

· 基础研究 ·

血管内皮生长因子和一氧化氮对兔生理性缺血冠状动脉侧支血流量的影响

李玲 陆晓 励建安 肖明月 李咏雪

【摘要】目的 研究血管内皮生长因子(VEGF)和一氧化氮(NO)对兔生理性缺血训练(PIT)中侧支血流量的影响,为研究生理性缺血的侧支循环形成机制奠定基础。**方法** 健康成年新西兰白兔 55 只,体重(2.0 ± 0.5)kg。将水囊梗阻器安装在冠状动脉左室支,建立可控性心肌缺血模型,术中及术后实验兔死亡 6 只,另有 2 只因 ECG 无缺血改变未满足本实验的入选标准而剔除,余 47 只造模成功兔纳入实验。将 47 只兔按随机数字法分为假手术组(7 只)、单纯心肌缺血组(7 只)、单纯 PIT 组(11 只)、VEGF 抑制的 PIT 组(7 只)、NO 抑制的 PIT 组(9 只)和 VEGF-NO 双抑制的 PIT 组(6 只)。各组分别在造模时进行缺血刺激,并在刺激前后分别注射微球。处死前开胸时同样进行缺血刺激,且在刺激前后分别注射微球。实验终止时取左室前壁缺血心肌组织,采用微球技术检测缺血区相对侧支血流量。**结果** 训练前造模时,各组缺血区心肌的相对侧支血流量基础值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。训练 4 周后,各组缺血心肌的相对侧支血流量较组内训练前均有明显增加($P < 0.01$),且以单纯 PIT 组的侧支血流增加最多,由训练前的(39.23 ± 9.39)%增加到(85.31 ± 12.07)%;单纯心肌缺血组、单纯 PIT 组和 NO 抑制的 PIT 组心肌缺血区域心肌相对血流量分别与假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);VEGF 抑制的 PIT 组、NO 抑制的 PIT 组及 VEGF-NO 双抑制的 PIT 组的心肌相对血流量均明显低于单纯 PIT 组($P < 0.05$);VEGF-NO 双抑制的 PIT 组与 NO 抑制的 PIT 组的缺血心肌相对血流量组间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),但与 VEGF 抑制的 PIT 组的组间差异无统计学意义($P > 0.05$),且 NO 抑制的 PIT 组与 VEGF 抑制的 PIT 组的组间差异亦无统计学意义($P > 0.05$)。单纯心肌缺血组和单纯 PIT 组分别与 VEGF-NO 双抑制的 PIT 组比较,组间差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** PIT 可以通过 VEGF 和 NO 增加远隔缺血心肌的侧支血流量,抑制 VEGF 和 NO 减弱缺血训练对侧支循环的促进作用;VEGF 与 NO 均参与侧支循环的形成,且 VEGF 起主要作用。

【关键词】 生理性缺血训练; 血管内皮生长因子; 一氧化氮; 侧支血流量

Effects of vascular endothelial growth factor and nitric oxide on coronary collateral blood flow during ischemic physical training Li Ling, LU Xiao, LI Jian-an, XIAO Ming-yue, LI Yong-xue. Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China
Corresponding author: LI Jian-an, Email: lijianan@carm.org.cn

【Abstract】Objective To explore the effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) on coronary collateral blood flow (CCBF) in a rabbit model of physical ischemic training (PIT), and to provide a foundation for the study of the mechanism of collateral circulation formation in PIT. **Methods** Models of intermittent myocardial ischemia were established in 55 rabbits by installing a water balloon constrictor on the left ventricular coronary artery. The rabbits were then divided into a sham-operation group, a pure ischemia group, a PIT group, a PIT group with NO inhibition pretreatment, a PIT group with VEGF inhibition treatment, and a PIT group with both NO and VEGF inhibition pretreatment. Microspheres were injected at modeling and before sacrifice before and after ischemic stimulation. At the termination of the experiment the ischemic myocardial tissue of the left ventricular anterior wall was sampled, and then relative CCBF was measured using the microspheres. **Results** There was no significant difference among the 6 groups before training. After training prominent differences among the groups were observed, with the PIT group having the greatest increase in CCBF. CCBF in the pure ischemia group, the PIT group, and the PIT group with NO inhibition pretreatment were significantly higher than in the sham-operation group. Significant differences were also found between the PIT group and the three pretreatment groups. CCBF in the PIT group with NO pretreatment and VEGF inhibition was significantly different from that in the NO pretreatment group, while it was not found in the group

