

· 基础研究 ·

不同负荷游泳运动对小鼠心电活动和心肌血管内皮细胞生长因子表达的影响

刘 浩¹

摘要

目的:探讨三种不同负荷对小鼠的心电活动、心肌组织中血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达以及体重的影响。

方法:雄性2月龄昆明小鼠30只,适应性喂养1周后,随机平均分为静养对照组、120min组、120min+负重组,对训练组进行游泳训练,观察各组的体重改变。训练完成后,连续监测、记录ECG各值,完成后取其心脏处理后观察VEGF的表达。利用IMAGE PRO PLUS 5.1图像分析软件测量面积比,心电活动主要测量心率、P-R间期、P波时程、P波幅度、P-R段、QRS波群时程、QRS波群峰峰值、T波时程、T波幅度及Q-T间期。

结果:三组小鼠中120min+负重组随着训练时间的延长而逐渐不能顺利地完成任务,游完后都筋疲力尽;而其他两组的小鼠活动状态一直较好。三组小鼠在8周的训练时间里,饮水和进食较好,体重一直呈现上升的趋势。静养对照组VEGF表达为阴性;120min组表达为弱阳性;120min+负重组表达为阳性。P-R间期、P波时程、P波幅度、P-R段影响显著;QRS波群时程、QRS波群峰峰值、T波时程、T波幅度及Q-T间期影响不显著。

结论:运动强度和心脏的功能性代偿能力增强是成正比的,此结果为心脏康复中运动训练负荷的影响提供了试验依据。

关键词 运动负荷;小鼠;心电活动;心肌;血管内皮细胞生长因子

中图分类号:R318,R493 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2010)-07-0650-05

Effects of swimming with different loads on electrocardioactivity and myocardial vascular endothelial cell growth factor in mouse/LIU Hao//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine,2010,25(7):650—654

Abstract

Objective:To investigate the effects of swimming with three different loads on vascular endothelial cell growth factor(VEGF) expressions in mice myocardium, electrocardioactivity and bodyweight.

Method:As experimental objects, after 1 week feeding adaptation 30 Kunming male mice were divided into 3 groups randomly: control group, 120min group and 120min+burdened group. After completing swimming training, mice hearts were removed and stained by HE and immunochemical technique. The changes of body weight and VEGF expression in mice myocardium were observed. IMAGE PRO PLUS 5.1 image analysis software was used to measure area ratio. In electrocardioactivity observation, heart rate, P-R interval, duration of P, amplitude of P, durations of P-R segment and QRS complex, QRS complex peak, duration of T, amplitude of T and Q-T interval were measured.

Result: With the prolongation of training time 120min+burdened group could not complete the tasks smoothly gradually, and displayed exhaustively after training. In the other two groups activities of mice were better. In eight weeks training three groups all drank and ate better, and their body weight showed an upward trend. The control group displayed negative VEGF expression, 120min group displayed weak positive expression and 120min+burdened group displayed positive recombinant expression. The effects on P-R interval, duration of P, amplitude of P and duration of P-R segment were significant;and the effects on QRS complex, QRS complex peak, duration of T,

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2010.07.009

1 河南科技大学医学院解剖学与组织胚胎学教研室,河南洛阳,471003

作者简介:刘浩,男,讲师;收稿日期:2009-06-14

amplitude of T and Q-T interval were not significant.

Conclusion: The ability of functional compensation of heart is directly proportional to the intensity of exercises training. This study provide experimental evidence for the effects of exercises training load in cardiac rehabilitation.

