

# 迷走神经在生理性缺血训练改善心力衰竭大鼠心功能中的作用\*

程怡慧<sup>1</sup> 张秀<sup>1</sup> 张心彤<sup>1</sup> 王璐<sup>1</sup> 滕美玲<sup>1</sup> 陆晓<sup>1,2,3</sup>

## 摘要

**目的:**探讨生理性缺血训练(PIT)改善心力衰竭(心衰)大鼠心功能过程中迷走神经的作用及其发挥效应的分子生物学机制。

**方法:**30只大鼠随机分为假手术组(SO组)、单纯心衰组(HF组)、生理性缺血训练组(PIT组)、乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体拮抗剂组(M<sub>2</sub>R-组)及乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体激动剂组(M<sub>2</sub>R+组),每组6只。SO组按照心衰大鼠模型建立步骤,将线穿过左冠状动脉前降支不结扎,不训练;HF组为心衰大鼠模型,不训练;PIT组在HF组基础上进行训练,每次缺血5min,再灌注5min,5次/天,5天/周,持续8周;M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组分别在PIT组基础上每天尾静脉注射乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体特异性拮抗剂(0.5mg/kg, i.v.)及激动剂(0.2mg/kg, i.v.)。8周训练结束后,采用小动物二维超声系统检测心功能,Masson染色检测心肌梗死面积,qRT-PCR及Western Blot分别检测Bcl-2、Bax、MMP-9及TIMP-1的mRNA和蛋白表达水平,Ellman法检测乙酰胆碱酯酶活性,ELISA法检测去甲肾上腺素浓度。

**结果:**8周训练后,PIT及M<sub>2</sub>R+组的左室射血分数(LVEF)、Bcl-2、Bcl-2/Bax的值及TIMP-1显著高于HF组和M<sub>2</sub>R-组( $P < 0.05$ );相反地,心肌梗死面积、Bax、MMP-9及MMP-9/TIMP-1的值则显著低于HF组和M<sub>2</sub>R-组( $P < 0.05$ )。PIT组、M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组乙酰胆碱酯酶活性显著高于HF组( $P < 0.01$ ),前三组组间无显著差异( $P > 0.05$ )。与SO组相比,其余各组去甲肾上腺素浓度显著升高( $P < 0.01$ ),但各组组间均无显著差异( $P > 0.05$ )。乙酰胆碱酯酶活性与Bcl-2/Bax及LVEF, Bcl-2/Bax与LVEF呈正相关,乙酰胆碱酯酶活性与MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TIMP-1与LVEF呈负相关( $P < 0.001$ )。

**结论:**PIT可以通过提高迷走神经活性,减少心肌凋亡,减轻心肌间质纤维化,从而抑制心肌重构,改善心衰大鼠的心功能,该保护过程由乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体介导。

**关键词** 心力衰竭;生理性缺血训练;迷走神经;心肌重构;乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体

**中图分类号:**R541.4,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-06-0639-10

The role of vagus nerve in the process of physiological ischemic training improving cardiac function in heart failure rats/CHENG Yihui, ZHANG Xiu, ZHANG Xintong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021,36(6): 639—648

## Abstract

**Objective:** To explore the role of vagus nerve in the process of physiological ischemic training(PIT) improving cardiac function in rats with heart failure and underlying molecular biological mechanism.

**Method:** Thirty rats were randomized into sham operation (SO), heart failure (HF), physiological ischemic training (PIT), acetylcholine M<sub>2</sub> receptor antagonist (M<sub>2</sub>R-) and acetylcholine M<sub>2</sub> receptor agonist (M<sub>2</sub>R+) group. In SO group, according to the heart failure model, the line was crossed through the anterior descending branch of the left coronary artery without ligation, no training. HF group was established as heart failure model, no training. PIT group was given training on the basis of HF group accompanied with ischemia for 5min and reperfusion for 5min each time, 5 times per day, 5 days per week, for 8 weeks. On the basis of PIT

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.06.001

\*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772441, 82072546);国家自然科学基金青年科学基金项目(81902288);苏州市临床医学专家团队引进项目(SZYJTD201725);南京市功能重建与康复临床医学研究中心项目(2019060002)

1 南京医科大学第一附属医院康复医学中心,江苏南京,210029; 2 南京医科大学附属江苏盛泽医院; 3 通讯作者

第一作者简介:程怡慧,女,硕士研究生,初级治疗师; 收稿日期:2020-12-30

group, M<sub>2</sub>R- group and M<sub>2</sub>R+ group were given acetylcholine M<sub>2</sub> receptor specific antagonist (0.5mg/kg, i.v.) and agonist (0.2mg/kg, i.v.) by tail vein injection every day respectively. After 8 weeks training, animal two-dimensional ultrasound system was used to detect cardiac function, myocardial infarction area was detected by Masson staining, mRNA and protein expression of Bcl-2, Bax, MMP-9 and TIMP-1 were detected by qRT-PCR and Western Blot respectively, acetylcholinesterase activity was detected by Ellman, and noradrenaline concentration was detected by ELISA.

**Result:** After 8 weeks training, left ventricular ejection fraction (LVEF), Bcl-2, Bcl-2/Bax and TIMP-1 in PIT and M<sub>2</sub>R+ groups were significantly higher than those in HF group and M<sub>2</sub>R- group ( $P<0.05$ ). In contrast, the myocardial infarction area, Bax, MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 were significantly lower than those in HF group and the M<sub>2</sub>R-group ( $P<0.05$ ). The activity of acetylcholinesterase in PIT group, M<sub>2</sub>R- group and M<sub>2</sub>R+ group was significantly higher than those in HF group ( $P<0.01$ ). However, there was no significant differences between the former three groups ( $P>0.05$ ). The concentrations of norepinephrine were significantly higher in the other groups than in SO group ( $P<0.01$ ). On the contrary, there was no significant differences between the other groups ( $P>0.05$ ). The activity of acetylcholinesterase was positively correlated with Bcl-2/Bax and LVEF; Bcl-2/Bax was positively correlated with LVEF; the activity of acetylcholinesterase was negatively correlated with MMP-9/TIMP-1; MMP-9/TIMP-1 was negatively correlated with LVEF ( $P<0.001$ ).

**Conclusion:** PIT can upregulate the activity of vagus nerve, reduce myocardial apoptosis, and alleviate myocardial interstitial fibrosis, thereby inhibiting myocardial remodeling and improving cardiac function in rats with heart failure. This protective process is mediated by acetylcholine M<sub>2</sub> receptor.