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.04.001

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81070181)

作者单位:210029 南京,南京医科大学第一附属医院康复医学科

通信作者:励建安,Email:lijianan@carm.org.cn

with VEGF inhibition pretreatment. The CCBF in the group with VEGF inhibition pretreatment and the group with NO inhibition pretreatment was similar. **Conclusions** PIT can improve CCBF to the remote ischemic myocardium when combined with VEGF and NO pretreatment. Blocking VEGF or NO can reduce CCBF after training, and both VEGF and NO are involved in the formation of collateral circulation, with VEGF playing the major role.

【Key words】 Physical ischemic training; Vascular endothelial growth factor; Nitric oxide; Coronary collateral blood flow

冠心病是最常见的心血管疾病之一,侧支循环形成是心肌缺血的重要代偿机制^[1]。本课题组前一项国家自然科学基金课题“等长收缩和缺血训练对血管储备的作用及机理(30570893)”创新性地提出了生理性缺血训练(physical ischemic training, PIT),即在正常肢体采用袖带加压或等长收缩方式造成可逆性组织缺血,进而促进远隔病理性缺血部位侧支循环的形成,结果显示家兔等长收缩运动造成正常骨骼肌短暂生理性缺血可以使远隔缺血心肌的侧支循环生成增加^[2],但其具体的远隔作用机制尚不清楚。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和一氧化氮(nitric oxide, NO)均为促侧支血管生成的重要因子。血浆中 VEGF 浓度与冠心病患者冠脉侧支的大小相关,VEGF 含量高者,侧支的直径也较大^[3]。有临床研究显示,使用一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)会减弱 VEGF 刺激冠脉侧支血管形成的作用^[4],NO 与 VEGF 均在局部侧支形成中起作用,但目前有关 PIT 促进远隔缺血心肌侧支生成中 NO 及 VEGF 的重要性及其因果关系的研究尚未见报道。本研究通过观察 PIT 中 VEGF 和 NO 的表达对远隔缺血心肌的侧支血流量的影响,旨在探讨 VEGF 和 NO 在 PIT 中的重要作用,为 PIT 的临床应用提供实验依据。

材料与方法

一、实验动物和微球

健康成年普通级新西兰兔 55 只,雌雄不拘,体重(2.0 ± 0.5) kg。由江苏省农业科学院畜牧兽医研究所提供,许可证号 SCXK(苏)2002-0025。实验前常规饲养 24 h。

微球(microsphere)为直径 15 μm 的塑料微球(由美国 Triton 技术公司提供),可用多种染料标记。制剂为生理盐水混悬液,每毫升含微球 3×10^6 粒。经左心耳注射进入体循环后可随血流到达全身毛细血管网,因其直径稍大于红细胞且不具有红细胞的变形特性,所以第 1 次循环即可全部滞留在全身的体循环毛细血管网,检测局部组织相对微球数量可代表注射即刻局部组织的相对血流量。微球理化性质稳定,不会引起弥散性微循环栓塞,也不会被溶解吸收,在不同时期注

