

·基础研究·

间歇运动训练对缺血再灌注损伤大鼠心脏的保护作用*

彭峰林^{1,2} 陆燕玲² 张 林¹ 陈德权³ 邓树勋⁴

摘要 目的:探讨间歇运动抗心脏缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用。方法:32只大鼠随机分成4组:间歇运动训练组、一次间歇运动组、对照组和假手术组,缺血再灌注模型制备前,间歇运动训练组进行高强度间歇运动训练,一次间歇运动组仅进行一次高强度的间歇运动,对照组不运动。采用结扎大鼠左冠状动脉方法制备在体大鼠心肌缺血再灌注损伤模型,实时监控心电图和左心室收缩功能并进行分析。缺血30min、再灌注40min后检测血清心肌酶含量,取心肌组织进行病理切片分析。结果:①经间歇运动训练和一次间歇运动预处理的大鼠心肌损伤比对照组轻,间歇运动训练组更为明显;②经间歇运动训练和一次间歇运动预处理的大鼠,血清CK和LDH明显低于对照组,且间歇运动训练组的GOT明显低于对照组;③经间歇运动训练和一次间歇运动预处理的大鼠在缺血30min和再灌注40min时心脏功能明显高于对照组。结论:长期高强度间歇运动训练及短时间高强度间歇运动都具备预处理效应,能对缺血再灌注大鼠心肌产生保护作用。

关键词 间歇运动;缺血再灌注损伤;心脏保护作用

中图分类号:R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2009)

The cardioprotective effect of intermittent exercises on ischemia-reperfusion rats' myocardium/ PENG Fenglin, LU Yanling, ZANG Lin, et al. // Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2009,

Abstract **Objective:**To explore the cardioprotective effect of chronic and acute intermittent exercises training on myocardial ischemia reperfusion injury. **Method:**Thirty-two rats were used and randomly divided into four groups: chronic intermittent exercises training group (CIE, n=8), acute intermittent exercises group (AIE, n=8), control group (C, n=8) and sham operated group (S, n=8). The rats in CIE performed high intensity intermittent training for 8 weeks, the rats in AIE performed high intensity intermittent training only one time. The others had not any exercises training. Myocardial ischemia reperfusion injury was induced by the occlusion of left anterior descending branch of coronary artery in vivo. Electrocardiogram and left ventricular function were real-time monitored and analysed. After 30min ischemia and 40min reperfusion, activity of myocardial enzymes in plasma was observed and myocardial pathological changes was analysed. **Result:** ①Extents of myocardial injury in CIE and AIE were less than that in control group, especially in CIE. ②In CIE and AIE, activities of CK and LDH were remarkably lower than that in control group; and activities of GOT in AIE were remarkably less than that in control group. ③At the duration of ischemia 30min and reperfusion 40min the rats' cardiac function in CIE and AIE was significant higher than that in control. **Conclusion:** Both chronic and acute high intensity intermittent exercises training can induce preconditioning effect and effectively protect myocardium from ischemia-reperfusion injury.

Author's address School of Physical Education, Suzhou University, Suzhou, 215021

Key words intermittent exercises; ischemia reperfusion injury; cardioprotective effect

在缺血预适应研究中发现,一些酶的合成增加、活性增高是延迟预处理的重要机制之一^[1-2],激活内源性保护机制也是缺血预适应的重要环节^[3]。而运动实验研究表明:运动也会诱导这些酶的表达增加^[4],启动一些内源性保护机制^[3],这表明运动可能产生类似缺血预适应的效应。间歇运动是一种积极性休息的重复运动,是竞技运动训练和健身的主要运动方式,本实验采用间歇运动为干预方式,来证实高强度间歇运动训练和一次高强度间歇运动是否具有抗心肌缺血再灌注损伤的延期保护作用,以期临床康

复和运动实践提供依据。

1 材料与方法

* 基金项目:广西师范大学博士科学研究基金

1 苏州大学体育学院,苏州,215021

2 广西师范大学体育学院

3 漳州师范学院体育系

4 华南师范大学体育科学学院

作者简介:彭峰林,男,副教授,博士,博士后

收稿日期:2008-12-18

1.1 仪器与试剂

小动物跑台(DSPT202, 杭州立泰), BL-生物机能实验系统(重庆泰盟科技), 小动物呼吸机(HX-300, 重庆泰盟科技), 722 分光光度计(上海精密科学仪器公司), 常规免疫组化仪器。

肌酸激酶(creatine phosphokinase, CK)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、谷草转氨酶(glutamic-oxaloacetic transaminase, GOT)和双缩脲法蛋白定量试剂盒均由南京建成公司提供, 其余试剂均采用国产分析纯。

