

大鼠心肌梗死后血管内皮生长抑制因子的时程变化

王文军,张哲雄,周彦,刘小林,王西珍,王彦*

连云港市第二人民医院检验科,江苏 连云港 222006

[摘要] 目的:研究大鼠心肌梗死模型后不同时间血管内皮生长抑制因子(vascular endothelial cell growth inhibitor, VEGI)表达及意义。方法:通过结扎SD大鼠左冠状动脉前降支远端1/3建立心肌梗死模型,通过心电图变化判断是否成功。分别于术后1、2、3、4、5、6、7、8周开胸取左心室梗死区、梗死边缘区、非梗死区心肌,应用荧光定量PCR与Western blot检测VEGI基因及蛋白表达变化。结果:心电图变化提示造模成功,大鼠术后早期(1~3周)VEGI mRNA表达下调($P < 0.05$),而后期(5~8周)则表达显著增加($P < 0.05$)。与mRNA水平变化类似,VEGI蛋白水平在心肌梗死组大鼠术后早期(1~3周)表达水平下调($P < 0.05$),后期(5~8周)显著上升($P < 0.05$)。结论:VEGI作为一种血管再生抑制因子,在心肌梗死早期通过表达下调促进血管再生,进行梗死心肌代偿修复;而在心肌梗死后期通过表达抑制心肌梗死区血管再生,提示VEGI在心脏血管再生调节中有重要作用,有望成为缺血性心脏病治疗的新靶点。

[关键词] 心肌梗死;血管内皮生长抑制因子;实时荧光定量PCR;大鼠

[中图分类号] R542.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)05-612-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20180508

心肌梗死(myocardial infarction, MI)是首位危及人类生命的心血管疾病^[1],该病主要是由冠状动脉急性、持续性缺血缺氧所引起。因此恢复局部血流供应,是梗死心肌修复的基本前提,但目前对于梗死心肌区血管再生影响因素的研究尚缺乏透彻的认识。现在的研究认为缺血心肌局部血管再生抑制因素对促血管生成具有重要影响^[2]。血管内皮生长抑制因子(vascular endothelial cell growth inhibitor, VEGI)是新近发现的一种血管再生抑制因子,属于肿瘤坏死因子超家族^[3]。因此我们推测VEGI极有可能参与了梗死心肌血管再生的病理生理过程。本研究观察VEGI在大鼠心肌梗死后mRNA和蛋白水平表达的变化,对VEGI在大鼠心肌梗死的病理生理过程中的作用进行初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

70只健康成年雄性SD大鼠(8~10周,体重200~250g)购自蚌埠医学院实验动物实验中心。兔抗VEGI、鼠抗beta-actin抗体(Santa Cruz公司,美国),

[基金项目] 连云港市医学检验科重点学科建设项目(SH1526)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: wangyan1358@163.com

碱性磷酸酶标记山羊抗兔IgG及山羊抗鼠IgG(Vector公司,美国),Western blot专用电泳装置、转膜装置、显色试剂与图象扫描分析仪(Bio-Rad公司,美国)。小动物呼吸机购于上海奥尔科特生物科技有限公司,小动物心电监护仪购自上海玉研科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠心肌梗死模型的建立

采用结扎左冠状动脉前降支制作大鼠心肌梗死模型。术前称重,予以0.4%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉。常规消毒铺巾,在胸骨左侧与胸骨平行做长约2 cm的纵切口,切开皮肤,钝性分离胸大肌,用眼科开睑器于3~4肋间的肋间肌扩开胸腔,暴露心脏,分离心包膜。仔细辨别冠状动脉,用无损伤缝线于冠状动脉左前降支(left anterior descending, LAD)远端1/3处连同心肌一并结扎。结扎后心电图ST段弓背向上抬高,左室壁变苍白并运动减弱,证实造模成功后将心脏小心放回胸腔。以上操作结束后,逐层关胸使胸腔完全闭合,轻压胸廓两侧,挤出胸腔内空气,继续呼吸机通气,直至大鼠出现自主呼吸后撤除呼吸机。

1.2.2 标本的采集与保存

将70只建模成功的SD大鼠随机分为7组,分别于术后1、2、4、5、6、7与8周,采用3%的戊巴比妥

钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,迅速取出心脏置于4 °C 预冷的生理盐水漂洗除去血液,分别取左心室梗死区、梗死边缘区、非梗死区心肌组织各300 mg,立即放入-80 °C冰箱中保存备用。