射不同颜色标记的微球,可分析血流量的动态变化。

二、心肌缺血动物模型的制备

经兔耳缘静脉缓慢推注 3% 的戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉动物后,取仰卧位,手术部位剃毛,消毒铺巾固定,左侧第 5 肋间开胸,剪开心包,暴露心脏。沿左心耳找到左室支(left ventricular branch, LVB),在左心耳下缘 5 ~ 10 mm 处用单股聚丙烯带针缝合线(5.0 号)钩绕 LVB,将水囊梗阻器捆绑固定。捆绑松紧度以注水时心电图(electrocardiogram, ECG)缺血改变,抽水后心肌实现再灌注为准。将水囊导管固定于胸壁上。于水囊注水前和水囊注水 2 min 即刻向左心耳内分别注射黄色和伊红色微球。以生理盐水冲洗胸腔,逐层关胸,抽出胸腔内气体,使肺复张。将水囊导管从皮下引至项背部两肩胛骨间,穿出皮下并固定。待兔复苏后送回笼,术后予以青霉素 40 万 U,持续 3 d,术后休息 1 周^[5]。

三、实验动物分组及训练方法

术中及术后实验兔死亡 6 只,另有 2 只水囊注水时 ECG 无缺血改变未满足本实验的入选标准而剔除。余 47 只兔纳入实验,按随机数字表法分为假手术组(7 只)、单纯心肌缺血组(7 只)、单纯 PIT 组(11 只)、VEGF 抑制的 PIT 组(7 只)、NO 抑制的 PIT 组(9 只)和 VEGF-NO 双抑制的 PIT 组(6 只)。各组干预措施:①假手术组,不做任何处理;②单纯心肌缺血组,术后休息 1 周后进行心肌缺血刺激;③单纯 PIT 组,术后休息 1 周后进行心肌缺血刺激和双下肢 PIT;④ VEGF 抑制的 PIT 组,术后休息 1 周,训练前 24 h 静脉注射 VEGF 受体阻断剂贝伐珠单抗注射液 10 mg/kg,训练 2 周后再次注射,进行心肌缺血刺激和双下肢 PIT;⑤ NO 抑制的 PIT 组,手术后即于兔饮用水给予 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的 L-NAME,术后休息 1 周进行心肌缺血刺激和双下肢 PIT;⑥ VEGF-NO 双抑制的 PIT 组,手术后即于兔饮用水给予 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的 L-NAME,训练前 24 h 静脉注射贝伐珠单抗注射液 10 mg/kg,训练 2 周后再次注射,进行心肌缺血刺激和双下肢 PIT。心肌缺血模型实验流程详见图 1 所示。

心肌缺血刺激:俯卧位固定,ECG 监测,水囊注水,ECG 呈缺血改变开始计时,维持 2 min,休息 10 min,2 次/日,5 日/周。双下肢 PIT:俯卧位固定,双下肢袖带加压,加压 3 min,休息 5 min,3 次/日,5 日/周。

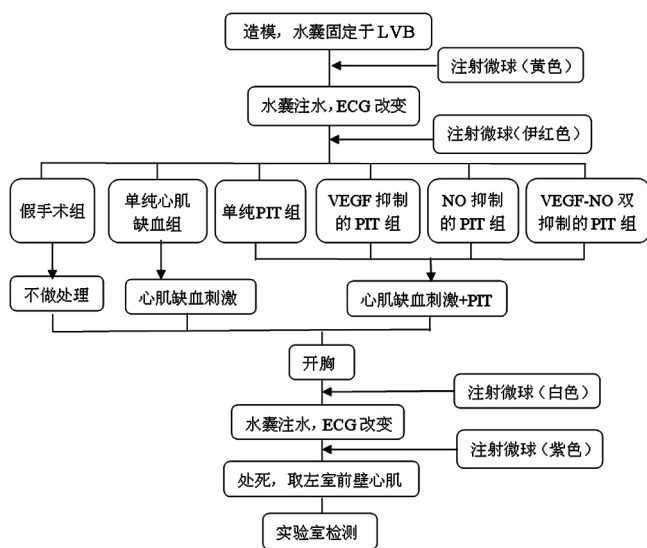


图 1 心肌缺血模型实验流程示意图

四、标本的采集及相对侧支血流量的测定

训练 4 周后,动物于安静状态下麻醉,第 2 次开胸,于水囊注水阻断血管前、阻断 2 min 即刻分别注射白色和紫色微球。ECG 恢复正常后处死,立即取出心脏,分离粘连组织,肉眼大体观察 LVB 支配区有无心肌坏死灶。各组 LVB 阻断部位 2 mm 以下的支配区为缺血区,作为微球分析用标本。

