

等长收缩训练促进犬慢性缺血心肌血流灌注的研究*

姜 峰¹ 管骏涛¹ 宋佳成¹ 严降雨¹ 林 松² 陆 晓^{1,3}

摘要

目的:观察主动等长收缩训练对犬慢性缺血心肌血流灌注的影响。**方法:**应用Ameroid缩窄器制备犬慢性冠状动脉狭窄模型,造模成功后,将模型动物随机分为2组:对照组(CG组)(n=6),主动等长收缩训练组(AIE组)(n=6)。主动等长收缩训练:采用100%最大强度训练1min,休息1min,每日重复20次,每周训练5天,训练时程为6周。训练6周末,所有模型犬行心脏SPECT成像测定心肌缺血区域血流灌注,免疫组化法测定犬缺血心肌组织毛细血管密度。**结果:**AIE组缺血区域静息血流灌注心肌节段总评分(23.00 ± 2.35)较CG组(46.4 ± 8.88)明显降低($P < 0.05$),AIE组缺血心肌部位的毛细血管密度(22.40 ± 2.07)显著高于CG组(15.20 ± 5.40)($P < 0.05$)。**结论:**主动等长收缩训练可以增加慢性缺血犬的心肌毛细血管密度,促进缺血心肌的血流灌注。**关键词** 等长收缩;心肌缺血;心肌血流灌注;核素灌注显像;毛细血管密度**中图分类号:**R541.4, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2016)-06-0611-06**Isometric exercise training increases myocardial perfusion for chronic ischemic myocardium in canine/JI-ANG Feng, GUAN Juntao, SONG Jiacheng, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2016, 31 (6): 611—616**

Abstract

Objective: To investigate the effects of active isometric exercise training on capillary density and myocardial perfusion in canine model of chronic ischemic myocardium.**Method:** An Ameroid constrictor was placed around the left anterior descending branch of the left coronary artery in 12 canine. SPECT (single-photon emission computed tomography) imaging was used to evaluate myocardial perfusion. The animals were divided into active isometric exercise training group (AIE) (n=6) and control group (CG) (n=6). Canine in the AIE group performed active isometric exercises for 6 weeks, whereas canine in the CG group remained sedentary. The expression of capillary density was measured by immunohistochemical analysis. Myocardial perfusion was assessed by SPECT imaging.**Result:** The capillary density in the AIE training group (23.00 ± 2.35) was significantly higher than that in the CG group (46.4 ± 8.88) ($P < 0.05$). SPECT imaging showed that myocardial perfusion (22.40 ± 2.07) was significantly improved in the AIE training group (15.20 ± 5.40) ($P < 0.05$).**Conclusion:** Active isometric exercise could increase the capillary density in the canine model of chronic myocardial ischemia, and thus effectively increase the blood perfusion in ischemic myocardium.**Author's address** Dept. of Rehabilitation, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, 210029**Key word** isometric exercise; myocardial ischemia; myocardial perfusion; SPECT; capillary density

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2016.06.001

*基金项目:国家自然科学基金资助项目(81472164)

1 南京医科大学第一附属医院,南京,210029; 2 南京医科大学附属南京医院; 3 通讯作者

作者简介:姜峰,男,硕士研究生; 收稿日期:2016-01-21

冠心病已成为对人类威胁最大的疾病之一^[1]。改善缺血心肌血流灌注是治疗冠心病的主要方法^[2]。目前经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)及冠脉搭桥手术是改善缺血区域心肌灌注的常用方法^[3]。但是,有很大一部分患者由于各种客观条件因素限制不适合做PCI治疗和冠脉搭桥手术^[4-6],因此冠脉侧支生成即患者自身形成动脉“生物搭桥”以补充缺血区域心肌血供不足有可能成为冠心病患者极具潜力的治疗方法之一^[7]。

