

STZ 诱导糖尿病大鼠心肌 VEGF 表达及血管密度变化对缺血再灌注损伤的影响

马国川¹, 夏焱², 苏浩彬², 陈环², 刘彩红³, 岑丹阳², Ruth B. Caldwell⁴, R. William Caldwell⁵
(1. 广东省体育运动技术学院体育医院, 广东 广州 510100; 2. 中山大学附属第二医院儿科, 广东 广州 510120; 3. 广东药学院研究生处, 广东 广州 510006; 4. 佐治亚医学院, 生物学血管中心; 5. 药理学和毒理学系, 奥古斯塔, GA 30901, 美国)

摘要: [目的] 测定不同周期 STZ 诱导的糖尿病对心肌缺血/再灌注 (I/R) 损伤的影响及其与心肌 VEGF 表达及冠脉血管密度变化的关系。 [方法] 阻断和开放左冠状动脉前降支建立大鼠急性心肌 I/R 模型。分别用 TTC 染色、免疫印迹分析及 Morphometric 分析方法, 测定大鼠心肌 I/R 后梗死面积、VEGF 表达及冠脉血管密度。 [结果] STZ 处理后 2 周, 糖尿病组 (2WD) 心肌梗死面积比相应周期对照组 (2WC) 明显缩小; STZ 处理后 16 周 (16WD), 梗死面积比相应对照组 (16WC) 增加; Morphometric 分析显示, 心脏的冠脉血管密度在 2WD 组比 2WC 组显著增加 (28%), 而 16WD 组比 16WC 组明显减少 (33%); 血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的表达在 2WD 组比 2WC 组显著增加 (30%), 但在 16WD 组大鼠 VEGF 表达比 16WC 组明显减少。 [结论] STZ 诱导糖尿病早期、晚期对心肌 I/R 损伤呈现相反的作用。这可能是由于早、晚期糖尿病相反的心肌 VEGF 表达及冠脉血管密度改变而引起的。

关键词: 糖尿病; 缺血/再灌注; 血管内皮生长因子; 新血管生成, 心肌

中图分类号: R543.7, R587.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0281-04

Effects of STZ-induced Diabetes on Ischemic/Reperfusion Injury of Rats Myocardium via Alterations in VEGF Expression and Angiogenesis

MA Guo-chuan¹, XIA Yan², SU Hao-bin², CHEN Huan², LIU Cai-hong³, CEN Dan-yang²,
Ruth B. Caldwell⁴, R. William Caldwell⁵

(1. Sports Hospital, Sports Technical Institute of Guangdong, Guangzhou 510100, China; 2. Department of Pediatric, The Second Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Graduate Section, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 4. Vascular Biology Center, 5. Department of Pharmacology & Toxicology Medical College of Georgia, Augusta, GA 30901, USA)

Abstract: 【Objective】 To determine the effects of different-term STZ-induced diabetes on ischemia/reperfusion (I/R) injury of myocardial and to determine whether I/R injury is related to diabetes-induced alterations in vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and cardiac vascular density. 【Methods】 The models of I/R injury were induced by occlusion and reperfusion of the left descending coronary artery of rats. Size of I/R-induced infarct was determined using triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. VEGF expression was quantified by Western blot analysis. Cardiac vascular density was quantified by morphometric analysis. 【Result】 Two weeks after STZ treatment, infarct size was decreased in the 2 weeks diabetic hearts (2WD) as compared with time-matched control group (2WC). Whereas after 16 weeks of diabetes (16WD), the infarct size was increased in the diabetic hearts as compared with the 16WC group. Morphometric analysis showed vascular density in the heart was significantly increased in 2WD group as compared with the 2WC (by 28%) while there was decreased (by 33%) in 16WD compared with 16WC group. VEGF expression increased in 2WD group by 30%, but was lower in 16WD rats than in 16WC rats. 【Conclusion】 Short- and long-term STZ induced diabetes exert opposite influences on myocardial I/R injury, and

收稿日期: 2005-04-12

基金项目: 美国 NIH 基金 (RO1 HL 70215-01)

作者简介: 马国川 (1969-), 男, 甘肃张川人, 留美博士后, 副主任医师; 夏焱, 博士, 通讯作者。E-mail: kellyxia2005@gmail.com

these contradictory influences may depend on different alterations in VEGF expression and angiogenesis.

