

· 基础研究 ·

短暂缺血阈强度运动促进心肌侧支循环生成的机制

陆晓 励建安 吴涛 黄澎 邱峰 孟祥博 高晶

【摘要】目的 在小型猪可控性心肌缺血动物模型上,观察短暂缺血阈强度运动促进缺血区冠状动脉侧支循环生成的机制。**方法** 选择健康广西巴马小型猪 32 头,钝缘支装上气囊缩窄器制作可控性心肌缺血动物模型,4 周后行冠状动脉造影证实模型建立成功。实验动物随机分为假手术组、单纯缺血组和运动组。单纯缺血组通过缩窄器注水加压制造心肌缺血,每日 2 次,每次 2 min,每周 5 d,共 8 周;运动组除制造静息状态心肌缺血外,每天还进行平板训练 30 min,其中包括 2 次缺血阈强度运动,每次 2 min,每周训练 5 d,共 8 周。假手术组不作任何干预。采用微球测定训练前、后缺血区相对心肌血流量(RMBF);采用 Western-blot 及 Real-time RT-PCR 法测定缺血心肌局部血管内皮细胞生长因子(VEGF)及其受体胎肝激酶-1(Flk-1)的蛋白及 mRNA 表达量;采用 ELISA 法测定血清肌钙蛋白含量以确定训练的安全性;应用电镜观察心肌细胞损伤情况。**结果** 运动组 RMBF 显著高于单纯缺血组及假手术组(均 $P < 0.01$);单纯缺血组 RMBF 亦显著高于假手术组($P < 0.01$)。运动组 VEGF 及 Flk-1 的蛋白及 mRNA 表达量均显著高于单纯缺血组及假手术组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。单纯缺血组的 VEGF 及 Flk-1 的蛋白及 mRNA 表达量均显著高于假手术组($P < 0.05$)。单纯缺血组及运动组训练后,血清肌钙蛋白与训练前相比无显著增加(均 $P > 0.05$)。光镜及电镜检查无明显异常。**结论** 小型猪可控性心肌缺血动物模型给予适宜短暂缺血阈强度运动,可通过缺血心肌局部 VEGF 及其受体 Flk-1 的上调安全有效地促进冠状动脉侧支循环生成。

【关键词】 缺血; 侧支循环; 运动; 血管内皮生长因子; 胎肝激酶-1

Intermittent exercise promotes collateral circulation in ischemic myocardial tissue LU Xiao, LI Jian-an, WU Tao, HUANG Peng, QIU Feng, MENG Xiang-bo, GAO Jing. Rehabilitation Department, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: LI Jian-an, Email: lijianan@public1.ptt.js.cn

【Abstract】Objective To observe whether appropriate intermittent exercise at the ischemic threshold can safely promote collateral circulation in an ischemic area of the myocardium through the increased expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor fetal liver kinase-1 (Flk-1). **Methods** A balloon constrictor was surgically implanted in the first obtuse marginal coronary artery (OM1) of miniature pigs. The subjects were divided into 3 groups: a sham-operation group, a pure ischemia group, and an exercise training group. Subjects in the exercise training group performed individualized treadmill programs 30 min daily, 5 d per week, for 8 weeks, including 2 two-minute episodes of exercise-induced ischemia. Two pre-exercise episodes of pure ischemia induced by brief OM1 occlusion were also conducted. Only pure ischemia was induced in the pure ischemia group, and the sham-operation group remained sedentary for the experimental period. Relative myocardial blood flow (RMBF) was measured using microspheres. VEGF and Flk-1 expression levels were measured by Western blotting and real time RT-PCR analyses. Cardiac troponin I (ctnI) levels were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Light and electron microscopy were employed to examine myocardia damage in the ischemic area. **Results** RMBFs in the exercise training group were significantly higher than those in the pure ischemia and sham-operation groups. RMBFs in the pure ischemia group were significantly higher than those in the sham-operation group. The expression of VEGF and Flk-1 proteins and mRNAs in the exercise training group were significantly higher than those in the pure ischemia and sham-operation groups, and the levels in the pure ischemia group were also significantly higher than those in the sham-operation group. After training, no myocardial damage and no ctnI increase was observed in the pure ischemia group. Microscopy revealed no obvious structural changes. **Conclusion** Intermittent exercise at the

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2009.09.004

基金项目:国家自然科学基金(30370687)

作者单位:210029 南京,南京医科大学第一附属医院康复科

通信作者:励建安,Email:lijianan@public1.ptt.js.cn

ischemia threshold intension can safely promote coronary collateral formation through upregulation of VEGF and Flk-1 expression in the ischemic myocardial area of a porcine model.