**Author's address** Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210029

**Key word** heart failure; physiological ischemic training; vagus nerve; myocardial remodeling; acetylcholine M<sub>2</sub> receptor

心力衰竭(heart failure, HF,以下简称心衰)是各种心脏疾病的严重表现或终期阶段,患病率、死亡率和再住院率较高,给社会和家庭带来较大经济负担<sup>[1]</sup>。美国心脏协会和美国心脏病学会均推荐稳定的慢性期心衰患者进行以有氧训练为主的常规运动训练,可以改善临床症状,降低死亡率及再住院率,提高生存质量<sup>[2]</sup>。然而常规有氧运动的临床应用具有局限性,尤其是对于疾病早期、病情较重或合并并发症的心衰患者而言,有氧运动存在较大的风险与隐患。因此我们需要寻找一种安全有效且适用全部心衰人群的训练方法。

本课题组前期提出的生理性缺血训练(physiological ischemic training, PIT)指在正常肢体上进行反复短暂的生理性缺血及再灌注,对远隔组织产生保护作用的过程<sup>[3]</sup>。动物和临床研究均发现PIT可以安全有效地改善心梗后的侧支循环血流量,减少心肌梗死面积,其机制与远隔促进血管内皮生长因子、一氧化氮、成纤维细胞生长因子-2、单核细胞趋化因子-1等因子的释放相关<sup>[4-8]</sup>。既往研究发现8周的PIT可

以抑制心肌细胞凋亡,有效地改善心衰大鼠的心肌重构及心功能,但其具体的通路机制尚未知晓<sup>[9]</sup>。

HF的特征之一的是自主神经的紊乱,表现为交感神经活性增强和迷走神经活性减弱。长期交感神经刺激可导致心肌细胞的凋亡和坏死,心肌间质纤维化,促进心肌重构,迷走神经活性的低下使其对交感神经的拮抗作用下降,进一步加重自主神经的失衡,使心室功能不断恶化<sup>[10]</sup>。迷走神经末梢分泌乙酰胆碱,在心脏中与M型受体相结合,对心肌细胞进行调节,其中M<sub>2</sub>受体占绝对优势,激活后可以减慢心率,增加平滑肌收缩,减弱心肌收缩力。研究发现心衰后迷走神经功能的低下与M<sub>2</sub>受体的活性降低相关,激动M<sub>2</sub>受体可以产生抗细胞凋亡、抗炎效应,从而保护受损心肌<sup>[11-13]</sup>。现阶段众多研究者将提高迷走神经活性作为治疗心衰的靶点。多项动物研究提示电刺激迷走神经可以减慢心率,抑制交感神经兴奋,心肌细胞凋亡及间质纤维化,提高心衰后大鼠的心功能,减缓心肌重构<sup>[14-15]</sup>。临床研究也初步证实迷走神经刺激可以有效改善心衰患者的心功

能和生存质量<sup>[16-17]</sup>。另有研究证实数次肢体缺血再灌注对心脏的远隔保护作用与迷走神经的激活密切相关<sup>[18-20]</sup>。由此可见,迷走神经参与了PIT对心脏的保护过程,可能与抗凋亡、抑制间质纤维化及M<sub>2</sub>受体的参与相关,但其具体机制未知。

因此本研究旨在探讨PIT改善心衰大鼠心功能过程中迷走神经的作用及其发挥效应的分子生物学机制,从而为PIT在全范围慢性HF人群中的临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

30只SPF级健康雄性Wistar大鼠,8周龄,体重(200±20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCKY(京)2016-0006]。实验前适应性饲养1周,在室温23±2℃,相对湿度50%±10%下饲养,采用实验室饮食和饮水的标准方案。实验方案遵循美国NIH的实验动物使用指南,经南京医科大学动物伦理委员会批准(IACUC-1901019-1)。

按照随机数字表将大鼠随机分为以下5组,每组6只:①假手术组(sham-operated, SO):按照心肌梗死后慢性缺血性心力衰竭模型建立步骤,开胸后于左冠状动脉前降支处将6—0的线穿过但不结扎,安静笼养8周;②单纯心衰组(HF):建立心肌梗死后慢性缺血性心力衰竭模型,安静笼养8周;③生理性缺血训练组(PIT):在HF大鼠基础上行PIT;④乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体拮抗剂组(acetylcholine M<sub>2</sub> receptor antagonist, M<sub>2</sub>R-):在PIT大鼠基础上,每天尾静脉注射乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体拮抗剂Methoctramine(0.5mg/kg, i.v.);⑤乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体激动剂组(acetylcholine M<sub>2</sub> receptor agonist, M<sub>2</sub>R+):在PIT大鼠基础上,每天尾静脉注射乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体激动剂Oxotremorine(0.2mg/kg, i.v.)。

### 1.2 慢性缺血性心衰大鼠模型

10%水合氯醛(3.0ml/kg)腹腔注射以麻醉大鼠,麻醉后仰卧位固定于小动物手术台上,进行气管插管并连接小动物呼吸机。备皮消毒后,于第三、四肋间做一横向切口,钝性分离各层肌肉暴露胸膜及心脏,用镊子撕开心脏包膜,于左心耳与肺动脉圆锥交界下方1—2mm处寻找左冠状动脉前降支,使用6—0号缝

合线结扎左前降支,进针深度约1mm,宽度约2mm。左心室前壁颜色由红色转变为青紫或苍白,同步记录的心电图显示S-T段抬高、T波倒置则表明结扎成功。术后安静笼养4周后行小动物超声心电图检测,慢性心力衰竭大鼠模型建立成功的标准为:左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)<50%。

### 1.3 生理性缺血训练方案

采用无创止血带结扎大鼠双下肢肌肉最丰厚处,使其血流完全阻断,判断标准为:皮肤青紫、皮温下降、股动脉搏动消失。训练方案为缺血5min,再灌注5min,此为一次循环,5次循环/天,5天/周,训练8周。

### 1.4 心功能检测

训练8周后采用小动物超声心动成像系统(visualsonics Vevo3100)检测心功能,异氟烷麻醉大鼠,将其仰卧位固定,备皮后将探头置于其左前胸部,采用M型超声检测LVEF,以反映心脏功能状态,各测量值均取3个连续心动周期的平均值。

