

血管内皮生长因子促进慢性心肌梗死血管生成

陈 成 钱军岭 陈 涛 葛 敏 王东进

摘 要 **目的** 探索血管内皮生长因子对猪慢性心肌梗死的治疗作用。**方法** 通过开胸直视下结扎前降支建立猪的心肌梗死模型,1 个月后将建模成功的猪分为血管内皮细胞生长因子(VEGF)组 and 对照组,分别直视下心肌内注射 VEGF 和磷酸缓冲盐溶液(PBS),2 个月后进行 MR 检查比较两组心功能参数,梗死心肌组织分别做 HE 染色和免疫组化染色,分析梗死区域微血管生成和细胞增殖情况。**结果** 因子注射 2 个月后,两组干预前后的心功能指标差值比较分别为左心室射血分数(LVEF) ($4.0\% \pm 10.4\%$ vs $1.8\% \pm 1.6\%$, $P > 0.05$)、心排出量(CO) ($2.1 \pm 1.6\text{L/min}$ vs $1.4 \pm 0.8\text{L/min}$, $P > 0.05$)、左心室后壁舒张期厚度(LVPWTd) ($2.8 \pm 0.5\text{mm}$ vs $2.0 \pm 0.8\text{mm}$, $P > 0.05$)、左心室舒张末期容积(EDV) ($24.0 \pm 5.0\text{ml}$ vs $39.6 \pm 16.2\text{ml}$, $P > 0.05$)。通过免疫组化染色分析,VEGF 组的微动脉密度比对照组高(87.0 ± 9.1 vs 50.8 ± 7.2 , $P < 0.05$),毛细血管密度比对照组高(367.5 ± 50.8 vs 188.5 ± 14.3 , $P < 0.05$),增殖细胞核数目较对照组多(432.5 ± 37.7 vs 132.0 ± 29.0 , $P < 0.05$)。**结论** VEGF 能够促进梗死心肌的血管新生,促进梗死区域侧支循环建立。

关键词 慢性心肌梗死 猪 血管内皮生长因子 血管新生

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.11.009

Vascular Endothelial Growth Factor Promote Angiogenesis in Chronic Myocardial Infarction. Chen Cheng, Qian Junling, Chen Tao, et al. Department of Cardiothoracic Surgery, The Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Jiangsu 210008, China

Abstract **Objective** To explore the effect of vascular endothelial growth factor for swine with chronic myocardial infarction. **Methods** Swine were modeled myocardial infarction through ligating the left anterior descending artery by thoracotomy. Modeled swine were divided into VEGF group and control group. The VEGF protein was injected into the myocardium around the infarcted area by thoracotomy in VEGF group, while PBS in control group. After two months, the heart function of the two groups were evaluated and compared by MR, and vascularization and cell proliferation were analysed by HE stain and immunohistochemistry stain. **Results** After two months, the difference comparisons of the two groups before and after treatment about indexes of heart function were LVEF ($4.0\% \pm 10.4\%$ vs $1.8\% \pm 1.6\%$, $P > 0.05$), CO ($2.1 \pm 1.6\text{L/min}$ vs $1.4 \pm 0.8\text{L/min}$, $P > 0.05$), LVPWTd ($2.8 \pm 0.5\text{mm}$ vs $2.0 \pm 0.8\text{mm}$, $P > 0.05$), EDV ($24.0 \pm 5.0\text{ml}$ vs $39.6 \pm 16.2\text{ml}$, $P > 0.05$), respectively. Moreover, not only the arterioles density and the capillary density of the VEGF group were higher than the control group (87.0 ± 9.1 vs 50.8 ± 7.2 and 367.5 ± 50.8 vs 188.5 ± 14.3 , respectively, $P < 0.05$), but also proliferating cell nuclear numbers were more (432.5 ± 37.7 vs 132.0 ± 29.0 , $P < 0.05$) according to the immunohistochemistry assay. **Conclusion** VEGF can facilitate angiogenesis in the infarcted myocardium, as well as formation of the collateral circulation.

