

·基础研究·

生理性缺血训练改善心衰大鼠心脏结构和功能的最佳干预强度及生物学标志物研究*

滕美玲¹ 王佳悦¹ 张英杰¹ 华文洁¹ 王沈蕊¹ 陆 晓^{1,2}

摘要

目的:探索生理性缺血训练(PIT)改善心衰大鼠心脏结构、功能的最佳干预强度及生物学标志物。

方法:30只SD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1min组(PIT-S组)、5min组(PIT-M组)和10min组(PIT-L组),每组6只。SO组按心衰模型建立步骤,穿线过左冠状动脉前降支不结扎,不训练;HF组建立心衰大鼠模型;PIT组在HF组基础上接受训练,单次缺血时长分别为1min、5min、10min,再灌注均为5min,5次/天,5天/周,持续8周。训练结束后采用经胸壁超声心动图检测心功能,Masson染色检测心肌纤维化程度,qRT-PCR检测Bcl-2、Bax、MMP9、TIMP1 mRNA的相对表达水平,ELISA法检测血清中NT-proBNP、Bradykinin、TNF- α 、IL-6、IL-10等生物学标志物含量。

结果:与SO组相比,各组Bax、心肌纤维化程度、MMP9/TIMP1比值显著升高,左室射血分数(LVEF)、Bcl-2/Bcl-2/Bax比值、TIMP1显著降低($P < 0.05$);与HF组相比,3组PIT组LVEF显著升高,Bax、心肌纤维化程度、MMP9、MMP9/TIMP1比值显著降低($P < 0.05$);3组PIT大鼠中,PIT-M组LVEF、Bcl-2/Bax比值显著高于另外2组,而Bax、MMP9/TIMP1比值显著低于另外2组($P < 0.05$)。除PIT-S组Bradykinin含量外,各组血清各标志物含量均明显高于SO组;PIT-M组各标志物含量均显著低于HF组,其中IL-6、Bradykinin、TNF- α 显著低于PIT-S组,IL-10、Bradykinin、TNF- α 显著低于PIT-L组($P < 0.05$)。各标志物血清含量与LVEF均呈负相关($P < 0.01$),其中NT-proBNP相关性最为密切($r = -0.936, P < 0.0001$)。

结论:相比于单次1min缺血/5min灌注、10min缺血/5min灌注,5min缺血/5min灌注的PIT方案对心衰大鼠心脏的远隔保护作用更显著,NT-proBNP可作为反映其保护作用的最佳生物学标志物。

关键词 心力衰竭;生理性缺血训练;心功能;最佳干预强度;生物学标志物

中图分类号:R493, R541.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2022)-06-0728-09

Optimum intervention intensity and effect biomarkers of physiological ischemic training to improve cardiac structure and function in rats with heart failure/TENG Meiling, WANG Jiayue, ZHANG Yingjie, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2022, 37(6):728—736

Abstract

Objective: To explore the optimum intervention intensity and effect biomarkers of physiological ischemic training(PIT) on improving cardiac structure and function in rats with heart failure.

Method: Thirty rats were randomized into sham operation(SO), heart failure(HF), physiological ischemic training for 1min(PIT-S), 5min(PIT-M) and 10min(PIT-L), with 6 rats in each group. In the SO group, according to the heart failure model establishment, the line was threaded through the anterior descending branch of the left coronary artery without ligation or training. Heart failure model was established in HF group. PIT group received training on the basis of HF group, accompanied with ischemia for 1min, 5min, 10min respectively and reperfusion for 5min each time, 5 cycles/day, 5 days/week, lasting for 8 weeks. After the training, cardi-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2022.06.002

*基金项目:国家自然科学基金面上项目(81772441);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 通讯作者

第一作者简介:滕美玲,女,初级治疗师;收稿日期:2021-10-21

ac function was detected by transthoracic echocardiography, the degree of myocardial fibrosis was detected by Masson staining, the relative expression level of Bcl-2, Bax, MMP9, TIMP1 mRNA was detected by qRT-PCR, and the content of NT-proBNP, Bradykinin, TNF- α , IL-6, IL-10 in serum was detected by ELISA.

Result: Compared with SO group, Bax, MMP9/TIMP1 ratio and the degree of myocardial fibrosis in other groups were significantly increased, while the left ventricular ejection fraction(LVEF), Bcl-2, Bcl-2/Bax ratio and TIMP1 were significantly decreased($P < 0.05$). Compared with HF group, LVEF in 3 PIT groups was significantly increased, while Bax, the degree of myocardial fibrosis, MMP9 and MMP9/TIMP1 ratio were significantly decreased($P < 0.05$). The LVEF and Bcl-2/Bax ratio in PIT-M group were significantly higher while the Bax and MMP9/TIMP1 ratio were significantly lower than those in the other two PIT groups($P < 0.05$). Except the Bradykinin in PIT-S group, the content of other biomarkers in each group was significantly higher than those in SO group. The content of each biomarker in PIT-M group was significantly lower than that in HF group, among which IL-6, Bradykinin, TNF- α were significantly lower than that in PIT-S group, and IL-6, Bradykinin, TNF- α were significantly lower than that in PIT-L group($P < 0.05$). The serum content of the above biomarkers were all negatively correlated with LVEF($P < 0.01$), and NT-proBNP was the most closely correlated($r = -0.936, P < 0.0001$).