【Key words】 Ischemia; Collateral blood circulation; Exercise; Vascular endothelial growth factor; Fetal liver kinase-1

冠心病患者通过冠状动脉介入治疗及搭桥手术进行血运重建,是改善缺血区心肌灌注的常用方法。然而,有很多患者由于各种原因不适于做此类手术^[1]。另外,由于介入治疗存在围手术期并发症及术后再狭窄等问题,因此心脏康复治疗的主要对象——稳定型心绞痛患者介入治疗的风险/收益率还在争论中^[2]。所以,冠状动脉侧支生成,即患者自身形成“生物搭桥”以补充缺血区供血不足,有可能成为稳定型冠心病极具潜力的治疗方法之一。同时,心肌缺血区侧支循环生成,即心脏康复的中心效应也是心脏康复研究的热点问题之一^[3,4]。

侧支循环的生成与多种促血管生长因子及其受体的激活和抑制物下调有关。其中最重要的促血管生长因子是血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)及其受体-1(又称 FMS 样酪氨酸激酶, FMS-like tyrosine kinase, Flt-1)、受体-2(又称胎肝激酶-1, fetal liver kinase-1, Flk-1)^[5]。目前,有不少研究试图通过外源性 VEGF 输入或基因重组来实现缺血区域治疗性血管新生(也称为生物搭桥)。但由于靶向性缺乏^[6],可导致缺血部位作用不足而在非缺血部位产生不良作用。因此,如何诱导心肌缺血区局部内源性 VEGF 及受体的表达增加,从而促成自身动脉的“生物搭桥”,成为临床需要迫切解决的问题。

缺血可以增加心肌内 VEGF 及其受体的表达,并刺激侧支循环生成^[7,8]。但直接心肌缺血在临床上难以实现,且过分缺血可造成不可逆的心肌损伤。因此,只有确定适宜的缺血负荷及缺血的可控性,才能发挥缺血作用。我们前期在兔单纯缺血模型的研究中发现,引起最大侧支生成的最小缺血强度为 2 min 完全性缺血,频率为 2 次/d, 3 ~ 5 次/周^[9-11]。但此结果源于小动物且单纯缺血在临床不具有可操作性。

运动可通过增加组织耗氧造成狭窄冠状动脉供应区相对缺血,促进局部 VEGF 及其受体表达增加,从而产生新的侧支循环,实现生物搭桥。且运动还可通过调节运动强度的大小诱导相对性心肌缺血的发生或使之减轻甚至消失。因此,运动可实现心肌缺血的可控性,而且具有临床可操作性。本研究的假说为运动诱发的适宜间断性心肌缺血可通过上调缺血区域局部内源性 VEGF 及其受体,安全有效地促进冠状动脉侧支循环形成,具有现实的临床意义。

材料与方法

一、实验动物

健康广西巴马小型猪 32 头,体重(23.7 ± 4.0)kg。所有猪均经过适应性活动平板训练 1 周,1 周后均可在平板上稳定跑动。

二、水囊缩窄器

选用合适 PTCA 球囊(直径 4 mm,长 15 ~ 20 mm),用 7 号慕丝线将水囊固定于自制的不锈钢环(内径 4 mm,厚 1 mm,开口 1 mm)内(图 1)。

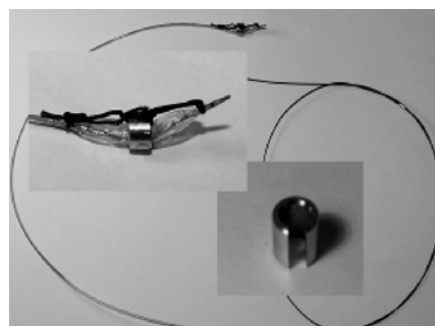


图 1 水囊缩窄器

三、手术过程

手术麻醉采用氯胺酮(20 mg/kg 体重)肌肉注射,戊巴比妥钠(25 mg/kg 体重)静脉注射,司可林(8 mg/kg 体重/h)静脉滴注;经左侧第 4 肋间进胸,水囊缩窄器卡在左回旋支第 1 分支钝缘支(obtuse marginal 1, OM1)起始部;水囊注水加压至阻断靶血管(心电图出现 ST 段抬高),保持该压力 2 min,减压后心电图可恢复正常;关胸。4 周后行冠状动脉造影,于水囊加压前、后,记录造影图像及心电图变化。

