

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00519

· 论 著 ·

5-单硝酸异山梨酯上调斑马鱼血小板源性生长因子受体 β 表达并促进血管新生

吕 慧, 王国坤, 刘 博, 李松华, 秦永文*

第二军医大学长海医院心血管内科, 上海 200433

[摘要] **目的** 通过研究 5-单硝酸异山梨酯对斑马鱼血管发育的影响, 探讨硝酸酯类药物促进血管新生的作用机制。**方法** 以血管内皮具有绿色荧光蛋白标记的转基因斑马鱼胚胎为研究对象, 将以 100、300、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 5-单硝酸异山梨酯处理的胚胎作为实验组, 以 0.5% 二甲基亚砜(DMSO)处理的胚胎作为对照组, 从受精卵形成后 0.5~1 h 开始药物处理, 24~26 h 后观察药物对转基因斑马鱼血管发育的影响。使用荧光显微镜观察新生血管状态并记录血管长度。分别从药物处理后 0、6、12 和 24 h 的斑马鱼胚胎中提取总 RNA, 采用实时定量 RT-PCR 方法检测血小板源性生长因子受体 β (PDGFR β) 的表达变化。**结果** 5-单硝酸异山梨酯可促进斑马鱼血管发育($P<0.01$), 且在 100、300、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 3 个浓度梯度范围内其促进作用与药物浓度成正比。实验组较对照组 PDGFR β 表达量升高, 在药物作用 12 和 24 h 时差异有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 5-单硝酸异山梨酯可上调 PDGFR β 的表达, 促进斑马鱼血管发育。

[关键词] 血管生成; 单硝酸异山梨酯; 斑马鱼; 血小板源性生长因子受体

[中图分类号] R 972.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)05-0519-04

Isosorbide mononitrate upregulates platelet-derived growth factor receptor β and promotes angiogenesis in zebrafish

LÜ Hui, WANG Guo-kun, LIU Bo, LI Song-hua, QIN Yong-wen*

Department of Cardiovasology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the pro-angiogenesis mechanism of isosorbide mononitrate by observing its effect on the angiogenesis in Tg(flkl1;EGFP) transgenic zebrafish. **Methods** The embryos incubated with isosorbide mononitrate (100, 300, 500, and 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were taken as the experiment groups, and the embryos exposed to 0.5% DMSO were identified as the controls. The embryos were treated one hour before the postfertilization stage, and the status and length of the newly-formed blood vessels were observed under fluorescence microscope 24-26 h after treatments. The total RNAs were extracted from zebrafish embryos at 0, 6, 12, and 24 h after treatment; real-time quantitative RT-PCR was performed to examine the level of platelet-derived growth factor receptor β (PDGFR β). **Results** Isosorbide mononitrate greatly promoted the growth of the intersegmental vessels in zebrafish ($P<0.01$). It also dose-dependently promoted the growth of vascular at concentrations 100, 300, and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The expression levels of PDGFR β gene were increased in the experiment groups compared with DMSO group, with significant difference found at 12 h and 24 h after treatment ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Our data suggest that isosorbide mononitrate can up-regulate PDGFR β expression and promote angiogenesis in zebrafish.

[Key words] angiogenesis; isosorbide mononitrate; zebrafish; platelet-derived growth factor receptor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5): 519-522]

长效异乐定是一种硝酸酯类扩血管药, 其主要成分为 5-单硝酸异山梨酯, 主要用于冠心病长期治疗预防心绞痛, 心肌梗死伴有持久性心绞痛症状的后期治疗, 与洋地黄或利尿剂合用治疗慢性充血性

心力衰竭等。以往研究认为, 长效单硝酸异山梨酯主要通过舒张外周血管、降低前负荷及收缩压, 增加静脉血容量、减少心肌氧供需求, 扩张心外膜的冠状动脉、增加心肌氧供发挥作用^[1]。但心脏功能与多

[收稿日期] 2012-01-19

[接受日期] 2012-04-02

[基金项目] 国家自然科学基金(31000354)。Supported by National Natural Science Foundation of China (31000354)。

[作者简介] 吕 慧, 硕士。E-mail: 120834966@qq.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81873195, E-mail: qyw2009@sina.cn

种因素有关,例如侧支循环的建立就对防御冠心病患者心肌缺血具有重要意义。侧支循环是建立在正常区域与缺血区域之间的新生血管,是对逐步发展的冠状动脉狭窄及堵塞的应答^[2]。5-单硝酸异山梨酯能否促进血管新生和侧支循环的建立尚不清楚。