1.2 实验动物

3 月龄清洁级雌性 SD 大鼠, 体重 180—220g, 由中山大学动物实验中心提供, 动物合格证号: 2004A060。控制室温和湿度, 动物自由饮食和进水。

1.3 方法

1.3.1 运动模型建立(参考并改良于 Bowles 等^[9]): 32 只 SD 大鼠, 随机分为 3 组: 间歇运动训练组 8 只、一次间歇运动组 8 只、对照组 16 只。间歇运动训练组: 第 1 周为适应阶段, 由 20m/min、0°、5min/d 开始跑台运动, 后逐渐增加强度和运动时间。第 2 周开始进行间歇运动训练; 运动期运动强度为 50m/min, 间歇期采用活动性休息, 强度为 16m/min, 16m/min 和 50m/min 各运动 2min, 重复 10 次, 坡度为 5°, 45min/d(包括 5min 热身运动), 每周训练 5d, 共训练 7 周。训练结束后 24h 制备心肌缺血再灌注损伤模型。

一次间歇运动组: 运动期运动强度为 50m/min, 间歇期采用活动性休息, 强度为 16m/min, 16m/min 和 50m/min 各运动 2min, 重复 10 次, 坡度为 5°, 45min(包括 5min 热身运动), 训练 1 次, 训练结束后 24h 制备心肌缺血再灌注损伤模型。

对照组大鼠常规饲养, 不进行运动。

1.3.2 在体心脏 I/R 模型制备: 将对照组分为假手术组(sham, n=8)和缺血再灌注组(control, n=8), 后一组同间歇运动训练组(CIE, n=8)和一次间歇运动组(AIE, n=8)均进行在体缺血再灌注实验。缺血再灌注大鼠术前 12h 禁食, 不限饮水, 以乌拉坦(0.65g/kg)腹腔麻醉后固定于动物解剖台上。分离气管, 气管插管, 连接动物呼吸机支持呼吸, 频率 70 次/min, 潮气量 8ml/次, 将针形电极插入四肢皮下, 连接心电图机, 接通生物信号分析系统, 记录标准导联心电图。经胸骨左缘 2—4 肋开胸, 剪开心包, 暴露心脏及左室表面血管, 以左冠状动脉主干为标志, 在左心耳根部下方 2mm 处进针, 5/0 结扎线穿过心肌表层在肺动脉圆锥旁出针, 在结扎线两端分别套入丝线环

作为再灌注拉线, 收紧结扎线以造成心肌缺血, 牵拉再灌注拉线使结扎线放松后即行再灌注, 以收紧结扎线后心电图 S-T 段抬高放松结扎线后 S-T 段下降 1/2 以上为模型成功, 关闭胸腔。缺血 30min, 开胸再灌注 40min。假手术组大鼠开胸穿线但不结扎冠状动脉, 其他操作同缺血再灌注组大鼠。

1.3.3 心功能指标测定: 颈动脉插入导管进入左心室, 外接压力感受器, 与生物信号分析系统相连, 经分析记录动脉血压(blood pressure, BP), 左心室收缩压峰值(left ventricular systolic pressure, LVSP), 左室舒张末压(left ventricular end diastolic pressure, LVEDP), 心率(heart rate, HR), 左室内压发展最大速率($\pm dp/dt_{max}$)。

1.3.4 心肌组织病理分析: 经缺血再灌注后, 取大鼠心肌修剪后切成小块, 迅速放入 10% 甲醛中固定 24—48h。组织块依次经过 60% 乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇、无水乙醇、50% 二甲苯+50% 乙醇、二甲苯脱水, 在包埋机上进行石蜡包埋。经修块、切片、捞片、捞片后, 在全自动染色机上进行常规苏木精-伊红(HE)染色。中性树胶封片, 在显微照相系统下观察拍照。

1.3.5 血清心肌酶指标测试: 缺血再灌注结束后腹腔采血, 待血液自然凝固后, 以 3000 转/min 离心 15min, 取血清。CK、LDH 和 GOT 均采用比色法测定, 操作方法按试剂盒说明进行。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料均以均数 $\pm$ 标准差表示。多组间比较采用方差分析及多组均数的两两比较。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异标准。

