

·基础研究·

生理性缺血训练促进心肌缺血模型 VEGF 表达的时间规律*

苏娟¹ 励建安^{1,2} 沈梅¹ 高晶¹

摘要 目的:研究等长收缩运动诱导的生理性缺血训练促进心肌缺血模型外周血 VEGF 表达的时间规律。方法:健康成年新西兰兔 23 只,体重 2.5 ± 0.5 kg。于坐骨神经外膜纵行植入电极,施加高强度脉冲电刺激(40Hz、1ms、2.5mA),诱发靶肌肉(腓肠肌)等长收缩运动,作为生理性缺血训练的模型;在冠状动脉左室支安装气囊梗阻器,制作可控性心肌缺血模型。造模成功后随机分为假手术组(SO)、单纯心肌缺血组(MI)和生理性缺血训练组(PI)。缺血负荷为 2min/h、2 次/d,共 4 周;PI 组为每次训练 5min,休息 5min,重复 8 次/d,共 4 周。各组分别于实验前和实验后第 1、2、3 和 4 周耳中动脉取血,采用 ELISA 技术检测血液中 VEGF 浓度。结果:SO 外周血 VEGF 各时间点差异无显著性意义($P>0.05$);MI 和 PI 实验后各时间点均较实验前表达升高($P<0.05$),第 2 周外周血 VEGF 的表达达到高峰,之后进入平台期。第 1、2、3、4 周各组两两比较差异均有显著性($P<0.05$)。结论:骨骼肌生理性缺血训练可以提高外周血 VEGF 的含量,在第 2 周达高峰,之后进入平台期,其 VEGF 升高超过单纯心肌缺血训练。

关键词 心肌缺血;生理性缺血训练;血管内皮生长因子

中图分类号:R541.4,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2008)-09-0774-03

The time patterns of circulating VEGF expression promoted by myocardial ischemia and physiological ischemic training/SU Juan,LI Jian'an,SHEN Mei,et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2008,23(9): 774—776

Abstract Objective:To determine the time course of circulating serum VEGF promoted by myocardial ischemia and physiological ischemic training. **Method:**Twenty-three New Zealand rabbits were subjected to brief occlusion of left ventricle coronary artery branch (LVB). The myocardial ischemia model was the LVB occlusion with a balloon occluder for 2min, repeated twice a day for 4 weeks. After myocardial ischemia models were successfully completed, electrode from a pulse electrical stimulator was anchored in sciatic nerve of hindlimb. The hindlimb underwent 5 min electrical stimulation (40Hz, 2.5mA) followed by 5min rest, which was repeated 8 times/d for 4 weeks. The subjects were randomly divided into sham operation group (SO), myocardial ischemia group (MI) and physiological ischemic training group (PI). Blood samples were collected at baseline and the 1st, 2nd, 3rd and 4th week from each group. Serum VEGF concentrations were measured using ELISA kit. **Result:**VEGF increased significantly in MI and PI, which reached peak at the end of 2nd week ($P<0.01$). Both MI and PI have no significant difference at the 2nd, 3rd and 4th week ($P>0.05$). The circulating serum VEGF level increased significantly in MI at all time points during experiment comparing with SO($P<0.01$). Serum VEGF in PI was higher than that in MI after physiological ischemic training ($P<0.05$). **Conclusion:**The peak VEGF expression occurred in the end of 2nd week after 4-week training in PI. Physiological ischemic training may increase the expression of circulating serum VEGF over the effect of pure myocardial ischemia.

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

Key words myocardial ischemia; physiological ischemic training; vascular endothelial growth factor

心血管疾病日益成为威胁人类健康的重要疾病,缺血性疾病的病理生理基础是血管储备降低,通过促进侧支循环生成来提高缺血性疾病的血管储备是国际研究的热点之一。参与侧支血管生成的因素中,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)特异性地诱导内皮细胞迁移、增殖^[1],是调节血管生成的相关因子中主要的细胞因子^[2]。研究表明急性运动后外周血 VEGF 表达增高^[3],心肌缺血后外周血 VEGF 也出现生成增加的变化^[4]。本课题提出生理性缺血训练的概念并进行了系列研究,目

