

丹参多酚酸盐对大鼠梗死后心肌组织血管新生的影响及机制研究

方凌燕 刘衍宇 李国达 凌云 梁一波 邓玉丽 余丽

【摘要】 目的:观察丹参多酚酸盐对心肌梗死后大鼠血管新生和血管生长因子(VEGF)、微小 RNA-126(miR-126)表达的影响。 方法:将 55 只雄性 SD 大鼠随机分为丹参多酚酸盐低剂量组(LS 组, $n=15$)、丹参多酚酸盐高剂量组(HS 组, $n=15$)、模型组(M 组, $n=15$)及假手术组(S 组, $n=10$)。HS、LS 及 M 组大鼠行冠状动脉左前降支结扎术建立急性心肌梗死(AMI)模型后,分别予腹腔注射丹参多酚酸盐 30、15 mg/(kg·d)及相应剂量生理盐水。S 组只穿线不结扎,予腹腔注射相应剂量生理盐水,每日 1 次,共 7 d。4 周后,采用免疫组织化学法检测各组大鼠心肌梗死边缘区微血管密度(MVD)和 VEGF 的表达;采用实时荧光定量逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测心肌梗死边缘区 miR-126、VEGF mRNA 表达水平。 结果:M 组 MVD、VEGF 蛋白以及 mRNA 表达均高于 S 组($P<0.05$), M 组 miR-126 表达低于 S 组($P<0.05$);LS 和 HS 组 MVD、VEGF 及 miR-126 表达均高于 M 组($P<0.01$);HS 组 MVD、VEGF 蛋白、VEGF mRNA 及 miR-126 表达高于 LS 组($P<0.01$)。 结论:丹参多酚酸盐对心肌梗死后大鼠血管新生有促进作用,其作用机制可能与上调心肌 miR-126 表达、促进 VEGF 表达有关,且呈剂量依赖性。

【关键词】 丹参多酚酸盐;心肌梗死;血管新生;血管内皮生长因子;微小 RNA-126
doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2015.04.013

Role of salvianolate in angiogenesis after acute myocardial infarction in rats FANG Lingyan¹, LIU Yanyu¹, LI Guoda², LING Yun¹, LIANG Yibo¹, DENG Yuli¹, YU Li². 1. Department of Chronomedical Laboratory, the Second affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Graduate School, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524003, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects of salvianolate on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and microRNA-126 (miR-126) after acute myocardial infarction in rats. **Methods:** A total of 55 male SD rats were randomly allocated to the model(M) group ($n=15$), low-dose salvianolate-treated (LS) group($n=15$), high-dose salvianolate-treated (HS) group ($n=15$) and the sham operated (S) group($n=10$). Left anterior descending coronary artery(LAD) of rats in the M, LS and HS group was ligated to create the models of acute myocardial infarction and rats were given salvianolate at 15 mg/(kg·d), 30 mg/(kg·d), normal saline by intraperitoneal injection for 7 days. The S group was established and given normal saline for 7 days. After 4 weeks, the myocardial microvessel density (MVD) and VEGF in marginal zone of infarcted region were detected by immunohistochemical staining, and the expression levels of miR-126 and VEGF mRNA were determined by real time RT-PCR. **Results:** Compared with the S group, the MVD, VEGF protein and VEGF mRNA were higher but the expression of miR-126 was lower in the M group ($P<0.05$). Compared with

基金项目:湛江市科技财政资金竞争项目(2014A01032)

作者单位:524023 湛江,广东医学院第二附属医院临床时间医学实验室(方凌燕,刘衍宇,凌云,梁一波,邓玉丽);广东医学院研究生院(李国达,余丽)

通信作者:刘衍宇,Email:289757937@qq.com

the M group, the MVD, VEGF protein, VEGF mRNA and miR-126 expression in the LS and HS group all obviously elevated ($P < 0.05$). The MVD, VEGF protein, VEGF mRNA and miR-126 expression in the HS group were higher than those in the LS group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Salvianolate plays a role in promoting angiogenesis after myocardial infarction, through upregulating the expression of miR-126, VEGF and VEGF mRNA in the ischemic region in a dose dependent manner.