Key words: diabetes; ischemia/reperfusion; VEGF; angiogenesis, myocardial

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):281-284]

冠状动脉疾病是糖尿病的主要的并发症, 合并糖尿病的冠心病病人心肌梗死的发病率和死亡率远高于非糖尿病病人^[1]。与临床研究所不同的是: 糖尿病对心肌局部缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤的实验研究呈现出矛盾的结果, 包括减轻、增加或随病期改变心肌 I/R 损伤^[2-4]。让人感兴趣的是: 实验研究报告链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病动物模型在 I/R 实验时具有心肌保护作用, 类似于缺血预适应反应^[2]。遗憾的是其保护机制仍未完全明了, 因此, 对糖尿病动物在 I/R 时保护心肌作用机理的研究, 对临床治疗糖尿病并发心血管疾病具有非常重要的意义。在糖尿病患者的肝脏中, 血管新生 (angiogenesis) 是最近几年新的研究趋势, 血管新生是指在缺血心肌已有的血管床上, 促进内皮细胞发芽长出新支, 形成血管网。众所周知, 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 是刺激新血管生成的特定因素之一。我们测定了不同时期 STZ 糖尿病心脏 VEGF 表达、冠脉血管变化及其对 I/R 损伤的影响。

1 研究对象和方法

1.1 实验动物与分组

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (Harlan, Madison, Wisconsin, USA), 体质量约 250 g, 随机分成 8 组: 2 周和 16 周的 STZ 处理组 (2WD 和 16WD); 2 周和 16 周的 STZ + I/R (2WD+I/R 和 16WD+I/R) 组, 及时间相对应的对照组 (2WC, 16WC, 2WC+I/R 和 16WC+I/R)。糖尿病是通过尾静脉注射含 STZ (美国 Sigma 公司, 55 mg/kg) 的柠檬酸缓冲液 (0.01 mol/L, pH 4.5) 诱导而成。对照组单独注射等量柠檬酸缓冲液。STZ 注射后 3 d 及 I/R 实验前收集尿样、血样测试尿糖和血糖。血糖超过 22 mmol/L, 尿糖阳性者, 归为糖尿病组。为避免酮症酸中毒, 糖尿病组 STZ 处理后 1 周开始每只鼠皮下注射胰岛素 2 U/d^[5]。该剂量胰岛素仅为预防酮症酸中毒, 注射后糖尿病组血糖仍保持在 22 mmol/L 以上。

1.2 急性心肌局部缺血和再灌注的模型

盐酸氯胺酮 (100 mg/kg) 和甲苯噻嗪 (10 mg/kg) 混合腹腔注射麻醉。右颈静脉插管补充体液, 左颈动脉插管监测血压和心率。气管插管与犬齿动物呼吸机相连。体温用电热垫维持在 37℃。待心率和血压稳定后, 施左胸切开术。暴露左冠状动脉左前降支, 用丝线 (6-0) 缝合形成活的闭环。用止血钳子夹紧闭环造成左心室局部缺血, 心肌缺血的标志是心包膜表面苍白且血压下降。松开止血钳再灌注。再灌注时血压略微上升。实验均为缺血 30 min, 再灌注 2 h。