四、训练过程

将实验猪分为假手术组、单纯缺血组和运动组。单纯缺血组及运动组每天均在安静状态下通过水囊加压使心电图产生缺血改变,2 次/天,每次 2 min;第 1 次与第 2 次间隔 10 min,每周 5 d,共 8 周。运动组除制造静息状态心肌缺血外,每天还进行平板训练 30 min:先行 3 min 准备活动,然后做中等强度(80% 最大心率水平)运动 10 min,接着做缺血阈强度运动 2 min,重复中等强度运动 10 min 和缺血阈强度运动 2 min,最后做 3 min 结束活动;运动频率为每周 5 次,持续 8 周。假手术组不作任何干预。

在实验过程中,有 5 头猪在围手术期死亡,2 头猪

死于呼吸系统疾病,1 头猪在训练间歇期突然死亡。共有 24 头猪完成实验,每组 8 头。

五、实验室检查

8 周后,取缺血区域心肌(沿 OM1 走向缩窄器下方 1 cm 处)及正常区域心肌(沿左前降支走向心尖上方 2 cm 处)作相关检测。

(一) 相对心肌血流量(relative myocardial blood flow, RMBF)测定

1. 微粒体注入体内时间:手术日将 OM1 装上缩窄器后,水囊加压,由左心耳注入曙红色微球(美国 Triton 公司)1.3 ml,共加压 2 min,在最后 30 s 注入黄色微球 1.3 ml。取材日在水囊加压前,由左心耳注入紫色微球 1.3 ml,加压 2 min 后注入白色微球 1.3 ml,然后取材。

2. 微粒体的提取及测定:心肌标本用二甲基甲酰胺提取微粒体中的染料,分别在各颜色相对应波长下用分光光度计检测,所得吸光度值用计算机软件(Triton5.xls Dye-Trak File Data Page,美国 Triton 公司)直接计算出微球粒数(个/g 心肌)。缺血区域 RMBF 是以同一动物非缺血区域心肌内的微球数量作为参照^[12]。测定公式如下:缺血区域 RMBF = 缺血区域心肌内微球数量/非缺血区域心肌内微球数量;其中缺血区域指 OM1 支配区域,非缺血区域指左前降支支配区域。

(二) Western-blot 法测定 VEGF 及 Flk-1 蛋白含量

VEGF 及 Flk-1 的 Western-blot 蛋白含量测定方法见文献^[11]。其中 VEGF 一抗采用 VEGF 鼠单克隆抗体(Sc7269,美国 Santa Cruz 公司,1:800);Flk-1 一抗采用鼠单克隆抗体(Sc6251,美国 Santa Cruz 公司,1:500);GAPDH 一抗为鼠单克隆抗体(mAbcam 9484,英国 Abcam 公司,1:2000),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(美国 KPL 公司,1:5000)。成像及灰度分析采用 Gel Doc 2000 凝胶电泳成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司)。

(三) Real time RT-PCR 法测定 VEGF 及 Flk-1 mRNA 含量

用 TRIZOL 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取心肌组织 RNA。采用 M-MLV 逆转录酶体系(美国 Invitrogen 公司),总体积为 20 μ l,合成 cDNA。Real time 定量 PCR 反应采用 Master SYBR Green 方案,由 Light Cycler 荧光定量 PCR 仪(Roche 公司,德国)完成。扩增引物如下:VEGF 引物序列为上游 5' CCTTGCT-GCTCTACCTCCAC 3',下游 5' CACTCCAGACCT-TCGTCGTT 3',扩增目的片断为 241 bp。Flk-1 引物序列为上游 5' GGCTCTGAGGAACGACTGGA 3',下游 5' ATACCTCGCACAAAGGGACA 3',扩增目的片断为

291 bp。内参照 GAPDH 引物上、下游序列为 5' AA-GAAGGTGGTGAAGCAGGC 3',5' TCCACCACCCTGTT-GCTGTA 3',扩增片断为 203 bp(上海康成生物技术有限公司合成)。

