

# 运动训练对大鼠缺血下肢血管新生的影响

葛红卫<sup>1</sup> 何延政<sup>2,3</sup> 梅燕<sup>2</sup> 刘勇<sup>2</sup> 曾宏<sup>2</sup> 施森<sup>2</sup> 文雪刚<sup>2</sup>

**摘要** 目的:观察下肢缺血及运动训练对大鼠缺血下肢微血管生成的影响。方法:SD大鼠30只随机分为A、B、C3组各10只,A、B组建立大鼠下肢缺血模型,C组仅作皮肤切开缝合。建模1周后A组大鼠跑步训练(30min/d)。B、C组日常活动,运动训练4周后处死大鼠,取大腿内收肌组织块免疫组化检测微血管密度(MVD)、血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)表达,比较3组差异。结果:肌组织MVD、VEGF、bFGF免疫组化均显示:A组高于B组( $P<0.01$ ),B组高于C组( $P<0.01$ );A、B、C组间差异均存在显著性。结论:下肢缺血刺激可以促进血管新生、成血管因子表达增加,运动训练可以增强该效应。

**关键词** 缺血;运动训练;血管新生

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-05-0413-03

**Effects of hindlimb ischemia and exercises training on microangium in rats with ischemic limbs/GE Hongwei, HE Yanzheng, MEI Yan, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2008, 23(5): 413—415**

**Abstract Objective:** To observe the effects of hindlimb ischemia and exercises training on microangium in rats with ischemic limbs. **Method:** Thirty healthy male Sprague-Dawley rats were divided into experiment group (A), control group (B) and pseudosurgery group (C) randomly. Hindlimb ischemia was established in rats (A and B) by surgical excision of right femoral arteries. Rats in group A were trained to run 30min once a day at the standard for 4 weeks, then all the rats were sacrificed to obtain the adductor of the ischemic upper leg and fix. MVD, VEGF, bFGF in tissues were measured by immunohistochemistry to compare the difference among 3 groups. **Result:** MVD, VEGF, bFGF in tissues measured by immuno-histochemistry techniques displayed as: group A > group B ( $P<0.01$ ); group B > group C ( $P<0.01$ ), significant differences were among group A, B and C. **Conclusion:** Lower limb ischemia can increase the angiogenesis and exercises training can enhance this effect.

**Author's address** The Third Hospital of Suzhou University, 213003

**Key words** ischemia; exercises training; angiogenesis

慢性肢体缺血性疾病发病率逐年增高,治疗困难,尤其对于多节段动脉硬化性闭塞,以及广泛小动脉闭塞者治疗相当棘手<sup>[1]</sup>。“治疗性血管新生”为该类疾病提供了新的治疗思路。本研究在建立大鼠肢体缺血模型基础上,探讨运动训练对缺血组织微血管密度的影响,为进一步探讨运动训练促进血管新生提供研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 大鼠右下肢缺血模型的制作

SD大鼠共30只,随机分为运动训练组(A组)、非运动组(B组)和假手术组(C组),每组各10只。A组和B组大鼠均在手术显微镜下高位结扎股总动脉、股深动脉,游离股浅动脉至膝下,切除、结扎分支血管,10只假手术组(C组)仅作右后肢皮肤切开缝合。1周后经彩超证实模型建立成功。

### 1.2 运动训练

缺血模型建立成功1周后,A组大鼠每天上午置入网状滚筒运动训练器(自制,周径2m,长度

1.5m)中,顺时针匀速转动10r/min,20m/min,诱导大鼠匀速跑动,至大鼠有疲劳感(以大鼠跑动步伐渐渐跟不上匀速旋转的滚筒为准<sup>[2]</sup>),约30min,以后每天运动量以此为准。B组、C组保持日常活动。

### 1.3 取材与固定

A组大鼠运动训练达4周后(30min/d),A、B、C组大鼠全部深麻醉处死,取右大腿内收肌组织块,1.0cm×0.5cm×0.5cm,固定,石蜡包埋,恒温切片机分别沿肌纤维走向及垂直走向切片;捞片,烤片。

