

建立大鼠心肌缺血与体外 CMECs 缺氧模型-观察 对冠脉微循环的影响

贾政¹⁾, 邢正江¹⁾, 刘茜²⁾, 杜义斌³⁾, 李冰³⁾, 解英¹⁾, 赵义³⁾

(1)昆明医科大学附属延安医院心脏大血管外科; 2)全科医学科心血管病区, 云南昆明 650051;
3)云南省中医医院老年医学科, 云南昆明 650051)

[摘要] **目的** 建立在体大鼠心肌缺血与体外心肌微血管内皮细胞(CMECs)缺氧模型, 通过其结构及生物学特性变化, 探讨冠脉微循环的微血管生成基础。**方法** 应用 1/3 结扎冠脉前降支法建立大鼠心肌缺血模型, 利用 HE、Masson 染色、透射电镜分别检测心肌组织结构及超微结构。采用低氧培养箱建立大鼠 CMECs 时间梯度缺氧模型(缺氧时间分别设置为 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h), 倒置相差显微镜观察 CMECs 形态特征及生长特点, CCK-8 法测定增殖率, 计数法测定存活率。ELISA 法检测炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)以及血管生成因子(VEGF、Ang-2)表达水平。**结果** 在冠脉结扎 72 h 后, HE 和 MASSON 染色提示成功建立大鼠心肌缺血缺氧模型; 透射电镜发现细胞超微结构存在缺血缺氧性改变。CMECs 具有鲜明的形态特征。随缺氧时间延长, 48 h 后增殖速率显著下降($P=0.0426$); 24 h 后存活率显著下降(72.8%)。长期缺氧导致 IL-1 β (24 ~ 72 h, P 分别=0.0007, 0.0007, 0.001)、IL-6(24 ~ 72 h, P 分别=0.0015, 0.0005, 0.0007)和 TNF- α (24 ~ 72 h, P 分别=0.0015, 0.0063, 0.0008)释放水平显著高于短期缺氧 IL-1 β (4 ~ 12 h, $P=0.007, 0.0034, 0.0009$)、IL-6 (4 ~ 12 h, P 分别=0.0026, 0.0013, 0.0045)和 TNF- α (12 h, $P=0.0087$)释放水平。血管生成因子 VEGF 在缺氧 8 h 后表达开始升高($P<0.0001$), 在 12 ~ 24 h (P 均 <0.0001)下降后随即迅速升高($P<0.01$); Ang-2 的表达自 4 ~ 12 h 起表达降低($P<0.05$), 自 24 h 起逐渐增高($P<0.01$)。**结论** 不同缺血缺氧时间心肌组织和 CMECs 出现的生物学变化各异, 炎症反应在早期即开始出现, 血管生成反应在晚期出现。有助于阐明缺血性心肌损伤的关键细胞及分子机制。

[关键词] 冠状动脉疾病; 缺氧; 心肌微血管内皮细胞; 冠脉微循环; 炎症; 血管生成

[中图分类号] R541.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)11-0038-08

Observation and Analysis of Coronary Microcirculation by Establishing Rat Myocardial Ischemia and in Vitro CMECs Hypoxia Model

JIA Zheng¹⁾, XING Zhengjiang¹⁾, LIU Qian²⁾, DU Yibin³⁾, LI Bing³⁾, XIE Ying¹⁾, ZHAO Yi³⁾

(1) Dept. of Cardiovascular Surgery; 2) Generae Medicine Ward, Dept. of Cardiovascular
Medicine, Yan'an Hospital Affiliated to Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650051;

3) Dept. of Geriatrics, Traditional Chinese Medicine Hospital of Yunnan Province,
Kunming Yunnan 650051, China)

[Abstract] **Objective** To establish in vivo rat ischemic myocardial injury and in vitro cardiac microvascular endothelial cell (CMEC) hypoxia models so as to investigate the structural and biological changes and probe the

[收稿日期] 2024-06-06

[基金项目] 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(202201AT070277); 云南省“两类人才”技术创新人才培养基金资助项目(202305AD160059); 云南省科技计划基金资助项目(202301AZ070001-079, 202102AA310003); 昆明市卫生科技百工程基金资助项目(2022-SW-011)

