

内皮祖细胞动员对兔生理性缺血训练促进远隔缺血心肌侧支生成的作用*

郑 瑜¹ 励建安^{1,3} 陆 晓¹ Jan D. Reinhardt² 张庆沙¹

摘要

目的:探讨血管内皮生长因子(VEGF)介导的内皮祖细胞(EPCs)动员在生理性缺血训练(PIT)促进远隔缺血心肌侧支循环生成过程中的作用。

方法:42只兔进行可控性心肌缺血造模,造模成功后随机分入以下6组:假手术组、单纯生理性缺血训练组、单纯心肌缺血组、生理性缺血训练组、阿托伐他汀组、雷帕霉素组。生理性缺血训练共4周,每次3min,间隔5min,每周训练5d,每天训练3次。实验终点时,处死动物取材,进行实验室检测:ELISA法检测外周血中VEGF含量;Western blot法检测缺血心肌中VEGF表达;流式细胞术检测外周血和缺血心肌中EPCs数量;微球技术检测缺血心肌侧支循环血流量。

结果:4周PIT后,VEGF含量在PIT组和PIT+组显著增加,与SO组、TO组和MI组相比,外周血和缺血心肌中VEGF含量在PIT组显著增加,结果具有显著性意义。PIT+组的EPCs数量在外周血和缺血心肌中均显著高于其他各组,PIT组与其他各组相比,外周血EPCs数量的差异同样具有显著性意义。冠状动脉侧支循环血流量(CCBF)和CCBF/冠状动脉血流量(CBF)在PIT+组和PIT组显著高于SO组、TO组和MI组。PIT-组的各项指标与SO组和TO组相比,差异均无显著性意义。EPCs数量的增加最高有43%可以被VEGF含量的增加解释,CCBF和CCBF/CBF的增加最高有90%可以被EPCs数量的增加解释。

结论:PIT可促进EPCs动员,通过其远隔效应归巢到缺血心肌生成侧支循环,改善冠脉血流,最终实现“生物搭桥”;通过促进和抑制EPCs,证实EPCs在PIT介导的缺血心肌侧支循环生成过程中具有重要作用。

关键词 生理性缺血训练;心肌缺血;侧支循环;内皮祖细胞;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(2014)-07-597-08

Effects of mobilization of endothelial progenitor cells in physiological ischemic training on collateral circulation formation in rabbits with remote myocardial ischemia/ZHENG Yu, LI Jianan, LU Xiao, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2014, 29(7): 597—604

Abstract

Objective: To investigate the effects of physiological ischemic training(PIT) and the important role of endothelial progenitor cells(EPCs) mediated by vascular endothelial growth factor(VEGF) on the protection of remote ischemic myocardium induced by PIT in the rabbit model of controllable myocardial ischemia.

Method: Forty-two rabbits were randomized into six groups: sham-operated (SO), training only (TO), myocardial ischemia (MI), physiological ischemic training (PIT), EPC promotor (PIT+), and EPC inhibitor (PIT-) group. At the endpoint, VEGF protein and EPCs were measured in plasma and myocardium. Coronary blood flow (CBF) and coronary collateral blood flow (CCBF) were also determined. All groups were compared using non-parametric statistics and associations between agents explored with fractional polynomials regression.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2014.07.002

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81070181)

1 南京医科大学第一附属医院康复医学科,南京,210029; 2 四川大学灾后重建与管理学院; 3 通讯作者
作者简介:郑瑜,男,硕士研究生; 收稿日期:2014-03-08

Result: VEGF protein levels were the highest in PIT+ and PIT groups. PIT group did differ significantly from SO, TO, MI, and PIT- groups regarding plasma VEGF protein levels as well as protein levels in myocardium. EPCs were the highest in PIT+ group followed by PIT. PIT group did differ significantly from SO, TO, MI, and PIT- groups regarding plasma EPCs. CCBF and CCBF/CBF increased significantly in PIT+ and PIT groups as compared to controls. VEGF explained up to 43% of variance in EPCs. EPCs explained up to 90% of variance in CCBF and CCBF/CBF.

Conclusion: PIT can improve revascularization via VEGF-mediated mobilization of EPCs and may be a new approach in the treatment of patients with coronary heart disease(CHD).

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

Key word physiological ischemic training; myocardial ischemia; coronary collateral circulation; endothelial progenitor cell; vascular endothelial growth factor

近年来,冠心病已成为世界范围内主要致死和致残的疾病,严重影响患者的生存和生活质量^[1]。冠脉支架植入、冠脉搭桥、注射外源性干细胞或内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)等手段可以促进心肌缺血区域侧支循环形成,增加冠脉血流,改善心肌灌注,广泛用于冠心病治疗^[2-3]。然而,很多患者由于各种原因而不适于进行经皮冠状动脉介入治疗及冠脉搭桥手术,并且外源性干细胞或EPCs注入最大的问题在于其靶向性、经费及细胞来源问题,其应用受到很大限制。众所周知,冠心病患者心肌缺血区域有效侧支循环形成是缺血心肌的自我保护机制,也是重要的治疗机制,如何通过非侵入手段安全有效地促进侧支循环形成是目前心脏康复领域研究的重要课题。

