

· 基础研究 ·

电刺激改善下肢缺血及促进骨骼肌血管生成的实验研究

钟林 蔡端 余波 张延龄

【摘要】目的 观察电刺激对后肢缺血大鼠 VEGF 及受体 FLK/KDR 的调节作用。**方法** 采用 SD 大鼠股浅动脉结扎法制备后肢缺血模型,应用 RT-PCR 和免疫组化方法检测电刺激对后肢缺血大鼠 VEGF mRNA 和蛋白表达的影响,应用 Western blot 和免疫荧光测定 FLK-1 表达。**结果** 刺激频率为 25 Hz,强度为 0.3 mA,不引起肌肉收缩。缺血模型建立 7 d 后连续电刺激 7 d,VEGF mRNA 的表达刺激组比非刺激组增加 3 倍(2.58 对 0.93, $P < 0.01$),VEGF 蛋白增加两倍(0.48 对 0.24, $P < 0.01$)。FLK-1 也有明显增加。**结论** 电刺激可促进后肢缺血大鼠 VEGF 和 FLK-1/KDR 的表达,从而实现非分子的治疗性血管生成作用。

【关键词】 电刺激; 血管内皮细胞生长因子; 血管生成

Electrical stimulation relieves ischemia of rat skeletal muscle via angiogenesis ZHONG Lin, CAI Duan, YU Bo, ZHANG Yan-ling. Department of Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of electrical stimulation on the expression of vascular endothelial growth factor(VEGF)mRNA and receptor FLK-1/KDR in a ischemic model of rat hindlimb. **Methods** The model of hindlimb ischemia on the right side was established by ligation of the superficial femoral artery in 10 rats. The rats were then randomized into an experimental group and a control group. The rats in the experimental group were intervened with electrical stimulation (25 Hz, 0.1 V) on the tibialis anterior (TA) of the right side, while those in the control group were not. RT-PCR and immunohistological methods were used to detect the expressions of VEGF mRNA and protein in TA muscles. FLK-1/KDR was detected by means of Western blot and immunofluorescence. **Results** After 7 days of continuous stimulation, there was a significant increase in blood flow within the muscle. VEGF mRNA and VEGF protein had 4-fold and 2-fold increases, respectively, in the stimulated TA muscles as compared to the control(2.58 vs 0.93, 0.48 vs 0.24, $P < 0.01$). FLK-1/KDR expression was up-regulated in the electrically stimulated skeletal muscle. **Conclusion** Electrical stimulation could serve as a nonmolecular therapeutic approach for angiogenesis via promoting VEGF and FLK-1/KDR expressions.

【Key words】 Electrical stimulation; Vascular endothelial growth factor; Tyrosine kinase receptor; Angiogenesis

动脉闭塞性疾病(arterial occlusive diseases)多由动脉粥样硬化引起,每年美国有 1 000 万人面临心、脑、肢体缺血的威胁。尽管药物和血管外科技术已有了长足的进步,但由于血管病变的多节段性和手术后再狭窄的发生,使外科治疗仍面临很大的挑战。近年来,血管生成治疗成为研究热点。Isner 等^[1]首先转染血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)裸质粒进入患肢骨骼肌以改善下肢缺血,促进侧枝循环的建立,并在临床试验中获得重大进展。但是由于基因治疗不可避免带来的免疫原性、致癌性及无调控性,使其应用受到局限,所以非常有必要探求一种非分子的血管生成策略。Debrececi 等^[2]报道,经皮电刺激(transcutaneous electrical stimulation,TES)能改善下肢缺血,且疗效优于药物治疗,然而其机制并不清楚。本实验通过研究电刺激对大鼠 VEGF 及受体 FLK-1 表达的调节作用,

探讨电刺激的血管生成作用。

资料与方法

一、骨骼肌缺血及电刺激模型的建立

选用成年雄性 SD 大鼠共 10 只,每组各 5 只,体重 300 ~ 350 g。先结扎右股浅动脉,然后随机分成两组:电刺激组结扎右股浅动脉 7 d 后,于胫前肌插入带有针灸针的电极,连续刺激 7 d;非刺激组在结扎右股浅动脉后虽同样于胫前肌插入电极,但不进行电刺激治疗。电刺激部位取胫前肌在胫骨粗隆下 1 cm 处,频率为 25 Hz,强度为 0.3 mA (低于肌肉收缩强度),脉冲波形为正弦方波,波宽为 0.3 ms,刺激时间 2 h/d,用激光多普勒测定血流(Perimed 公司,Sweden)。刺激 7 d 后同时取胫前肌做后续实验。