【Key words】 Salvianolate; Myocardial infarction; Angiogenesis; Vascular endothelial growth factor; miRNA-126

研究表明,丹参多酚酸盐除了具有传统的保护心肌细胞、抗动脉粥样硬化等功效之外,还有促进血管新生的作用^[1],但具体机制尚不明确。在心肌缺血、缺氧时,血管新生均通过生长因子的作用实现^[2],其中以血管内皮细胞生长因子(VEGF)最为重要。研究表明,微小 RNA-126(miR-126)与血管新生密切相关^[3]。敲除 miR-126 的斑马鱼在胚胎发育阶段出现血管完整性缺失及出血^[4]。本实验通过建立大鼠心肌梗死模型,观察丹参多酚酸盐对大鼠心肌梗死后梗死边缘区 miR-126、VEGF 的表达和微血管密度(MVD)的影响。

1 材料与仪器

SPF 级雄性 SD 大鼠 55 只,体质量 220 ~ 260 g,购自广东省医学实验动物中心[合格证号: SCXK(粤)20080002],饲养于符合 SPF 级实验动物环境。丹参多酚酸盐(上海绿谷制药有限公司)。miR-126、内参 U6 引物、PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq II、SYBR® PrimeScript™ miRNA 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) Kit 检测试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。大鼠 VEGF 引物序列、内参 β -actin 引物序列(上海生物工程有限公司)。VEGF 多克隆抗体、CD34 多克隆抗体、磷酸盐缓冲液(武汉博士德生物工程有限公司)。羊抗兔 IgG、DAB 显色液、苏木素(迈新生物技术开发有限公司)。小动物呼吸机(上海寰熙医疗器械有限公司)。BL-420F 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司)。聚合酶链反应(PCR)扩增仪(德国 Eppendorf 公司)。LightCycler 480 II 实时定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 急性心肌梗死(AMI)模型的制备及分组

HS、LS 和 M 组大鼠参照文献^[5]描述的方法建立 AMI 模型。AMI 模型制作成功判断标准:结扎冠状动脉左前降支后,左室壁变苍白,室壁运动减弱, BL-420F 生物机能实验系统检测心电图 ST 段明显抬高,证明模型制作成功。S 组仅在冠状动脉

左前降支下穿线,不结扎,其他制作程序同 AMI 模型组。所有大鼠在术前 30 min 和术后 3 d 连续肌肉注射 20 万单位青霉素。HS、LS 组大鼠在造模成功后分别予腹腔注射丹参多酚酸盐 30、15 mg/(kg·d),M、S 组大鼠予腹腔注射相应剂量生理盐水。每日 1 次,共 7 d。

2.2 标本采集

4 周后处死大鼠,摘取心脏,剪去主动脉弓、右心室、心房等,在乳头肌横切面切取心肌组织(包括梗死区、移行区、健存区)。心肌组织均分为两份,一份用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,制备厚度为 4 μ m 的组织切片,分别用于 HE 染色和免疫组织化学染色;其余心肌组织置于 -80 °C 冰箱保存,用于实时荧光定量 RT-PCR 检测。

2.3 VEGF 蛋白表达

石蜡切片常规脱蜡和复水,枸橼酸缓冲液热修复,3% H_2O_2 室温孵育,正常山羊血清室温封闭 30 min,滴加兔抗 VEGF 抗体(1:100)4 °C 过夜,PBS 洗 3 次,滴加生物素化羊抗兔 IgG,室温孵育 30 min,PBS 清洗,DAB 显色,常规脱水、透明,中性树脂封片。细胞胞质被染成棕黄色和棕褐色为阳性表达,心肌组织切片采用 Image-pro plus 6.0 软件进行图像定量分析,每个样本做相同切面的 5 张切片,每张切片在 400 倍光镜下随机选择 5 个视野进行测量,计算出平均光密度值,其值越高,蛋白表达量越多。