Key words Chronic myocardial infarction; Porcine; Vascular endothelial growth factor; Angiogenesis

近年来,冠心病在全世界范围的发生率和病死率呈逐年上升趋势,根据美国心脏学会的报道,2010 年美国约有 78 万人会出现新发心肌梗死,约 47 万人会出现复发心肌梗死^[1]。2011 年美国有 375295 人死于冠心病^[2]。

血管新生是心肌修复的关键,许多研究都证明刺激血管新生可以促进缺血和(或)梗死心肌修复^[3,4]。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,

VEGF)是血管内皮细胞特异性的促有丝分裂原,有促进内皮增生,增强血管通透性,加速新血管形成作用。研究表明 VEGF 对多种组织缺血性疾病(包括肢体、心肌、脑缺血等)均具有促进侧支循环建立,增加缺血组织血流量,改善缺血组织的功能作用,是治疗冠心病最常用的生长因子之一^[5]。MRI 对心肌梗死的诊断具有较高的敏感度和特异性,既可直观准确地显示心肌梗死病变的范围和程度,也可测量心功能参数。本实验通过 MRI 来评价 VEGF 对猪慢性心肌梗死的疗效。

材料与方法

1. 建立陈旧性心肌梗死动物模型:14 只小型实验猪购于上海浦东华新特种养殖厂,术前禁食、禁水,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81370239)

作者单位:210008 南京大学医学院附属鼓楼医院心胸外科

通讯作者:王东进,主任医师,教授,博士生导师,电子信箱:gldjw

@163.com

氯胺酮(15mg/kg)、地西洋(1mg/kg)、阿托品(0.3~0.5mg)肌内注射诱导麻醉,开放耳缘静脉通路,气管插管后机械通气。术中以 2.5% 丙泊酚[12mg/(kg·h)]维持麻醉,琥珀胆碱维持肌内松弛状态。猪取仰卧位,以左胸前外侧第 4 肋间进胸,静脉注射肝素 100U/kg 肝素化,在前降支距离心尖部 1cm 处用 4-0 滑线结扎,预阻断 5min 后,松开结扎线,5min 后彻底结扎左前降支。术后予青霉素抗感染 3 天,伤口定期换药。造模后 1 个月行 MR 检查,使用 Philips Achieva 1.5 T 双梯度超导磁共振成像系统进行检测。

2. 干预:造模 1 个月后仍存活的猪有 9 只,雌猪 6 只,雄猪 3 只,体重为 33.4±10.1(17~49)kg。随机分为两组:VEGF 组 5 只,对照组 4 只。通过开胸直视下注射因子的方法进行干预。术前准备同前。经右胸前外侧第 4 肋间进胸,VEGF 组的因子注射量为 100μg(用生理盐水稀释成 1ml),在梗死边缘注射 10 个点,每点 10μg;对照组注射 PBS 1ml,同样在梗死边缘注射 10 个点,每点 0.1ml。VEGF 为人脐静脉内皮细胞扩增所得 VEGF₁₆₅。

3. 评价:造模是否成功可通过结扎前后的心电 ST-T 改变、造模后 1 个月 MR 检查明确梗死范围以及干预时触诊梗死区域心肌变薄来评价。干预后 2 个月行 MR 检查,记录注射因子后的心功能参数左心室射血分数(LVEF)、心排出量(CO)、左心室后壁舒张期厚度(LVPWTd)、左心室舒张末期容积(EDV),并与干预前做对比。取出心脏标本行 HE 染色及免疫组化染色,一抗为大鼠 α-平滑肌肌动蛋白抗体(anti-α-SMA)、兔血管性假血友病因子抗体(anti-vWF)、大鼠增殖细胞核抗原(anti-Ki67),二抗为北京中杉公司的二抗试剂盒。

4. 统计学方法:所有结果均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,对各组干预前后的差值进行成组设计 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 死亡率:造模后有 5 只猪死亡,死亡率 35.7%,均为结扎前降支后 20~40min 后发生心室颤动而死亡。干预实验后存活 8 只(88.9%),死亡 1 只(11.1%),为 VEGF 组的一只猪在分离粘连时发生心室颤动而死亡。

2. MR 检测结果:VEGF 组和对照组在干预前和干预 2 个月后记录的心功能参数左心室射血分数(LVEF)、心排出量(CO)、左心室后壁舒张期厚度(LVPWTd)、左心室舒张末期容积(EDV)的均数,见表 1。两组干预前后 LVEF、CO、LVPWTd、EDV 的变化差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 1 两组干预前后心功能比较

分组	干预	LVEF	CO	LVPWTd	EDV
		(%)	(L/min)	(mm)	(ml)
VEGF 组	前	66.9±2.4	2.6±0.4	6.3±0.6	37.2±7.0
	后	70.8±12.7	4.7±1.3	9.2±0.6	61.2±11.6
	差值	4.0±10.4	2.1±1.6	2.8±0.5	24.0±5.0
对照组	前	70.1±15.0	3.4±0.1	6.8±1.1	37.8±2.5
	后	71.9±13.8	4.8±0.9	8.8±1.5	77.4±17.8
	差值	1.8±1.6	1.4±0.8	2.0±0.8	39.6±16.2
<i>P</i>		0.051	0.221	0.423	0.197