[作者简介] 贾政(1988~), 男, 河北保定人, 医学博士, 主治医师, 主要从事冠脉微循环与心肌细胞结构和功能的机制研究工作。

[通信作者] 赵义, E-mail: 13518731883@163.com

angiogenesis basis of coronary microcirculation. **Methods** In vivo rat myocardial ischemia model was established using the 1/3 ligation of the left anterior descending coronary artery and myocardial tissue structure and ultrastructure were detected using HE, Masson staining, and transmission electron microscopy, respectively. In vitro time-gradient hypoxia model of rat CMECs (hypoxia times set at 0 h, 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h) was established using a hypoxic incubator. An inverted phase-contrast microscope was used to observe the morphological and growth characteristics of CMECs. The proliferation rate was determined by CCK-8 method, and the survival rate was determined by counting method. The expression of inflammatory factors (IL-1 β , IL-6, TNF- α) and angiogenic factors (VEGF, Ang-2) were detected using ELISA method. **Results** After 72 hours of coronary artery ligation, HE and MASS staining indicated the successful establishment of a rat model of myocardial ischemia and hypoxia. The transmission electron microscopy revealed the ischemic and hypoxic changes in the ultrastructure of cells. CMECs exhibited the distinct morphological characteristics and adhered to the surface. With the prolonged hypoxia time, the proliferation rate significantly decreased after 48 h ($P = 0.0426$), and the survival rate significantly decreased after 24 h (72.8%). Long-term hypoxia led to significantly higher release levels of IL-1 β (24 ~ 72 h, $P = 0.0007, 0.0007, 0.001$), IL-6 (24 ~ 72 h, $P = 0.0015, 0.0005, 0.0007$), and TNF- α (24 ~ 72 h, $P = 0.0015, 0.0063, 0.0008$ respectively) compared to short-term hypoxia IL-1 β (4 ~ 12 h, $P = 0.007, 0.0034, 0.0009$ respectively), IL-6 (4 ~ 12 h, $P = 0.0026, 0.0013, 0.0045$ respectively), and TNF- α (12 h, $P = 0.0087$). In addition, the expression of angiogenic factor VEGF began to increase 8 hours after hypoxia ($P < 0.0001$), decreased at 12-24 hours ($P < 0.0001$ respectively), and then increased rapidly ($P < 0.01$); The expression of Ang-2 decreased from 4-12 hours ($P < 0.05$), and gradually increased from 24 hours ($P < 0.01$). **Conclusions** Myocardial tissues and CMECs exhibit the different biological changes at different ischemia-hypoxia time points with inflammatory reactions beginning in the early stages and angiogenesis reactions occurring in the late stages. These findings contribute to elucidating the key cellular and molecular mechanisms underlying ischemic myocardial injury.

[**Key words**] Coronary artery disease; Hypoxia; Cardia microvascular endothelial cells; Coronary microcirculation; Inflammation; Angiogenesis.

冠心病是严重威胁人类健康的重要疾病之一, 其发病机制与冠状动脉粥样硬化性狭窄密切相关^[1]。尽管过去 10 a 中冠心病总体死亡率下降约 1/4, 但仍构成全球死亡主要因素, 在美国约 2 010 万人患有冠心病^[2], 而中国约 3.3 亿人患有心血管疾病, 其中冠心病约 1 139 万人^[3]。此外, 冠状动脉疾病导致心肌缺血缺氧, 引起心肌细胞结构和功能发生改变, 同时对心肌微循环系统产生严重影响。心肌微循环系统的完整性和功能状态对于维系心肌细胞代谢和收缩至关重要^[4]。心肌微循环系统的主要结构是心肌毛细血管网, 而心肌微血管内皮细胞(cardiac microvascular endothelial cell, CMECs)是构成微血管的关键细胞类型, 线粒体则作为主要能量来源, 其质量在内皮细胞中占 2% ~ 6%, 在心肌细胞中约占 32%^[5]。一方面, CMECs 参与调控血流动力学和微血管的通透性, 另一方面, 自身可分泌多种活性因子, 以及通过释放或摄入外泌体^[6], 传递多种类型的 RNAs, 进而调节心肌细胞的功能。因此, CMECs 在冠心病, 尤其是心肌缺血性损伤中扮演着非常重要的角色。

多项研究表明^[7-9], 缺血缺氧可导致 CMECs 发生一系列病理生理变化, 如形态学改变、细胞凋亡增加、炎症因子 NLRP3 激活、血管生成因子 VEGF 表达改变等。这些变化不仅会破坏 CMECs 的正常结构和功能, 也会直接影响心肌细胞, 从而进一步加重缺血缺氧损伤。然而, 目前针对 CMECs 在心肌缺血病理生理过程中的具体作用机制仍有待进一步深入的研究。本研究拟通过构建大鼠缺血性心肌损伤模型和体外短时间及长时间 CMECs 缺氧模型, 以在体和体外 2 个层面系统性分析在缺氧条件下, 冠脉微循环的主要构成部分在结构和生物学特性方面的变化, 包括 CMECs 的生长、存活、炎症及血管生成相关因子的变化, 并进一步探讨这些变化对冠脉微循环的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 6 ~ 8 周龄, 体重 150 ~ 200 g, 普通光照、基础饲料喂养, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 许可证号: SCXK(湘)