2 结果

2.1 大鼠心肌组织病理切片比较

HE 染色后光镜检查结果显示, 假手术组心肌形态学无明显改变, 肌纤维完整, 心肌细胞形态规则, 胞核多呈纺锤形; 对照模型组心肌纤维排列不规则, 结构紊乱, 呈波浪样变性, 局部横纹消失, 大范围肿胀、断裂、坏死融合, 并可见明显出血灶及较多的中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophil, PMN)浸润。间歇运动训练模型组和一次间歇运动模型组心肌病理性变化程度都较模型组减轻。间歇运动模型组可见心肌细胞水肿及 PMN 浸润, 炎性细胞浸润较模型组轻, 心肌受损的程度也进一步下降。一次间歇运动模型组可见点状的心肌细胞坏死, 并见心肌细胞水肿变性和 PMN 浸润(图 1, 见彩色插页)。

2.2 大鼠血清心肌酶的比较

经 30min 的缺血和 40min 的再灌注后, 对照模型组与对照假手术组相比, 血清中肌酸激酶、乳酸脱氢酶和谷草转氨酶的活性均显著升高 ($P<0.01$); 间歇训练缺血模型组的 CK、LDH 和 GOT 活性显著低于对照缺血模型组 ($P<0.01$); 一次间歇运动模型组大鼠血清中 CK 和 LDH 活性显著低于对照组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而 GOT 没有显著变化 (见表 1)。

2.3 大鼠心脏机能指标比较

缺血前、缺血和再灌注过程中全程监测大鼠的心率 (HR)、左心室收缩峰值 (LVSP)、左心室舒张

末压 (LVEDP)、收缩期左室内压上升最大速率 (+dp/dtmax)、舒张期左室内压下降最大速率 (-dp/dtmax), 取安静时、缺血 30min 和再灌注 40min 时上述指标进行组间比较, 结果见表 2—4。

表 1 大鼠血清心肌酶的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	CK (U/ml)	LDH (U/L)	GOT (卡门单位/ml)
假手术组	8	0.58±0.18	7030.10±545.32	7.83±1.51
对照组	8	1.26±0.11 ^③	8660.78±192.37 ^③	14.44±1.79 ^③
CIE 组	8	0.99±0.22 ^②	7883.42±428.15 ^②	11.71±3.02 ^①
AIE 组	8	1.10±0.13 ^①	8216.47±261.53 ^②	14.65±2.58

缺血再灌注模型组间比较, 与对照模型相比^① $P<0.05$, ^② $P<0.01$; 对照模型组与假手术组比较, ^③ $P<0.01$ 。

表 2 大鼠心率和左室内压力变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	心率 (beats/min)			左心室收缩峰值 (mmHg)			左心室舒张末压 (mmHg)		
		0min	缺血 30min	再灌注 40min	0min	缺血 30min	再灌注 40min	0min	缺血 30min	再灌注 40min
假手术组	8	352.5±53.96	351.67±34.58	356.83±23.56	126.69±9.68	122.22±2.59	121.84±10.21	5.46±2.88	6.22±2.59	7.78±1.70
对照组	8	325.13±83.07	367.75±24.94	349.00±29.44	128.43±4.41	102.61±9.25 ^③	100.03±10.90 ^③	5.16±4.82	12.75±3.09 ^③	13.63±6.46 ^③
CIE 组	8	331.13±75.01	352.63±35.57	329.00±45.77	126.52±3.19	114.21±4.65 ^②	113.03±7.08 ^①	2.19±1.85	5.91±2.21 ^②	6.49±2.87 ^①
AIE 组	8	319.87±43.02	375.75±19.37	359.13±19.46	128.49±12.23	113.45±9.76 ^①	111.83±13.56	4.50±4.19	12.21±6.31 ^①	11.60±5.56

缺血再灌注模型组间比较, 与对照模型相比^① $P<0.05$, ^② $P<0.01$; 对照模型组与假手术组比较, ^③ $P<0.01$ 。

表 3 大鼠收缩期左室内压上升最大速率 ($\bar{x}\pm s$, mmHg/ms)

组别	鼠数	0min (mmHg/ms)	缺血 30min (mmHg/ms)	缺血 30 分时下降率 (%)	再灌注 40min (mmHg/ms)	再灌注 40min 时下降率 (%)
假手术组	8	4.87±1.09	4.29±0.97	11.07±4.62	4.06±0.69	14.82±9.04
对照组	8	4.89±0.65	2.68±1.06 ^③	44.51±9.65 ^④	2.90±0.71 ^③	38.73±13.78 ^③
CIE 组	8	6.37±1.15 ^②	5.63±1.78 ^②	18.44±2.31 ^②	5.15±1.50 ^②	26.46±11.03 ^①
AIE 组	8	4.84±2.10	3.81±1.69	21.24±3.41 ^①	3.57±0.70 ^①	27.38±13.06 ^①