前尚不清楚缺血训练对 VEGF 影响的时间规律。

本研究旨在探索等长收缩运动作为生理性骨骼肌缺血训练与心肌缺血刺激外周血 VEGF 表达及变化的时间规律,为进一步研究生理性缺血训练对缺血心肌侧支循环生成的作用提供基础。

* 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,南京广州路 300 号,210029

2 通讯作者

作者简介:苏娟,女,硕士研究生

收稿日期:2008-06-14

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年普通级新西兰兔 23 只, 体重 $2.5 \pm 0.5\text{kg}$, 由南京农业科学院畜牧兽医研究所提供。

1.2 心肌缺血动物模型制作

参照本课题组实验研究方法制作兔可控性心肌缺血模型^[5]。在冠状动脉左室支 (left ventricular branch, LVB) 安置气囊梗阻器。气囊充气时肉眼观察结扎部位以下 LVB 支配区心肌发绀, 心电图 II 导联监测出现心肌缺血改变; 抽气后发绀区心肌恢复正常颜色, 2min 后心电图恢复正常为气囊安置成功。

1.3 生理性缺血训练模型制作

经兔耳缘静脉缓慢推注 3% 戊巴比妥钠 (30mg/kg) 麻醉后, 随机选取一侧肢体, 将其俯卧, 备皮后消毒铺巾。坐骨结节下 1cm 作纵向切口, 钝性分离肌肉, 逐层暴露坐骨神经。用神经拉钩轻轻挑起较粗大的神经束, 持针器夹持电极丝 65° 斜角持续轻柔刺破神经外膜, 与神经长轴平行植入电极, 电极头端进入神经外膜 4—5mm, 用外科缝线于电极的弹簧起始部、中央及末端钩绕缝合固定至神经外膜。在操作中动作要轻柔, 缝合张力要适中, 以免卡压神经, 造成神经损伤。再将神经外部电极相连的导线与神经周围肌肉组织缝合固定, 参考电极植入神经周围肌肉缝合固定。将两电极及相连接的导线经皮下引至兔项背部, 导线头端的两个电极接头穿出皮肤, 缝合固定。缺血训练是采用高强度电刺激诱导靶肌肉最大等长收缩运动, 产生短暂的骨骼肌缺血。电刺激前后大隐静脉取血进行血乳酸测定, 刺激后血乳酸浓度从刺激前的 $0.85 \pm 0.17\text{mmol/L}$ 增加到 $4.87 \pm 0.77\text{mmol/L}$ ($P < 0.01$), 证明骨骼肌处于缺血缺氧状态, 视为模型制作成功。

1.4 动物分组

实验用兔 23 只, 因麻醉过量死亡 1 只, 心脏手术一侧胸膜破裂气胸死亡 1 只, 手术中发生室颤抢救无效死亡 1 只, 手术后气囊充气无相应心电图缺血表现和电刺激无相应肌肉收缩的各剔除 1 只, 其余 18 只随机入组, 分为假手术组 (SO), 单纯心肌缺血组 (MI) 和生理性缺血训练组 (PI), 每组各 6 只。假手术组除不进行心肌缺血和骨骼肌缺血刺激外, 其余操作同 PI。

1.5 心肌缺血方案

兔术后休息 7d, 从第 8 天开始进行心肌缺血刺激。气囊充气后, 心电图 II 导联出现相应的 ST 段抬高或压低的缺血表现, 抽气后 ST 段即恢复正常为一次缺血刺激。每次充气 2min, 1h 后行第 2 次缺血刺激, 2 次/d, 连续四周, 每周 1—2 次心电图监测, 观察

气囊充气兔缺血情况。

1.6 生理性缺血训练方案

兔术后休息 7d, 从第 8 天开始进行训练。在气囊充气完成一次心肌缺血刺激后, 即施加电刺激使腓肠肌产生等长收缩运动。将弹簧秤与胫骨垂直方向钩于足部, 电流强度逐渐增加, 直到弹簧秤显示力量不再增加, 作为腓肠肌最大等长收缩运动的标志 (电流强度 2.5mA)。每次电刺激 5min, 休息 5min, 重复 8 次/d, 连续 4 周。

