

· 基础研究 ·

等长收缩负荷对家兔股动脉固有侧支循环开放的影响

韩良 励建安 余滨宾

【摘要】目的 观察不同等长收缩负荷对股动脉固有侧支循环开放的影响,为研究生理性缺血训练对侧支循环生成的影响奠定基础。**方法** 选择健康成年家兔 24 只,体重 (2.0 ± 0.5) kg,于左下肢坐骨神经植入电极,电刺激产生等长收缩造成缺血,预先设定不同收缩强度和持续时间。实验终止时取坐骨神经支配区——腓肠肌组织,微球技术定量检测股动脉固有侧支血流(FCBF)。**结果** ①采用 40% 最大等长收缩强度(IE_{max})时缺血区局部血流降低程度最大($P < 0.01$);采用 60% IE_{max} 和 80% IE_{max} 的局部血流下降率相比,差异无统计学意义。②采用 40% IE_{max} 刺激 0~4 min,FCBF 呈增加趋势,第 4 分钟时达峰值,较刺激即刻、刺激后第 2,3 分钟明显增加($P < 0.01$),至第 5 分钟不再进一步增加。③以 40% IE_{max} 刺激 4 min 后再灌注 0~2 min,FCBF 呈增加趋势,再灌注第 2 分钟 FCBF 较再灌注即刻明显增加($P < 0.01$),第 5 分钟 FCBF 回落至基础水平,至第 8,10 分钟无显著变化。**结论** 促使家兔股动脉 FCBF 最大开放的最小强度为 40% IE_{max} ,最短刺激时间为 4 min,FCBF 开放持续时间不超过 5 min。

【关键词】 股动脉; 局部血流量; 生理性缺血训练

The effect of isometric contraction in opening femoral artery collateral circulation in rabbits HAN Liang, LI Jian-an, YU Bin-bin. Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China

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

【Abstract】 Objective To explore the effect of isometric contraction-induced ischemic burden for evoking maximal intrinsic femoral artery collateral circulation. **Methods** Twenty-four adult New Zealand rabbits weighing (2.0 ± 0.5) kg were subjected to a model of isometric contraction-induced ischemia. An electrode was implanted in the sciatic nerve of the left hind limb for evoking isometric contraction of the gastrocnemius, which blocked local blood flow and induced local ischemia. Femoral artery collateral blood flow (FCBF) was measured using a microsphere technique. **Results** Local blood flow was the lowest at 40% of the maximal isometric contraction (IE_{max}), and reached plateau at 60% of IE_{max} . FCBF increased gradually and reached a plateau at 40% of IE_{max} in the 4th min. After 4 minutes at 40% of IE_{max} , FCBF had increased to higher than pre-stimulus, peaking in the 2nd minute, and then decreasing gradually to baseline at the 5th minute after reperfusion. It ceased to increase when reperfusion was prolonged to 8 or 10 min. **Conclusions** The minimal ischemic burden for full obstruction of the femoral artery is 40% of IE_{max} , and the shortest stimulus duration is 4 min. The maximal FCBF opening duration is no more than 5 min.

【Key words】 Femoral artery; Local blood flow; Ischemic training

冠心病、心肌梗死等缺血性疾病是现代医学面临的巨大挑战。大量研究证明,心肌缺血可以促进冠状动脉侧支循环生成,是重要的心肌保护因素^[1-4]。本课题组的前期研究发现,心肌缺血刺激不仅使心肌血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达增高,同时也使邻近和远隔组织的 VEGF 表达增加^[5-6],提示缺血刺激不仅导致局部组织的侧

支循环生成,也可能通过 VEGF 的远隔表达,造成远隔部位侧支循环的形成。为此我们提出“生理性缺血训练”的概念,即反复对正常肢体血管直接阻断或进行等长收缩造成的暂时可逆性组织缺血,可使 VEGF 释放或者上调,促进远隔的病理性缺血部位形成侧支循环^[7]。本课题组已经证明,一定强度的正常骨骼肌缺血刺激可以引起远隔的病理性缺血心肌和骨骼肌侧支循环生成增加^[8-10],但尚未系统研究不同等长收缩强度及时间对固有侧支开放的影响。

侧支循环是通过固有侧支血管开放来增加侧支血流的速度和剪切力,从而促进侧支循环生成^[11-12]。固有侧支开放是侧支循环生成的前提。本实验旨在系统

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2010.01.005

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30570893)

作者单位:210009 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@public1.ptt.js.cn

