DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.13.008
第26卷第13期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 13
1148 2004年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)13-1148-04

重组人生长激素对AMI大鼠缺血心肌VEGF表达的影响及其生物学效应

张 晔,王旭开,杨成明,胡厚祥,王耀辉,石伟彬,付春江,方玉强 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨重组人生长激素对急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)大鼠缺血心肌VEGF表达的影响及其促血管再生的生物学效应。方法 制备急性心肌梗死大鼠模型,存活大鼠随机分为单纯心肌梗死组(MI组),低剂量生长激素处理组(GH_1组:术后24 h开始rh-GH皮下注射0.2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$),高剂量生长激素处理组($GH_2$组:术后24 h开始rh-GH皮下注射1.0 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$),另设假手术组(SO组)为对照组,注射28 d后处死动物,采用Ⅷ因子免疫组织化学染色观察各组缺血心肌新生血管密度;RT-PCR和蛋白免疫印迹方法各组大鼠缺血心肌VEGFmRNA表达和蛋白合成的影响。结果 与MI组相比,GH_1、GH_2组VEGFmRNA的表达和蛋白合成增加;GH_1、GH_2组缺血心肌血管密度增加(19.8±2.9)比(16.4±4.4)/高倍视野,$P<0.05$;(28.5±3.6)比(16.4±4.4)/高倍视野,$P<0.001$,GH_2组又明显高于GH_1组($P<0.001$)。结论 重组人生长激素可以促进急性心肌梗死大鼠缺血心肌血管再生,而增加缺血心肌VEGF mRNA的表达以及蛋白合成可能是其机制之一。

关键词:重组人生长激素;血管再生;急性心肌梗死;血管内皮生长因子
中图法分类号:R542.22;R977.1 文献标识码:A

Effects of recombinant human growth hormone on VEGF expression in ischemic myocardium and angiogenesis of acute myocardial infarction rats

ZHANG Ye, WANG Xu-kai, YANG Cheng-ming, HU Hou-xiang, WANG Yao-hui, SHI Wei-bin, FU Chun-jiang, FANG Yu-qiang (Department of Cardiovascular Diseases, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of human recombinant growth hormone on the angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in ischemic myocardium of acute myocardial infarction (AMI) rats. **Methods** A total of 60 male Sprague-Dawley rats (150—200 g) were subjected to left ascending coronary artery ligation. At 24 h after ligation, the survived rats were randomized to receive recombinant human growth hormone at the dose of 0.2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ (GH1, $n=10$) or 1.0 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ (GH2, $n=10$) or nothing (MI, $n=11$). The left rats ($n=13$) underwent thoracic incision without ligation of the left ascending coronary artery to serve as age-matched sham-operation controls (SO, $n=13$). The rats were sacrificed at 28 d after the injection. The effects of recombinant human growth hormone on collateral microvessel density were measured by immunohistochemical analysis using Ⅷ factor. VEGF expression in ischemic myocardium of acute myocardial infarction rats was observed by RT-PCR and Western blotting. **Results** As compared with the control animals at 28 d after ligation, GH treated rats had significantly higher expressions of VEGF, and a significantly higher collateral microvessel density. **Conclusion** Recombinant human growth hormone can promote the myocardial angiogenesis. The increased mRNA expression and protein synthesis of VEGF in ischemic myocardium of acute myocardial infarction rats may be one of the mechanisms.

Key words: recombinant human growth hormone; angiogenesis; acute myocardial infarction; VEGF

基金项目:重庆市科委应用基础研究资助项目(2001)
Supported by the Research Project Foundation for Basic Research and Application of Sci &Tech Committee of Chongqing (2001)
作者简介:张 晔(1978—),女,湖南省湘潭市人,硕士研究生,医师,主要从事血管再生方面的研究。电话:(023)68757246
通信作者:王旭开,电话:(023)68757266
收稿日期:2003-03-13;修回日期:2003-10-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

利用血管再生治疗缺血性心脏病是目前心血管疾病研究领域的热点。血管再生是一个复杂的过程, 众多促血管生长因子如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等参与其中, 发挥不可缺少的作用。利用血管生长因子促进缺血组织周围侧支循环血管的形成, 围绕病变血管组成内源性血管旁路, 通过新建立的血运途径增加组织的灌注和氧供, 称为"治疗性血管再生"。生长激素(growth Hormone, GH)是由腺垂体分泌的一种在机体生长、发育及代谢中发挥重要作用的激素。近年来它在心肌结构和功能方面的作用引起越来越多的注意。实验表明急性心肌梗死后应用 GH 治疗可以延长动物生存时间, 改善心脏功能[1,2]。研究表明生长激素与血管再生(angiogenesis)有重要联系[3~5], 本实验目的在于观察生长激素对于具有明确促血管再生作用的细胞因子 VEGF 在急性心肌梗死大鼠缺血心肌血管再生表达的影响及其促进血管再生的生物学效应, 了解 GH 促血管再生作用的机制。这对于进一步完善缺血性心脏病的血管再生治疗将是有益补充。