血小板源性生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)在血管新生过程发挥重要作用^[3],它可通过结合其酪氨酸激酶受体(PDGFR α 、PDGFR β)促进内皮细胞迁移、增生及生存^[4],上调 PDGF 信号的表达,促进血管新生过程^[5]。为研究 5-单硝酸异山梨酯对血管新生的效应,我们以血管内皮具有绿色荧光蛋白标记、可非侵入性实时观察的 Tg(flkl1; EGFP)转基因斑马鱼^[6]胚胎血管生成模型作为平台,观察 5-单硝酸异山梨酯对斑马鱼胚胎的血管生长和 PDGF 受体表达的影响,探讨 5-单硝酸异山梨酯参与血管新生的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

Tg(flkl1; EGFP)转基因斑马鱼系由中国科学院健康研究所赠予,Leica 205 FA 体式荧光显微镜,梯度 PCR 扩增仪(日本 TaKaRa 公司),RG-3000A 定量 PCR 仪(澳大利亚 Corbett Research 公司)。长效异乐定(主要成分为 5-单硝酸异山梨酯,珠海许瓦兹制药有限公司,国药准字 H20031224)为成品药物,系长海医院心内科捐赠;TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司;PrimeScript[®] RT 试剂盒购自 TaKaRa 公司;THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 购自 ToYoBo 公司。

1.2 方法

1.2.1 胚胎处理及血管长度计算

药物研磨成粉状后溶解至 0.5% 二甲亚砜(DMSO)中,使 5-单硝酸异山梨酯含量为 100、300、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。Tg(flkl1; EGFP)转基因斑马鱼根据 Westerfield 的标准方案^[7]进行饲养,采用 14 h : 10 h 黑暗与照明交替、28.5 $^{\circ}\text{C}$ 鱼缸系统水养,定时给予草履虫喂食。取卵前 1 d,雌雄以 2 : 1 的比例放入交配缸内,交配缸底部有产卵托盘,中间放置隔板,过夜,次日晨照明后去掉隔板。受精卵形成后 0.5~1 h 内给予药物刺激,以 5-单硝酸异山梨酯处理的胚胎作为实验组,0.5% DMSO 处理的胚胎作为对照组。使用 Leica 205 FA 体式荧光显微镜观察药物处理后 26 h 的胚胎血管发育情况,使用 LEICA 软件计算节间血管长度。

1.2.2 PCR 引物设计与合成

根据斑马鱼 GAPDH 和 PDGFR β 基因序列利用 Primer 5.0 软件设计引物:PDGFR β F: 5'-CTA CAT CTC CAA AGG CAG CA-3', PDGFR β R: 5'-ACA GGT TAT GAA AGA TGC TCT CG-3'; GAPDH F: 5'-CAG GCA TAA TGG TTA AAG TTG GTA-3', GAPDH R: 5'-CAT GTA ATC AAG GTC AAT GAA TGG-3'。PDGFR β 及内参 GAPDH 的 RT-PCR 特异引物序列均由上海博尚生物技术有限公司提供。

1.2.3 实时荧光定量 RT-PCR 检测 PDGFR β 基因的表达量

按 TRIzol 试剂说明书分别提取药物处理后 0、6、12 和 24 h 斑马鱼胚胎总 RNA,使用 PrimeScript[®] RT 试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA。将所得的 cDNA 产物置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。以反转录所得的 cDNA 体积的 1/20 为模板,使用 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 行定量 PCR。扩增条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,40 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min。建立 PCR 产物的溶解曲线以鉴定产物是否单一。以 GAPDH 为内参。扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,采用 Rotor Gene 6 软件进行 PDGFR β 与 GAPDH 基因条带的相对密度分析。mRNA 相对水平的表达以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。

1.3 统计学处理

运用 SPSS 11.0 软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行组间差异比较。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 不同浓度 5-单硝酸异山梨酯对斑马鱼血管发育的影响

图 1A 为在明场及荧光下观察受精后 26 h(hour post-fertilization, hpf) 对照组及 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物处理组的斑马鱼胚胎节间血管,图 1B 为对照组及 100、300、500、1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物处理后的胚胎节间血管长度。由图 1B 可见,300、500 及 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物处理后的胚胎节间血管长度与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$),并且药物处理后的胚胎节间血管的长度并非与药物浓度呈正相关,以 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物处理的胚胎节间血管长度最长。