地观察电刺激等长收缩所致缺血的强度和时间对骨骼肌固有侧支开放程度和持续时间的影响,确定促进其固有侧支最大限度开放的最低负荷,为生理性缺血训练的深入研究提供依据。

材料和方法

一、实验动物

健康成年普通级新西兰兔 24 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。

二、微球

微球(microsphere)由美国 Triton Technology 公司提供,为直径 15 μm 的塑料微球,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。经左心房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,从而代表当时的局部组织血流量。因微球理化性质稳定,故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,可得到某一局部组织不同时间点的多次相对血流量指标^[13]。

三、动物模型制备

1. 安置电刺激器:经兔耳缘静脉缓慢推注 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)麻醉动物后,取俯卧位,手术部位剃毛,消毒铺巾;坐骨结节下 1 cm 横行切口,钝性分离肌肉,暴露坐骨神经;用神经拉钩轻轻挑起神经束,持针器夹持电极丝以 60° 斜角持续轻柔刺破神经外膜,再与神经长轴平行植入电极,用 7-0 外科缝线于电极起始部、中央及末端缝合,并固定至神经外膜;用江苏产 SY-708A 型外周神经电刺激器(刺激频率 40 Hz,波宽 1 ms)检查电极安置是否有效,出现相应部位的肌肉收缩后视为电极安置成功,逐层缝合手术切口^[10]。

2. 运动方式:兔仰卧位,用弹簧称勾住缚于足部中央的牵引带,与胫骨平行向上拉;用电刺激器(刺激频率 40 Hz,刺激时间 1 ms)刺激左侧坐骨神经,电刺激强度由小到大,兔腓肠肌收缩的拉力也随之增大,直到足部收缩不能拉动弹簧秤,即认为达到最大等长收缩,此时骨骼肌的收缩强度为最大等长收缩强度(maximal isometric exercise, IEmax)。

四、退出实验的标准

有下列情况的家兔退出实验:①电极植入失败;②在完成实验前呼吸、心跳停止超过 30 s。

五、实验分组及处理方案

实验中以预先设定的不同缺血强度和缺血时间对

兔实验侧下肢制作电刺激致等长收缩模型,按照研究内容的不同分为 A 组 12 只、B 组 6 只、C 组 6 只。由于微球应用的特殊性,要求各强度刺激并列进行,而不能在同一动物肢体上先后进行,为了保证足够的样本量,所以 A 组用 12 只兔(24 只下肢,每一个刺激强度 6 只下肢);B、C 组可根据时间顺序依次注射微球,故各选用 6 只兔。

1. 等长收缩强度对局部血流量的影响:A 组兔用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)耳缘静脉麻醉(麻醉时效约 2 h),双下肢安装电极,测定每只下肢的 IEmax 后,分别采用 20%、40%、60% 和 80% 的 IEmax 进行刺激,每种强度刺激维持 3 min;于电刺激前和刺激末 30 s 分别注射黄色(yellow)和柿红色(persimmon)微球各 0.15 ml;在兔麻醉状态下耳缘静脉注射空气栓塞处死,取双下肢腓肠肌组织进行微球测定。

为排除兔血流量的个体差异,我们采用局部血流下降率表示一定等长收缩强度对局部血流量的影响,以造成最大缺血区血流下降率的最小等长收缩强度作为适宜等长收缩强度。局部血流下降率(%) = (电刺激前微球数 - 电刺激末微球数) / 电刺激前微球数 $\times$ 100%。实验中有 2 只兔因非实验原因死亡,予以剔除。

2. 等长收缩时间对局部血流量(即固有侧支血流量)的影响:B 组兔以 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)耳缘静脉麻醉,左侧下肢安装电极后测定其 IEmax;根据 A 组的实验结果,在麻醉状态下采用最适等长收缩强度刺激,分别在刺激前、刺激即刻以及刺激过程中第 2, 3, 4 和 5 分钟依次注射黄色、柿红色、橙色(orange)、柠檬色(lemon)、橘红色(tangerine)和浆果色(berry)微球各 0.15 ml;在兔麻醉状态下耳缘静脉空气栓塞处死,取双下肢腓肠肌组织进行微球测定。右下肢不进行电刺激,作为空白对照。以能促使等长收缩后固有侧支开放最大的最短时间为适宜等长收缩时间。其中 1 只兔在实验中死亡,予以剔除。