近年来国内外的实验证实等长收缩运动,不仅能够延长动力性运动的作用持续时间,还能有效地降低心绞痛、心肌缺血等的发生概率^[8],但是等长收缩运动能否促进缺血心肌侧支生成,改善血流灌注,仍缺少足够的研究来证实。本实验通过观察主动等长收缩训练对犬慢性缺血心肌血流灌注的影响,证明等长收缩训练的有效性及其安全性,为冠心病临床康复治疗开辟新途径提供详实的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性比格犬,普通级,月龄10—15个月,体质量(10.0±2.0)kg,购自南京医科大学实验动物中心[SCXK(苏)2014-0025]。动物饲养均采用标准饲料、自由饮水;饲养环境为温度、湿度、亮度控制的房间。动物在南京医科大学动物实验中心进行适应性饲养一周后进行手术造模及分组训练。实验方案遵循美国NIH公布的实验动物使用指南,并经南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 慢性心肌缺血模型的建立

该动物模型采用国内外较为成熟的造模技术^[9]。实验犬取右侧卧位,经3%戊巴比妥1ml/kg(CWE公司,美国)静脉麻醉;常规备皮、消毒、铺巾,气管插管,机械通气辅助呼吸,潮气量20ml/kg,呼吸频率15次/min,呼吸比1:2,氧浓度为300—400ml/min,静脉注射肌松剂罗库溴铵0.6mg/kg(默沙东公司,美国),于胸骨左缘第5肋间进胸,暴露心脏,使用2%利多卡因喷洒心脏表面,从而减少手术操作引起心脏的刺激反应。寻找到冠状动脉左前降支,于第一对角支上方,距离心耳边缘约0.5—1cm处放置内径1.75mm大小的Ameroid缩窄环(美国Rease-

arch Instruments, SW公司),闭式胸腔引流,逐层缝合后关闭胸腔,缝合皮下组织和皮肤,术后2h拔出引流管和气管插管。术后进行常规抗感染治疗,肌肉注射青霉素240万单位,每日2次,共3d。

1.3 主动等长收缩训练模型的建立

主动等长收缩训练采用固定犬的双侧前肢,使犬背负铅块,犬处于仅能依靠双侧后肢着地的站立体位来诱发双侧后肢的等长收缩运动,逐渐增加犬所背负铅块的重量,测定单次站起并能够维持1min所能背负的最大负荷(1RM)作为100%最大等长收缩训练强度。以1RM作为100%最大等长收缩训练强度。采用100%最大强度训练1min,休息1min,每日重复20次,每周训练5天,训练时程为6周。

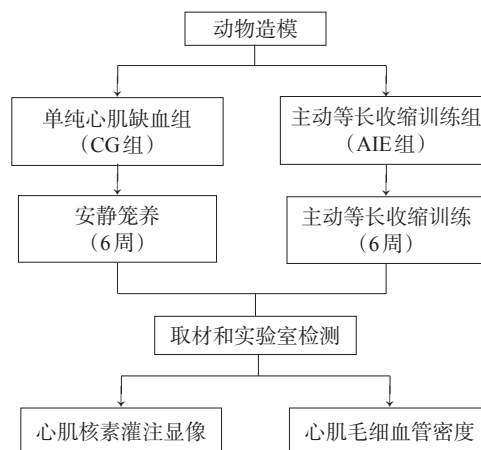
1.4 实验动物分组

成功造模的12只犬在休息1周后,随机分为对照组(control group, CG组)6只和主动等长收缩训练组(active isometric exercise, AIE组)6只。其中CG组继续安静饲养6周。AIE组进行主动等长收缩训练。实验流程见图1。

1.5 SPECT显像

运动训练6周后全部12只模型犬以3%戊巴比妥1ml/kg静脉麻醉后,静脉注射^{99m}Tcm-MIBI 20MBq/kg(江苏省原子能研究所),注射后15分钟行SPECT显像(Inveon, Siemens公司,德国),显像条件:双探头断层图像采集,层厚5.0mm,层间距0.8mm,管电压100kV,管电流80mA,使用矩阵128×128,放大倍数1.0,能峰140keV,窗宽20%,每11.25°