Conclusion: Compared with ischemia for 1min or 10min, the PIT program of 5min ischemia/5min reperfusion has a more significant cardiac protection effect on heart failure rats, and NT-proBNP can be used as the best effect biomarker to reflect the protection effect.

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;cardiac function;optimum training intensity;biomarker

心力衰竭(heart failure, HF)患病率在世界范围内呈增长趋势,作为各种心脏疾病晚期的临床表现,心衰与心脏结构改变、心功能异常及代谢紊乱等密切相关^[1]。心肌细胞凋亡和心肌细胞外基质纤维化重塑是心脏重构的重要病理性过程,驱动重构的因素可分为两大类:由异常循环、局部神经激素和细胞因子改变引起的机械应激和生化应激。应激信号调节基因表达、蛋白质功能、代谢过程等,导致心肌细胞肥大、凋亡和收缩力下降,进而影响心衰患者心功能及预后^[2-3]。心衰患者的预后较差,其药物治疗目前存在用药不规范、治疗剂量不达标、患者依从性差等情况;非药物治疗也由于资源获得途径和支付能力有限、侵入性方式等原因在我国并未得到充分利用^[4];此外,运动训练(以有氧运动为主)近年来已较为广泛应用于心衰康复,但其无法在疾病早期进行,且对心衰较严重或有并发症的患者相对禁忌^[5]。而近年来用于心衰康复的生理性缺血训练(physiological ischemic training, PIT),于正常肢体反复行袖带加压形成单纯骨骼肌缺血,已被证实能够产生远隔组织保护作用,从而抑制心肌纤维化重塑,延缓心

脏重构,改善心功能,且相对安全、有效、适用性广^[6-9]。根据本课题组前期实验结果,本研究设置不同训练强度分组,旨在探索PIT改善心衰后心脏重构和心功能的最佳干预强度及生物学标志物。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选取 SPF 级健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30 只,体重(200 $\pm$ 10)g,均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供[许可证号:SCXK(浙)2019-0001]。大鼠置于江苏省实验动物中心 SPF 环境分笼饲养 3d,予标准饲料、自由饮水,昼夜节律 12h—12h。实验方案遵循美国 NIH 公布的实验动物使用指南,并通过南京医科大学动物伦理委员会批准(IACUC—1901019)。

采用随机数字表法将 30 只 SD 大鼠分为:①假手术组(sham-operated, SO)组;②单纯心衰组(HF 组)及 PIT 组。其中 PIT 组按照不同缺血时长分为:③1min 短时间组(PIT-S 组);④5min 中等时间组(PIT-M 组)。⑤10min 长时间组(PIT-L 组),每组 6

只,共5组。

1.2 慢性缺血性心衰动物模型

采用腹腔注射10%水合氯醛溶液(0.3ml/100g)麻醉大鼠后,将其固定于手术台上,行气管插管并连接小动物呼吸机辅助通气,呼吸频率80次/min,潮气量0.7—0.8ml(按体质量调节),吸呼比1:1.5。在左侧第3—4肋间切开皮肤,逐层钝性分离肌层,撕开心包膜充分暴露心脏,于左心耳与肺动脉圆锥间约1mm处,用6—0丝线结扎冠状动脉左前降支(left anterior descending coronary artery, LAD),诱导心肌缺血,以心电图示S-T段明显抬高,肉眼观察灌注部位心肌变紫红或灰白,室壁运动明显减弱为结扎成功标志。迅速分层缝合胸壁,待大鼠恢复自主呼吸后,拔除气管插管,手术过程严格无菌操作。术后予抗感染治疗3d。SO组大鼠手术过程同上,但在相同位置只穿线不结扎。术后24h所有大鼠死亡率为28%。术后安静笼养4周后行经胸壁超声心动图检测,以左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)<50%视为慢性心力衰竭大鼠模型制备成功^[10-11]。

1.3 生理性缺血训练方案

生理性缺血训练采用无创乳胶止血带(内径1.8mm,外径4.2mm)环扎大鼠双后肢近端,阻断血流至远端皮肤紫绀明显,股动脉搏动消失。训练方案以缺血1min(PIT-S组)、5min(PIT-M组)或10min(PIT-L组),再灌注5min为1个循环,每天5个循环,每周训练5天,持续8周。SO组及HF组大鼠于相同环境下饲养8周,不接受PIT。

1.4 心功能检测

术后4周(训练前)及训练8周后采用经胸壁超声心动图(VisualSonics Vevo3100)检测大鼠心功能相关指标。经2%异氟烷麻醉,大鼠以仰卧位固定并连接电极,在M型模式下以MX 250s探头于大鼠左胸部探查心脏结构。以乳头肌水平处的短轴视图量化其左室舒张末期内径(left ventricular internal di-

ameter end diastole, LVIDd)、左室收缩末期内径(left ventricular internal diameter end systole, LVIDs),并计算左心室射血分数。图像经VevoLab软件分析,各测量值取3个连续心动周期的平均值。

1.5 心肌纤维化程度测定

采用Masson三色法测定心肌纤维化程度。结束8周训练后进行心肌组织取材,取心室最大横径处约3mm组织固定于4%多聚甲醛溶液中,经石蜡包埋、切片(3μm)、脱蜡、染色,其中胶原结构呈蓝色,心肌结构呈红色。采用Aperio Image Scope图像采集软件(Leica Biosystems Imaging, Inc., USA),计算心肌胶原组织占切片组织总面积的百分比作为纤维化程度。

