

· 基础研究 ·

神经肌肉电刺激对慢性低氧高二氧化碳模型大鼠肺动脉高压的影响

覃燕青 沈洁 黄世园 蒋贤逊 王小同

【摘要】 目的 观察神经肌肉电刺激对慢性低氧高二氧化碳大鼠肺动脉高压的影响。**方法** 选取雄性 SD 大鼠 18 只,按随机数字表法分为正常对照组(对照组)、低氧高二氧化碳组(模型组)和低氧高二氧化碳+神经肌肉电刺激组(电刺激组),每组 6 只大鼠。模型组和电刺激组每天置于氧舱内(O_2 浓度 9%至 11%, CO_2 浓度 5%至 6%)8 h 进行造模,连续 4 周,对照组则吸入普通空气。每天造模结束后对电刺激组大鼠双侧腓肠肌进行神经肌肉电刺激 30 min。4 周后,处死大鼠,分离右心室(RV)和左心室加室间隔(LV+S),计算右心肥厚指数 RVHI[$RVHI = RV / (LV + S)$],光镜下观察大鼠肺细小动脉结构形态变化,计算出管壁厚度占血管外径的百分比(WT%) and 管壁面积占血管总面积的百分比(WA%);采用蛋白质印迹法检测低氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、丙酮酸脱氢酶-E1(PDH-E1)、3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1(PDK1)蛋白表达;同时采用微量酶标法检测(LDH)活性,采用 ELISA 法检测丙酮酸脱氢酶(PDH)的浓度。**结果** 与对照组比较,模型组的 RVHI、WT%、WA% 值均升高($P < 0.01$),HIF-1 α 、PDK1 蛋白表达水平增高($P < 0.01$),PDH-E1 α 蛋白表达下降($P < 0.01$),LDH 活性提高($P < 0.01$),PDH 浓度未见明显差异($P > 0.05$)。与模型组相比较,电刺激组的 RVHI、WT%、WA% 值均显著降低($P < 0.01$),HIF-1 α 、PDK1 蛋白表达明显下降($P < 0.01$),PDH-E1 α 蛋白表达明显增高($P < 0.01$),LDH 活性显著下降($P < 0.01$),PDH 浓度未见明显差异($P > 0.05$)。**结论** 神经肌肉电刺激可能通过抑制 HIF-1 α 蛋白表达,抑制 PDK1、PDH-E1 α 活性、LDH 活性,抑制肺组织氧化磷酸化向糖酵解转变,从而减轻肺血管重塑,改善慢性低氧高二氧化碳所致的大鼠肺动脉高压。

【关键词】 低氧高二氧化碳; 肺动脉高压; 神经肌肉电刺激; 低氧诱导因子-1 α ; 大鼠

基金项目:浙江省自然科学基金(Y2080503)

Neuromuscular electrical stimulation relieves pulmonary artery hypertension associated with chronic hypoxic hypercapnia Qin Yanqing*, Shen Jie, Huang Shiyuan, Jiang Xianxun, Wang Xiaotong. * Center of Rehabilitation and Neurology, The Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China

Corresponding author: Wang Xiaotong, Email: wangxt22@163.com

【Abstract】 Objective To investigate effects of neuromuscular electrical stimulation (NMES) on pulmonary arterial hypertension induced by chronic hypoxic hypercapnia in rats. **Methods** Eighteen male Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal control group (the control group), a hypoxic hypercapnia group (the model group), and a hypoxic hypercapnia + NMES group (the NMES group), each of 6. The rats in both the model and NMES groups were placed in an isobaric cabin with an O_2 concentration of 9% to 11% and a CO_2 concentration of 5% to 6% for 8 hours a day for 4 weeks. After leaving the cabin, NMES was performed on the NMES group's bilateral calf muscles for 30 minutes every day. The heart was removed, and the right ventricle (RV) and the left ventricle plus the septum (LV+S) were dissected. An index of right ventricular hypertrophy was calculated as $RVHI = RV / (LV + S)$. Any changes in the pulmonary vasculature were observed using an optical microscope. WT% and WA% were calculated. The expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), PDH-E1 α and PDK1 in the lung tissue were determined using western blotting. The LDH activity and the concentration of PDH in the lung tissue homogenate were measured by spectrophotometric method using the LDH assay kit and ELISA, respectively. **Results** Compared with the control group, the average RVHI, WT% and WA%, the protein expression of HIF-1 α and PDK1, and LDH activity had all increased significantly in the NMES group, while the average expression of PDH-E1 α had