### 1.5 心肌梗死面积检测

训练8周后,于结扎点至心尖之间横截面切取大鼠心肌组织,约3mm厚,放入4%的多聚甲醛中固定,待固定状态良好后,进行脱水、石蜡包埋、切片(5μm)及Masson染色,在染色的切片中,心肌细胞呈红色,心肌胶原纤维(梗死的心肌组织由胶原纤维替代)呈蓝色。采用Image-pro plus 6.0(Media Cybernetics, Inc, Rockville, MD, USA)分析软件测定心肌梗死面积,计算蓝色胶原纤维面积占全部心肌组织面积的百分比。

### 1.6 Bcl-2、Bax、MMP-9及TIMP-1的表达水平检测

采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测Bcl-2、Bax、MMP-9及TIMP-1 mRNA表达水平,用Trizol法提取心肌梗死区域组织总RNA并定量,使用反转录试剂盒(Thermo)将mRNA反转录得cDNA,随后使用Stepone plus实时荧光定量PCR仪(美国ABI)进行PCR扩增。PCR内参为GAPDH,各mRNA引物序列信息见表1。采用2<sup>-ΔΔCT</sup>法计算各分子mRNA的相对表达量,每个实验组重复3次。

采用Western Blot法测定各因子蛋白表达水平,匀浆、离心提取心肌组织总蛋白,以β-Actin作为上样对照,取30μg蛋白进行凝胶电泳,100V恒压下转膜,室温环境在含5%脱脂牛奶TBST封闭液中封

闭1—2h,加入β-Actin(Servicebio, 1:1000)、Bcl-2(Affinity, 1:10000)、Bax(Servicebio, 1:1000)、MMP-9(Affinity, 1:1000)、TIMP-1(Servicebio, 1:1000)一抗,4°C孵育过夜,加入HRP标记山羊抗大鼠二抗(Servicebio, 1:2000)室温孵育1h,洗膜,ECL化学发光检测并采集图像,Alpha软件处理系统分析目标带的光密度值。

表1 mRNA引物序列

引物名	序列
GAPDH上游引物	5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3'
GAPDH下游引物	5'-GGTGAAGAATGGGAGTTGCT-3'
Bcl-2上游引物	5'-GGATCCAGGATAACGGAGGC-3'
Bcl-2下游引物	5'-ATGCACCCAGAGTGATGCAG-3'
Bax上游引物	5'-GGCGATGAACCTGACAACAAC-3'
Bax下游引物	5'-CCCAGTTGAAGTTGCCGTCT-3'
MMP-9上游引物	5'-GCAAACCCCTGCGTATTTCCATT-3'
MMP-9下游引物	5'-GCGATAACCATCCGAGCGAC-3'
TIMP-1上游引物	5'-GCCTCTGGCATCCTCTTGTG-3'
TIMP-1下游引物	5'-GAACCGAAACCTGTGGCAT-3'

1.7 乙酰胆碱酯酶活性检测

采用Ellman法测定心肌乙酰胆碱酯酶活性。将心肌组织漂洗后制备组织匀浆液,测定匀浆液蛋白浓度,随后按Ellman比色法标准步骤,测定各管吸光度(OD)。乙酰胆碱酯酶活性(U/mg prot)=(测定管OD值-空白管OD值)/(标准管OD值-空白管OD值)×标准品浓度(1μmol/ml)/蛋白浓度(mg/ml)。

1.8 去甲肾上腺素含量检测

采用酶联免疫吸附检测法(ELISA)测定血浆去甲肾上腺素浓度,按照ELISA测定试剂盒说明进行操作,根据标准品的浓度和OD值绘制标准曲线,根据标准曲线方程计算出样本浓度。

1.9 显著性分析

采用SPSS 25.0统计软件对数据进行分析,所有数据采用均数±标准差表示,经检验均满足正态性及方差齐性。组间比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA),多重比较采用最小显著差异法(least significant difference, LSD)。相关性分析采用Pearson相关分析。P<0.05认为差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 各组大鼠左室射血分数比较

8周训练前, HF组、PIT组、M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组的

LVEF组间无明显差异,差异无显著性意义(P>0.05)。实验终点时,SO组的LVEF显著高于HF组、PIT组、M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组,差异具有显著性意义(P<0.01)。PIT组和M<sub>2</sub>R+组的LVEF显著高于与HF组及M<sub>2</sub>R-组,PIT组与M<sub>2</sub>R+组相比,LVEF明显降低,差异具有显著性意义(P<0.05)。HF组LVEF显著高于M<sub>2</sub>R-组,差异具有显著性意义(P<0.01),见图1。

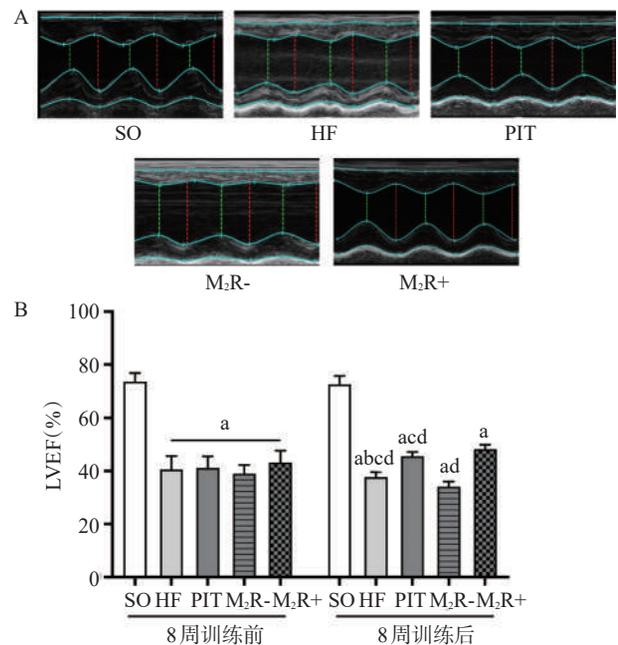
2.2 各组大鼠心肌梗死面积比较

实验终点时,SO组的心肌梗死面积显著低于HF组、PIT组、M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组,差异具有显著性意义(P<0.01)。PIT组和M<sub>2</sub>R+组的心肌梗死面积显著低于HF组及M<sub>2</sub>R-组,差异具有显著性意义(P<0.01)。HF组的心肌梗死面积显著低于M<sub>2</sub>R-组,差异具有显著性意义(P<0.01),见图2。