本课题组前期研究发现,心肌缺血刺激不仅可以使缺血心肌局部内皮血管生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)含量增加,同时也可以使肾脏、肝脏等远隔组织中VEGF含量增加^[4-6]。缺血刺激既然可以促进远隔VEGF表达增加,是否也可以促进远隔侧支循环生成增加是一个值得研究的课题。本课题组在随后的研究中证实:反复的生理性骨骼肌缺血训练可以诱导远隔缺血心肌生成侧支循环,最终实现“生物搭桥”。我们将这种反复作用于正常肢体的可逆性缺血称为生理性缺血训练(physiological ischemic training, PIT)^[7]，“缺血持续时间3min,再灌注时间5min,缺血日负荷3次/d,缺血周负荷5d/周”为适宜的生理性缺血负荷。虽然上述结果证实PIT可以促进远隔缺血心肌侧支循环生成,但其具体的细胞学及分子生物学机制仍不清楚。

内皮祖细胞起源于骨髓,并具有增殖、迁移至特

定部位,分化并参与血管生成的能力^[8]。一些特殊刺激如药物、缺血及运动能够将EPCs从骨髓动员至血液循环中,在靶组织的诱导下,通过长距离迁移,进入靶组织,参与受损血管的修复或新生^[9]。研究发现,急性心肌梗死及急性冠脉综合征后,患者外周血EPCs数量有显著增加^[10],心脏X综合征的患者外周血EPCs数量与对照组相比也有显著增加^[11],提示EPCs介导的血管修复是严重缺血后的生理反应; Lambiase PD等^[12]的研究证实,侧支循环不充分(CFI<0.25)的冠心病患者与侧支循环较充分的冠心病患者相比(CFI≥0.25),其外周血EPCs数量显著降低。证实了EPCs在侧支循环生成中的重要作用。

内皮血管生长因子对于EPCs的增殖、迁移和分化具有重要的调控作用^[13]。Adams等^[14]研究发现,冠心病患者出现短暂的心肌缺血即可引起其外周血中VEGF含量和EPCs数量的显著增加,并且两者的增加具有相关性。本课题组前期研究也证实,短暂缺血阈强度训练可以安全有效地通过缺血心肌局部VEGF的增加促进冠状动脉侧支循环的生成^[15]。但是,在PIT介导的远隔缺血心肌侧支循环生成过程中,VEGF作用的分子生物学机制及VEGF与EPCs动员的因果关系尚不清楚。

因此,本研究旨在探讨VEGF介导的EPCs动员在PIT促进远隔缺血心肌侧支循环生成过程中的作用,为PIT的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

42只成年新西兰白兔(2.3±0.2)kg,购于江苏南

京金陵兔场[许可证号 SCXK(苏)2012-0003],雌雄不拘。动物饲养均采用实验室饮食、饮水标准方案;饲养环境为温度、湿度、亮度控制的房间。动物于南京医科大学动物试验中心 SPF 级饲养 1 周后进行手术造模。实验方案严格按照美国 NIH 实验动物使用指南,并经过江苏省人民医院伦理委员会批准。

1.2 可控性心肌缺血动物模型

该动物模型为本课题组成熟的造模技术^[16]。动物取仰卧位,麻醉采用兔耳缘静脉注射药物 3%戊巴比妥钠(1ml/kg);备皮,碘伏消毒,于胸骨左缘第 5 肋间进胸,暴露心脏后根据左心耳与左室支(left ventricular branch, LVB)的关系确定后者的位置,在左心耳下缘 5—10mm 处用 5-0 单股聚丙烯带针缝合线由心肌内穿出,固定水囊缩窄器。以向水囊中注水时心电图出现缺血改变(Ⅱ导联 ST 段抬高或压低至少 1mm)和抽水后心肌实现再灌注(2min 内 ST 段心电图表现恢复正常)为造模成功标准。生理盐水冲洗胸腔后逐层缝合胸腔,并抽出胸腔内气体,帮助动物肺复张。最后将水囊缩窄器导管循导丝经皮下从项背部引出并缝合固定。术后连续 3d 肌注青霉素(40 万 U/d)预防感染。

排除标准:①手术中或术后非心脏原因意外死亡;②手术中水囊固定完成后注水,心电图未见缺血改变;③水囊抽水 0.5h 后心电图仍不能恢复正常。

实验终点时,取动物静脉血 5—10ml 及缺血部位以下心肌组织并保存,进行实验室检测。

1.3 生理性缺血训练和心肌缺血刺激方案

生理性缺血训练采用止血带环扎兔双下肢近端,阻断血流以股动脉搏动消失为标准^[17]。生理性缺血训练共 4 周,每次 3min,间隔 5min,每周训练 5d,每天训练 3 次。

