

生理性缺血训练改善心肌梗死后慢性心力衰竭大鼠心功能及心室重塑的神经机制*

张 秀¹ 程怡慧¹ 张心彤¹ 王 璐¹ 滕美玲¹ 陆 晓^{1,2,3}

摘要

目的:探讨生理性缺血训练(PIT)改善心肌梗死后慢性心衰大鼠心功能及心室重塑的神经机制。

方法:健康雄性 Wistar 大鼠随机分为生理性缺血训练组(PIT组)、迷走神经切断组(VN-cut组)、单纯心衰组(CHF组)及假手术组(SO组)。采用结扎左冠状动脉前降支的方法制备心肌梗死后慢性心衰模型。PIT组进行慢性心衰造模,同时进行PIT,PIT方案为双下肢缺血5min,再灌注5min,5次/天,5天/周,持续8周;VN-cut组进行慢性心衰及右侧迷走神经切断造模,同时进行PIT;CHF组进行慢性心衰造模,不进行PIT;SO组大鼠行开胸手术,6-0结扎线穿过心脏而不结扎,不进行PIT,安静笼养。训练8周后,采用小动物超声心动图检测心功能,随后取左心室肌进行以下检测:Masson染色测心肌梗死面积,RT-PCR检测Bcl-2/Bax及MMP9/TIMP-1的mRNA含量,Ellman法检测乙酰胆碱酯酶活性,Karnovsky-Rosenthal法检测胆碱能神经密度。

结果:训练8周后,PIT组与CHF组相比,左室射血分数(LVEF)、Bcl-2/Bax及MMP9/TIMP-1的比值、乙酰胆碱酯酶活性、胆碱能神经密度改善均有显著性意义($P<0.05$)。PIT组与VN-cut组相比,LVEF、心肌梗死面积、Bcl-1/Bax及MMP9/TIMP-1的比值、胆碱能神经密度改善均有显著性意义($P<0.05$),CHF组与VN-cut组相比Bcl-1/Bax及MMP9/TIMP-1的比值改善有显著性意义($P<0.05$)。相关性分析显示,Bcl-2/Bax的比值与乙酰胆碱酯酶活性、胆碱能神经密度之间呈直线正相关($P<0.01$),而MMP9/TIMP-1的比值与乙酰胆碱酯酶活性、胆碱能神经密度之间呈直线负相关($P<0.01$)。

结论:生理性缺血训练通过提高乙酰胆碱酯酶活性及胆碱能神经密度,进而提高迷走神经活性。相关性分析表明,心肌梗死后心室重构受迷走神经活性相关因子调控,因此,有理由推测生理性缺血训练可调控迷走神经活性相关因子改善心肌梗死后慢性心衰大鼠的心功能及心室重塑。

关键词 生理性缺血训练;迷走神经;心功能;心室重塑

中图分类号:R493,R542.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2021)-08-0915-08

Neural mechanism of physiological ischemic training in improving cardiac function and ventricular remodeling in chronic heart failure after myocardial infarction/ZHANG Xiu, CHENG Yihui, ZHANG Xintong, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2021, 36(8): 915—922

Abstract

Objective: To investigate the neural mechanism of physiological ischemic training (PIT) in improving cardiac function and ventricular remodeling in rats with chronic heart failure induced by myocardial infarction.

Method: Healthy male Wistar rats were randomized into physiological ischemia training group (PIT group), vagal nerve cut group (VN-cut group), chronic heart failure group (CHF group) and sham operation group (SO group). The chronic heart failure model was prepared by ligating the anterior descending branch of left coro-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2021.08.003

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772441);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,江苏省南京市,210029; 2 南京医科大学附属江苏盛泽医院康复医学科; 3 通讯作者
第一作者简介:张秀,女,硕士研究生; 收稿日期:2020-11-23

nary artery (LAD). The PIT group received PIT training in addition to thoracotomy and LAD ligation. The PIT training protocol was consisted of 5 min of ischemia followed by 5 min of perfusion, 5 cycles a day, 5 days per week for 8 weeks. The right vagal nerve was cut off in the VN-cut group in addition to thoracotomy, LAD ligation and PIT training. The CHF group received both thoracotomy and LAD ligation. Rats in the SO group only received thoracotomy with no ligation or training. After 8 weeks of training, cardiac function was detected with echocardiography. Masson staining was used to measure size of myocardial infarction. RT-PCR was used to detect mRNA concentration of Bcl-1/Bax and MMP9/TIMP-1. Ellman method was used to detect acetylcholinesterase activity, and Karnovsky-Roots method was for cholinergic nerve density.