### 1.4 组织病理检查

**1.4.1** 缺血组织切片的HE染色:石蜡切片脱蜡,水化后苏木素染液染色,盐酸分化,伊红染液复染,酒精梯度脱水,二甲苯透明,树脂封片、保存。

**1.4.2** 微血管密度(microvascular density,MVD)、

1 苏州大学附属第三医院血管外科,213003

2 泸州医学院附属医院血管外科,646000

3 通讯作者:何延政(泸州医学院附属医院血管外科,646000)

作者简介:葛红卫,男,硕士,住院医师

收稿日期:2007-08-14

VEGF、bFGF 的免疫组化检测：依照链霉素-生物素过氧化物酶复合物法（SABC 法）进行免疫组化反应。一抗为兔抗鼠 VWF(vessel wall fibroblast)因子(浓缩型 0.1ml:Santa-Cruz 公司),兔抗鼠 VEGF 多克隆抗体(北京中杉);兔抗鼠 bFGF 多克隆抗体(北京中杉)。二抗为即用型 SABC 试剂盒(武汉博士德)。依说明书进行操作。

### 1.5 光镜观察与结果判断

以胞浆呈棕黄色染色者为内皮细胞 VWF 表达阳性,对 VWF 阳性进行微血管计数,首先在低倍镜下选择着色密度最高的区域。然后在 200 倍光镜下,随机计数 5 个视野内微血管数,取平均值作为该片的每视野下的血管数(个/HPF),即 MVD。以胞浆呈棕黄色染色者为内皮细胞、骨骼肌细胞 VEGF、bFGF 表达阳性,2 名观察者采用双盲法于 200 倍光镜下随机选 5 个视野,根据染色强度(a)和阳性细胞数(b)计算 VEGF、bFGF 评分<sup>[3]</sup>。

染色强度(a):按阳性细胞百分率分为:(0)阳性细胞百分率 0%—5%;(1), 阳性细胞百分率 5%—25%;(2), 阳性细胞百分率 25%—50%;(3), 阳性细胞百分率 50%—100%。

阳性细胞数(b):胞浆内出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。

以阳性系数(a+b)表示 VEGF、bFGF 评分表达:

a+b 得分	0—1	2	3	4—5	6
阳性系数	0	1	2	3	4

### 1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以均数±标准差表示, 组间比较采用 *q* 检验。

## 2 结果

### 2.1 模型建立

造模术后所有实验大鼠均存活, 动物模型术后均出现右侧后肢缺血表现, 如跛行、肢端苍白等。1 周后经彩色多普勒检查提示大腿部动脉血流中断, 证实模型建立成功。

### 2.2 组织微血管密度

显微镜观察 HE 染色 A、B 两组骨骼肌细胞间隙, 可见断面圆形的细血管,C 组仅可见少许微血管分布。免疫组化切片 A、B 两组可见大量新生血管, 主要分布在骨骼肌细胞间, 血管壁被覆一至数个内皮细胞,VWF 表达阳性, 表现为胞浆呈棕黄色且 A 组 MVD 高于 B 组, 二者差异有显著性(*P*<0.01)。A、B 两组 MVD 均显著高于 C 组(*P*<0.01), 见表 1。

### 2.3 VEGF、bFGF 的表达

**2.3.1** A、B 两组沿骨骼肌横向切片免疫组化检测后 VEGF、bFGF 表达均显示骨骼肌良好, 见表 1。

**2.3.2** 细胞有棕黄色颗粒沉着, 棕黄色颗粒呈异质状分布于胞浆内, 提示 VEGF、bFGF 阳性。A 组与 B 组相比, 二者 VEGF、bFGF 表达均有显著性差异, (*P*<0.01)。C 组肢体组织见 VEGF、bFGF 为阴性或弱阳性表达, 显著低于 B 组, (*P*<0.01), 见表 1。

