

冲击波对糖尿病大鼠股动脉血管黏附分子及血流动力学的影响*

邹晋峰¹ 贺纯静^{1,3} 康新国¹ 段自坤¹ 李林艳² 刘云琴¹ 黄朝东¹

摘要

目的:探讨冲击波对糖尿病大鼠股动脉血管黏附分子及血流动力学的影响。

方法:清洁级健康雄性SD大鼠18只,10周龄,体重220g—250g,随机分为3组(n=6):对照组(A组)、糖尿病组(B组)、冲击波治疗组(C组)。B组和C组通过高糖高脂饮食及腹腔注射链脲菌素建立糖尿病模型,C组在模型建立成功后第1、2、3、4周时各接受1次冲击波治疗。治疗结束后,超声观察各组大鼠股动脉直径和多普勒血流变化,并取各组左侧股动脉,蛋白质印迹法(Western Blot)检测ICAM-1、VCAM-1蛋白表达及反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测ICAM-1 mRNA、VCAM-1 mRNA的表达。

结果:与A组比较,B组、C组大鼠ICAM-1、VCAM-1蛋白表达及ICAM-1 mRNA、VCAM-1 mRNA表达升高($P<0.05$);与B组比较,C组ICAM-1、VCAM-1蛋白表达及ICAM-1 mRNA、VCAM-1 mRNA表达降低($P<0.05$);与A组比较,B、C组大鼠股动脉直径及血流量明显减小($P<0.05$);与B组比较,C组大鼠股动脉直径及血流量增大($P<0.05$)。

结论:冲击波治疗可以改善糖尿病大鼠股动脉直径,增加股动脉血流量,可能与减少ICAM-1、VCAM-1蛋白表达、ICAM-1 mRNA、VCAM-1 mRNA的表达有关。

关键词 冲击波;糖尿病;黏附分子;血流动力学

中图分类号:R587.1,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2023)-06-0737-05

Effects of shock wave on vascular adhesion molecules and hemodynamics of femoral artery in diabetic rats/ZOU Jinfeng, HE Chunjing, KANG Xinguo, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2023, 38(6):737—741

Abstract

Objective: To investigate the effects of shock wave on femoral artery adhesion molecules and hemodynamics in diabetic rats.

Method: Eighteen healthy male SD rats aged 10 weeks with a body weight of 220g—250g were randomly divided into 3 groups: control group (group A, n=6), diabetes group (group B, n=6) and shock wave treatment group (group C, n=6). Group B and C were treated with high glucose and high fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin to establish diabetic models. Group C was treated with shock wave therapy at 1, 2, 3 and 4 weeks after successful model establishment. After the treatment, the changes in femoral artery diameter and Doppler blood flow in each group were observed by ultrasonography. The left femoral artery of each group was taken to detect the protein expressions of ICAM-1 and VCAM-1 by Western Blot and the mRNA expressions of ICAM-1 and VCAM-1 by RT-PCR.

Result: Compared with group A, the protein expression of ICAM-1 and VCAM-1 and mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 in group B and C were increased ($P<0.05$); compared with group B, the protein expression of ICAM-1 and VCAM-1 and mRNA expression of ICAM-1 and VCAM-1 in group C were de-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2023.06.004

*基金项目:贵州省卫生健康委科学技术基金(gzWJKJ2020-1-135);黔科合基础-ZK[2021]一般403

1 贵州省人民医院疼痛科,贵州省贵阳市,550002; 2 贵州医科大学研究生院; 3 通讯作者

第一作者简介:邹晋峰,男,副主任医师; 收稿日期:2021-10-28

creased ($P<0.05$); compared with group A, the diameter and blood flow of femoral artery in groups B and C were significantly decreased ($P<0.05$); compared with group B, the diameter and blood flow of femoral artery in group C increased ($P<0.05$).

Conclusion: Shock wave therapy can improve the diameter of femoral artery and increase the blood flow of femoral artery in diabetic rats. It may be related to the decrease of the expression of ICAM-1, VCAM-1 protein, ICAM-1 mRNA and VCAM-1 mRNA.