Result: After 8 weeks training, the left ventricular ejection fraction (LVEF), the ratio of Bcl-2/Bax and MMP9/TIMP-1, the acetylcholinesterase activity, and the cholinergic nerve density were improved significantly in the PIT group when compared with those in the CHF group ($P<0.05$). Compared with the VN-cut group, the PIT group significantly improved the LVEF, the myocardial infarction area, the ratio of Bcl-2/Bax and MMP9/TIMP-1, and the cholinergic nerve density ($P<0.05$). Compared with the VN-cut group, the improvement in the ratio of Bcl-2/Bax and MMP9/TIMP-1 was statistically significant in the CHF group ($P<0.05$). Correlation analysis showed that the ratio of Bcl-2/Bax was positively correlated with the acetylcholinesterase activity and cholinergic nerve density ($P<0.01$), while the ratio of MMP9/TIMP-1 was negatively correlated with the acetylcholinesterase activity and cholinergic nerve density ($P<0.01$).

Conclusion: Physiological ischemia training was able to upregulate vagal nerve activity by increasing the acetylcholinesterase activity and cholinergic nerve density. Correlation analysis showed that ventricular remodeling was regulated by vagal activity, thus concluding that PIT can preliminarily improve cardiac function and ventricular remodeling through the upregulation of vagal activity in rats with chronic heart failure after myocardial infarction.

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

Key word physiological ischemic training; vagal nerve; cardiac function; ventricular remodeling

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是由心肌收缩和舒张功能不协调引发的一种临床综合征,是各种心脏疾病发展到一定阶段的最终归宿,由于其发病率和死亡率均较高,对患者生活质量造成严重影响,给家庭和社会造成巨大经济负担^[1]。

自主神经系统由迷走神经和交感神经组成,在调节正常心脏功能以及各种情况下的病理性心脏重构中发挥重要作用^[2]。心力衰竭由于其复杂的病理生理机制可使自主神经系统的功能发生混乱,以交感神经活性增高伴有迷走神经活性下降为主要表现。研究发现,导致心肌梗死及心衰发生率和死亡率增加的原因之一为自主神经平衡失调^[3]。交感神经活性持续增高可使心室功能恶化、心肌重构及心肌梗死后死亡率增加,而迷走神经活性的持续降低可加速左室功能不全的进程和心肌重塑,从而导致难治性心衰^[4]。既往针对心衰的治疗方法主要是降低交感神经活性,多采用药物治疗,如血管紧张素转

换酶抑制剂、 β 受体阻滞剂^[5]。然而近年来,如何有效提高迷走神经活性成为心衰治疗的热点问题。动物研究发现,刺激颈部的迷走神经可减缓心衰后心室重塑、降低心律失常的发生,同时降低死亡率^[6-7]。此外,部分临床研究发现迷走神经电刺激可逆转心衰患者心室重塑,刺激一氧化氮产生,减少心衰时破坏性炎症反应,减少受损心脏向中枢神经系统传入病理性信号^[8-9]。但由于电刺激植入操作复杂,创伤大且副作用较多,从而限制了其在临床上的广泛应用。因此,需要寻找一种简单无创的提高迷走神经活性的方法。

本课题组前期实验已证实连续8周的缺血再灌注训练即生理性缺血训练(physiological ischemic training, PIT)可改善心肌梗死后慢性心衰大鼠的心功能、逆转心室重塑,但其是否通过迷走神经通路发挥作用目前尚不清楚^[10]。既往动物研究发现短暂阻断股动脉或肾动脉而产生的远隔心脏保护作用可

随着传入神经切断而消失^[11-12]。Mastitskaya等^[13]研究发现,对大鼠正常肢体进行缺血再灌注后可对远隔的心脏组织产生保护作用,该保护作用的产生依赖于脑干迷走节前神经元的激活。迷走神经末梢释放的主要神经递质为乙酰胆碱(Acetylcholine, Ach),该递质可使血管内皮细胞产生血管活性因子,如内皮源性舒张因子,该因子可使冠状动脉扩张,进而增加冠脉血流。Ach的含量与胆碱能神经密度密切相关。Delfiner等^[2]的研究发现心衰大鼠迷走神经活性受损与胆碱能神经密度降低有关。由此,我们推测PIT可能通过提高胆碱能神经密度进而增加Ach含量,从而提高迷走神经活性。

本研究主要探讨生理性缺血训练是否可持续提高迷走神经活性,从而改善心肌梗死后慢性心衰大鼠的心功能及心室重塑,进一步阐明生理性缺血训练改善心衰的神经机制,为生理性缺血训练在心衰中的应用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性Wistar大鼠由南京医科大学动物实验中心提供(北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006)。体重200—220g,8—10周龄,SPF级。实验前在通风避光,饲养温度为 $(24\pm 2)^{\circ}\text{C}$,湿度为 $35\%\pm 4\%$ 的大鼠房间适应性饲养1周,随后进行手术造模及分组训练。实验方案遵循美国国立卫生研究院公布的实验动物使用指南,并由南京医科大学动物实验中心伦理委员会批准(伦理编号1901019-1)。