图1 实验流程图



采集1帧,各时间点分别以短轴、水平长轴和垂直长轴重建并融合心肌断层图像。放射性原子T99标记甲氧基异丁基乙腈(MIBI),能选择性被功能正常心肌吸收,聚集在正常心肌区域。吸收一定量放射性药物的心肌会在图像中呈现高密度区域。如果心肌有供血减少,MIBI吸收减少就会出现异常的暗区,表明此区域可能处于缺血状态。显像结果采用靶心图表示,靶心图将心脏分为前壁、前间壁、后间壁、下后壁、前侧壁、后侧壁、心尖7个区域,20个节段。节段心肌血流灌注情况采用半定量法节段评分:0分:正常;1分:轻度降低;2分:中度降低;3分:重度降低;4分:完全没有摄入。总的心肌血流灌注情况采用20个节段的评分相加即节段总评分来表示。

1.6 心肌组织毛细血管密度检测

心肌取材:AIE组及CG组在6周结束训练后采取安乐死。取材时静推3%戊巴比妥后迅速开胸游离心脏,于Ameroid阻断部位远端3mm处同一位置取冠状动脉左前降支支配区域心肌置于4%多聚甲醛中以备镜检。

免疫组织化学染色:经4%多聚甲醛溶液固定的心肌组织进行常规石蜡包埋,切片,脱蜡至水,厚度5 μ m,置于EDTA抗原修复缓冲液(pH9.0)的微波炉内进行抗原修复,室温放凉,PBS冲洗,3% H₂O₂室温孵育25min,PBS冲洗甩干,3% BSA室温封闭30min,甩干,一抗4 $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS冲洗,甩干,以vWF标记的二抗(美国Lab Vision公司)室温孵育50min,PBS冲洗,甩干,加入DAB(丹麦DAKO公司)显色,Harris苏木紫复染3min左右封片观察。经免疫组化染色的阳性微血管呈棕黄色。

毛细血管密度结果判断:采用Weidner法^[10]判断毛细血管密度:在光学显微镜(日本Olympus)低倍视野下(40倍及100倍)扫视完整的组织切片,在缺血周边区域选取内皮细胞染色清晰,背景对比良好,微血管数量最密集的部位,以染成棕黄色单个细胞或内皮细胞丛作为一个血管计算。使用image pro plus 6.0图像处理系统(USA Media Cybernetics),在上述指定的视野范围内随机选取5个视野,并以调整光学显微镜200倍视野计算所有染色阳性的微血管数,取其平均值作为毛细血管密度。染色的内皮细胞或内皮细胞簇与附近的微血管或其他结缔组

织分开,就可以视为一个微血管,不考虑有无血管腔存在作为判断血管的标准。光学显微镜下观察并选取典型视野摄片。

1.7 统计学分析

数据均以均数 $\pm$ 标准差表示。所有数据均经SPSS 17.0统计学软件检验呈正态性分布且方差齐性。组间比较采用独立样本t检验。

2 结果

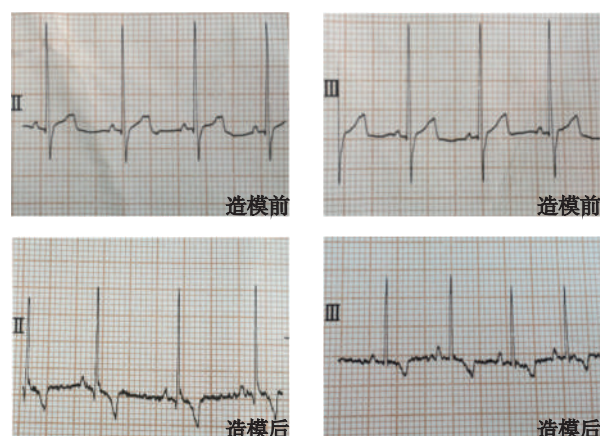
2.1 模型建立情况

共有14只犬进行慢性心肌缺血造模,1只于放置缩窄环过程中因血管破裂大出血死亡,1只因手术过程中突发室颤死亡。放置Ameroid缩窄环后即刻和术后4周,行12导联心电图检查。在置入Ameroid缩窄环后1h所有动物心电图均未出现急性心肌梗死图形(包括ST段抬高和非ST段抬高型心肌梗死)。置入Ameroid缩窄环后4周,所有模型犬心电图均有改变,以I、AVL和(或)II、III、AVF和(或)V4—V6导联ST段压低和(或)T波改变为主。见图2。