二、VEGF mRNA 的测定

用 RT-PCR 方法检测,用 Ladoux 等^[3]文献介绍的方法设计 VEGF 及内参照 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAP-

DH)引物,由上海生物化工公司合成。Tripure 分离法提取总 RNA,并在紫外分光光度计测定 A_{260} 与 A_{280} 比值,在 1.6 ~ 2.0 范围内。RT-PCR 一步法试剂盒 (Roche Molecular Biochemicals) 进行反应,退火温度 55℃,共进行 35 次循环,以能扩增出 698 bp (VEGF₁₈₈)、626 bp (VEGF₁₆₄) 和 493 bp (VEGF₁₂₀) 条带为阳性。

三、VEGF 蛋白的免疫组化检测

组织切片经脱蜡水化后,用 1% BSA 孵化 30 min,加 VEGF 兔多抗 (1:200, Santa Cruz Biotechnology) 37℃ 孵育 1 h, 4℃ 过夜; TBS 洗涤 3 次,加生物素化羊抗兔二抗 (1:20 华美公司) 37℃ 孵育 1 h; 加入 ABC 复合物, 37℃ 孵育 1 h, 最后进行 DAB 显色 (Elite, Vector laboratory)。

四、FLK-1 的蛋白免疫印迹 (Western blot) 测定

电刺激 7 d 后,收集大鼠新鲜胫前肌,组织修剪称重后,经提取液 (0.1 mol/L HEPES, 1 mol/L NaCl, 0.025 mol/L EDTA, 10 mmol/L PMSF, 10% SDS, 0.1% NP-40) 抽提蛋白;酶标定量后,取 10 μ g 组织蛋白按照本实验室常规方法进行 6% SDS-PAGE 变性电泳,转移至 PVDF 膜,25 V, 30 min,一抗为兔抗 FLK-1 多克隆抗体 (1:200, Santa Cruz 公司),二抗为 HRP 标记的羊抗兔 (1:100, 华美公司),最后 DAB 显色。

五、FLK-1 的免疫荧光测定

冰冻切片经冷丙酮固定 10 min, 0.01 mol/L, pH 7.4 PBS 漂洗 3 次,加一抗兔抗 FLK-1 多克隆抗体 (1:50, Santa Cruz 公司) 30 min, 37℃ PBS $\times$ 3; 二抗为羊抗兔-FITC (1:20, 华美公司) 30 min, 37℃ PBS $\times$ 3; 最后缓冲甘油封片,荧光显微镜下观察。

六、统计学分析

数据均用 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间用 t 检验, $P < 0.05$ 为差别有显著性。

结 果

一、电刺激对 VEGF mRNA 的诱导

缺血模型建立 7 d 后连续电刺激 7 d,电刺激组 VEGF mRNA 的表达为非刺激组的 3 倍 (表 1, 图 1),说明电刺激可显著增加缺血胫前肌 VEGF mRNA 的表达。

二、VEGF 蛋白的表达

电刺激后,缺血胫前肌 VEGF 阳性细胞表达增加,两倍于非刺激对照组 (表 1)。VEGF 表达于肌肉组织内,呈棕黄色,周围可见复染的深蓝色细胞核 (图 2, 图 3)。

表 1 两组大鼠骨骼肌 VEGF 表达的变化 ($\bar{x} \pm SD$)

组 别	n	VEGF mRNA	VEGF 蛋白
电刺激组	5	2.58 $\pm$ 0.08 $\Delta\Delta$	0.48 $\pm$ 0.06 $\Delta\Delta$
非刺激组	5	0.93 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.07