2.2 5-单硝酸异山梨酯对斑马鱼不同发育时期 PDGFR β 基因表达的影响

选取斑马鱼胚胎发育的 0、6、12、24 h 4 个时间点提取 RNA,获取药物处理后随时间变化胚胎 PDGFR β 的表达。如表 1 所示,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 药物处理后的斑马鱼整胚的 PDGFR β 的

mRNA 表达水平随发育时间的增加而增加。实验组与对照组比较, 12hpf ($P < 0.05$), 24hpf ($P < 0.01$) 时

差异有统计学意义。

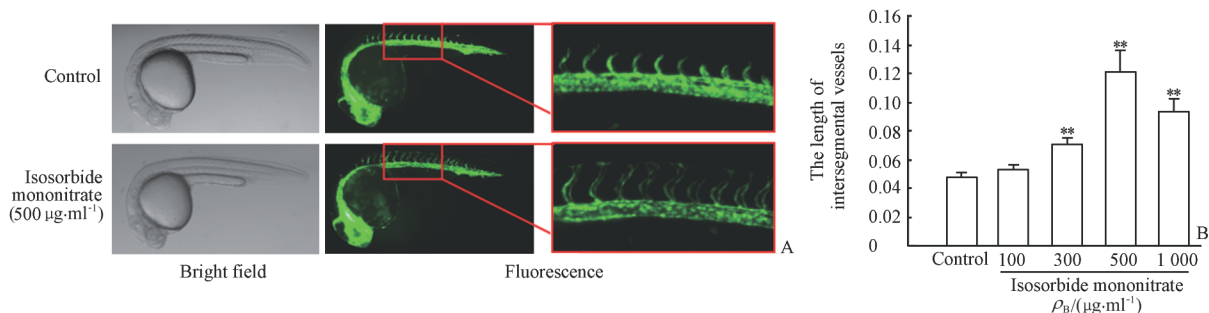


图 1 5-单硝酸异山梨酯对斑马鱼胚胎血管发育的影响

Fig 1 Angiogenic effects of isosorbide mononitrate in zebrafish embryos

Hpf: Hour post-fertilization. A: Bright field and fluorescence image at 26 hpf; B: The length of intersegmental vessels at 24 hpf. * $P < 0.01$ vs control group; $n = 20$; $\bar{x} \pm s$

表 1 5-单硝酸异山梨酯处理后不同时间点斑马鱼整胚 PDGFR β 的表达

Tab 1 Expression of PDGFR β mRNA in zebrafish embryos at different time points after isosorbide mononitrate treatment

Group	$n = 10, \bar{x} \pm s$			
	0 hpf	6 hpf	12 hpf	24 hpf
Control	0.75 \pm 0.05	1.03 \pm 0.02	12.06 \pm 1.76	17.75 \pm 3.43
Isosorbide mononitrate (500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	0.79 \pm 0.06	1.05 \pm 0.09	14.53 \pm 6.69*	24.95 \pm 4.78**

Hpf: Hour post-fertilization. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

3 讨论

为能更好地检测血管促进效应, 选择合适的活体血管模型显得尤为重要。由于大多数活体血管模型具有侵入性, 难以定量数据, 很难用于研究药物对血管发育过程的影响。而转基因斑马鱼 Tg(flk1:EGFP) 具有非侵入性可实时观察的独特优势, 该种转基因斑马鱼血管内皮可用绿色荧光蛋白标记^[6], 定量筛选具有促进血管新生作用的药物。本研究使用 Tg(flk1:EGFP) 转基因斑马鱼胚胎血管生成模型作为平台, 探索 5-单硝酸异山梨酯参与血管新生的作用及机制。

硝酸酯类药物是冠心病常用的抗心绞痛药物, 既往未证明存在长期的有益效应^[8], 一些临床试验甚至发现长期口服硝酸酯类药物会增加心梗后不良事件的发生^[9-10], 但近期一项研究表明对于持续性血液透析的患者, 使用长效的单硝酸异山梨酯可减少急性左心衰的发病^[11]。目前对于硝酸酯类药物的效用仍存在较大争议, 主要表现为长期服药可缓解患者症状, 但患者服药依从性较差, 同时可诱导内皮细胞功能紊乱从而影响预后^[12]。提示该类物质除了扩张血管外, 可能还存在其他的药理作用。本

研究发现 5-单硝酸异山梨酯可促进斑马鱼的节间血管的生成, 即促进血管新生, 为拓展它的药理作用提供了实验依据。

血管的生长受多种因子的调节。已有研究报道一些血管因子例如 VEGF、FGF 及骨髓干细胞均可用于治疗性血管新生^[13], 刺激冠状动脉侧支循环形成从而减少心肌缺血。PDGF 作为一种重要的调节因子, 通过 PDGFR 发挥促血管生长作用^[14]。在内皮细胞形成毛细血管网的血管新生过程中 PDGFR β 信号必不可少^[15], 在 PDGFR β 敲除小鼠中可见大量血管缺失^[16]更是支持其在血管新生中的重要作用。Wiens 等^[17]发现人类与斑马鱼 PDGFR β 的序列高度保守, 且明确提出 PDGFR β 信号在调节血管新生中的作用。我们通过定量 PCR 检测了 5-单硝酸异山梨酯处理后斑马鱼整胚 PDGFR β 的相对表达量, 发现实验组相对表达量较对照组明显升高, 推测该药物可能通过上调 PDGFR β 的 mRNA 表达量从而影响节间血管的生长。鉴于血管调节过程的复杂性, 可能还存在 VEGF 或 FGF 等参与 5-单硝酸异山梨酯引起的节间血管生成过程, 同时 PDGFR β 是否可作为药物作用靶点尚需进一步研究。

本研究通过 Tg(flk1:EGFP) 转基因斑马鱼模

型实时观察了5-单硝酸异山梨酯对斑马鱼胚胎血管发育的影响,发现5-单硝酸异山梨酯可上调PDGFR β 的表达,促进斑马鱼血管发育,这为进一步了解硝酸酯类药物的药理作用提供了实验依据。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

[1] Prakash A, Markham A. Long-acting isosorbide mononitrate [J]. *Drugs*,1999,57:93-100.