1.3 心肌梗死面积大小的确定

左心室大小, 梗死面积大小, 缺血区面积如先前文献描述方法测定^[6]。即在 2 h 再灌注后, 左冠状动脉左前降支再次被封闭。埃文斯蓝染料 (2%) 被注入左心室, 缺血区为非蓝染色, 蓝染者为正常灌注区。摘除心脏, 冲洗多余的蓝染料, 将左心室横切为 2 mm 厚切片。切片在 10 g/L 2,3,5- 氯化三苯基四氮唑的磷酸盐缓冲液染色 12 min, 梗死区不染色, 砖红色染色区为可逆活性组织。每层切片的上下两面均拍摄照片, 使用 Metamorph 图像软件分析照片不同区域面积大小。每层切片两边的区域平均计算。缺血区面积表示为总左心室面积的百分比, 梗死面积表示为缺血区面积的百分比。

1.4 VEGF 纯化及免疫印迹分析

分离心脏左心室组织缺血区, 用含苯甲基磺酰氟 1 mmol/L, 偏钒酸钠 2 mmol/L, 10 g/L 蛋白酶抑制剂混合物的放射性免疫沉淀缓冲液冰上匀浆 10 000 ×g, 4 离心 30 min。上清液贮于 -80℃ 冰箱待测。用 Bio-Rad 蛋白测定包测总蛋白质浓度。用 heparin sepharose beads (美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司) 纯化 VEGF, 加样于 40~100 g/L 聚丙烯酰胺胶体中, 用电泳法将蛋白分离, 并转移至硝化纤维薄膜上。薄膜用 50 mL/L 低脂牛奶封闭过夜, 然后用抗-VEGF 抗体 (美国 Santa Cruz Biotech 公司) 标记。对 X 线敏感的化学发光物 (ECL RPN2106, 美国 Amersham Pharmacia 公司) 标记特定抗体, 并曝光于 X 线片上。

1.5 免疫组化法检测冠脉血管密度

用 Bandiera Smiplafolia Isolectin B4 (美国 Vector Laboratories) 来标记冠脉血管的内皮细胞

(红染)。用 Metamorph 图像软件分析系统测定红色光密度代表冠脉血管的密度。

1.6 统计学处理

实验数据用均数 ± 标准差表示, 用 Statview 统计软件做 ANOVA 分析。检验水准 = 0.05。

2 结 果

2.1 动物数据

2 周和 16 周糖尿病组中, 血糖显著升高, 而体重在糖尿病 2 周时增加, 16 周时减少(表 1)。

表 1 体质量和血糖

Group		n	Initial body weight(g)	Body weight (g)	Blood glucose (mmol/L)
2 week	Control	11	257 ± 4	312 ± 3 ²⁾	6.1 ± 0.3
	Diabetic	11	259 ± 4	276 ± 3 ^{1), 2)}	29.0 ± 1.9 ³⁾
16 week	Control	8	261 ± 5	391 ± 6 ²⁾	6.3 ± 0.2
	Diabetic	8	263 ± 6	250 ± 16 ^{1), 2)}	27.6 ± 1.8 ³⁾

1) Diabetic body weight vs the time matched control group, F=351.36, P<0.01; 2) Diabetic body weight vs initial group, F=351.36, P<0.01; 3) Blood glucose diabetic group vs the time matched control group, F=2098.90, P<0.001

2.2 梗死面积大小和缺血区

在 2WD 组, 梗死面积比对照组 2WC 减少(分别为 35.00% ± 3.00%, 51.00 % ± 3.30%), 在 16 WD 组中, 梗死面积比对照组 16WC 组增加 (分别为 61.00% ± 3.00% , 50.00 % ± 2.00%) F=16.4, P < 0.05 缺血区面积大小在 2WC,2WD,16WC,16WD 无组间差异。

2.3 心脏的血管密度

用 Isolectin B4 标记大鼠心脏的血管内皮细胞。Morphometric 分析显示: 2WD 组心脏血管密度

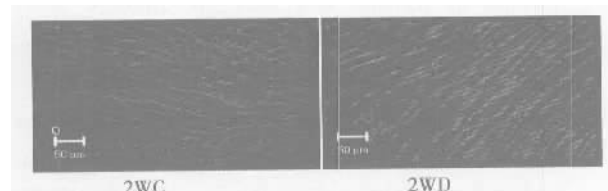


图 1 免疫组化法检测大鼠心脏冠脉血管密度

Fig.1 Cardiac vascular density determined by immunohistochemistry staining

Shows vascular density was significantly increased in rats myocardium (2WD) as compared with the time-matched control (2WC) rats. F=257.2, P < 0.01