2019-0004。

1.2 主要试剂

戊巴比妥钠购自 Sigma。大鼠心脏微血管内皮细胞完全培养基购自 Procell。DMEM 培养基购自 Gibco。胎牛血清、胰蛋白酶、青霉素、链霉素购自 VivaCell。CCK8 试剂盒购自 Biomiky。ELISA 试剂盒 VEGF、IL-6 购自 NeoBioscience；IL-1 β 、TNF- α 购自 Proteintech；Ang-2 购自 abmart。培养皿、细胞培养板等耗材购自 Nest。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠心肌缺血模型的建立 购买的大鼠预适应喂养 1 周，标准饮食和水。使用 2% 戊巴比妥钠将大鼠腹腔麻醉，确保其进入无痛觉状态。仰卧位，头后仰固定，四肢伸展固定，行气管切开，接小动物呼吸机，吸呼比 1 : 1.5，胸部碘伏消毒，在胸骨左侧 3 ~ 4 肋间，顺肋间隙斜行切口，切开胸壁皮肤，钝性分离肌肉层，纵行剪开胸骨，暴露心脏，小心分离并固定心包。在左心耳下缘 3 ~ 4 mm 处，定位冠脉左前降支，用 7-0 带线缝合针部分结扎，结扎线远端组织变白则判断为急性心肌缺血模型成功。逐层闭合胸腔，挤压胸廓，将胸腔内空气挤出，切口附近涂擦青霉素钠预防感染。待大鼠恢复自主呼吸，拔除气管插管，放置保温垫内待完全清醒，连续 3 d 肌注青霉素钠 20 万 U/d 预防感染。

1.3.2 组织病理学(HE 染色) 于术后 72 h，取大鼠心脏，剔除心包、结缔组织、脂肪等，取结扎线以下心肌组织，预冷含双抗 PBS 冲洗 3 次去除血迹，迅速置于 4% 多聚甲醛中固定组织，依次 70%、80%、95%、100% 乙醇梯度组织脱水，将脱水好的组织依次浸泡梯度二甲苯进行透明，石蜡包埋，5 μ m 厚度切片，中性树胶封片后置于光学显微镜下观察心肌组织病理学改变。

1.3.3 组织病理学(Masson 染色) 取大鼠心肌组织，同上处理，置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h，依次 70%、80%、95%、100% 乙醇梯度组织脱水，石蜡包埋，5 μ m 厚度切片，置于预涂玻片上，二甲苯梯度浸泡透明、脱蜡，梯度乙醇复水，在 Masson 染液中浸泡，脱色并洗涤，中性树胶封片后置于光学显微镜下观察心肌组织病理学结构。

1.3.4 透射电镜观察超微结构 取大鼠新鲜心肌组织，置于预冷的电镜固定液中切成 1 mm³ 的立方体，0.1 M 磷酸缓冲溶液 PB(pH=7.4)漂洗，随后置于 1% 锇酸避光室温固定，依次 30%、50%、70%、80%、95%、100% 乙醇梯度组织脱水，渗

透后置入包埋板，树脂聚合 48 h，60 ~ 80 nm 超薄切片，2% 醋酸铀+2.6% 枸橼酸铅溶液双染色，随后，置于 HT7800 透射电镜下观察心肌细胞超微结构。

1.3.5 大鼠 CMECs 的分离与培养 取 SD 大鼠断颈处死，75% 酒精浸泡 5 min，转移至超净工作台，仰卧位固定大鼠，沿胸骨正中剪开皮肤，打开胸腔，去除心包组织，剪下左心室，将左心室剪成 1 mm³ 碎块，放入含双抗的 PBS 中，清洗后放入离心管，加入胰酶消化液，37 $^{\circ}$ C 恒温振荡水浴，消化 1 h，加入 FBS 终止胰酶反应，经 100 目细胞筛过滤，经 1000 r/min 离心 5 min，去除上清，保留细胞沉淀。用大鼠心肌微血管内皮细胞完全培养基重悬细胞，接种于多聚赖氨酸预包被的培养皿中，37 $^{\circ}$ C，5%CO₂ 恒温培养箱中静置培养，24 h 更换培养基，每 3 d 换液至细胞长满。

1.3.6 CMECs 缺氧模型的建立 将培养好的 CMECs 置于缺氧条件下，模拟缺氧环境。将细胞培养器皿放置在预先充填 5% CO₂ 和 95% N₂ 混合气体的缺氧箱中。根据实验设计，将 CMECs 置于缺氧条件下的特定时间。分组如下：对照组：将 CMECs 保持在正常氧气条件下处理，缺氧组：将 CMECs 置于缺氧条件下处理 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72 h。将 24 h 以内定义为短期缺氧，24 h 以上定义为长期缺氧。

1.3.7 CCK-8 法测定 CMECs 的增殖状态 将待检测的 CMECs 铺 96 孔板，2 \times 10³ 每孔，待细胞贴壁后，每孔 100 μ L 培养基中加入 10 μ L 的 CCK-8，37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 培养箱中孵育，450 nm 处读取 OD 值，分别读取 0 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h、72 h 细胞增殖情况。