1.6 Bcl-2、Bax、MMP9及TIMP1表达水平检测

采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测Bcl-2、Bax、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP9)及其抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP1)的mRNA相对表达水平。使用Trizol法从大鼠围梗死区心肌(距缺血区域3—4mm)组织中提取总RNA,进行浓度与纯度检测,经逆转录合成cDNA,采用SYBR Green(TaKaRa, Kusatsu, Japan)并由Steponeplus qRT-PCR仪器(ABI, USA)进行检测。以GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各mRNA的相对表达水平。实验进行3次平行重复。引物序列信息见表1。

1.7 生物学标志物含量检测

采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测N端前脑钠素(NT-proBNP)、肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素6(interleukin-6, IL-6)、白介素10(interleukin-10, IL-10)及缓激肽(bradykinin, BK)等生物学标志物的血清含量。大鼠腹主动脉取血,静置2h后3000r/min离心15min,取上层血清。按照ELISA试剂盒(SenBeiJia Biotechnology Co., Ltd., Nanjing, Jiangsu, China)说明步骤,测定对应波

表1 荧光定量PCR引物序列表

mRNA	上游引物序列	下游引物序列
Bcl-2	GGGGATGACTTCTCTCGTCG	TGACATCTCCCTGTTGACGC
Bax	ACGCTGCGGGGAGTC	TGCTCGATCCTGGATGAAACC
MMP9	GCCGGGAACGTATCTGGAAA	GTTGTGGAACTCACACGCC
TIMP1	GCCTCTGGCATCTCTTGT	AGCGTCGAATCCTTTGAGCA

长处吸光度(OD)值。以标准品浓度为横坐标,OD值为纵坐标,绘制标准曲线,以此计算各标志物含量。

1.8 统计学分析

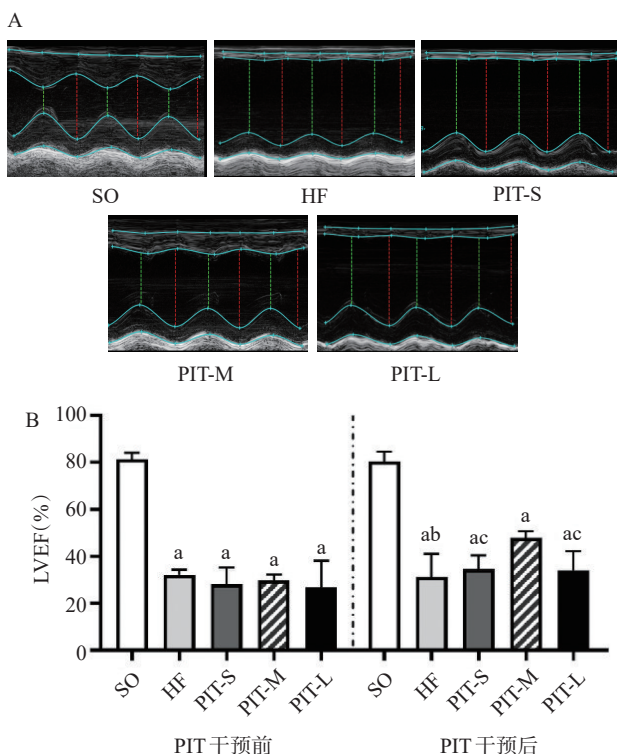
采用SPSS 23.0版统计学软件进行数据处理。所有数据均采用均数±标准差表示,组间数据比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA),多重比较选用最小显著差异法或Dunnett T3检验。相关性分析采用Pearson相关(相关系数以 r 表示),回归分析采用曲线回归(决定系数以 R^2 表示)。 $P<0.05$ 表示差异具有显著性意义。

2 结果

2.1 心功能比较

8周PIT干预前,超声心动图显示:与SO组相比,各组心衰大鼠LVEF显著降低($P<0.0001$),其余各组间无明显差异($P>0.05$);PIT干预后,PIT-M组大鼠LVEF显著高于HF组($P<0.01$)、PIT-S组和PIT-L组($P<0.05$)。见图1。

图1 各组大鼠PIT干预前后左室射血分数(LVEF)比较



注:A.8周PIT造模后各组大鼠超声心动图像。B.PIT造模前及造模后各组大鼠的LVEF(%)。与SO组相比,a. $P<0.0001$;与PIT-M组相比,b. $P<0.01$,c. $P<0.05$ 。n=6。

2.2 心肌细胞凋亡程度比较

实验终点时检测各组大鼠心肌细胞凋亡程度。心肌qRT-PCR结果显示:与SO组相比,各组心衰大鼠Bax表达水平均显著增高,Bcl-2表达水平及Bcl-2/Bax比值均显著降低($P<0.0001$);与HF组相比,3组PIT干预的心衰大鼠Bax表达水平均明显降低,PIT-M组Bcl-2表达水平及Bcl-2/Bax比值明显增高($P<0.05$);3组PIT大鼠中,PIT-M组Bax表达水平显著低于另外两组,而Bcl-2/Bax比值显著高于另外两组($P<0.001$)。见图2。