标本自然腐败后,于 15 ml 离心管中剪碎,强碱氢氧化钾 (1 mol/L) 分解后提取微球,用二甲基甲酰胺萃取微球上的染料。然后分别在各颜色所对应的波长下用分光光度计 (Ultrospec 2000 型,美国 Pharmacia Biotech 公司) 检测,吸光度值经标准方程转化为微球数 (每克心肌个数),代表微球注射时局部心肌的血流量。为排除兔血流量的个体差异,本研究采用心肌相对侧支血流量表示心肌缺血区域血流量的变化,计算公式如下:缺血区域心肌相对侧支血流量 (%) = 缺血刺激后缺血心肌内微球数量 (个/g) / 缺血刺激前缺血心肌内微球数量 (个/g) × 100%。

五、统计学方法

所得数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有数据均经 SPSS 13.0 版软件检验呈正态性分布且方差齐性。多组间采用单因素方差分析,组间采用 LSD 两两比较。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

结 果

本研究实验动物成功造模 47 只。标本无肉眼可见的心肌坏死病灶,LVB 支配区心肌肉眼观与非支配区心肌无明显差别。

训练前造模时,各组缺血区心肌的相对侧支血流量基础值组间比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

训练 4 周后,各组缺血心肌的相对侧支血流量较组内训练前均有明显增加 ($P < 0.01$),且以单纯 PIT 组的侧支血流量增加最多。训练 4 周后,单纯心肌缺血组、单纯 PIT 组和 NO 抑制的 PIT 组的心脏缺血区域心肌相对血流量分别与假手术组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); VEGF 抑制的 PIT 组、NO 抑制的 PIT 组及 VEGF-NO 双抑制的 PIT 组的心肌相对血流量均明显低于单纯 PIT 组 ($P < 0.05$); VEGF-NO 双抑制的 PIT 组与 NO 抑制的 PIT 组的缺血区域心肌相对血流量组间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),但与 VEGF 抑制的 PIT 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),且 NO 抑制的 PIT 组与 VEGF 抑制的 PIT 组的组间差异亦无统计学意义 ($P > 0.05$)。单纯心肌缺血组和单纯 PIT 组分别与 VEGF-NO 双抑制的 PIT 组比较,组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 各组实验兔训练前后缺血区域心肌相对血流量比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	基础值 (训练前)	训练 4 周后
假手术组	7	36.96 ± 5.77	48.05 ± 4.51
单纯心肌缺血组	7	46.40 ± 17.64	69.43 ± 6.46 ^a
单纯 PIT 组	11	39.23 ± 9.39	85.31 ± 12.07 ^{ab}
VEGF 抑制的 PIT 组	7	37.77 ± 18.76	57.51 ± 15.01 ^c
NO 抑制的 PIT 组	9	41.91 ± 16.64	66.31 ± 21.07 ^{acd}
VEGF-NO 双抑制的 PIT 组	6	39.26 ± 6.83	45.77 ± 7.95 ^{bc}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与单纯心肌缺血组比较,^b $P < 0.05$;与单纯 PIT 组比较,^c $P < 0.05$;与 VEGF-NO 双抑制的 PIT 组比较,^d $P < 0.05$ 。