1.3.8 CMECs 存活率的测定 将对照组和缺氧组分别置于培养皿上，加入消化酶，使细胞均匀分布。采用台盼蓝染色细胞计数法，使用相差显微镜观察细胞的形态。根据培养的细胞类型，选择放大倍数。进行定性和定量评估细胞的存活率。定性评估可以判断细胞是否存在形态异常和脱落，以及细胞聚集情况。定量评估使用计数方法来统计形态正常的细胞数目，以及形态异常的细胞数目，计算存活率。

1.3.9 ELISA 法测定 CMECs 炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)的水平 将待检测的 CMECs 铺 6 孔板，收集培养上清液，根据 ELISA 试剂盒使用说明，测定炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)的水平。使用酶标仪测量 450 nm 时的 OD 值，通

过绘制 OD 值与标准浓度的关系来制定标准曲线, 随后确定样品的浓度。

1.3.10 ELISA 法测定 CMECs 血管生成因子 (VEGF、Ang-2) 的水平 上清液的收集方法同上, 根据 ELISA 试剂盒使用说明书, 测定血管生成因子 (VEGF、Ang-2) 的水平。样品浓度的测定方法同上。

1.4 统计学处理

数据均采用 Graph-Pad Prism 9.0 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析和图像制作, 并以均数 \pm 标准差 (SD) 表示。通过 Student *t* 检验分析 2 组之间的差异, 自身对照采用配对样本 *t* 检验, 使用方差分析进行随机区组设计的比较; 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 冠脉结扎诱导后引起缺血心肌组织的 HE 染色改变

HE 染色结果显示: 术后 72 h, 对照组心肌组织横纹清晰且排列整齐, 心肌细胞完整且排列规则。模型组可见心肌组织横纹轻度排列紊乱, 但可见细胞肿胀, 心肌间质可见较多炎性细胞浸润, 未见显著的心肌细胞坏死、溶解及瘢痕增生, 见图 1。

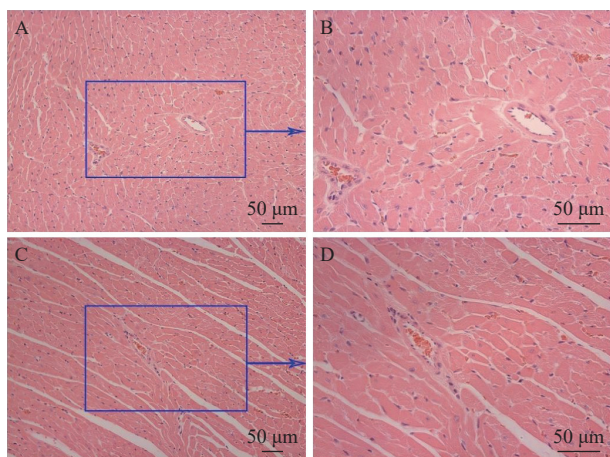


图 1 心肌组织 HE 染色

Fig. 1 HE staining of myocardial tissue

A: 对照组(200 \times); B: 对照组(400 \times); C: 模型组(200 \times); D: 模型组(400 \times)。

2.2 心肌组织短期缺血下的 Masson 染色改变

Masson 染色结果显示: 术后 72 h, 对照组未见明显病理性改变, 模型组可见轻度间质增生, 未见显著的纤维化性改变, 见图 2。

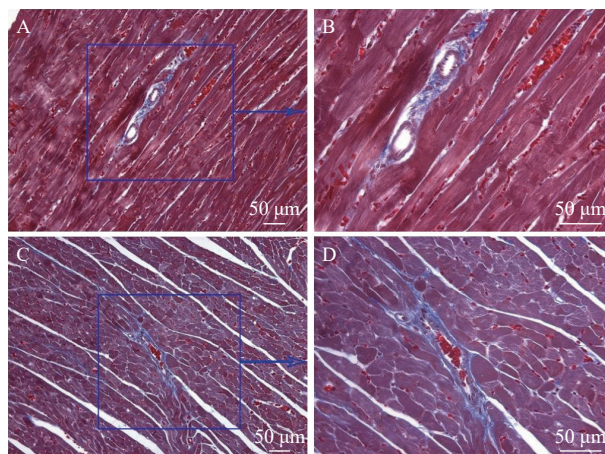


图 2 心肌组织 Masson 染色

Fig. 2 Masson staining of myocardial tissue

A: 对照组(200 \times); B: 对照组(400 \times); C: 模型组(200 \times); D: 模型组(400 \times)。

2.3 心肌组织短期缺血下的超微结构改变

透射电镜结果显示: 术后 72 h, 与对照组相比, 模型组心肌细胞超微结构尚完整, 表现为线粒体肿胀和形态不规则改变, 肌质网破坏并数量减少, 肌间微小血管上皮细胞肿胀, 管腔内可见大量有形物质, 但血管壁结构尚完整, 见图 3。

