

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cxyb.002932

Ghrelin对易损斑块内血管新生和心肌梗死后血管新生的影响及机制研究

王 丽, 庞 俊, 陈庆伟, 李桂琼, 柯大智

(重庆医科大学附属第二医院老年心血管科, 重庆 400010)

[摘要]目的: 探讨 ghrelin 对易损斑块内血管新生和心肌梗死后血管新生的影响及机制。方法: 将 ApoE^{-/-}小鼠分为易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组。所有 ApoE^{-/-}小鼠均高脂饮食喂养 12 周诱导动脉粥样硬化易损斑块, 构建的动脉粥样硬化易损斑块模型即为易损斑块组。遗传背景相同的 C57BL/6J 小鼠正常饮食喂养 12 周, 分为正常对照组和单纯心梗组。第 8 周时, 单纯心梗组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组结扎冠状动脉左前降支构建急性心梗模型。急性心梗造模后, ghrelin 干预组腹腔注射 ghrelin(100 μg/kg, 2 次/d), 直至第 12 周实验结束。超声心动图检测各组左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) 和左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS), 油红 O 染色观察主动脉窦粥样斑块面积的百分比, CD31 免疫组化染色检测易损斑块内和心梗周边区新生血管生成密度(microvascular density, MVD), Masson 染色检测心肌梗死面积。Real-time PCR 和 Western blot 分别检测各组血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管生成素(angiopoietins, Ang)-1/2 和酪氨酸激酶受体(tyrosine-protein kinase receptor, Tie)-2 的表达。结果: ①与单纯心梗组相比, 易损斑块+心梗双模型组[(65.518 ± 4.160)% , P=0.000]心梗面积明显增加, LVEF[(58.560 ± 11.900)% , P=0.012]和 LVFS[(27.182 ± 7.807)% , P=0.013]降低, 心梗周边区 MVD(5.800 ± 0.837, P=0.000)减低, VEGF(1.870 ± 0.122, P=0.001)、Ang-1(1.830 ± 0.056, P=0.007)、Ang-2(1.660 ± 0.217, P=0.006)和 Tie-2(1.660 ± 0.115, P=0.020)表达降低, ghrelin 干预后可明显缩小心梗面积[(39.751 ± 3.039)% , P=0.000], 增加易损斑块+心梗双模型组 LVEF[(74.679 ± 6.535)% , P=0.013]和 LVFS[(37.507 ± 5.210)% , P=0.020], 增加心梗周边区 MVD(9.857 ± 1.345, P=0.000), 升高 VEGF(3.503 ± 0.384, P=0.004)、Ang-1(3.277 ± 0.186, P=0.017)、Ang-2(3.450 ± 0.187, P=0.000)和 Tie-2(3.133 ± 0.139, P=0.009)的表达; ②易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组主动脉窦粥样斑块面积的百分比、斑块内 MVD、斑块内 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的基因与表达在 3 组间无统计学差异, ghrelin 对易损斑块合并心梗小鼠斑块内血管新生无影响。结论: Ghrelin 可通过上调 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的基因与蛋白表达, 促进易损斑块+心梗双模型组小鼠心梗后血管新生, 减少心肌梗死面积, 稳定和缩小易损斑块。Ghrelin 对易损斑块+心梗双模型组小鼠斑块内血管新生无影响。

[关键词]ghrelin; 血管新生; 易损斑块; 心肌梗死; 血管内皮细胞生长因子**[中图分类号]**R543.7**[文献标志码]**A**[收稿日期]**2020-12-21

Effects and mechanisms of ghrelin on angiogenesis in vulnerable plaque and myocardial infarction

Wang Li, Pang Jun, Chen Qingwei, Li Guiqiong, Ke Dazhi

(Department of Geriatrics Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

[Abstract]Objective: To investigate the effects and mechanisms of ghrelin on angiogenesis in vulnerable plaque and myocardial infarction. Methods: The ApoE^{-/-} mice were divided into vulnerable plaque group, vulnerable plaque + myocardial infarction group and ghrelin-intervened group. All ApoE^{-/-} mice were fed with a high-fat diet for 12 weeks to induce atherosclerotic vulnerable plaques. The induced-atherosclerotic vulnerable plaque model was established in vulnerable plaque group. The C57BL/6J mice were fed for 12 weeks on a normal diet and divided into control group and myocardial infarction group. At the 8th week of this study, myocardial infarction group, vulnerable plaque + myocardial infarction group and ghrelin group were subjected to acute myocardial infarction model. After this model, the ghrelin group was administered ghrelin(100 μg/kg, bid) until the end of the 12th week. The left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fraction shortening (LVFS) were detected by echocardiography and the percentage of atherosclerotic plaque area in aortic sinus was observed by Oil red O staining. The microvascular density

作者介绍: 王 丽, Email: 84134176@qq.com,

研究方向: 老年心血管疾病研究和治疗。

通信作者: 陈庆伟, Email: Chenqwcq@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 31600957, 31871182)。

优先出版: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20211206.1503.004.html>

(2021-12-07)

(MVD) in vulnerable plaque and surrounding area of myocardial infarction were measured by CD31 immunohistochemistry and Masson staining, respectively. The mRNA and protein expression of vascular endothelial growth factor(VEGF),angiopoietins(Ang)-1/2 and tyrosine-protein kinase receptor(Tie)-2 were respectively examined by real-time PCR and Western blot. **Results:** ①Compared with myocardial infarction group, the myocardial infarct size in vulnerable plaque + myocardial infarction group[($65.518 \pm 4.160\%$, $P=0.000$) was increased, whereas the LVEF[$(58.560 \pm 11.900\%)$, $P=0.012$] and LVFS[$(27.182 \pm 7.807\%)$, $P=0.013$], the MVD (5.800 ± 0.837 , $P=0.000$) in the peripheral area of myocardial infarction, and the expression of VEGF(1.870 ± 0.122 , $P=0.001$), Ang-1 (1.830 ± 0.056 , $P=0.007$), Ang-2 (1.660 ± 0.217 , $P=0.006$) and Tie-2 (1.660 ± 0.115 , $P=0.020$) were decreased, significantly. Additionally, the ghrelin intervention had significantly reduced myocardial infarct size [$(39.751 \pm 3.039\%)$, $P=0.000$], and improved LVEF [$(74.679 \pm 6.535\%)$, $P=0.013$], LVFS [$(37.507 \pm 5.210\%)$, $P=0.020$], the MVD (9.857 ± 1.345 , $P=0.000$) in the peripheral area of myocardial infarction, and the expression of VEGF(3.503 ± 0.384 , $P=0.004$), Ang-1(3.277 ± 0.186 , $P=0.017$), Ang-2(3.450 ± 0.187 , $P=0.000$) and Tie-2(3.133 ± 0.139 , $P=0.009$) of the vulnerable plaque + myocardial infarction group. ②There were no significant differences in the percentage of aortic sinus plaque area, the MVD in vulnerable plaque, and the expression of VEGF, Ang-1, Ang-2 and Tie-2 among the vulnerable plaque group, the vulnerable plaque + myocardial infarction group and the ghrelin-intervened group. Regrettably, ghrelin had no effect on angiogenesis in vulnerable plaque+ myocardial infarction mice. **Conclusion:** Ghrelin can promote angiogenesis in ischemic myocardium, reduce myocardial infarct size, and stabilize vulnerable plaque by increasing the mRNA and protein expression of VEGF, Ang-1, Ang-2 and Tie-2. Ghrelin had no effect on angiogenesis in vulnerable plaque of vulnerable plaque + myocardial infarction group.