1.7 标本采集

MI 和 PI 于实验前 (0 周), 实验后 1、2、3 和 4 周这 5 个时间点取血, SO 在相同的时间点取血。分别于刺激结束后 6h 兔耳中动脉取血 4ml, 注入 5ml 分离胶促凝管中, 静置 20min 后以 3000r/min 速度离心 10min, 取血清分装标记后液氮保存送检。

1.8 ELISA 测定血清 VEGF

使用 Rabbit VEGF kit (BPD Biomedicals, Inc, USA), 依照次序各加 100 μl 标准品于酶标板的空白微孔中作为对照, 同时各加入 100 μl 的样品于空白微孔中。随即加入 50 μl 的酶标记溶液于标准品孔和样品孔中。轻轻摇动酶标板以混匀微孔反应液, 于 37℃ 孵育反应 60min。反应完毕后洗板, 甩净板内液体, 于吸水纸上静置 15s, 重复洗板 5 次。每孔加入呈色剂 A、B 液各 50 μl , 轻轻摇动酶标板混匀 5s, 于 37℃ 避光孵育反应 15min。反应完毕后于每孔中加入 50 μl 终止液终止反应, 混匀 30s。30min 内于酶标仪 (CliniBio 128C, Austria) 在 450nm 处读取 OD 值。以 B/B₀% 值 (B=标准品 OD 值, B₀=标准品 0 点 OD 值) 为纵坐标, 标准品浓度为横坐标绘制标准曲线, 由标准曲线得出对应血清样品的 VEGF 浓度值。

1.9 统计学分析

采用 SPSS10.0 统计软件进行方差分析检验 3 组之间 VEGF 表达的差异; 单因素方差分析分析组内不同时间点表达的差异。

2 结果

三组各时间点血清 VEGF 的浓度数值见表 1。组内比较: SO 组各时间点无显著差异 ($P > 0.05$); MI 组 1、2 周后比实验前 VEGF 的表达水平明显升高 ($P < 0.01$), 2、3、4 周间无显著性差异 ($P > 0.05$); PI 组 1、2 周后 VEGF 较实验前有显著差异 ($P < 0.01$), 2、3、4 周比较无显著差异 ($P > 0.05$)。组间比较: 实验前各组两两比较无显著差异 ($P > 0.05$); 第 1、2、3、4 周各组两两比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。实验后各时间点的表达 MI 组明显高于 SO, PI 组显著高于 MI。

表1 外周血液 VEGF 浓度变化的时间规律

($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

组别	动物数	0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
SO	6	73.07±11.35	71.18±9.21	72.77±12.69	63.61±9.01	71.44±9.00
MI	6	76.68±9.95	114.13±8.70 ^①	186.73±19.02 ^{①③}	181.84±22.71 ^①	187.25±18.68 ^①
PI	6	80.74±8.69	218.18±17.96 ^②	264.61±14.60 ^{②③}	251.05±26.28 ^②	242.98±20.75 ^②

①MI 与 SO 比较, $P < 0.01$; ②PI 与 MI 比较, $P < 0.05$; ③实验 2 周后与 0、1 周比较, $P < 0.01$

3 讨论

课题组前期研究确定了造成最大侧支开放的最小缺血负荷是 2min, 缺血频率是 2 次/d^[6-7], 并且发现持续 4 周的单纯心肌缺血可显著提高缺血区心肌 VEGF 表达^[8]。如果骨骼肌短暂缺血训练促进缺血组织侧支循环生成增加, 从而改善组织缺血, 提高血管储备, 将具有重要意义。本研究的目的就是证明等长收缩运动诱导的骨骼肌生理性缺血训练与心肌缺血刺激血液 VEGF 表达的时间规律。

有研究表明超过 30% 的最大自主收缩强度的等长收缩运动可以导致不同程度的短暂血流阻断^[9-10]。本研究采用最大等长收缩运动, 以期达到最大程度的血流阻断。乳酸是糖酵解的代谢产物, 乳酸蓄积是组织缺血、缺氧极为敏感的指标, 因此血乳酸测定可以反映组织氧供和代谢状态以及灌注量不足。我们在预实验确认电刺激后血乳酸显著升高, 证明骨骼肌处于缺血缺氧状态, 可以作为短暂缺血训练的模型。