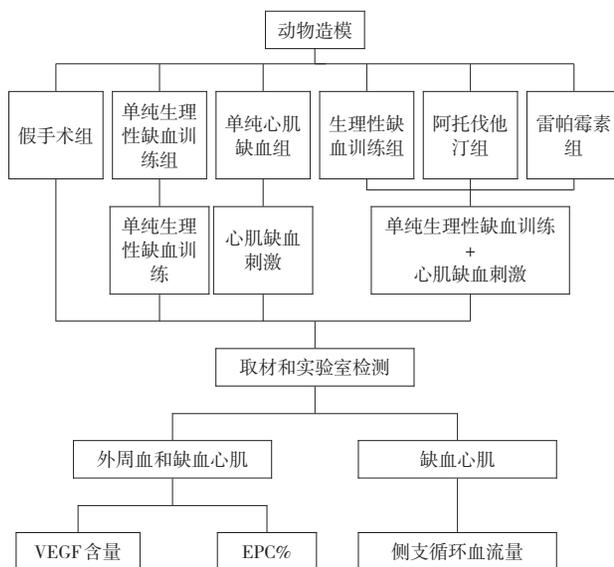
心肌缺血刺激采用心电图监测,水囊注水,缺血刺激以Ⅱ导联 ST 段抬高或压低至少 1mm 为标准^[18]。心肌缺血刺激共 4 周,每次 2min,间隔 10min,每周刺激 5d,每天刺激 2 次。

1.4 实验动物分组

成功造模的 42 只兔休息 1 周后,随机分入以下 6 组:①假手术组(sham-operated group, SO)(n=6),不进行任何缺血刺激和训练,安静笼养;②单纯生理性缺血训练组(training only group, TO)(n=6),只

进行双下肢生理性缺血训练;③单纯心肌缺血组(myocardial ischemia group, MI)(n=8),只进行心肌缺血刺激;④生理性缺血训练组(physiological ischemic training group, PIT)(n=8),同时进行心肌缺血刺激和双下肢生理性缺血训练;⑤阿托伐他汀组(EPC promoter group, PIT+)(n=7),同时进行心肌缺血刺激和双下肢生理性缺血训练,并且给予口服 EPCs 促进剂阿托伐他汀(10mg/kg/d)^[19];⑥雷帕霉素组(EPC inhibitor group, PIT-)(n=7),同时进行心肌缺血刺激和双下肢生理性缺血训练,并且给予口服 EPCs 抑制剂雷帕霉素(0.5mg/kg/d)^[20]。实验流程见图 1。

图 1 实验流程图



1.5 外周血及缺血心肌组织中 VEGF 检测

采用 ELISA 法(BPB 公司,德国)测定外周血 VEGF 含量,具体操作步骤依照试剂盒说明书进行,最后得出各孔 OD 值,然后计算外周血 VEGF 蛋白含量,进行相应统计处理。

采用 Western blot 法测定缺血心肌组织中 VEGF 表达,一抗为鼠抗 VEGF 单克隆抗体(美国, Santa Cruz 公司),二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG(美国, Santa Cruz 公司)。采用 Gel-Doc2000 凝胶电泳成像分析系统进行成像和灰度分析,计算每个 VEGF 蛋白条带与内参蛋白条带的光密度值的比值,进行相应统计处理。

1.6 外周血及缺血心肌组织中EPCs数量检测

采用流式细胞术测定外周血及缺血心肌组织中EPCs数量,测定管中加入10 μ l PerCP标记的CD45单克隆抗体(BD公司,美国)用于设门,然后加入10 μ l PE标记的CD34单克隆抗体(BD公司,美国)和10 μ l APC标记的CD309单克隆抗体(BD公司,美国),室温避光孵育15min,加入4ml红细胞裂解液,室温避光放置12min,离心后弃上清,固定后利用流式细胞仪(BD公司,美国)检测CD34⁺/CD309⁺双阳性细胞百分比,以EPCs占外周血有核细胞的百分比代表外周血EPCs数量,进行相应统计处理。

1.7 缺血心肌侧支循环血流量检测

采用微球法测定缺血心肌侧支循环血流量,微球注射的时间点分别为:冠脉左室支水囊植入后,心电图监测下于水囊充水前和充水引起心肌缺血2min的最后30s分别于左心房注射红色和黄色微球各0.15ml;实验终点时,各组实验动物处死前于麻醉状态下再次开胸,心电图监测下于水囊充水前和充水引起心肌缺血2min的最后30s分别于左心房注射紫色和白色微球各0.15ml。随后处死动物,于各组左室支阻断部位2mm以下的心肌缺血区取材用作微球分析标本。采用相对侧支循环血流量来表示缺血心肌局部血流量的变化,以排除动物的个体差异,缺血区域相对冠状动脉侧支循环血流量(%)=缺血刺激后缺血心肌内微球数量(个/g)/缺血刺激前缺血心肌内微球数量(个/g) \times 100%,冠状动脉侧支循环血流量(coronary collateral blood flow, CCBF)为水囊充水形成冠状动脉梗死时,测得的单位缺血心肌的微球数目;冠状动脉血流量(coronary blood flow, CBF)为水囊充水前,测得的单位缺血心肌的微球数目。