2.3 各组大鼠心肌组织中Bcl-2、Bax表达水平及Bcl-2/Bax比较

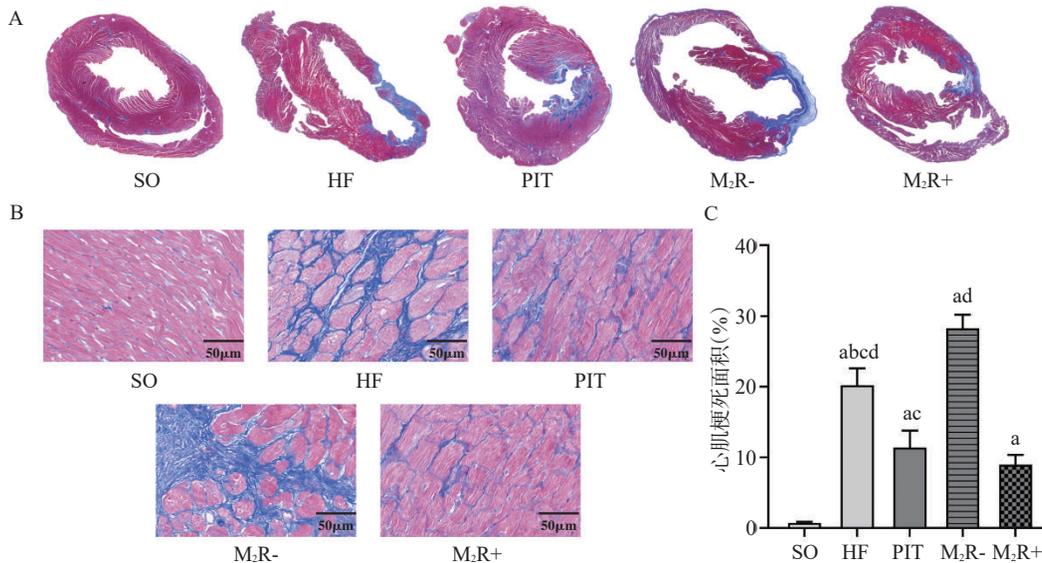
实验终点时,与SO组相比, HF组、PIT组及M<sub>2</sub>R-组Bcl-2的表达水平显著降低, HF组、PIT组、M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组Bax的表达水平显著升高, Bcl-2/Bax的比值显著降低,差异具有显著性意义(P<

图1 各组大鼠训练前后左室射血分数(LVEF)比较



A: 8周训练后各组大鼠超声心动图; B: 8周训练前和训练后各组大鼠的LVEF(%). 与SO组相比, a.P<0.01; 与PIT组相比, b.P<0.05; 与M<sub>2</sub>R-组相比, c.P<0.01; 与M<sub>2</sub>R+组相比, d.P<0.05

图2 各组大鼠心肌梗死面积比较



A: 各组大鼠心肌切片Masson染色图,正常心肌组织呈红色,心肌梗死组织呈蓝色;B: 倍镜下各组大鼠的Masson染色图,比例尺:50µm; C: 各组大鼠的心肌梗死面积(%).与SO组相比,a. $P<0.01$ ;与PIT组相比,b. $P<0.01$ ;与M<sub>2</sub>R-组相比,c. $P<0.01$ ;与M<sub>2</sub>R+组相比,d. $P<0.01$

0.05)。与PIT组和M<sub>2</sub>R+组相比, HF组及M<sub>2</sub>R-组Bcl-2的表达水平显著降低, Bax表达水平显著升高, Bcl-2/Bax的比值显著降低, PIT组与M<sub>2</sub>R+组相比, Bcl-2的表达水平显著降低, Bax的表达水平显著升高, Bcl-2/Bax的比值显著降低, 差异均具有显著性意义( $P<0.05$ )。HF组Bcl-2的表达水平, Bcl-2/Bax的比值显著高于M<sub>2</sub>R-组, 差异具有显著性意义( $P<0.05$ ), 见图3。

#### 2.4 各组大鼠心肌组织中MMP-9、TIMP-1表达水平及MMP-9/TIMP-1比较

实验终点时,与SO组相比, HF组、PIT组、M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组MMP-9的表达水平及MMP-9/TIMP-1的比值显著升高, HF组、PIT组及M<sub>2</sub>R-组TIMP-1表达水平显著降低, 差异具有显著性意义( $P<0.05$ )。与PIT组和M<sub>2</sub>R+组相比, HF组及M<sub>2</sub>R-组MMP-9的表达水平显著升高, TIMP-1的表达水平显著降低, MMP-9/TIMP-1的比值显著升高, PIT组与M<sub>2</sub>R+组相比, MMP-9的表达水平显著升高, TIMP-1的表达水平显著降低, MMP-9/TIMP-1的比值显著升高, 差异均具有显著性意义( $P<0.05$ )。HF组TIMP-1的表达水平显著高于M<sub>2</sub>R-组, MMP-9/TIMP-1的比值显著低于M<sub>2</sub>R-组, 差异具有显著性意义( $P<0.05$ ), 见图4。

#### 2.5 各组大鼠心肌组织中乙酰胆碱酯酶活性比较

实验终点时, SO组的乙酰胆碱酯酶活性显著高于HF组、PIT组、M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组, 差异均具有显著性意义( $P<0.01$ )。PIT组、M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组的乙酰胆碱酯酶活性显著高于HF组, 差异具有显著性意义( $P<0.01$ )。PIT组的乙酰胆碱酯酶活性比M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组略低( $P>0.05$ ), 见图5。

#### 2.6 各组大鼠血浆中去甲肾上腺素浓度比较

实验终点时, SO组去甲肾上腺素浓度显著低于HF组、PIT组、M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组, 差异均具有显著性意义( $P<0.01$ )。HF组、PIT组、M<sub>2</sub>R-组及M<sub>2</sub>R+组去甲肾上腺素浓度的组间比较均无显著差异, 差异无显著性意义( $P>0.05$ ), 见图6。