1　材料和方法

1.1　急性心肌梗死动物模型的制备

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 60 只, 由大坪医院实验动物中心提供, 体质量 150 ~ 200 g。制备心肌梗死大鼠实验方法参照文献方法: 大鼠采用乙醚吸入麻醉, 消毒后于胸骨左缘第 3, 4 肋间切开胸壁, 暴露心脏, 6.0 丝线结扎左冠状动脉前降支近端开口处。缝合关闭胸腔, 大鼠复苏。假手术组则仅在左冠状动脉前降支近端开口处穿线。

1.2　动物分组

假手术组大鼠设为对照组(sham operated, SO 组), 共计 13 只。其余存活大鼠(共 31 只)随机分为 3 组: 单纯手术组(MI 组); 注射低剂量重组人生长激素组(GH_1 组); 注射高剂量重组人生长激素组(GH_2 组)。分笼饲养。分别为 11、10、10 只。术后第 2 天开始, GH_1 组皮下注射重组人生长激素组[(recombinant human growth hormone, rhGH), 长春金赛药业生产, 金磊赛赠 0.2 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$(相当于大鼠垂体切除后需要补充生长激素的生理剂量), 共计 28 d; GH_2 组皮下注射 rhGH 1.0 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$(可引起血流动力学变化, 而不会引起心肌肥厚的剂量), 共计 28 d。

1.3　动物的处死及标本的获取

28 d 后, 4 组动物均采用断颈处死法, 取出心脏后肉眼可见梗死区域心肌呈灰白色或浅黄色, 剪取梗死区与正常心肌交界地带心肌即缺血心肌, 立即—70 ℃液氮保存。

1.4　缺血心肌微血管密度的测定

Ⅷ因子免疫组织化学法测定缺血心肌微血管密度: 剪取梗死区与正常心肌交界地带心肌即缺血心肌, 4%甲醛固定, 梯度乙醇脱水, 透明, 石蜡包埋, 切片(5 μm 厚), 标准 S-P 法染色, DAB 显色, 一抗为兔抗Ⅷ因子相关抗原抗体。试剂盒与抗体均购自北京中山生物技术有限公司。染色后参考 Weidner 等的方法, 计数缺血区微血管密度(microvessel density, MVD): 先在显微镜低倍视野(100 倍)下全面观察切片, 确定微血管密度最高处, 然后在高倍视野(200 倍)下以与周围组织明显区分的任何 1 个棕黄色的内皮细胞后内皮细胞簇作为 1 个血管, 只要结构不相连, 其分支结构也作为 1 个血管计数, 管腔及内含红细胞并非计数所必须。每个标本计数 5 个高倍视野(200 倍, 0.74 mm^2/视野)下微血管数量, 取其平均值作为该病例的 MVD 值。

1.5　缺血心肌 VEGF mRNA 的测定

采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测缺血心肌 VEGFmRNA 的表达。VEGF 引物参照文献[6], 由上海基康生物技术有限公司合成, 5′-GCTCTCTTGGGTGCAC TGGA-3′, 5′-CACCGCCTTGGCTTGTCACA-3′, 扩增长度为 563 bp, 431 bp, 内参照为 β-actin, 5′-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3′, 5′-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3′, 扩增长度为 300 bp。心肌总 RNA 的提取参照 Tripure 说明书(Roche 公司), 经甲醛电泳证实 RNA 的完整性后, 在紫外分光光度仪(BECKMAN, 德国)上测定 A_{260} 与 A_{280} 的 OD 之比值在 1.8 ~ 2.0, 在波长 260 nm 时测定总 RNA 的浓度, 计算出进行 RT-PCR 所需的样品量。按照一步法 RT-PCR 试剂盒(Promega, 美国)提供的说明书加入 RT-PCR 反映所需试剂、引物、RNA 样品、*Taq* 酶、无 RNA 酶无菌水至终体积 50 μl。扩增条件 95 ℃变性 30 s, 65 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 45 s, 重复循环 35 次。反应完成后取 PCR 产物 10 μl, 加载样缓冲液在 1.5%的琼脂糖凝胶(含 0.5 μg/ml 溴化乙锭)上电泳, 电泳完毕后紫外灯下照片。图像输入仪摄取产物 DNA 和内参照 DNA 电泳条带图像, 全自动图像分析系统转化为灰度值, 产物 DNA 合内参 DNA 电泳条带图像灰度值之比即为样品 mRNA 相对含量。