1.8 统计学分析

采用Stata 13.0统计软件进行分析,考虑到各组VEGF蛋白含量、EPCs数量和冠状动脉侧支循环血流量的改变量的实验数据并不符合正态分布,因此本研究采用非线性分析方法计算各组间差异^[21],同时使用盒须图来呈现统计结果,图中圆圈代表均数、矩形盒内部的直线代表中位数、矩形盒的长度代表四分位间距、从矩形盒上下两边向外各画一条线段直到不是异常值的最远点表示该批数据正常值的分

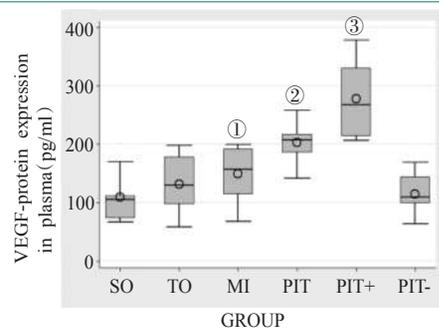
布区间、圆点代表极端值。

2 结果

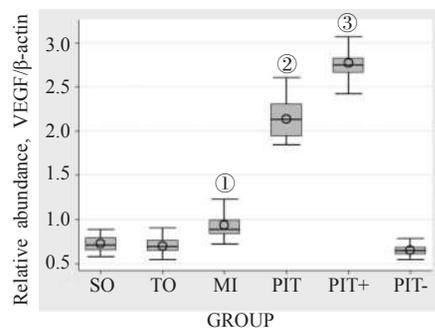
2.1 对外周血及缺血心肌中VEGF水平的影响

生理性缺血训练实验终点时,外周血中PIT组和PIT+组的VEGF水平高于MI组,差异具有显著性意义($P < 0.03$),PIT+组的VEGF水平显著高于其他各组($P < 0.03$),PIT-组和SO组、TO组之间VEGF水平无显著差异($P > 0.05$)。而缺血心肌中VEGF水平的统计结果与外周血中一致,即PIT组和PIT+组的VEGF水平显著高于MI组($P < 0.043$),PIT+组的VEGF水平最高($P < 0.043$),PIT-组的VEGF水平和SO组、TO组相比,差异均无显著性意义($P > 0.05$),见图2。

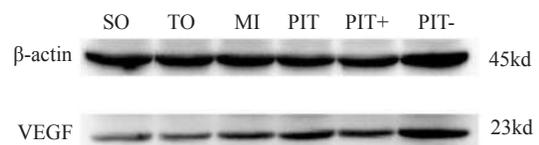
图2 各组外周血及缺血心肌中VEGF表达比较



①与PIT组和PIT+组相比 $P < 0.03$;②与SO组,TO组,MI组,PIT+组和PIT-组相比 $P < 0.03$;③与SO组,TO组,MI组,PIT组和PIT-组相比 $P < 0.03$



①与PIT组和PIT+组相比 $P < 0.043$;②与SO组,TO组,MI组,PIT+组和PIT-组相比 $P < 0.043$;③与SO组,TO组,MI组,PIT组和PIT-组相比 $P < 0.043$



各组缺血心肌中VEGF水平 Western blot结果

2.2 对外周血及缺血心肌中EPCs数量的影响

生理性缺血训练实验终点时,外周血中PIT组和PIT+组的高于MI组,差异具有显著性意义($P < 0.03$),PIT+组的EPCs数量显著高于其他各组($P < 0.03$),PIT-组和SO组、TO组之间EPCs数量无显著差异($P > 0.05$)。而缺血心肌中MI组的EPCs数量高于SO组和TO组($P < 0.033$),PIT组的EPCs数量与MI组($P=0.23$)及PIT+组($P=0.13$)相比,差异无显著性意义,PIT+组的EPCs数量显著高于SO组、TO组和MI组($P < 0.033$),PIT-组的EPCs数量和SO组、TO组相比,差异均无显著性意义($P > 0.05$),见图3。

2.3 对缺血心肌侧支循环血流量的影响

生理性缺血训练实验终点时,各组之间的CBF改变量均无显著性差异($P > 0.05$),而CCBF改变量在各组间的统计结果符合预期,即PIT组和PIT+组的CCBF改变量显著高于其他各组($P < 0.001$),而

PIT-组的CCBF改变量和SO组、TO组和MI组相比,差异均无显著性意义($P > 0.05$)。排除个体差以后,CCBF/CBF改变量的统计结果和CCBF改变量一致,见表1。