40只大鼠随机分为4组:①假手术组(sham-operated group, SO组, $n=10$),该组大鼠进开胸手术,6—0结扎线穿过心脏而不结扎,不进行训练,安静饲养;②单纯心衰组(chronic heart failure group, CHF组, $n=10$),该组大鼠进行慢性心衰造模,不进行任何训练;③生理性缺血训练组(physiological ischemic training group, PIT组, $n=10$),该组大鼠进行慢性心衰造模,同时进行PIT;④迷走神经切断组(vagal nerve cut group, VN-cut组, $n=10$),该组大鼠进行慢性心衰及迷走神经切断造模,同时进行PIT。

1.2 动物造模

1.2.1 慢性心衰模型:该模型采用技术较为成熟的心肌梗死后慢性心衰大鼠模型^[14]。健康雄性Wistar大鼠,采用10%的水合氯醛($0.3\text{ml}/100\text{g}$)进行腹腔麻醉,麻醉后仰卧位固定在无菌操作台上,采用剃毛刀剔除左胸前毛发,碘伏消毒后于三、四肋间剪开皮肤与肌肉,打开胸腔之前连接小动物呼吸机进行通气。采用镊子顿性分离肋间肌肉,开胸器撑开肋骨,暴露心脏,用镊子撕开心包,在肺动脉圆锥与左心耳交界下方1—2mm处寻找左冠状动脉前降支,随后用6—0线穿过心肌结扎左前降支,结扎宽度2—3mm,深度1—2mm。结扎后出现左室壁肉眼可见苍白或青紫,室壁搏动减慢,则证明结扎成功。术后于饲养间安静饲养4周,随后通过小动物超声心动图检测心功能,造模成功的标志为左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) $\leq 50\%$ 。

1.2.2 生理性缺血训练模型:将大鼠置于固定器中,采用无创止血带结扎大鼠“大腿”根部血管,松紧程度以大鼠下肢皮肤青紫,皮温降低为宜。训练方案为缺血5min,灌注5min,5次/天,5天/周,持续8周。

1.2.3 迷走神经切断模型:麻醉步骤同上,仰卧位于于无菌操作台上固定,剃毛刀去除颈部正中毛发,碘伏消毒后,经颈部正中做一皮肤切口,用镊子分离颈部的腺体及肌肉,使右侧血管及神经暴露,采用玻璃分针顿性分离颈内动脉和迷走神经,将神经从两端夹起,用剪刀从中间剪断神经,同时通过观察切断前后心率、呼吸变化,以判断切断的神经是否为迷走神经^[15]。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 心功能检测:训练8周后采用小动物超声心动图(Visualsonics Vevo3100)检测心脏结构与功能。异氟烷麻醉大鼠,将大鼠放于检测台上,剔除胸部毛发,将超声探头置于大鼠左侧胸部,取左室长轴切面,用超声心动仪检测LVEF。

1.3.2 心肌梗死面积检测:训练8周后,取大鼠心肌组织于组织固定液中浸泡,随后进行常规的石蜡切片脱蜡后,对组织切片进行Masson三色染色,心肌细胞在光镜下呈红色或黄色,而胶原纤维呈蓝绿色,随后进行拍摄,扫描,采用Image-pro plus 6.0(Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA)图像分析仪测定心肌胶原含量,心肌梗死面积的计算方法为:

胶原纤维的面积百分比(%)=(胶原纤维像素面积/组织像素面积)×100%

1.3.3 免疫荧光定量检测:采用RT-PCR法测定心肌细胞重塑指标包括B淋巴细胞瘤2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和Bcl-2关联蛋白X(Bcl-2-Associated protein X, Bax)的mRNA含量,心肌间质重塑指标包括基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)和基质金属蛋白酶组织抑制剂-1(metalloproteinase inhibitor 1, TIMP-1)的mRNA含量。训练8周后,取100mg左心室心肌组织剪碎研磨,总RNA的提取根据Trizol RNA试剂盒的说明进行随后对提取出来的RNA进行反转录,PCR反应体系按说明书配制,混合均匀后,进行扩增。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法测定mRNA含量。

1.3.4 胆碱酯酶活性检测:采用Ellman法测定心肌乙酰胆碱酯酶活性。训练8周后,取100mg左心室心肌组织,采用预冷的PBS溶液漂洗心肌组织3次,随后按1:10比例加入预冷的生理盐水,13000r/min,4℃离心30min,取上清液备用,按Ellman试剂盒进行操作。

乙酰胆碱酯酶活性(U/mg prot)=(测定管吸光值-空白管吸光值)/(标准管吸光值-空白管吸光值)×标准品浓度(1μmol/ml)/蛋白浓度(mg/ml)^[16]