(四) ELISA 法测定血清肌钙蛋白含量

测定用一抗及二抗由江苏省人民医院心血管病研究所制备。步骤如下:10 μ g/ml 一抗包被板子,4℃ 下过夜,再加入 1% 脱脂奶粉缓冲液于 4℃ 下封闭过夜;每孔加入 100 μ l 上清,再加入酶标二抗 2 μ l(1:500),37℃ 下反应 20 min;加显色剂(TMB 与 H₂O₂ 按 1:1 混合)100 μ l,37℃ 下反应 10 min;加 50 μ l 硫酸终止反应。在酶联反应仪上,设置双波长 450 nm 和 630 nm,读取此波长下的吸光度。

(五) 透射电镜观察

组织块经固定、脱水、浸透后,用树脂包埋。Leica 超薄切片机切片,厚度 60 nm。切片用醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。在 JEM-1010 型透射电子显微镜下观察。

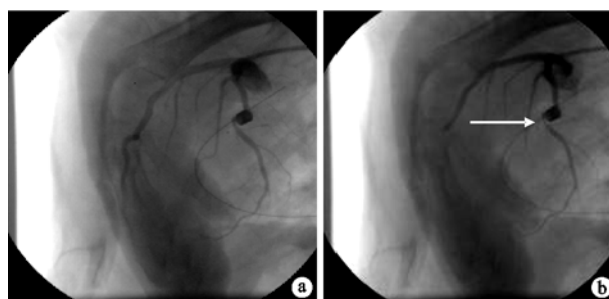
六、统计学分析

数据均以($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据均经 SPSS 10.0 版软件检验,呈正态性分布且方差齐性。各组间采用单因素方差分析,组间多重比较采用 Fisher post-hoc test;每组训练前、后 RMBF 的比较采用配对 *t* 检验;采用 Pearson 相关系数分析 RMBF 与 VEGF、Flk-1 表达的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、冠状动脉造影

猪术后休息 4 周,冠状动脉造影检测造模是否成功。结果如下:水囊加压前,OM1 近端为不完全性狭窄(66% $\pm$ 4%,图 2a);加压 2 min 时,OM1 近端为完全性狭窄(93% $\pm$ 3%,图 2b);减压后,OM1 近端恢复加压前状态(65% $\pm$ 3%)。



注:a. 球囊注水加压前,OM1 近端缩窄器所在位置狭窄程度为 60%;b. 球囊注水加压后,OM1 近端缩窄器所在位置狭窄程度为 90%

图 2 造模动物冠状动脉造影图

二、RMBF

8 周训练结束后,在 OM1 阻断 2 min 时所测得的 RMBF,运动组显著高于单纯缺血组及假手术组(均 $P < 0.01$),单纯缺血组显著高于假手术组($P < 0.01$)。在单纯缺血组及运动组,同样在 OM1 阻断 2 min 的条件下,训练后的 RMBF 显著高于训练前($P < 0.05$ 或 0.01)。在未加压的条件下,3 组实验结束时的 RMBF 均低于开始时的 RMBF(均 $P < 0.01$)。见表 1。

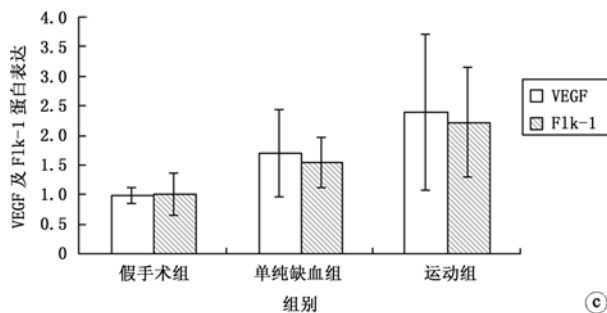
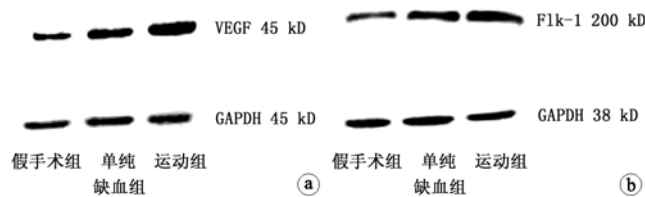
表 1 各组缺血区域 RMBF 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	手术日(训练前)		取材日(训练后)	
		缺血前	缺血时	缺血前	缺血时
假手术组	8	1.07 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.33 ± 0.04 ^d	0.18 ± 0.03
单纯缺血组	8	1.10 ± 0.91	0.20 ± 0.03	0.38 ± 0.06 ^d	0.26 ± 0.06 ^{ac}
运动组	8	1.05 ± 0.06	0.17 ± 0.04	0.38 ± 0.05 ^d	0.31 ± 0.03 ^{abd}

