量明显大于用药1周时（$P<0.01$），而用药3周时VEGF表达水平与用药2周时无统计学差异（$P>0.05$）。而对照组则相反，随着时间的延长，缺血心肌中VEGF蛋白表达呈逐渐下降趋势。因而，美托洛尔组与对照组对应各周的VEGF表达比较，前者增加非常显著（$P<0.01$）。

2.4 心率对缺血心肌毛细血管密度及VEGF蛋白表达的影响（表3）

用美托洛尔2周后心率没有减慢的心肌梗塞大鼠，其缺血心肌中毛细血管密度及VEGF蛋白质的表达均显著低于心率减慢的心肌梗塞大鼠（$P<0.01$）。

3 讨 论

美托洛尔属于高度选择性的β1受体阻滞剂。已经广泛应用于冠心病的二级预防，β-受体阻滞剂治疗心肌梗塞的主要作用是减少心肌耗氧，改善心肌氧的供需平衡，保护存活心肌，而β-受体阻滞剂是否可以促进缺血心肌的血管新生，增加缺血心肌血供尚未见报道，本文研究发现，急性心肌梗塞后的大鼠，在服用β-受体阻滞剂美托洛尔1周后，毛细血管密度显著增加，2周左右达到高峰，此后维持在较高水平。而对照组缺血心肌中毛细血管密度在心肌梗塞2周后呈逐渐下降，上述结果说明β-受体阻滞剂有促进缺血心肌毛细血管新生的作用，这可能是临床上使用β-受体阻滞剂能显著提高心肌梗塞病人生存率的原因之一。

本研究还显示，应用美托洛尔后的心肌梗塞大鼠缺血心肌中VEGF表达明显增加，其增加趋势同毛细血管密度增加相一致。VEGF是内皮细胞有丝分裂原，大量的研究已经表明，无论是内源性或是外源性VEGF均有强烈的促缺血心肌毛细血管新生作用[3,4]，从上述结果推测，β-受体阻滞剂促血管新生的作用是由VEGF介导的，它是通过上调缺血心肌中的VEGF，再由后者促进缺血心肌中毛细血管新生。

最近有学者报道，窦性心动过缓可引起正常大鼠心肌中毛细血管新生，而该作用也是由VEGF介导的[5]。本文用美托洛尔后，绝大多数大鼠心率下降，心率下降愈明显，缺血心肌中毛细血管密度及VEGF表达增加也愈明显。而其中少数大鼠在服用美托洛尔后心率未明显下降，其缺血心肌中毛细血管密度也未改变，而且随着时间的延长，缺血心肌中VEGF的表达反而呈下降趋势，提示β-受体阻滞剂促缺血心肌毛细血管新生的作用与心率减慢有关，可能由窦性心动过缓所引起，这与Wei等的报道相似[5]。窦性心动过缓促进心肌血管新生的机理推测是：心率减慢造成舒张期延长，舒张期灌注增加，心室壁内心肌细胞及毛细血管的张力增大，这种张力可促使心肌细胞或毛细血管内皮细胞分泌内源性的VEGF，最终导致毛细血管的新生[5]。

总之，人们认为β-受体阻滞剂可以促进缺血心肌毛细血管新生，该作用可能是由窦性心动过缓触发的内源性VEGF分泌增加造成，但是否血压因素以及其它血管生长因子也参与了上述作用，尚有待进一步观察。同时本文心肌取材均为左室心肌，是否右室心肌也有同样的结果尚不清楚，也需进一步研究。

参 考 文 献

[1] Sellke FW, Simons M. Angiogenesis in cardiovascular disease: current status and therapeutic potential[J]. Circulation. 1999; 100: 468-474.

（下转第150页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

mRNA在感染后6周升高、感染后10周达高峰，随后逐渐下降、感染后24周恢复正常水平，可见IL-6与虫卵肉芽肿形成有一定关系。

本文用日本血吸虫重组BCG-Sj26GST疫苗免疫、尾蚴攻击后发现脾细胞分泌IL-6无明显变化，提示IL-6可能与血吸虫疫苗诱导的保护性免疫力无关。已知IL-6是由活化的单核巨噬细胞、B细胞和Th2细胞分泌的细胞因子，我们推测疫苗免疫可提高宿主细胞免疫功能，IL-1分泌升高，可能促进脾细胞Th1分泌IL-2和IFN-γ，加强宿主Th1反应，但不促进甚至抑制脾脏单核巨噬细胞、B细胞和Th2细胞分泌IL-6，因而IL-6水平无明显变化。