2.3 心肌细胞外基质重塑程度比较

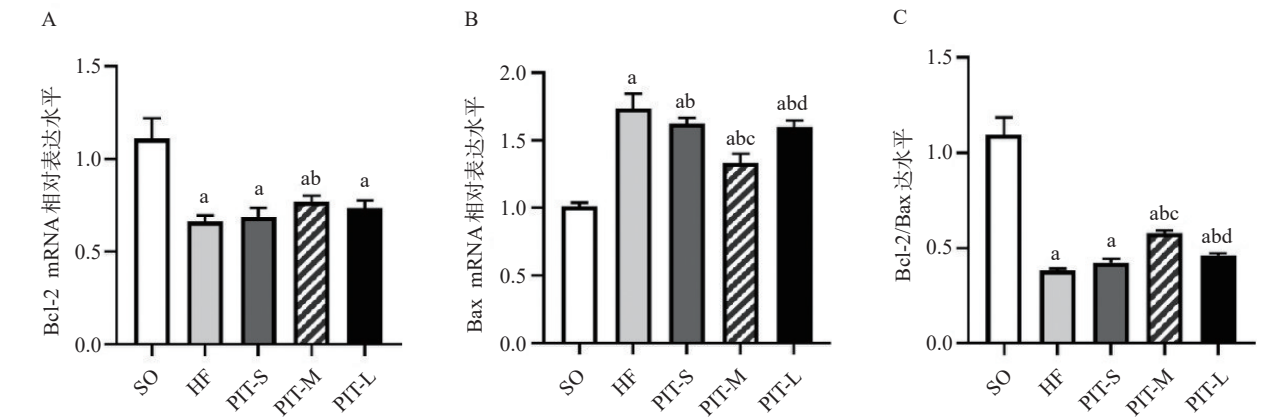
实验终点时检测各组大鼠心肌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重塑结果。心肌病理学观察显示:与SO组相比,各组大鼠心肌纤维化程度均显著增高($P<0.01$);与HF组相比,3组PIT干预的心衰大鼠心肌纤维化程度均显著降低($P<0.0001$)。心肌qRT-PCR结果显示:与SO组相比,除PIT-M组外各组大鼠MMP9表达水平显著增高($P<0.01$),各组大鼠TIMP1表达水平均显著降低($P<0.001$),各组大鼠MMP9/TIMP1比值均明显增高($P<0.05$);与HF组相比,3组PIT干预大鼠的MMP9表达水平与MMP9/TIMP1比值均明显降低($P<0.05$);此外,PIT-M组大鼠TIMP1表达水平明显高于HF组和PIT-S组($P<0.05$),其MMP9/TIMP1比值显著低于PIT-S组和PIT-L组($P<0.001$)。见图3。

2.4 生物学标志物含量比较

实验终点时检测各组大鼠血清生物学标志物含量。ELISA结果显示:除PIT-S组大鼠BK含量外,各组大鼠血清各标志物含量均明显高于SO组($P<0.05$)。①NT-proBNP含量:仅PIT-M组明显低于HF组($P<0.01$),其他干预组与HF组无明显差异($P>0.05$);②BK含量:PIT-M组显著低于其他组($P<0.01$);③TNF- α 含量:PIT-M组显著低于HF组及其他干预组($P<0.01$);④IL-6含量:PIT-M与PIT-L组显著低于HF组和PIT-S组($P<0.0001$),但该组间无明显差异($P>0.05$);⑤IL-10含量:PIT-S与PIT-M组均明显低于HF组($P<0.05$),但该组间无明显差异($P>0.05$),PIT-M组明显低于PIT-L组($P<0.05$)。见图4。