2.4 外周血中VEGF水平与EPCs数量的相关性

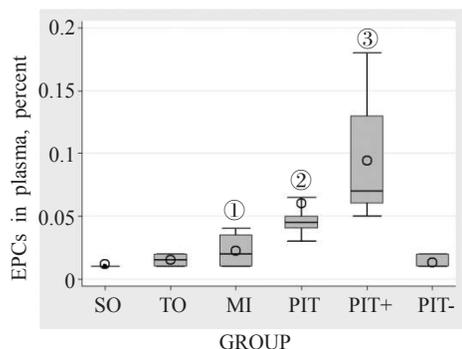
实验终点时,外周血中VEGF水平与EPCs数量

表1 各组缺血心肌侧支循环血流量比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

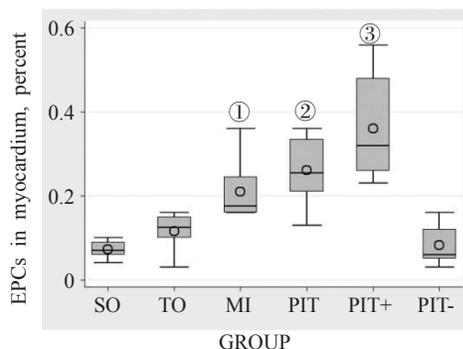
组别	CBF	CCBF	CCBF/CBF
SO	-11±83	22±101	0.85±2.81
TO	29.5±84	12.5±45	-0.02±2.40
MI	43.5±170.5	161±118	5.09±5.86
PIT	-10.5±81.5	635.5±98.5 ^①	21.06±1.23 ^③
PIT+	-31±71	1034±30 ^②	34.54±3.13 ^④
PIT-	-66±55	-54±63	-1.14±1.97

①与SO组、TO组、MI组、PIT+组和PIT-组相比 $P < 0.001$;②与SO组、TO组、MI组、PIT组和PIT-组相比 $P < 0.001$;③与SO组、TO组、MI组、PIT+组和PIT-组相比 $P < 0.001$;④与SO组、TO组、MI组、PIT组和PIT-组相比 $P < 0.001$

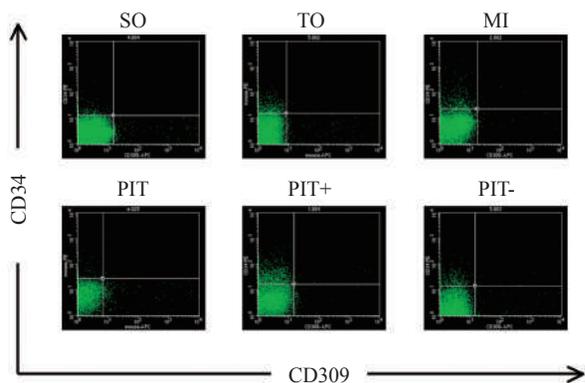
图3 各组外周血及缺血心肌中EPCs数量比较



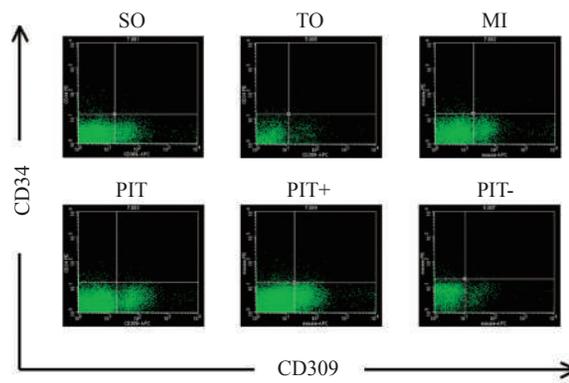
①与PIT组和PIT+组相比 $P < 0.03$;②与SO组、TO组、MI组、PIT+组和PIT-组相比 $P < 0.03$;③与SO组、TO组、MI组、PIT组和PIT-组相比 $P < 0.03$



①与SO组、TO组、PIT组和PIT+组相比 $P < 0.033$;②与SO组、TO组和PIT-组相比 $P < 0.033$;③与SO组、TO组、MI组和PIT-组相比 $P < 0.033$



流式细胞仪检测各组外周血中CD34/CD309双阳性细胞(即EPCs)占有核细胞百分比。



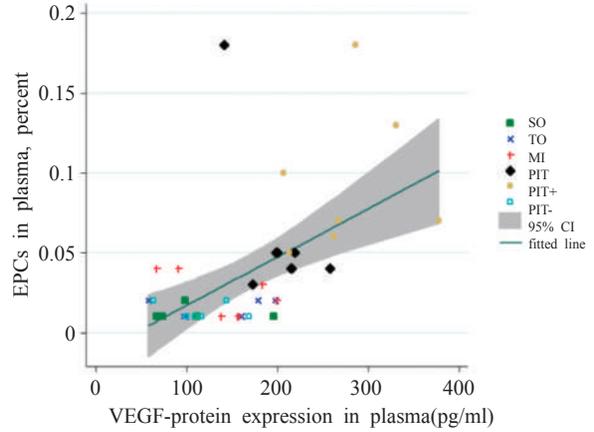
流式细胞仪检测各组缺血心肌中CD34/CD309双阳性细胞(即EPCs)占有核细胞百分比。

