

· 基础研究 ·

缺血负荷对家兔股动脉固有侧支循环开放的影响^{*}

余滨宾¹ 励建安^{1,2} 韩 良¹

摘要

目的:研究单纯缺血负荷对家兔股动脉固有侧支循环开放程度和开放持续时间的影响,为生理性缺血训练的深入研究提供依据。

方法:健康成年家兔 26 只,体重(2.5±0.5)kg。股动脉以动脉夹夹闭,制作下肢单纯缺血模型,逐级设定不同缺血时间、间隔和缺血频率。采用微球技术检测缺血区和正常区股动脉固有侧支循环血流(FCBF)。

结果:①FCBF 在阻断后递增,第 3min 时达到高峰,较阻断后即刻明显增加($P<0.01$),第 4min 时达到平台期。②缺血区在阻断 3min 后再灌注,再灌注第 2min 时局部血流较阻断前明显增加($P<0.01$),再灌注最大维持时间可以达到 5min,不超过 8min。③反复缺血刺激(阻断 3min,间隔 5min)6 次,缺血 3 次时 FCBF 显著增加,达到高峰($P<0.01$),继续增加缺血频率 FCBF 反而呈下降趋势。

结论:家兔股动脉最大 FCBF 开放的最短缺血时间为 3min,再灌注最大维持时间可以至 5min,适宜缺血频率为 3 次。

关键词 生理性缺血训练;缺血时间;缺血频率;固有侧支循环

中图分类号:R541, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2010)-01-0004-05

Effect of ischemic burden on the opening of intrinsic femoral collaterals circulation in rabbits/YU Binbin, LI Jian'an, HAN Liang//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2010, 25(1): 4—8

Abstract

Objective: To study the minimal ischemic burden for evoking maximal opening of intrinsic femoral collaterals and provide the basis for clinical application of physiological ischemic training.

Method: Twenty-six New Zealand adult rabbits [(2.5±0.5)kg] were subjected to complete occlusion of femoral artery with different ischemic burden (graded ischemic duration, interval and frequency). Femoral artery collateral blood flow (FCBF) was measured with microsphere technique.

Result: 1. FCBF increased progressively at the onset of occlusion and reached the peak level at the 3rd min ($P<0.01$), then entered the plateau phase with occlusion prolonging at the 4th min. 2. Compared to pre-occlusion, the regional blood flow increased significantly at the 2nd min after one episode of 3min ischemia ($P<0.01$). The maximal opening of intrinsic femoral collaterals maintained at least 5 min, but decreased gradually at the 8th min after reperfusion. 3. FCBF increased significantly after three repetitive 3min occlusions with 5min interval between each ($P<0.01$). A trend of decrease was shown with the ischemic burden reaching more than 3 times.

Conclusion: The data suggests that the fully opening of intrinsic collaterals circulation after artery occlusion requires 3min duration and maintains at least 5 min, which is augmented by three repetitive 3min occlusions with 5min interval. Increase of ischemic burden can not enhance FCBF further.

Author's address The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029

Key words physiological ischemic training; ischemic time; ischemic frequency; intrinsic collateral circulation

缺血性疾病是指以组织缺血为主要病理改变的疾病,包括冠心病、脑梗死、外周动脉狭窄等。建立侧支循环是这些缺血性疾病治疗的主要手段之一^[1]。以建立侧支循环为核心的研究已经进行了多年,取得

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570893); 1 南京医科大学第一附属医院康复医学科,南京,210029; 2 通讯作者
作者简介:余滨宾,女,在读硕士研究生; 收稿日期:2009-05-15

积极的进展^[2-3]。

研究已经证明心肌缺血促进冠状动脉侧支循环生成^[4],是重要的心肌保护因素^[5],而无心肌缺血者侧支循环不生成^[6]。缺血刺激可以诱导合成血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)为主的多种促血管生长因子,进而促进侧支循环的生成^[7]。

本课题组在进行上一项国家自然科学基金课题“运动和缺血促进心肌侧支循环生成的作用和机理(30370687)”的结果提示,缺血刺激不仅可以提高局部的 VEGF 表达和侧支循环开放,也可以导致 VEGF 的远隔表达和侧支循环的生成,实现远隔效应^[8-9]。