2.2 实验终点各组心肌血流灌注显像

心肌血流灌注采用心肌核素灌注显像靶心图进行评价,靶心图把心脏分为前壁、前间壁、后间壁、下后壁、前侧壁、后侧壁、心尖7个区域,20个节段。节段心肌血流灌注情况采用半定量法节段评分,总的心肌血流灌注情况采用20个节段的评分相加即节段总评分来表示。AIE组的心肌节段总评分(23.00 $\pm$ 2.35)低于CG组(46.40 $\pm$ 8.88)($P < 0.05$),提

图2 造模前后心电图



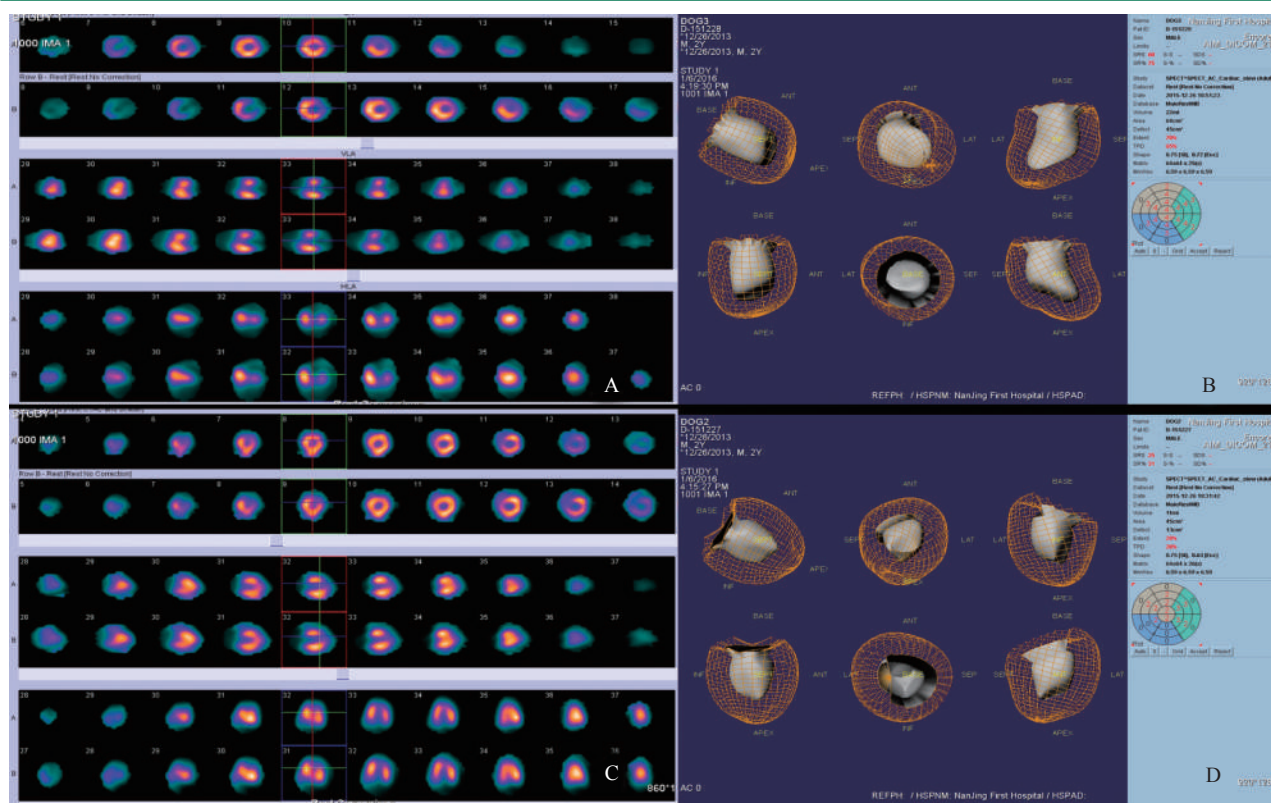
示AIE组的心肌灌注血流有明显改善。见图3。

2.3 实验终点各组毛细血管密度

免疫组化染色的vWF抗原阳性显示的微血管呈棕黄色。在本实验中,vWF作为内皮细胞的标志物,用来检测缺血区域毛细血管的数量。选取外直径 $<50\mu\text{m}$ 、环形的阳性区域,作为认定毛细血管的

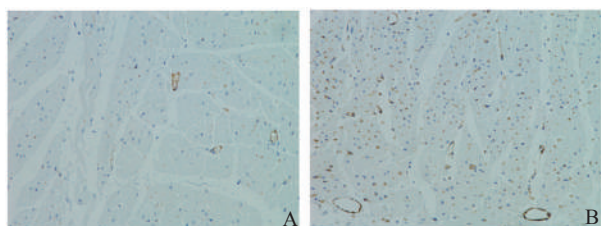
标准。计数方法以高倍镜下每张切片随机选5个视野。计算5个视野内毛细血管平均数,以每平方毫米毛细血管数表示毛细血管密度。等长收缩训练6周后,AIE组犬毛细血管密度(22.40 ± 2.07)明显高于CG组(15.20 ± 5.40)($P<0.05$)。见图4。

图3 各组心肌核素灌注显像及靶心图



注:A为CG组心肌核素灌注显像;B为CG组靶心图;C为AIE组心肌核素灌注显像;D为AIE组靶心图