Author's address Department of Pain, Guizhou Province People's Hospital, Guiyang, 550002

Key word shock wave; diabetes mellitus; adhesion molecule; hemodynamics

糖尿病患病率从1980年的0.67%升至2013年的10.4%^[1]。糖尿病血管病变是糖尿病最常见的并发症之一,也是糖尿病多数并发症发生的重要环节,早期糖尿病微血管病变是糖尿病神经病变、糖尿病肾病、糖尿病心血管病变发生的基础^[2-3]。体外冲击波治疗是一种通过将能量集中释放促进受损组织再生的非手术治疗方法^[3],具有无创、副作用小等特点,可以抑制炎症反应、氧化应激和凋亡,早期多用于骨骼肌疾病的治疗,现逐步应用于多种血管病变。血管粥样硬化是2型糖尿病最常见的并发症,血管内皮细胞损伤和单核细胞黏附是粥样硬化的早期激活反应,其中,血管内皮细胞分泌黏附分子介导白细胞附着是关键的一步^[4]。黏附分子,包括免疫球蛋白超家族(immunoglobulin superfamily, IgSF)、整合素、钙粘素、选择素等,在其中扮演着慢性炎症反应与内皮功能紊乱间的重要媒介作用。细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)是一种IgSF,在细胞因子刺激下表达于内皮细胞和白细胞;血管细胞黏附分子-1(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)是另一种IgSF,在高糖或多种炎症因子(如白介素1- β 、肿瘤坏死因子- α 、脂多糖、Toll样受体等)刺激下表达于内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞^[5]。本研究拟探讨体外冲击波治疗对糖尿病大鼠血管直径、血流量的影响及对股动脉ICAM-1、VCAM-1表达的影响。

1 材料与方法

健康成年清洁级、雄性SD大鼠18只,10周龄,体重220g—250g,由陆军军医大学实验动物中心提供(动物使用许可证号:SYXK(渝)2017.0005)。将SD大鼠随机分为3组($n=6$):对照组(A组),糖尿病血管病变组(B组)及体外冲击波治疗组(C组)。A

组自由进食、饮水,B、C组高糖高脂饮食喂养4周。本研究所有程序均符合陆军军医大学实验室动物护理和使用指南,并通过贵州省人民医院伦理委员会批准(批号:伦审[动物]2021-011)。

1.1 建模

糖尿病病变动物模型建立:依据文献^[5],B组和C组腹腔注射链脲佐菌素(Sigma公司,美国)60mg/kg,(A组腹腔注射相同容积生理盐水)。分别于注射前空腹(禁食12h后)、注射7天后空腹(禁食12h后)取尾静脉血标本测定血糖浓度,注射7天后血糖浓度 $>16.7\text{mmol/L}$ 为糖尿病病变模型建立成功。

1.2 冲击波治疗

C组(冲击波治疗组)于糖尿病模型建立成功后第1周、第2周、第3周、第4周时各接受1次冲击波治疗:体外冲击波治疗仪(EMS公司,型号:Swiss DolorClast Cart,瑞士),根据我科前期研究确定参数^[6]:放散性低能量手柄,冲击头($\Phi 6\text{mm}$),能量密度为 0.16mJ/mm^2 ,频率10Hz,能量1.0bar,次数2000次。治疗前腹腔注射1%戊巴比妥钠40mg/kg,保留自主呼吸,固定大鼠后对其左后肢股动脉分布区域进行备皮处理,碘伏常规皮肤消毒,以左后肢股动脉分布范围为治疗区域。B组及A组大鼠在第1周、第2周、第3周、第4周时各接受1次同等剂量戊巴比妥钠麻醉及备皮处理。

1.3 超声观测

第4周治疗后,腹腔注射1%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉各组大鼠,采用高分辨率超声系统(Vevo 770, VisualSonics, Toronto, ON, Canada)测量股动脉直径和多普勒血流变化情况。测量血管舒张期内径:在左心室收缩末期(即同步心电图T波)冻结图像,进行血管内径的测量。脉冲多普勒取频谱测量时,声束方向和血流方向的夹角 $<60^\circ$,尽可能使每次