本实验是国家自然科学基金课题“等长收缩和缺血训练对血管储备的作用及机理(30570893)”的组成部分。该课题创新性地提出采用生理性缺血训练,即正常肢体血管直接阻断或等长收缩方式造成的可逆性组织缺血,促进远隔病理性缺血部位侧支循环的形成。本课题组前期研究^[10]已经证实了生理性缺血训练的远隔效应,但未研究具体的训练方案,即适宜的缺血负荷(缺血时间、间隔和频率)。

组织缺血是通过固有侧支血管开放增加侧支血流的速度和剪切力,促进侧支循环生成^[11-12]。固有侧支循环开放是侧支循环生成的前提,明确缺血负荷与固有侧支循环开放的规律是生理性缺血训练方案制订的基础。

本研究旨在观察单纯缺血时间、间隔、频率对固有侧支循环开放程度和持续时间的影响,确定促进股动脉固有侧支循环开放的适宜缺血负荷,为生理性缺血训练的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年普通级家兔 26 只,雌雄不拘,体重 2.5 ± 0.5 kg。由江苏省农业科学院畜牧兽医研究所提供,许可证号 SCXK(苏)2002-0025。

1.2 微球

微球^[13](Microsphere, Triton Technology, USA)为直径 $15 \mu\text{m}$ 的塑料微粒体,以多种颜色标记。制剂为生理盐水混悬液,每毫升含微球 3×10^6 粒。充分混

匀微球混悬液后经左心耳注射进入体循环,随血流到达全身毛细血管网。检测局部组织微球数量可代表注射即刻局部组织的相对血流量。在不同时间点注入不同颜色的微球,可分析血流量的动态变化。

1.3 单纯缺血动物模型的制作

3%戊巴比妥钠自兔耳缘静脉缓慢推注麻醉(30mg/kg)。取仰卧位固定,左侧下肢腹股沟下 2cm 纵向切口,钝性分离皮肤和皮下筋膜,暴露并分离股动脉,采用动脉夹夹闭股动脉,造成骨骼肌缺血。在缺血时间终点时打开动脉夹,形成动脉血流再灌注^[14-15]。

1.4 实验动物剔除标准

出现下列情况的家兔退出实验:①股动脉破裂或不完全阻断;②股动脉缺血再灌注失败;③术中或术后非心脏原因意外死亡。

1.5 实验分组及实验方案

术中死亡 1 只,另有 1 只未满足本实验的入选标准而退出。其余 24 只家兔随机分为 A、B、C、D 组,每组各 6 只。4 组实验依次进行(图 1)。A 组为粗筛促进最大 FCBF 的最短缺血时间,B 组是进一步细筛实验。C 组是在 B 组实验后,确定股动脉固有侧支循环血流(femoral artery collateral blood flow, FCBF)最大维持时间,D 组是确定缺血频率对 FCBF 开放持续时间的影响,每次阻断 3min,间隔 5min,重复 1—6 次。A、B 组中每只动物的左后肢作为实验组,右后肢作为正常对照。C、D 组中测得的再灌注时局部血流与阻断前局部血流的差值即为 FCBF,计算公式为:FCBF=再灌注血流-阻断前血流。

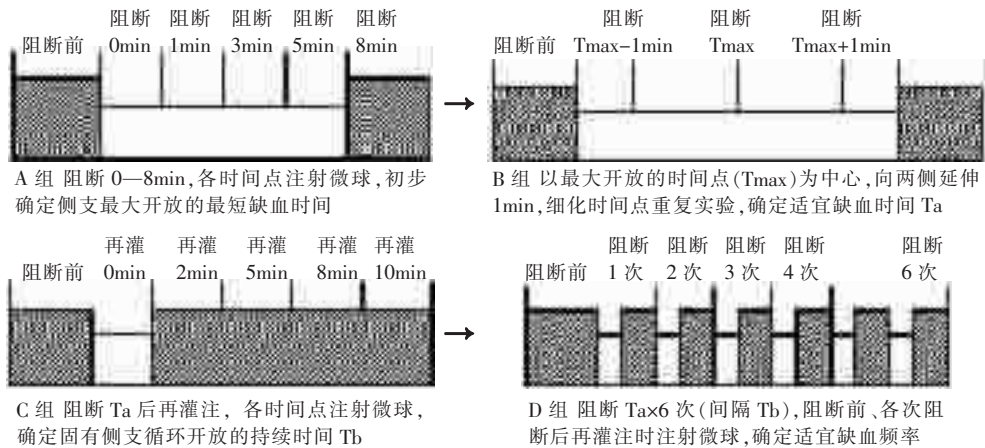
1.6 标本采集

实验中所有动物于麻醉状态下开胸,在各时间点向左心耳内分别注射不同颜色微球 $150 \mu\text{l}$ 。实验终点时,在麻醉下处死动物,取阻断股动脉支配区腓肠肌(缺血区)及另一侧正常腓肠肌(正常区)各约 2g,置于 15ml 聚丙烯离心管中,称标本净重并标记。自然腐败 2 周后进行微球定量测定。