1.3.5 胆碱能神经密度检测:采用Karnovsky-Roots法测定胆碱能神经密度。取100mg左心室心肌组织置于预冷的10%甲醛钙中固定24h,随后制成6μm厚的冰冻切片。按组织化学Karnovsky-Roots法配置孵育液。随后将切片放入孵育液中避光孵育12h。采用Image-pro plus 6.0 (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA)图像分析仪进行光密度值分析:

胆碱能神经密度($\times 10^3 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$)=神经的染色面积/总检测面积^[17]

1.4 统计学分析

采用SPSS 25.0统计软件包对所有数据进行分析。组间比较前对所有结果进行正态分布及方差齐性检验。采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)比较组间数据,多重比较采用最小显著差异法(least significant difference, LSD)。心室重塑与迷走神经指标之间的相关性采用Pearson相关

性分析。以 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠死亡情况

共40只大鼠参与随机分组,其中PIT组一只大鼠在随机分组后由于肠梗阻死亡,最终SO组10只大鼠,CHF组10只大鼠,PIT组9只大鼠,VN-cut组10只大鼠完成实验。

2.2 左室射血分数

训练8周后进行超声心动图检测,结果显示SO组与其他3组相比均有意义(SO: 69.80 ± 4.90 vs CHF: 32.41 ± 6.92 vs PIT: 45.81 ± 7.39 vs VN-cut: 34.88 ± 7.60 , $P<0.05$),同时PIT组与CHF组及VN-cut组相比LVEF改善有显著性意义(45.81 ± 7.39 vs 32.41 ± 6.92 vs 34.88 ± 7.60 , $P<0.05$),然而CHF组与VN-cut组之间LVEF改善无显著性意义(32.41 ± 6.92 vs 34.88 ± 7.60 , $P>0.05$),各组大鼠超声心动图见图1。

2.3 心肌梗死面积

训练8周后进行Masson三色染色,结果显示PIT组与VN-cut组相比,梗死面积明显减少,改善有显著性意义(10.47 ± 4.76 vs 19.75 ± 7.95 , $P<0.05$);而PIT组与CHF组相比改善没有显著性意义(10.47 ± 4.76 vs 15.23 ± 5.69 , $P>0.05$),各组大鼠Masson染色见图2。

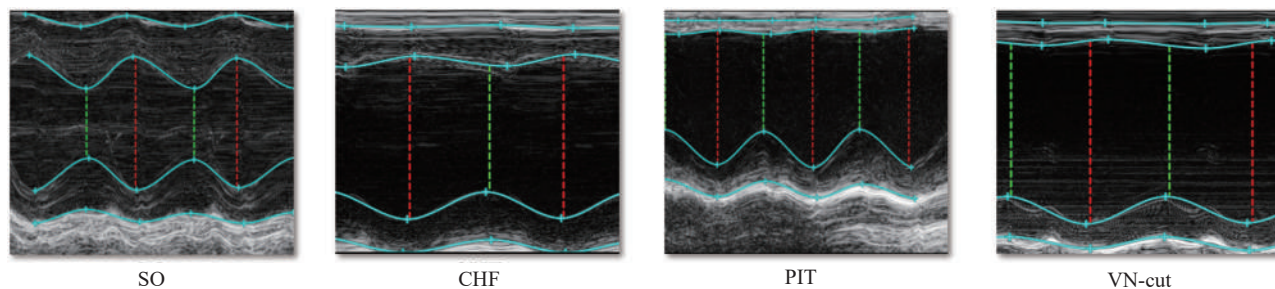
2.4 心室重塑RT-PCR检测

训练8周后进行RT-PCR检测,对于心肌细胞重塑指标Bcl-2/Bax而言,SO组与CHF组、PIT组及VN-cut组相比差异具有显著性意义(1.00 ± 0.11 vs 0.24 ± 0.04 vs 0.52 ± 0.06 vs 0.33 ± 0.04 , $P<0.05$);PIT组与CHF组及VN-cut组相比,差异有显著性意义(0.52 ± 0.06 vs 0.24 ± 0.04 vs 0.33 ± 0.04 , $P<0.05$),同时CHF组与VN-cut相比组间差异有显著性意义(0.24 ± 0.04 vs 0.33 ± 0.04 , $P<0.05$)。就心肌间质重塑指标MMP9/TIMP-1而言,各组间差异均有显著性意义(SO: 1.00 ± 0.09 vs CHF: 6.46 ± 0.66 vs PIT: 2.45 ± 0.13 vs VN-cut: 3.26 ± 0.29 , $P<0.05$),见图3。