1.6　缺血心肌 VEGF 蛋白的测定

采用 Western blot 检测缺血心肌 VEGF 蛋白质的表达。按照分子克隆手册将液氮冷冻组织进行 SDS-PAGE 蛋白电泳, 转印, 抗体反应(小鼠抗 VEGF 单克隆抗体, Santa Cruz 公司), 最后化学发光法显带。

1.7　统计学处理

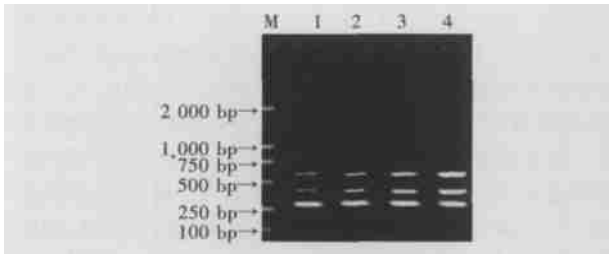
数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对 PCR 产物电泳条带和蛋白免疫印迹, 采用 Bio-Rad 公司的 Quantity one 图像分析系统进行定量分析, 采用 SPSS 统计软件进行方差分析。

2　结果

2.1　rhGH 增加急性心肌梗死大鼠缺血心肌 VEGF mRNA 的表达

急性心肌梗死发生后 28 d, MI 组大鼠心肌 VEGF mRNA 的表达较假手术组增高[(0.66 ± 0.20) *vs* (0.46 ± 0.12), $P < 0.05$], 表明急性心肌梗死本身即可促进心肌 VEGF mRNA 的表达, 这可能是机体的一种代偿机制, 而 rhGH 可以进一步增加 VEGF mRNA 在缺血心肌的表达, GH_1 组比 MI 组: [(1.19 ± 0.38) *vs* (0.66 ± 0.20), $P < 0.01$]; GH_2 组比 MI 组: [(2.84 ± 0.31) *vs* (0.66 ± 0.20), $P < 0.001$]; 如图 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net



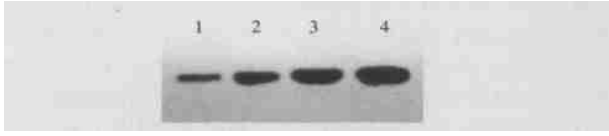
M: PCR marker; 1: Control; 2: MI group; 3: GH_1group; 4: GH_2group

图1 rhGH 对 AMI 大鼠缺血心肌 VEGF mRNA 表达的影响

Fig 1 Effects of rhGH on VEGF mRNA expression in ischemic myocardium of AMI rats

2.2 rhGH 增加急性心肌梗死大鼠缺血心肌 VEGF 蛋白质的合成

28 d后, MI 组大鼠心肌 VEGF 蛋白的表达较假手术组增高(4.24±1.03 *vs* 2.31±0.52, $P<0.05$), GH_1 组比 MI 组: 6.27±0.75 *vs* 4.24±0.75, $P<0.01$; GH_2 组比 MI 组: 7.84±1.20 *vs* 4.24±0.75, $P<0.01$。如图2。



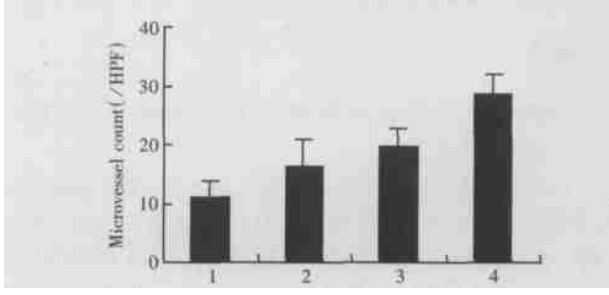
1: Control; 2: MI group; 3: GH_1group; 4: GH_2group

图2 rhGH 对 AMI 大鼠缺血心肌 VEGF mRNA 表达的影响

Fig 2 Effects of rhGH on VEGF protein synthesis in ischemic myocardium of AMI rats