注: $\Delta\Delta$ 与非刺激组比较, $P < 0.01$

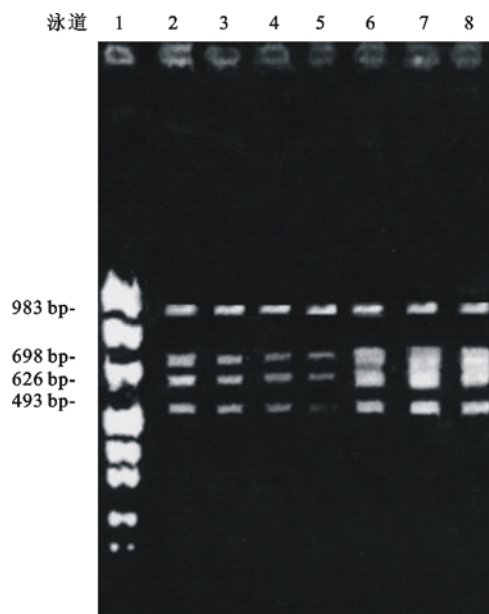


图 1 大鼠缺血骨骼肌 VEGF mRNA 的表达

注: 1—标志物; 983 bp—内参照 GAPDH; 5—对照; 2~4—非电刺激组; 6~8—电刺激组

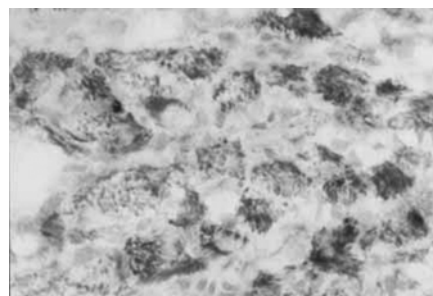


图 2 缺血骨骼肌电刺激 1 周后 VEGF 蛋白的表达 (ABC 染色, $\times 400$)

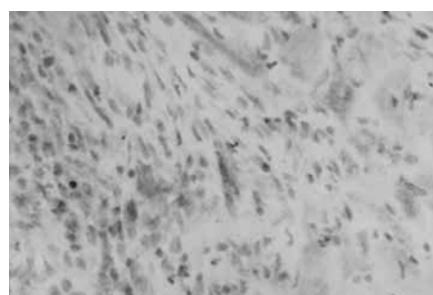


图 3 缺血骨骼肌非刺激组 VEGF 蛋白的表达 (ABC 染色, $\times 400$)

三、VEGF 受体 FLK-1 的蛋白免疫印迹测定结果

电刺激后 180 kd 的 FLK-1 蛋白表达与非刺激组相比显著增加,证实电刺激对 VEGF 受体表达具有诱导作用 (图 4)。

四、FLK-1 的免疫荧光测定

荧光显微镜下,观察到在细胞间质有翠绿色的荧光受体,有一些有明显的半圆形,周围肌肉组织轮廓清晰。电刺激组阳性数明显比非刺激组多。其结果与蛋

白质免疫印迹的结果吻合(图 5,图 6)。

五、缺血大鼠远端血流的变化

用激光多普勒测定缺血后肢血流,以研究电刺激对缺血肢体血管生成及血流的影响。实验侧及对侧胫前肌血流比值作为研究对象,股浅动脉结扎 7 d 后刺激组与非刺激组并无显著性差异,14 d 后刺激组缺血后肢血流增加明显,而非刺激组无显著性变化(图 7)。另外在整个实验过程中大鼠能很好耐受,并未出现肌肉收缩、损伤现象。

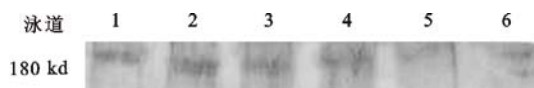


图 4 大鼠胫前肌 FLK-1 蛋白的 Western blot 印迹分析
注:1~3—电刺激组;4~6—非刺激组

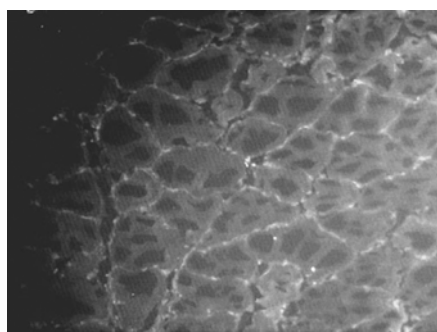


图 5 电刺激后大鼠骨骼肌 FLK-1 的表达 (FITC 染色, $\times 400$)

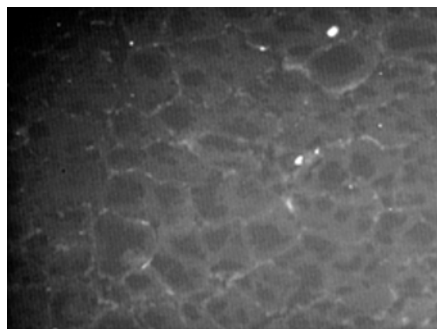


图 6 未电刺激的大鼠缺血骨骼肌 FLK-1 的表达 (FITC 染色, $\times 400$)