表 1 大鼠肌组织 MVD 及 VEGF、bFGF 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MVD	VEGF	bFGF
A 组	39.94±4.01 <sup>①</sup>	3.30±0.67 <sup>①</sup>	3.1±0.73 <sup>①</sup>
B 组	27.23±3.64 <sup>②</sup>	2.29±0.67 <sup>②</sup>	2.39±0.69 <sup>②</sup>
C 组	13.32±2.26	0.59±0.49	0.87±0.53

①与 B 组比 *P*<0.01; ②与 C 组比 *P*<0.01

## 3 讨论

研究表明, 缺血因素促进缺血组织局部形成新生血管和侧支循环; 骨骼肌的血管系统发生自身重塑以提高活动肌肉的供氧<sup>[4—5]</sup>。其机制可能与外周血和组织 VEGF、bFGF 及其受体表达上调有关。本实验显示, 肢体缺血组大鼠组织 MVD、VEGF、bFGF 表达较假手术组明显增高。VEGF 是一种高度特异的血管内皮细胞有丝分裂原, 能促进内皮细胞分裂、增殖、迁移、趋化; 能通过促进单核巨噬细胞迁移, 进而分泌多种血管生长因子, 间接促进血管新生;bFGF 是血管形成的较为直接诱导物, 可进一步促进管状结构的形成和成熟<sup>[6]</sup>, 从而多途径地促进缺血部位的血管新生。

运动通过血流对血管壁剪切应力提高、机体 VEGF-R 信号等表达, 诱导内皮细胞增殖和分化, 促进侧支动脉形成和毛细血管的新生。本实验中, 肢体缺血大鼠模型经运动训练后, 发现大鼠缺血组织 MVD、VEGF、bFGF 表达明显增高, 说明运动训练能促进缺血肢体的新血管生成和侧支循环形成, 改善组织供血。运动能有效地提高外周血中血管生长因子 VEGF、bFGF 水平。此外运动还诱导血管适应性改变, 骨骼肌局部血流量的提高, 毛细血管密度的增加; 血流对血管壁剪切应力增强, 刺激内皮细胞释放各种生长因子等一系列复杂的反应<sup>[5]</sup>。

VEGF 能有效动员骨髓内皮祖细胞(endothelial progenitor cell, EPCs)入外周血、诱导 EPCs 的增殖, 并定位到缺血组织, 在原位分化形成成熟的内皮细胞, 从而形成新的血管<sup>[7]</sup>, 称之为出生后的血管发生。研究证实, 运动是动员 EPCs 的有效手段, 同时 EPCs 又能分泌 VEGF、HGF、G-CSF、GM-CSF 等促血管生长因子<sup>[8]</sup>, 可达到治疗性血管新生的效果, 从而多途径地促进缺血部位的血管新生。

本实验表明：以跑步为代表的体育运动训练能促进组织血管新生，有助于阐明运动训练促进下肢血管新生理论，丰富“治疗性血管新生”理论研究以及康复治疗发展。鉴于运动训练同时能改善机体微循环，减轻患肢组织炎性病变，增强患者心肺功能等，有望在慢性动脉闭塞性疾病的治疗中发挥作用。

## 参考文献

- [1] Lazarides MK, Georgiadis GS, Papas TT, et al. Diagnostic criteria and treatment of Buerger's disease: a review [J]. Int J Lower Extremity Wounds, 2006, 5(2):89—95.
- [2] Lloyd PG, Prior BM, Li H, et al. VEGF receptor antagonism blocks arteriogenesis, but only partially inhibits angiogenesis, in skeletal muscle of exercise-trained rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 288(2): H759—H768.
- [3] Ivan D, Niveiro M, Diwan A. Analysis of protein tyrosine kinases expression in the melanoma metastases of patients treated with Imatinib Mesylate [J]. J Cutan Pathol, 2006, 33(4): 280—285.
- [4] Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Effect of electrical stimulation on arteriogenesis and angiogenesis after bilateral femoral artery excision in the rabbit hind-limb ischemia model[J]. Vascular and Endovascular Surgery, 2005, 39(3):257—265.
- [5] Prior BM, Yang HT, Terjung RL. Terjung. What makes vessels grow with exercise training [J]. J Appl Physiol, 2004, 97 (3): 1119—1128.
- [6] Fu Y, Ponce ML, Thill M. Angiogenesis inhibition and choroidal neovascularization suppression by sustained delivery of an integrin antagonist [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(11): 5184—5190.
- [7] Shintani S, Murohara T, Ikeda H, et al. Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2001, 103(23):2776—2779.
- [8] Rehman J, Li J, Orschell CM, et al. Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors [J]. Circulation, 2003, 107(8): 1164—1169.