2.3 rhGH 对缺血心肌侧支循环形成的影响

28 d 后, GH_1 组大鼠缺血区微血管数高于心肌梗死组[(19.8±2.9)比(16.4±4.4)/高倍视野, $P<0.05$], GH_2 组大鼠缺血区微血管数明显高于心肌梗死组[(28.5±3.6)比(16.4±4.4)/高倍视野, $P<0.001$], GH_2 组大鼠缺血区微血管数明显高于 GH_1 组[(28.5±3.6)比(19.8±2.9)/高倍视野, $P<0.001$], 如图3。



1: Control; 2: MI group; 3: GH_1group; 4: GH_2group

图3 rhGH 对 AMI 大鼠缺血心肌微血管数目的影响

Fig 3 Effects of rhGH on microvessel density in ischemic myocardium of AMI rats

3 讨论

冠状动脉性心脏病(coronary artery disease, CAD)是世界上具有最高发病率和死亡率的疾病。目前主要的治疗手段如药物治疗、经皮冠状动脉介入治疗和冠状动脉旁路移植手术等虽然有效地降低了 CAD 患者的死亡率, 但超过 15%的患者因为冠状动脉病变的复杂性, 无法耐受介入性的或依赖外科手术完成的血运重建, 另外有相当一部分病人在接受了上述治疗后症状并未完全缓解, 因为心肌血供没有恢复到正常的水平。在冠状动脉高度硬化或阻塞后, 受到局部缺血缺氧的刺激, 局部促血管生长因子合成增加, 机体生成新的侧枝血管来部分缓解缺血, 但这个自发性的生理应答反应(即血管发生)通常很慢, 而且不能完全补偿损失的血供。这可能与血管生长因子表达过低或是机体由于各种原因对它们的反应减弱有关。补充血管生长因子可以部分地克服这些缺陷。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前动物和临床实验研究得最为深入的促血管生长因子。实验证明它们在体内及体外均有很强的促进血管再生的活性[6,7]。

GH 是一种在体内具有广泛作用的激素, 其促进血管再生的作用机制目前还不完全清楚。现有的研究认为可能的机制包括: ①促进有丝分裂。在细胞循环周期特别是在 G_0-G_1 和 G_1-Gs 阶段, GH 刺激细胞 RNA、DNA 的合成, 促进内皮细胞、平滑肌细胞以及成纤维细胞的有丝分裂, 进而促进细胞增殖。②刺激细胞迁移。刺激血管内皮细胞迁移使其形成血管管腔; 刺激血管平滑肌细胞和血管周细胞的增殖迁移以维持新生血管的稳定性[3~5]。GH 对心肌细胞多种基因的表达具有调节作用[2], 我们的实验显示 GH 可以促进急性心肌梗死大鼠缺血心肌血管再生, 促进具有明显促血管生长活性的 VEGF 在缺血心肌局部的表达, 并可能存在一个初步的量效关系。这可能是GH 除了直接促进形成血管的各种细胞的增殖迁移外, 从细胞因子途径发挥促进血管再生作用。

年龄是缺血性心脏病的重要因素。进入老年期后, 随着年龄增长, 机体 GH 的合成释放逐渐下降, 老年患者冠状动脉狭窄或阻塞后侧支循环形成不足可能与较低水平的全身和/或局部 GH 浓度有关[8]。rhGH 是一种已广泛应用于临床的药物, 相对于 VEGF 基因和 VEGF 重组蛋白质治疗来说, 获取较为容易, 价钱相对低廉, rhGH 的补充治疗将是对缺血性心脏病血管再生性治疗的有益探索。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献：

[1] Cittadini A, Isgaard J, Monti M G, *et al*. Growth hormone prolongs survival in experimental postinfarction heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(2): 2154—2163.

[2] Jin H X, Yang R H, Lu H W, *et al*. Effects of early treatment with growth hormone on infarct size, survival, and cardiac gene expression after acute myocardial infarction[J]. Growth horm IGF Res, 2002, 12(4): 208—215.

[3] Oomen P H N, Beentjes J A M, Bosma E, *et al*. Reduced capillary permeability and capillary density in the skin of GH-deficient adults: improvement after 12 months GH replacement[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2002, 56(4): 519—524.

[4] Smith L, Kopchick J, Chen W, *et al*. Essential role of growth hormone in ischemia-induced neovascularization retinal[J]. Science, 1997, 276 (5319): 1706—1709.

[5] Corbacho A M, Martinez De La Escalera G, Clapp C. Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis[J]. J Endocrinol, 2002, 173(2): 219—238.