【Key words】ghrelin;angiogenesis;vulnerable plaque;myocardial infarction;vascular endothelial growth factor

研究发现,血管新生(angiogenesis)是体内多种疾病重要的病理机制和发病原因^[1]。动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)斑块内血管新生所致易损斑块破裂和血栓形成是导致急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)的重要病因,抑制斑块内血管新生是稳定或逆转易损斑块的潜在治疗靶点^[2-3]。患者在发生AMI后,其梗死周边缺血区域的血管新生是机体对缺血的一种重要代偿机制,促进梗死周边区血管新生、改善冠脉微循环已成为心梗治疗的重要手段^[4]。应用药物或化学肽类促进缺血区血管新生同时抑制斑块内血管新生是当前关注的热点。

Ghrelin 是 1999 年由日本学者 Kojima 等从大鼠胃黏膜中分离纯化的一个含有 28 个氨基酸的多肽,是生长激素促分泌物受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)的内源性配体。综合目前国内外研究,ghrelin 被认为是一种内源性血管新生(促进或抑制)的调节因子^[2-3,5-10]。既往研究发现,ghrelin 可促进糖尿病心梗大鼠缺血心肌微血管新生^[6]和抑制兔腹主动脉粥样硬化易损斑块内血管新生^[2-3],提示 ghrelin 可能具有促进心梗后血管新生和抑制斑块内血管新生的双重效应。但上述研究分别在大鼠和兔中完成,有些甚至是体外实验。同一动物机体内 ghrelin 是否具有促进心梗后血管新生和抑制斑块内血管新生的双重效应及其相关机制,是本文探讨的重点。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

Ghrelin 购自 Abcam(美国),免抗小鼠 CD31 购自 Abcam(美国),免抗小鼠血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)购自 Millipore(美国),免抗小鼠血管生成素(angiopoietins, Ang)-1 购自 Abcam(美国),免抗小鼠 Ang-2 购自 Abcam(美国),小鼠抗小鼠络氨酸激酶受体(tyrosine-protein kinase receptor, Tie)-2 购自 Abcam(美国),小鼠抗兔 β -actin 购自碧云天生物技术研究所(中国),山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗购自中杉金桥(北京,中国),油红 O 购自 Sigma(美国),逆转录和荧光定量 PCR 试剂盒购自 Takara(大连,中国),VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 引物合成自上海生工(中国)。全自动生化分析仪(Olympus2700,日本),显微镜(Olympus,日本),全自动酶标仪(Thermo,美国)。聚丙烯酰胺凝胶电泳垂直电泳槽、半干转移电泳槽及凝胶成像仪购自 Bio-Rad 公司(美国)。高脂饲料:基础饲料 79%+脂肪 21%+胆固醇 0.15% (由第三军医大学大坪医院实验动物中心合成)。

1.2 模型的制备

8 周龄雄性 ApoE^{-/-}小鼠 30 只,体质量 26~29 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。将 ApoE^{-/-}小鼠随机分为易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组,每组 10 只。所有 ApoE^{-/-}小鼠均高脂饮食喂养 12 周诱导动脉粥样硬化易损斑块,构建的动脉粥样硬化易损斑块模型即为易损斑块组。遗传背景相同的 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 20 只,正常饮食喂养 12 周,随机分为正常对照组和单纯心梗组,每组 10 只。第 8 周时,单纯心梗组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组结扎冠状动脉左前降支构建急性心梗模型。

急性心梗造模后,ghrelin 干预组腹腔注射 ghrelin(100 μg/kg, 2 次/d),其余组分别腹腔注射等量生理盐水,直至第 12 周实验结束。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准。

1.3 实验方法

1.3.1 M 型超声检测小鼠心功能及血脂测定 Ghrelin 腹腔注射干预 4 周后,采用超声心动图检测小鼠心功能。采用探头频率 10 MHz 的美国 GE Vivid 7 超声诊断仪测量(在重庆医科大学儿童医院心脏超声科完成)。清醒状态下固定小鼠,左侧胸部脱毛后,取胸骨旁左心室长轴切面,M 型超声测量左心室收缩功能以左室射血分数(left ventricular ejection fraction,LVEF) 及左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS) 表示。至少重复测量 3 个心动周期。所有测量采用双盲法,由心脏超声专业医师进行测定。超声检查后,隔夜禁食眼眶采血,全自动生化分析仪测定血浆甘油三酯(triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C) 和高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol,HDL-C),所有指标在重庆医科大学附属第二医院检验科测定完成。

1.3.2 油红 O 染色观察主动脉窦动脉粥样斑块面积占管腔总面积的百分比 各实验组小鼠每组 3 只,用 10% 水合氯醛按 3.5 mL/kg 腹腔注射麻醉后开胸经左心室插管,以生理盐水快速冲洗血液,随后用 4°C 含 4% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution,PBS) 内灌注固定,自主动脉根部至腹主动脉末端离断整个主动脉,用剪刀剪开,生理盐水反复冲洗,剥去动脉壁的外膜,油红 O 染色。将染色好的主动脉用数码相机照相后,用 IPP 6.0 软件测定 AS 斑块表面积与动脉壁表面积,计算呈红色的 AS 斑块表面积与整个动脉壁表面积的百分比。断颈处死剩余小鼠,仔细分离心脏和整个腹主动脉,用生理盐水轻轻漂洗后,予 4% 多聚甲醛过夜固定,石蜡包埋,4 μm 切片,HE 染色,计算主动脉斑块横断面积与管腔面积百分比。

1.3.3 CD31 免疫组化染色检测梗死边缘区和易损斑块内新生血管生成密度(microvascular density,MVD) 石蜡切片常规脱蜡、水化,微波抗原修复,封闭 15 min,一抗(CD31,稀释比例为 1:200)、37°C 2 h, PBS 洗 3 次。二抗室温 15 min, PBS 洗 3 次,DAB 显色,苏木素复染。200 倍显微镜下每组选取 10 个视野计数微血管数目,均值代表该样本的血管生成水平。

1.3.4 Masson 染色检测心肌梗死面积 用 Masson 染色(康为世纪,中国)检测梗死边缘区胶原生成情况及心肌梗死面积。在进行此种染色时,梗死心肌被纤维组织替代,被染成蓝色,存活心肌为红色。计算梗死心肌与左心室心肌面积比值。应用 IPP 6.0 软件测量并统计坏死心肌与全部左心室心肌面积的百分比,各组取平均值。

1.3.5 Real-time PCR 检测 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的 mRNA 表达 分别取梗死边缘区心肌组织和腹主动脉各约 50 mg,加入 1 mL Trizol,冰上匀浆,提取总 RNA,并合成 cDNA。所有引物均参照 Genbank 提供的序列,用 Primer 5.0 设计,由上海生工合成。引物序列如下:VEGF(154 bp):上游‘AGAA-GCAGTCCCTGGAGTAGA’,下游‘TCCGATCTCCAGTTAGCA-CC’;Ang-1(197 bp):上游‘TAGGGGCACACTCATGCATTC’,

下游‘TGTAACCGTTCAGCGTGGAG’;Ang-2(211 bp):上游‘CTACTCGCTCAAGGCCACAA’,下游‘GTGCAGGCTTAAGT-GATGCG;Tie-2(121 bp):上游‘GCTCAGGTGCCACTGTAC-CAATG’,下游‘GTCATCCTGGCCTGCCTTGC’;内参 β-actin(174 bp):上游‘GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG’,下游‘ATGCCACAGGATTCCATACC’。反应条件:第 1 次循环 95°C 2 min,其后以 95°C 变性 5 s,60°C 退火 10 s,72°C 延伸 30 s,循环 40 周期,最后以 72°C 5 min 终止。反应完成后计算机自动分析 Ct 值。Ct 值定义为每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。根据溶解曲线和产物电泳结果判断反应产物特异性。目的基因与 β-actin 的相对比值作为其表达量,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相对比值。