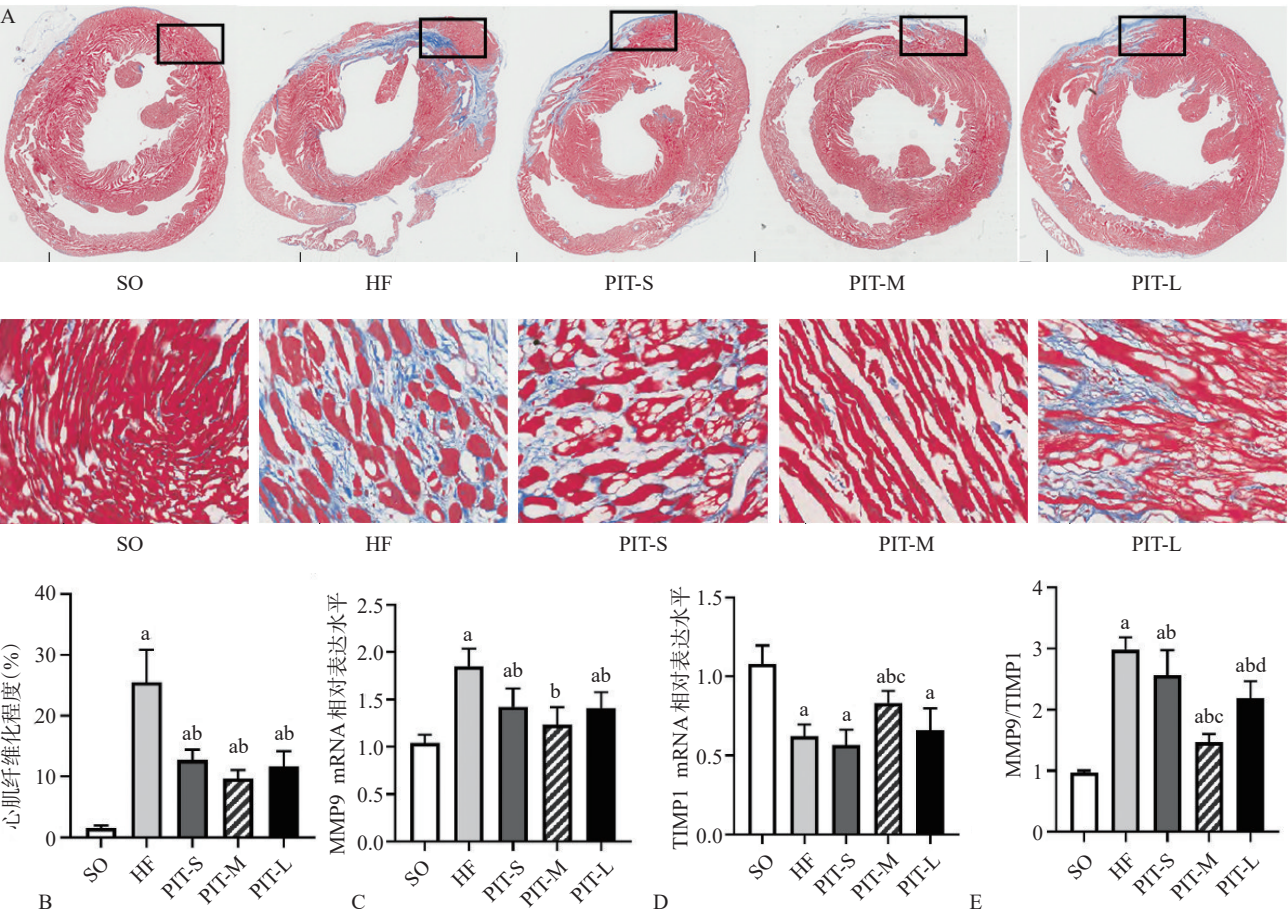
2.5 相关性分析及回归分析

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

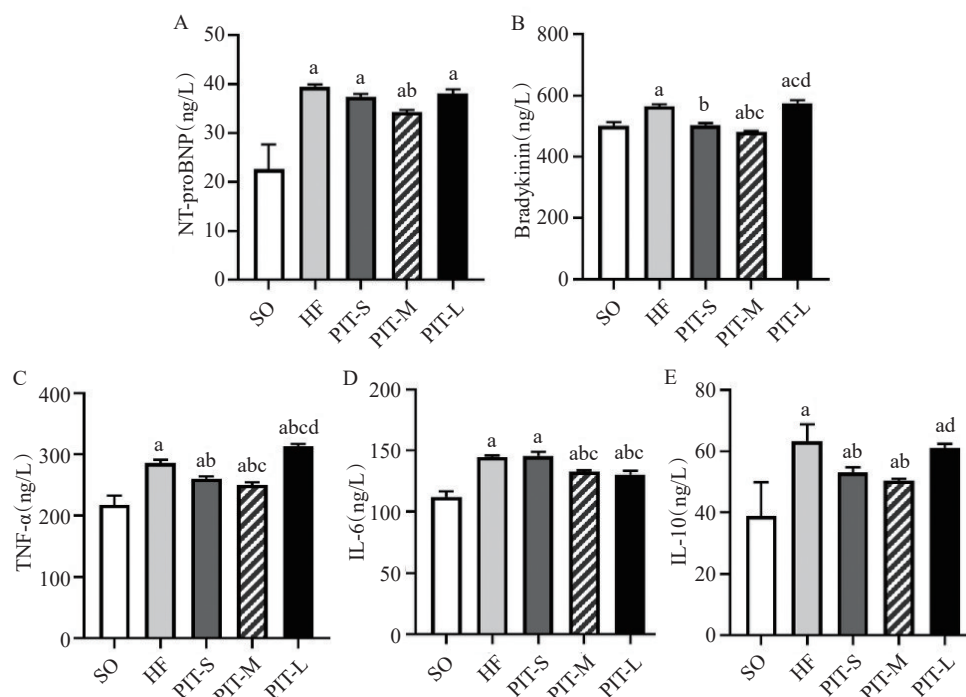


注:a.与SO组相比,b.与HF组相比,c.与PIT-S组相比,d.与PIT-M组相比, $P < 0.05$ 。n=6。

图3 各组大鼠心肌纤维化程度、心肌组织中MMP9、TIMP1相对表达水平及MMP9/TIMP1比较



注:A.各组大鼠心肌Masson染色图及倍镜下视野,正常心肌结构呈红色,胶原结构呈蓝色,比例尺:25μm;B.各组大鼠心肌纤维化程度(%);C—E.各组大鼠心肌MMP9、TIMP1 mRNA相对表达水平及MMP9/TIMP1比值。a.与SO组相比,b.与HF组相比,c.与PIT-S组相比,d.与PIT-M组相比, $P < 0.05$ 。n=6。