Author's address Dept. of Anatomy and Histology, Medical College, Henan University of Science and Technology, Luoyang Henan, 471003

Key words exercises load;mouse;electrocardioactivity;myocardium;vascular endothelial cell growth factor

长时间的力竭游泳运动可以导致多项生理功能的改变,少有对其心电活动研究的报道。本文分析小鼠力竭游泳后的心电改变,通过免疫组化手段来了解运动后小鼠心肌的改变状况。在参照艾洪滨等^[1]对正常小鼠的宽频带心电图的研究以及步斌^[2]的运动负荷与沙棘对大鼠心肌血管内皮生长因子表达影响的研究之后,采用游泳方法建立小鼠运动模型,观察不同运动负荷使小鼠心肌从形态到功能发生的改变,为非病理状态下研究血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial cell growth factor,VEGF)提供了一条与体育运动科学研究结合的道路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组:取2月龄雄性昆明小鼠30只,每只体重约 (34 ± 1.87) g(由湖北省实验动物研究中心提供),国家标准啮齿类动物饲料饲养,室温 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $51\%\pm 4\%$,每天光照8h。适应性喂养1周后,随机分为3组,每组10只。

1.1.2 实验仪器和主要试剂:常规手术器械,自制塑料水池(150cm $\times$ 32cm $\times$ 80cm),切片机(LAICA,德国),隔水式电热恒温培养箱(上海),机械不锈钢烧烤微波炉,光学显微镜(OLYMPUS,日本),图像分析系统(IMAGE PRO PLUS 5.1,美国)。免疫组化主要试剂:VEGF抗体(一抗、二抗)(武汉博士德公司),免疫组化SP试剂盒(武汉博士德公司),DAB(武汉博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立:首先确定此批小鼠的运动能力,随机选取一只小鼠测试其无负重时的游泳时间为3h;再分别以体重的2%、5%、8%的负重测试其游泳时间,以力竭为标准(力竭判断标准为小鼠沉入水底10s不浮起,无法完成翻正反射),分别为150min、120min、110min,以此作为标准,力竭时运动

量的67%为中等强度,100%为大强度。结合张志琪所作实验^[3],确定游泳时间为2h,尾部负体重的5%。随后以无强度、中等强度和大强度将小鼠随机分成三组。静养对照组:平时不运动,饲养条件与另外两组相同,每当另两组小鼠训练时,此组小鼠也放入温度相同的浅水中,浸泡2h。120min组:水深25cm,水温 $32\pm 1^{\circ}\text{C}$,每周训练6d,每天训练1次。第一次下水10min,此后逐日累加,到第一周末时游泳时间达到1h/d,第二周末达到2h/d,以后维持这一运动强度直至第8周。以光滑玻璃棍对小鼠进行驱赶。120min+负重组:与120min组训练条件和方法相同,在同一时间放入水中,小鼠负重5%体重,2h不间断运动,结束后即刻用毛巾擦干。

1.2.2 心电图监测记录、取材及标本制备:选用水合氯醛作为麻醉剂(0.2ml/10g),经由腹腔给药对小白鼠实施全身麻醉,在其四肢皮下各穿一根银针,为导联电极,连接生物功能实验系统,记录II或者aVF导联,持续12min的ECG信号的监测、记录。恢复知觉后即刻活体解剖,打开胸腔,心室上做“十字形切口”,切断大动静脉,取出心脏,放入4%多聚甲醛中固定。标本固定2h后,经阶梯式浓度酒精进行脱水,脱水后经两次二甲苯各30min透明。随后依次放进48—50 $^{\circ}\text{C}$ 、54—56 $^{\circ}\text{C}$ 、56—58 $^{\circ}\text{C}$ 的石蜡中浸蜡1h,石蜡包埋、切片。石蜡切片的厚度为2 μm 。其他免疫组化方法依照博士德产品说明进行。

1.2.3 图像分析:显微镜均取 $\times 40$ 倍,每组测定2张切片,每张切片随机选取4个视野进行图像采集,视野主要集中在心肌的左心室上。以视野为单位,每组共8个视野。利用IMAGE PRO PLUS 5.1图像分析软件测量面积比。VEGF染色是否为阳性以PBS液代替一抗所得切片对照作标准。

1.2.4 心电监控项目:心率、P-R间期、P波时程、P波幅度、P-R段、QRS波群时程、QRS波群峰峰值、T波时程、T波幅度及Q-T间期。

1.3 统计学分析

所有数据均经过 SPSS11.5 统计软件处理,所测数据采用平均值±标准差来表示,显著性水平取 $P<0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 三组小鼠一般情况