decreased significantly. Compared with the model group, significant decrease was observed in the average RVHI, WT%, WA%, protein expression of HIF-1 α and PDK1, and LDH activity in the NMES group, but the average expression of PDH-E1 α increased significantly. No significant differences in PDH concentration were detected among the 3 groups. **Conclusions** NMES may alleviate pulmonary artery hypertension induced by chronic hypoxic hypercapnia, at least in rats. The mechanism may be attributed to inhibiting the expression of HIF-1 α protein, which may inhibit the activity of PDH-E1 α and LDH, then the aerobic metabolism into glycolysis, finally improving the remodeling of the pulmonary vascular structure.

【Key words】 Hypoxic hypercapnia; Pulmonary arterial hypertension; Neuromuscular electrical stimulation; Hypoxia-inducible factor-1 α

Fund program: The Natural Science Foundation of Zhejiang province (grant Y2080503)

肺动脉高压是慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)发展至肺心病的一个重要环节,可严重影响患者的生存状态、生活质量以及疾病的预后转归。肺动脉高压的主要特征为肺血管阻力及肺动脉压力进行性升高,伴随不可逆的肺血管重塑,最终可导致右心衰竭而死亡。

神经肌肉电刺激(neuromuscular electrical stimulation, NMES)是通过刺激支配肌肉的神经分支,引起肌肉收缩的一系列间歇性刺激^[1]。近年的研究发现,神经肌肉电刺激可改善 COPD 患者的肌肉功能^[2],提高肌容积、肌肉力量和运动耐力^[3]。目前,仍鲜见关于神经肌肉电刺激对肺动脉高压的影响及其相关机制的研究。基于以上因素,本研究拟采用神经肌肉电刺激对低氧高二氧化碳肺动脉高压大鼠模型进行干预,以期观察神经肌肉电刺激对肺动脉高压的影响,并对其可能的机制进行分析。

材料与方法

一、实验动物分组

选取体重 200~220 g 的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级雄性 Sprague-Dawley (SD)大鼠 18 只,由温州医科大学实验动物中心提供[合格证号 SYXK(浙)2010-0150]。按随机数字表法将 18 只大鼠分为对照组、模型组(低氧高二氧化碳造模)、电刺激组(低氧高二氧化碳造模+神经肌肉电刺激),每组 6 只。

二、模型制备

所有大鼠均置于常压低氧高二氧化碳动物实验模拟舱(潍坊产)内,模型组和电刺激组吸入 O₂ 浓度 9%~11%, CO₂ 浓度 5%~6% 的气体,每天 8 h,持续 4 周(即造模 4 周);对照组仅吸入空气,其他各类条件与模型组和电刺激组相同。3 组大鼠均置于正常环境中饲养(室温 20~23 ℃,湿度 50%~70%),自由饮食和饮水。

三、NMES 方法

3 组大鼠均于每日吸气后即刻给予电刺激治疗,每天造模结束后,将大鼠固定于固定台上,局部剃毛,

黏贴表面电极片于双侧腓肠肌并连接韩氏穴位神经肌肉刺激仪(南京产),对照组和模型组刺激仪不通电,电刺激组刺激参数为 100 Hz 刺激 3 s 与 2 Hz 刺激 3 s 交替,刺激强度以可见肌肉收缩为宜,每次刺激 30 min。