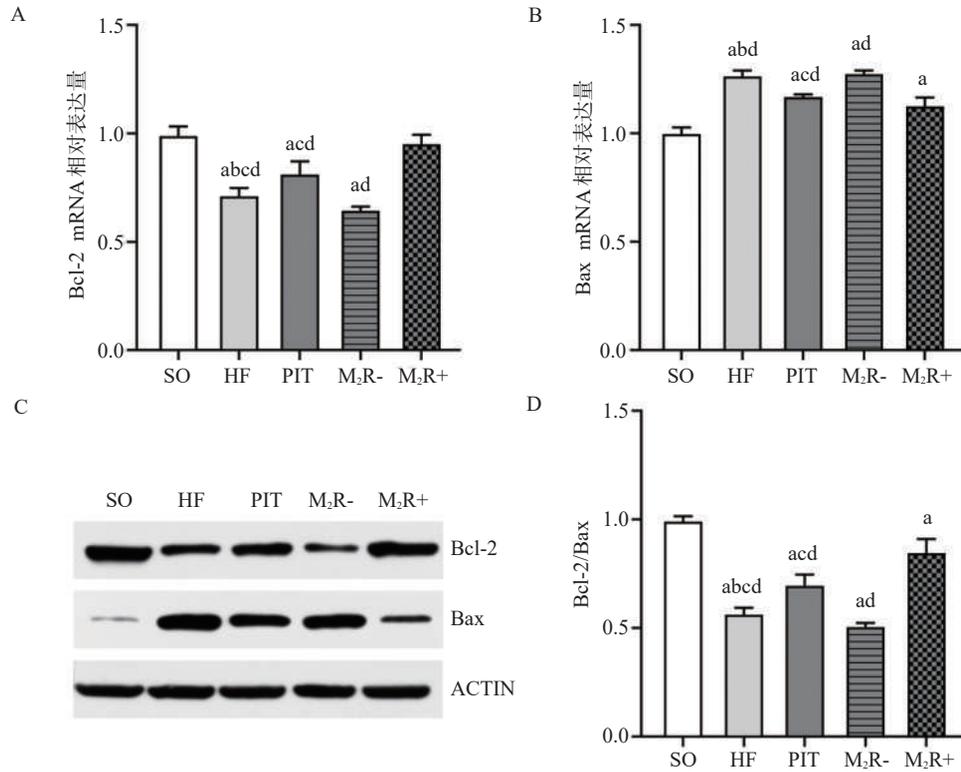
#### 2.7 相关性分析

乙酰胆碱酯酶活性与Bcl-2/Bax, Bcl-2/Bax与LVEF呈正相关, 乙酰胆碱酯酶活性与MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TIMP-1与LVEF呈负相关, 且乙酰胆碱酯酶活性与LVEF呈正相关( $P<0.001$ ), 见图7。

### 3 讨论

本研究通过慢性缺血性心衰大鼠模型, 探索迷走神经在PIT改善心衰后心功能中的作用及其分子生物学机制。结果显示PIT可以通过提高迷走神经

图3 各组大鼠心肌组织中Bcl-2、Bax表达水平及Bcl-2/Bax比较



A: 各组大鼠Bcl-2 mRNA表达水平; B: 各组大鼠Bax mRNA表达水平; C: 各组大鼠Bcl-2和Bax蛋白表达水平(Western Blot图); D: 各组大鼠Bcl-2/Bax的比值。与SO组相比, a.  $P < 0.05$ ; 与PIT组相比, b.  $P < 0.05$ ; 与M<sub>2</sub>R-组相比, c.  $P < 0.05$ ; 与M<sub>2</sub>R+组相比, d.  $P < 0.05$

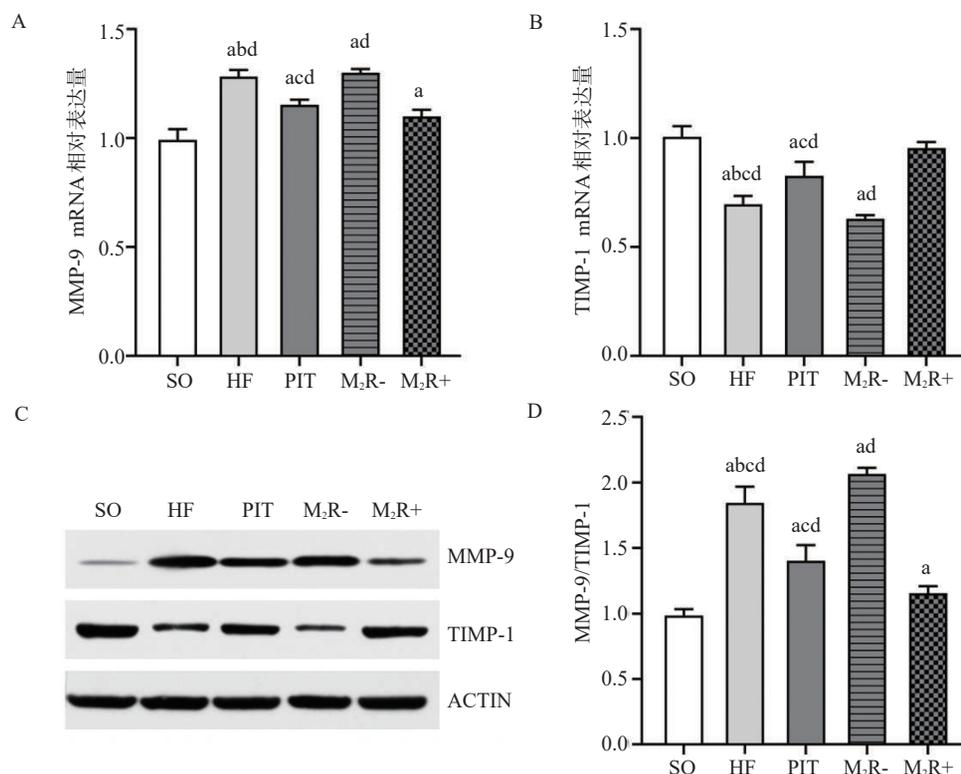
活性, 发挥由乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体介导的减轻心肌凋亡与间质纤维化的作用, 从而抑制心肌重构, 改善心衰大鼠的心功能。

基于有氧运动治疗慢性心衰的局限性, 我们提出了安全有效且应用范围较广的生理性缺血训练。虽然本课题组的前期研究已初步证实PIT可以改善心衰, 但其作用机制不详<sup>[9]</sup>。自主神经失衡是心衰不断发展的重要因素, 许多研究通过电刺激迷走神经提高迷走神经活性以纠正该失衡状态, 发现迷走神经刺激可以抑制心肌重构, 改善心衰<sup>[14-15]</sup>。同时有研究报道PIT和迷走神经在心脏保护过程中具有密不可分的联系, 但未见其在心衰中的联系<sup>[18-20]</sup>。因此我们探索了PIT保护心衰过程中迷走神经的作用, 并进一步对其作用机制进行探讨, 为将PIT转向心衰治疗的临床应用提供理论基础。