静养对照组的小鼠活泼好动、时而静息。皮毛光亮、眼睛有神,进食量与 120min 组相近,多于 120min+负重组。解剖后见内脏各器官色泽鲜红,供血情况良好,体脂分布正常,未见器官肌肉萎缩等情况。120min 组的一般情况与静养对照组无明显差异,偶有气喘,饮水量和进食量稍增加,神态和皮毛等无明显变化。解剖后发现,体脂分布减少,内脏各器官色泽鲜红,供血良好,未见器官肌肉萎缩等情况。120min+负重组的训练随着训练时间的延长神情倦怠、眼神暗淡无光、体毛有部分脱落。解剖可见,体脂分布明显减少,内脏器官色泽暗红,供血较差,部分脏器淤肿,心脏均比其他两组小鼠饱满。

2.2 三组小鼠体重变化比较

见表 1。静养对照组小鼠在 8 周的训练时间内,饮水和进食较好,体重一直呈现上升的趋势,而 120min+负重组小鼠在每次训练后进食量都增加,饮水量也逐渐加大,在训练结束时体重还在不断地增加;120min 组在开始时体重还有所增加,但到后来体重却明显保持在一定的水平。通过 SPSS 软件分析三组小鼠体重第一周和最后一周的变化,只有静养对照组前后差异无显著性($P>0.05$)。在最后一周对三组小鼠体重作对比分析后发现,不同的负荷方法进行的训练对其体重有着显著的影响($P<0.05$)。

2.3 三组小鼠心肌组织变化

各组小鼠解剖心脏时肉眼观,呈鲜红色,弹性好大体无明显变化,但 120min+负重组的心脏心室壁较其他两组的心室壁肥厚,并且游泳的两组小鼠心脏体积比对照组的心脏体积更为饱满。静养对照组 HE 染色切片在×40 倍的光镜下(图 1),可见心肌纤维呈短柱状,分支相互连接成网,境界清楚,胞浆均匀红染,心肌纤维排列整齐,核大小正常,呈椭圆形位于细胞中央,细胞间质较少,毛细血管形态、分布正常,内皮细胞、基膜无肿胀增厚、无炎性细胞浸润。

120min 组 HE 染色切片在光镜下(图 2),可见心肌纤维部分增粗,胞核增大,血管腔扩张,无明显的心肌细胞变性、坏死。120min 组较静养对照组并非明显。而对 120min+负重组的 HE 切片进行观察(图 3),发现部分心肌纤维增粗,胞核增大,部分细胞肿大,核周呈空泡样变,心肌细胞核周隙扩张,核着色浅,细微结构不清,并可见部分毛细血管和小动脉、静脉淤血,少量炎细胞浸润,内皮细胞肿胀,腔内红细胞淤滞。

2.4 三组小鼠心电图变化

见表 2。

2.5 三组小鼠 VEGF 染色比较

静养对照组 VEGF 表达为阴性,满视野染色均匀,有散在 VEGF 的特异性的棕黄色颗粒(图 4);120min 组心肌中可见在细胞间质内有少许的棕黄颗粒,其 VEGF 表达为弱阳性(图 5);而在 120min+负重组中可见心肌中大量存在有棕黄颗粒,使得满视野中充满了棕黄色(图 6),其 VEGF 表达为阳性。分析其阳性面积比(阳性面积/视野面积),120 min 组($6.7\%\pm3.8\%$)和 120min+负重组($11.4\%\pm8.5\%$)与静养对照组($0.5\%\pm0.1\%$)比较差异有显著性,120 min 组与 120min+负重组比较差异也有显著性意义。

表 1 三组小鼠训练期间的体重变化 ($\bar{x}\pm s, g$)

