

· 基础研究 ·

50 Hz 低电压电刺激对大鼠缺血心肌血管新生及血管内皮生长因子表达的影响

刘兴德 龙宇飞

【摘要】目的 探讨 50 Hz 的低电压电刺激心肌对大鼠缺血心肌毛细血管新生及血管内皮生长因子 (VEGF) 表达的影响。**方法** 将 12 只心肌梗死模型大鼠随机分为 50 Hz 低电压电刺激组 (电刺激组) 和非电刺激对照组 (对照组), 用免疫组化法和逆转录-多聚酶链反应 (RT-PCR) 方法测定大鼠缺血心肌中内皮细胞 (EC) 数、毛细血管密度 (CD) 和 VEGF mRNA 和蛋白的表达。**结果** 与对照组比较, 电刺激组大鼠缺血心肌中 EC 数和 CD、VEGF mRNA 及蛋白表达均增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 50 Hz 低电压电刺激能促进大鼠缺血心肌中的毛细血管新生, 其机制可能与上调 VEGF 蛋白和 mRNA 的表达有关。

【关键词】 电刺激; 心肌缺血; 血管新生; 血管内皮生长因子; 大鼠

Effects of 50 Hz low voltage electric stimulation on angiogenesis and the expression of VEGF in the ischemic myocardium LIU Xing-de, LONG Yu-fei. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

【Abstract】Objective To study the effects of 50 Hz low voltage electric stimulation on angiogenesis and the expression of VEGF in the ischemic myocardium in rats. **Methods** Twelve Wistar rats with experimentally induced myocardial ischemia were randomly divided into an electric stimulation (ES) group and a control group. The animals in the electric stimulation group were electrically stimulated at 50 Hz and 0.3 V through electrodes implanted in the epicardium of the anterior wall of the left atrium. Those in the control group were delivered sham electrical stimulation through similar implanted electrodes. Immunohistochemistry was used to count endothelial cells (ECs) and measure the capillary density (CD). A reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was employed to measure the expression of VEGF protein and VEGF mRNA. **Results** The number of ECs, and the CDs in the ES group were significantly greater than in the control group, and the expression of VEGF protein and VEGF mRNA was also significantly higher. **Conclusions** Low voltage electrical stimulation at 50 Hz can promote angiogenesis and the expression of VEGF in the ischemic myocardium in rats.

【Key words】 Electrical stimulation; Myocardial ischemia; Angiogenesis; Vascular endothelial growth factor

冠心病是临床常见疾病,除药物治疗外,经皮冠状动脉介入治疗、冠状动脉旁路移植术等血管重建措施治疗冠心病已取得满意效果,但这些方法主要靠侵入性方法恢复冠状动脉血流,且存在费用昂贵、手术复杂、有危险性以及术后再狭窄等问题。随着人们对冠心病研究的深入,发现某些药物能诱导心肌血管新生^[1],此为冠心病治疗研究提供了一个重要思路。文献报道,用不产生肌肉收缩反应的低电压电刺激大鼠缺血的后肢骨骼肌,可促进骨骼肌中的血管新生^[2],但不产生心肌收缩的低电压电刺激能否促进缺血心肌的血管新生,文献报道不多^[3-5]。本研究拟观察 50 Hz 的低电压电刺激心肌对大鼠缺血心肌毛细血管新生及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor,

VEGF) 表达的影响,为寻找促进冠心病患者缺血心肌血管新生的治疗措施提供基础研究资料。

材料与方法

一、实验动物

Wistar 大鼠 12 只,雌雄不拘,体重为 170 ~ 250 g,由贵阳医学院实验动物中心提供。

二、主要试剂和仪器

Ⅷ因子相关抗原抗体 (北京中山);即用型免疫组化试剂盒 (武汉博士德);VEGF 兔多克隆抗体 (武汉博士德);Trizol 试剂 (上海生物工程公司);Taq 酶 (DNA 聚合酶,杭州开瑞);二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) (武汉博士德);DH-150 动物人工呼吸机 (浙江大学医学仪器厂);ULT-1386-3 三洋 - 86 度低温冰箱 (日本);5745 台式冷冻离心机 (德国);Biomias99 纤维采集图象分析系统 (四川大学图象图形研究所);Ep-

基金项目:教育部科学技术研究重点项目 (204128)

作者单位:550004 贵阳,贵阳医学院附院心血管科 (龙宇飞,现在长沙市中心医院分院内一科)

pendorf centrifuge 5810 R 高速离心机; UVP 8000 型凝胶成像系统; 紫外分光光度计 UV1240 (日本岛津公司); Amersham 核酸蛋白分析仪; VEGF 引物由上海生物工程公司合成, 扩增产物为 542 bp, 正义链引物: 5'-CTGCTCTCTGGGTGCACTGG-3', 反义链引物: 5'-CAC-CGCCTTGGCTTGTACAT-3'; 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 引物由上海生物工程公司合成, 正义链引物: 5'-CTTCCT-GGGCATGGAGTC-3', 反义链引物: 5'-GCCGATCCA-CACGGAGTA-3'。