四、检测方法及观察指标

1. 动物取材和右心肥厚指数(right ventricle hypertrophy index, RVHI)测定:造模 4 周后,将 3 组大鼠经 5%水合氯醛腹腔麻醉,打开胸腔,快速经左心室生理盐水灌注,待肺组织血液冲净后,完整取下心脏,剪去心房组织,再沿室间隔剪开,分离右心室(right ventricle, RV)和左心室加室间隔(left ventricle +septum, LV+S),用滤纸吸净后置于电子天平称重,测量 RV/(LV+S)重量比,即 RVHI。将左下肺置于 4 ℃的 4%多聚甲醛中固定,余肺组织-80 ℃冰箱保存待测。

2. 肺血管形态学检测:造模 4 周后,将肺组织置于 4%多聚甲醛中固定 48 h,常规脱水石蜡包埋,5 μ m 厚度切片,行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,封片后置于光镜下观察肺血管的形态学变化并拍照。每只大鼠选取不连续切片 3 张,每张切片随机选取 20~100 μ m 直径的肺细小动脉 3 条,应用 Image-pro plus(IPP) 6.0 版图像处理软件对直径在 20~100 μ m 的肺小动脉进行图像分析,测量肺细小动脉管壁厚度、外径、血管总面积及管壁面积,计算出管壁厚度占血管外径的百分比(vessel wall diameter/total diameter, WT%) and 管壁面积占血管总面积的百分比(vessel wall area/total area, WA%),取其平均值作为反映大鼠的肺血管形态学的指标。

3. 微量酶标法测乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性、ELISA 法测丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)浓度:造模 4 周后,取标本 0.1 g 加入 900 μ l 冷生理盐水,均质器匀浆,离心取上清,采用南京建成生物研究所提供的试剂盒测定 LDH 活性,同时采用上海卡奴生物有限公司提供的 ELISA 检测试剂盒测定 PDH 浓度,最后均采用全波长扫描多功能

酶标仪(美国 BIO-TEK 公司),以 450 nm 波长测定其吸光度,按照公式得出最后数据。

4. Western blot 法检测蛋白表达:造模 4 周后,采用蛋白裂解液提取蛋白,bicinchoninic acid(BCA)蛋白浓度测定试剂盒测浓度,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)(配制 8%分离胶及 5%浓缩胶)、切胶、转膜、封闭、孵育小盒中分别加入一抗低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α ,HIF-1 α)抗体(美国 Abcam 公司,1:1000)、3-磷酸肌醇依赖性蛋白激酶 1(3'-phosphoinositide-dependent kinase 1,PDK1)抗体(美国 Santa Cruz 公司,1:500)、丙酮酸脱氢酶-E1(pyruvate dehydrogenase-E1,PDH-E1) α 抗体(美国 Santa Cruz,1:1000)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)抗体(美国 Abcam 公司,1:1000)、4℃摇床孵育过夜,洗膜,加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记二抗(1:5000),室温孵育 2 h,洗膜,用电化学发光(electrochemiluminescence,ECL)化学发光液充分接触,Alpha Ease FC 软件分析条带吸光度,以目的蛋白条带的吸光度和 GAPDH 条带的比值代表目的蛋白的相对表达量。

五、统计学方法

采用 SPSS 17.0 版统计学软件对所得数据进行分

析,所有数据均进行正态性方差齐性检验,数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析对组间差异进行统计学比较,两两之间的比较,各组方差齐时用最小显著性差异法(least-significant difference,LSD)检验,各组方差差不齐时用 Games-Howell 法检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