2.5 迷走神经检测结果

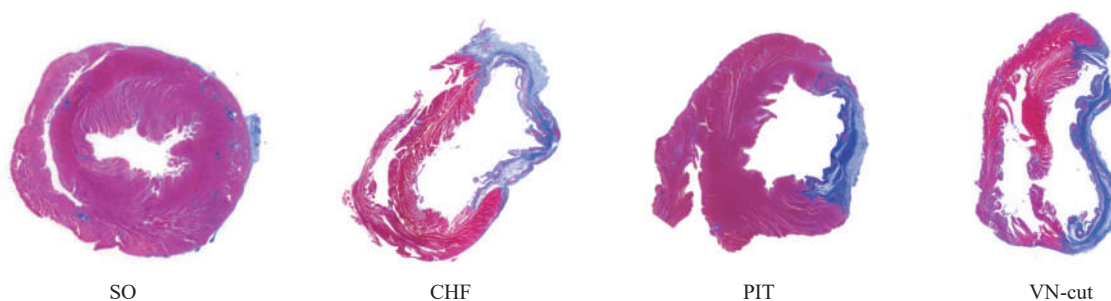
训练8周后检测乙酰胆碱酯酶活性及胆碱能神经密度,就胆碱酯酶活性而言SO组与CHF组、PIT

图1 各组大鼠超声心动图



注:SO为假手术组,CHF为慢性心衰组,PIT为生理性缺血训练组,VN-cut为迷走神经切断组

图2 各组大鼠Masson染色图

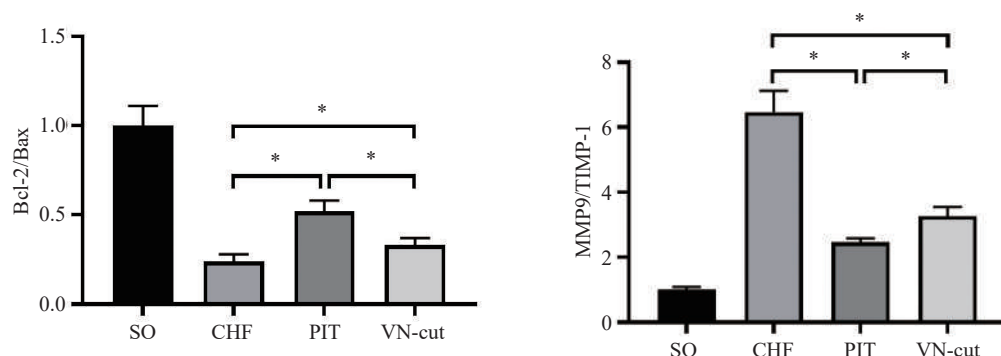


注:SO为假手术组,CHF为慢性心衰组,PIT为生理性缺血训练组,VN-cut为迷走神经切断组

组及VN-cut组相比均有意义(SO: 4.09 ± 0.02 vs CHF: 2.97 ± 0.12 vs PIT: 3.20 ± 0.08 vs VN-cut: 3.14 ± 0.22 , $P < 0.05$),PIT组与CHF组相比改善有显著性意义(3.20 ± 0.08 vs 2.97 ± 0.12 , $P < 0.05$),而PIT组与VN-cut组相比改善无显著性意义(3.20 ± 0.08 vs 3.14 ± 0.22 , $P > 0.05$)。SO组与CHF组、PIT组及VN-cut组相比在胆碱能神经密度方面改善均有意

义(SO: 18.40 ± 1.46 vs CHF: 10.00 ± 0.94 vs PIT: 11.88 ± 0.59 vs VN-cut: 10.19 ± 1.24 , $P < 0.05$),且PIT组与CHF组及VN-cut组相比改善均有意义(11.88 ± 0.59 vs 10.00 ± 0.94 vs 10.19 ± 1.24 , $P < 0.05$),而CHF组与VN-cut组相比改善无意义(10.00 ± 0.94 vs 10.19 ± 1.24 , $P > 0.05$),胆碱能神经染色结果见图4。

图3 各组大鼠Bcl-2/Bax及MMP9/TIMP-1mRNA含量分析



注:SO为假手术组,CHF为慢性心衰组,PIT为生理性缺血训练组,VN-cut为迷走神经切断组;* $P < 0.05$

2.6 相关性分析

Bcl-2/Bax 与乙酰胆碱酯酶活性、胆碱能神经密度之间呈直线正相关($P<0.01$),相关系数 r 分别为 0.8918 和 0.9152;MMP9/TIMP-1 与乙酰胆碱酯酶活性、胆碱能神经密度呈直线负相关($P<0.01$),相关系数 r 分别为-0.7467和-0.7183,结果见图5。