三、大鼠心肌梗死模型的制作及电极植入^[4]

用 10% 水合氯醛 (3 ml/kg 体重) 行腹腔注射麻醉。行气管切开及气管插管后, 采用动物人工呼吸机控制呼吸, 呼吸频率为 55 ~ 60 次/min, 潮气量 10 ml。胸正中左旁切开皮肤, 逐层分离皮下组织、肌肉, 剪断第 3、4 肋骨, 暴露心脏。用 0 号丝线结扎左冠状动脉前降支, 并以 0 号线穿过连接线圆圈将 2 根电极 (自制) 缝置在左心室前壁心肌的心外膜上, 2 电极相距 1 cm 左右, 然后迅速将心脏复位并关闭胸腔。在大鼠的皮下打一隧道, 将 2 根电极从大鼠的背部引出, 待大鼠自主呼吸恢复后拔出气管内插管并缝合气管。以上手术均在严格无菌条件下进行, 术后腹腔内注射青霉素钠 80 万 U/d, 连续 3 d, 以预防感染。以心电图肢导联 ST 段弓背向上抬高作为模型复制成功的标志。

四、分组与电刺激

将已植入电极的心肌梗死大鼠随机分成 50 Hz 低电压电刺激组 (电刺激组) 和非电刺激对照组 (对照组), 每组 6 只。电刺激组大鼠在心肌梗死后第 2 天开始给予 50 Hz 的低电压电刺激, 电压固定在 0.3 V, 低于致心肌收缩电压的 1/2, 每日刺激 6 h, 连续 5 d; 对照组大鼠心肌缺血模型成功后, 仅植入电极, 不予电刺激。第 7 天取 2 组大鼠左室梗死区及相邻区域心肌备检。

五、缺血心肌中内皮细胞及毛细血管密度的检测与计数

取梗死周边缺血区心肌组织, 以 10% 甲醛溶液进行心肌固定, 并进行常规石蜡包埋及作心肌切片 (5 μ m)。按链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶 (streptavidin-peroxidase, SP) 试剂盒说明, 以 VIII 因子相关抗原抗体作内皮细胞免疫组化染色, 内皮细胞胞浆呈棕黄色。在显微镜放大 400 倍视野下计数内皮细胞 (endothelial cell, EC), 取 5 个连续缺血区域视野下的均值。同时计数毛细血管 (直径 < 20 μ m), 以毛细血管数/mm² 表示毛细血管密度 (capillary density, CD)。

六、缺血心肌组织中 VEGF 蛋白表达的测定

运用免疫组织化学方法, 严格按 SP 免疫组化试剂

盒说明操作。细胞胞浆颜色呈棕黄染色为阳性。采用高清晰度彩色病理图像测量系统测定平均光密度值并作半定量分析。

七、缺血心肌组织中 VEGF mRNA 表达的测定

提取组织总核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA), 总 RNA 含量测定, 凝胶电泳鉴定, 逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 引物设计, cDNA 第一链逆转录合成, 多聚合酶反应, 扩增结束后在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 30 min 后在紫外灯下观察结果。用凝胶成像分析系统测量光密度值。

八、统计学分析

采用 SPSS 11.0 版软件包, 所有数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、50 Hz 低电压电刺激心肌对大鼠缺血心肌中 EC 数和 CD 的影响

50 Hz 低电压电刺激心肌对大鼠缺血心肌中 EC 数和 CD 的影响见表 1。

表 1 50 Hz 低电压电刺激心肌对大鼠缺血心肌中 EC 数和 CD 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	EC (N)	CD (毛细血管根数/mm ²)
对照组	6	30.40 $\pm$ 3.64	1029.06 $\pm$ 9.31
电刺激组	6	37.13 $\pm$ 1.83 ^a	1065.07 $\pm$ 25.26 ^a

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; N——每个放大 400 倍视野中的内皮细胞个数

由表 1 可见, 与对照组比较, 电刺激组大鼠缺血心肌中 EC 数和 CD 均增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

二、50 Hz 低电压电刺激心肌对大鼠缺血心肌中 VEGF 表达的影响

50 Hz 低电压电刺激心肌对大鼠缺血心肌中 VEGF 表达的影响见表 2。

表 2 50 Hz 低电压电刺激心肌对大鼠缺血心肌中 VEGF 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	VEGF mRNA (光密度值)	VEGF 蛋白 (光密度值)
对照组	6	0.90 $\pm$ 0.09	0.18 $\pm$ 0.03
电刺激组	6	1.14 $\pm$ 0.12 ^a	0.25 $\pm$ 0.03 ^a