2.4 MVD 检测

免疫组织化学法染色组织切片,方法同上。CD34 一抗工作浓度为 1:100,凡被染成棕黄色的单个内皮细胞或内皮细胞簇均作为 1 个血管计数,带有较厚肌层的血管或管腔大于 8 个红细胞大小均不计数。在 400 倍视野下,在心肌梗死边缘区进行微血管计数(MVC),每张片随机取 5 个视野,计数每个视野 MVC,取均值。MVD 以毛细血管个数/视野表示,故每例 MVC 值即为该大鼠 MVD 值。

2.5 大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA、miRNA-

126 的表达

采用 Trizol 试剂提取心脏组织标本总 RNA, 逆转录为互补脱氧核糖核酸(cDNA), 以此为模板行 PCR 扩增。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。引物序列: VEGF 上游引物 5'-GCACTGGACCCTGGCTTTAC-3', 下游引物 5'-CCCGCACACCCGATTAGG-3', 扩增片段大小 228 bp; β -actin 上游引物 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 下游引物 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3', 扩增片段大小 150 bp。采用两步法 PCR 反应, 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火延伸 1 min。共 40 个循环, 得到每个样品 Ct 值。

依据宝生物工程(大连)有限公司提供的方法进行引物设计, miR-126 上游引物 5'-GGCATTACTTTTGGTACGCGAAA-3'; U6 上游引物 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3', 反向引物皆为 Takara 提供的通用引物。扩增产物长度分别为 70 bp 和 75 bp。扩增条件同上。实时荧光定量 PCR 等操作按试剂盒说明进行, 采用 U6 作参考基因。得到每个样品 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法计算目的基因表达量, $\Delta Ct = \text{目的基因 Ct} - \text{内参 Ct}$ 。

2.6 统计学分析

应用 SPSS 19.0 软件处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验, 各组 miR-126、VEGF mRNA 相对表达量、MVD 之间的关系采用 Pearson 积差相关分析。统计检验均为双侧概率检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 心肌梗死造模及大鼠存活情况

造模 24 h 内, LS 组 2 只大鼠死亡, HS 组 2 只大鼠死亡, M 组 3 只大鼠死亡。48 h 内, LS 组累计 3 只大鼠死亡, HS 组累计 3 只大鼠死亡, M 组累计 4 只大鼠死亡, S 组无大鼠死亡。48 h 后, 各组未出现死亡大鼠。SD 大鼠心电图见图 1。

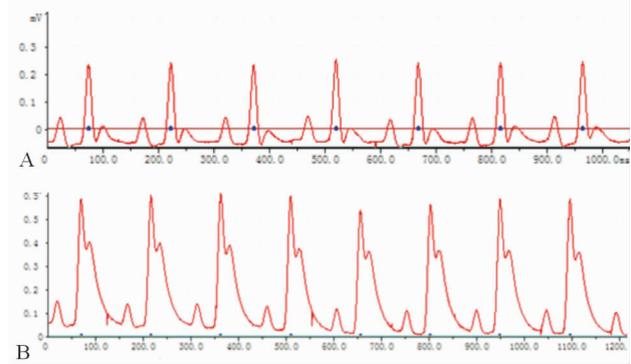
3.2 HE 染色心肌组织病理形态学改变

S 组未见心肌纤维化, 心肌排列整齐; M 组心肌内可见严重的心肌纤维化, 心肌排列紊乱、变粗、间隙增宽; LS 和 HS 组的心肌纤维化程度明显减轻, 心肌排列较 M 组整齐(见图 2)。

