

胎盘生长因子对急性心肌梗死大鼠血管新生的影响及心肌保护作用

罗礼云¹, 陈柏荣¹, 黄茵¹, 黄涌泉², 殷月兰¹, 陈剑¹, 伍卫¹
(中山大学附属第五医院 1.心血管内科, 2.超声科, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】观察重组胎盘生长因子治疗对急性心肌梗死大鼠心肌梗死边缘区血管新生的影响及其心肌保护作用。【方法】冠状动脉结扎法建立大鼠急性心肌梗死模型, 30 只 SD 雄性大鼠被随机分为三组: 假手术组, 对照组(生理盐水心肌内注射)及重组胎盘生长因子治疗组。在冠脉结扎后 4 周, 超声心动图评估大鼠心脏结构及功能, Masson 染色测定梗死面积, ELISA 法检测各组大鼠血浆脑钠肽(BNP)水平; 采用免疫组织化学技术检测大鼠心肌梗死边缘区 CD31 阳性的内皮细胞数量及 α -SMA 阳性平滑肌细胞数量, 以评估新生血管情况, Western blot 检测梗死边缘区胶原-1 蛋白含量。【结果】冠状动脉结扎后 4 周, 与对照组相比, 重组胎盘生长因子治疗组 LVEF、LVFS 明显升高, 而 LVEDD 及 LVESD 降低($P < 0.01$), 且梗死面积明显缩小($P < 0.01$), 血浆 BNP 水平亦较低($P < 0.01$), 而梗死边缘区 CD31 阳性的内皮细胞及 α -SMA 阳性平滑肌细胞密度则高于对照组($P < 0.01$), 梗死边缘区胶原-1 蛋白含量则低于对照组($P < 0.01$)。【结论】重组胎盘生长因子心肌内注射可促进急性心肌梗死大鼠梗死心肌边缘区毛细血管及小动脉新生, 减少胶原-1 蛋白含量, 并可达到改善左心收缩功能、降低血浆 BNP 水平、缩小梗死面积的心肌保护作用。

关键词:急性心肌梗死; 血管新生; 胎盘生长因子

中图分类号: R54 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2016)02-0222-06

Effect of Angiogenesis and Cardioprotective Activity of Placental Growth Factor in a Rat Model of Acute Myocardial Infarction

LUO Li-yun¹, CHEN Bai-rong¹, HUANG Yin¹, HUANG Yong-quan², YIN Yue-lan¹, CHEN Jian¹, WU Wei¹
(1. Department of Cardiology, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhuhai 519000, China; 2. Department of Ultrasonic Department, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhuhai 519000, China)
Corresponding to: WU Wei, E-mail: wuwei9@mail.sysu.edu.cn

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of angiogenesis in peri-infarct area of the placental growth factor therapy for acute myocardial infarction rats and its cardioprotective activity. 【Method】 The AMI rats model was established by ligation of the left anterior descending of coronary arteries. Thirty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: sham group, normal saline group (control group) and PlGF group. Four weeks after ligation and treatment, cardiac function, scar area, plasma concentration of BNP, angiogenesis and arteriogenesis, myocardial collagen I protein expression were studied. Echocardiography, Masson staining, enzyme-linked immunosorbent assay, immunohistochemistry, Western Blot were performed. 【Result】 Four weeks after ligation, compared with the control group, LVEF, LVFS were higher in PlGF group, While LVEDD and LVESD decreased obviously ($P < 0.01$). Average scar percentage and plasma concentration of BNP were lower in PlGF group ($P < 0.01$). The mean CD31-positive microvessels and α -SMA positive microvessels of the peri-infarct area were higher in PlGF group ($P < 0.01$), while collagen I protein content was decreased in this group ($P < 0.01$). 【Conclusion】 PlGF intervention improves cardiac function and reduces infarction size in AMI rats, the possible mechanism is related to dual function of promoting angiogenesis and arteriogenesis, reducing collagen I expression is also one of the important mechanisms.