	动物数	静养对照组	120min 组	120min+负重组
第 1 周	30	41.0±1.75	37.6±1.73	36.5±2.24
第 2 周	30	41.4±3.51	37.0±2.77	37.6±3.85
第 3 周	30	41.8±2.73	38.2±2.23	38.7±3.95
第 4 周	30	42.2±4.15	38.6±1.86	39.7±4.93
第 5 周	30	43.6±4.63	40.0±2.15	40.3±5.48
第 6 周	30	44.5±4.34	41.1±2.02	42.1±4.76
第 7 周	30	45.9±4.76	40.2±2.46 ^{①②}	43.8±5.12 ^{①②}

①同组与第一周比较 $P<0.05$,②与对照组相同周数比较 $P<0.05$

表 2 三组小鼠 10 项心电图指标对比表 ($\bar{x}\pm s$)

	静养对照组	120min 组	120min+负重组
心率(beats/min)	539±114	517±131 ^①	519±129 ^①
P-R 间期(ms)	33.7±2.7	35.9±4.2 ^①	36.3±3.7 ^①
P 波时程(ms)	8.0±0.8	8.9±0.7 ^①	8.8±0.9 ^①
P 波幅度(mV)	0.100±0.031	0.117±0.123	0.125±0.148 ^①
P-R 段(ms)	25.7±2.5	28.5±2.1 ^①	30.4±3.1 ^①
QRS 波群时程(ms)	8.8±0.9	9.0±0.8	9.1±0.7
QRS 波群峰峰值(mV)	1.465±0.359	1.512±0.324	1.530±0.364
T 波时程(ms)	9.9±1.8	9.8±1.7	9.7±1.9
T 波幅度(mV)	0.545±0.099	0.578±0.129	0.598±0.146
Q-T 间期(ms)	18.7±1.8	18.9±1.7	18.9±1.6

①与对照组比较 $P<0.05$

图 1 静养对照组
HE 染色情况 (HE×40)

心肌纤维呈短柱状,分支相互连接成网,境界清楚,胞浆均匀红染

图 3 120min+负重组
HE 染色情况(HE×40)

心肌纤维增粗,胞核增大,部分细胞肿大,核着色浅,细微结构不清,并可见淤血

图 5 120min 组 VEGF 表达
为弱阳性 (VEGF×40)

心肌在细胞间质内有少许的棕黄颗粒,其 VEGF 表达为弱阳性

图 2 120min 组
HE 染色情况(HE×40)

心肌纤维部分增粗,胞核增大,血管腔扩张,无明显的心肌细胞变性、坏死

图 4 静养对照组
VEGF 表达阴性(VEGF×40)

仅有散在的 VEGF 的特异性的棕黄染色颗粒

图 6 120min+负重组 VEGF
表达情况 (VEGF×40)

心肌中大量存在有棕黄颗粒

竭运动导致心肌缺血而出现病理性变化。实验证明运动可以提高机体耐缺氧能力^[6],尤其在心肌中增加 VEGF 表达更有利于耐缺氧^[2,7],这是由于 VEGF 是内皮细胞特异性有丝分裂原,具有促进内皮细胞分裂、增殖、迁移,形成新生血管的作用。VEGF mRNA 在心脏中主要位于心肌细胞,低氧促使心肌细胞表达 VEGF mRNA、分泌 VEGF 蛋白增加,是机体的一种代偿机制。分泌出的 VEGF 蛋白作用于血管内皮细胞膜上的 VEGF 受体 Flk-1、Fit-1,通过一系列信号传导使内皮细胞分裂、增殖、迁移,形成新生血管,建立侧支循环,增加缺氧/缺血心肌的氧供/血供,从而减轻或逆转心肌细胞的受损,改善心功能。不同运动负荷训练对机体产生不同的影响,有研究表明血管内皮细胞在正常情况下低表达 VEGF,但当内皮细胞被置于缺氧环境时,细胞内 VEGF mRNA 水平明显增加^[8],这表明 VEGF 不仅通过旁分泌途径作用于内皮细胞,而且有自分泌机制参与。国外学者在鼠、猪、狗的不同形式所造成的心肌梗死或心肌损伤的动物模型中均发现 VEGF 的异常表达^[9-10]。Banai 等^[11]还发现,体外培养的心肌细胞缺氧 2—4h,细胞内的 VEGF mRNA 水平增高 6—10 倍;而在体内,当心肌缺氧时心肌细胞中 VEGF mRNA 水平可以增高 3—5 倍。显微镜下所见,部分心肌纤维增粗,胞核增大,部分细胞肿大,核周呈空泡样变,心肌细胞核周隙扩张,核着色浅,细微结构不清,并可见部分毛细血管和小动脉、静脉淤血,少量炎性细胞浸润,内皮细胞肿胀,腔内红细胞淤滞。这说明随着负荷的加大,机体进一步激活了内皮生长因子,但这是以部分细胞的损伤作为代价的。