呈直线相关($\beta=0.013, P < 0.001$), EPCs数量的增加中有27%可以被VEGF水平增加解释, 见图4。

2.5 外周血和缺血心肌中EPCs数量与缺血心肌侧支循环血流量的相关性

实验终点时, 外周血中EPCs数量和CCBF改变量、CCBF/CBF改变量分别呈曲线相关($P < 0.001$), CCBF改变量的增加中有89%可以被EPCs数量增加解释; CCBF/CBF改变量的增加中有90%可以被EPCs数量增加解释。心肌中EPCs数量和CCBF改变量、CCBF/CBF改变量分别呈直线相关($P < 0.001$), CCBF改变量的增加中有58%可以被EPCs数量增加解释; CCBF/CBF改变量的增加中有56%可以被EPCs数量增加解释, 见图5。

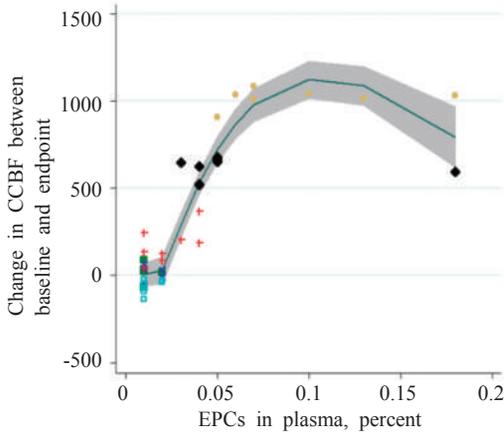
图4 实验终点时外周血中VEGF水平与EPCs数量的相关性分析



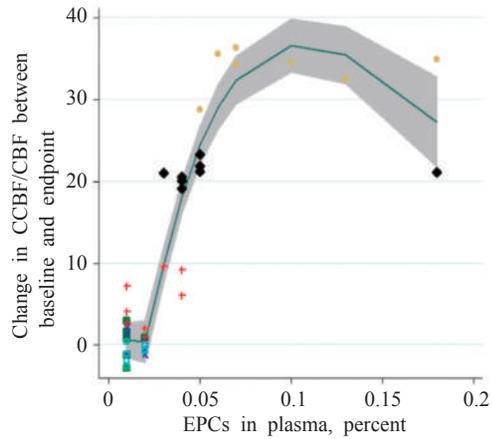
实验终点时外周血中VEGF水平与EPCs数量的相关性分析, $r=0.89, P < 0.001$

图5 实验终点时外周血和缺血心肌中EPCs数量与缺血心肌侧支循环血流量的相关性分析

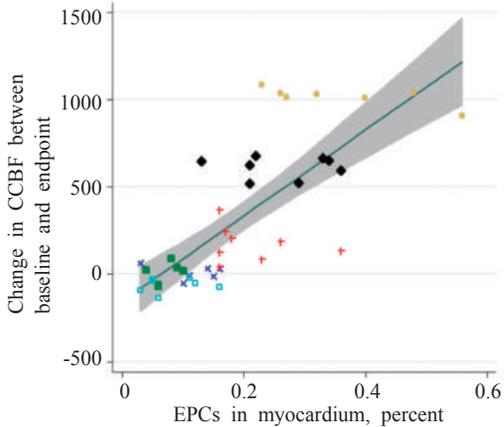
■ SO × TO + MI ◆ PIT ▲ PIT+ □ PIT- 95% CI — fitted line



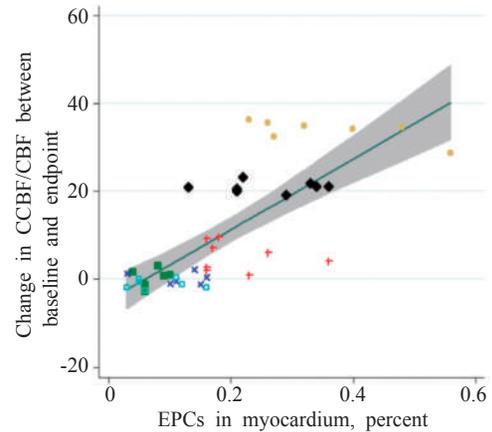
实验终点时外周血中EPCs数量与CCBF改变量的相关性分析, $r=0.89, P < 0.001$



实验终点时缺血心肌中EPCs数量与CCBF/CBF改变量的相关性分析, $r=0.90, P < 0.001$



实验终点时外周血中EPCs数量与CCBF/CBF改变量的相关性分析, $r=0.58, P < 0.001$



实验终点时缺血心肌中EPCs数量与CCBF/CBF改变量的相关性分析, $r=0.56, P < 0.001$

3 讨论

本研究通过兔可控性心肌缺血模型,对PIT的作用及其分子生物学和细胞学机制进行探索,结果显示PIT可以促进VEGF的表达,后者增加EPCs动员,通过其远隔效应归巢到缺血心肌生成侧支循环,改善冠脉血流,最终实现“生物搭桥”;通过促进和抑制EPCs,证实了EPCs在PIT介导的缺血心肌侧支循环生成过程中的重要作用。