Key words: acute myocardial infarction; angiogenesis; placental growth factor

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2016, 37(2):222-227]

收稿日期: 2015-11-10

基金项目: 珠海市科技局课题(2015A1009)

作者简介: 罗礼云, 主治医师, 在读博士生, 研究方向: 缺血性心脏病, E-mail: 510331873@qq.com; 伍卫, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: wuwei9@mail.sysu.edu.cn

尽管药物治疗、经皮冠状动脉介入治疗及外科手术(冠状动脉旁路移植术)已取得令人瞩目的进展,缺血性心脏病仍然是主要严重危害人类健康及生命的疾病。对急性心肌梗死患者梗死相关动脉进行的再灌注治疗挽救了濒临坏死的心肌细胞,减少左心室梗死面积,从而在过去几十年减少了约30%的死亡率,但由于充血性心力衰竭而入院的心肌梗死存活者依然为数众多^[1],为提高急性心肌梗死患者心功能及改善其临床转归,对辅助性治疗方法包括干细胞移植及生长因子治疗的研究受到国内外学者的重视。其中治疗性血管新生疗法(therapeutic neovascularization)是一种有前景的治疗缺血性心脏病的方法^[2],在众多可能促进缺血心肌血管生长的因子中,胎盘生长因子(placental growth factor, PIGF)因其较强的促进血管新生功能已成为国内外研究的热点^[3]。PIGF属于血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)家族成员,相比VEGF,PIGF不仅具有更强的促进血管新生作用,且无水肿、纤维素沉积和新生血管瘤等不良作用^[4]。国外学者尝试应用外源性重组PIGF治疗急性心肌梗死大鼠,结果发现PIGF治疗可改善大鼠左心室射血分数、减小梗死面积、促进血管新生等,从而达到改善心室重塑及心功能的目的^[5]。但PIGF改善心室重塑的机制尚未完全明确,本研究拟从血管新生及对心肌胶原-1表达的影响两方面探讨PIGF心肌保护的机制。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

30只SPF级雄性SD(Sprague-Dawley)大鼠,体质量250~300g,由中山大学实验动物中心提供。戊巴比妥钠购自上海西唐科技有限公司,重组PIGF-2购自美国R&D Systems公司,抗CD31抗体、一抗胶原-I购自美国Abcam公司, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体购自美国Novus公司,大鼠血浆脑钠尿肽ELISA试剂盒由武汉华美生物科技(CUSABIO)提供。

1.2 大鼠急性心肌梗死模型建立及分组

大鼠被随机分为假手术组、对照组及重组PIGF-2治疗组,每组10只。大鼠心肌梗死模型建立大概步骤如下^[6]:称重后以1%戊巴比妥(30~45 mg/kg)腹腔内注射麻醉,经口行气管插管成功

后连接小动物呼吸机(呼吸机参数:呼吸比2:1,潮气量30 mL/kg,呼吸频率65~80次/min),无菌操作下于左胸前区第三、四肋间行胸廓切开术,暴露心脏,撕开心包膜,于左心耳下缘2~3 mm处用6-0缝合线结扎左冠状动脉前降支,进针深度约2 mm(假手术组只穿线,不结扎)。结扎后肉眼可见结扎局部下方和左心室前壁呈灰白至紫绀,且II导联心电图R波增高伴明显切迹(ST段抬高)并持续15 min以上即为心肌梗死结扎成功标志。确认模型建立成功后10 min进行心肌内注射相应试剂,对照组:300 μ L生理盐水,PIGF治疗组:2 μ g重组PIGF与生理盐水稀释成300 μ L,注射部位分别位于梗死区上部、中部及下部)。注射完成后逐层缝合胸腔,逐渐撤停呼吸机,恢复自主呼吸。待大鼠呼吸稳定后,清醒后拔出气管插管,放入笼内继续饲养(房间温度24~26 $^{\circ}$ C)4周。