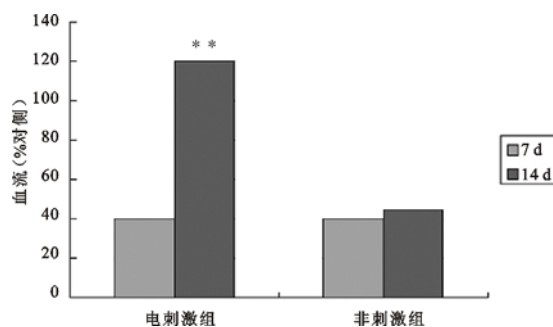


图 7 电刺激对缺血后肢血流的影响

注: ** 电刺激组与非刺激组缺血 14 d 后比较, $P < 0.01$

讨 论

Omura^[4]最先应用 TES 治疗周围循环障碍,并获得了临床安全治疗的参数。Spincemille 等^[5]开展了硬膜外电刺激多中心双盲对照临床试验,其结果证实电刺激对缺血的改善和疼痛的控制与增加微循环 PO_2 和抑制 5-HT 与交感神经的活性有关。然而,电刺激的区域血管生成作用及对 VEGF 和其受体影响的系统研究尚未见报道。

下肢慢性缺血多由动脉粥样硬化、大动脉炎、血栓闭塞性脉管炎等疾病引起,对于失去手术时机和手术治疗失败的患者,临床治疗常显捉襟见肘。本研究旨在探求一种简单可行的治疗性血管生成方法。结果表明,电刺激能改善下肢缺血。经激光多普勒测定,缺血后肢血流在电刺激作用下增加 80%,而非电刺激组变化不明显。不仅如此,电刺激还能促进骨骼肌细胞分泌 VEGF,电刺激 7 d 后 VEGF mRNA 增加 3 倍、蛋白增加 2 倍。更重要的是发现电刺激后骨骼肌间质细胞如内皮细胞 VEGF 受体 FLK-1 的表达增加,此为特异性较好的 Western blot 和免疫荧光测定所证实。VEGF 有两个受体:VEGF-R1/FLT-1 和 VEGF-R2/FLK-1。业已证明,缺血缺氧是通过影响 VEGFR1/FLT-1 引起 VEGF 增高^[6],说明电刺激引起的 VEGF 增高并不是缺血缺氧所造成,而是通过 VEGF-R2/FLK-1 实现。所有这些,都为电刺激在下肢慢性缺血治疗中的临床应用奠定了理论基础。

血管生成受许多因子的影响,Angiopoietin-1、Ephrin 从胚胎时期影响血管生成,前者在血管形成后期维持血流状态,介导内皮与基质网络联系;后者决定血管形成动脉或静脉的方向,但它们都不能直接引起内皮细胞的增殖^[7,8]。与此相反,VEGF 在血管形成早期就促进内皮细胞增殖、迁徙,是血管重塑的始动因子。在电刺激、缺氧、缺血(离体细胞培养)的情况下平滑肌细胞分泌 VEGF 增加,并受血小板刺激因子-1、血小板因子-4 的抑制,VEGF 与内皮细胞 FLT-1、FLK-1/KDR (VEGF 酪氨酸受体)结合。由于 Angiopoietin-1 在肌细胞中合成,使其更易发挥介导内皮细胞与细胞外基质网络联系的作用,它通过 Tie-2 受体与 VEGF 共同作用于 Akt (酪氨酸蛋白激酶 B)而启动内皮细胞内源性信号传导,最终引起内皮细胞增殖、毛细血管增生^[9,10]。

目前,血管生成的治疗策略分两种:一种是以 VEGF 为主的基因治疗;第二种就是电刺激的非分子血管生成策略。前者由于基因治疗不可避免带来的免疫原性、致癌性及无调控性使其应用受到局限。本实验采用电刺激方法可引起区域性的 VEGF mRNA、

VEGF 蛋白表达增加,从而改善缺血肢体远端的血流,并克服了基因治疗的种种缺陷。从而表明,电刺激可以实现非分子的治疗性血管生成作用。

血管生成机制是一个非常复杂的网络,无论是 VEGF 的基因治疗,还是电刺激的非分子策略都还需要进一步深入研究。但就其改善缺血组织毛细血管床的供血来说,电刺激不失为一种值得考虑的选择。

参 考 文 献

- 1 Isner JM, Vale PR, Symes JF, et al. Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ Res*, 2001, 89:389-400.
- 2 Debrececi L, Gyulai M, Debrececi A, et al. Results of transcutaneous electrical stimulation (TES) in cure of lower extremity arterial disease. *Angiology*, 1995, 46:613-618.
- 3 Ladoux A, Frelin C. Expression of vascular endothelial growth factor by cultured endothelial cells from brain microvessels. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 194:799-803.
- 4 Omura Y. Noninvasive circulatory evaluation and electro-acupuncture and TES treatment of diseases difficult to treat in western medicine.