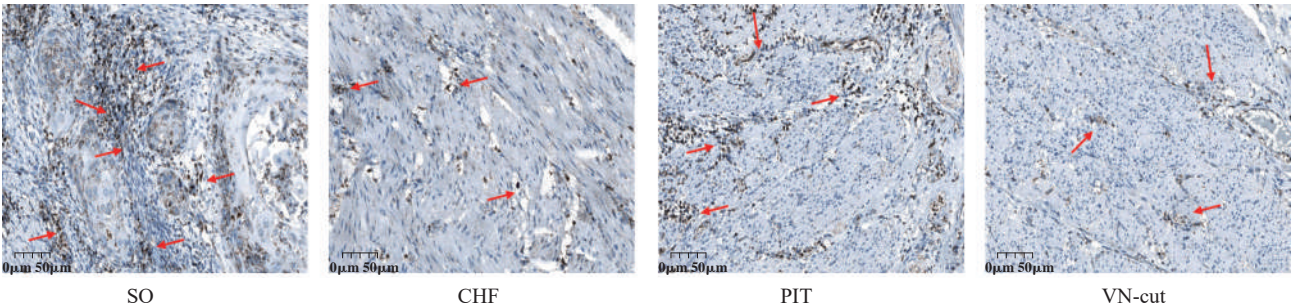
3 讨论

本研究通过右侧迷走神经切断探讨生理性缺血

训练改善心肌梗死后慢性心衰大鼠心功能及心室重塑的神经机制,结果显示生理性缺血训练通过显著提高乙酰胆碱酯酶活性及胆碱能神经密度,从而持续提高迷走神经活性,进而改善左心功能,逆转心肌细胞及心肌间质重塑。

心血管系统的正常生理功能及病理状态与自主神经的调节密不可分。自主神经系统在生理情况下处于动态平衡的状态,以维持心脏的正常功能。交感神经系统在心衰后代偿性的激活,神经末梢分泌