比在 2WC 组中增加 28% (图 1), 同时, 16WD 组心脏血管密度比在 16WC 组中减少 33%。

2.4 血管内皮细胞生长因子(VEGF) 的表达

免疫印迹分析显示 VEGF 在 2WD 组中与 2WC 大鼠相比提高 30% (图 2)。此外, VEGF 表达在 16WD 组中与 16WC 大鼠相比减少 29%。



图 2 免疫印迹法测定 STZ 诱导糖尿病心脏 VEGF 的表达 Fig.2 Western blot for VEGF expression in STZ-induced diabetic rat myocardium

VEGF expression increased in 2WD group, but was lower in 16WD rats than in 16WC rats. F=12.1, P < 0.05

3 讨 论

3.1 冠状动脉新血管生成可能是糖尿病早期的一个重要的代偿机制

心肌局部 I/R 损伤随氧耗增加或供氧减少而增加。新血管形成有助于提高心肌组织灌注, 增加心肌氧供。足够数量冠脉血管网的存在以保证缺血区域足够的血供, 是冠状动脉闭塞之后减小梗死面积甚至提供能量保证细胞生存的重要因素。血管新生即原有的血管又产生新的血管。生理情况下血管生长处于相对平衡状态, 当发生缺血、缺氧等应激情况时平衡失控, 血管新生的过程被激活, 导致侧枝血管形成。研究发现, 心肌缺血、缺氧时, 冠脉侧枝的形成可以减少或抵御心肌缺血或坏死, 保证血液的正常供给。有研究证实心肌局部缺血的动物模型和患有冠心病病人中, 新血管和新毛细血管网络均增多^[7,8]。我们的研究显示, 大鼠心脏冠脉血管密度在糖尿病早期(2 周)时较对照组增加, 但至糖尿病 16 周时血管密度显著减少。血管密度增加, I/R 后梗死面积减小; 血管密度减少, I/R 后梗死面积增大。这说明冠脉血管数量增加会储存对心肌局部缺血时的灌注能力, 从而维持心脏正常功能。

3.2 糖尿病早期心脏血管生长素的表达升高但慢性期降低

VEGF 除了促进新血管生成外还可以减轻心肌局部 I/R 损伤^[9]。VEGF 也起着促进内皮细胞增殖和抑制细胞凋亡的作用, 因而是一个促进细胞生存的因素。此外, VEGF 已经被证实具有促进一

氧化氮(NO)合成酶和刺激释放 NO 的作用^[10]。高浓度 NO 舒张血管和增加血流,维持心肌局部缺血时的灌注能力。本实验结果显示, VEGF 在 2WD 大鼠心脏中的表达比对照组升高,但是在 16WD 大鼠却显著减少。这意谓着糖尿病早期心脏 VEGF 表达增加,不但促进细胞的生存,而且促进了冠脉血管密度增加。而糖尿病慢性期时刚好相反,刺激血管生长因子水平下降,因而心肌血管密度降低,心肌局部缺血时的灌注能力下降,细胞生存能力下降。缺氧是促进 VEGF 分泌的主要因素,VEGF 促进血管形成作用较强,它的过度表达或表达不足很大程度影响体内血管形成。促血管生长因子治疗冠心病是近十年来研究热点,动物实验研究已证实 VEGF 可增加冠状动脉闭塞处心肌的血流供应^[11],应用 VEGF 基因治疗冠心病的临床研究^[12]也取得了丰硕的成果,VEGF 治疗冠心病有效、安全、可靠,已进入二期临床研究,可望于近期成为治疗性药物应用于临床及 VEGF 与干细胞移植联合应用。