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$

由表 2 可见, 与对照组比较, 电刺激组大鼠缺血心肌中 VEGF mRNA 及蛋白表达增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。

讨 论

心脏冠状动脉侧支循环的形成和开放能够减轻心肌缺血,防止细胞坏死,预防和延缓缺血性心肌病的形成,改善患者的临床症状和预后。血管新生可促进缺血周边组织侧支循环的建立。心肌中血管的生长分 2 种类型:血管新生和血管发生。血管新生又称真性血管新生,是从原有毛细血管发芽长出新的毛细血管和小的非肌性血管。在正常成年的个体几乎不会发生血管新生,只有在胚胎发育期,或在某些病理状态下才能激活血管新生。心肌缺血是心肌中毛细血管新生的触发因素之一。冠状动脉病变可使冠脉侧支血管新生,后者可以增加冠脉血流,改善心肌局部缺血,增强心肌舒缩功能。目前心肌血管新生基因治疗的动物及临床试验显示,基因治疗虽使心肌缺血得到有效改善,但还存在许多尚未解决的问题。因此,积极寻找新的治疗心肌缺血的手段对临床治疗冠心病具有实用价值。

本研究显示,电刺激组的大鼠缺血心肌中 EC 数与 CD 高于对照组,差异具有统计学意义。提示 50 Hz 低电压电刺激心肌能促进大鼠缺血心肌中的毛细血管新生,这为治疗冠心病心肌缺血在方法学上提供了一个新视角,但具体需要多长时间才能形成有功能的新生血管尚需进一步研究。

50 Hz 低电压电刺激心肌促进大鼠缺血心肌毛细血管新生的机制尚不清楚。Kanno 等^[2]给予培养的骨骼肌和血管平滑肌发放低电压电刺激,发现 50 Hz 电刺激可使骨骼肌细胞中 VEGF mRNA 及蛋白表达增加。余强等^[3]发现,25 Hz 低电压电刺激能促进大鼠缺血心肌的 VEGF 表达,但未发现 50 Hz 低电压电刺激对大鼠缺血心肌的血管新生及 VEGF 的表达产生影

响。近来,Nagasaka 等^[6]发现,50 Hz 低电压电刺激能促进大鼠缺血后肢的血管新生以及 VEGF 和肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)的表达。推测 50 Hz 低电压电刺激可能通过上调大鼠缺血心肌 VEGF 和 HGF 的表达促进了缺血心肌血管的新生。

本研究显示,与对照组比较,电刺激组大鼠缺血心肌中的 VEGF 蛋白和 mRNA 表达均增多,差异具有统计学意义。提示 50 Hz 低电压电刺激的促缺血心肌血管新生作用可能与上调 VEGF 的蛋白和 mRNA 表达有关。至于 HGF 是否介导了 50 Hz 低电压电刺激的促缺血心肌血管新生作用尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 王振涛,韩丽华,朱明军,等. 黄酮、皂苷类中药对促心肌梗死后大鼠缺血心肌血管新生作用及相关生长因子表达的影响. 中西医结合心脑血管病杂志, 2006, 4:305-307.
- [2] Kanno S, Oda N, Abe M, et al. Establishment of a simple and practical procedure applicable to therapeutic angiogenesis. Circulation, 1999, 99:2682-2687.
- [3] 余强,陈运贞. 阈下刺激促大鼠缺血心肌毛细血管新生的研究. 重庆医科大学学报, 2003, 28: 296-299.
- [4] 龙宇飞,王淑琴,何艳. 25 Hz 和 50 Hz 电刺激对大鼠缺血心肌毛细血管新生的影响. 贵阳医学院学报, 2006, 31:388-390.
- [5] 刘兴德,龙宇飞,王艺明,等. 25 Hz 频率阈下电刺激对大鼠缺血心肌 VEGF 和 NF- κ B 表达的影响. 贵阳医学院学报, 2007, 31:9-11.
- [6] Nagasaka M, Kohzuki M, Fujii T, et al. Effect of low-voltage electrical stimulation on angiogenic growth factor in ischaemic rat skeletal muscle. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33:623-627.

(修回日期:2008-02-26)

(本文编辑:松 明)

《中华物理医学与康复杂志》2008 年第 6 期“继续教育园地”答题卡

(文章见本期 430-432 页,测试题见本期 395 页)

姓 名	_____	性别	_____	1.	A	B	C	D
职 称	_____			2.	A	B	C	D
工作单位	_____			3.	A	B	C	D
联系电话	_____	邮编	_____	4.	A	B	C	D
地 址	_____			5.	A	B	C	D

答题卡请寄: 430030 武汉市解放大道 1095 号同济医院《中华物理医学与康复杂志》编辑部收(该答题卡复印有效)