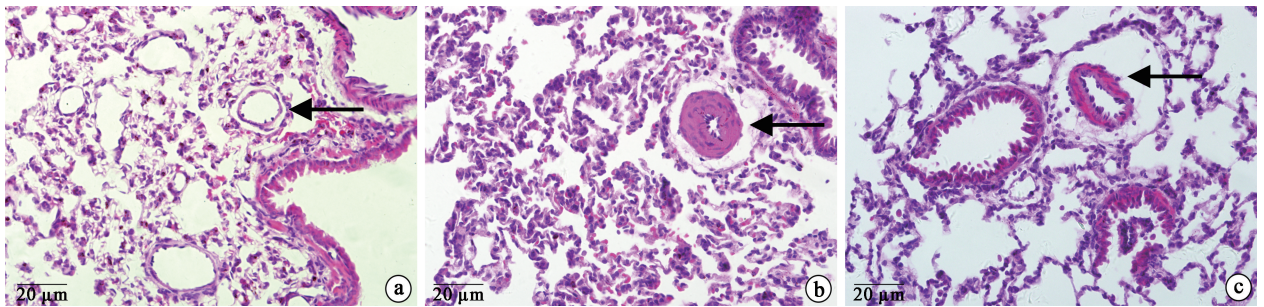
结 果

一、肺血管重塑检测

造模 4 周后,光镜下显示,对照组肺细小动脉结构清晰,管壁较薄、管腔完整,平滑肌层无明显增生;模型组肺细小动脉管壁增厚明显,管腔狭窄显著,尤其以中膜平滑肌细胞肥大合并增生为突出;电刺激组管壁增厚较少,管腔狭窄不明显,增生相对减少,详见图 1。与对照组比较,模型组的 RVHI、WT%、WA%值均明显增高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组相比,电刺激组 WT%、WA%值有所下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),详见图 2。

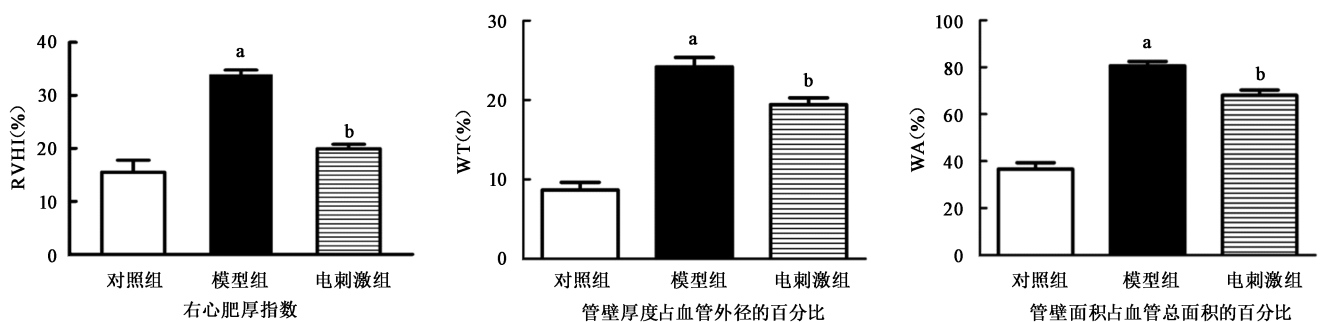
二、肺组织匀浆 LDH 活性及 PDH 浓度变化

造模 4 周后,3 组大鼠的 PDH 浓度组间差异无统计学意义($P > 0.05$);模型组大鼠肺组织匀浆 LDH 活性较对照组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);电刺激组 LDH 活性较模型组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),详见图 3。



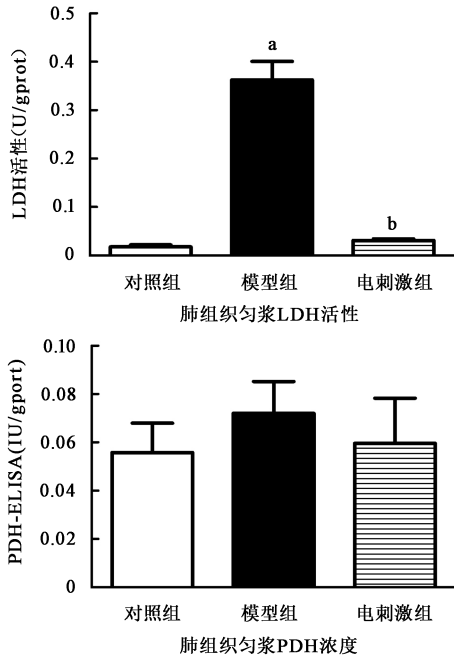
注:a 为对照组,b 为模型组,c 电刺激组,箭头所指为肺小动脉

图 1 HE 染色显示各组肺小动脉结构变化(HE 染色, $\times 200$)