1.3.6 Western blot 检测 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的蛋白表达 分别提取梗死边缘区心肌组织和腹主动脉易损斑块总蛋白,用 BCA 法测定样品的蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳:加适量的 5 × 上样缓冲液 99°C 变性 5 min,分离胶的浓度是 12%,每泳道加 36 μg 蛋白。蛋白样品先 80 V 电泳 30 min,进入分离胶,然后 100 V 电泳 1.5 h 至胶下端 1 cm 左右,85 V 湿转 90 min 将蛋白印迹到 PVDF 膜上,剪出目的条带。5% 脱脂牛奶浸泡封闭 1 h,加一抗(anti-VEGF,1:1 000;anti-Ang-1,1:1 000;anti-Ang-2,1:1 000;anti-Tie-2,1:1 000;β-actin,1:2 000)4°C 摆晃过夜,用 TBST(pH=7.5,10 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L NaCl 和 0.2% Tween-20) 液洗膜 10 min × 3 次。加二抗(1:1 000) 室温下摇晃 2 h。用 TBST 液洗膜 10 min × 3 次。将膜放在 0.5 mL ECL 检测试剂混合液中孵育约 1 min,利用化学发光法进行图像扫描,保存图像。

1.4 统计学处理

所有资料采用 SPSS 17.0 统计分析软件处理。所得数值以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。其余组与正常对照组比较采用单因素方差分析中两两比较的 Dunnett 法,2 组之间的比较采用 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 体质量及血脂变化

正常对照组和单纯心梗组体质量和血脂 4 项无明显差异。易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组、ghrelin 干预组的体质量、TC、LDL-C 和 HDL-C 均高于正常对照组。Ghrelin 干预后可明显降低易损斑块+心梗双模型组 TG 水平,而 2 组间体质量、TC、LDL-C 和 HDL-C 无统计学差异。各组小鼠体质量和血脂变化见表 1。

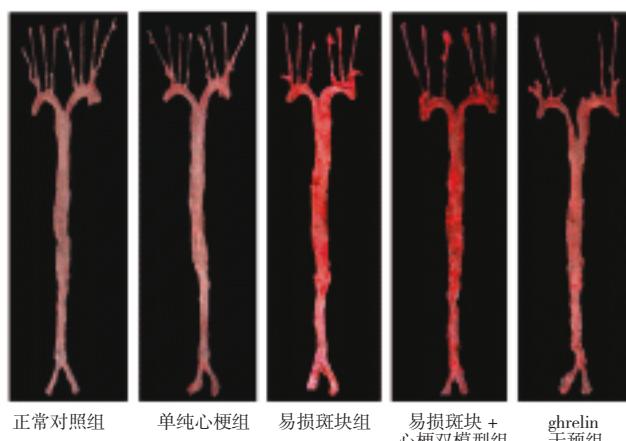
2.2 各组小鼠 AS 斑块面积的评估

正常对照组和单纯心梗组小鼠腹主动脉内膜几乎无 AS 斑块形成(图 1A、D、E)。高脂饮食喂养 12 周后,易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组小鼠腹主动脉内膜出现大量脂质伴粥样斑块形成(图 1A、D、E),其主动脉斑块表面积和横断面面积均较正常对照组明显增加(图 1B、C),而易损斑块组和易损斑块+心梗双模型组斑块表面积、横断面面积比较无统计学差异。Ghrelin 干预后可明显减少易损斑块+心梗双模型组小鼠主动脉斑块的表面积和横断面面积(图 1B、C)。

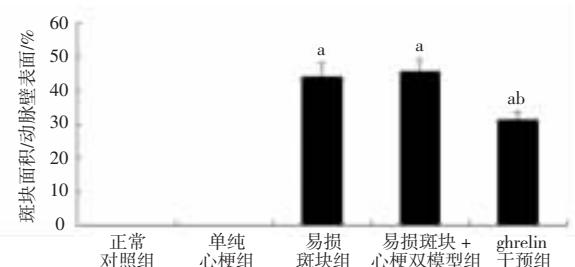
表 1 各组小鼠体质量及血脂变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

指标	正常对照组	单纯心梗组	易损斑块组	易损斑块 + 心梗双模型组	ghrelin 干预组	F 值	P 值	两两比较结果
体质量/g	28.583 ± 1.007	29.120 ± 1.511	32.250 ± 1.249^a	31.280 ± 1.432^b	30.971 ± 2.011^c	6.007	0.002	^a P=0.001 ^b P=0.024 ^c P=0.030
TC/(mmol·L ⁻¹)	2.140 ± 0.195	1.998 ± 0.229	8.158 ± 1.642^a	8.318 ± 1.634^a	8.490 ± 1.555^a	41.116	0.000	^a P=0.000
TG/(mmol·L ⁻¹)	0.710 ± 0.083	0.750 ± 0.168	1.365 ± 0.363^a	1.602 ± 0.556^b	1.013 ± 0.233^d	8.221	0.000	^b P=0.005 ^d P=0.000 ^c P=0.029
LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	0.203 ± 0.037	0.184 ± 0.049	0.730 ± 0.265^a	0.764 ± 0.200^a	0.781 ± 0.175^a	18.441	0.000	^a P=0.000
HDL-C/(mmol·L ⁻¹)	1.552 ± 0.167	1.426 ± 0.133	2.403 ± 0.386^a	2.576 ± 0.548^a	2.330 ± 0.250^a	14.472	0.000	^a P=0.000

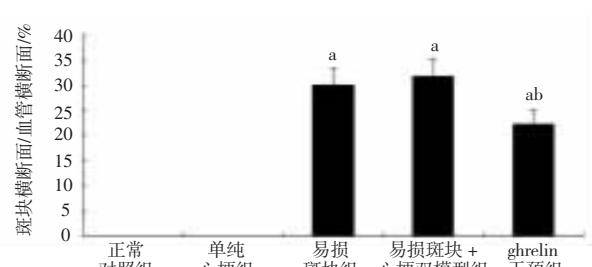
注:a,与正常对照组比较;b:与正常对照组比较;c:与正常对照组比较;d:与易损斑块+心梗双模型组比较



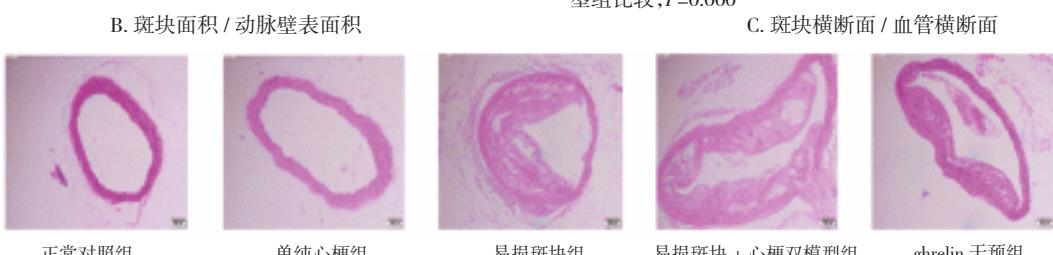
A. 各组油红O染色



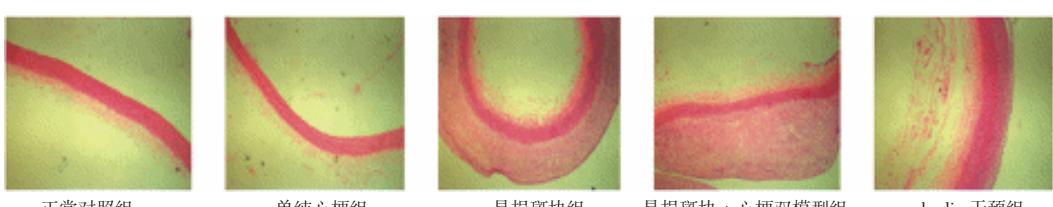
注:a,与正常对照组比较,P=0.000; b:与易损斑块+心梗双模型组比较,P=0.000



注:a,与正常对照组比较,P=0.000; b:与易损斑块+心梗双模型组比较,P=0.000



D. 各组 HE 染色(200×)



E. 各组 HE 染色(400×)

图 1 各组小鼠动脉粥样硬化斑块面积的评估 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3 CD31 免疫组化染色检测心梗后血管新生和斑块内血管新生