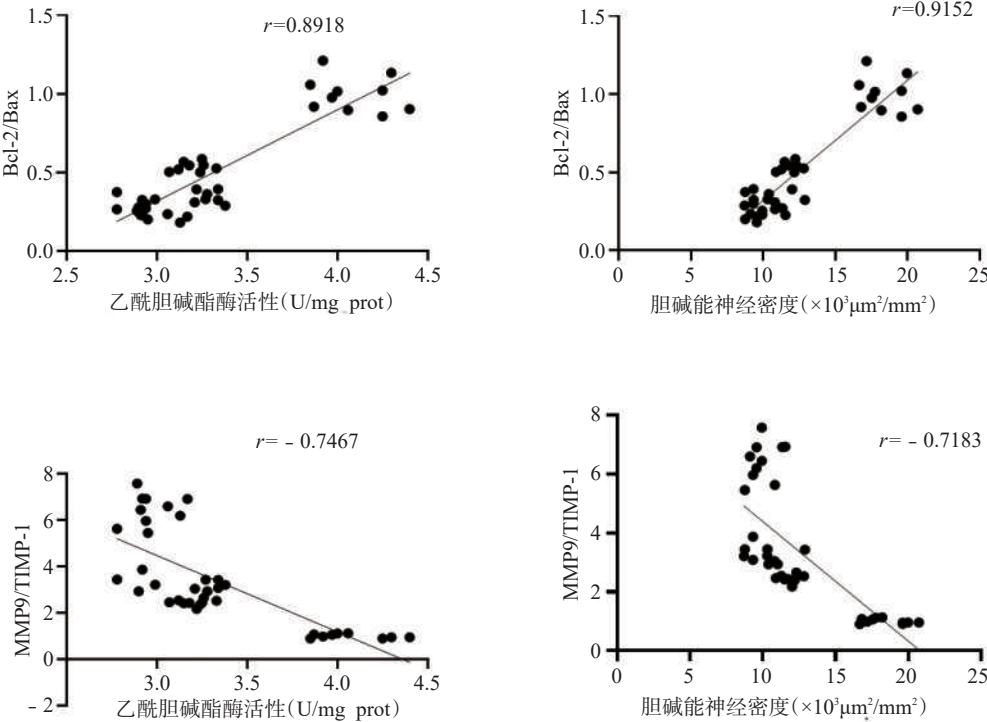
图4 各组大鼠心肌胆碱能神经染色图



注:SO为假手术组,CHF为慢性心衰组,PIT为生理性缺血训练组,VN-cut为迷走神经切断组

比例尺:50μm

图5 Bcl-2/Bax、MMP9/TIMP-1与乙酰胆碱酯酶活性、胆碱能神经密度的相关性分析



的大量去甲肾上腺素,与 β 受体结合后,引起周围血管收缩,增强心肌收缩力,增加心输出量,从而暂时改善心功能^[18]。然而,长期过度激活的肾素-血管紧张素-醛固酮系统会破坏交感与迷走神经之间的动态平衡,从而导致副交感神经系统长期被抑制,进一步引起心肌间质纤维化、心肌细胞凋亡与坏死,心室重塑,最终加重心衰的发生与发展^[19]。研究证实心衰患者高死亡率的预测因素为心率增快和迷走神经活性降低^[20]。近年来越来越多的研究者将提高迷走神经活性作为心衰治疗的重点。早期研究发现在慢性心衰大鼠颈部植入迷走神经刺激器并进行电刺激后与单纯心衰组相比心室收缩功能明显改善,同时死亡率也降低^[7]。随后进行的动物实验和部分临床试验均支持该结果^[6-9]。迷走神经刺激通过有创的方式提高迷走神经活性进而改善心衰,但该方法在临床不易开展,因此需要寻找一种简单无创的方法来替代该方法。

本研究通过建立基于慢性心衰的右侧迷走神经切断模型观察生理性缺血训练对迷走神经活性的影响。结果显示CHF组、PIT组和VN-cut组的乙酰胆碱酯酶活性及胆碱能神经密度与SO组相比均降低,当迷走神经切断后,PIT的作用被减弱,且PIT组的胆碱能神经密度均高于CHF组及VN-cut组($P<0.05$),PIT组的乙酰胆碱酯酶活性高于CHF组($P<0.05$),PIT组乙酰胆碱酯酶活性与VN-cut组相比改善虽无显著性意义,但从两组均值可发现有改善趋势,证明PIT可提高乙酰胆碱酯酶活性,增加胆碱能神经密度,从而持续提高迷走神经活性。由于乙酰胆碱酯酶是在胆碱能神经元胞体中合成,随后通过轴浆转运到相应的突触前膜或突触后膜的内外侧,因此胆碱能神经密度的降低直接影响乙酰胆碱酯酶含量^[17]。心衰中胆碱能神经密度的降低可能是由于神经纤维数量或大小减少、心肌肥厚或扩张而无神经纤维的增加^[2]。Delfiner等^[2]研究发现心衰后心外膜自主神经密度降低,迷走神经密度降低,提示迷走神经活动减弱可能是由于其神经密度降低导致。

心衰后心室重构与自主神经失衡密切相关。交感神经长期激活而迷走神经活动受抑制时会造成心肌结构发生一系列变化,如心肌间质纤维化、心肌细胞凋亡、心肌重构,最终造成心室重构,心功能不断

恶化。多种基因参与调控心肌细胞的凋亡其中参与调控最重要的基因为Bcl-2和Bax。Bcl-2为抗凋亡基因,主要通过抑制氧自由基的产生和改变细胞内 Ca^{2+} 内流,并抑制线粒体膜通透性的改变,从而抑制细胞凋亡;Bax是促细胞凋亡基因,通过下调Bcl-2基因的表达,升高细胞内 Ca^{2+} 浓度从而诱发细胞凋亡^[21]。细胞凋亡的发生取决于促凋亡基因与抗凋亡基因的相对含量,通常采用Bcl-2/Bax的比值来反应细胞凋亡情况,若比值降低则促进细胞凋亡,反之抑制细胞凋亡。本研究通过RT-PCR定量方法来检测心肌细胞中Bax及Bcl-2基因的mRNA表达水平,发现与SO组相比,CHF组、PIT组及VN-cut组Bcl-2/Bax的比值下降,PIT组Bcl-2/Bax的比值高于CHF组及VN-cut组($P<0.05$),且CHF组Bcl-2/Bax的比值低于VN-cut组($P<0.05$)。PIT可以逆转慢性心衰后心肌凋亡,减少细胞凋亡,同时也表明迷走神经切断后PIT的效应无法产生。此外,相关性分析发现Bcl-2/Bax比值与胆碱酯酶活性及胆碱能神经密度呈正相关,因此可推测PIT通过迷走神经通路调控心肌细胞凋亡,逆转心肌重塑,从而保护心肌。

MMPs与TIMP参与心肌间质纤维化的调控。MMP9是心肌细胞外基质重构时主要的酶,激活后能降解正常细胞外基质,使间质纤维化,心肌纤维化增加,导致心肌间质重构及心室扩张而TIMP-1则能抑制其活性^[22]。目前多采用MMP9和TIMP-1的比值来反应间质重塑,比值降低可抑制间质重塑。本研究RT-PCR定量检测结果显示与SO组相比,CHF组、PIT组及VN-cut组MMP9/TIMP-1比值均增高,PIT组MMP9/TIMP-1比值比CHF组及VN-cut组低($P<0.05$),且CHF组MMP9/TIMP-1的比值高于VN-cut组($P<0.05$)。研究显示迷走神经活性增强后可以促进心肌细胞内一氧化氮的生成,一氧化氮可增强TIMP-1基因的表达,抑制MMP-9基因的表达,从而改善间质重塑^[23]。此外,相关性分析发现MMP9/TIMP-1比值与胆碱酯酶活性及胆碱能神经密度呈负相关,由此可推断PIT通过提高迷走神经活性逆转心衰后间质重塑。同时由Masson三色染色测得的心肌胶原容积分数结果也显示PIT组与VN-cut相比改善有显著性意义($P<0.05$),PIT组与CHF相比其绝对值改善有意义。由此说明,PIT可