1.3 超声心动图评估心脏结构及功能

冠状动脉结扎术前及术后4周,1%戊巴比妥腹腔内注射麻醉状态下进行大鼠经胸超声心动图检查(飞利浦IE33,12 MHz探头),以胸骨旁短轴切面,M超测量左室舒张末内径(LVEDD)、左室收缩末内径(LVESD)。LVEDD定义为一个心动周期内的左室的最大内径,与之对应,LVESD定义为一个心动周期内的左室最小内径,以连续三个心动周期测量值的平均值作为检测数据。左室短缩分数(LVFS)=(LVEDD-LVESD)/LVEDD \times 100%。根据Teichholz公式^[7]计算左室射血分数(LVEF)。

1.4 Masson染色梗死面积测定

冠脉结扎后4周,处死大鼠后迅速开胸切取心脏,用生理盐水清洗并去除心腔内残余血液,在长轴中点处垂直于长轴将左心室一分为二,心尖侧的一半心肌组织于4%甲醛溶液中固定,保存24 h后经石蜡包埋,取5 μ m厚的切片行病理组织学检查,Masson染色定量测定梗死面积,坏死瘢痕组织被染为蓝色,存活心肌组织被染为红色。应用图像处理软件Image J测量梗死面积并取平均值^[8],梗死面积=(瘢痕内弧长+瘢痕外弧长)/(外周长+内周长) \times 100%。

1.5 ELISA法检测各组大鼠血浆脑钠尿肽(BNP)浓度

冠状动脉结扎后4周,戊巴比妥腹腔注射麻醉,切取心脏标本前先从腹主动脉抽取动脉血,离心去除颗粒后于分装保存于-70 $^{\circ}$ C冰箱备用,按照大鼠钠尿

肽 ELISA 检测试剂盒 (CBS-E07972R, CUSABIO, 中国)说明书提供的实验步骤进行检测^[9]。

1.6 免疫组化检测梗死边缘区血管新生

采用免疫组化技术检测大鼠心肌梗死边缘区血小板-内皮细胞黏附分子(CD31)阳性的内皮细胞数量,以评估新生毛细血管情况,检测抗 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)阳性平滑肌细胞数量,以评估新生小动脉情况^[10]。将组织切片在室温中放置 60 min 或 60 °C 恒温箱中烘烤 20 min,脱蜡和水化后用蒸馏水或 PBS 配置新鲜的 3% H₂O₂, 室温封闭 5 ~ 10 min, PBS 洗 3 次,每次 2 min。滴加封闭液,室温 10 min,滴加一抗(抗 CD31 抗体/ α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体),4 °C 过夜,滴加羊抗或兔 IgG 抗体-HRP 多聚体,室温孵育 1 h, DAB 显色,蒸馏水洗后脱水、透明,中性树脂 50 μ L 封片,选择 5 个梗死区视野,计算 CD31 阳性微血管数量(200 倍目镜下)及 α -SMA 阳性血管数量(100 倍目镜下)。

1.7 Western Blot 检测梗死边缘区胶原-1 蛋白含量

收集细胞蛋白后,采用 6% 聚丙烯酰胺凝胶分离目的蛋白,经 SDS-PAGE 电泳后将蛋白转至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭后,将一抗胶原-I (使用浓度 1:3000)4 °C 孵育过夜后,用 TBST 每次 7 min 洗两次后,用相应的稀释好的二抗(HRP 标记山羊抗兔二抗,使用浓度 1:3000)室温下孵育 1 ~ 2 h 后,用 TBST 每次 7 min 洗 3 次后,进行化学发光显影(ECL)^[11]。用 Image J 分析目标条带的光密度值。以 beta-actin(使用浓度 1:5000)作为内参照,比较不同处理后蛋白表达的差异。