心梗后血管新生:CD31 抗体附着于血管内皮细胞,免疫组化染色阳性为新生血管。正常对照组和易损斑块组心肌组织有极少量微血管新生。单纯心梗组梗死周边区有大量微血管新生,易损斑块+心梗双模型组梗死周边区 MVD 较单纯心梗组明显较少,ghrelin 干预后明显增加易损斑块+心梗双模型组梗死周边区 MVD(图 2A)。各组 200 倍显微镜下计数微血管生成数(直方图所示,图 2C)。斑块内血管新生:正常对照组和单纯心梗组腹主动脉无动脉粥样硬化斑块形成。易损斑块组小鼠腹主动脉粥样斑块内有大量微血管新生,易损斑块+心梗双模型组小鼠腹主动脉粥样斑块内 MVD 与易损斑块组比较无明显性差异,ghrelin 干预后对易损斑块+心梗双模型组小鼠腹主动脉粥样斑块内 MVD 无明显变化(图 2B)。

2.4 各组小鼠心肌梗死面积

正常对照组和易损斑块组染成红色的心肌组织中几乎无或极少量染成蓝色的间质纤维(图 3A)。单纯心梗组梗死周边区心肌组织中镶嵌有较多染成蓝色的间质纤维,易损斑块+心梗双模型组梗死周边区间质纤维增生明显加重,可见大片染成灰蓝色的间质纤维,ghrelin 腹腔注射干预后可见其间质纤维的增生较易损斑块+心梗双模型组明显减少(图 3A)。

IPP 6.0 计算各组心肌梗死面积的百分比(直方图所示,图 3B)。

2.5 各组小鼠心功能变化

Ghrelin 腹腔注射干预 4 周后,M 型超声心动检测各组小鼠 LVEF 和 LVFS(图 4A)。正常对照组和易损斑块组 LVEF(图 4B)和 LVFS(图 4C)明显高于其余各组,但 2 组间无统计学差异。与单纯心梗组相比,易损斑块+心梗双模型组 LVEF(图 4B)和 LVFS(图 4C)明显降低。Ghrelin 干预后可明显改善易损斑块+心梗双模型组 LVEF(图 4B)和 LVFS(图 4C)。

2.6 各组小鼠 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的 mRNA 表达

通过荧光定量 PCR 检测各组 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的 mRNA 表达。正常对照组和易损斑块组未诱导缺血心肌,其心肌组织 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的 mRNA 表达无变化。与正常对照组相比,单纯心梗组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组心梗周边区缺血心肌 VEGF(图 5A)、Ang-1(图 5B)、Ang-2(图 5C)和 Tie-2(图 5D)的表达均明显升高。与单纯心梗组相比,易损斑块+心梗双模型组缺血心肌 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 表达均降低,ghrelin 干预后可明显增加易损斑块+心梗双模型组缺血心肌 VEGF(图 5A)、Ang-1(图 5B)、Ang-2(图 5C)和 Tie-2(图 5D)的 mRNA 表达。正常对照组和单纯心梗组腹主动脉无易损斑块形成。与正常对照组相比,易损斑块成模后,易损斑块组、易

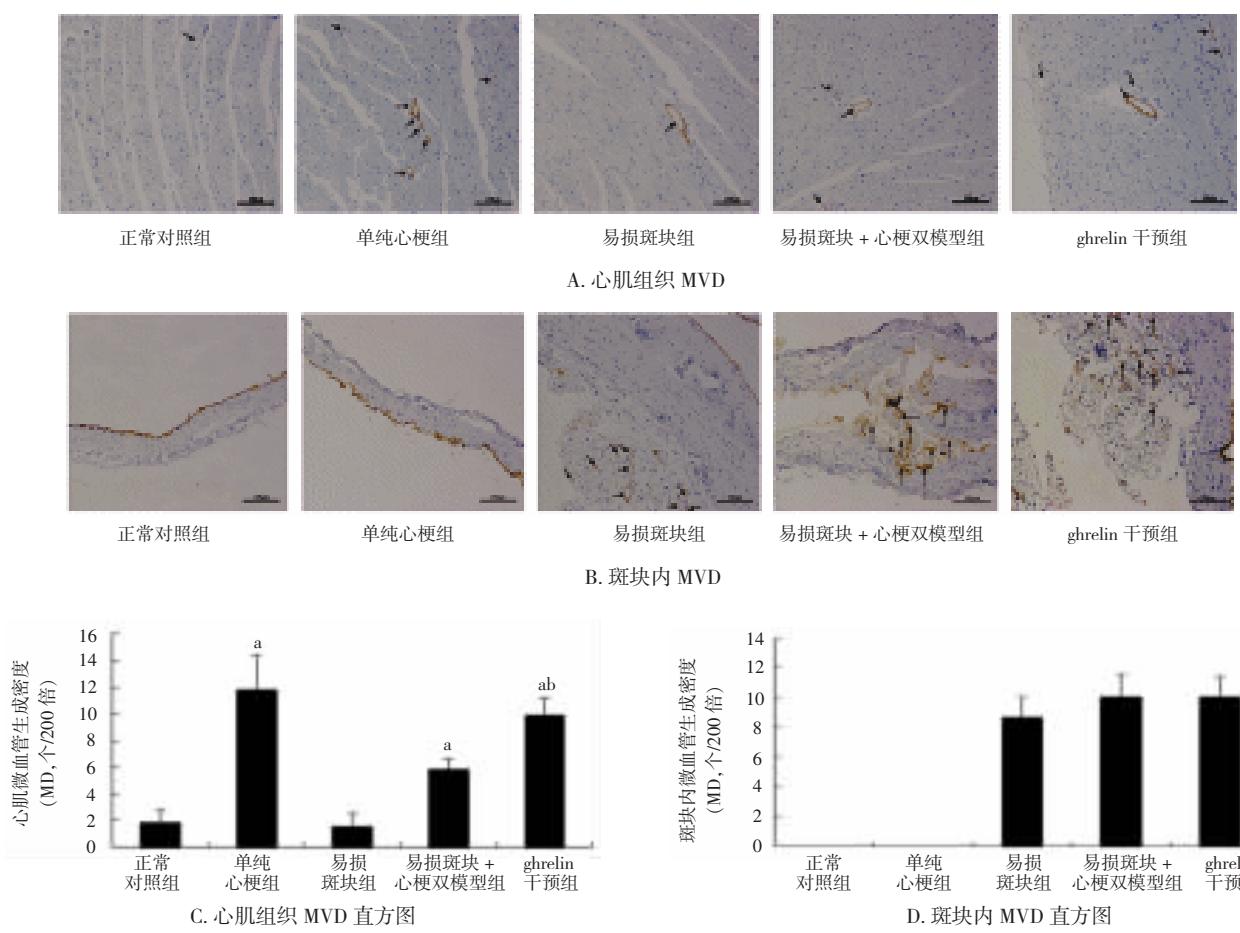
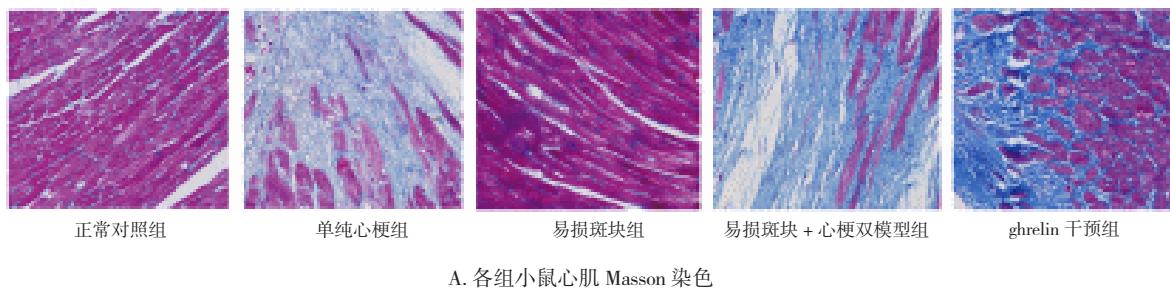
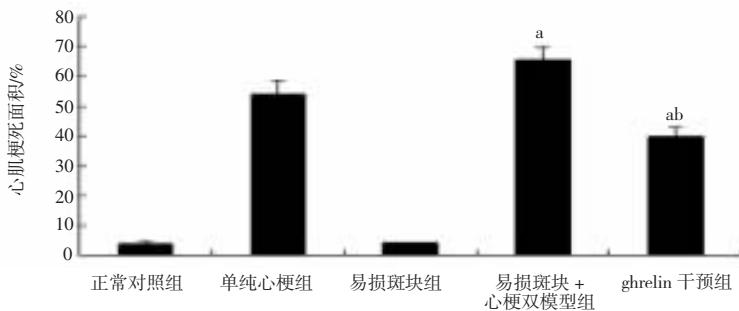