橙红色高亮度区域越多,心肌节段总评分越低,显示存活心肌越多,心肌血流灌注越好。

图4 各组毛细血管密度



注:A为CG组缺血心肌毛细血管密度的表达;B为AIE组缺血心肌毛细血管密度的表达

3 讨论

本研究中采用慢性心肌缺血模型,观察等长收

缩训练是否能改善缺血心肌血流灌注。结果显示等长收缩训练组毛细血管密度明显高于对照组($P<0.05$),心肌核素灌注显像证实等长收缩训练组缺血心肌区域的心肌节段总评分明显低于对照组($P<0.05$),即等长收缩训练可以通过促进缺血心肌侧支生成,改善缺血区域血流灌注。

本研究在犬左冠状动脉前降支上放置 Ameroid 缩窄环复制慢性心肌缺血模型。Ameroid 缩窄环的外层为金属,内层为酪蛋白,是一种内径为1.5—2.5mm的双层环。其作用原理是置入体内的酪蛋白材料可吸收周围的组织液从而逐渐膨胀,而外层不

能变形,酪蛋白膨胀后只能向内挤压,造成被箍的冠状动脉狭窄乃至闭塞^[11-13]。该方法在国内外的很多动物实验中都得到证实,有较好的缓慢阻断冠状动脉供血,导致慢性心肌缺血的作用^[9]。与以往等长收缩训练模型建立不同,以往模型多采用麻醉状态下以感应电刺激诱发肌肉产生等长收缩运动^[14-15],而本研究首次采用了清醒状态下使犬双侧后肢负重站立诱发主动等长收缩运动,更贴近于临床,即临床患者采用主动等长收缩运动较被动等长收缩运动更简便更实用。这对于等长收缩训练以后在临床上的推广和应用具有更直接的借鉴价值。