缺血再灌注模型组间比较, 与对照模型相比^① $P<0.05$, ^② $P<0.01$; 对照模型组与假手术组比较, ^③ $P<0.05$, ^④ $P<0.01$ 。

表 4 大鼠舒张期左室内压下降最大速率 ($\bar{x}\pm s$, mmHg/ms)

组别	鼠数	0min (mmHg/ms)	缺血 30min (mmHg/ms)	缺血 30 分时下降率 (%)	再灌注 40min (mmHg/ms)	再灌注 40min 时下降率 (%)
假手术组	8	3.67±0.41	3.44±0.65	5.49±4.13	3.40±0.67	7.34±2.88
对照组	8	3.74±0.48	2.11±0.24 ^③	37.13±8.87 ^④	2.12±0.28 ^③	41.12±7.67 ^④
CIE 组	8	5.47±0.29 ^②	4.60±0.38 ^②	16.74±3.21 ^①	4.41±0.32 ^②	19.71±3.14 ^①
AIE 组	8	4.52±0.47	3.92±0.55 ^①	14.66±5.13 ^①	3.22±0.38 ^①	27.04±2.23 ^①

缺血再灌注模型组间比较, 与对照模型相比^① $P<0.05$, ^② $P<0.01$; 对照模型组与假手术组比较, ^③ $P<0.05$, ^④ $P<0.01$ 。



A: 对照组

B: 假手术组

C: CIE 组

D: AIE 组

图 1 心肌组织病理学切片 (HE 染色)

3 讨论

3.1 间歇运动减少缺血再灌心肌损伤

本实验采用了高强度间歇运动训练和一次高强度间歇运动的预处理方法^[9], 在体观察运动预处理后对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用。组织病理学切片结果显示, 缺血 30min、再灌注 40min 后, 各缺血再灌注模型组大鼠心肌均出现明显形态学改变, 如心肌纤维出现结构紊乱、横纹消失、胞体肿胀、坏死融合、中性粒细胞浸润。但心肌损伤以安静对照组最为严重, 一次间歇运动训练次之, 间歇运动训练组大

鼠心肌损伤最轻。肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH) 和谷草转氨酶 (GOT) 是检测急性心肌梗死和损伤的标志酶, 在正常情况下, 血清中这些酶的活性远比组织中低 (约 1000 倍), 在细胞膜结构改变、完整性破坏和通透性增加时, 可由细胞内大量渗出, 检测血清中 CK、LDH 和 GOT 的含量可间接反应细胞膜的受损程度^[9]。实验结果显示: 缺血再灌注后对照模型组大鼠血清中 CK、LDH 和 GOT 的活性显著高于对照假手术组。与对照缺血再灌注模型组相比, 间歇运动训练模型组血清中 CK、LDH 和 GOT 的活性

显著降低, 一次间歇运动模型组大鼠血清中 CK 和 LDH 活性显著低于对照模型组, 而 GOT 没有显著变化。由组织切片和血清心肌酶学指标提示: 间歇运动训练和一次间歇运动练习都对缺血再灌注心肌产生了保护作用, 具有预处理效应。

3.2 间歇运动保护缺血再灌注损伤心脏的功能

检查心肌收缩功能的指标有心输出量(SV)、射血分数(EF)、心室功能曲线、心肌收缩成分缩短速度(V_{ce})、左心室收缩峰值(LVSP)、收缩期左室内压上升最大速率($+dp/dt_{max}$)等, 本实验采用 LVSP 和 $+dp/dt_{max}$ 来评定在体缺血再灌注心脏的收缩机能。LVSP 指左心室收缩时, 室内压达到的最高值, LVSP 大则表示心肌的收缩力强。 $+dp/dt_{max}$ 主要受心肌收缩性的影响, 是动物实验和人体插管时评定心肌收缩性能的最常用指标, $+dp/dt_{max}$ 增高反应心肌收缩性增强, $+dp/dt_{max}$ 下降表明心肌收缩性能受损^[7]。检查舒张功能的指标有左心室舒张末压 (LVEDP)、舒张时左室内压下降最大速率($-dp/dt_{max}$)、等容舒张时间室内压下降的时间常数(T)、充盈量、充盈速度和充盈分数等。本实验应用 LVEDP 和 $-dp/dt_{max}$ 评定缺血再灌注过程中心脏的舒张功能。LVEDP 表示左心室的前负荷, 反映左心室的舒张功能和顺应性。 $-dp/dt_{max}$ 是反映心脏舒张功能最敏感的指标^[8]。