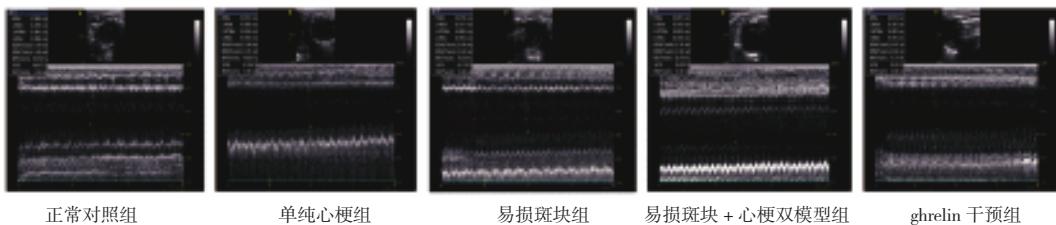
图 2 心梗后血管新生和斑块内血管新生 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



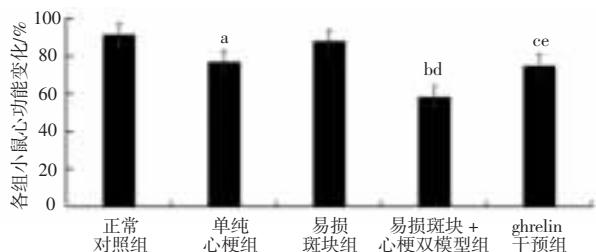
A. 各组小鼠心肌 Masson 染色

注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$;b:与易损斑块 + 心梗双模型组比较, $P=0.000$

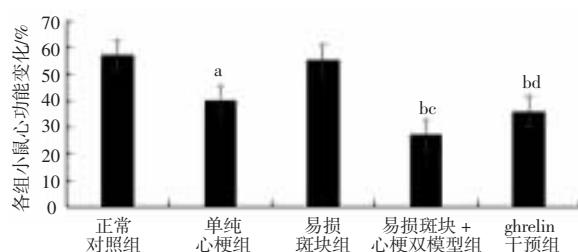
B. 各组心肌梗死面积

图 3 Masson 染色梗死周边区心肌组织 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A. 各组小鼠超声心动图

注:a,与正常对照组比较, $P=0.010$;b:与正常对照组比较, $P=0.000$;c:与正常对照组比较, $P=0.001$;d:与单纯心梗组比较, $P=0.012$;e:与易损斑块 + 心梗双模型组比较, $P=0.013$

B. 各组小鼠 LVEF 变化

注:a,与正常对照组比较, $P=0.001$;b:与正常对照组比较, $P=0.000$;c:与单纯心梗组比较, $P=0.013$;d:与易损斑块 + 心梗双模型组比较, $P=0.020$

C. 各组小鼠 LVFS 变化

图 4 各组小鼠心功能变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

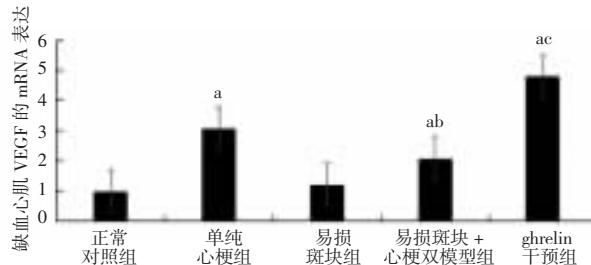
损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组易损斑块内 VEGF(图 5E)、Ang-1(图 5F)、Ang-2(图 5G) 和 Tie-2(图 5H) 的表达均明显升高。易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组小鼠易损斑块内 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的表达无变化, ghrelin 对易损斑块+心梗双模型组斑块内 VEGF(图 5E)、Ang-1(图 5F)、Ang-2(图 5G) 和 Tie-2(图 5H) 的表达无影响。

2.7 各组小鼠 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的蛋白表达

通过 Western blot 检测各组 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的蛋白表达。与正常对照组相比,单纯心梗组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组心梗周边区缺血心肌 VEGF(图 6A、B)、Ang-1(图 6A、C)、Ang-2(图 6A、D) 和 Tie-2(图 6A、E) 的表达均明显升高。与单纯心梗组相比,易损斑块+心梗双模型组缺血心肌 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2

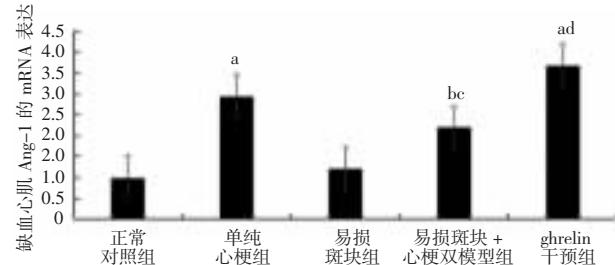
表达降低,ghrelin 干预后可明显增加易损斑块+心梗双模型组缺血心肌 VEGF(图 6A、B)、Ang-1(图 6A、C)、Ang-2(图 6A、D)和 Tie-2(图 6A、E)的蛋白表达。与正常对照组相比,易损斑块成模后,易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin

干预组斑块内 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的表达均明显升高(图 6F、G)。易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组小鼠易损斑块内 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的表达无变化(图 6F、G)。



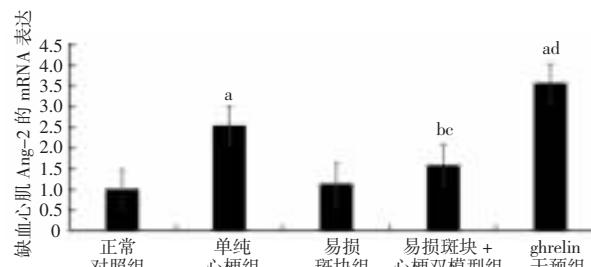
注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$;b:与单纯心梗组比较, $P=0.001$;
c:与易损斑块+心梗双模型组比较, $P=0.004$

A. 缺血心肌 VEGF 的 mRNA 表达



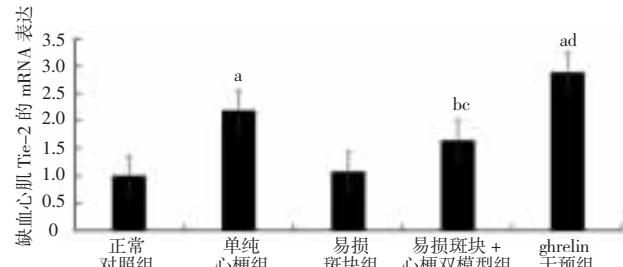
注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$;b:与正常对照组比较, $P=0.002$;
c:与单纯心梗组比较, $P=0.007$;d:与易损斑块+心梗双模型组比较, $P=0.017$