3. 等长收缩后再灌注对局部血流量的影响:C 组兔以 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)耳缘静脉麻醉,左侧下肢安装电极后测定其 IEmax;根据 A、B 组的实验结果,在麻醉状态下采用最适等长收缩强度刺激,保持适宜等长收缩时间,分别在电刺激前、刺激即刻以及刺激结束后第 2, 5, 8 和 10 分钟依次注射黄色、柿红色、橙色、柠檬色、橘红色和浆果色微球各 0.15 ml;在兔麻醉状态下耳缘静脉注射空气栓塞处死,取双下肢腓肠肌组织进行微球测定,计算固有侧支循环相对血流量:固有侧支循环相对血流量 = 缺血区再灌注微球数 - 刺激前微球数。其中 1 只兔在实验中死亡,予以剔除。

六、局部相对血流量测定

取坐骨神经支配区腓肠肌组织约 2.0 g,用强碱(1 mol/L 的 KOH)分解后提取微球,用酸化乙酸乙氧乙酯萃取微球上的染料,分别在各颜色对应的波长下用分光光度计(Ultro-spec 2000 型 Pharmacia Biotech 公司,美国)测定,所得吸光度值根据标准方程可转化为微球数(个/g 骨骼肌),即表示微球注射时的局部骨骼肌血流量^[14]。

七、统计学方法

所有数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,经 SAS 9.1.2 版软件分析,呈正态分布且方差齐性。A 组采用单因素方差分析及 Scheffe 法多重比较检验,B、C 组进行重复测量数据的方差分析检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、等长收缩强度对缺血区局部血流量的影响

A 组电刺激前各等长收缩强度组缺血区局部血流量比较, $F = 30.68, P < 0.01$ 。20% 与 60% IEmax 缺血区局部血流量及 40% 与 80% IEmax 缺血区局部血流量比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。余两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

不同等长收缩强度刺激后局部血流下降率比较: $F = 35.02, P < 0.01$ 。随着刺激强度逐渐增大,局部血流下降率也随之增大,采用 40% IEmax 的局部血流下降率最大;采用 20% IEmax 的局部血流下降率与其他强度比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);40% IEmax 与 80% IEmax 的局部血流下降率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);40% IEmax 与 60% IEmax 的局部血流下降率比较,60% IEmax 与 80% IEmax 的局部血流下降率比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

二、等长收缩时间对缺血区局部血流量(此时即为固有侧支血流量)的影响

B 组缺血区各时间点股动脉固有侧支血流(femoral artery collateral blood flow, FCBF)比较: $F =$

2557.61, $P < 0.01$ 。以 40% IEmax 进行刺激,FCBF 在刺激 0~4 min 呈递增趋势,第 4 分钟达峰值;第 4 分钟与刺激即刻、第 2 分钟和第 3 分钟 FCBF 比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);第 4 分钟与第 5 分钟 FCBF 比较,差异无统计学意义,刺激延长至 5 min 血流不再继续增加。见表 2。

正常区各时间点固有侧支血流量比较: $F = 11.32, P < 0.01$ 。刺激前与刺激第 5 分钟 FCBF 比较,差异无统计学意义;刺激即刻以及第 2、3 和 4 分钟 FCBF 两两比较,差异均无统计学意义;刺激前和第 5 分钟分别与刺激即刻以及第 2、3 和 4 分钟两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

三、等长收缩后再灌注局部血流量的变化

C 组缺血区各时间点血流比较: $F = 1112.04, P < 0.01$ 。以 40% IEmax 刺激 4 min 后再灌注。再灌注 0~2 min 局部血流呈递增趋势,第 2 分钟与刺激前及刺激即刻局部血流比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);第 2 分钟与第 5、8 和 10 分钟比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$);再灌注 5~10 min 回落到基础水平,刺激前与再灌注 5、8 和 10 min 比较,差异均无统计学意义。

正常区各时间点血流比较: $F = 22.00, P < 0.01$ 。局部血流在刺激前与再灌注第 10 分钟比较,差异无统计学意义;再灌注即刻与第 2、5 和 8 分钟比较,差异均无统计学意义;刺激前和再灌注第 10 分钟分别与再灌注即刻以及第 2、5 和 8 分钟比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 等长收缩强度对缺血区局部血流量的影响(微球数,个/g 骨骼肌, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