Adams 等^[11]的研究显示急性运动诱导的冠心病患者心肌缺血后外周血 VEGF 于 2—6 h 升高。本研究发现 MI 在进行缺血刺激后外周血 VEGF 表达较 SO 显著升高, PI 较 MI 显著升高, 提示单纯心肌缺血刺激和生理性骨骼肌缺血训练均可以诱导外周血 VEGF 的表达。并在 2 周达高峰, 之后进入平台期。这与研究报道有氧训练后血液 VEGF 表达存在时间规律一致^[12]。

有研究报道单次心肌缺血后 VEGF 在达到高峰表达后数小时迅速下降^[11]。但是本实验证明, 反复的病理性心肌缺血和生理性骨骼肌缺血训练, 都可以诱导 VEGF 在 1 周后表达升高, 2 周后较 1 周进一步升高, 之后进入平台期。这一结果提示每天进行反复心肌缺血和生理性缺血训练的刺激, 可以使 VEGF 保持较高的水平, 从而发挥促进侧支血管生成的作用。

此外本研究骨骼肌生理性缺血训练后每周 VEGF 的表达显著高于心肌缺血组, 表明生理性缺血训练对 VEGF 的表达有超越心肌缺血刺激的独立作用, 提示生理性缺血训练对于远隔的病理性缺血组织侧支循环的形成有远隔效应。

本研究提示生理性缺血训练促进心肌缺血模型

VEGF 表达的独立意义和时间规律。同时生理性缺血训练只造成骨骼肌短暂缺血, 因此安全性极好。骨骼肌等长收缩运动是日常生活中常用的动作之一, 它作为生理性缺血训练模型的最大价值是安全、有效和临床应用方便。进一步深入研究将有可能开创冠心病康复治疗的新途径。

本研究的主要局限是没有对骨骼肌、血液和心肌的 VEGF 进行示踪研究。因此对于血液和心肌 VEGF 的升高是否来源于骨骼肌尚无法最后定论。但是生理性缺血训练对外周血 VEGF 形成的作用超越了单纯心肌缺血训练, 这个附加作用充分提示其物质基础是来自于骨骼肌缺血刺激。具体机制的阐明有待于进一步的深入研究。

参考文献

- [1] Koch AE, Harlow LA, Haines GK, et al. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis[J]. J Immunol, 1994, 152(8): 4149—4156.
- [2] Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, et al. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum: mechanism of the omentum-mediated angiogenesis[J]. J Surg Res, 1997, 67(2): 147—154.
- [3] Kraus RM, Stallings HW III, Yeager RC, et al. Circulating plasma VEGF response to exercise in sedentary and endurance-trained men[J]. J Appl Physiol, 2004, 96(4): 1445—1450.
- [4] Liou JY, Shyu KG, Lu MJ, et al. Pericardial fluid and serum levels of vascular endothelial growth factor and endostatin in patients with or without coronary artery disease[J]. J Formos Med Assoc, 2006, 105(5): 377—383.
- [5] 王骏, 金挺剑, 励建安. 兔可控性心肌缺血模型的建立[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(5): 327—328.
- [6] 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.
- [7] 王骏, 励建安, 金挺剑, 等. 心肌缺血日负荷对新西兰兔血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2005, 20(3): 165—168.
- [8] 顾劲扬, 励建安, 王元会, 等. 心肌缺血周负荷对兔心肌血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(2): 99—102.
- [9] Richardson D. Blood flow response of human calf muscles to static contractions at various percentages of MVC [J]. J Appl Physiol, 1981, 51(4): 929—933.
- [10] Osada T, Katsumura T, Murase N, et al. Post-exercise hyperemia after ischemic and non-ischemic isometric handgrip exercise [J]. J Physiol Anthropol Appl Human Sci, 2003, 22(6): 299—309.
- [11] Adams V, Lenk K, Linke A, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(4): 684—690.
- [12] Laufs U, Werner N, Link A, et al. Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis [J]. Circulation, 2004, 109(2): 220—226.