(上接390页)

这一提法目前较常用。本文同时还进行了氢谱分析，结果可供进一步研究青少年精神疾病参考。NAA 存在于神经元中，是神经元数量和活性的标志<sup>[8—9]</sup>。既往认为，其峰值的减低提示神经元死亡或功能丧失。最近的动物实验表明，其峰值减低亦可见于可逆性的神经元损害<sup>[8]</sup>，提示严重的、但可恢复的神经元功能障碍。

认知功能是人脑高级功能的一部分，涉及感知觉、注意、想象、记忆、思维、判断等心理过程，是为一定目的在一定心理结构中进行的信息加工过程。因此认知过程表现在信息的接收、分类、储存、加工、提取、整合等方面的功能<sup>[4]</sup>。但如何对认知过程，特别是“注意”做出客观评价是困扰临床医生的一大难题。本研究探讨了健康青少年的fMRI特点，初步报告了健康青少年视觉注意作业时的激活与未激活的脑区，同时确立其规范性实验及操作分析模式<sup>[1]</sup>。为进一步探讨不同种类的青少年精神障碍脑功能变化提供参考指标。

## 参考文献

- [1] 吴丽慧.事件相关功能性磁共振成像研究进展[J].神经病学与神经康复学杂志,2005,2(4):247—250.
- [2] Doval O, Bello E, Singh J, et al. The brain in motion: functional magnetic resonance imaging for clinicians I [M]. Chicago: University of Illinois at Chicago, 2001, 1—34.
- [3] Gazzaniga MS.认知神经科学.沈政,朱滢,迟惠生等,译.上海:上

- 海教育出版社,1998,287—534.
- [4] Smith EE, Jonides J. Storage and executive processes in the frontal lobes[J]. Science, 1999, 283:1657—1661.
- [5] Smith EE, Jonides J. Neuroimaging analysis of human working memory[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95:12061—12068.
- [6] Veltman DJ, Rombouts SA, Dolan RJ. Maintenance versus manipulation in verbal working memory revisited: an fMRI study [J]. Neuroimage, 2003, 18: 247—256.
- [7] Danielsen ER, Ross B. Magnetic resonance spectroscopy diagnosis of neurological diseases [M]. New York: Marcel Dekker, 1999, 11—12.
- [8] 金真,臧云峰,张磊,等.儿童注意缺陷多动障碍的脑磁共振氢谱研究[J].中华放射科杂志,2002,36(6):541—543.
- [9] Ogawa S, Tank DW, Menon R, et al. Intrinsic signal change accompanying sensory stimulation: Functional brain mapping with magnetic resonance imaging [J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89:5951—5955.
- [10] Kwong KK, Belliveau JW, Chesler SA, et al. Dynamic magnetic resonance imaging of human brain activity during primary sensory stimulation [J]. Proc Natl Acad Sci, 1992, 89:5675—5679.
- [11] Mulert C, Gallinat J, Dorn H, et al. The relationship between reaction time, error rate and anterior cingulate cortex activity [J]. Int J Psychophysiol, 2003, 47:175—183.
- [12] Mulert C, Gallinat J, Pascual-Marqui R, et al. Reduced event-related current density in the anterior cingulate cortex in schizophrenia[J]. Neuroimage, 2001, 13:589—600.
- [13] 齐静,杜潮珂,栾国明,等.海马硬化MR质子波谱分析与MRI的对比研究[J].中华放射科杂志,2000,34:511—517.