注:与对照组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$

图 2 3 组大鼠 RVHI、WT%和 WA%组间比较



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$

图3 3组大鼠肺组织匀浆 LDH 活性和 PDH 浓度组间比较

三、蛋白印迹法检测 HIF-1 α 、PDK1、PDH-E1 α 蛋白表达量

造模 4 周后,蛋白印迹法结果显示,与对照组比较,模型组的 HIF-1 α 、PDK1 蛋白表达均明显增高,差异均有统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,电刺激组的 HIF-1 α 、PDK1 蛋白表达显著下降,差异均有统计学意义($P<0.01$);与对照组比较,模型组的 PDH-E1 α 蛋白表达明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$),而电刺激组 PDH-E1 α 蛋白表达则明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$),详见图 4。

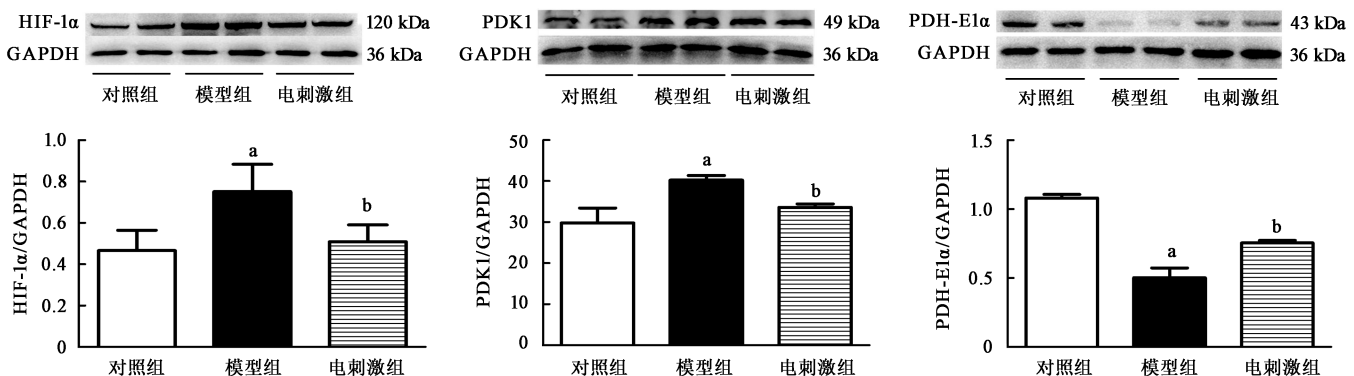
讨 论

肺动脉高压动物模型的复制成功与否主要有以下两个方面进行判断:一是肺血流动力学改变;二是病理形态学改变包括肺血管和心肌的改变^[4]。本课题组

的实验造模条件、动物与既往实验条件相同,即造模 2 周后,大鼠或小鼠即会出现肺动脉高压,并于造模 4 周后达到稳定^[5-10]。本研究虽没有对实验大鼠的平均肺动脉压或右心室压进行直接测定,但进行了详细的肺动脉病理形态学检测,结果发现,模型组大鼠肺细动脉管壁增厚明显,管腔狭窄显著;RVHI、WT%、WA% 值明显提高,这与本课题组以往的实验结果相似^[5-10],据既往的经验以及本实验的病理形态学改变提示,本研究的肺动脉高压动物模型造模成功。与模型组比较,电刺激组大鼠肺细动脉管壁增厚减少,管腔狭窄不明显,增生相对减少;RVHI、WT%、WA% 值显著下降,该结果提示,NMES 可部分缓解肺血管重塑。