注:与假手术组相比,^a $P < 0.01$;与单纯缺血组相比,^b $P < 0.01$;组内与手术日相应时间段比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

三、缺血心肌局部 VEGF 及其受体 Flk-1 的蛋白表达

VEGF 蛋白表达量在单纯缺血组及运动组均高于假手术组($P < 0.05$ 或 0.01),运动组 VEGF 蛋白表达量高于单纯缺血组($P < 0.05$)。Flk-1 蛋白表达量结果与 VEGF 蛋白表达量结果相似。见图 3。



注:a. VEGF 及其内参 GAPDH 蛋白表达图;b. Flk-1 及其内参 GAPDH 蛋白表达图;c. VEGF 及其受体 Flk-1 蛋白表达差异图

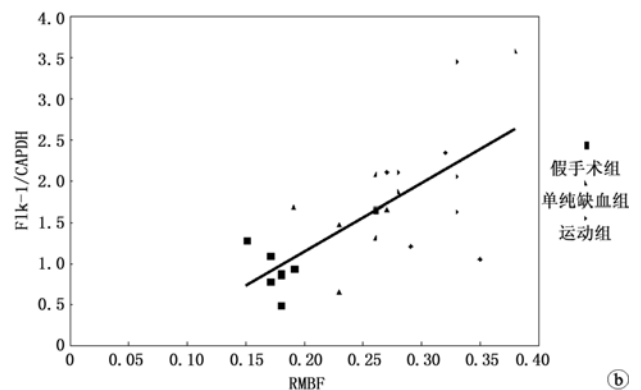
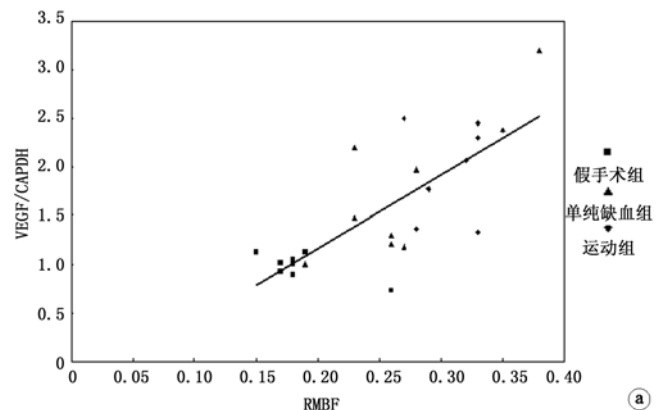
图 3 VEGF 及 Flk-1 蛋白表达图

四、缺血心肌 VEGF 及其受体 Flk-1 的 mRNA 表达

目的基因与 GAPDH 的 PCR 扩增效率一致,因此实时定量 RT-PCR 的数据处理可采用 $\Delta\Delta Ct$ 法,即 $\Delta Ct = Ct_{\text{标本}} - Ct_{\text{GAPDH}}$, $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{单纯缺血组或运动组}} - \Delta Ct_{\text{假手术组}}$, 平均相对含量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [13]。各组结果显示,运动组及单纯缺血组 VEGF mRNA 表达均显著高于假手术组($P < 0.01$ 或 0.05);单纯缺血组 VEGF mRNA 表达为假手术组的 2.43 倍,运动组为假手术组的 5.70 倍;运动组 VEGF mRNA 表达也显著高于单纯缺血组($P < 0.05$)。运动组及单纯缺血组 Flk-1 mRNA 的表达均高于假手术组($P < 0.01$);单纯缺血组为假手术组的 2.93 倍,运动组为假手术组的 7.89 倍;运动组 Flk-1 mRNA 的表达也高于单纯缺血组($P < 0.01$)。见表 2。

五、RMBF 与 VEGF、Flk-1 蛋白表达的相关性分析

RMBF 与 VEGF 蛋白表达的相关系数为 0.75, RMBF 与 Flk-1 蛋白表达的相关系数为 0.70,提示侧支生成与 VEGF 及 Flk-1 蛋白表达有较高的关联,见图 4。