B. 缺血心肌 Ang-1 的 mRNA 表达



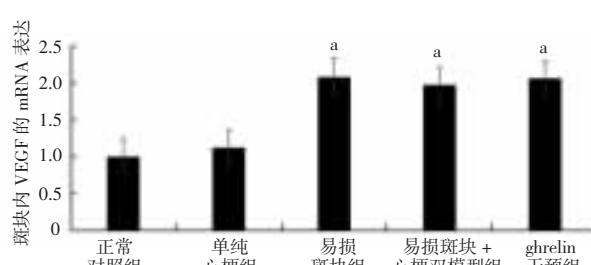
注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$;b:与正常对照组比较, $P=0.005$;
c:与单纯心梗组比较, $P=0.006$;d:与易损斑块+心梗双模型组比较, $P=0.000$

C. 缺血心肌 Ang-2 的 mRNA 表达



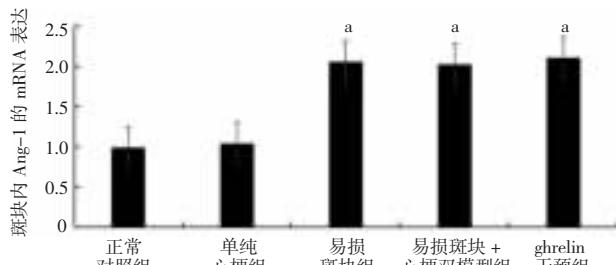
注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$;b:与正常对照组比较, $P=0.015$;
c:与单纯心梗组比较, $P=0.020$;d:与易损斑块+心梗双模型组比较, $P=0.009$

D. 缺血心肌 Tie-2 的 mRNA 表达



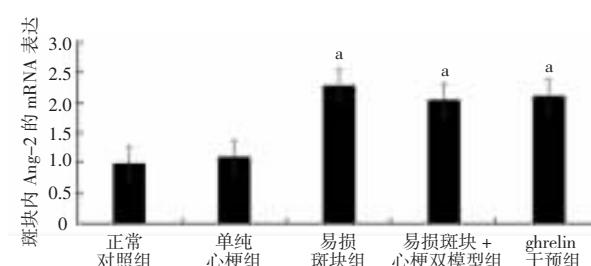
注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$

E. 斑块内 VEGF 的 mRNA 表达



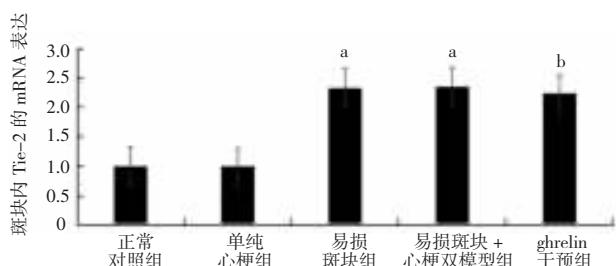
注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$

F. 斑块内 Ang-1 的 mRNA 表达



注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$

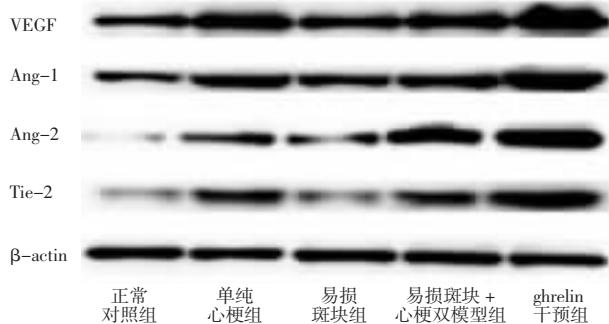
G. 斑块内 Ang-2 的 mRNA 表达



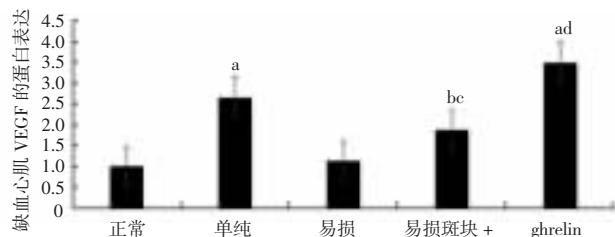
注:a,与正常对照组比较, $P=0.005$;b:与正常对照组比较, $P=0.009$

H. 斑块内 Tie-2 的 mRNA 表达

图 5 各组小鼠 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

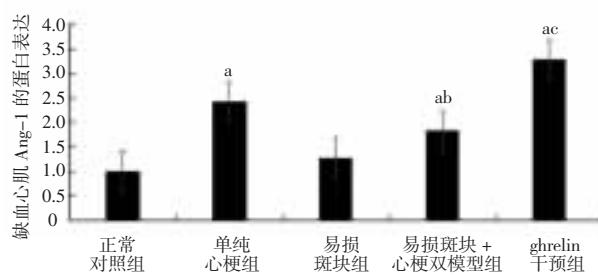


A. 缺血心肌 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的蛋白表达



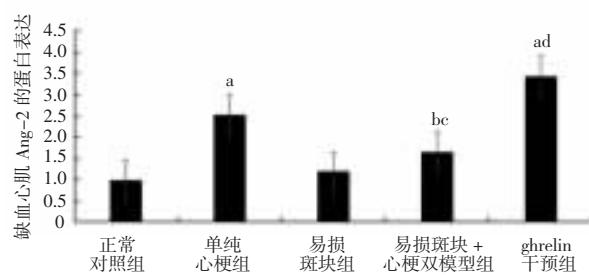
注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$;b:与正常对照组比较, $P=0.002$;
c:与单纯心梗组比较, $P=0.009$;d:与易损斑块+心梗双模型组比较, $P=0.002$

B. 缺血心肌 VEGF 蛋白表达直方图



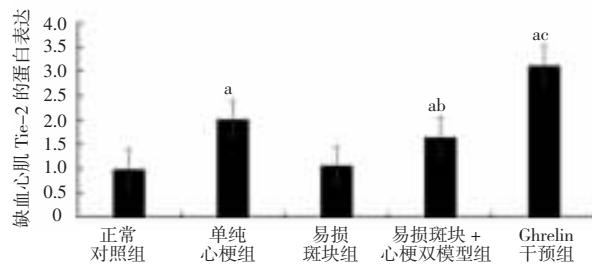
注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$;b:与单纯心梗组比较, $P=0.001$;
c:与易损斑块+心梗双模型组比较, $P=0.000$

C. 缺血心肌 Ang-1 蛋白表达直方图



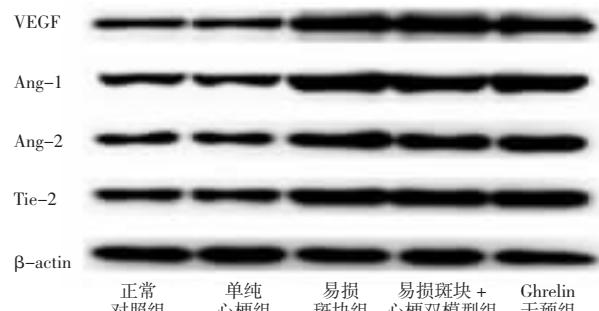
注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$;b:与正常对照组比较, $P=0.001$;
c:与单纯心梗组比较, $P=0.004$;d:与易损斑块+心梗双模型组比较, $P=0.000$