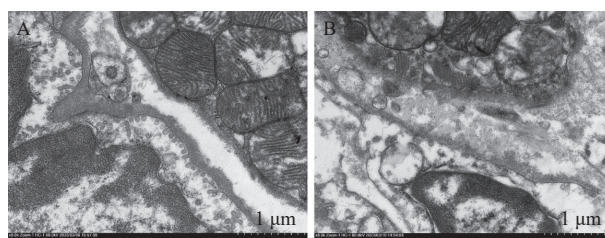


图 3 透射电镜观察心肌组织超微结构

Fig. 3 The ultrastructure of myocardial tissue under transmitting electron microscope

A: 对照组; B: 模型组。

2.4 CMECs 的形态特征及生长特点

原代 CMECs 经分离后呈圆形、椭圆形、短梭型, 细胞质透明状。在 4~6 h 后呈贴壁式生长, 边缘光滑, 24 h 后呈簇状生长, 显示出细胞间连接, 48 h 后偶有呈多边形扁平状、长梭形等, 72 h 后扁平状细胞开始增多, 或称“铺路石”样。P1~3 代细胞生长较为缓慢, 但贴壁状况良好, 短时间(20 min)内贴壁约 50%, 见图 4。

2.5 CMECs 的增殖状态

增殖率结果显示: 随时间延长, 在 12 h 内 2 组 OD 值无显著变化, 在 24 h 时升高较为显著, 但组间差异并无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较, 缺氧组在 48 h 和 72 h 时增殖速率下降, P 分别=0.0426 和 0.003, 见图 5。

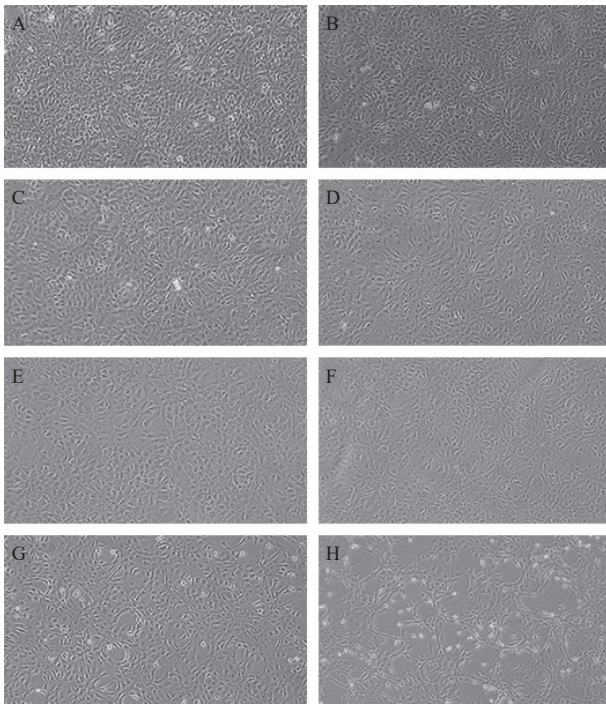


图 4 CMECs 显微镜普通视野下形态特征(100×)

Fig. 4 The morphological characteristics of CMECS under general microscope(100×)

A: 对照组 0 h; B: 模型组 0 h; C: 对照组 24 h; D: 模型组 24 h; E: 对照组 48 h; F: 模型组 48 h; G: 对照组 72 h; H: 模型组 72 h。

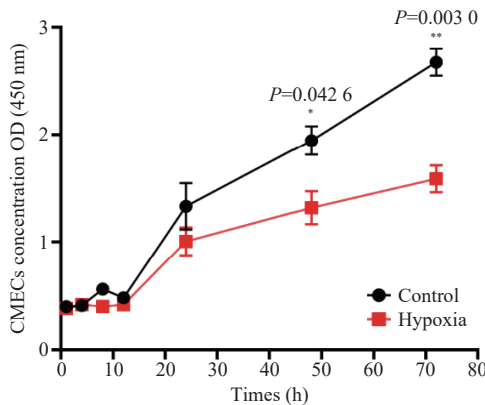


图 5 CCK8 法检测 CMECs 增殖状态

Fig. 5 Proliferation of CMECs detected by CCK8

注: 黑线代表对照组, 红线代表缺氧组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.6 CMECs 的存活率

结果显示: 0~24 h 内, 对照组和缺氧组的细胞形态无明显变化; 48 h 呈簇状生长, 缺氧组部分细胞体积开始缩小, 细胞排列疏松, 间隙增大; 与对照组相比, 缺氧组在 72 h 后细胞间连接断裂, 大量细胞圆形化, 大量游离细胞出现, 出现较多空白区域。对照组中, 健康 CMECs 所占比例均大