测量保持一致,测量收缩期峰值血流速度(peak systolic velocity, Vs)。

1.4 取材

第4周治疗及超声观测结束后,各组大鼠禁食24h,腹腔注射1%戊巴比妥钠(40mg/kg)麻醉,备皮,手术区皮肤消毒,根据股动脉搏动情况确定股动脉的位置和走行方向,将皮肤沿股动脉走向纵向切开,用纹式钳把周围组织钝性分离开来,以暴露股动脉鞘。用眼科镊沿着血管走向钝性分离出股动脉约4cm—5cm,两端剪断,磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)冲洗,置于无菌冻存管中, - 80°C冰箱保存。

1.5 检测

Western Blot方法测定血管组织ICAM-1、VCAM-1蛋白的量,均按试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司)说明书操作。RT-PCR方法检测血管组织ICAM-1 mRNA、VCAM-1 mRNA,血管组织ICAM-1、VCAM-1引物的设计,在NCBI数据库(<http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/>)中查找基因序列,设计RT-PCR引物,引物序列见表1。

1.6 统计学分析

采用SPSS 23.0软件进行分析,正态分布的计量资料以均数±标准误表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 糖尿病建模

B组与C组大鼠建模7天后尾静脉血糖对比(表2),组间比较无显著差异($P > 0.05$),提示B组与C组糖尿病病变模型造模均成功。A组血糖处理前后无差异。

2.2 冲击波治疗对糖尿病大鼠股动脉直径的影响

与A组比较,B、C组大鼠股动脉直径减小($P < 0.05$);与B组比较,C组大鼠股动脉直径增大($P <$

0.05),见表3、图1,提示糖尿病大鼠股动脉直径较正常大鼠减小,而经过冲击波治疗后,股动脉直径增大。

2.3 冲击波治疗对糖尿病大鼠股动脉血流的影响

与A组比较,B、C组大鼠股动脉血流量减小($P < 0.05$);与B组比较,C组大鼠股动脉血流量增大($P < 0.05$),见表3、图2,提示糖尿病大鼠股动脉血流量较正常大鼠减小,而经过冲击波治疗后,股动脉血流量增大。

2.4 冲击波治疗对血管黏附分子的影响

与A组比较,B组、C组大鼠ICAM-1、VCAM-1蛋白及ICAM-1 mRNA、VCAM-1 mRNA表达升高($P < 0.05$);与B组比较,C组大鼠ICAM-1、VCAM-1蛋白及ICAM-1 mRNA、VCAM-1 mRNA表达降低($P < 0.05$),见表4、图3、图4,提示经过冲击波治疗后,糖尿病大鼠血管黏附分子ICAM-1及VCAM-1表达均下降。

采用高分辨率超声系统Vevo 770, VisualSonics, 测量股动脉直径和多普勒血流变化情况,测量血管舒张期内径在左心室收缩末期的冻结图像,进行血管内径的测量(白色箭头间范围,每幅图像右上为测量数值)(图1)。脉冲多普勒取频谱测量时,声束方向和血流方向的夹角 $< 60^\circ$,尽可能使每次测量保持一致,测量峰值血流速度(图2)。

表2 3组大鼠造模前后尾静脉血糖变化($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

组别	造模前	造模后
A组	4.6±0.9	4.8±0.5 ^③
B组	4.8±0.6	20.4±3.6 ^①
C组	4.5±0.8 ^②	19.6±2.5 ^{①②}

注:①与造模前比较, $P < 0.05$; ②与B组比较, $P > 0.05$; ③与腹腔注射生理盐水前,A组前后值, $P > 0.05$ 。A组:对照组; B组:糖尿病血管病变组; C组:体外冲击波治疗组。

表3 3组大鼠股动脉直径及血流速度的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	直径(cm)	血流速度(cm/s)
A组	0.14±0.006	31.7±7.7
B组	0.06±0.007 ^①	13.4±5.6 ^①
C组	0.09±0.006 ^{①②}	24.8±6.7 ^{①②}

注:①与A组比较, $P < 0.05$; ②与B组比较, $P < 0.05$ 。A组:对照组; B组:糖尿病血管病变组; C组:体外冲击波治疗组。

表1 RT-PCR的引物序列

引物	引物序列
Icam1-F	5'-GATGGTGAAGTCTGTCAA-3'
Icam1-R	5'-AGCCTTCTGTAACCTGTATA-3'
Vcam1-F	5'-CCTCACCTTAATTGCTATG-3'
Vcam1-R	5'-CCACTTCTGTTTTGTCTC-3'
β -actin-F	5'-CATCCTGCGTCTGGACCTGG-3'
β -actin-R	5'-TAATGTCACGCACGATTCC-3'