D. 缺血心肌 Ang-2 蛋白表达直方图

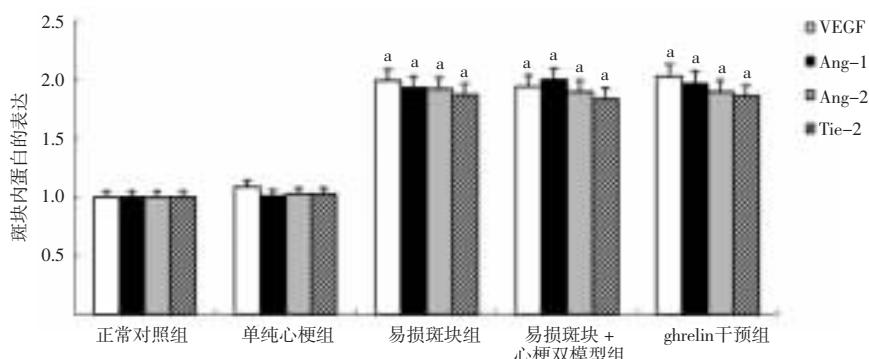


注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$;b:与单纯心梗组比较, $P=0.007$;
c:与易损斑块+心梗双模型组比较, $P=0.000$

E. 缺血心肌 Tie-2 蛋白表达直方图



F. 斑块内 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的蛋白表达



注:a,与正常对照组比较, $P=0.000$

G. 斑块内 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 蛋白表达直方图

图 6 各组小鼠 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨 论

动脉粥样硬化性心血管疾病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)严重威胁人们的生命和健康,是急性心脑血管事件发生的重要原因。应用药物促进缺血区血管新生和抑制斑块内血管新生是当前热点。然而在同一机体内,斑块内血管新生和心梗后血管新生往往相伴而存,在用药物促进心梗后血管新生、改善冠脉微循环的同时往往加剧了斑块内血管新生,而在抑制斑块内血管新生、稳定易损斑块的同时又抑制了心梗后血管新生。那么,是否有一种新的药物或化学肽类可以双向调节心梗后血管新生和斑块内血管新生,让二者达到动态平衡,从而使患者受益,这将是本课题所要探讨的重点内容。

Ghrelin 主要由胃的 X/A 样细胞分泌产生,其天然受体 GHSR 在心脏的左心房、左心室及主动脉、冠状动脉、微血管系统均有广泛表达^[7-8,11-12],ghrelin 通过与 GHSR 特异性结合发挥降低血压^[13-14]、抗炎抗氧化^[15-16]、保护血管内皮^[17-18]、改善心衰^[19-20]等一系列心血管保护作用。此外,ghrelin 被认为是一种内源性血管新生的调节因子,然而对于 ghrelin 是促进或是抑制血管新生意见尚未统一^[2-3,5-10,21]。既往研究发现,ghrelin 可促进大鼠心肌微血管内皮细胞体外血管新生^[7]和骨髓源性内皮祖细胞定向迁移^[8],以及增加糖尿病心梗大鼠缺血心肌微血管生成密度^[6],提示 ghrelin 具有促进心梗后血管新生的效应。同时,本研究发现 ghrelin 可抑制氧化低密度脂蛋白诱导的人冠状动脉内皮细胞的体外血管新生^[3]和抑制高脂饮食+球囊损伤兔腹主动脉内膜粥样硬化易损斑块内血管新生^[2],提示 ghrelin 具有抑制斑块内血管新生的效应。由此可见,ghrelin 可能具有促进心梗后血管新生和抑制斑块内血管新生的双重效应。但上述研究分别在大鼠和兔中完成,有些甚至是体外实验,同一动物机体内 ghrelin 是否具有上述相似效应及其可能的分子机制如何,目前尚无研究报道。

ApoE 是清除乳糜微粒和极低密度脂蛋白受体的配体,ApoE 缺乏导致血液循环中富含胆固醇的

物质积累,从而导致 AS 病灶的产生^[22-24]。本研究通过高脂饮食饲养 ApoE^{-/-}小鼠 12 周诱导 AS 易损斑块模型,在易损斑块造模第 8 周时结扎冠状动脉左前降支构建易损斑块+心梗双模型,模拟临床 AS 患者易损斑块裂致急性心肌梗死损伤。Ghrelin (100 μg/kg, bid) 腹腔注射干预 4 周后,发现易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组、ghrelin 干预组的体质量、TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 均明显高于正常对照组,提示高脂血症模型复制成功。接着对各组小鼠 AS 斑块面积进行评估,发现高脂饮食喂养 12 周后,易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组小鼠腹主动脉内膜出现大量脂质伴粥样斑块形成,其主动脉粥样斑块表面积和横断面面积均较正常对照组明显增加,提示已成功构建 AS 易损斑块模型。同时,本研究发现 ghrelin 干预后可明显降低易损斑块+心梗双模型组血浆 TG 水平,减少易损斑块+心梗双模型组小鼠主动脉斑块的表面积和横断面面积,提示 ghrelin 具有明显抗 AS 的效应。

进一步通过 CD31 免疫组化染色检测各组小鼠心肌梗死边缘区 MVD 和腹主动脉斑块内 MVD,发现正常对照组和易损斑块组心肌组织有极少量微血管新生,其心肌 MVD 明显低于发生心肌梗死后的各组,提示 ApoE^{-/-}小鼠在未合并心肌缺血时无代偿性血管新生。单纯心梗组梗死周边区有大量微血管新生,易损斑块+心梗双模型组梗死周边区 MVD 较单纯心梗组明显较少,提示 AS 易损斑块小鼠在发生急性心肌梗死后其反应性血管新生能力明显减弱、侧支循环形成减少,这进一步决定了急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)患者的不良预后。本研究发现 ghrelin 干预后明显增加易损斑块+心梗双模型组梗死周边区 MVD,表明 ghrelin 可促进易损斑块合并心梗小鼠心肌微血管新生、提高冠脉微循环的血流灌注。同时,本研究发现易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组小鼠腹主动脉粥样斑块内有大量微血管新生,但 3 组间腹主动脉斑块内 MVD 无统计学差异,提示 ghrelin 对 ApoE^{-/-}小鼠诱导腹主动脉斑块内血管新生无影响。以上研究表明,ghrelin 可促进心梗后血管新生而对斑块内血管新生无影响,在同一机体内并不具备双

向调节血管新生的效应。

通过 Masson 染色观察各组小鼠心肌梗死边缘区间质纤维的增生情况并计算心肌梗死面积,发现易损斑块+心梗双模型组小鼠梗死周边区有大量染成蓝色的间质纤维,其增生程度较单纯心梗组明显加重,心肌梗死面积亦明显增加。Ghrelin 腹腔注射干预后其间质纤维的增生较易损斑块+心梗双模型组小鼠明显减轻、心肌梗死面积亦明显减少,提示 ghrelin 可明显减少易损斑块+心梗双模型组小鼠梗死周边区心肌纤维化、减少心肌梗死面积,这与 ghrelin 可促进易损斑块+心梗双模型小鼠心梗后血管新生、改善冠脉微循环的血流灌注是一致的。同时通过 M 型超声检测各组小鼠心功能,发现易损斑块+心梗双模型小鼠其 LVEF 和 LVFS 均较单纯心梗小鼠明显降低,ghrelin 腹腔注射干预后可明显提高易损斑块+心梗双模型小鼠心功能。

血管生成素(angiopoietins, Angs)家族是近年来发现的一种内皮细胞特异性促血管生成因子,包括 Ang-1、Ang-2、鼠 Ang-3 和人 Ang-4,它们均可作用于细胞膜上的酪氨酸激酶受体 Tie-2 而发挥作用^[25-26],目前研究较多的是 Ang-1 和 Ang-2。研究发现 Ang/Tie-2 系统广泛参与体内血管新生及促新生血管成熟的调节,Ang-1 是 Tie-2 的激活剂,对维持血管结构的稳定和完整性有重要作用,Ang-2 是 Ang-1 的天然拮抗剂,抑制 Ang-1 的效应^[27]。VEGF 是目前已知的功能最强的促有丝分裂素,能特异性作用于血管内皮细胞,诱导内皮细胞的增生、迁移,在生理性和病理性血管新生过程中发挥重要作用^[28-29]。本研究发现急性心肌梗死造模后,单纯心梗组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组梗死周边区缺血心肌 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的表达均明显升高,提示缺氧诱导了缺血心肌 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的表达,增加了梗死周边区 MVD。进一步发现与单纯心梗组相比,易损斑块+心梗双模型组缺血心肌 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 表达均降低,这解释了易损斑块+心梗双模型组缺血心肌 MVD 明显降低的原因,提示易损斑块患者在发生急性心梗后存在缺血诱导的血管新生障碍。Ghrelin 干预后可明显增加易损斑块+心梗双模型组缺血心