3.3 各组大鼠 CD34 表达结果

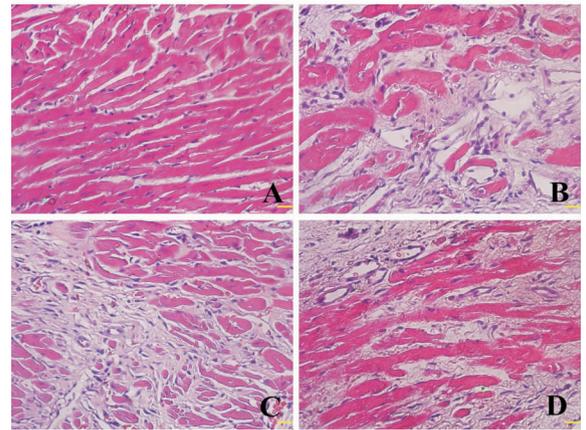
在 400 倍光镜下观察计数 CD34 染色数目即微血管数目, 见图 3。各组均可见新生的微血管, S 组

微血管增生不明显, M 组可见少量微血管增生, LS 组和 HS 组可见较多增生的微血管; M 组 MVD 高于 S 组 ($P < 0.05$), LS 组和 HS 组 MVD 均高于 M 组 ($P < 0.01$), HS 组 MVD 亦高于 LS 组 ($P < 0.01$), 见表 1。



注: A 为结扎左前降支前; B 为结扎左前降支 1 min 后

图 1 SD 大鼠心电图



注: A 为 S 组, B 为 M 组, C 为 LS 组, D 为 HS 组

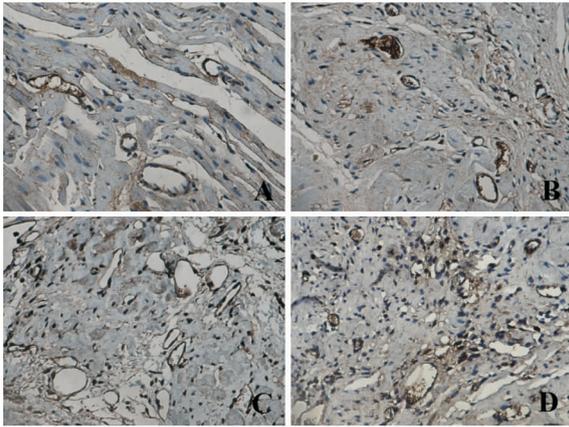
图 2 各组大鼠心肌 HE 染色结果(×400)

3.4 丹参多酚酸盐对心肌梗死大鼠心肌 VEGF 蛋白表达的影响

VEGF 蛋白在心肌细胞和血管内皮细胞的胞浆均有表达, 见图 4。各组大鼠梗死边缘区均可见 VEGF 蛋白表达。M 组 VEGF 蛋白表达高于 S 组 ($P < 0.05$), LS 组和 HS 组 VEGF 蛋白表达均高于 M 组 ($P < 0.01$), HS 组 VEGF 蛋白表达高于 LS 组 ($P < 0.01$), 见表 1。

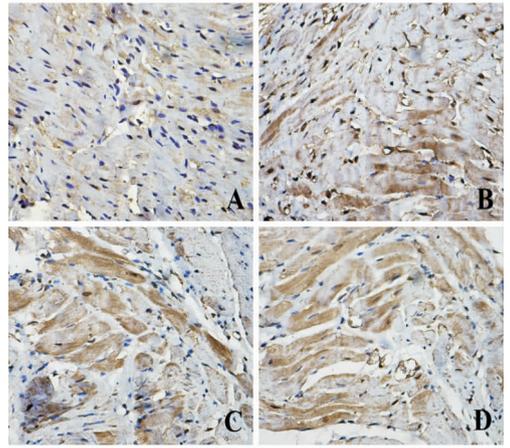
3.5 大鼠心肌梗死边缘区 VEGF mRNA、miR-126 的表达

M 组 VEGF mRNA 表达水平高于 S 组 ($P < 0.05$), 但 miR-126 表达水平低于 S 组 ($P < 0.05$), LS 和 HS 组 VEGF mRNA 及 miR-126 表达水平均高于 M 组 ($P < 0.01$), HS 组 VEGF mRNA 和 miR-126 表达均高于 LS 组 ($P < 0.01$), 见表 2。



注:A为S组,B为M组,C为LS组,D为HS组

图3 各组大鼠心肌CD34相对表达量(×400)