Acupunct Electrother Res, 1983, 8:177-256.

- 5 Spincemaille GH, de Vet HC, Ubbink D, et al. The result of spinal cord stimulation in critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2001, 20:99-105.
- 6 Marti HH, Werner R. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:15809-15814.
- 7 Suri C, Jones P, Patan S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor during embryonic angiogenesis. *Cell*, 1996, 87:1171-1180.
- 8 Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and vein revealed by ehprn-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell*, 1998, 93:741-753.
- 9 Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 2000, 6:389-3950.
- 10 Messina LM, Brevetti LS, Chang DS, et al. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia: invited commentary. *J Control Release*, 2002, 78:285-294.

(收稿日期:2002-06-17)

(本文编辑:郭铁成)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

科技论文中量和单位的使用规则

针对许多作者在来稿中常有量和单位使用错误的状况,特参照《中华人民共和国法定计量单位》和《中华人民共和国法定计量使用方法》,以及 GB3100~3102-93 有关量、单位和符号的规定及其书写规则,结合中华医学会杂志社编写的《法定计量单位在医学上的应用》第 3 版(人民军医出版社,2001 年),对科技论文中量和单位的使用作如下说明,望广大作者写作时注意参照执行。

各种量和单位除在无数值的叙述性文字中可使用中文符号外,均应使用量和单位的国际符号;非物理量的单位(例如个、次、件、人等)一律用中文表示。

1. 单位符号:统一用正体字母,无复数形式。来源于人名的单位(例如 Pa、Gy 等)的首字母大写,“升”一般用大写“L”,其余均为小写。

2. 量值:表示量值时,单位符号应置于数值之后,数值与单位符号之间留 1/4 汉字空。例如:3 mm, 3 L。惟一例外为平面角的单位度(°)、分(')和秒("),数值和单位符号之间不留空隙。例如:30°, 30'45"。

3. 人体及动物内压力检测值的计量单位:根据国家质量技术监督局和卫生部联合发布的《关于血压计量单位使用规定的补充通知》,凡涉及人体和动物体内的压力检测值,可以恢复使用 mm Hg、cm H₂O 等,但在文中第 1 次出现时应注明与 kPa(千帕斯卡)的换算系数。

4. 单位符号的整体性:单位符号是一个整体,不得拆开或移行。若上行末排 mmol/, 下行排 L, 则应将上行末的 mmol/移至下行,与 L 连排成一体。

5. 浓度的表示:一般情况下,统一用 L(升)作为表示人体检验组分浓度单位的分母,而不使用 ml(毫升)、dl(分升)、mm³(立方毫米)等作分母。但当涉及高精度微量测试的问题,强调测试样品为微升、毫升等时,可以用 ml(毫升)、μl(微升)等作分母。

6. 单位符号的组合:单位符号可以与非物理量的单位(如:件、台、人、次等)的汉字构成组合形式的单位,例如:件/d(件每天)。

7. 组合单位符号:在 1 个组合单位符号中,斜线不应多于 1 条。例如:mg/kg/d 应写成 mg/(kg·d),或 mg·kg⁻¹·d⁻¹。

8. 时间的表示方法:天(日)应用“d”,小时应用“h”,分钟应用“min”,上述 3 项的单位符号均用英文小写。在描述第 × 天、第 × 小时、第 × 分钟时,不可用“第 × d”、“第 × h”、“第 × min”;每天、每小时、每分钟,也不可用“每 d”、“每 h”、“每 min”。

9. 离心加速作用的表示:应以重力加速度(g)的倍数的形式表达,例如:6 000 × g 离心 10 min;或者在给出离心机转速的同时给出离心半径,例如:离心半径 8 cm, 12 000 r/min 离心 10 min。

10. 不能把 ppm、pphm、ppb 等缩写字作为单位使用。

《中华物理医学与康复杂志》编辑部