于 90%。缺氧组 12 h 内细胞存活率约 90%, 24 h 后开始下降, 72 h 后细胞存活率约为 50%。

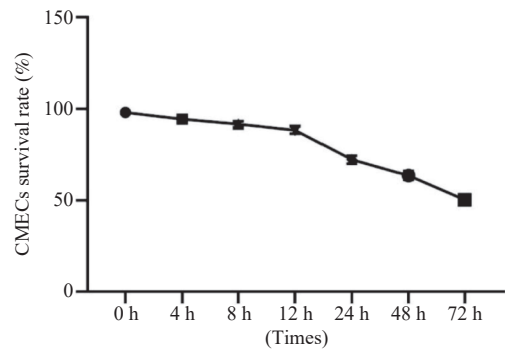


图 6 CMECs 的存活率

Fig. 6 Survival rate of CMECs

2.7 CMECs 的炎症因子 (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) 表达情况

结果显示: 随缺氧时间延长, 炎症因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的表达逐渐增高, 其中 IL-1 β 、IL-6 在缺氧 4 h 后即开始表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。而 TNF- α 则在缺氧 12 h 后开始表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 此外, 长期缺氧较短期缺氧增加更为显著, 见图 7~图 9。

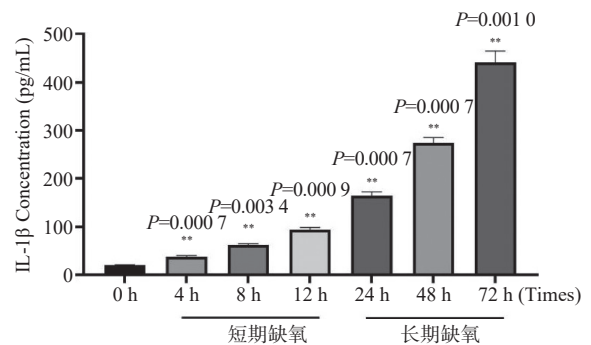


图 7 ELISA 法检测炎症因子 IL-1 β 的浓度

Fig. 7 The concentration of inflammatory factor IL-1 β detected by ELISA

与 0 h 组比较, ** $P < 0.01$ 。

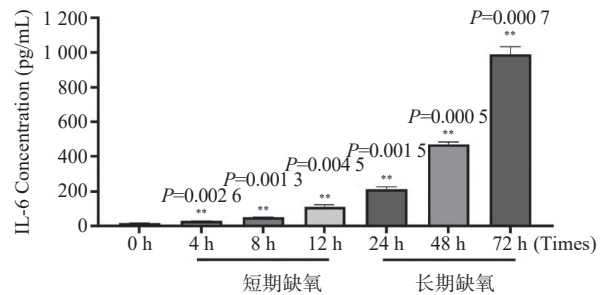


图 8 ELISA 法检测炎症因子 IL-6 的浓度

Fig. 8 The concentration of inflammatory factor IL-6 detected by ELISA

与 0 h 组比较, ** $P < 0.01$ 。

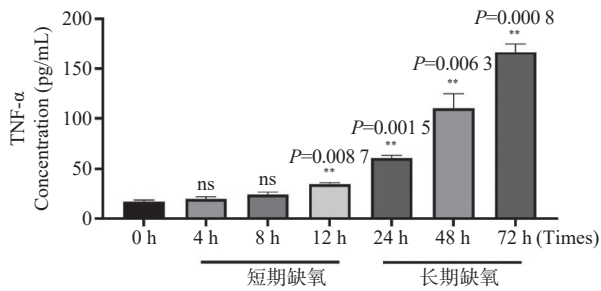


图 9 ELISA 法检测炎症因子 TNF- α 的浓度

Fig. 9 The concentration of inflammatory factor TNF- α detected by ELISA

与 0 h 组比较, ** $P < 0.01$ 。

2.8 CMECs 的血管生成因子 (VEGF、Ang-2) 表达情况

结果显示: 随缺氧时间延长, 血管生成因子 VEGF、Ang-2 的表达逐渐增高, 其中 VEGF 在缺氧 8 h 后表达具有显著差异 ($P < 0.05$); Ang-2 在缺氧 4 h ~ 12 h 期间表达下降 ($P < 0.05$), 在 24 h 后表达上升 ($P < 0.05$)。此外, VEGF 的表达在 12 h 至 24 h 期间表达降低 ($P < 0.05$), 在 48 h 后表达显著增加 ($P < 0.05$), 见图 10 ~ 图 11。