图4 各组大鼠血清中NT-proBNP、BK、TNF- α 、IL-6、IL-10含量比较

注:a.与SO组相比,b.与HF组相比,c.与PIT-S组相比,d.与PIT-M组相比, $P < 0.05$ 。n=6。

Pearson 相关分析结果显示:大鼠血清中 NT-proBNP 含量与 LVEF 呈显著负相关, $r = -0.936$, $P < 0.0001$;BK 含量与 LVEF 呈显著负相关, $r = -0.5424$, $P = 0.002$;TNF- α 含量与 LVEF 呈显著负相关, $r = -0.8213$, $P < 0.0001$;IL-6 含量与 LVEF 呈显著负相关, $r = -0.8863$, $P < 0.0001$;IL-10 含量与 LVEF 呈显著负相关, $r = -0.8485$, $P < 0.0001$ 。见图5。

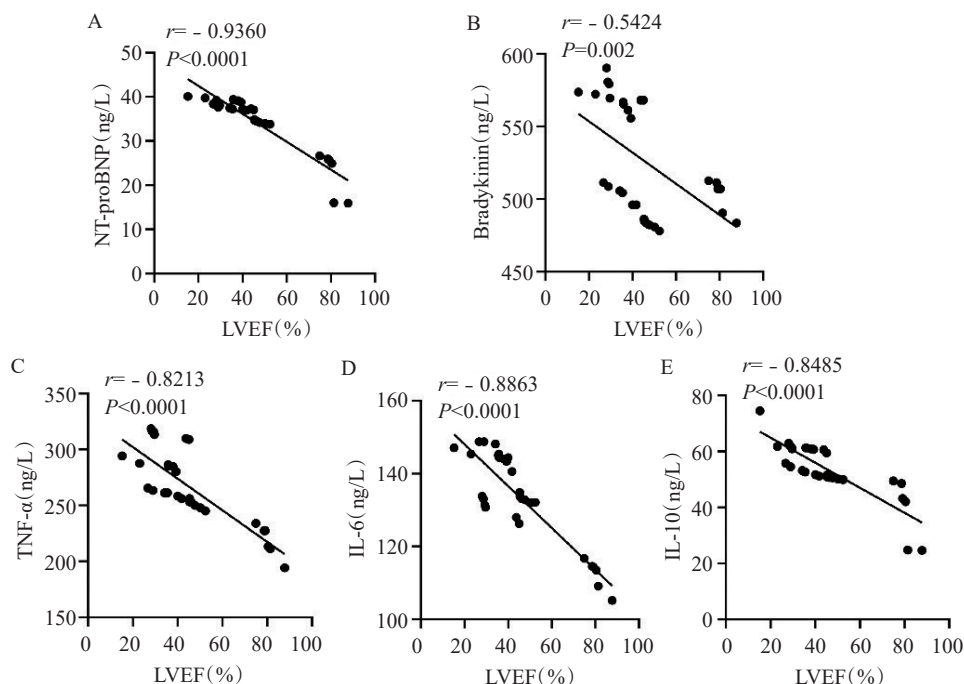
选择以上相关程度最密切的生物学标志物 NT-proBNP,以其血清中含量(ng/L)为因变量(y),大鼠缺血时长(min)为自变量(x)进行曲线回归分析。根据 R^2 选取拟合度最高的曲线模型:三次回归曲线,拟合方程式为: $y = 39.42 + 0.7x - 0.6x^2 + 0.05x^3$, $R^2 = 0.9261$, $P < 0.0001$ 。见图6。

3 讨论

心脏重塑是心力衰竭发生发展的重要因素,包括由心肌损伤或心肌壁应力增加引起的心脏大小、形状和功能的一系列进行性改变,涉及心肌细胞和 ECM 组成的变化^[12]。细胞凋亡是进行性心肌细胞

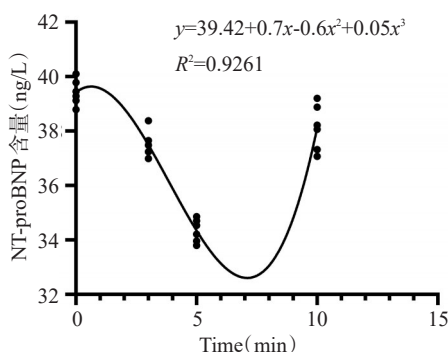
丢失的主要原因,在心力衰竭左室功能恶化中起重要作用。Bcl-2/Bax 是激活凋亡的外在途径启动因子。Bcl-2 蛋白家族中,Bcl-2 抑制凋亡,Bax 促进凋亡激活,Bcl-2/Bax 比值则调控线粒体凋亡通路的启动^[13]。ECM 为心脏细胞提供支架,从而保证心脏的结构完整性和功能,而心肌重构中应激信号引起 ECM 及成纤维细胞特性的广泛改变^[3,14]。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)及其抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)与 ECM 纤维化、舒张功能障碍密切相关。其中 MMP9 可降解基质胶原,诱发基质纤维化重塑,TIMP1 则能抑制 MMP9 的活性,MMP9 与 TIMP1 的相互作用和平衡维持基质组织稳态^[15-17]。本研究结果显示与单纯心衰大鼠相比,三组不同强度 PIT 干预的心衰大鼠心肌组织中的 TIMP1 表达量相对增高,MMP9 表达量及 MMP9/TIMP1 比值明显降低;心肌纤维化程度均显著降低;Bax 表达量显著降低,Bcl-2 表达量及 Bcl-2/Bax 比值相对增高;LVEF 均显著提升;其中 PIT-M 组的相对增量与减量最为显