3. HE 染色及免疫组化染色结果:心肌组织经 HE 染色光镜下可见细胞核被苏木素染成蓝色,胞质被伊红染成红色,而细胞外基质不被染色呈白色。梗死区心肌细胞肿胀,肌质呈颗粒状凝聚而分布不均匀,横纹模糊不清或消失(图 1)。

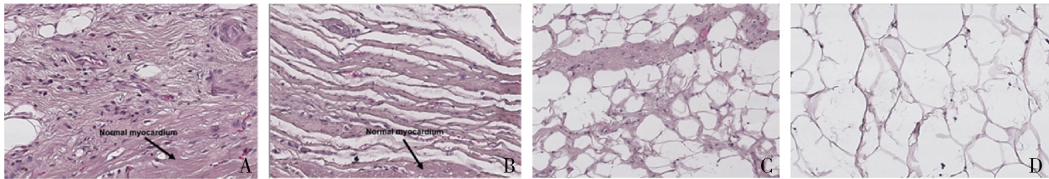


图 1 心肌组织经 HE 染色结果(×20)

A. VEGF 组梗死心肌边缘组织;B. 对照组梗死心肌边缘组织;C. VEGF 组梗死区域组织;D. 对照组梗死区域组织。箭头所指为正常心肌组织

VEGF 组与 PBS 组干预前后的标本经 anti-α-SMA、anti-vWF、anti-Ki67 免疫组化染色(图 2~图 4)分别测得微动脉密度、毛细血管密度、增殖细胞核

数目,VEGF 组较对照组差异有统计学意义(*P* < 0.05,表 2)。

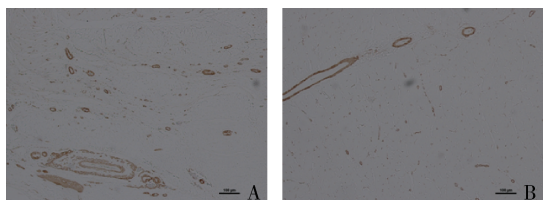


图2 VEGF组和对照组利用 anti- α -SMA 免疫组化染色检测梗死区域微动脉密度($\times 20$)

A. VEGF 组; B. 对照组

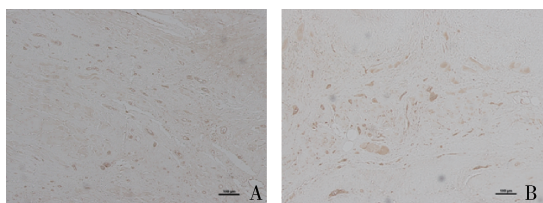


图3 VEGF组和对照组利用 anti-vWF 免疫组化染色检测梗死区域毛细血管密度($\times 20$)

A. VEGF 组; B. 对照组

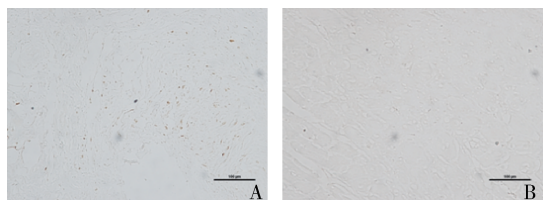


图4 VEGF组和对照组利用 anti-Ki67 免疫组化染色检测增殖细胞核数目($\times 20$)

A. VEGF 组; B. 对照组

表2 两组干预前后免疫组化结果比较

分组	anti- α -SMA	anti-vWF	anti-Ki67
VEGF 组	87.0 ± 9.1	367.5 ± 50.8	432.5 ± 37.7
对照组	50.8 ± 7.2	188.5 ± 14.3	132.0 ± 29.0
<i>P</i>	0.001	0.000	0.000

anti- α -SMA. α -平滑肌肌动蛋白抗体; anti-vWF. 血管内皮细胞的特异性抗体; anti-Ki67. 增殖细胞核特异抗体。单位: 个/平方米

讨 论

微血管密度是直接反映侧支血管形成最可靠的解剖学指标,在一定程度上能反映冠状动脉侧支循环血供情况。anti- α -SMA、anti-vWF 抗体分别是特异的血管平滑肌细胞和内皮细胞标志物,能较好地显示组织中的微动脉和毛细血管,作为反映血管生成的间接手段。本研究通过 anti- α -SMA、anti-vWF 抗体标记微血管,发现 VEGF 组的微动脉和毛细血管的