1.8 统计学分析

应用 IBM SPSS 21.0 统计软件进行统计分析。数据采用均数 \pm 标准差(means \pm SD)表示。多组间均数比较采用单因素方差分析(正态分布资料)或 Kruskal-Wallis 检验(非正态分布资料),两组间均数比较采用 Post-hoc 检验(LSD 法)。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 超声心动图对大鼠心功能的评估

在冠状动脉结扎前,超声心动图测得 LVEDD, LVESD, LVEF 及 LVFS 各项指标在各组大鼠之间

无统计学差异(P > 0.05)。冠状动脉结扎后 4 周,超声心动图检查发现心肌梗死组(对照组)大鼠心室前壁运动减弱或消失,反映心室收缩功能的指标 LVEF、LVFS 较假手术组显著降低,LVEDD 及 LVESD 则显著升高(P < 0.01)。与对照组相比,PIGF 治疗组 LVEF、LVFS 明显升高,而 LVEDD 及 LVESD 明显降低(P < 0.01; 表 1, 图 1)。

表 1 冠脉结扎后 4 周超声心动图
Table 1 Echocardiography parameter four weeks after ligation (mean \pm SD)

Group	LVEDD /mm	LVESD/mm	LVEF/%	LVFS/%
Sham	6.61 \pm 0.86	3.94 \pm 0.20	79.06 \pm 2.89	43.10 \pm 3.24
Control	9.07 \pm 0.24 ¹⁾	7.33 \pm 0.31 ¹⁾	35.10 \pm 0.93 ¹⁾	17.23 \pm 0.66 ¹⁾
PIGF	7.80 \pm 0.38 ¹⁾²⁾	6.26 \pm 0.16 ¹⁾²⁾	50.20 \pm 1.09 ¹⁾²⁾	25.6 \pm 0.52 ¹⁾²⁾
F	50.483	40.650	156.245	48.428
P	0.000	0.000	0.000	0.000

ANOVA and Post-hoc comparisons (LSD). 1) compared with Sham, P < 0.01; 2) compared with control, P < 0.01

2.2 心肌梗死面积测定

冠状动脉结扎后 4 周,Masson 染色结果见图 2。与对照组相比,PIGF 心肌内注射组梗死面积明显减小(P < 0.01, 表 2)。

2.3 大鼠血浆 BNP 浓度比较

单因素方差分析发现三组间 BNP 浓度存在明显差异(P < 0.01),进一步两组间比较((LSD 检验)发现假手术组血浆 BNP 浓度最低,与对照组相比,PIGF 治疗组血浆 BNP 浓度水平明显降低(P < 0.01, 表 2)。

2.4 大鼠梗死周围区新生血管比较

各组大鼠梗死周围区内皮细胞中 CD31 免疫组织化学测定结果见图 3。单因素方差分析发现毛细血管密度(CD31 阳性细胞数量/mm²)在各组间存在差异(P < 0.05),其中假手术组最高(169 \pm 6)/mm², Post-hoc (LSD 法) 检验发现 PIGF 治疗组毛细血管密度(131 \pm 7)/mm² 高于对照组(35 \pm 5)/mm² (P < 0.01), 表 2。-SMA 阳性细胞数量在各组之间亦存在明显差异(图 3),假手术(42.0 \pm 4.6)/mm² 高于其他两组,PIGF 治疗组小动脉密度(-SMA 阳性细胞数量/mm²)(24.2 \pm 3.7)/mm² 明显高于对照组(7.2 \pm 1.7)/mm² (P < 0.01), 表 2。