本课题组前期发现,心肌缺血刺激不仅使心肌VEGF表达增高,同时也使邻近组织和远隔组织的表达增加^[22];血液与心肌、肝脏VEGF水平具有相关性^[23]。这些结果提示缺血刺激不仅导致局部组织VEGF增加和血管储备改善,也可以导致VEGF远隔表达。既然缺血刺激诱导生成的VEGF可以远隔表达,就可能造成远隔部位侧支循环的形成。

既往研究证明,缺血也可以介导EPCs从骨髓动员至外周血:急性冠脉综合征和急性心肌梗死患者外周血中EPCs数量增加表明EPCs介导的组织和血管修复是机体对严重缺血的一种生理反应^[24-26]。尽管EPCs动员的分子生物学机制尚不清楚,但有研究提示VEGF可能是主要的促释放因子^[9]。离体实验提示VEGF可促进EPCs增值,并呈剂量依赖性^[27]。临床上对急性心肌梗死患者的观察研究发现,外周血中VEGF和EPCs数量呈正相关^[28]。动物实验也证实,适宜的心肌缺血可以增加VEGF表达及EPCs数量,从而促进冠状动脉侧支循环生成^[29-30]。本研究的结果显示,与对照组(SO组和TO组)相比,仅给予心肌缺血刺激时,外周血和缺血心肌中VEGF表达、EPCs数量以及CCBF和CCBF/CBF均有所增加,与上述研究的结果一致,并且外周血中VEGF含量与EPCs数量具有相关性,提示EPCs数量增加与VEGF含量增加有关。

然而,对于冠心病患者而言,无论何种直接诱发心肌缺血的活动都具有导致过分缺血的危险,从而带来临床推广应用的伦理及安全性顾虑。众所周知,缺血不仅是病理性的,也可以是生理性的:微血栓或脑血管一过性痉挛等原因导致短暂性脑缺血发作产生短暂可逆的肢体功能丧失,是典型的病理性缺血;而打雪仗时两手从苍白到通红的过程,就是生理性缺血和缺血后充血的过程。远隔作用既然可以

发生于病理性缺血刺激之后,也可能发生于生理性缺血之后。在此基础上,我们提出了PIT的概念,即反复在正常骨骼肌造成暂时缺血,造成训练的远隔作用,促进病理性缺血部位的侧支循环生成^[7]。虽然PIT也会引起机体短暂的缺血,但因其缺血可逆并且缺血训练部位位于远隔正常肢体的特点,具有较好的安全性和临床实用性。因此,本研究将PIT应用于兔可控性心肌缺血模型,探讨PIT对心肌缺血的保护作用 and 机制。

本研究结果显示,与MI组相比,PIT组的CCBF和CCBF/CBF的改变量显著增加,这与高晶等^[31]的研究结果一致,即PIT可以通过改善冠脉血流实现对心肌缺血的保护作用。在本研究中,外周血和缺血心肌中EPCs数量与侧支循环血流量具有相关性,侧支循环血流量的增加大部分能够被PIT介导的EPCs数量增加解释,也从侧面证实了EPCs在PIT对心肌缺血保护过程中的作用。当EPCs的数量被雷帕霉素抑制后,PIT的远隔效应随即消失;而在使用EPCs促进剂阿托伐他汀后,PIT的远隔效应则可以被增强,进一步证实EPCs在PIT介导的缺血心肌侧支循环生成过程中的重要作用。与此同时,我们还发现外周血中EPCs数量与侧支循环血流量呈曲线相关,可能说明当EPCs数量超过一定范围后,其促侧支循环生成效应不会进一步增加。传统细胞因子注射一旦过量,对侧支循环生成并没有更多好处,反而会带来某些不良反应,而生理性缺血训练作为一种非侵入性的运动训练方式则相对安全。

本研究的局限性主要在于并未对外周血中VEGF和EPCs进行示踪,对于VEGF表达增加及其介导的EPCs数量增加,以及后者归巢到远隔缺血心肌生成侧支循环的效应是否来源于PIT刺激尚不能最后定论;仅研究了VEGF在PIT过程中与EPCs及侧支循环生成的相互作用,尚有多种细胞因子在PIT过程中发挥作用,参与侧支循环生成的调控,还需进一步研究。

本研究从多个层面探讨了PIT的作用和机制:PIT可通过促进VEGF表达,增加EPCs数量,促进远隔缺血心肌侧支循环生成;通过使用EPCs促进剂和抑制剂阐明PIT过程EPCs动员和侧支循环生成的关系,为缺血性心脏病提供治疗思路。