讨 论

本研究通过阻断 VEGF 和 NO 的表达测定兔生理性缺血训练模型中远隔病理性缺血心肌的侧支血流量,结果显示单纯 PIT 组侧支血流量最高,其余各组均低于单纯 PIT 组;通过 VEGF 及 NO 阻断后,均减少了 PIT 组产生的血流增加效应,从而证实了 VEGF 和 NO 在 PIT 促进远隔缺血部位侧支循环中的作用。

一、观察指标的选择

用微球定量检测局部血流量在国内外已是成熟的方法^[6],通过注射不同颜色的微球,可观察同一个体不同时间点局部血流的动态变化。本实验沿袭前期研究^[7],采用微球定量检测方法作为主要研究手段。微球测定侧支血流量有 2 种方法,即测定相对侧支血流量和绝对侧支血流量。本研究采用的心肌相对侧支血流量指标测定的是心肌缺血刺激后及心肌缺血刺激前心脏缺血区域的心肌微球数目。Hübner 等^[9]报道,注入足够多及大小合适的微球时,局部心肌血流量与微球数目成正比,且操作更简便。

二、PIT 与侧支生成的关系

本研究发现,单纯心肌缺血组的心肌相对侧支血流量高于假手术组,显示间歇性心肌缺血刺激可以使局部缺血心肌的侧支形成,这与以往多项研究结果相符^[2,7]。兔双侧下肢经 4 周的 PIT 可以明显增加缺血心肌毛细血管的血流量,且与其它各组相比,单纯 PIT 组缺血心肌侧支血流量的增加最显著,而病理性缺血区域的毛细血管血供与侧支血流量的增加是一致的。单纯 PIT 组毛细血管血供高于单纯心肌缺血组,提示缺血心肌不仅可以受局部缺血刺激产生侧支循环,还可以通过 PIT 产生的某些促血管生成因子的作用使远隔部位的缺血心肌形成侧支,增加缺血心肌的血供。本实验前期研究^[10]也证实,局部运动不仅使运动局部的血管生成因子增加,在远隔部位的非运动区肌肉或组织及血清中也可以检测到促血管生成因子的增加。

三、VEGF 和 NO 在 PIT 中的作用

1. VEGF 在 PIT 中促进远隔缺血心肌侧支生成的作用:研究表明心肌缺血后血清和骨骼肌中 VEGF 含量上调,冠脉缺血刺激训练后远隔部位骨骼肌 VEGF 表达增加^[10]。Olfert 等^[11]发现,阻断 VEGF 表达后骨骼肌运动训练不能形成侧支循环,VEGF 在调节毛细血管容量中是必不可少的,小鼠心肌和骨骼肌缺乏 VEGF 时不能耐受有氧运动。本研究观察 VEGF 抑制前后心肌血流量的变化,发现 VEGF 抑制后的 PIT 组的心肌血流量低于单纯 PIT 组,说明 PIT 可通过某种机制使远隔部位缺血心肌的 VEGF 含量增加,从而促进该处侧支形成;使用 VEGF 抑制剂后,VEGF 促进侧支生成的作用被抑制,侧支血流量减少。

2. NO 在 PIT 中促进远隔缺血心肌侧支生成的作用:NO 是促进侧支形成的另一种重要因子。有研究表明,使用 NO 供体二亚乙基三胺一氧化氮亲核复合体(diethylenetriamine NONOate, DETA NONOate)可明显促进侧支血管生成^[12]。临床研究显示,NOS 的抑制剂非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)与冠脉侧支形成不良有关,侧支循环形成良好的患者血浆 ADMA 含量低,而侧支循环形成差的患者血浆 ADMA 含量高,NO 含量与侧支形成正相关^[13]。本研究发现,NO 抑制的 PIT 组心肌的相对侧支血流量低于单纯 PIT 组,且单纯心肌缺血组也低于单纯 PIT 组,说明远隔部位缺血训练可以使心肌缺血区 NO 增加,从而增加心肌血流量,NO 阻断后心肌侧支血流量的增加减少。