低氧高二氧化碳可诱导 HIF-1 α 的表达^[7],HIF-1 α 则可促进 PDK1 的表达^[11],而 PDK1 的活化可使 PDH-E1 α 催化域磷酸化失活^[12],阻止丙酮酸进入线粒体参与三羧酸循环,减少电子供体向电子传递链的转运,从而导致线粒体膜电势超极化状态、线粒体活性氧的减少,促进细胞增殖^[13-14]。此外,低氧高二氧化碳还具有激活活化 T 细胞核因子^[15-16],降低钾离子通道蛋白表达水平^[17],引起线粒体功能失调,促进钙离子内流等作用^[18],从而促使肺血管收缩,促进肺动脉高压形成。HIF-1 α 可提高 LDH 的活性^[19],促进丙酮酸通过酵解变成乳酸,氧化磷酸/糖酵解比率下降,可导致肺动脉高压^[20]。本研究结果发现,模型组大鼠肺组织 HIF-1 α 蛋白表达较对照组明显提高,差异有统计学意义($P<0.01$),PDK1 蛋白表达亦随着提高($P<0.01$),肺组织匀浆 PDH 浓度虽无明显改变($P>0.05$),但代表丙酮酸脱氢酶复合体活性的 PDH-E1 α 蛋白水平明显下降($P<0.01$),肺组织匀浆中 LDH 活性提高($P<0.01$)。以上结果提示,HIF-1 α 表达的增高可促进肺组织氧化磷酸化向糖酵解转变,从而参与肺血管重塑,有助于形成肺动脉高压。

NMES 作用于 COPD 患者的局部效应在很多研究中已得到证实,即可直接改善对应肌肉的功能。有研



注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$

图4 3组大鼠 HIF-1 α 、PDK1、PDH-E1 α 蛋白相对表达量组间比较

究发现, NMES 具有系统性远隔效应, Vieira 等^[21]对 COPD 患者双侧股四头肌进行神经肌肉电刺激, 结果发现, 其血浆中肿瘤坏死因子 α 明显下降, β 内啡肽明显提高, 患者 1 秒用力呼气容积显著提高, 呼吸困难减轻, 6 min 步行距离明显延长。本研究结果亦显示, 电刺激组较模型组大鼠肺组织 HIF-1 α 蛋白和 PDK1 蛋白表达均明显下降 ($P<0.01$), 尽管 PDH 浓度无明显变化, PDH-E1 α 蛋白表达却明显增高 ($P<0.01$), 且 LDH 活性也明显下降 ($P<0.01$)。以上结果均表明, NMES 可通过抑制肺组织 HIF-1 α 蛋白的表达影响相关代谢酶的活性, 抑制肺血管重塑, 从而降低慢性低氧高二氧化碳所致的大鼠肺动脉高压。

综上所述, NMES 具有局部效应和系统性远隔效应, 可抑制 HIF-1 α 蛋白的表达和肺组织氧化磷酸化向糖酵解转变以及 PDK1、PDH-E1 α 、LDH 的活性, 从而减轻肺血管重塑, 改善慢性低氧高二氧化碳所致的大鼠肺动脉高压。本研究为肺动脉高压的治疗提供了新的方法和思路, 也为拓展 NMES 的临床应用提供了初步理论依据。