密度均比对照组高,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明 VEGF 可促进血管生成、促进缺血心肌侧支循环的建立。细胞核增殖抗原 Ki67 是一种与细胞有丝分裂密切相关、能反映细胞增殖状态的核抗原,被作为评价细胞生长分数有效指标。本实验中,用 anti-Ki67 标记后发现 VEGF 组梗死区域中,细胞核增殖的数目明显较对照组多。

研究发现,VEGF 在体外特异地刺激内皮细胞的分化和迁移,在体内触发一系列的事件诱导血管生成^[6]。Cheng 等^[7]通过实验证实了心肌梗死后的心肌和末梢血清里 VEGF 的表达是上调的。这可能是缺血性心脏病患者中存在自发形成侧支循环的原因,然而,其速度与程度均不足以代偿机体的需要,因为 VEGF 的血管生成效应依赖于它局部浓度^[8]。因此,通过输入外源性 VEGF 达到促进缺血心肌侧支循环的建立、改善心肌缺血已成为研究心肌梗死治疗策略的热点。已有多项研究表明重组 VEGF 蛋白或 VEGF 基因导入梗死心肌能促进血管生成、提高侧支血流,减少细胞凋亡,从而挽救顿抑心肌,改善心脏功能^[9-11]。

本实验虽然观察到 VEGF 能够促进梗死区域的血管再生,但是 MR 结果显示两组 LVEF、CO、LVP-WTd、EDV 干预前后的变化没有明显差异。这和 Zhang 等^[10]研究结果类似,他在实验中观察到 VEGF 组和对照组在短轴缩短率和射血分数上差异无统计学意义,且两组之间 LVDd、LVDs、左心室后壁舒张期厚度差异无统计学意义($P > 0.05$)。这可能与血管再生的程度微弱不足以改善整体心功能和心室重构,以及梗死面积过小不足以影响心功能有关。相信未来 VEGF 通过更深入的研究能够应用于临床,为心肌梗死患者的治疗带来希望。

本实验尚存在一些不足。首先,样本量偏少,增加实验误差;其次,若结合超声心动图检查,对心功能的评价将更全面准确。

参考文献

- Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, *et al.* Heart disease and stroke statistics - 2010 update: a report from the American Heart Association[J]. Circulation, 2010, 121(7): e46-e215
- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, *et al.* Heart disease and stroke statistics - 2015 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2015, 131(4): e29-322
- 孙林, 张戈, 周旭, 等. 三种途径移植自体 BM-MNCs 对猪急性心肌梗死后心功能影响的对比研究[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(1): 71-74

(下转第 81 页)

卵融合等生理过程^[11,12]。印度研究者首次报道 SPAG9 在肿瘤中的表达,且在肿瘤患者血液中具有较强的免疫原性^[13]。人 SPAG9 基因存在于染色体 17q21.33,此定位区域与癌基因扩增及表达有关。SPAG9 的蛋白结构与 c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)相互作用蛋白有同源性,可通过与其结合,在丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路中发挥重要作用,参与人体多种生理功能,也与某些疾病和肿瘤的发生、发展相关^[14,15]。研究发现 MAPK 信号通路在肿瘤的进程中发挥重要作用,且 Davidson 等^[16]的研究发现 MAPK 通路中的 p38 和 JNK 与乳腺癌的进程有关,故 SPAG9 可通过与 JNK 结合参与乳腺癌的发生和发展。SPAG9 可通过作用于 MAPK 通路进而抑制肿瘤的生长,因此 SPAG9 有可能作为肿瘤生物治疗的靶点。

本研究中乳腺癌原发病灶组织 SPAG9 的表达明显高于癌旁非肿瘤组织,提示 SPAG9 表达可能与乳腺癌进程相关,但 SPAG9 表达与乳腺癌 TNM 分期无关。笔者在血清学方面的研究发现,乳腺癌血清 SPAG9 抗体浓度显著高于良性病变组和健康对照组,且血清 SPAG9 抗体浓度与年龄和乳腺癌 TNM 分期有关;ROC 曲线显示,血清 SPAG9 抗体浓度临界值为 10.185mU/ml 时,SPAG9 抗体对乳腺癌诊断有一定的敏感度,且特异性较高。本组资料表明,乳腺癌病灶组织 SPAG9 高表达,且血清中 SPAG9 抗体水平明显升高,对乳腺癌的诊断具有一定的临床应用价值。

参考文献

- 1 Torre LA, Bray F, Siegel RL, *et al.* Global cancer statistics, 2012 [J]. *Cancer Clinic*, 2015, 65 (2): 87-108
- 2 Zeng H, Zheng R, Zhang S, *et al.* Female breast cancer statistics of 2010 in China: estimates based on data from 145 population-based cancer registries [J]. *J Thorac Dis*, 2014, 6(5): 466-470
- 3 Kanojia D, M Garg, S Gupta, *et al.* Sperm-associated antigen 9 is a