注:a. RMBF 与 VEGF 蛋白表达的相关性分析;b. RMBF 与 Flk-1 蛋白表达的相关性分析

图 4 RMBF 与 VEGF 及 Flk-1 蛋白表达的相关性分析

表 2 各组缺血区域心肌 VEGF 及其受体 Flk-1 的 mRNA 表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	n	VEGF ΔCt	VEGF $\Delta\Delta Ct$	VEGF 相对 SO 的值 $2^{-\Delta\Delta Ct}$	Flk-1 ΔCt	Flk-1 $\Delta\Delta Ct$	Flk-1 相对 SO 的值 $2^{-\Delta\Delta Ct}$
假手术组	8	14.76 ± 0.71	0.00 ± 0.71	1.00 (0.61 ~ 1.64)	12.44 ± 0.70	0.00 ± 0.70	1.00 (0.60 ~ 1.62)
单纯缺血组	8	13.48 ± 1.29 ^a	-1.28 ± 1.29	2.43 (1.00 ~ 5.90)	10.89 ± 1.00 ^b	-1.55 ± 1.00	2.93 (1.46 ~ 5.86)
运动组	8	12.25 ± 1.24 ^{bc}	-2.51 ± 1.24	5.70 (2.40 ~ 13.45)	9.46 ± 0.95 ^{bd}	-2.98 ± 0.95	7.89 (4.08 ~ 15.24)

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与单纯缺血组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

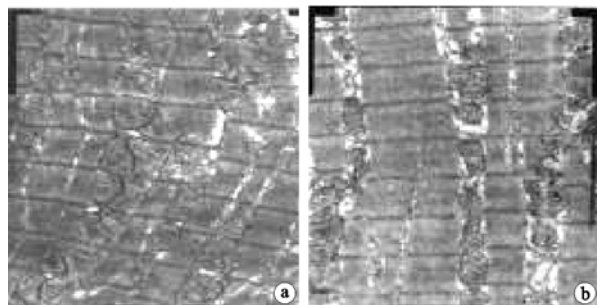
六、心肌损伤情况

1. 血清肌钙蛋白测定:单纯缺血组和运动组第 1 天训练及训练 8 周后,血清肌钙蛋白较训练前均无明显增加($P>0.05$),见表 3。

表 3 运动组及单纯缺血组血清肌钙蛋白检测结果比较(ng/ml , $\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	训练前	第 1 天训练后	训练 8 周后
单纯缺血组	8	0.14 ± 0.15	0.09 ± 0.02	0.15 ± 0.10
运动组	8	0.17 ± 0.13	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.03

2. 心肌细胞结构:透射电镜图像显示,在单纯缺血组及运动组,缺血区域心肌线粒体排列整齐,无明显肿胀,闰盘无明显扩张,肌纤维明暗带排列清晰,无明显紊乱,核无明显异常。提示在运动组及单纯缺血组,8 周的训练并未造成心肌纤维的损伤。见图 5。



注:a. 单纯缺血组缺血区域心肌图像;b. 运动组缺血区域心肌图像

图 5 运动组及单纯缺血组缺血区域心肌电镜图像(醋酸铀-柠檬酸铅双染, $\times 5\,000$)

讨 论

一、可控性缺血动物模型的建立

本研究在 OM1 近端植入缩窄器,试图通过水囊加压及减压,实现靶血管缺血的可控性。研究结果发现,在手术日,水囊加压后与加压前相比,心电图 ST 段明显上抬,减压后,心电图又恢复至加压前。冠状动脉造影发现,加压前 OM1 近侧有一定程度狭窄($66\% \pm 4\%$),加压后狭窄程度加重($93\% \pm 3\%$),减压后又恢复至加压前水平($65\% \pm 3\%$)。通过以上心电图及冠状动脉造影结果,可以确认可控性心肌缺血模型的建立。RMBF 检测结果发现,在水囊未加压状态下,取材日的 RMBF 值显著低于手术日。经解剖发现,主要是因为缩窄器与靶血管之间有一定程度的结缔组织增生。缓慢增生的结缔组织可以使缩窄器造成靶血管支配区域心肌的慢性缺血,这一特点与国际公认的 AMIROID 缩窄器一样。因此,本动物模型不但可通过水囊加压、减压实现可控性缺血,而且可模拟冠心病患