本研究发现PIT组心肌梗死面积显著低于HF组, 乙酰胆碱酯酶的活性及LVEF显著高于HF组,

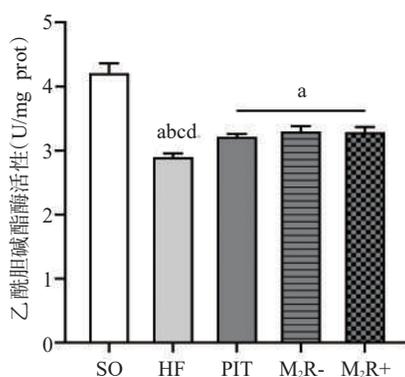
且乙酰胆碱酯酶活性与LVEF呈正相关。乙酰胆碱酯酶可以快速水解神经末梢释放的乙酰胆碱, 迷走神经兴奋时神经末梢乙酰胆碱释放量增加, 乙酰胆碱酯酶的活性也会随之增加, 因此乙酰胆碱酯酶活性可以间接反映迷走神经末梢释放的乙酰胆碱含量, 以此反映迷走神经的活性。上述结果从侧面证明迷走神经在PIT改善心衰大鼠的心功能中发挥作用。当使用乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体拮抗剂后, 与PIT组相比, 心肌梗死面积显著增大, LVEF显著下降, PIT对心脏的远隔保护作用消失; 使用乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体激动剂后, 与PIT组相比, LVEF显著提高, PIT对心脏的远隔保护作用加强, 进一步证实迷走神经在PIT介导的心功能保护中具有重要作用, PIT通过提高迷走神经活性发挥其改善心功能的作用。我们在M<sub>2</sub>R-组和M<sub>2</sub>R+组观察到乙酰胆碱酯酶活性增加的现象, 其原因可能是M<sub>2</sub>受体拮抗剂和激动剂与M<sub>2</sub>受体特异性结合后阻止了乙酰胆碱与M<sub>2</sub>受体的结

图4 各组大鼠心肌组织中MMP-9、TIMP-1表达水平及MMP-9/TIMP-1比较



A: 各组大鼠MMP-9 mRNA表达水平; B: 各组大鼠TIMP-1 mRNA表达水平; C: 各组大鼠MMP-9和TIMP-1蛋白表达水平(Western-Blot图); D: 各组大鼠MMP-9/TIMP-1的比值。与SO组相比, a.  $P < 0.05$ ; 与PIT组相比, b.  $P < 0.05$ ; 与M<sub>2</sub>R<sup>-</sup>组相比, c.  $P < 0.05$ ; 与M<sub>2</sub>R<sup>+</sup>组相比, d.  $P < 0.05$

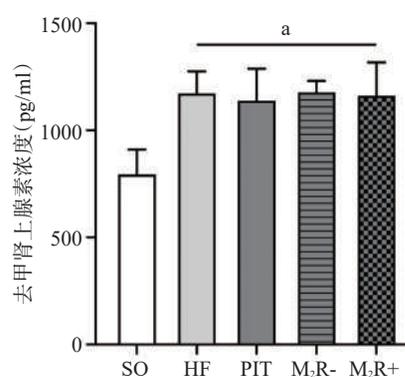
图5 各组大鼠心肌组织中乙酰胆碱酯酶活性比较



与SO组相比, a.  $P < 0.01$ ; 与PIT组相比, b.  $P < 0.01$ ; 与M<sub>2</sub>R<sup>-</sup>组相比, c.  $P < 0.01$ ; 与M<sub>2</sub>R<sup>+</sup>组相比, d.  $P < 0.01$

合,导致突触间隙中游离乙酰胆碱含量的增加,乙酰胆碱酯酶活性随之增加。此外,在注射乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体拮抗剂后,心肌梗死面积明显高于HF组,LVEF

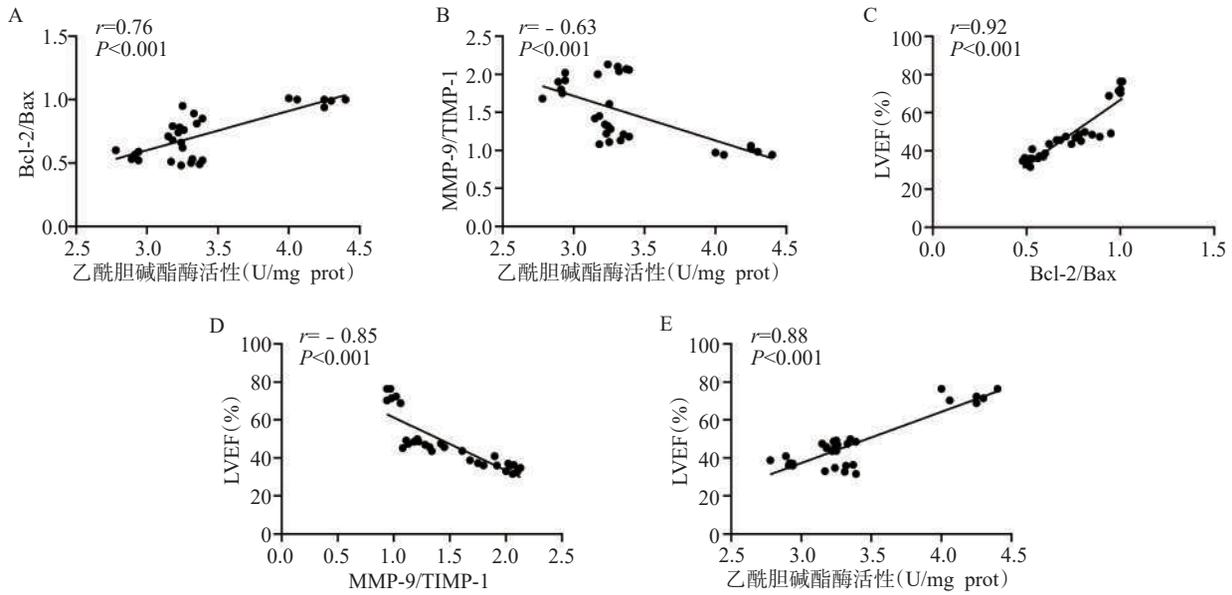
图6 各组大鼠血浆中去甲肾上腺素浓度比较



与SO组相比, a.  $P < 0.01$

明显低于HF组,说明即使心衰后迷走神经活性有所下降,但其仍能发挥一定作用,若完全阻断迷走神经,会使心衰进一步加重,强调了纠正自主神经的失

图7 相关性分析



A: 乙酰胆碱酯酶活性与 Bcl-2/Bax 的相关性分析,  $r=0.76, P<0.001$ ; B: 乙酰胆碱酯酶活性与 MMP-9/TIMP-1 的相关性分析,  $r=-0.63, P<0.001$ ; C: Bcl-2/Bax 与 LVEF 的相关性分析,  $r=0.92, P<0.001$ ; D: MMP-9/TIMP-1 与 LVEF 的相关性分析,  $r=-0.85, P<0.001$ ; E: 乙酰胆碱酯酶活性与 LVEF 的相关性分析,  $r=0.88, P<0.001$