等长收缩强度	电刺激前 (个/g 骨骼肌)	电刺激 3 min (个/g 骨骼肌)	下降率(%)
20% IEmax	407 ± 43	255 ± 16	36.6 ± 9.3
40% IEmax	451 ± 45 ^a	194 ± 33 ^a	57.3 ± 4.2 ^a
60% IEmax	398 ± 70 ^a	182 ± 42 ^a	54.6 ± 4.2 ^a
80% IEmax	459 ± 69 ^{ab}	232 ± 36 ^{ab}	49.0 ± 8.0 ^{ab}

注:与 20% IEmax 比较,^a $P < 0.01$;与 40% IEmax 比较,^b $P < 0.05$

表 2 IE 时间对缺血区固有侧支血流量的影响(微球数,个/g 骨骼肌, $\bar{x} \pm s, n = 5$)

检测部位	刺激前	刺激过程中				
		刺激即刻	第 2 分钟	第 3 分钟	第 4 分钟	第 5 分钟
缺血区	518 ± 50 ^a	59 ± 38 ^a	215 ± 8 ^a	262 ± 22 ^a	397 ± 28	405 ± 27
正常区	507 ± 53	487 ± 60 ^b	479 ± 56 ^b	495 ± 44 ^b	490 ± 43 ^b	513 ± 47

注:与缺血区刺激过程中第 4 分钟比较,^a $P < 0.01$;与正常区刺激前、刺激第 5 分钟比较,^b $P < 0.05$

表 3 等长收缩后再灌注局部血流量的变化(微球数,个/g 骨骼肌, $\bar{x} \pm s, n = 5$)

检测部位	刺激前	刺激结束后再灌注				
		再灌注即刻	第 2 分钟	第 5 分钟	第 8 分钟	第 10 分钟
缺血区	450 ± 60 ^a	751 ± 50 ^a	807 ± 52	454 ± 105 ^a	444 ± 49 ^a	462 ± 19 ^a
正常区	460 ± 33	422 ± 17 ^b	423 ± 25 ^b	422 ± 9 ^b	427 ± 38 ^b	450 ± 17
固有侧支	-	301 ± 29	357 ± 29	4 ± 30	-6 ± 16	12 ± 25

注:与缺血区刺激过程中第 2 分钟比较,^a $P < 0.01$;与正常区刺激前、刺激第 10 分钟比较,^b $P < 0.05$

讨 论

既往研究业已提示,缺血刺激不仅导致局部 VEGF 增加,也可引起 VEGF 远隔表达。如果对没有缺血病理基础的肌肉组织采用生理性缺血训练的方式,促进 VEGF 释放,诱发或者加强远隔病理性缺血部位的侧支循环生成,在临床上将有十分重要的价值^[15]。我们前期虽已进行过有关试验,但并未阐明造成缺血并促进固有侧支循环开放的等长收缩的强度和时间上的规律。

等长收缩是人类肌肉的基本运动形式,其特征是运动时肌肉张力增高,而肌肉长度基本不变。由于肌肉张力增高,穿行于肌肉内的血管壁压力增大,可以导致血流阻断。等长收缩对心血管的作用我们前期已经进行了研究,证明了该运动形式的调控机制和安全性^[16-17]。

1. 适宜 IE 强度: A 组实验结果显示,采用 40% IEmax 时,局部血流下降率最大,增至 60% IEmax 和 80% IEmax 时,局部血流下降率没有进一步增高,说明等长收缩造成局部组织缺血时,40% IEmax 已达到其阻断血流的最大限度,阻断作用不再随等长收缩强度的增加而增加。本实验结果发现,采用 40% IEmax 的局部血流下降率较 80% IEmax 时高,考虑是由于采用 80% IEmax 时出现骨骼肌高强度强直收缩的疲劳性,故在后期不能维持有效的肌肉收缩,导致局部血管压力下降,血流出现一过性恢复所致。研究还发现电刺激前兔血流量亦不全相同,考虑是兔单位体重血流量的个体差异所造成。

2. 适宜等长收缩时间: B 组实验结果显示,以 40% IEmax 造成缺血后,FCBF 在 0~4 min 呈增加趋势,第 4 分钟较刺激即刻以及第 2,3 分钟明显增加,第 5 分钟不再进一步增加。这说明采用 40% IEmax 造成缺血 4 min 后,固有侧支开放已经达到最大限度,不再随刺激时间的延长继续增加。正常区各时间点间血流量走势基本平稳,在刺激前和刺激第 5 分钟较高,考虑是由于微球提取及测量中的误差所致。