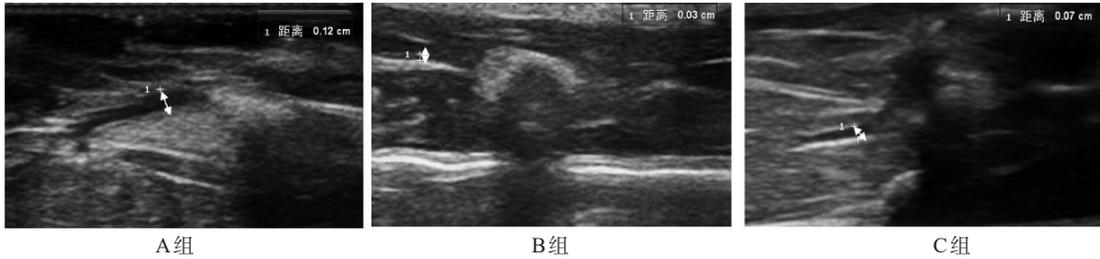
注:①F:上游引物;②R:下游引物。

表4 3组大鼠ICAM-1、VCAM-1蛋白及其mRNA表达的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	ICAM-1	ICAM-1 mRNA	VCAM-1	VCAM-1 mRNA
A组	23.4±1.5	23.7±3.7	22.9±2.9	22.7±4.1
B组	35.8±0.6 ^①	33.4±0.6 ^①	32.6±0.3 ^①	37.5±0.5 ^①
C组	26.5±0.7 ^{①②}	27.4±0.5 ^{①②}	28.4±0.7 ^{①②}	31.3±0.4 ^{①②}

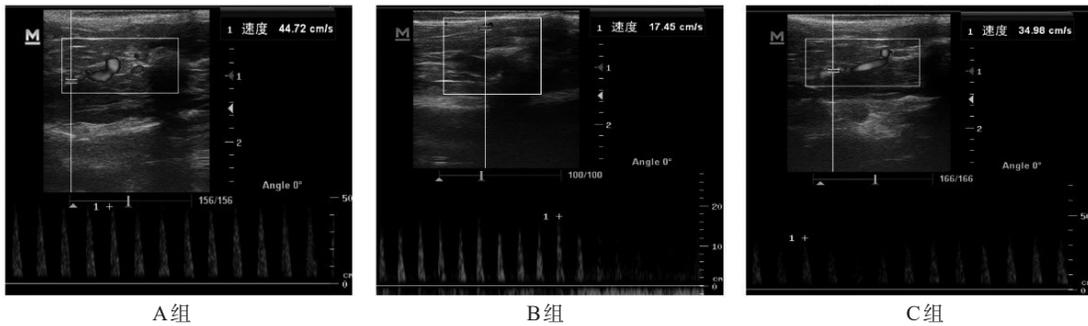
注:①与A组比较, $P < 0.05$; ②与B组比较, $P < 0.05$ 。A组:对照组; B组:糖尿病血管病变组; C组:体外冲击波治疗组。