1.2.3 总RNA提取及其逆转录cDNA

采用异硫氰酸胍法提取总RNA,具体如下:将组织在1 mL TRIzol 试剂中匀浆,静置5 min后加入0.2 mL氯仿振荡混匀;4 °C条件下,12 000 r/min离心5 min后,将上清转至新的离心管,并加入等体积的异丙酮混匀;室温静置10 min后,4 °C离心15 min,弃上清液,沉淀块用70%乙醇洗涤后,加入50 μL DEPC水溶解。随后运用分光光度计测量RNA浓度,存于-80 °C保存备用。

采用日本 TaKaRa 公司 PrimeScript™ RT Reagent Kit,将提取的RNA逆转录为cDNA,操作步骤如下:首先,取0.2 mL Ep管置于冰上,依次加入2.0 μL 5× PrimeScript Buffer,0.5 μL Oligo dT Primer (50 μmol/L),0.5 μL PrimeScript RT Enzyme Mix I,0.5 μL Random 6 mers (100 μmol/L)与0.5 μg总RNA,加DEPC水至10 μL,轻轻混匀,离心3~5 s;其次,将Eppendorf管置PCR仪(ABI 9700)中,按下列条件进行反应:37 °C 15 min,85 °C 5 s,20 °C 20 min;最后,向每个反应中加90 μL RNase-free水,用加样枪混匀,并将cDNA保存于-20 °C备用。

1.2.4 实时荧光定量PCR检测VEGI mRNA的表达

应用实时定量PCR法检测mRNA的表达,配置如下反应体系:10.0 μL 2×SYBRPremixExTaq™,0.5 μL上游引物,0.5 μL下游引物,2.0 μL cDNA与7.0 μL ddH₂O。然后实时荧光定量PCR扩增仪(ABI 7500)进行扩增,扩增条件:预变性95 °C 5 min;PCR反应95 °C 15 s,60 °C 34 s,45个循环。引物序列:目的基因VEGI,上游5'-GATAAGCCAAGGGCA-

CACCT-3',下游5'-GGCCAGGCCTAGTTCATGTT-3',长度102 bp;内参基因GAPDH,上游5'-GAGA-AGGCTGGGGCTCATTT-3',下游5'-AGTGATGGCATGGACTGTGG-3',长度231 bp。采用2^{-ΔΔCt}法计算目的基因的相对表达量。

1.2.5 Western blot检测VEGI蛋白表达

首先取大鼠心肌组织100 mg加1 mL RIPA蛋白裂解液中,冰浴中匀浆,4 °C 15 000 r/min离心10 min,弃沉淀留上清,并采用BCA法测定蛋白浓度;其次用RIPA蛋白裂解液和蛋白处理液将各管蛋白浓度调为一致,并煮沸5 min;再次采用4%浓缩胶与10%分离胶进行蛋白电泳,转膜,5%脱脂奶粉的TBS封闭,TBST漂洗;最后分别入兔抗VEGI(1:500)、鼠抗beta-actin(1:1 000)抗体孵育过夜,TBST洗涤,然后分别加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔IgG(1:2 000)与碱性磷酸酶标记山羊抗鼠IgG(1:2 000)室温孵育2 h,TBST洗涤后进行显色、扫描、灰度分析。

1.3 统计学方法

所有数据均采用SPSS 16.0统计软件进行单因素方差分析处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

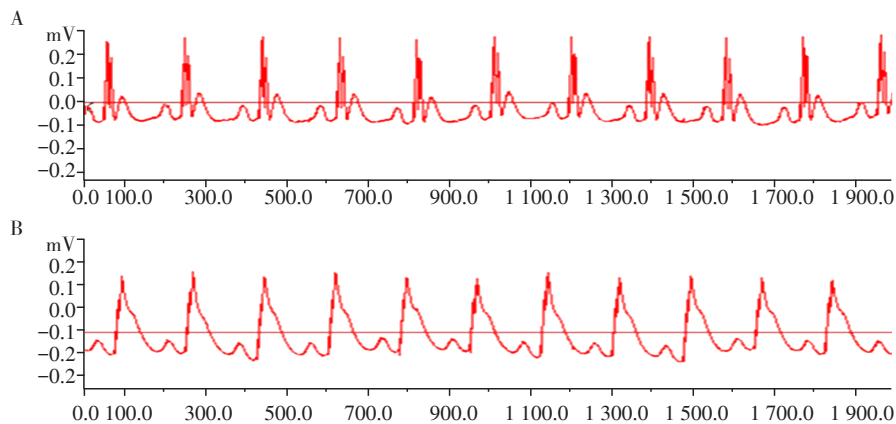
2 结果

2.1 大鼠心肌梗死模型的鉴定

大鼠心脏冠状动脉左前降支结扎前心电图均正常,结扎瞬间心电图变为一过性ST段弓背向上抬高,与T波融合成单相曲线。结扎瞬间可见结扎线远端心肌活动度减弱,左室前壁苍白后发绀,提示模型制作成功(图1)。