衡在治疗心衰中的重要作用。

心肌重构是心衰发生及发展的重要病理机制, 心肌凋亡参与心肌重构的过程。Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡过程中具有重要作用, 其中 Bcl-2 蛋白可以抑制细胞凋亡, 而其同源水溶性蛋白 Bax 则促进细胞凋亡, Bcl-2/Bax 的比值可反映细胞凋亡的情况。有研究表明刺激迷走神经可以提高 Bcl-2 的表达, 减少细胞凋亡, 改善心肌缺血再灌注的损伤<sup>[21]</sup>。在心肌梗的豚鼠上进行迷走神经刺激, 发现迷走神经刺激可以降低 Bax 的表达, 改善心功能<sup>[22]</sup>。那么 PIT 通过激活迷走神经改善心衰后心功能的过程中可能也涉及抗凋亡的机制。本研究发现对心衰大鼠实施 PIT 后, 与 HF 组相比, 心肌组织中的 Bcl-2 表达量升高, Bax 表达量降低, Bcl-2/Bax 的值显著增高, 乙酰胆碱酯酶活性和 LVEF 显著提高, 且 Bcl-2/Bax 与乙酰胆碱酯酶活性和 LVEF 均呈直线正相关。初步提示 Bcl-2 和 Bax 可能参与了 PIT 提高迷走神经活性从而改善心衰大鼠心功能的过程。在乙酰胆碱 M<sub>2</sub> 受体被拮抗剂阻断后, 与 PIT 组相比, Bax 表达量显著增加, Bcl-2 表达量、Bcl-2/Bax 的值及 LVEF 显著降低, 提示迷走神经介导的 PIT 对心脏的保护作用消失;

而乙酰胆碱 M<sub>2</sub> 受体被激动后, 与 PIT 组相比, Bax 表达量明显下降, Bcl-2 表达量、Bcl-2/Bax 的值及 LVEF 明显升高, 提示迷走神经介导的 PIT 对心脏的保护作用加强。以上结果证明 PIT 通过提高迷走神经活性, 调控 Bcl-2 和 Bax 的表达, 发挥抗心肌细胞凋亡的作用, 抑制心肌重构, 从而改善心衰大鼠的心功能。

心肌细胞外基质过度纤维化同样也是心肌重构的关键因素, 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是特异性降解细胞外基质成分的水解酶, 金属蛋白酶组织抑制因子 (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs) 是 MMPs 的内源性抑制剂, 细胞外基质胶原纤维的稳态与 MMPs 与 TIMPs 的平衡密切相关。研究发现 MMPs 家族中的 MMP-9 能溶解心肌胶原基质, 诱发心衰后的间质纤维化, 其特异性抑制因子 TIMP-1 则能抑制 MMP-9 的活性, 延缓间质纤维化<sup>[23]</sup>。因此 MMP-9/TIMP-1 可反映心衰后间质纤维化的严重程度。本研究结果显示对心衰大鼠实施 PIT 后, 与 HF 组相比, 心肌组织中的 MMP-9 表达量降低, TIMP-1 表达量增高, MMP-9/TIMP-1 的值明显降低, 乙酰胆碱酯

酶活性和LVEF显著提高,且MMP-9/TIMP-1与乙酰胆碱酯酶活性和LVEF均呈直线负相关,初步说明MMP-9和TIMP-1在PIT激活迷走神经继而保护心脏的过程具有一定的作用。使用乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体拮抗剂后,与PIT组相比,MMP-9表达量及MMP-9/TIMP-1的值明显增大,TIMP-1表达量及LVEF明显降低,提示迷走神经介导的PIT对心脏的保护作用消失;而使用乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体激动剂后,与PIT组相比,MMP-9表达量及MMP-9/TIMP-1的值显著降低,TIMP-1表达量及LVEF显著增高,提示迷走神经介导的PIT对心脏的保护作用加强。本研究中的心梗面积采用Masson染色法测量,其中染为蓝色的组织为心肌胶原纤维,由于坏死的心肌组织两周后会由纤维组织替代,故本文中心肌梗死的面积即为心肌胶原纤维的面积。该结果同样表明,与HF组大鼠相比,PIT干预后心衰大鼠的胶原纤维含量显著减少,M<sub>2</sub>R-组显著增高,在组织形态学层面也证明了PIT可以通过激活迷走神经改善心衰后的心肌纤维化与心肌重构。提示PIT通过提高迷走神经活性,调控MMP-9和TIMP-1的表达,减轻间质纤维化,从而抑制心肌重构,改善心衰大鼠的心功能。

心脏迷走神经起自脑干的迷走神经背核和疑核,下行至心脏脂肪垫处换元,发出节后神经纤维,节后纤维于心肌接头处释放乙酰胆碱,激活乙酰胆碱M型受体,心脏上的M型受体主要为M<sub>2</sub>受体。既往研究报道,乙酰胆碱可以通过激活M<sub>2</sub>受体下调TNF- $\alpha$ 的表达,发挥抗炎作用,从而保护缺氧损伤的心肌<sup>[13]</sup>。本研究通过使用乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体的特异性拮抗剂和激动剂,初步探讨M<sub>2</sub>受体在迷走神经介导的PIT对心脏保护过程中的作用。在使用M<sub>2</sub>受体拮抗剂后,PIT发挥的抗凋亡、抑制间质纤维化、减少心肌梗死面积、提高LVEF等心脏保护作用均消失,而使用M<sub>2</sub>受体激动剂后,PIT发挥的心脏保护作用被增强,可说明PIT激活迷走神经后,由M<sub>2</sub>受体介导抗心肌凋亡、减轻间质纤维化的保护效应,从而抑制心肌重构,改善心衰大鼠心功能。

有研究表明迷走神经刺激改善心衰大鼠心功能的作用机制与其抑制交感神经活性、降低交感神经密度相关<sup>[24]</sup>。交感神经末梢分泌去甲肾上腺素,与 $\alpha$ 1肾上腺素能受体及心肌的 $\beta$ 1肾上腺素能受体结合