图1 3组大鼠股动脉直径的变化



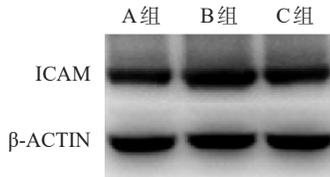
A组:对照组; B组:糖尿病血管病变组; C组:体外冲击波治疗组。

图2 3组大鼠股动脉血流速度的变化



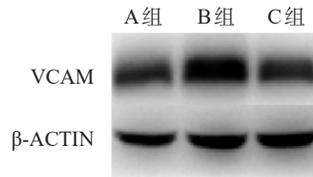
A组:对照组; B组:糖尿病血管病变组; C组:体外冲击波治疗组。

图3 3组大鼠股动脉ICAM-1蛋白含量



A组:对照组; B组:糖尿病血管病变组; C组:体外冲击波治疗组。

图4 3组大鼠股动脉VCAM-1蛋白含量



A组:对照组; B组:糖尿病血管病变组; C组:体外冲击波治疗组。

3 讨论

糖尿病是一种复杂的进行性代谢性疾病,持续的高血糖可引发微血管和大血管并发症。微血管并发症是视网膜病变、周围神经病变和糖尿病肾病等重要疾病的始发因素;糖尿病大血管并发症表现为冠状动脉、外周血管粥样硬化;脑卒中则是糖尿病患者的主要死亡原因^[7]。糖尿病血管并发症与动脉粥样硬化密切相关,动脉粥样硬化是在动脉血管壁上逐渐发生的炎症过程,根据组织学分类,硬化过程中由轻到重可分为I型、II型、III型、IV型和V型和VI型^[8]。2型糖尿病患者由于一直处于慢性炎症状态,体内ICAM-1水平显著升高^[9]。

细胞黏附分子是一类表达于细胞表面,介导细胞与细胞间或细胞与基质间相互接触与结合的糖蛋

白,在动脉粥样硬化中,黏附分子介导的炎症过程起了极其重要的作用^[10]。2型糖尿病患者体内ICAM-1、VCAM-1升高,且存在长期慢性低强度的炎症反应^[11]。其中,ICAM-1是介导炎症反应的主要调节因子^[12],VCAM-1可以被认为是一种预测心血管疾病如缺血性心脏病、脑卒中和微血管病等的炎症标志物,也被认为是动脉粥样硬化的炎症标志物和危险因素^[13-15]。研究发现,在2型糖尿病患者中,VCAM-1与老年痴呆症的发生密切相关^[16]。本研究观察到,糖尿病大鼠股动脉直径减小,血流减慢,ICAM-1与VCAM-1表达均升高,表明糖尿病可能因黏附分子介导的炎症过程而导致血管病变。

体外冲击波疗法由1980年Chaussy等^[17]首次应用,成功治疗肾结石,近年来其治疗范围从碎石、骨

折不愈合等逐渐扩展到肌肉筋膜疾病、慢性疼痛、男科等领域;治疗方式也从单纯聚焦式发展到发散式、心电触发等多种方式,及由此发展的多种不同仪器。在治疗血管性疾病方面,已安全应用于改善勃起功能障碍^[18]、难治性心绞痛^[19]、周围血管病变^[20]等疾病;低能量冲击波被认为可较安全地应用于男性生殖器血管、心脏血管及外周小血管。近期研究认为,低能量冲击波能够在糖尿病神经痛患者中促进神经再生^[21]。我们前期研究也发现,冲击波能改善糖尿病神经痛患者症状^[22],减少TNF- α 、AT1等炎症因子的表达^[23-25]。国外研究也证明,冲击波治疗能够引起NO水平的增加和随后NF-kappaB激活的抑制,抑制对组织的炎症作用^[26]。而NF-kappaB下调具有抑制黏附分子表达的作用^[27-28]。本次研究观察到,冲击波治疗能够改善糖尿病大鼠股动脉血流,减轻股动脉损伤,减少大鼠股动脉中黏附分子ICAM-1、VCAM-1蛋白表达与mRNA表达。因此,体外冲击波治疗具有保护糖尿病大鼠血管病变的作用,可能与其减轻相关炎症反应,抑制NF-kappaB传导等通路,从而减少黏附分子的表达有关。

综上,体外冲击波可以降低血管黏附分子的表达,改善血流动力学,从而治疗糖尿病引起的相关血管病变,相对安全,且无明显副作用。本实验也存在样本量较小、可能存在实验误差等缺点,还需做进一步相关研究。