2.5 大鼠梗死周围区胶原-1 含量比较

心肌梗死后 4 周,Western blot 检测到假手术

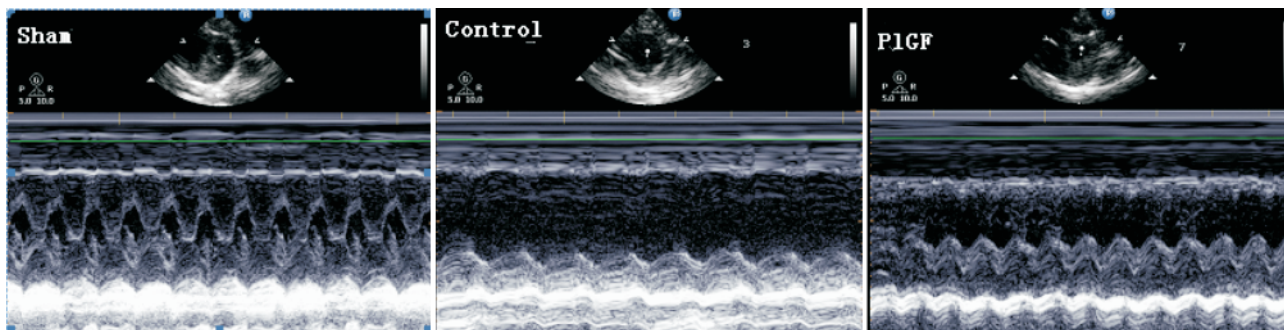


图 1 心肌梗死后超声心动图

Fig.1 Echocardiography of rats after AMI

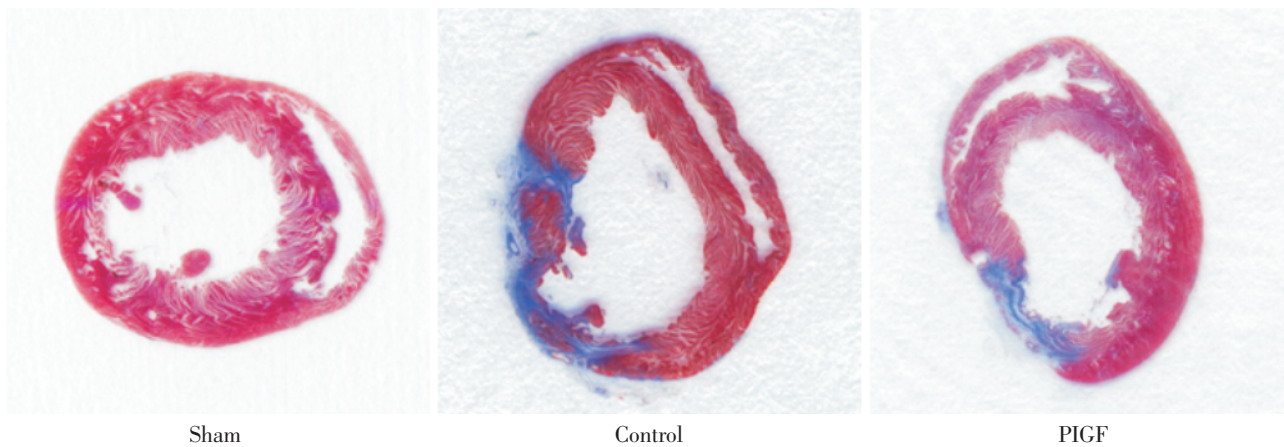


图 2 大鼠心肌 Masson 染色

Fig.2 Masson trichrome staining

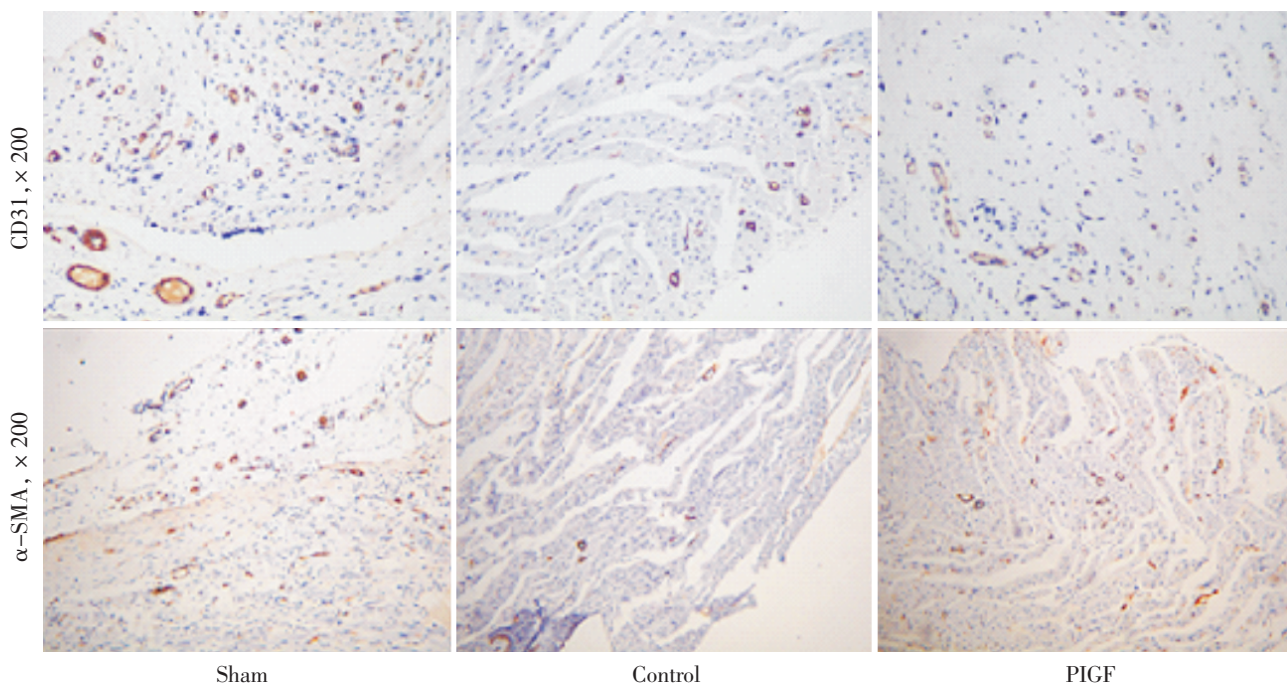


图 3 大鼠心肌免疫组织化学

Fig.3 Immunohistochemical staining

表 2 心肌梗死面积

Table 2 Scar Area

($\bar{x} \pm s$)

Group	Scar area/%	concentration of BNP/(pg/mL)	CD31-positive microvessels/mm ²	α -SMA -positive microvessels/mm ²
Sham	0	141 ± 11	169 ± 6	42.0 ± 4.6
Control	36.01 ± 2.40	1 203 ± 101 ¹⁾	35 ± 5 ¹⁾	7.2 ± 1.7 ¹⁾
PIGF	23.11 ± 3.17	672 ± 49 ¹⁾²⁾	131 ± 8 ¹⁾²⁾	24.2 ± 3.7 ¹⁾²⁾
<i>F</i>	184.26	207.834	442.043	442.043
<i>P</i>	0.001	0.000	0.000	0.000

ANOVA and Post-hoc comparisons(LSD). 1): compared with Sham, $P < 0.01$; 2): compared with control, $P < 0.01$