者冠状动脉慢性狭窄状态,使动物模型更贴近于临床。

二、缺血阈强度运动对侧支循环生成的作用

长期以来,冠心病临床及康复策略均致力于抑制或避免心肌缺血的发作,认为其可造成心肌细胞损伤。但是近年来的研究发现,短暂心肌缺血可促进心肌侧支循环生成^[14,15]。但过度缺血又可造成不可逆的心肌损伤。因此,研究适宜的可控性缺血负荷,以发挥缺血的积极作用具有重要临床价值。促进最大限度固有侧支循环开放和最佳状态侧支循环形成的最小缺血负荷,就是适宜心肌缺血负荷。我们既往的研究发现,单纯缺血促进最大限度侧支生成的最小缺血强度为 2 min 完全性缺血,日最低缺血频率为 2 次,周缺血频率为 3~5 次^[9-11]。但单纯缺血不具有临床可操作性。运动可通过耗氧的增加形成相对性心肌缺血,并可在停止运动或者降低运动负荷时,立即缓解心肌缺血,因此,合理的运动可实现心肌缺血的可控性,从而具有临床实用价值。本研究发现,运动组及单纯缺血组 RMBF 显著高于假手术组;而运动组与单纯缺血组相比,RMBF 也有显著增加。这一结果提示每天 2 次,每次 2 min 的短暂缺血阈强度运动可有效地促进缺血区侧支循环生成。

三、缺血阈强度运动促进侧支生成的分子生物学机制

1. VEGF 及其受体:侧支循环的生成受多种血管生长因子调控,VEGF 是目前研究最多并且特异性最强的一种促血管生长因子,在运动、缺血、低氧及血管损伤时能促进血管内皮细胞增殖、迁移及诱导血管生成^[16]。缺乏 VEGF,如 VEGF 基因敲除的老鼠可出现胚胎早期血管形成受损或冠状血管机能障碍及心肌缺血恢复能力的下降^[17]。

VEGF 受体目前主要有 2 种:Flt-1 (VEGFR-1) 和 Flk-1 (VEGFR-2)。Flk-1 是 VEGF 在内皮细胞上的主要传导者,它可导致内皮细胞的增殖、迁移、分化、血管形成,使血管渗透性增加,另外在保持血管的完整性上也有重要作用^[18]。Flt-1 可能与血管内皮细胞的集结有关^[19]。有研究报道,Flk-1 基因敲除的老鼠不会产生内皮细胞的分化,也不会产生有结构的血管,提示这一受体在血管生成过程中是必需的^[20]。相反,Flt-1 基因敲除的老鼠可有内皮细胞的成熟分化,但所形成的是非结构性的血管^[21]。因此,本研究主要测定缺血心肌 VEGF 及 Flk-1 的变化。

2. 外源性 VEGF 输入的副作用:目前,很多动物实验及临床研究都证实,可通过质粒等将 VEGF 导入机体,产生治疗性局部血管新生,但外源性 VEGF 导入由于缺乏靶向性可产生以下副作用:低血压、一过性小腿水肿、血管瘤形成、肿瘤血管新生、隐匿的恶性肿瘤生

长、增殖性或出血性视网膜病加重^[6]。

3. 内源性 VEGF 及其受体表达:如何诱导心肌缺血区局部内源性 VEGF 及其受体 Flk-1 表达增加,从而既促进缺血区冠状动脉侧支生成又避免外源性 VEGF 的副作用,成为临床需要迫切解决的问题。有研究发现,缺血可增加心肌内 VEGF 及 Flk-1 的表达,促进心肌侧支循环的生成^[7,8]。但直接心肌缺血在临床难以实现。运动可通过增加组织耗氧而造成狭窄冠状动脉供应区心肌相对性缺血,促进局部 VEGF 及其受体表达增加,从而产生新的侧支循环,实现生物搭桥目的。

本实验结果证实,运动组 VEGF 及受体 Flk-1 的蛋白及 mRNA 表达量均高于单纯缺血组及假手术组,运动组 RMBF 显著高于单纯缺血组及假手术组。RMBF 与 VEGF 及 Flk-1 的表达有很高的相关性。提示缺血阈强度运动可促进局部内源性 VEGF 及受体表达增加,从而促进缺血心肌局部冠状动脉侧支循环生成,实现生物搭桥。