分析其机制,小鼠身体中大部分都有 VEGF 分布,心房、心室和瓣膜中也有 VEGF 分布。正常情况下,心肌细胞低水平表达 VEGF,维持一定血管密度和血管对运输营养物质所必需的通透性。进一步研究发现,缺血缺氧均可诱导心肌细胞表达 VEGF 增强,而且坏死区周围明显高于非坏死区^[12]。虽然在运动过程中^[13],心脏的缺血、缺氧现象存在,但当运动负荷适当时,心脏的缺血、缺氧并不对心脏造成严重损伤,这可能与适宜运动时心肌组织内抗氧化系统能力提高及适宜运动时心肌组织内毛细血管数量增多,提高冠脉血流量和毛细血管的交换能力有关。而

3 讨论

3.1 运动对体重的影响

在本试验中,120min+负重组小鼠精神状态、体重、进食饮水量、大小便等与 120min 组和对照组比较有进一步的生长,这说明 5%的负荷量使小鼠的心肌的代谢和功能进一步增强。小鼠体重随着训练的进行而不断地增加,这可能是小鼠的自然生长速度较训练消耗速度快的缘故,并且有可能在较适宜的训练负荷下刺激了进食,进一步加快了体重的增长。

3.2 运动对心肌的影响

大量动物实验研究发现^[5],适量运动可使小鼠心肌纤维增粗,心肌结构发生协调性变化,线粒体数量增多,心肌毛细血管增多,使心肌蛋白合成增加。不适宜的运动可导致心肌受损,突然进行大强度或衰

在运动超过了一定的量的情况下,心肌细胞自由基增多、钙超负荷,并发生缺血、缺氧性损伤,毛细血管损伤后密度下降,心肌细胞与间质的胶原间正常比例遭到破坏,心脏由代偿性生理肥大向失代偿性病理肥大转变。本实验结果显示在一定量的运动负荷下可以促进心肌细胞分泌 VEGF,可能是因为运动造成心肌缺血缺氧,从而诱导 VEGF 表达增强,这与文献报道相一致;而 120min+负重组比 120min 组心肌细胞分泌 VEGF 强,可能是因为加大强度负荷运动后心肌细胞在一定程度上受到损伤,心肌缺血缺氧,心肌细胞病变尚不足引起大量分泌 VEGF 的缘故,或大强度负荷组大鼠对心肌损伤产生适应性改变,这些都会使的 VEGF 再次对内皮细胞产生刺激,内皮细胞从而增殖,在体内诱导血管生成。