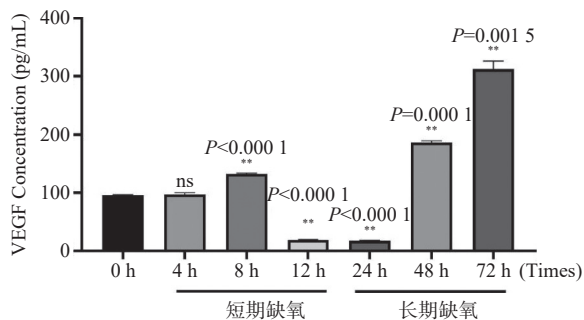


图 10 ELISA 法检测血管生成因子 VEGF 的浓度

Fig. 10 The concentration of angiogenesis factor VEGF detected by ELISA

与 0 h 组比较, ** $P < 0.01$ 。

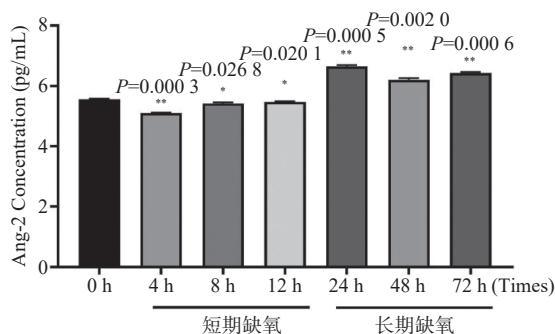


图 11 ELISA 法检测血管生成因子 Ang-2 的浓度

Fig. 11 The concentration of angiogenesis factor Ang-2 detected by ELISA

与 0 h 组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

冠状动脉血管系统构成组分包括心外膜动脉 (>500 μm)、毛细血管前小动脉 (200 ~ 500 μm)、小动脉 (10 ~ 200 μm) 和毛细血管 (<10 μm), 除心外膜动脉外, 其他血管均参与冠脉微循环组成, 其中微循环系统是维系心脏自身血液灌注的重要基础^[10]。本研究通过 HE 染色和 Masson 染色, 证实了在限定时限的大鼠缺血性心肌损伤模型中, 心肌细胞出现的病理学改变, 包括心肌组织横纹轻度排列紊乱, 细胞肿胀, 心肌间质可见较多炎性细胞浸润及轻度增生等, 这些改变都是典型的缺血缺氧损伤性表现。透射电镜进一步观察到, 心肌细胞的细胞器如线粒体肿胀、肌质网破坏并数量减少, 肌间微小血管上皮细胞肿胀, 管腔内可见大量有形物质等超微结构发生的病理学改变。本研究结果与杨铃等^[11]报道的早期特征基本一致, 受到实验方案、实验动物条件等客观因素的影响, 可能引起结果上有所差异, 本结果提示在 72 h 后开始显现。因此推测, 缺血的持续时间决定了心肌损伤的程度, 而梗塞的大小也由闭塞冠状动脉的数量和位置决定。特征性改变为本研究建立大鼠缺血性心肌损伤模型提供了可靠的依据, 也为后续研究提供了基础。

CMEC 是调节微血管的舒缩功能, 预防血栓形成, 维持血管通透性, 调节炎症, 调节各种刺激因素引起的血管生成的重要生理基础^[12]。对于 CMECs 自身脆弱的生存状态来讲, 置于缺氧环境下 48 h 以上属于长时缺氧。此外, Mishra 等^[13]提供了评估心肌细胞死亡的指南, 系统性地描述了识别、测量和评估心肌细胞死亡模式的最佳方法, 对本研究的研究方案提供了理论依据。不同类型细胞间通讯是通过多种旁分泌、自分泌和内分泌因子实现协调的心脏微环境, 与心肌细胞相比, 冠状动脉微血管中的内皮细胞更不容易受到缺血性损伤, 并且内皮细胞中的冠状动脉损伤可滞后于心肌细胞损伤^[14]。本研究结果显示, 体外培养的原代 CMECs 在不同程度的缺氧时间下表现出显著的病理生理学改变, 主要包括: 提示随着缺氧时间的延长, 48 h 后细胞形态学开始发生变化 (细胞体积开始缩小, 细胞排列疏松, 间隙增大等), 而在 72 h 后, 细胞形态学变化进一步显著 (细胞间连接断裂, 大量细胞圆形化, 大量游离细胞出现, 出现较多空白区域)、增殖活性受到

抑制、存活率下降、炎症因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)和血管生成相关因子(VEGF、Ang-2)释放。这些改变呈现出明显的时间依赖性, CMECs的损伤程度逐渐加重。

此外, 本研究结果还表明, 在体实验和体外实验随缺氧时间变化, 能够较好的反应对冠脉微循环的显著影响, 细胞形态改变、细胞增殖率下降和存活率降低等现象, 说明了缺氧环境对CMECs的基本结构和功能造成了严重破坏。然而, 缺氧诱导方法的不同会引起细胞增殖效率及细胞活力的差异。Wang等^[15]使用CoCl₂诱导冠脉内皮细胞缺氧模型, 至72 h时细胞活力下降至约为60%, 而本研究结果中这一数据约为50%。此外, 炎症因子释放表明CMECs发生了严重的炎症反应, 这不仅会加重自身损伤, 也可能激发全身性的炎症级联反应的病理生理基础。而血管生成因子的释放, 则提示了CMECs试图通过诱导新生血管来缓解自身缺氧状态, 但同时也可能导致病理性血管增生。