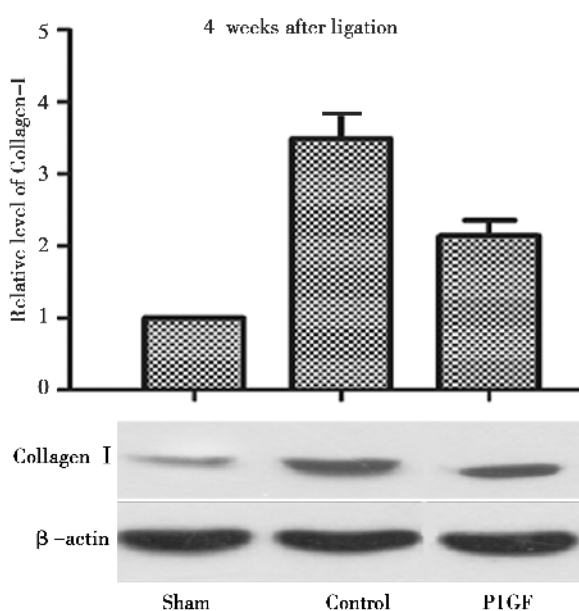


图 4 Western Blot 检测胶原-1 含量

Fig.4 Content changes of collagen-I detected by Western blot

组胶原-1 蛋白含量最低,以假手术组作为参照,与对照组相比,PIGF 治疗组胶原-1 蛋白含量较低 ($P < 0.01$),图 4。

3 讨论

急性心肌梗死仍然是威胁人类生命的严重疾病之一。目前成熟的再灌注治疗特别是直接经皮冠脉介入治疗可迅速开通急性心肌梗死患者的梗死相关动脉,但相当部分患者心肌微循环组织水平灌注仍不理想,这部分患者常出现明显的心室重塑并最终导致心力衰竭。PIGF 作为 VEGF 家族成员,已成为国内外辅助性治疗急性心肌梗死的研究热点。目前的研究发现,外源性重组 PIGF 治疗可改善大鼠左心室射血分数、减小梗死面积,机

制可能与其促进血管新生、调节炎症因子及金属蛋白酶(MMP-2)表达等相关^[4-5,12]。此前的文献报道采用的重组 PIGF 注射剂量、注射方式及观察时机不尽相同。本研究应用 2 μ g 重组 PIGF-2 多点心肌内注射方式,观察到的结果与此前研究较为一致:重组 PIGF 治疗可提高左室射血分数,缩小梗死面积,增加毛细血管及小动脉新生。曾有研究发现 PIGF 治疗组心肌内 BNP mRNA 表达相对于对照组较低^[5],本研究则发现 PIGF 治疗组血浆 BNP 水平降低明显,而 BNP 是心功能不全严重程度及预后不良较为特异性的生物标志物。此前关于 PIGF 改善心室重塑的机制研究主要集中在新生血管、细胞凋亡、炎症反应等方面,尚未见文献报道其对心肌梗死后心肌间质重构方面的影响。本研究首次初步探讨了 PIGF 治疗对间质重构的关键成分胶原-1 的影响,结果发现 PIGF 可减少心肌梗死慢性期梗死边缘区心肌内胶原-1 的含量。

VEGF 虽然具有强大的促进血管新生的功能,但动物实验及临床研究均未发现其改善心室重塑及心功能的作用,而 PIGF 则不同,推测机制可能与其双重功能相关^[13]:既可增加毛细血管增生,又可增加小动脉增殖。但 PIGF 增强梗死边缘区血管新生的机制仍未完全阐明,目前发现 PIGF 通过与特异性受体 VEGFR-1/酪氨酸激酶受体 (fms-lityrosine kinase-1, Flt-1) 以膜结合状态结合于细胞表面,作用于多种细胞如内皮细胞、平滑肌细胞、炎症细胞(如单核细胞)及内皮祖细胞等。PIGF 通过结合 Flt-1,激活 PI-3K/Akt、p38MAPK/ERK、JAK/STAT3 等下游信号转导通路,促进内皮细胞的迁移、增殖和存活直接刺激血管新生,促进平滑肌细胞的增殖和募集使血管成熟,动员骨髓造血干细胞、募集单核-巨噬细胞分化和激活进而促进