1.7 局部血流量测定

标本自然腐败后,于离心管中剪碎,强碱 KOH (1mol/L)分解后提取微球,用酸化乙酸乙酯萃取微球上的染料。然后分别在各颜色所对应的波长下用分光光度计(Ultrospec2000 型, Pharmacia

图 1 实验分组及每组处理方案



Biotech 公司,美国)检测,所得的吸光度值可通过标准方程转化为微球数(个/g 骨骼肌),即代表微球注射时局部骨骼肌的相对血流量。

1.8 统计学分析

数据均以均数±标准差表示。所有数据均经 SPSS12.0 软件检验,呈正态分布且方差齐性。多组间采用单因素方差分析,两组间采用两两比较。 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 缺血时间对 FCBF 的影响

见表 1。A 组中 FCBF 在阻断 3min 时达到最大,以 3min 为中心向两侧延伸 1min,细化时间点进行 B 组实验。综合两组实验结果显示 FCBF 在阻断 0—3min 呈递增趋势,阻断 3min 时达到高峰,较阻断后

即刻明显增加($P<0.01$),4min 时恢复到平台期。正常区骨骼肌局部血流在各时间点间无显著变化($P>0.05$)。

2.2 FCBF 的持续时间

见表 2。C 组中阻断 3min 后再灌注,再灌注 0—2min 时局部血流呈增加趋势,再灌注 2min 时较阻断前明显增加($P<0.01$),再灌注 5min 时局部血流与再灌注 2min 时相当($P>0.05$),至 8min 时逐渐回落。相应 FCBF 在 2—5min 时维持峰值,8—10min 时逐渐回落。再灌注 0min 时局部血流低于阻断前,无法推算 FCBF 值。

2.3 缺血频率对 FCBF 的影响

见表 3。D 组数据显示缺血频率 3 次时 FCBF 显著增加,达到高峰($P<0.01$),继续增加缺血频率 FCBF 反而呈下降趋势。

表 1 缺血时间对 FCBF 的影响 ($\bar{x}\pm s$, 个/g 骨骼肌)

	阻断前	阻断中						
		0min	1min	2min	3min	4min	5min	8min
缺血区	395±34	84±15	143±21	166±22	266±18	221±27	198±19	200±15
正常区	405±17	405±31	395±13	387±17	405±38	390±27	402±27	401±21

表 2 缺血后再灌注时局部血流的变化 ($\bar{x}\pm s$, 个/g 骨骼肌)

	阻断前	阻断后再灌注				
		0min	2min	5min	8min	10min
局部血流	409±22	309±39	613±67	625±41	509±51	501±39
FCBF			203±47	215±19	99±30	92±18

表 3 缺血频率对 FCBF 的影响 ($\bar{x}\pm s$, 个/g 骨骼肌)

	阻断前	阻断次数				
		1 次	2 次	3 次	4 次	6 次
局部血流	399±22	608±41	646±52	713±66	626±66	561±31
FCBF		208±28	246±33	313±35	226±40	161±12

3 讨论

3.1 研究背景

本课题组前期关于心肌缺血负荷的研究确定了冠状动脉缺血负荷与固有侧支循环最大开放的关系^[16],并应用于有氧运动训练,证明运动诱导的间断性心肌缺血训练可以促进冠状动脉侧支循环生成^[17]。

尽管缺血促进侧支循环生成的作用有利于提高血管储备,但是在心肌缺血的病理基础上继续施加缺血刺激仍然有可能诱发心血管危险。本课题组目前进行的生理性缺血训练是通过骨骼肌缺血刺激的远隔效应来促进缺血心肌侧支循环生成,以避免心血管危险。本课题组前期研究^[10]已经初步证实这一假说。