等长收缩运动作为人类肌肉的基本运动形式,是指肌纤维的长度在肌肉收缩时保持不变,无关节活动,但肌肉内张力增加。既往的观点认为等长收缩运动能够引起血压的增加从而增加心脏后负荷,因此被排除于心脏康复之外。然而,最近国外实验证明:单独的握拳、负重运动或合并动力性运动与运动试验相比,产生较少的ST段下移及心律失常。冠心病患者在做动力性运动的同时进行等长收缩运动,不仅能够延长动力性运动的作用持续时间,还能有效地降低心绞痛、心肌缺血等的发生概率^[16]。等长收缩运动过程中心率和心输出量同时增高但是外周血管阻力却没有明显变化,导致的结果是血压即收缩压及舒张压均显著增高。本课题组前期的人体实验研究也证实正常人及冠心病患者等长收缩训练时心率、收缩压、舒张压均明显增加^[17]。由于冠状动脉主要在舒张期供血,等长收缩运动时舒张压增加可能可以促进冠状动脉血流灌注,改善心肌供血,缓解心绞痛症状^[18]。

本课题组前期的动物研究发现,采用麻醉状态下以电刺激坐骨神经诱发等长收缩运动,可以增加局部股动脉固有侧支开放,增加局部血流^[19]。Richards等^[20]临床研究发现让患者做等长握拳运动的同时,通过多普勒超声检测到前臂的血流量明显增加。但是等长收缩运动是否能够促进远隔缺血心肌的灌注目前研究较少。我课题组既往临床研究让冠心病患者在行经皮冠状动脉介入治疗术中,在球囊阻塞冠脉血管的同时做1min的等长握拳运动,发现与对照组相比,等长收缩训练组侧支循环指数明显增加,意味着单次等长收缩运动可以增加侧支血流

募集^[21],但是长期的等长收缩训练是否能够促进缺血心肌局部侧支生成,改善血流灌注,目前研究较少。

本研究通过观察主动等长收缩训练对远隔缺血心肌侧支生成的影响。发现经过6周的主动等长收缩训练,与对照组相比,训练组缺血心肌组织毛细血管密度显著增加,核素心肌灌注显像提示缺血心肌血流灌注显著改善,充分证明主动等长收缩训练可以改善远隔缺血心肌的血流灌注。有文献证实,传统的有氧训练尤其是缺血阈强度的有氧训练可以促进缺血心肌侧支生成^[22]。但在心肌缺血的基础上再次诱发缺血,存在伦理及安全性的顾虑。主动等长收缩训练不需要诱发心肌缺血,也不需要特别的设备及设置,临床应用简便安全。因此本研究发现不仅为等长收缩训练应用于心血管康复临床提供有力证据,且其改善远隔缺血心肌血流灌注即“远隔生物搭桥”作用,有可能为冠心病患者临床及康复治疗开拓一条安全有效经济的新途径。

本研究存在相应的不足,只观察了等长收缩训练可以促进缺血心肌的血流灌注,但是对其促进缺血心肌侧支生成的机制并没有做深入研究。由于成年后的侧支循环生成包括血管新生和动脉生成两部分^[23],血管新生是指从原有的毛细后微血管网上芽生分化出新生的、不具有完整中膜结构的毛细血管网的过程。而动脉生成是指原有闭合的侧支循环网开放并重塑,引起管径扩大,从而形成侧支交通,为闭塞血管起到自身搭桥作用^[24]。血管新生只能轻微改善缺血区血供,而动脉生成可以产生有功能的大侧支动脉,因此与血管新生相比可更有效恢复血管阻塞后下降的血流^[25]。本研究中等长收缩训练增加缺血心肌血流灌注究竟是通过促血管新生还是动脉生成目前还不清楚,本课题组将在未来的研究中进行进一步探索。

参考文献

- [1] Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, et al. Measuring the global burden of disease and risk factors, 1990—2001[M]. 2006;1:1—14.
- [2] Choi JH, Chang SA, Choi JO, et al. Frequency of myocardial infarction and its relationship to angiographic collateral flow in territories supplied by chronically occluded coronary