参考文献

- [1] Global atlas on cardiovascular disease prevention and control [J]. Geneva: WHO. 2011.
- [2] Park CB, Park HK, Kim CJ. Iatrogenic acute coronary dissection during coronary angioplasty for in-stent restenosis: role of intravascular ultrasound in diagnosis and treatment [J]. J Invasive Cardiol, 2012, 24(1):E1—2.
- [3] Akchurin RS, Shiriaev AA, Rudenko BA, et al. Left main coronary artery stenosis and progression of coronary artery atherosclerosis after angioplasty and stenting in patients directed to coronary artery bypass surgery[J]. Kardiologiia, 2012, 52(1):58—64.
- [4] Wang YP, Maeta H, Mizoguchi K, et al. Intestinal ischemia preconditions myocardium: role of protein kinase C and mitochondrial K (ATP) channel[J]. Cardiovascular Research, 2002, 55(3):576—582.
- [5] Chen YS, Chien CT, Ma MC, et al. Protection "outside the box" (skeletal remote preconditioning) in rat model is triggered by free radical pathway[J]. The Journal of surgical research, 2005, 126(1):92—101.
- [6] Cheung PY, Sawicki G, Wozniak M, et al. Matrix metalloproteinase-2 contributes to ischemia-reperfusion injury in the heart[J]. Circulation, 2000, 101(15):1833—1839.
- [7] Shen M, Gao J, Li J, et al. Effect of ischaemic exercise training of a normal limb on angiogenesis of a pathological ischaemic limb in rabbits[J]. Clinical science, 2009, 117(5): 201—208.
- [8] Hill JM, Zalos G, Halcox JP, et al. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk [J]. The New England journal of medicine, 2003, 348(7): 593—600.
- [9] Möbius-Winkler S, Höllriegel R, Schuler G, et al. Endothelial progenitor cells: implications for cardiovascular disease[J]. Cytometry A, 2009, 75(1):25—37.
- [10] Werner N, Nickenig G. Influence of cardiovascular risk factors on endothelial progenitor cells: limitations for therapy? [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(2):257—266.
- [11] Huang PH, Chen YH, Chen YL, et al. Vascular endothelial function and circulating endothelial progenitor cells in patients with cardiac syndrome X[J]. Heart, 2007, 93(9): 1064—1070.
- [12] Lambiase PD, Edwards RJ, Anthonopoulos P, et al. Circulating humoral factors and endothelial progenitor cells in patients with differing coronary collateral support[J]. Circulation, 2004, 109(24):2986—2992.
- [13] Flamme I, Breier G, Risau W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo[J]. Developmental biology, 1995, 169(2):699—712.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Lin A, Li J, Zhao Y, et al. Effect of physiologic ischemic training on protection of myocardial infarction in rabbits[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2011, 90(2):97—105.
- [17] Zhao Y, Li J, Lin A, et al. Improving angiogenesis and muscle performance in the ischemic limb model by physiological ischemic training in rabbits[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2011, 90(12):1020—1029.
- [18] Xiao M, Lu X, Li J, et al. Physiologic ischaemic training induces endothelial progenitor cell mobilization and myocardial angiogenesis via endothelial nitric oxide synthase related pathway in rabbits[J]. Journal of cardiovascular medicine, 2014, 15(4):280—287.
- [19] Matsumura M, Fukuda N, Kobayashi N, et al. Effects of atorvastatin on angiogenesis in hindlimb ischemia and endothelial progenitor cell formation in rats[J]. Journal of atherosclerosis and thrombosis, 2009, 16(4):319—326.
- [20] Chen WQ, Zhong L, Zhang L, et al. Oral rapamycin attenuates inflammation and enhances stability of atherosclerotic plaques in rabbits independent of serum lipid levels[J]. British journal of pharmacology, 2009, 156(6):941—951.
- [21] Cuzick J. A Wilcoxon-type test for trend[J]. Statistics in medicine, 1985, 4(1):87—90.
- [22] 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):422—425.
- [23] 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.
- [24] Leone AM, Rutella S, Bonanno G, et al. Mobilization of bone marrow-derived stem cells after myocardial infarction and left ventricular function[J]. European heart journal, 2005, 26(12):1196—1204.
- [25] Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, et al. Mobilization of CD34/CXCR4⁺, CD34/CD117⁺, c-met⁺ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction[J]. Circulation, 2004, 110(20):3213—3220.
- [26] Massa M, Rosti V, Ferrario M, et al. Increased circulating hematopoietic and endothelial progenitor cells in the early phase of acute myocardial infarction[J]. Blood, 2005, 105(1):199—206.
- [27] Kaushal S, Amiel GE, Guleserian KJ, et al. Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo[J]. Nature medicine, 2001, 7(9): 1035—1040.
- [28] 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.
- [29] Matsunaga T, Wartier DC, Tessmer J, et al. Expression of VEGF and angiopoietins-1 and -2 during ischemia-induced coronary angiogenesis[J]. American journal of physiology Heart and circulatory physiology, 2003, 285(1):H352—358.
- [30] Toyota E, Wartier DC, Brock T, et al. Vascular endothelial growth factor is required for coronary collateral growth in the rat[J]. Circulation, 2005, 112(14):2108—2113.
- [31] Sandri M, Adams V, Gielen S, et al. Effects of exercise and ischemia on mobilization and functional activation of blood-derived progenitor cells in patients with ischemic syndromes: results of 3 randomized studies[J]. Circulation, 2005, 111(25):3391—3399.