3.3 治疗性血管增生以减轻心肌缺血对糖尿病合并冠心病的治疗具有重要意义。

从以上分析可知:STZ 诱导糖尿病 2 周时对心脏 I/R 损伤确有保护作用。然而,至糖尿病 16 周时这种保护作用不但消失,而且加重 I/R 的损伤。这种相反的结果似乎取决于糖尿病不同的病理时期心肌 VEGF 的表达和冠脉血管网的改变。早期糖尿病保护心肌免受心肌 I/R 损伤可能是通过促进内皮细胞增殖和抑制细胞凋亡的作用、刺激冠脉毛细血管网络形成、适应性地提高抗 I/R 损伤的能力^[9]。通过治疗性血管增生以减轻心肌缺血正在成为目前研究的热点^[13]。血管新生疗法即是通过加强新生侧枝血管的自然过程以维持冠状动脉渐进性闭塞时的血流量。早期糖尿病通过 VEGF 刺激冠脉毛细血管网络的形成保护心肌免受心肌 I/R 损伤,这提示对治疗性血管增生以减轻心肌缺血,对糖尿病合并冠心病治疗的研究具有重要意义。

参考文献:

[1] ABBUD Z A, SHINDLER D M, WILSON A C, et al. Effect of diabetes mellitus on short- and long-term mortality rates of patients with acute myocardial infarction: a statewide study. *Myocardial Infarction Data*

Acquisition System Study Group [J]. *Am Heart J*, 1995, 130(1):51- 58.

[2] FEUVRAY D, LOPASCHUK G D. Controversies on the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury: the sensitivity of the diabetic heart to ischemic injury is decreased [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 34(1):113- 120.

[3] PAULSON D J. The diabetic heart is more sensitive to ischemic injury [J]. *Cardiovasc Re*, 1997, 34(1):104- 112.

[4] XU G, TAKASHI E, KUDO M, et al. Contradictory effects of short- and long- term hyperglycemias on ischemic injury of myocardium via intracellular signaling pathway [J]. *Exp Mol Pathol*, 2004, 76(1): 57- 65.

[5] BACKLUND T, PALQJOKI E, SARASTE A, et al. Sustained cardiomyocyte apoptosis and left ventricular remodelling after myocardial infarction in experimental diabetes [J]. *Diabetologia*, 2004,47(2): 325- 330.

[6] BARBOSA V, SEEVERS R E, ZAUGG C E, et al. Preconditioning ischemia time determines the degree of glycogen depletion and infarct size reduction in rat hearts [J]. *Am Heart J*, 1996,131(2): 224- 230.

[7] SASAYAMA S, FUJITA M. Recent insights into coronary collateral circulation [J]. *Circulation*, 1992, 85 (3):1197- 1204.

[8] MARTIN A, KOMADA M R, SANE D C. Abnormal angiogenesis in diabetes mellitus [J]. *Med Res Rev*, 2003,23(2): 117- 145.

[9] LUO Z, DIACO M, MUROHARA T, et al. Vascular endothelial growth factor attenuates myocardial ischemia- reperfusion injury [J]. *Ann Thorac Surg*, 1997, 64(4): 993- 998.

[10] COOKE J P, LOSORDO D W. Nitric oxide and angiogenesis [J]. *Circulation*, 2002, 105(18):2133- 2135.

[11] 屈正,安春雷,许斌,等.血管内皮生长因子基因促进心肌血运重建的实验研究 [J]. *中华外科杂志*, 2002, 40(12):951.

[12] SARKAR N, RUCK A, KALLNER G. et al. Effects of intramyocardial injection of PhVEGF - A165 as sole therapy in patients with refractory coronary artery disease- 12- month follow- up: angiogenic gene therapy [J]. *J Intern Med*, 2001, 250(5):373- 381.

[13] KHAN T A, SELLKE F W, LAHAM R J. Gene therapy progress and prospects: therapeutic angiogenesis for limb and myocardial ischemia[J]. *Gene Therapy*, 2003, 10(4):285- 291.

(编辑 张恩健)