- novel biomarker for colorectal cancer and is involved in tumor growth and tumorigenicity [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178 (3): 1009-1020
- 4 Garg M, Kanojia D, Khosla A, *et al.* Sperm-associated antigen 9 is associated with tumor growth, migration, and invasion in renal cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (20): 8240-8248
- 5 Ren B, Wei X, Zou G, *et al.* Cancer testis antigen SPAG9 is a promising marker for the diagnosis and treatment of lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5): 2599-2605
- 6 Xie C, L Fu, N Liu, *et al.* Overexpression of SPAG9 correlates with poor prognosis and tumor progression in hepatocellular carcinoma [J]. *Tumour Biol and Medicine*, 2014, 35 (8): 7685-7691
- 7 Li H, Peng Y, Niu H, *et al.* SPAG9 is overexpressed in human prostate cancer and promotes cancer cell proliferation [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35 (7): 6949-6954
- 8 Miao ZF, Wang ZN, Zhao TT, *et al.* Overexpression of SPAG9 in human gastric cancer is correlated with poor prognosis [J]. *Virch Archiv*, 2015, 467 (5): 525-533
- 9 Yan Q, Lou G, Qian Y, *et al.* SPAG9 is involved in hepatocarcinoma cell migration and invasion via modulation of ELK1 expression [J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9: 1067-1075
- 10 严秋月, 钱颖, 刘艳宁, 等. 精子相关抗原 9 在原发性肝癌中的表达及其临床价值 [J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2014, 2 (4): 252-256
- 11 Shankar S, Mohapatra B, Verma S, *et al.* Isolation and characterization of a haploid germ cell specific sperm associated antigen 9 (SPAG9) from the baboon [J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 69 (2): 186-193
- 12 Jagadish N, Rana R, Selvi R, *et al.* Characterization of a novel human sperm associated antigen 9 (SPAG9) having structural homology with c-Jun N-terminal kinase-interacting protein [J]. *Biochem J*, 2005, 389: 73-82
- 13 Garg M, Chaurasiya D, Rana R, *et al.* Sperm-associated antigen 9, a novel cancer testis antigen, is a potential target for immunotherapy in epithelial ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13 (5): 1421-1428
- 14 Engstrom W, Ward A, Moorwood K. The role of scaffold proteins in JNK signalling [J]. *Cell Proliferat*, 2010, 43 (1): 56-66
- 15 Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802 (4): 396-405
- 16 Davidson B, Konstantinovskiy S, Kleinberg L, *et al.* The mitogen-activated protein kinases (MAPK) p38 and JNK are markers of tumor progression in breast carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2006, 102 (3): 453-461

(收稿日期: 2016-04-01)

(修回日期: 2016-04-21)

(上接第 34 页)

- 4 Chepeleva EV, Pavlova SV, Malakhova AA, *et al.* Therapy of chronic cardiosclerosis in WAG rats using cultures of cardiovascular cells enriched with cardiac stem cell [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2015, 160 (1): 165-173
- 5 Uitterdijk A, Springeling T, van Kranenburg M, *et al.* VEGF165A microsphere therapy for myocardial infarction suppresses acute cytokine release and increases microvascular density but does not improve cardiac function [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309 (3): H396-406
- 6 Azimi-Nezhad M. Vascular endothelial growth factor from embryonic status to cardiovascular pathology [J]. *Rep Biochem Mol Biol*, 2014, 2(2): 59-69
- 7 Cheng C, Li P, Wang YG, *et al.* Study on the expression of VEGF and HIF-1 α in infarct area of rats with AMI [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(1): 115-119

- 8 Yang Y, Shi C, Hou X, *et al.* Modified VEGF targets the ischemic myocardium and promotes functional recovery after myocardial infarction [J]. *J Control Release*, 2015, 213: 27-35
- 9 Tao Z, Chen B, Tan X, *et al.* Coexpression of VEGF and angiopoietin-1 promotes angiogenesis and cardiomyocyte proliferation reduces apoptosis in porcine myocardial infarction (MI) heart [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(5): 2064-2069
- 10 Zhang J, Ding L, Zhao Y, *et al.* Collagen-targeting vascular endothelial growth factor improves cardiac performance after myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2009, 119(13): 1776-1784
- 11 Zangi L, Lui KO, von Gise A, *et al.* Modified mRNA directs the fate of heart progenitor cells and induces vascular regeneration after myocardial infarction [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(10): 898-907

(收稿日期: 2016-04-14)

(修回日期: 2016-04-26)