肌 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的表达,提示 ghrelin 可通过上调 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的表达增加易损斑块+心梗双模型组缺血心肌 MVD。同时,本研究发现易损斑块组、易损斑块+心梗双模型组和 ghrelin 干预组斑块内 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的表达较正常对照组明显升高,但 3 组间比较无统计学差异,提示 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的表达增加是斑块内血管新生的重要原因,ghrelin 对斑块内 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的表达无影响。

综上所述,本研究结果首次证实了 ghrelin 可通过上调 VEGF、Ang-1、Ang-2 和 Tie-2 的基因与蛋白表达促进易损斑块+心梗双模型组小鼠心梗后血管新生,减少心肌梗死面积,稳定和缩小易损斑块,提示 ghrelin 具有促进心梗后血管新生的效应,这对 ACS 患者具有潜在的临床治疗价值。然而,ghrelin 对易损斑块合并心梗小鼠斑块内血管新生无影响,提示 ghrelin 并不影响斑块内血管新生,其并不同时具有双向调节血管新生的效应。但本实验结果仅仅局限于动物的在体实验研究,ghrelin 在人体内是否具有相似的作用效果尚待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Johnson T, Zhao LN, Manuel G, et al. Approaches to therapeutic angiogenesis for ischemic heart disease[J]. J Mol Med(Berl), 2019, 97(2): 141-151.
- [2] Wang L, Chen QW, Ke DZ, et al. Ghrelin inhibits atherosclerotic plaque angiogenesis and promotes plaque stability in a rabbit atherosclerotic model[J]. Peptides, 2017, 90: 17-26.
- [3] Wang L, Li GQ, Chen QW, et al. Octanoylated ghrelin attenuates angiogenesis induced by oxLDL in human coronary artery endothelial cells via the GHSR1a-mediated NF-κB pathway[J]. Metabolism, 2015, 64(10): 1262-1271.
- [4] Baruah J, Hitzman R, Zhang J, et al. The allosteric glycogen synthase kinase-3 inhibitor NP12 limits myocardial remodeling and promotes angiogenesis in an acute myocardial infarction model[J]. J Biol Chem, 2017, 292(50): 20785-20798.
- [5] Wang J, He L, Huwatiwieke B, et al. Ghrelin stimulates endothelial cells angiogenesis through extracellular regulated protein kinases (ERK) signaling pathway[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): E2530.

- [6] Wang L, Chen QW, Li GQ, et al. Ghrelin ameliorates impaired angiogenesis of ischemic myocardium through GHSR1a-mediated AMPK/ENOS signal pathway in diabetic rats[J]. Peptides, 2015, 73:77–87.
- [7] Wang L, Chen QW, Li GQ, et al. Ghrelin stimulates angiogenesis via GHSR1a-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt signal pathways in rat cardiac microvascular endothelial cells[J]. Peptides, 2012, 33(1):92–100.
- [8] Chen XD, Chen QW, Wang L, et al. Ghrelin induces cell migration through GHSR1a-mediated PI3K/Akt/ENOS/NO signaling pathway in endothelial progenitor cells[J]. Metabolism, 2013, 62(5):743–752.
- [9] Neale JPH, Pearson JT, Katare R, et al. Ghrelin, microRNAs, and critical limb ischemia: hungering for a novel treatment option[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2017, 8:350.
- [10] Mirzaei Bavil F, Alipour MR, Keyhanmanesh R, et al. Ghrelin decreases angiogenesis, HIF-1 α and VEGF protein levels in chronic hypoxia in lung tissue of male rats[J]. Adv Pharm Bull, 2015, 5(3):315–320.
- [11] Lilleness BM, Frishman WH. Ghrelin and the cardiovascular system[J]. Cardiol Rev, 2016, 24(6):288–297.
- [12] Virdis A, Lerman LO, Regoli F, et al. Human ghrelin: a gastric hormone with cardiovascular properties[J]. Curr Pharm Des, 2016, 22(1):52–58.
- [13] Yu AP, Ugwu FN, Tam BT, et al. Ghrelin axis reveals the interacting influence of central obesity and hypertension[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2018, 9:534.
- [14] Kemp BA, Howell NL, Padia SH. Intrarenal ghrelin receptor inhibition ameliorates angiotensin II-dependent hypertension in rats [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2018, 315(4):F1058–F1066.
- [15] Zhang RL. Ghrelin suppresses inflammation in HUVECs by inhibiting ubiquitin-mediated uncoupling protein 2 degradation[J]. Int J Mol Med, 2017, 39(6):1421–1427.
- [16] Bai J, Yang F, Dong L, et al. Ghrelin protects human lens epithelial cells against oxidative stress-induced damage[J]. Oxid Med Cell Longev, 2017, 2017:1910450.
- [17] Zhu JH, Zheng CH, Chen J, et al. Ghrelin protects human umbilical vein endothelial cells against high glucose-induced apoptosis via mTOR/P70S6K signaling pathway[J]. Peptides, 2014, 52:23–28.
- [18] Li PJ, Liu Y, Xiang Y, et al. Ghrelin protects human umbilical vein endothelial cells against advanced glycation end products-induced apoptosis via NO/cGMP signaling[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(9):15269–15275.
- [19] Yang CY, Liu JS, Liu K, et al. Ghrelin suppresses cardiac fibrosis of post-myocardial infarction heart failure rats by adjusting the activin A-follistatin imbalance[J]. Peptides, 2018, 99:27–35.
- [20] Tokudome T, Otani K, Miyazato M, et al. Ghrelin and the heart[J]. Peptides, 2018, 111:42–46.
- [21] Khazaei M, Tahergorabi Z. Ghrelin did not change coronary angiogenesis in diet-induced obese mice[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2017, 63(2):96–99.
- [22] Li Y, G Zhang C, Wang XH, et al. Progression of atherosclerosis in ApoE-knockout mice fed on a high-fat diet[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(18):3863–3867.
- [23] Wang J, Zhao P, Gao Y, et al. The effects of anti-IL-23p19 therapy on atherosclerosis development in ApoE $^{-/-}$ mice[J]. J Interferon Cytokine Res, 2019, 39(9):564–571.
- [24] Kumar S, Chen M, Li Y, et al. Loss of ADAMTS4 reduces high fat diet-induced atherosclerosis and enhances plaque stability in ApoE $^{-/-}$ mice[J]. Sci Rep, 2016, 6:31130.
- [25] González-González A, González A, Alonso-González C, et al. Complementary actions of melatonin on angiogenic factors, the angiopoietin/Tie2 axis and VEGF, in co-cultures of human endothelial and breast cancer cells[J]. Oncol Rep, 2018, 39(1):433–441.
- [26] Moritz F, Schniering J, Distler JHW, et al. Tie2 as a novel key factor of microangiopathy in systemic sclerosis[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1):105.
- [27] Eklund L, Kangas J, Saharinen P. Angiopoietin-Tie signalling in the cardiovascular and lymphatic systems[J]. Clin Sci (Lond), 2017, 131(1):87–103.
- [28] Ramjiawan RR, Griffioen AW, Duda DG. Anti-angiogenesis for cancer revisited: is there a role for combinations with immunotherapy? [J]. Angiogenesis, 2017, 20(2):185–204.
- [29] Bai YN, Liu RL, Li ZX, et al. VEGFR endocytosis regulates the angiogenesis in a mouse model of hindlimb ischemia[J]. J Thorac Dis, 2019, 11(5):1849–1859.

(责任编辑:唐秋姗)