四、安全性

缺血阈强度运动的安全性是其进入临床应用最受关注的问题。为了确定短暂缺血阈强度运动是否会损伤心肌细胞,我们在生化指标及组织学检查二方面进行了求证。在生化指标方面,众所周知,血清肌钙蛋白是确定心肌有无损伤的高敏性指标,它可在心肌损伤早期即在出现组织学可见的心肌坏死之前就升高^[22]。本实验结果显示,运动组第 1 天训练后及 8 周训练结束后,其血浆血清肌钙蛋白含量较训练前均无明显增加。在组织学方面,电镜检查未看到明显的心肌梗死变化。这些结果均提示短暂缺血阈强度运动是安全的。

五、研究局限点

本研究的局限点在于:①由于靶血管钝缘支是左回旋支第一分支,因此造成的心肌缺血区域相对偏小。在以后的实验中,将在较大的缺血区域进一步观察缺血阈强度运动的安全性。②由于实验条件及经费原因,本研究只对短暂缺血阈强度运动促进冠状动脉侧支循环生成的机制进行了初探。由于侧支循环生成过程中除 VEGF 及其受体外,还有其它多种因素参与,因此在今后的研究中将继续深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Toyota E, Matsunaga T, Chilian WM. Myocardial angiogenesis. *Mol Cell Biochem*, 2004, 264:35-44.
- [2] Hambrecht R, Walther C, Möbius-Winkler S, et al. Percutaneous coronary angioplasty compared with exercise training in patients with stable coronary artery disease: a randomized trial. *Circulation*, 2004, 109:1371-1378.
- [3] Niebauer J, Hambrecht R, Marburger C, et al. Impact of intensive physical exercise and low-fat diet on collateral vessel formation in stable angina pectoris and angiographically confirmed coronary artery disease. *Am J Cardiol*, 1996, 76:771-775.
- [4] Linke A, Erbs S, Hambrecht R. Effects of exercise training upon endothelial function in patients with cardiovascular disease. *Front Biosci*, 2008, 13:424-432.
- [5] Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 1997, 18:4-25.
- [6] Freedman SB, Isner JM. Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med*, 2002, 136:54-71.
- [7] Banai S, Shweiki D, Pinson A, et al. Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 1994, 28:1176-1179.
- [8] Adams V, Lenk K, Linke A, et al. Increase of circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary artery disease after exercise-induced ischemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24:684-690.
- [9] 王红星, 励建安, 路鹏. 缺血负荷对家兔冠状动脉固有侧支循环开放的影响. *中国康复医学杂志*, 2003, 18:274-278.
- [10] 王骏, 励建安, 金挺剑, 等. 心肌缺血日负荷对新西兰兔血管内皮生长因子表达的影响. *中国康复医学杂志*, 2005, 20:165-168.
- [11] 顾劲扬, 励建安, 王元会, 等. 心肌缺血周负荷对兔心肌血管内皮生长因子表达的影响. *中国康复医学杂志*, 2006, 21:99-103.
- [12] Cardinal TR, Hoying JB. A modified fluorescent microsphere-based approach for determining resting and hyperemic blood flows in individual murine skeletal muscles. *Vascul Pharmacol*, 2007, 47:48-56.
- [13] Bubner B, Baldwin IT. Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 2004, 23:263-271.
- [14] Matsunaga T, Warltier DC, Tessmer J, et al. Expression of VEGF and angiopoietins-1 and -2 during ischemia-induced coronary angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285:352-358.
- [15] Toyota E, Warltier DC, Brock T, et al. Vascular endothelial growth factor is required for coronary collateral growth in the rat. *Circulation*, 2005, 112:2108-2113.
- [16] Iwakura A, Komeda M, Fujita M. Coronary stenosis and mechanisms of collateral vessel growth. *Nippon Rinsho*, 1998, 56:2504-2508.
- [17] Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, et al. Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res*, 2000, 86:29-35.
- [18] Ziche M, Morbidelli R, Choudhuri R, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest*, 1997, 99:2625-2634.
- [19] Carmeliet P, Collen D. Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. *J Pathol*, 2000, 190:387-405.
- [20] Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 1995, 376:62-66.
- [21] Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M, et al. Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature*, 1995, 376:66-70.
- [22] Fishbein MC, Wang T, Matijasevic M, et al. Myocardial tissue troponins T and I. An immunohistochemical study in experimental models of myocardial ischemia. *Cardiovasc Pathol*, 2003, 12:65-71.

(收稿日期:2008-09-19)

(本文编辑:吴倩)