参考文献

- [1] 中华医学会糖尿病学分会.中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J].中华糖尿病杂志,2018,10(1):4-67.
- [2] 李秀钧,邬云红.糖尿病是一种炎症性疾病[J].中华内分泌代谢杂志,2003,19(4):251-253.
- [3] 中国研究型医院学会冲击波医学专业委员会.骨科肌体冲击波疗法专家共识[J/OL].中国医学前沿杂志,2014(6):170-177.
- [4] Hegazy GA, Awan Z, Hashem E, et al. Levels of soluble cell adhesion molecules in type 2 diabetes mellitus patients with macrovascular complications[J]. J Int Med Res, 2020, 48(4):300060519893858.
- [5] 邵俊伟,蔡逊.高脂饮食联合链脲佐菌素建立2型糖尿病大鼠模型的研究进展[J].中国实验动物学报,2014(4):90-93.
- [6] 余倩,贺纯静,康新国,等.不同能量冲击波对大鼠糖尿病神经痛的影响[J].中华麻醉学杂志,2018,38(12):1471-1475.
- [7] American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus[J]. Diabetes Care, 2013, 36 Suppl 1(Suppl 1):S67-S74.
- [8] Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. a report from the committee on vascular lesions of the council on arteriosclerosis, American Heart Association[J]. Circulation, 1995, 92(5):1355-1374.
- [9] 向敏.2型糖尿病肾病患者CRP与黏附分子水平检测及意义[J].中国医师杂志,2008,10(2):246-247.
- [10] Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis[J]. J Pathol, 1993, 171(3):223-229.
- [11] el-Mesallamy H, Suwailem S, Hamdy N. Evaluation of C-reactive protein, endothelin-1, adhesion molecule(s), and lipids as inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus patients[J]. Mediators Inflamm, 2007(2007):73635.
- [12] Bui TM, Wiesolek HL, Sumagin R. ICAM-1: a master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis[J]. J Leukoc Biol, 2020, 108(3):787-799.
- [13] Kaufmann BA, Sanders JM, Davis C, et al. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis with targeted ultrasound detection of vascular cell adhesion molecule-1[J]. Circulation, 2007, 116(3):276-284.
- [14] Cho YS, Kim CH, Ha TS, et al. Inhibition of STAT3 phosphorylation by sulforaphane reduces adhesion molecule expression in vascular endothelial cell[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016, 94(11):1220-1226.
- [15] de Lemos JA, Hennekens CH, Ridker PM. Plasma concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent cardiovascular risk[J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36(2):423-426.
- [16] Zhang L, Mao H. The relationship between serum VCAM-1 and Alzheimer's disease in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. Diabetes Metab Syndr Obes, 2020(13):4661-4667.
- [17] Chaussy C, Brendel W, Schmiedt E. Extracorporeally induced destruction of kidney stones by shock waves[J]. Lancet. 1980, 13;2(8207):1265-1268.
- [18] 莫敦胜,詹绪新,石红卫,等.低能量冲击波治疗勃起功能障碍疗效及安全性:随机对照试验的meta分析[J].中华男科学杂志,2019,25(3):257-264.
- [19] 杨祥,王钰.体外冲击波在心血管疾病康复中的应用进展[J].中国康复医学杂志,2018,33(7):861-864.
- [20] 秦乾统,谢育龙,蒋东红,等.发散式体外冲击波治疗糖尿病足的疗效观察[J].现代实用医学,2020,32(9):1136-1137.
- [21] Lohse-Busch H, Marlinghaus E, Reime U, et al. Focused low-energy extracorporeal shock waves with distally symmetric polyneuropathy (DSPNP): a pilot study[J]. NeuroRehabilitation, 2014, 35(2):227-233.
- [22] 康新国,贺纯静,余倩,等.气压弹道式体外冲击波治疗糖尿病神经病变的疗效观察[J].贵州医药,2019,43(1):105-106.
- [23] Zhou Y, Dai H, Long J, et al. Effects of extracorporeal shock waves on neuralgia in diabetic rats[J]. J Pain Res, 2019(12):387-394.
- [24] Long J, He C, Ding H, et al. Effect of shock wave on vascular lesions in diabetic rats[J]. Pain Physician, 2019, 22(5):E505-E510.
- [25] 龙娟,丁华,黄朝东,等.体外冲击波治疗对大鼠糖尿病神经病变的影响[J].中华麻醉学杂志,2019,39(12):1472-1475.
- [26] Mariotto S, de Prati AC, Cavalieri E, et al. Extracorporeal shock wave therapy in inflammatory diseases: molecular mechanism that triggers anti-inflammatory action[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(19):2366-2372.
- [27] Zhong L, Simard MJ, Huot J. Endothelial microRNAs regulating the NF- κ B pathway and cell adhesion molecules during inflammation[J]. FASEB J, 2018, 32(8):4070-4084.
- [28] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6):a001651.