[6] Ishii Y, Ushida T, Tateishi T, *et al*. Effects of transcutaneous topical injection of oxygen on vascular endothelial growth factor gene into the healing ligament in rats[J]. J Orthop Res, 2003, 12(6): 1113—1117.

[7] Matsunaga T, Warltier D C, Weihrauch D W, *et al*. Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide[J]. Circulation, 2000, 102(25): 3098—3103.

[8] Sonntag W, Lynch C D, Cooney P T, *et al*. Decreased in cerebral microvasculature with age are associated with the decline in growth hormone and insulin-like growth factor 1[J]. Endocrinology, 1997, 138(8): 3515—3520.

（编辑 张 宁）

文章编号：1000-5404(2004)13-1151-01

个案与短篇

无害性心脏杂音 1 例分析

Analysis of a case of innocuous heart murmur

但三利 （重庆市沙坪坝区人民医院内科，重庆 400030）

患者，男，20 岁，发现心脏杂音 19.5 年。于多家医院就诊，行心脏彩超检查，均提示室间膈缺损的可能性大。19.5 年来，患者无明显的心慌、气促、夜间阵发性呼吸困难等症状，体力不受限，与同龄相比，发育无明显差异。其母亲否认孕娠期有明显的受凉感冒史及服药史，患者为足月顺产。于 2003 年 5 月 8 日来我院行体检，进一步明确病变情况而准备行心脏介入治疗，以免影响高考。查体：体温正常，发育正常，营养好，唇红，颈静脉无怒张，胸无畸形，双肺(－)，心界不大，心率 80 次/min，心音有力，胸骨左缘 2、3、4 肋间可闻及 5/6 级较粗糙的全收缩期杂音，P2 稍亢进。腹部(－)，双下肢不肿。于我院行心电图、胸片检查均正常，心脏彩超仍考虑室间膈缺损的可能性大，各腔室无明显扩大。到我市一家三级甲等医院行心脏介入治疗，再次行心脏彩超仍提示室间膈肌部小缺损而收住院。术前行 3 大常规、甲状腺功能 5 项、血粘度检查均正常。行心导管检查：左室造影，未见心室水平分流、肺动脉也未显影，测定主动脉收缩压和左心室收缩压不存在压力差(均为 110 mmHg)；右心导管经右心房、右心室到肺动脉测压，肺动脉收缩压和右心室收缩压均为 28 mmHg。检查结果：心血管无异常，排除室间膈缺损、房间膈缺损、瓣膜疾病等。诊断为无害性心脏杂音。

讨论

正常血液在血管内向前流动呈层流状态，不产生杂音。如血流加快、管径异常、血流紊乱或血粘度改变，则血流由层流变为湍流(骚动血流)，进而形成旋涡，撞击心壁、瓣膜、腱索或大血管壁使之产生振动，在相应的部位可听到声音即杂音[1]。杂音一般分病理性和功能性，功能性杂音即为无害性杂音。功能性杂音一般为柔和吹风样，强度在 2/6 级以下，时限较短。而该病员自幼即发现心脏杂音，且杂音的性质为 5/6 级较粗糙的全收缩期杂音，从临床上很容易误诊为病理性杂音。根据相关检查，排除因管径异常、血流紊乱或血粘度改变引起，排除因贫血、甲亢、发热等血流速度加快引起。分析其产生的可能原因：患者为青年，心肌发育良好，心脏收缩有力，因此血流速度快，快速射血入肺动脉干和主动脉干内，形成湍流而出现杂音的可能性大。这例病例告诉我们：① 在临床工作中，不是一旦闻及粗糙的全收缩期杂音，排除贫血、甲亢、发热等血流速度加快的原因，就考虑为病理性杂音。在青少年，要结合病史及相关检查综合考虑该杂音为病理性或生理性。② 超声医生也应引起重视：也不要被临床表现所误导，避免误诊。③ 心脏超声对心脏疾病是间接检查，给临床医生诊断疾病提供很大的帮助，但绝不能完全依赖它，作为临床医生，诊断的思路要广、深，提高诊断水平，减少误诊的发生。

关键词：无害性心脏杂音；室间隔缺损
中图法分类号：R541.7 文献标识码：B

参考文献：

[1] 戚 仁，王友赤. 诊断学[M]. 第 4 版. 北京：人民卫生出版社，1998. 6.

（编辑 陈聪连）

作者简介：但三利(1968－)，女，重庆市人，主治医师，主要从事心血管内科治疗方面的研究。电话：(023)65318778

收稿日期：2004-04-27；修回日期：2004-06-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net