2.2 心肌VEGI mRNA的表达

和非梗死区心肌相比,术后早期(1~3周)VEGI mRNA表达下调($P < 0.05$,图2),其中第2周VEGI



A:心脏冠状动脉左前降支结扎前心电图;B:心脏冠状动脉左前降支结扎后心电图,可见心电图的ST状抬高。

图1 大鼠心肌梗死时心电图变化

mRNA 表达下调最显著;心肌梗死后(5~8周)则表达显著上调($P < 0.05$,图2),其中第6周 VEGI mRNA 表达上调最显著;而各时间点的梗死边缘区 VEGI mRNA 水平无显著变化。

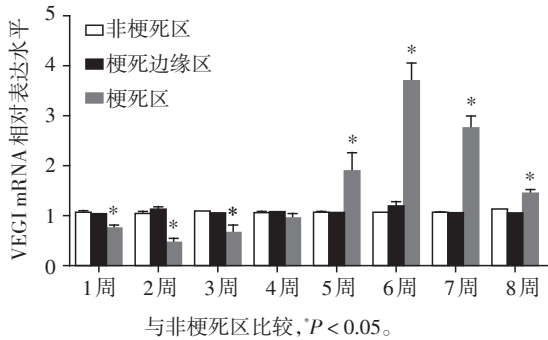


图2 实时定量PCR检测大鼠心肌梗死后不同时间点不同心脏部位 VEGI mRNA 的表达

2.3 心肌 VEGI 蛋白的表达

与 mRNA 水平变化类似,大鼠心肌梗死组术后早期(2周)梗死区 VEGI 表达水平显著下调($P < 0.01$,图3),而心梗后期(6周)表达则显著上调($P < 0.05$,图3)。

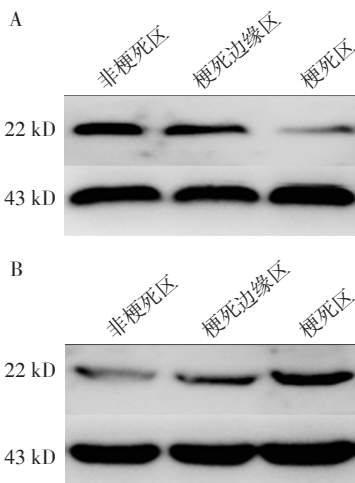


图3 Western blot 检测大鼠心肌梗死后不同心脏部位 2周(A)和6周(B)时 VEGI 蛋白的表达

3 讨论

生理条件下,心脏存在着血管再生刺激因素与抑制因素之间的精确平衡,该平衡失调是引起心肌梗死的一个重要原因^[4-5]。但是迄今为止,对于缺血心肌促血管再生治疗的研究,大多数研究者都着眼于加强促血管再生的刺激因素,忽略了缺血心肌局部促血管生长因素和抑制血管生长因素的动态相互作用,特别是血管再生抑制因素对促血管生成的

重要影响。本研究发现心肌梗死后大鼠心肌 VEGI 在 mRNA 和蛋白水平均出现明显、有意义的变化:梗死早期表达下调,而晚期则显著高于正常水平。VEGI 的双向变化提示其在心肌梗死后的不同时期可能发挥不同作用。

VEGI 是新近发现的一种血管再生抑制因子,属于肿瘤坏死因子超家族。自 1997 年被鉴定以来,大量研究表明,VEGI 参与了生物体组织和器官的形成、神经系统的信号转导、血管生成、细胞与细胞之间的黏附等重要生理过程^[6-7]。近年来研究发现,VEGI 作为机体的一种内源性关键细胞因子,其抗血管再生活性远较已知的其他内源性血管抑制因子,如血管他丁、内皮他丁等作用更为强大。即使在目前最强促血管生长因子血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF),或者成纤维细胞生长因子((fibroblast growth factor, FGF)-1、碱性 FGF(bFGF)和白介素 8 存在的条件下,VEGI 也能显著抑制内皮细胞的迁移。有研究报道,心脏血管内皮细胞均可表达(旁分泌)抑制血管生长因子(如 VEGI)^[8]。同样,本研究发现大鼠心肌梗死 1~3 周梗死区 VEGI 表达下降,第 5 周开始梗死区 VEGI 升高;至第 8 周恢复至正常水平。提示 VEGI 在心脏血管再生调节中有重要作用,有可能成为心脏病治疗的新靶点,如果在缺血心肌局部阻断局部组织中的 VEGI,可以有利于提高促血管再生的速度和效率。