Khalil等[11]发现Sm感染鼠脾细胞分泌IL-6在感染后6～20周升高，在感染后10周达高峰。本文显示疫苗皮下注射后，用Sj26或PHA诱导均在免疫后8周达最高水平，当疫苗静脉注射后，用Sj26诱导脾细胞产生IL-6在免疫后8周达最高水平，而用PHA刺激时则在免疫后10周达最高水平，可见疫苗免疫小鼠后脾细胞产生IL-6在免疫后4～8周开始升高，免疫后8～10周达最高水平，并持续至观察结束的第16周，表明疫苗免疫后脾细胞产生IL-6动力学过程大约早于曼氏血吸虫感染2周左右。

参 考 文 献

[1] kishimoto T, Akira S, Taga T, et al. Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines[J]. Science, 1992;258:593-597.

[2] Kent TT, Marrack P, Kappler JW, et al. IL-6 rescues resting mouse T cells from apoptosis[J]. J Immunol.1997;158:5791-5796.

[3] Joseph SB, Miner KT, Croft M, et al. Augmentation of naive, Th1 and Th2 effector CD4 responses by IL-6, IL-1 and TNF-α [J]. Eur J Immunol.1998;28:277-289.

[4] Kishimoto T. The biology of interleukin-6[J]. Blood.1989;74 (1):1-10.

[5] Watson CS, Smith WN, Vora AJ, et al. IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherance for lymphocytes[J]. Clin Exp Immunol.1996;105:112-123.

[6] Panzer S, Madden M, Matsuki K. Interaction of Il-1 beta, IL-6 and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human cells activated by murine antigens[J]. Clin Exp Immunol. 1993; 93:471-479.

[7] Pancre V, Monte D, Delannoye A, et al. Interleukin-6 is the main mediator of the interaction between monocytes and platelets in the killing of schistosoma mansoni[J]. Eur Cytokine Netw. 1990;1:15-21.

[8] 李文桂，石佑恩，汪燕鸣，等. 血吸虫重组BCG-Sj26GST疫苗接种后保护力的观察[J]. 同济医科大学学报，1999;28(1):13-19.

[9] 毛守白. 血吸虫生物学与血吸虫病的防治[M]. 第一版. 北京：人民卫生出版社，1990;8-220

[10] Wynn TA, Eltoum I, Cheever AW, et al. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of schistosoma mansoni[J]. J Immunol. 1993; 151(3):1430-1440.

[11] Khalil RM, Hultner L, Mailhammer R, et al. Kinetics of interleukin-6 production after experimental infection of mice with schistosoma mansoni[J].Immunol.1996;89(2):256-261.

(上接第144页)

[1] 李 杨，王 威，刘 苗，等. 盐酸氟桂利嗪片人体生物等效性研究[J]. 中国药房，2000;11(3):120.

[2] 谢 林，刘晓东，高 旭，等. 人血浆中盐酸氟桂利嗪HPLC测定及药代动力学研究[J] 中国药科大学学报，1995;26(5):300.

[3] 曲福军，夏 军，姜礼红，等 用反相HPLC法国测盐酸氟桂利嗪胶囊在人体中的相对生物利用度[J]. 中国药房，1997;8(4):173.

[4] 何海霞，周远大，姚高琼，等 人血浆中盐酸氟桂利嗪的HPLC测定及药代动力学研究[J]. 药物分析杂志，2000;20 (3):157.

(上接第147页)

[2] Drexler H, Depenbusch JW, Truog AG, et al. Effects of diltiazem on cardiac function and regional blood at rest and during exercise in a conscious rat preparation of chronic heart failure (myocardial infarction)[J]. Circulation, 1985;71:1260-1270.

[3] Shmuel D, Michael TJ, Matic S, et al. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs[J]. Circulation. 1994;89:2183-2189.

[4] Bernhard W, Takayuki A, Tomoaki M, et al. Vascular endothelial growth factor-c promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia[J]. Am J Pathol. 1998;153:381-394.

[5] Wei Z, Margaret DB, Tommy AB, et al Bradycardia-induced coronary angiogenesis is dependent on vascular endothelial growth factor[J]. Circ Res. 1999;85:192-198.