- arteries[J]. *Circulation*, 2013, 127(6):703—709.
- [3] McCullough PA. Coronary artery disease[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007, 2(3):611—616.
- [4] Seiler C, Stoller M, Pitt B, et al. The human coronary collateral circulation: development and clinical importance[J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(34):2674—2682.
- [5] Koerselman J, van der Graaf Y, de Jaegere PP, et al. Coronary collaterals: an important and underexposed aspect of coronary artery disease[J]. *Circulation*, 2003, 107(19):2507—2511.
- [6] Meier P, Seiler C. The coronary collateral circulation--clinical relevances and therapeutic options[J]. *Heart*, 2013, 99(13):897—898.
- [7] Seiler C, Meier P. Historical aspects and relevance of the human coronary collateral circulation[J]. *Curr Cardiol Rev*, 2014, 10(1):2—16.
- [8] Williams MA, Haskell WL, Ades PA, et al. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: 2007 update: a scientific statement from the American Heart Association Council on Clinical Cardiology and Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism[J]. *Circulation*, 2007, 116(5):572—584.
- [9] Hartman JC, Wartier DC. A model of multivessel coronary artery disease using conscious, chronically instrumented dogs [J]. *J Pharmacol Methods*, 1990, 24(4):297—310.
- [10] Weidner N, Semple JP, Welch WR, et al. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 1991, 324(1):1—8.
- [11] LITVAK J, SIDERIDES LE, VINEBERG AM. The experimental production of coronary artery insufficiency and occlusion[J]. *Am Heart J*, 1957, 53(4):505—518.
- [12] Roth DM, Maruoka Y, Rogers J, et al. Development of coronary collateral circulation in left circumflex Ameroid-occluded swine myocardium[J]. *Am J Physiol*, 1987, 253(5 Pt 2):H1279—1288.
- [13] O'Konski MS, White FC, Longhurst J, et al. Ameroid constriction of the proximal left circumflex coronary artery in swine. A model of limited coronary collateral circulation[J]. *Am J Cardiovasc Pathol*, 1987, 1(1):69—77.
- [14] Shen M, Gao J, Li J, et al. Effect of stimulation frequency on angiogenesis and gene expression in ischemic skeletal muscle of rabbit[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87(5):396—401.
- [15] 林松,陆晓,万里,等.麻醉犬等长收缩运动中血浆一氧化氮浓度变化及其对血流动力学的影响[J].*中国康复医学杂志*,2001,(06):23—26.
- [16] Pollock ML, Franklin BA, Balady GJ, et al. AHA Science Advisory. Resistance exercise in individuals with and without cardiovascular disease: benefits, rationale, safety, and prescription: An advisory from the Committee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention, Council on Clinical Cardiology, American Heart Association; Position paper endorsed by the American College of Sports Medicine[J]. *Circulation*, 2000, 101(7):828—833.
- [17] 蓝敏,励建安,周士枋,等.血浆内啡肽在等长收缩运动时对心血管运动反应的调节[J].*中华物理医学杂志*,1998,(02):43—46.
- [18] PS F, BA F, JP P. Training techniques in cardiac rehabilitation[M]. US:Human Kinetics Publishers. 1998. 69—73.
- [19] 韩良.等长收缩负荷对家兔股动脉固有侧支循环开放的影响[D].南京:南京医科大学,2009.41.
- [20] Richards JC, Crecelius AR, Larson DG, et al. Acute ascorbic acid ingestion increases skeletal muscle blood flow and oxygen consumption via local vasodilation during graded handgrip exercise in older adults[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309(2):H360—368.
- [21] Lin S, Lu X, Chen S, et al. Human coronary collateral recruitment is facilitated by isometric exercise during acute coronary occlusion[J]. *J Rehabil Med*, 2012, 44(8):691—695.
- [22] 黄澎,励建安,袁红洁,等.有氧运动训练对慢性冠状动脉狭窄后侧枝循环生成的初步研究[J].*中国康复医学杂志*,2002,(1):22—25.
- [23] Heil M, Eitenmüller I, Schmitz-Rixen T, et al. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences[J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1):45—55.
- [24] Cai W, Schaper W. Mechanisms of arteriogenesis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40(8):681—692.
- [25] Pöling J, Szibor M, Schimanski S, et al. Induction of smooth muscle cell migration during arteriogenesis is mediated by Rap2[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(10):2297—2305.