注:A为S组,B为M组,C为LS组,D为HS组

图4 各组大鼠心肌VEGF蛋白相对表达量(×400)

表1 各组大鼠心肌梗死边缘区MVD及VEGF蛋白相对表达量比较

项目	S组(n=10)	M组(n=13)	LS组(n=12)	HS组(n=13)
MVD	6.512 ± 1.914	9.479 ± 2.215 ⁽¹⁾	14.071 ± 3.208 ⁽¹⁾⁽²⁾	18.827 ± 3.674 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
VEGF 平均光密度	0.162 ± 0.038	0.191 ± 0.033 ⁽¹⁾	0.258 ± 0.036 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.313 ± 0.051 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注:与S组比较,⁽¹⁾P<0.05;与M组比较,⁽²⁾P<0.01;与HS组比较,⁽³⁾P<0.01

表2 各组大鼠心肌梗死边缘区VEGF mRNA、miR-126 相对表达量比较

项目	S组(n=10)	M组(n=13)	LS组(n=12)	HS组(n=13)
VEGF mRNA	0.088 ± 0.028	0.125 ± 0.025 ⁽¹⁾	0.168 ± 0.036 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.212 ± 0.051 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
miR-126	0.028 ± 0.006	0.021 ± 0.004 ⁽¹⁾	0.035 ± 0.007 ⁽¹⁾⁽²⁾	0.045 ± 0.008 ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾

注:与S组比较,⁽¹⁾P<0.05;与M组比较,⁽²⁾P<0.01;与HS组比较,⁽³⁾P<0.01

4 讨论

心肌再灌注(包括冠状动脉内支架置入术、溶栓治疗、冠状动脉旁路移植术)是治疗AMI的有效方法,但有严格的时间限制。对于无手术意愿或有禁忌证的患者,其应用受到限制。治疗性血管新生是指通过生物因子、细胞及药物对血管生成进行调控和干预,以促进缺血心肌血管新生,增加侧支循环,改善心肌血供。这种方法能够改善缺血心肌的微循环,提高心肌代偿能力,还可促进缺血心肌侧支循环的建立^[6]。VEGF是目前发现的最重要的血管生长因子之一。近年的研究证实,VEGF能促进血管新生,使缺血心肌建立有效的侧支循环^[7]。中药制剂也有促进缺血心肌侧支循环形成的作用^[8-9]。miR-126是血管内皮特异性miRNA,它与血管新生密切相关。Harris等^[10]发现,miR-126基因敲除的小鼠心肌梗死后冠状动脉侧支循环比对照组明显减少。Chen等^[11]在小鼠心肌缺血区域注射经转染能稳定表达miR-126的骨髓间充质干细胞(MSC)。结果显示,小鼠心肌梗死区毛细血管密

度明显增加,侧支循环明显增强。研究发现,miR-126可直接或间接调节VEGF表达,促进血管新生^[10]。以上研究均证实miR-126和VEGF可促进血管新生,miR-126可调控VEGF的表达,与本研究结果一致。

本研究结果显示,M组MVD、VEGF蛋白及mRNA表达均高于S组,说明心肌梗死后的缺血、缺氧环境能刺激VEGF合成增多,促进血管新生。HE染色显示,M组梗死后心肌纤维化、心室重构明显,侧支循环和血管新生有限,缺血区心肌的血供不足,因而不能有效逆转心室重构。LS组和HS组MVD、VEGF蛋白及mRNA表达水平均明显高于M组,HS组MVD、VEGF蛋白和mRNA表达均高于LS组。HE染色显示,LS组和HS组的心肌纤维化程度明显减轻,心肌排列较整齐,提示丹参多酚酸盐可能通过上调VEGF mRNA和蛋白表达,促进梗死边缘区新生血管的形成,使缺血局部建立有效的侧支循环,逆转心室重构,恢复缺血区功能,且该效应呈剂量依赖性。M组miR-126表达低于S