显著降低心肌胶原容积分数,改善间质纤维化。

综上所述,生理性缺血训练可以通过提高乙酰胆碱酯酶活性、胆碱能神经密度从而持续提高迷走神经活性,进一步改善心室重构,促进心功能恢复。本研究将有可能为心肌梗死后慢性心力衰竭提供一种新的治疗策略,为患者的临床和康复治疗提供新的途径及理论支持。本研究的局限性在于,仅探讨了生理性缺血训练通过持续提高迷走神经活性发挥作用,未进一步探讨具体的分子机制,未来应针对这方面展开深入研究。

参考文献

- [1] 中华医学会心血管病学分会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南2014[J]. 中华心血管病杂志, 2014, 2(42): 98—122.
- [2] Delfiner MS, Siano J, Li Y, et al. Reduced epicardial vagal nerve density and impaired vagal control in a rat myocardial infarction-heart failure model[J]. Cardiovasc Pathol, 2017, 26:21—29.
- [3] Feriani DJ, Souza GIH, Carrozzi NM, et al. Impact of exercise training associated to pyridostigmine treatment on autonomic function and inflammatory profile after myocardial infarction in rats[J]. Int J Cardiol, 2017, 227: 757—765.
- [4] Mostarda C, Rodrigues B, Vane M, et al. Autonomic impairment after myocardial infarction: role in cardiac remodeling and mortality[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(4): 447—452.
- [5] Loop MS, Van Dyke MK, Chen L, et al. Evidence-based beta blocker use associated with lower heart failure readmission and mortality, but not all-cause readmission, among medicare beneficiaries hospitalized for heart failure with reduced ejection fraction[J]. PLoS One, 2020, 15: e0233161.
- [6] Agarwal R, Mokelke 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.
- [7] Li M, Zheng C, Sato T, et al. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats[J]. Circulation, 2004, 109(1): 120—124.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Späth MR, Koehler FC, Hoyer-Allo KJR, et al. Preconditioning strategies to prevent acute kidney injury[J]. F1000Res, 2020, 9.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] Li Y, Xuan YH, Liu SS, et al. Short-term vagal nerve stimulation improves left ventricular function following chronic heart failure in rats[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(2): 1709—1716.
- [15] Li-Sha G, Xing-Xing C, Lian-Pin W, et al. Right cervical vagotomy aggravates viral myocarditis in mice via the cholinergic anti-inflammatory pathway[J]. Front Pharmacol, 2017, 8: 25.
- [16] Dunlap ME, Bibevski S, Rosenberry TL, 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—H1640.
- [17] Xu XL, Zang WJ, Lu J, et al. Effects of carvedilol on M2 receptors and cholinesterase-positive nerves in adriamycin-induced rat failing heart[J]. Auton Neurosci, 2006, 130(1-2): 6—16.
- [18] 胡慧慧, 何勃, 李元红, 等. 自主神经再平衡与心力衰竭[J]. 海南医学, 2019, 30(8): 1050—1057.
- [19] 孙春金, 曹梦灵, 关宏铜. 肾素-血管紧张素-醛固酮系统 in 高血压和心力衰竭疾病的相关研究进展[J]. 中国心血管病研究, 2020, 18(5): 446—450.
- [20] Lechat P, Hulot JS, Escolano S, et al. Heart rate and cardiac rhythm relationships with bisoprolol benefit in chronic heart failure in CIBIS II Trial[J]. Circulation, 2001, 103(10):1428—1433.
- [21] Kraljevic J, Marinovic J, Pravdic D, et al. Aerobic interval training attenuates remodelling and mitochondrial dysfunction in the post-infarction failing rat heart[J]. Cardiovasc Res, 2013, 99(1): 55—64.
- [22] Webb CS, Bonnema DD, Ahmed SH, et al. Specific temporal profile of matrix metalloproteinase release occurs in patients after myocardial infarction: relation to left ventricular remodeling[J]. Circulation, 2006, 114(10): 1020—1027.
- [23] Brack KE, Patel VH, Mantravardi R, et al. Direct evidence of nitric oxide release from neuronal nitric oxide synthase activation in the left ventricle as a result of cervical vagus nerve stimulation[J]. J Physiol, 2009, 587(Pt12): 3045—3054.