3. VEGF-NO 双抑制与侧支生成的关系:Matsunaga 等^[4]研究报道,VEGF 和 NO 在促进侧支生成中相互促进,内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)缺乏或使用 NO 抑制剂可以降低 VEGF 的表达,从而影响 VEGF 介导的侧支生成。而

使用 NO 促进剂或 eNOS 基因转导可以促进 VEGF 的生成^[14]。VEGF 也可以增强 eNOS 的表达,且 eNOS 进一步促进 VEGF 引起的血管生成作用^[15]。本研究显示,VEGF-NO 双抑制组血流量明显少于单纯 PIT 组和 NO 抑制的 PIT 组,且与 VEGF 抑制的 PIT 组差异无明显统计学意义,说明远隔部位 PIT 产生的 VEGF 和 NO 可明显促进侧支血流量的增加,VEGF 和 NO 均为促进侧支循环生成的重要因子,且 VEGF 起主要作用。

四、研究的局限性

本研究局限性:①实验动物例数偏少;②本实验仅研究了 VEGF 和 NO 对侧支生成的影响,尚有多种因子参与侧支形成,还需在今后的研究中继续探讨。

参 考 文 献

- [1] Berry C, Balachandran KP, L'Allier PL, et al. Importance of collateral circulation in coronary heart disease. *Eur Heart J*, 2007, 28: 278-291.
- [2] 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. *Clin Sci*, 2009, 117: 201-208.
- [3] Ripa RS, Jørgensen E, Baldazzi F, et al. The influence of genotype on vascular endothelial growth factor and regulation of myocardial collateral blood flow in patients with acute and chronic coronary heart disease. *Scand J Clin Lab Invest*, 2009, 69: 722-728.
- [4] Matsunaga T, Wartier DC, Weihrauch DW, et al. Ischemia-induced coronary collateral growth is dependent on vascular endothelial growth factor and nitric oxide. *Circulation*, 2000, 102: 3098-103.
- [5] 王骏, 金挺剑, 励建安. 兔可控性心肌缺血模型的建立. *中国康复医学杂志*, 2005, 20: 327-328.
- [6] Degens H, Craven AJ, Jarvis JC, et al. The use of coloured dye-extraction microspheres to measure blood flow in rabbit skeletal muscle: a validation study with special emphasis on repeated measurements. *Exp Physiol*, 1996, 81: 239-249.
- [7] 陆晓, 励建安, 吴涛, 等. 短暂缺血强度运动促进心肌侧支循环生成的机制. *中华物理医学与康复杂志*, 2009, 31: 587-592.
- [8] Hübner M, Souders JE, Shade ED, et al. Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of relative blood flow in severely injured lungs. *J Appl Physiol*, 1999, 87: 2381-2385.
- [9] 刘元标, 励建安, 路鹏, 等. 家兔短暂心肌缺血后 VEGF 蛋白表达的空间规律. *中国康复医学杂志*, 2004, 19: 422-425.
- [10] Olfert IM, Howlett RA, Wagner PD, et al. Myocyte vascular endothelial growth factor is required for exercise-induced skeletal muscle angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2010, 299: R1059-R1067.
- [11] Troidl K, Tribulova S, Cai WJ, et al. Effects of endogenous nitric oxide and of DETA NONOate in arteriogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2010, 55: 153-160.
- [12] Kocaman SA, Sahinarslan A, Biberoglu G, et al. Asymmetric dimethylarginine and coronary collateral vessel development. *Coron Artery Dis*, 2008, 19: 469-474.
- [13] Jozkowicz A, Cooke JP, Guevara I, et al. Genetic augmentation of nitric oxide synthase increases the vascular generation of VEGF. *Cardiovasc Res*, 2001, 51: 773-783.
- [14] Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Biochim Pol*, 2003, 50: 49-59.

(修回日期: 2013-02-20)

(本文编辑: 汪 玲)