生理性缺血训练的方式包括直接血流阻断法(袖带或者结扎血管)或间接血流阻断法(等长收缩)阻断肢体血流。但训练方案中促进侧支循环形成的理想缺血负荷依然缺乏实验研究。本实验采用直接阻断血流法研究适宜缺血负荷,为生理性缺血训练方案的制订提供实验依据。

3.2 研究设计

3.2.1 研究方案:缺血负荷三个要素为缺血时间、间隔时间和频率^[18]。理想的缺血负荷是指造成最大侧支循环开放、维持最长时间的最小缺血负荷及最少缺血刺激频率。本研究缺血时间采用粗筛结合细筛的方式研究,即按照较粗的时间段(缺血前、缺血0、1、3、5、8min)先确定FCBF最大开放的时间点(T_{max}),然后以T_{max}为中心向两侧各扩展1min,细化适宜缺血时间。根据本课题组过去证明的再灌注规律^[16],采用血管阻断解除后0、2、5、8、10min的间隔研究再灌注局部血流,确定侧支开放的持续时间,作为缺血频率研究的基础。考虑临床实用性采用1、2、3、4、6次反复缺血和再灌注的方式,确定缺血频率与固有侧支循环最大开放的关系,作为适宜缺血频率。

3.2.2 动物模型制作:实验中采用单纯缺血(直接阻断血流)方式进行缺血刺激,动物模型制作以动脉夹暂时夹闭股动脉造成下肢骨骼肌间断性缺血。操作简单易于控制,可以有效保证血流的完全阻断而不会造成血管损伤,是目前研究周围血管病中普遍采

用的模型^[14-15]。其作用等同于袖带直接加压于肢体的方式造成血流阻断,具有一定的临床指导意义。

3.2.3 观察指标:用微球定量检测局部血流量已经是国内外此研究方向的成熟方法^[13],通过注射不同颜色的微球,可观察同一个体不同时间点局部血流的动态变化。本课题组前期的研究已经多次采用这一方法检测局部组织血流量^[10,16-17],故本实验沿用微球定量检测方法作为主要研究手段。

3.3 结果分析

3.3.1 适宜单纯缺血时间:通过逐级筛选发现FCBF在阻断0—3min时呈递增趋势,提示固有侧支循环的逐步开放,3min时达到高峰,4min时进入平台期,说明股动脉固有侧支循环在缺血3min左右达到最大开放,不再随缺血时间的延长而增加,因此缺血3min为适宜缺血时间。

3.3.2 固有侧支循环开放持续时间:缺血3min后再灌注即刻骨骼肌局部血流低于缺血前,考虑与股动脉夹闭后,再灌注瞬间血管未完全复原有关。再灌注2—10min时局部血流均明显超过缺血前的基础水平,其差值即为FCBF。FCBF在再灌注2min时达到高峰,再灌注5min时维持峰值,8—10min时逐渐回落。表明再灌注最大维持时间可以达到5min,不超过8min。

3.3.3 适宜单纯缺血频率:反复阻断1、2、3、4、6次(缺血3min间隔5min),阻断3次时FCBF达到高峰,较阻断1次明显增加,继续增加缺血频率FCBF反而呈下降趋势。提示反复3次的缺血刺激可以在单次刺激固有侧支循环最大开放的基础上产生叠加效应,促进固有侧支循环的进一步开放,继续增加缺血负荷不利于固有侧支循环开放,因此适宜缺血频率为3次。

3.3.4 骨骼肌和心肌适宜缺血负荷的比较:本实验证明家兔股动脉最大固有侧支循环开放的最短缺血时间为3min,再灌注最大维持时间至5min,适宜刺激频率为3次。比较本课题组前期^[16]心肌缺血负荷研究结果(适宜缺血时间2min,侧支开放维持2min,适宜缺血频率1次),两者间存在一定差异。

目前认为,血管阻断前后的血压差是启动固有侧支循环开放的重要因素,而冠状动脉血压明显高于股动脉,阻断前后血压差较大,从而在较短时间内

达到固有侧支循环的最大开放^[19]。同样冠状动脉在阻断后再灌注瞬间血压增高较显著,急剧的血压差可能诱导固有侧支循环较快进入关闭状态,可能因此导致心肌侧支开放维持时间较短。