图5 心衰大鼠血清中各标志物含量与其LVEF的相关性分析



注:心衰大鼠血清中NT-proBNP、BK、TNF-α、IL-6、IL-10含量与其LVEF均呈显著负相关, $P < 0.05$ 。

图6 NT-proBNP血清含量与大鼠缺血时长的曲线回归分析



注:大鼠血清中NT-proBNP含量与PIT训练的单个缺血时长之间存在三次曲线回归关系。 $R^2=0.9261$, $P < 0.0001$ 。

著。表明PIT可通过调控Bcl-2、Bax、MMP9、TIMP1的表达,减少心肌细胞凋亡,延缓心肌基质纤维化重塑,抑制心肌重构,改善心功能,再次验证本课题组前期相关研究结论^[6-7]。其中5min缺血/5min灌注的PIT方案与1min缺血/5min灌注、10min缺血/5min灌注方案相比,对以上标志物表达水平的调控

作用更显著,更有效促进PIT发挥心脏保护作用,从而更大程度改善心衰大鼠心功能。

在心衰发展过程中动态改变的生物学标志物可以帮助诊断疾病,确定其严重程度,评估未来事件的风险并指导治疗^[18]。1998年美国国立卫生研究院将生物标志物定义为:可以被客观测量的用来反映生理、病理或者药理过程的具有生物学意义的标志物。有效的生物学标志物通常具有以下特点:能够快速精确地测定、重复性好、经济性、反映疾病的病理生理过程、指导临床决策^[12]。除了心肌损伤及纤维化重塑标志物Bcl-2/Bax、MMP9/TIMP1,本研究还选取了心衰相关的心肌牵张标志物NT-proBNP,炎症因子标志物TNF-α、IL-6、IL-10,以及KKS系统调节因子BK,分析接受不同干预方案大鼠血中各标志物的含量及其与LVEF的相关关系,进一步验证PIT对心衰大鼠心脏保护作用的最佳干预方案,并探索反映该作用的最佳生物学标志物。

NT-proBNP主要由心室肌合成及分泌,在心室容量扩张或压力负荷增加等病理情况下,其表达量明显增加,通过利钠、利尿和血管舒张作用来降低心

脏负荷,是心力衰竭发展或存在左室收缩功能受损的强有力的预测因子,具有较高的诊断和预后相关性,被认为是心衰诊断生物学标志物的金标准^[19-20]。大量基础和临床研究支持炎症细胞因子在心肌功能障碍和心脏不良重塑的机制中发挥重要作用^[21]。在心肌细胞中,TNF- α 通过扰乱钙稳态发挥负性肌力作用,并可能通过激活Caspase-8等相关的凋亡通路触发凋亡反应^[22-23]。在成纤维细胞中,TNF- α 可能通过破坏基质金属蛋白酶及其抑制剂之间的平衡(如MMP9/TIMP1),导致ECM降解^[24-25];在巨噬细胞中,TNF- α 可能通过促凋亡、负性肌力和基质降解等特性刺激IL-6等促炎因子合成^[26]。IL-6发挥负性肌力作用,并通过gp130/STAT3途径诱导心肌肥厚及纤维化^[27-29]。而抑炎因子IL-10可通过激活ERK 1/2 MAP激酶抑制IKK磷酸化,从而抑制TNF- α 诱导的NF- κ B激活,阻断其心肌细胞氧化、凋亡作用;还可以改变蛋白酶-抗蛋白酶平衡,通过基质保护作用促进受损心肌的愈合^[30-31]。此外,BK通过与B2受体结合,可抑制TNF- α /ACTD诱导的心肌凋亡,延缓心肌重构^[32]。本研究ELISA结果显示HF组大鼠各标志物含量较SO组均有所上升,证明以上标志物在心衰疾病发生发展中的重要作用。三组干预方案中,PIT-M组各标志物含量降幅最大且显著低于HF组,进一步表明5min缺血/5min灌注的PIT方案对心脏的远隔保护作用较其他两组更显著。PIT-L组大鼠血清TNF- α 含量显著高于其他组,可能是由于高强度PIT干预使大鼠双后肢皮肤及肌肉产生破坏性挤压伤,促炎因子TNF- α 释放增多,掩盖高强度PIT对该因子表达量的降低作用。

本研究结果中,大鼠血清NT-proBNP、BK、TNF- α 、IL-6、IL-10含量与大鼠LVEF均呈显著负相关,其中NT-proBNP与LVEF的相关程度最密切。在此基础上进一步探索分析了PIT单次缺血时长与大鼠血清中NT-proBNP含量之间的关系。曲线拟合结果提示:PIT训练改善心衰大鼠心脏结构及功能的最佳干预强度可能出现在单次缺血6—8min之间,此时大鼠血清中NT-proBNP含量最少。本实验为最佳PIT干预强度提供了参考区间,但仍需要进一步增加样本量和细化强度分组来明确最佳方案。