血管生长。

本研究发现 PIGF 的心肌保护作用还可能与其对梗死周围区心肌内胶原-1 蛋白表达的影响相关。胶原-1 是细胞间基质的主要成分,在心肌梗死后心肌纤维化过程中扮演重要角色,调节胶原合成已成为治疗心室重塑的重要靶点^[14]。PIGF 减少急性心肌梗死慢性期梗死周围区心肌内胶原-1 表达的可能的机制包括:随着新生血管增加,心肌组织水平缺血、缺氧得到改善,基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(TIMP-2)及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)表达增加,导致胶原-1 降解增加^[12]。其次,PIGF 可作用于炎症细胞,减少促炎介质如 TNF- α ,IL-6 的释放,而上述炎症介质可促进胶原-1 合成增加^[4]。

参考文献

- [1] SINGH P, SETHI N, KAUR N, et al. Revascularization in severe left ventricular dysfunction: does myocardial viability even matter? [J]. Clin Med Insights Cardiol, 2015, 9(Suppl 1): 105-109.
- [2] LASSALETTA AD, CHU LM, SELLEKE FW. Therapeutic neovascularization for coronary disease: current state and future prospects [J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(6): 897-909.
- [3] NAGY JA, DVORAK AM, DVORAK HF. VEGF-A (164/165) and PIGF: roles in angiogenesis and arteriogenesis [J]. Trends Cardiovasc Med, 2003, 13(5): 169-175.
- [4] BINSALAMAH ZM, PAUL A, KHAN AA, et al. Intramyocardial sustained delivery of placental growth factor using nanoparticles as a vehicle for delivery in the rat infarct model [J]. Int J Nanomed, 2011, 6: 2667-2678.
- [5] TAKEDA Y, UEMURA S, IWAMA H, et al. Treatment with recombinant placental growth factor (PIGF) enhances both angiogenesis and arteriogenesis and improves survival after myocardial infarction [J]. Circ J, 2009, 73(9): 1674-1682.
- [6] CHEN J, ZHENG S, HUANG H, et al. Mesenchymal stem cells enhanced cardiac nerve sprouting via nerve growth factor in a rat model of myocardial infarction [J]. Curr Pharm Design, 2014, 20(12): 2023-2029.
- [7] WYKRZYKOWSKA JJ, ROSINBERG A, LEE SU, et al. Autologous cardiomyotissue implantation promotes myocardial regeneration, decreases infarct size, and improves left ventricular function [J]. Circulation, 2011, 123(1): 62-69.
- [8] CHEN G, NAYAN M, DUONG M, et al. Marrow stromal cells for cell-based therapy: the role of antiinflammatory cytokines in cellular cardiomyoplasty [J]. Ann Thorac Surg, 2010, 90(1): 190-197.
- [9] LI J, YIN FF, HOU YL. Early diagnosis of rats with acute myocardial infarction by measurement of brain natriuretic peptide [J]. Exp Ther Med, 2013, 5(4): 1201-1205.
- [10] RENDELL MS, FINNEGAN MF, PISARRI T, et al. A comparison of the cutaneous microvascular properties of the spontaneously hypertensive rat and the Wistar-Kyoto rat [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 1999, 122(4): 399-406.
- [11] VOISINE P, BIANCHI C, KHAN TA, et al. Normalization of coronary microvascular reactivity and improvement in myocardial perfusion by surgical vascular endothelial growth factor combined with oral supplementation of L-arginine in a porcine model of endothelial dysfunction [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 129(6): 1414-1420.
- [12] LU ZX, MAO LL, LIAN F, et al. Cardioprotective activity of placental growth factor in a rat model of acute myocardial infarction: nanoparticle-based delivery versus direct myocardial injection [J]. BMC Cardiovasc Disord, 2014, 14: 53.
- [13] RONCAL C, BUYSSCHAERT, CHORIANOPOULOS E, et al. Beneficial effects of prolonged systemic administration of PIGF on late outcome of post-ischaemic myocardial performance [J]. J Pathol, 2008, 216(2): 236-244.
- [14] BORNSTEIN P. Matricellular proteins: an overview [J]. J Cell Commun Signal, 2009, 3(3/4): 163-165.

(编辑 孙慧兰)