[2] Schaper W. Angiogenesis in the adult heart[J]. *Basic Res Cardiol*,1991,86(Suppl 2):51-56.

[3] Warren C M, Iruela-Arispe M L. Signaling circuitry in vascular morphogenesis[J]. *Curr Opin Hematol*,2010,17:213-218.

[4] Li X, Pontén A, Aase K, Karlsson L, Abramsson A, Uutela M, et al. PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor[J]. *Nat Cell Biol*,2000,2:302-309.

[5] Levitzki A. PDGF receptor kinase inhibitors for the treatment of PDGF driven diseases[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004,15:229-235.

[6] Lawson N D, Weinstein B M. *In vivo* imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish[J]. *Dev Biol*, 2002,248:307-318.

[7] Westerfield M, Doerry E, Kirkpatrick A E, Douglas S A. Zebrafish informatics and the ZFIN database[J]. *Methods Cell Biol*,1999,60:339-355.

[8] Csont T, Ferdinandy P. Cardioprotective effects of glyceryl trinitrate: beyond vascular nitrate tolerance[J]. *Pharmacol Ther*,2005,105:57-68.

[9] Kanamasa K, Hayashi T, Kimura A, Ikeda A, Ishikawa K.

Long-term, continuous treatment with both oral and transdermal nitrates increases cardiac events in healed myocardial infarction patients[J]. *Angiology*,2002,53:399-408.

[10] Yiu K H, Pong V, Siu C W, Lau C P, Tse H F. Long-term oral nitrate therapy is associated with adverse outcome in diabetic patients following elective percutaneous coronary intervention [J]. *Cardiovasc Diabetol*,2011,10:52.

[11] Li H, Wang S X. Improvement of hypertension and LVH in maintenance hemodialysis patients treated with sustained-release isosorbide mononitrate[J]. *J Nephrol*,2011,24:236-245.

[12] Iachini Bellisarii F, Radico F, Muscente F, Horowitz J, De Caterina R. Nitrates and other nitric oxide donors in cardiology: Current positioning and perspectives[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*,2012,26:55-69.

[13] Nessa A, Latif S A, Siddiqui N I, Hussain M A, Bhuiyan M R, Hossain M A, et al. Angiogenesis-a novel therapeutic approach for ischemic heart disease[J]. *Mymensingh Med J*, 2009, 18: 264-272.

[14] Wu E, Palmer N, Tian Z, Moseman A P, Galdzicki M, Wang X, et al. Comprehensive dissection of PDGF-PDGFR signaling pathways in PDGFR genetically defined cells[J]. *PLoS One*, 2008,3:e3794.

[15] Hoch R V, Soriano P. Roles of PDGF in animal development [J]. *Development*,2003,130:4769-4784.

[16] Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine [J]. *Genes Dev*, 2008,22:1276-1312.

[17] Wiens K M, Lee H L, Shimada H, Metcalf A E, Chao M Y, Lien C L. Platelet-derived growth factor receptor beta is critical for zebrafish intersegmental vessel formation[J]. *PLoS One*,2010, 5:e11324.

[本文编辑] 周燕娟,孙 岩

· 消 息 ·

第二军医大学长海医院射波刀中心成立

2012年4月21日,“长海医院射波刀中心成立仪式暨学术研讨会”在第二军医大学锦雪苑隆重举行。医院孙颖浩院长和夏阳政委、上海市医学会肿瘤放射治疗专科委员会主任委员傅小龙教授、泰和诚医疗器械集团周红副总裁到会并为中心揭牌,来自全国各地的肿瘤放射治疗和神经外科专家等共120余人就射波刀在治疗肿瘤方面的新进展进行了专题学术讨论。

长海医院射波刀中心引进了“机器人立体定向放射治疗系统”,它是全球最新型、最先进的立体定向放射治疗设备,也是目前世界最先进及精确的肿瘤治疗设备。其突破性在于术中实时影像引导定位技术和动态肿瘤追踪治疗技术,给临床肿瘤医师提供了无创、无痛、无麻醉的全新肿瘤治疗方法,从而改善肿瘤患者治疗中和治疗后的生存质量。