综上所述,与1min缺血/5min灌注、10min缺血/

5min灌注方案相比,5min缺血/5min灌注的PIT方案对心衰大鼠心脏的远隔保护作用更显著,NT-proBNP可作为反映其保护作用效果的最佳生物学标志物。

参考文献

- [1] Loncar G, Cvetinovic N, Lainscak M, et al. Bone in heart failure[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2020, 11(2): 381—393.
- [2] Li Q, Li C, Elnwasany A, Sharma G, et al. PKM1 exerts critical roles in cardiac remodeling under pressure overload in the heart[J]. Circulation, 2021, 144(9): 71—727.
- [3] Kim GH, Uriel N, Burkhoff D. Reverse remodelling and myocardial recovery in heart failure[J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(2): 83—96.
- [4] 王宙, 周琳, 刘洋, 等. 慢性心力衰竭的流行病学研究现状及其防治研究进展[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2019, 11(08): 1022—1024.
- [5] Pelliccia A, Sharma S, Gati S, et al. 2020 ESC Guidelines on sports cardiology and exercise in patients with cardiovascular disease[J]. Eur Heart J, 2021, 42(1): 17—96.
- [6] 程怡慧, 张秀, 张心彤, 等. 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[J]. 中国康复医学杂志, 2021, 36(06): 639—648.
- [7] 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(06): 641—646.
- [8] 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.
- [9] 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.
- [10] Lenk K, Palus S, Schur R, et al. Effect of ghrelin and its analogues, BIM-28131 and BIM-28125, on the expression of myostatin in a rat heart failure model[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2013, 4(1): 63—69.
- [11] 陈明, 魏易洪, 侯玉鸣, 等. 心力衰竭动物模型研究进展[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(07): 1103—1105.
- [12] Chow SL, Maisel AS, Anand I, et al. Role of biomarkers for the prevention, assessment, and management of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association[J]. Circulation, 2017, 135(22): e1054—e1091.

- [13] Yan X, Wu H, Ren J, et al. Shenfu formula reduces cardiomyocyte apoptosis in heart failure rats by regulating microRNAs[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 227:105—112.
- [14] Bacmeister L, Schwarzl M, Warnke S, et al. Inflammation and fibrosis in murine models of heart failure[J]. *Basic Res Cardiol*, 2019, 114(3):19.
- [15] Tager T, Wiebalck C, Frohlich H, et al. Biological variation of extracellular matrix biomarkers in patients with stable chronic heart failure[J]. *Clin Res Cardiol*, 2017, 106(12):974—985.
- [16] Bironaite D, Daunoravicius D, Bogomolovas J, et al. Molecular mechanisms behind progressing chronic inflammatory dilated cardiomyopathy[J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2015, 15:26.
- [17] 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.
- [18] Yancy CW, 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—e161.
- [19] Nakagawa O, Ogawa Y, Itoh H, et al. Rapid transcriptional activation and early mRNA turnover of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy. Evidence for brain natriuretic peptide as an "emergency" cardiac hormone against ventricular overload[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1995, 96(3):1280—1287.
- [20] Alawieh H, Chemaly TE, Alam S, et al. Towards point-of-care heart failure diagnostic Platforms: BNP and NT-proBNP Biosensors[J]. *Sensors (Basel)*, 2019, 19(22):5003.
- [21] Hanna A, Frangogiannis NG. Inflammatory cytokines and chemokines as therapeutic targets in heart failure[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34(6):849—863.
- [22] Yokoyama T, Vaca L, Rossen RD, et al. Cellular basis for the negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian heart[J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1993, 92(5):2303—2312.
- [23] Haudek SB, Taffet GE, Schneider MD, et al. TNF provokes cardiomyocyte apoptosis and cardiac remodeling through activation of multiple cell death pathways[J]. *J Clin Invest*. 2007, 117(9):2692—2701.
- [24] Sivasubramanian N, Coker ML, Kurrelmeyer KM, et al. Left ventricular remodeling in transgenic mice with cardiac restricted overexpression of tumor necrosis factor[J]. *Circulation*. 2001, 104(7):826—831.
- [25] Li YY, Feng YQ, Kadokami T, et al. Myocardial extracellular matrix remodeling in transgenic mice overexpressing tumor necrosis factor α can be modulated by anti-tumor necrosis factor α therapy[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(23):12746—12751.
- [26] Hamid T, Gu Y, Ortines RV, et al. Divergent tumor necrosis factor receptor-related remodeling responses in heart failure: role of nuclear factor-kappaB and inflammatory activation[J]. *Circulation*, 2009, 119(10):1386—1397.
- [27] Kinugawa K, Takahashi T, Kohmoto O, et al. Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on $[Ca^{2+}]_i$ and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes[J]. *Circulation Research*, 1994, 75(2):285—295.
- [28] Melendez GC, McLarty JL, Levick SP, et al. Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats[J]. *Hypertension*, 2010, 56(2):225—231.
- [29] Kunisada K, Tone E, Fujio Y, et al. Activation of gp130 transduces hypertrophic signals via STAT3 in cardiac myocytes[J]. *Circulation*, 1998, 98(4):346—352.
- [30] Khaper N, Bryan S, Dhingra S, et al. Targeting the vicious inflammation-oxidative stress cycle for the management of heart failure[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(7):1033—1049.
- [31] Kaur K, Dhingra S, Slezak J, Sharma AK, et al. Biology of TNF α and IL-10, and their imbalance in heart failure[J]. *Heart Fail Rev*, 2009, 14(2):113—123.
- [32] 左萍. 缓激肽抑制 TNF- α /ACTD 诱导 HLB_2G_5 心肌细胞凋亡及其作用机制的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007:58.