3.3 运动对心电活动的影响

长时间以较大强度游泳的两组小鼠测得的 P-R 间期、P 波时程及 P-R 段比静养对照组小鼠所测得的有显著延长。这一结果表明:兴奋由窦房结沿心传导系统传到两侧心室肌的过程中,随着心率减慢,心容积变大,其传导速度变慢。但因为心电图仅能反映心肌心电传导过程,不能反映心肌收缩状态,故而表明是控制心电传导的心肌自律细胞和心房肌细胞功能降低,这是一种对长时间中等强度以上运动的适应性表现。另外,龚丽等^[14]研究了递增负荷运动对大鼠心房肌蛋白质的影响。发现耗竭性的运动可以导致心房肌收缩能力下降,而心室肌的影响较小,这与肌球蛋白在心肌中的差异性表达致使离子通道失活有关。毕立茹等^[15]研究发现大鼠耐力训练后心肌中 SOD 活性升高,导致细胞膜的脂质过氧化。其最终使得自律细胞的传导速度会变慢,心房肌的动作电位时程也会延长,最终表现两侧的心房去极化和复极化变缓。这可以从结果中的 P-R 间期、P 波时程、P 波幅度、P-R 段明显变化中看出。相反的,从 QRS 波群时程、QRS 波群峰峰值、T 波时程、T 波幅度及 Q-T 间期无明显变化可以看出,心室肌的影响并不大,这可能与心电传导在心室肌中对离子通道无明显影响有关。可见较强的负荷会对心肌中的心房肌产生明显的失代偿作用,而对心室肌则因为敏感性低无明显影响。故而,可以推论出小鼠的心室肌细胞对损伤性影响的耐受力要高于心房肌细胞。

4 结论

三组试验小鼠的心脏,随着所受负荷的增加,表现出代偿到失代偿的变化,并且通过心电活动监测可以推论出心房肌的失代偿程度较心室肌更为明显,这与心室肌更为敏感的传统观念相反。这说明心房肌虽然有一定的功能减弱,但是心室肌最终还是功能性增强。可以认为运动强度和心脏能力的功能性代偿增强是成正比的,此结果为心脏康的运动训练负荷的影响复提供了可靠的试验依据。

参考文献

- [1] 艾洪滨,祝建平,张学英,等.长时间游泳对小鼠心电活动的影响[J].山东医学工程,2003,22(1):24—27.
- [2] 步斌.运动负荷与沙棘对大鼠心肌血管内皮生长因子表达影响的研究[J].成都体育学院学报,2004,30(6):76—79.
- [3] 张志琪,田振军,张小玲.不同运动负荷小鼠心肌活细胞游离钙动态变化的 LSCM 研究[J].中国运动医学杂志,2003,22(1):82—84.
- [4] Stuber M, Scheidegger MB, Fischer SE, et al. Alterations in the local myocardial motion pattern in patients suffering from pressure overload due to aortic stenosis [J]. Circulation, 1999, 100(4): 361—368.
- [5] 王鑫,陈正东,吴昊,等.力竭游泳运动对大鼠心肌细胞中间纤维和超微结构的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(11):968—970.
- [6] 刘新霞,赵燕燕,陈春生,等.不同运动量对小鼠微循环及耐缺氧能力的影响[J].中国康复医学杂志,2008,23(9):786—788.
- [7] 邱峰,励建安,陆晓,等.心肌缺血和有氧运动训练诱导 VEGF 表达时间规律的实验研究 [J]. 中国康复医学杂志,2008,23(3):193—197.
- [8] 常芸.耐力训练后大鼠心肌毛细血管的研究之二:毛细血管 ATPase, AKP 活性,超微结构及密度的改变[J].中国运动医学杂志,1990,9(4):220—222.
- [9] Sellke FW, Wang SY, Stamler A, et al. Enhanced microvascular relaxations to VEGF and bFGF in chronically ischemic porcine myocardium [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1996, 271(8):713.
- [10] Yang R, Thomas GR, Bunting S, et al. Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1996, 27(3):838—844.
- [11] Banai S, Shweiki D, Pinson A, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis [J]. Cardiovasc Res, 1994, 28(6):1176—1179.
- [12] 于慕刚,吴明,哲王华.新生大鼠缺氧缺血性脑损伤血管内皮生长因子表达与新生血管形成关系的研究 [J]. 中国小儿急救医学,2007,14(1):45—47.
- [13] 潘明,李仪.运动对血管内皮生长因子的影响及其机制[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(10):1930—1933.
- [14] 龚丽,史绍蓉,黄鹰,等.递增负荷运动对大鼠心房肌蛋白质研究的影响[J].中国康复医学杂志,2008,23(2):107—109.
- [15] 毕立茹,周冬,王凤阳,等.番茄红素对训练小鼠力竭运动能力的影响[J].中国康复医学杂志,2008,23(6):537—539.