现有研究表明,VEGI 不仅具有强抑制新生血管生成作用,而且也是一种内源性炎症抑制因子^[9],在不恰当的时机使之表达降低,有可能加重梗死局部的炎症反应,给心脏带来负面影响。已知心肌梗死后,1~2 周内炎症达到高峰,肿瘤坏死因子、VEGF 上调,新生血管增加,血管通透性加大,组织水肿严重,之后 5~6 周炎症细胞逐渐减少(凋亡),不成熟的新生毛细血管闭合,成纤维细胞增生,纤维集聚^[10]。因而根据缺血心肌的病理学过程特征,在心肌梗死急性炎症期后,短暂调控沉默梗死局部 VEGI 的表达,有望增强心肌的自我修复能力,从而改善预后,提高患者长期存活率。

[参考文献]

[1] Gupta T, Harikrishnan P, Kolte D, et al. Outcomes of acute myocardial infarction in patients with hypertrophic cardiomyopathy[J]. Am J Med, 2015, 128(8):879-887

[2] Takawale A, Zhang P, Azad A, et al. Myocardial overexpression of TIMP3 after myocardial infarction exerts beneficial effects by promoting angiogenesis and suppressing

- early proteolysis [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 313(2):H224-H236
- [3] Zhao Q, Deng X, Hong B, et al. Protein of vascular endothelial growth inhibitor 174 inhibits epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma *in vivo* [J]. Anticancer Res, 2017, 37(8):4269-4275
- [4] Kapusta J, Mejer-Barczewska A, Kowalczyk E, et al. Evaluation of selected vascular active factors in patients after myocardial infarction subjected to cardiac rehabilitation [J]. Pol Merkur Lekarski, 2017, 43(254):56-60
- [5] Yang F, Liu W, Yan X, et al. Effects of mir-21 on cardiac microvascular endothelial cells after acute myocardial infarction in rats: Role of phosphatase and tensin homolog (pten)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signal pathway [J]. Med Sci Monit, 2016, 22:3562-3575
- [6] Cui ZT, Liu JP, Yao JM. Antagonistic effects of endostatin-vascular endothelial growth inhibitor chimeric recombinant adenovirus on homocysteine-induced vascular endothelial cells injury *in vivo* and *in vivo* [J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(44):e5197
- [7] Li M, Jia Q, Chen T, et al. The role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth inhibitor in clinical outcome of traumatic brain injury [J]. Clin Neurol Neurosurg, 2016, 144(1):7-13
- [8] Dong H, Wang Q, Zhang Y, et al. Angiogenesis induced by hvegfl65 gene controlled by hypoxic response elements in rabbit ischemia myocardium [J]. Exp Biol Med, 2009, 234(12):1417-1424
- [9] Zhao Q, Kun D, Hong B, et al. Identification of novel proteins interacting with vascular endothelial growth inhibitor 174 in renal cell carcinoma [J]. Anticancer Res, 2017, 37(8):4379-4388
- [10] Sun Y. Myocardial repair/remodelling following Infarction: roles of local factors [J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(3):482-490

[收稿日期] 2017-07-12

参考文献著录原则和方法

1. 为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃态度,以及读者提供有关信息的出处,应在论文的结论(无致谢段时)或致谢之后列出参考文献。
2. 参考文献列出的一般应限于作者直接阅读过的、最主要的、发表在正式出版物上的文献。私人通信和未公开发表的资料,一般不宜列入参考文献,可紧跟在引用的内容之后注释或标注在当页的地脚。
3. 参考文献著录应执行GB7714-2005的规定,建议采用顺序编码制。
4. 顺序编码制的要求如下:
 - (1) 在引文处按论文中引用文献出现的先后,用阿拉伯数字连续编序,将序号置于方括号内,并视具体情况把序号作为上角标,或作为语句的组成部分。如“张xx^[1]研究发现……”,“李xx等^[2]认为……”,“模型构建参考文献[3]”。
 - (2) 参考文献的每条文献著录项目应齐全,著录格式为:
主要责任者. 题名:其他题名信息[文献类型标志]. 其他责任者. 版本项. 出版地:出版者,出版年,引文页码[引用日期]. 获取和访问路径
 - (3) 论文中若同一篇参考文献出现引用多次的情况,则不需重复著录,按参考文献首次出现的顺序标注上角即可。