3. 固有侧支开放维持时间: C 组实验结果显示,以 40% IEmax 造成缺血 4 min 后,血流恢复即刻骨骼肌局部血流明显超过缺血前的基础值,第 2 分钟达到峰值,至第 5 分钟局部血流又回落到缺血前水平,至第 8,10 分钟无显著变化,提示固有侧支开放持续时间不超过 5 min。正常区各时间点间血流量走势基本平稳,在刺激前和再灌注第 10 分钟较高,考虑是由于微球提取及测量中的误差所致。

本实验系统研究了不同等长收缩强度和缺血时间对固有侧支开放的影响,确定造成兔股动脉固有侧支开放最大的最小等长收缩强度为 40% IEmax,最短缺血时间为 4 min,固有侧支开放维持时间不超过 5 min。

这些数据将为生理性缺血训练理想化方案的制定奠定基础,为进一步深入研究提供实验依据。生理性缺血训练的假说如果可以在临床上得到证实,将是心血管康复训练方法和原理的重要突破。

需要注意的是,本研究仅观察了电刺激致等长收缩负荷对固有侧支开放的急性影响,尚未观察生理性缺血训练对组织适应性改变和侧支循环形成的影响。本课题组正在该方向进行深入研究。

参 考 文 献

- [1] Schaper W. Collateral circulation: past and present. *Basic Res Cardiol*, 2009, 104: 5-21.
- [2] Elsmann P, van't Hof AW, de Boer MJ, et al. Role of collateral circulation in the acute phase of ST-segment-elevation myocardial infarction treated with primary coronary intervention. *Eur Heart J*, 2004, 25: 854-858.
- [3] Werner GS, Jandt E, Krack A, et al. Growth factors in the collateral circulation of chronic total coronary occlusions: relation to duration of occlusion and collateral function. *Circulation*, 2004, 110: 1940-1945.
- [4] Berry C, Balachandran KP, L'Allier PL, et al. Importance of collateral circulation in coronary heart disease. *Eur Heart J*, 2007, 28: 278-291.
- [5] 刘元标, 励建安, 路鹏, 等. 家兔短暂心肌梗死后 VEGF 蛋白表达的空间规律. *中国康复医学杂志*, 2004, 19: 443-445.
- [6] 路鹏, 励建安, 刘元标, 等. 心肌短暂缺血后血管内皮生长因子表达的时间规律. *中华物理医学与康复杂志*, 2004, 26: 577-580.
- [7] 陆晓, 励建安, 林松, 等. 血浆内啡肽对等长收缩运动心血管反应的中枢调节定位. *中华物理医学与康复杂志*, 2000, 22: 287-290.
- [8] Lu X, Wu T, Huang P, et al. Effect and mechanism of intermittent myocardial ischemia induced by exercise on coronary collateral formation. *Am J Phys Med Rehabil*, 2008, 87: 803-814.
- [9] Shen M, Gao J, Li J, et al. Effect of ischemic exercise training of normal limb on angiogenesis of pathological ischemic limb in rabbit. *Clin Sci*, 2009, [Epub ahead of print].
- [10] Shen M, Gao J, Li J, et al. Effect of stimulation frequency on angiogenesis and gene expression in ischemic skeletal muscle of rabbit. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87: 396-401.
- [11] Chappell DC, Varner SE, Nerem RM, et al. Oscillatory shear stress stimulates adhesion molecule expression in cultured human endothelium. *Circ Res*, 1998, 82: 532-539.
- [12] Price RJ, Less JR, Van Gieson EJ, et al. Hemodynamic stresses and structural remodeling of anastomosing arteriolar networks: design principles of collateral arterioles. *Microcirculation*, 2002, 9: 111-124.
- [13] 王红星, 励建安. 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: 274-277.
- [14] Kowallik P, Schulz R, Guth BD, et al. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation*, 1991, 83: 974-982.
- [15] Mannion JD, Buckman PD, Magno MG, et al. Collateral blood flow from skeletal muscle to normal myocardium. *J Surg Res*, 1992, 53: 578-587.
- [16] Li J, Zhao W, Zhou S, et al. Relationship between isometric exercise and myocardial ischemia in patients with coronary artery disease: an echo-doppler study. *Chin Med J*, 2000, 113: 493-497.
- [17] 单春雷, 励建安. 大脑行为对等长收缩运动时心血管反应的调控作用与机制. *中国康复医学杂志*, 2000, 15: 140-143.

(收稿日期: 2009-10-20)

(本文编辑: 吴 倩)