后发挥交感神经的效应,因此本研究采用去甲肾上腺素浓度反映交感神经的活性。本研究发现在进行PIT干预后去甲肾上腺素浓度与HF组无明显差异,M<sub>2</sub>受体拮抗剂和激动剂应用后,与PIT组相比同样无明显差异,表明PIT干预对交感神经活性的影响不大。上述讨论已证明M<sub>2</sub>受体介导PIT的保护过程,而M<sub>2</sub>受体主要由迷走神经节后纤维分泌的乙酰胆碱来激活,这一过程并不涉及交感神经的参与。以上提及的迷走神经刺激之所以可以抑制交感神经兴奋性的原因可能在于电刺激的靶点在迷走神经节前纤维,刺激可导致迷走神经的感觉传入增强,将信号传至中枢,通过中枢反射性调节交感神经的活性。此外,也有研究证明迷走神经刺激通过抑制临近的星状神经节的组织学重构来降低心脏交感神经的兴奋性<sup>[25]</sup>。

综上所述,PIT可以通过提高迷走神经活性,发挥由乙酰胆碱M<sub>2</sub>受体介导的抗心肌凋亡、减轻间质纤维化的作用,从而抑制心肌重构,改善心衰大鼠的心功能。本研究仅证实了PIT通过提高迷走神经活性改善心衰后的心功能,但PIT的实施部位位于远端肢体,迷走神经起自于脑内迷走神经背核和疑核,PIT如何从远隔处激活迷走神经,其具体机制尚未明确,需要进一步研究。

## 参考文献

- [1] 王华, 梁延春. 中国心力衰竭诊断和治疗指南2018[J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(10): 760—789.
- [2] Yancy C, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2017 ACC/AHA/HFSA focused update of the 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American college of cardiology/American heart association task force on clinical practice guidelines and the heart failure society of America[J]. Circulation, 2017, 136(6): e137—161.
- [3] 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.
- [4] Zheng Y, Lu X, Li J, et al. Impact of remote physiological ischemic training on vascular endothelial growth factor, endothelial progenitor cells and coronary angiogenesis after myocardial ischemia[J]. Int J Cardiol, 2014, 177(3): 894—901.
- [5] 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]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2014, 15(4): 280—287.
- [6] Lin S, Chen Y, Li Y, et al. Physical ischaemia induced by isometric exercise facilitated collateral development in the remote ischaemic myocardium of humans[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2014, 127(10): 581—588.
- [7] 耿灿茹, 管骏涛, 陆晓. 成纤维细胞生长因子-2在等长收缩促进远隔缺血心肌侧支动脉生成中的作用[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2018, 40(05): 331—335.
- [8] 管骏涛, 耿灿茹, 陆晓. 单核细胞趋化因子-1在等长收缩运动促进大鼠缺血心肌侧支动脉生成中的作用[J]. *中国康复医学杂志*, 2017, 32(8): 856—862.
- [9] 王璐, 程怡慧, 张秀, 等. 生理性缺血训练对慢性心力衰竭大鼠心功能及心肌重构的影响[J]. *中国康复医学杂志*, 2020, 35(6): 641—646.
- [10] Kobayashi M, Massiello A, Karimov JH, et al. Cardiac autonomic nerve stimulation in the treatment of heart failure [J]. *Ann Thorac Surg*, 2013, 96(1): 339—345.
- [11] Dunlap M, Bibeovski S, Rosenberry T, et al. Mechanisms of altered vagal control in heart failure: influence of muscarinic receptors and acetylcholinesterase activity[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285(4): H1632—1640.
- [12] Liao F, Zheng Y, Cai J, et al. Catestatin attenuates endoplasmic reticulum induced cell apoptosis by activation type 2 muscarinic acetylcholine receptor in cardiac ischemia/reperfusion[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16590.
- [13] Li D, Liu J, Liu B, et al. Acetylcholine inhibits hypoxia-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  production via regulation of MAPKs phosphorylation in cardiomyocytes[J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(4): 1052—1059.
- [14] Agarwal R, Mokolke E, Ruble SB, et al. Vagal nerve stimulation evoked heart rate changes and protection from cardiac remodeling[J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2016, 9(1): 67—76.
- [15] Sabbah HN, Ilsar I, Zaretsky A, et al. Vagus nerve stimulation in experimental heart failure[J]. *Heart Fail Rev*, 2011, 16(2): 171—178.
- [16] Premchand RK, Sharma K, Mittal S, et al. Autonomic regulation therapy via left or right cervical vagus nerve stimulation in patients with chronic heart failure: results of the ANTHEM-HF trial[J]. *J Card Fail*, 2014, 20(11): 808—816.
- [17] Zannad F, De Ferrari GM, Tuinenburg AE, et al. Chronic vagal stimulation for the treatment of low ejection fraction heart failure: results of the neural cardiac therapy for heart failure (NECTAR-HF) randomized controlled trial[J]. *Eur Heart J*, 2015, 36(7): 425—433.
- [18] Hausenloy DJ, Bøtker HE, Ferdinandy P, et al. Cardiac innervation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection[J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(7): 1167—1177.
- [19] Donato M, Buchholz B, Rodríguez M, et al. Role of the parasympathetic nervous system in cardioprotection by remote hindlimb ischaemic preconditioning[J]. *Exp Physiol*, 2013, 98(2): 425—434.
- [20] Mastitskaya S, Marina N, Gourine A, et al. Cardioprotection evoked by remote ischaemic preconditioning is critically dependent on the activity of vagal pre-ganglionic neurons [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(4): 487—494.
- [21] 雷玉华, 赵劲波, 张长江, 等. 颈迷走神经刺激对大鼠心肌缺血再灌注损伤心肌氧化应激和细胞自噬的影响研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2018, 37(2): 153—155.
- [22] Beaumont E, Southerland EM, Hardwick JC, et al. Vagus nerve stimulation mitigates intrinsic cardiac neuronal and adverse myocyte remodeling postmyocardial infarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015, 309(7): H1198—1206.
- [23] Polyakova V, Loeffler I, Hein S, et al. Fibrosis in end-stage human heart failure: severe changes in collagen metabolism and MMP/TIMP profiles[J]. *Int J Cardiol*, 2011, 151(1): 18—33.
- [24] Sun J, Lu Y, Huang Y, et al. Unilateral vagus nerve stimulation improves ventricular autonomic nerve distribution and functional imbalance in a canine heart failure model [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(6): 9334—9340.
- [25] Shen MJ, Shinohara T, Park HW, et al. Continuous low-level vagus nerve stimulation reduces stellate ganglion nerve activity and paroxysmal atrial tachyarrhythmias in ambulatory canines[J]. *Circulation*, 2011, 123(20): 2204—2212.