组,LS 组和 HS 组 miR-126 表达均高于 M 组;HS 组 miR-126 表达高于 LS 组,说明心肌梗死后 miR-126 表达下调^[12],因而 M 组血管新生不明显,而丹参多酚酸盐能上调 miR-126 表达,促进血管新生。VEGF mRNA 可能是 miR-126 的靶 mRNA,或 miR-126 通过调控其他靶 mRNA,影响 VEGF mRNA 表达。

参 考 文 献

[1] 庄 钦,毛 威.丹参多种活性成分调节血管新生机制的研究概述[J].浙江中医药大学学报,2014,38(4):506-510.

[2] 王雪婷,罗 明.微小 miR-126 在血管内皮细胞中的生物学功能[J].国际心血管病杂志,2014,41(1):4-6.

[3] Giacca M, Zacchigna S. VEGF gene therapy: therapeutic angiogenesis in the clinic and beyond[J]. Gene Ther,2012,19(6):622-629.

[4] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis[J]. Dev Cell,2008,15(2):261-271.

[5] 黄绍湘,路超,李 峰,等.大鼠心肌梗死模型的建立[J].辽宁中医杂志,2014,41(3):586-588.

[6] 张少言,林贲霄,陈 浩,等.血管新生与冠心病治疗性血管生

成[J].心血管病学进展,2014,35(1):55-59.

[7] Lassaletta AD, Elmadhun NY, Burgess TA, et al. Microvascular notch signaling is upregulated in response to vascular endothelial growth factor and chronic myocardial ischemia[J]. Circ J,2014,78(3):743-751.

[8] Sodha NR, Chu LM, Boodhwani M, et al. Pharmacotherapy for end-stage coronary artery disease [J]. Expert Opin Pharmacother,2010,11(2):207-213.

[9] 贺延奇.中医药对冠心病治疗性血管新生研究[J].亚太传统医药,2014,10(4):85-86.

[10] Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, et al. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2008,105(5):1516-1521.

[11] Chen JJ, Zhou SH. Mesenchymal stem cells overexpressing MiR-126 enhance ischemic angiogenesis via the AKT/ERK-related pathway[J]. Cardiol J,2011,18(6):675-681.

[12] Long G, Wang F, Duan Q, et al. Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction[J]. Int J Biol Sci,2012,8(6):811-818.

(收稿:2014-12-01 修回:2015-06-04)

(本文编辑:孙 雯)

(上接第 224 页)

[16] Unverdorben M, Vallbracht C, Cremers B, et al. Paclitaxel-coated balloon catheter versus paclitaxel-coated stent for the treatment of coronary in-stent restenosis [J]. Circulation, 2009,119(23):2986-2994.

[17] Rittger H, Brachmann J, Sinha AM, et al. A randomized, multicenter, single-blinded trial comparing paclitaxel-coated balloon angioplasty with plain balloon angioplasty in drug-eluting stent restenosis: the PEPCAD-DES study[J]. J Am Coll Cardiol,2012,59(15):1377-1382.

[18] Wöhrle J, Zadura M, Möbius-Winkler S, et al. SeQuentPlease World Wide Registry: clinical results of SeQuent please paclitaxel-coated balloon angioplasty in a large-scale, prospective registry study[J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60

(18):1733-1738.

[19] Byrne RA, Neumann FJ, Mehilli J, et al. Paclitaxel-eluting balloons, paclitaxel-eluting stents, and balloon angioplasty in patients with restenosis after implantation of a drug-eluting stent (ISAR-DESIRE 3): a randomised, open-label trial[J]. Lancet,2013,381(9865):461-467.

[20] Xu B, Gao R, Wang J, et al. A prospective, multicenter, randomized trial of paclitaxel-coated balloon versus paclitaxel-eluting stent for the treatment of drug-eluting stent in-stent restenosis: results from the PEPCAD China ISR trial[J]. JACC Cardiovasc Interv,2014,7(2):204-211.

(收稿:2014-11-03 修回:2015-06-04)

(本文编辑:丁媛媛)