3.4 实验意义

生理性缺血训练是本课题组提出的创新概念。通过前期研究^[10]已经初步证明,生理性缺血训练可以促进远隔的病理性缺血部位侧支循环形成。为此,该方向的研究将可能开创心血管疾病和外周血管疾病康复的新途径。但是过去的研究尚未深入探讨适宜的缺血训练负荷。本实验采用逐级筛选的原则,系统研究了缺血负荷和股动脉固有侧支循环开放的关系和规律,确定促进股动脉固有侧支循环最大开放的最小缺血负荷。研究结果为理想生理性缺血训练方案的制订提供重要的实验依据,训练方案的优化有利于减少缺血风险和增加侧支效应,为生理性缺血训练的临床应用奠定基础。

3.5 研究局限性

本研究从血流动力学角度研究了急性血管阻断造成最大固有侧支循环的最小缺血负荷。但是目前确定的缺血负荷尚未触及适宜的日负荷、周负荷和月负荷,即造成远隔部位最大侧支循环形成的理想化训练方案仍然有待进一步深入研究。本课题组已经在本研究结果的基础上,深入进行生理性缺血训练的日负荷、周负荷和月负荷的研究。

参考文献

- [1] Berry C, Balachandran KP, L'Allier PL, et al. Importance of collateral circulation in coronary heart disease [J]. Eur Heart J, 2007,28(3):278—91.
- [2] Kersten JR, Pagel PS, Chilian WM, et al. Multifactorial basis for coronary collateralization: a complex adaptive response to ischemia [J]. Cardiovasc Res, 1999, 43(1):44—57.
- [3] Linke A, Erbs S, Hambrecht R. Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease [J]. Front Biosci, 2008,13(1):424—432.
- [4] White FC, Carroll SM, Magnet A, et al. Coronary collateral development in swine after coronary artery occlusion [J]. Circ Res, 1992,71(6):1490—1500.
- [5] Ottani F, Galvani M, Ferrini D, et al. Prodromal angina limits infarct size. A role for ischemic preconditioning [J]. Circulation, 1995,91(2):291—297.
- [6] Cohen MV. Training in dogs with normal coronary arteries: lack of effect on collateral development [J]. Cardiovasc Res, 1990,24(2):121—128.
- [7] Hoeber A, Landuyt B, Highley MS, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis [J]. Pharmacol Rev, 2004,56 (4): 549—580.
- [8] 刘元标,励建安,路鹏,等. 家兔短暂心肌缺血后 VEGF 蛋白表达的空间规律 [J]. 中国康复医学杂志, 2004,19(6):443—445.
- [9] 路鹏,励建安,刘元标,等. 心肌短暂缺血后血管内皮生长因子表达的时间规律 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2004,26(10):577—580.
- [10] Shen M, Gao J, Li J, et al. Effect of ischemic exercise training of normal limb on angiogenesis of pathological ischemic limb in rabbit [J]. Clin Sci (Lond), 2009.
- [11] Chappell DC, Varner SE, Nerem RM, et al. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium [J]. Circ Res, 1998, 82(5):532—539.
- [12] Price RJ, Less JR, Van Gieson EJ, et al. Hemodynamic stresses and structural remodeling of anastomosing arteriolar networks: design principles of collateral arterioles [J]. Microcirculation, 2002,9(2):111—124.
- [13] Hof RP, Wyler F, Stalder G. Validation studies for the use of the microsphere method in cats and young minipigs [J]. Basic Res Cardiol, 1980,75(6):747—756.
- [14] Unthank JL, Sheridan KM, Dalsing MC. Collateral growth in the peripheral circulation: a review [J]. Vasc Endovascular Surg, 2004,38(4):291—313.
- [15] Waters RE, Terjung RL, Peters KG, et al. Preclinical models of human peripheral arterial occlusive disease: implications for investigation of therapeutic agents [J]. J Appl Physiol, 2004,97 (2): 773—780.
- [16] 王红星,励建安,路鹏,等. 缺血负荷对家兔冠状动脉固有侧支循环开放的影响 [J]. 中国康复医学杂志, 2003,18(5):274—278.
- [17] Lu X, Wu T, Huang P, et al. Effect and mechanism of intermittent myocardial ischemia induced by exercise on coronary collateral formation [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2008,87(10):803—814.
- [18] Cohn PF. Total ischemic burden: pathophysiology and prognosis [J]. Am J Cardiol, 1987,59(7):3C—6C.
- [19] Schaper W. Collateral circulation: past and present [J]. Basic Res Cardiol, 2009,104(1):5—21.