参 考 文 献

- [1] Maffiuletti NA. Physiological and methodological considerations for the use of neuromuscular electrical stimulation [J]. Eur J Appl Physiol, 2010, 110(2):223-234. DOI: 10.1007/s00421-010-1502-y.
- [2] Maddocks M, Nolan CM, Man WD, et al. Neuromuscular electrical stimulation to improve exercise capacity in patients with severe COPD: a randomised double-blind, placebo-controlled trial [J]. Lancet Respir Med, 2015, 4(1):27-36. DOI: 10.1016/S2213-2600(15)00503-2. Epub 2015 Dec 15.
- [3] Gerovasili V. Neuromuscular electrical stimulation appears to be useful in people with severe chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Physiother, 2012, 58(4):270. DOI: 10.1016/S1836-9553(12)70130-3.
- [4] 蒋明, 钟小宇. 慢性阻塞性肺疾病并肺动脉高压的实验动物模型研究现状 [J]. 国际呼吸杂志, 2006, 26(5):383-387.
- [5] 陈成水, 蔡孔长, 蒋仲荪, 等. 高二氧化碳对大鼠慢性常压低氧性肺动脉高压模型的影响 [J]. 浙江医学, 1999(8):464-466.
- [6] 徐漫欢, 范小芳, 王小同, 等. 吸入低氧高二氧化碳对小鼠右心室收缩压及肺小动脉重建的影响 [J]. 浙江医学, 2008, 30(1):41-43.
- [7] 郑云鹤, 王小同, 徐漫欢, 等. HIF 和 VEGF 在低氧性肺动脉高压中的调控作用 [J]. 温州医科大学学报, 2007, 37(5):449-451.
- [8] 丁城, 王良兴, 陈少贤, 等. 葛根素对低 O_2 高 CO_2 肺动脉高压大鼠肺动脉平滑肌细胞线粒体途径凋亡的影响 [J]. 温州医科大学学报, 2008, 38(4):295-299.
- [9] 刘银花, 杨汉文, 王小同, 等. 羟胺对慢性低氧高二氧化碳大鼠肺

动脉高压的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26(11):2171-2174.

- [10] 杨汉文, 诸葛毅, 王小同, 等. 激肽原酶对低氧高二氧化碳模型大鼠肺动脉高压的影响 [J]. 医药导报, 2010, 29(8):989-993.
- [11] Hitosugi T, Fan J, Chung TW, et al. Tyrosine phosphorylation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase 1 is important for cancer metabolism [J]. Mol Cell, 2011, 44(6):864-877. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.10.015.
- [12] Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia [J]. Cell Metab, 2006, 3(3):177-185.
- [13] Gopinath S, Sebastien B, Gael R, et al. Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension [J]. Sci Transl Med, 2010, 2(44):44ra58-44ra58. DOI: 10.1126/scitranslmed.3001327.
- [14] Platoshyn O, Golovina VA, Bailey CL, et al. Sustained membrane depolarization and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 279(5):C1540.
- [15] Sebastien B, Gael R, Gopinath S, et al. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(27):11418-11423.
- [16] Roxane P, Audrey C, Jolyane M, et al. Signal transducers and activators of transcription-3/pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2011, 123(11):1205-15. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.963314. Epub 2011 Mar 7.
- [17] Nievescintrón M, Hirenallurs D, Nygren PJ, et al. AKAP150 participates in calcineurin/NFAT activation during the down-regulation of voltage-gated K^+ currents in ventricular myocytes following myocardial infarction [J]. Cell Signal, 2016, 28(7):733-740. DOI: 10.1016/j.cellsig.2015.12.015.
- [18] Roxane P, Michelakis ED. The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension [J]. Circ Res, 2014, 115(1):148-164. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.301130.
- [19] Semenza GL. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism [J]. Curr Opin Genet Dev, 2010, 20(1):51-56. DOI: 10.1016/j.gde.2009.10.009. Epub 2009 Nov 26.
- [20] Sébastien B, Michelakis ED, Porter CJ, et al. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2006, 113(22):2630-2641.
- [21] Respir Vieira PJ, Chiappa AM, Cipriano G Jr, et al. Neuromuscular electrical stimulation improves clinical and physiological function in COPD patients [J]. Respir Med, 2014, 108(4):609-620. DOI: 10.1016/j.rmed.2013.12.013.

(修回日期:2017-02-04)

(本文编辑:阮仕衡)