实验结果显示: 急性心肌缺血/再灌注后, 左心室的收缩功能和舒张功能均下降, 但间歇运动训练和一次间歇运动对心肌的收缩功能和舒张功能有保护作用, 表现为经间歇运动预处理大鼠心脏的 LVSP、LVEDP 和 $\pm dp/dt_{max}$ 在缺血 30min 和再灌注 40min 时均显著高于对照组大鼠, 以间歇运动训练组尤为突出。心肌缺血时功能下降的可能原因有: 心肌收缩成分破坏、心肌能量供应不足、肌浆网摄取钙的能力下降、酸中毒等; 再灌注时心肌舒缩功能下降的可能原因有: 能量代谢障碍、自由基对细胞的损伤、钙超载、白细胞介导的损伤等^[9-10]。间歇运动训练使心脏形态结构发生适应性变化, 出现运动性肥大心肌, 其特征是心肌肌球蛋白 MHC 由 ATPase 活性低的 β 型向 ATPase 活性高的 α 型转变, 毛细血管增生, 毛细血管与肌纤维的比值合理, 非心肌细胞的生长与心肌细胞的生长匹配, 心脏顺应性增加^[11-15]。经过高强度间歇运动训练干预的心脏在缺血再灌注时抗损伤能力提高的可能机制是: 抗氧化防御能力增强, 因而加强了收缩成分的保护; 毛细血管的增生, 有利于氧供, 从而改善心肌的能量供应; 启动了其他一些内源性保护机制, 使细胞

的调节功能更为精确和完善。一次高强度间歇运动也能加强大鼠心脏缺血再灌注时的保护, 其可能机制与内源性保护机制的激活有关, 如内源性保护因子合成增加, 相关受体激活等。

通过结扎大鼠心脏冠状动脉前降支, 制造了在体缺血再灌注损伤心脏模型。经 30min 缺血和 40min 再灌注后, 观察心肌组织形态变化、血清心肌酶及心脏机能指标, 经高强度间歇运动训练和一次高强度间歇运动预处理后, 缺血再灌注心脏的心肌损伤减少, 功能损失降低。证实了高强度间歇运动训练和一次高强度间歇运动对大鼠心脏缺血再灌注损伤的延迟保护作用, 其中高强度的间歇运动训练对心脏的保护作用更为明显。

参考文献

- [1] Bolli R. The late phase of preconditioning [J]. *Circ Res*, 2000, 87: 972—983.
- [2] Pagliaro P, Gattullo D, Rastaldo R, et al. Ischemic preconditioning: from the first to the second window of protection[J]. *Life Sciences*, 2001, 69: 1—15.
- [3] Starnes JW, Taylor RP. Exercise-induced cardioprotection: endogenous mechanisms [J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2007, 39(9): 1537—1543.
- [4] Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, et al. Regulation of the vascular extracellular superoxide dismutase by nitric oxide and exercise training[J]. *J Clin. Invest*, 2000, 105: 1631—1639.
- [5] Bowles DK, Farrar RP, Starans. JW. Exercise training improves cardiac function after ischemia in the isolated, working rat heart[J]. *Am. J. Physiol*, 1992, 263: H804—H809.
- [6] Meune C, Martins E, Fulla Y, et al. New biological markers for acute coronary artery disease [J]. *J Mal Vasc*, 2003, 28(5): 251—257.
- [7] Schiller NB, Foster E. Analysis of left ventricular systolic function[J]. *Heart*, 1996, 75(6 Suppl 2): 17—26.
- [8] Yamamoto K, Redfield MM, Nishimura RA. Analysis of left ventricular diastolic function[J]. *Heart*, 1996, 75(6 Suppl 2): 27—35.
- [9] Bull DA, Maurer J. Aprotinin and preservation of myocardial function after ischemia-reperfusion injury[J]. *Ann Thorac Surg*, 2003, 75(2): S7352—9.
- [10] 罗真春, 凌宗秀. 心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2004, 20(11): 970—971.
- [11] Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(2): 193—201.
- [12] Holubarsch C, Goulette RP, Litten RZ, et al. The economy of isometric force development, myosin isoenzyme pattern and myofibrillar ATPase activity in normal and hypothyroid rat myocardium[J]. *Circulation Research*, 1985, 56: 78—86.
- [13] Schaub, Marcus C. Expression and localisation of myosin light chain kinase and phosphatase in cardiac development and hypertrophy [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2002, 4(6): A56—62.
- [14] Motoyuki I, Takashi M, Seiji M, et al. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat [J]. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physio*, 2001, 1281: R2029—R2036.
- [15] Anversa Piero, Leri Annarosa, Kajstura Jan, et al. Myocyte Growth and Cardiac Repair [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2002, 34(2): 91—105.