炎症反应是心肌缺血再灌注损伤的重要发病机制之一^[16]。本研究结果对于分子水平上揭示导致缺血性心肌损伤的关键细胞及分子机制具有积极的意义。缺血缺氧可直接损伤心肌细胞, 同时也会破坏心肌微循环系统中的CMECs^[5, 12]。受损的CMECs不仅自身功能受损, 还会释放大量有害因子, 进一步加重心肌缺血缺氧损伤, 形成恶性循环。这些发现为今后制定心血管疾病的早期诊断标志物和靶向治疗策略提供了新的思路。如监测CMECs相关的炎症(如IL-1 β 、IL-6、TNF- α)^[17-18]和血管生成标志物(如VEGF、Ang-2)^[7, 9], 以判断缺血缺氧损伤程度; 或者通过相关通路进一步深入的探索, 以明确减轻心肌损伤的相关机制。此外, CMECs自身也可作为一个潜在的研究热点, 如传递遗传物质、分泌活性因子等, 有助于阐明缺血缺氧状态下CMECs的病理生理学变化及其对冠脉微循环的影响, 进而揭示导致缺血性心肌损伤的关键环节。总的来说, 本研究仍有一些值得改进完善的地方, 如增加实验组数和重复次数、细胞水平与体内物质的关联性、增加标志物的鉴定方法等, 将会在后续研究中深入探索。

综上所述, 该研究有助于从微观角度阐明冠心病的病理基础和分子机制, 也为不同年龄人群的缺血性心肌损伤发病机制研究、早期诊断和靶向治疗提供新的思路和依据, 具有广阔的研究前景。

[参考文献]

- [1] Vaduganathan M, Mensah G A, Turco J V, et al. The global burden of cardiovascular diseases and risk: A compass for future health[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 80(25): 2361-2371.
- [2] Virani S S, Newby L K, Arnold S V, et al. 2023 AHA/ACC/ACCP/ASPC/NLA/PCNA guideline for the management of patients with chronic coronary disease: A report of the American Heart Association/American College of Cardiology joint committee on clinical practice guidelines[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2023, 82(9): 833-955.
- [3] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2022 概要 [J]. *中国循环杂志*, 2023, 38(6): 583-612.
- [4] Heusch G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2020, 17(12): 773-789.
- [5] Chang X, Lochner A, Wang H H, et al. Coronary microvascular injury in myocardial infarction: Perception and knowledge for mitochondrial quality control[J]. *Theranostics*, 2021, 11(14): 6766-6785.
- [6] Lei D, Li B, Isa Z, et al. Hypoxia-elicited cardiac microvascular endothelial cell-derived exosomal miR-210-3p alleviate hypoxia/reoxygenation-induced myocardial cell injury through inhibiting transferrin receptor 1-mediated ferroptosis[J]. *Tissue Cell*, 2022, 79(12): 101956.
- [7] Wang Y, Gao H, Cao X, et al. Role of GADD45A in myocardial ischemia/reperfusion through mediation of the JNK/p38 MAPK and STAT3/VEGF pathways[J]. *Int J Mol Med*, 2022, 50(6): 144.
- [8] Xin C, Zhang J, Hao N, et al. Irisin inhibits NLRP3 inflammasome activation in HG/HF incubated cardiac microvascular endothelial cells with H/R injury[J]. *Microcirculation*, 2022, 29(8): e12786.
- [9] Li G, Qiu Z, Li C, et al. Exosomal miR-29a in cardiomyocytes induced by angiotensin II regulates cardiac microvascular endothelial cell proliferation, migration and angiogenesis by targeting VEGFA[J]. *Curr Gene Ther*, 2022, 22(4): 331-341.
- [10] Vancheri F, Longo G, Vancheri S, et al. Coronary microvascular dysfunction[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(9): 2880.

- [11] 杨铃, 张轶欧, 贾力莉, 等. 心肌梗死大鼠模型的建立及疾病进程评价 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(23): 3733–3737.
- [12] Zhang Z, Li X, He J, et al. Molecular mechanisms of endothelial dysfunction in coronary microcirculation dysfunction [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2023, 56(3): 388–397.
- [13] Mishra P K, Adameova A, Hill J A, et al. Guidelines for evaluating myocardial cell death [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 317(5): H891–H922.
- [14] Yao J, Chen Y, Huang Y, et al. The role of cardiac microenvironment in cardiovascular diseases: Implications for therapy [J]. *Hum Cell*, 2024, 37(3): 607–624.
- [15] Wang K, Li B, Xie Y, et al. Statin rosuvastatin inhibits apoptosis of human coronary artery endothelial cells through upregulation of the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(3): 2052–2062.
- [16] Algoet M, Janssens S, Himmelreich U, et al. Myocardial ischemia–reperfusion injury and the influence of inflammation [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2023, 33(6): 357–366.
- [17] Wang Y, Yang X, Jiang A, et al. Methylation–dependent transcriptional repression of RUNX3 by KCNQ10T1 regulates mouse cardiac microvascular endothelial cell viability and inflammatory response following myocardial infarction [J]. *Faseb J*, 2019, 33(12): 13145–13160.
- [18] Qin X F, Shan Y G, Gao J H, et al. E3 ubiquitin ligase mind bomb 1 overexpression reduces apoptosis and inflammation of cardiac microvascular endothelial cells in coronary microvascular dysfunction [J]. *Cell Signal*, 2022, 91(3): 110223.