

等长收缩运动对动脉粥样硬化兔血管内皮生长因子与一氧化氮的影响

赵彦 赵美丽 林爱翠

【摘要】 目的 探讨等长收缩运动(IE)对动脉粥样硬化兔血管内皮生长因子(VEGF)和一氧化氮(NO)的影响。**方法** 选取成年雄性新西兰白兔 24 只,制作 IE 训练模型后,按照随机数字表法分为对照组、高脂组和训练组进行 2 个阶段(6 周+4 周)的实验,每组 8 只。对照组采用普通饮食,其余两组采用高脂饲料喂养。训练组兔在第 2 阶段增加每次 2 min、每日 3 次、每周 5 d 的 IE 训练。分别于实验前、实验第 6 周及第 10 周时对兔进行外周血 VEGF、VEGF mRNA 与 NO 检测,并于实验第 10 周时对兔主动脉血管壁进行动脉粥样硬化斑块检测。**结果** 实验前,各组 VEGF、VEGF mRNA、NO 含量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。10 周后,高脂组兔外周血 VEGF 含量高于训练组和对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。训练组和对照组各时间点兔外周血 VEGF 含量比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。高脂组兔实验 10 周后外周血 VEGF 含量高于实验前($P<0.05$)。实验 10 周后,训练组和高脂组兔外周血 VEGF mRNA 含量均高于对照组($P<0.05$)。3 组兔实验 10 周后外周血 VEGF mRNA 含量均高于实验前和实验 6 周后($P<0.05$)。实验 6 周后,训练组 NO 含量高于对照组($P<0.05$)。实验 10 周后,高脂组 NO 含量高于对照组($P<0.05$)。对照组、高脂组、训练组兔外周血 NO 含量在第 6 周和第 10 周时均高于实验前($P<0.05$)。实验结束时,训练组兔有少量动脉粥样硬化斑块形成,高脂组兔动脉粥样硬化斑块最多,对照组兔无动脉粥样硬化斑块形成。**结论** 高脂饮食可以促进动脉粥样硬化形成,使 VEGF、VEGF mRNA 和 NO 含量显著增加,IE 训练可有效减缓动脉粥样硬化进程,其具体机制尚待进一步研究。

【关键词】 等长收缩; 动脉粥样硬化; 血管内皮生长因子; 一氧化氮

基金项目:国家自然科学基金(81101456);江苏省体育局课题(ST12100203);南京市医学科技发展资金资助南京市卫生青年人才培养工程项目(QRX11248, KK14097);南京医科大学科技发展基金项目(2013NJMU077);江苏省高校自然科学研究面上项目(14KJB320002)

Effects of isometric exercise on vascular endothelial growth factor and NO levels in atherosclerosis Zhao Yan*, Zhao Meili, Lin Aicui. *Department of Sports and Health Science, Nanjing Sports Institute, Nanjing 210014, China

Corresponding author: Lin Aicui, Email: linaicui@126.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of isometric contraction exercise (IE) on the levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and nitric oxide (NO) in atherosclerosis. **Methods** Twenty-four New Zealand rabbits were randomly divided into a control group, a high fat (HF) group and a high fat with training (FT) group, each of 8. The rabbits in the control group were fed with normal food, while those in the other 2 groups were provided with a high-fat diet. Beginning six weeks later, the FT group received 2 minutes of IE training 3 times a day, 5 days a week for 4 weeks. VEGF, VEGF mRNA and NO were examined before the study and six and ten weeks after the intervention began. Atherosclerotic plaques were tested at the end of the intervention. **Results** Before the intervention there was no significant difference in any of the measurements among the 3 groups. After the intervention the average VEGF in the HF group was significantly higher than in the other 2 groups and higher than before the intervention. However, no significant differences in average VEGF were observed between the FT and control groups at any time point. After 10 weeks the average VEGF mRNA of both the HF and FT groups was significantly higher than that of the control group. Moreover, the average VEGF mRNA in each group was significantly higher than before and after the 6-week intervention. The average NO content of the FT and HF groups was significantly higher than that of the control

group six and ten weeks after intervention. For all 3 groups, the measurements 6 and 10 weeks later were significantly higher than before the intervention. More atherosclerotic plaques were observed in the HF group than in the FT group, while no atherosclerotic plaques were found in the control group. **Conclusion** A high-fat diet can promote the formation of atherosclerotic plaques and the production of VEGF, VEGF mRNA and NO. IE training can effectively slow the development of atherosclerosis, but the mechanism needs further research.

【Key words】 Isometric exercise; Atherosclerosis; Vascular endothelial growth factor; Nitric oxide

Fund program: The National Natural Science Foundation of China (grant 81101456); the Sports Bureau Fund of Jiangsu Province (grant ST12100203); Nanjing Medical Science and Technique Development Foundation (grants QRX11248 and KK14097); Nanjing Medical University Science and Technology Development Fund (grant 2013NJMU077); Natural Science Foundation of the Jiangsu (grant 14KJB320002)

有研究发现,等长收缩运动(isometric contraction exercise, IE)可以促进血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)分泌^[1],从而促进心肌缺血侧支循环形成,在兔发生心肌梗死时,可以有效减小梗死体积^[2]。若能将 IE 的这一作用应用于动脉粥样硬化的预防与治疗,将可能有助于冠心病患者的康复。本研究对动脉粥样硬化兔进行 IE 训练,旨在观察 IE 对动脉粥样硬化血管 VEGF 及一氧化氮(nitric oxide, NO)的影响。

材料与方法

一、实验动物及主要实验材料

选取成年新西兰白兔 24 只,雄性,体重 2.2 ~ 2.5 kg,购于江苏省农科院动物实验中心[许可证号 SYXK(苏)2009-0019]。实验前 1 周,将兔饲养于 12 h 昼/夜循环、不限量供应水和食物的设备中。实验方案经南京医科大学附属南京医院伦理委员会批准。主要实验试剂包括 Trizol 试剂(美国 Invitrogen)、ELISA 试剂盒(中国凯基公司产)、NO 试剂盒(中国碧云天公司产)、红细胞裂解液(中国凯基公司产)、cDNA 第一链合成试剂盒(美国 Thermo Fisher 产)、50×TAE 电泳缓冲液(中国凯基公司产)。主要实验仪器包括 SY-708A 型电刺激器(江苏苏云产)、荧光定量 PCR 循环仪(美国产)、YXQ-LS-50 型立式压力锅(中国上海产)、101AS-3 型电热鼓风干燥箱(中国上海产)、台式低速离心机(中国上海产)、XW-80A 型涡旋振荡器(中国产)、5804R 型高速冷冻离心机(德国产)、UV-2450 型紫外光度计(日本产)、普通梯度 PCR 仪(美国产)。

二、动物模型制作及分组

按 1 ml/kg 自兔耳缘静脉注射 3%戊巴比妥钠,保持麻醉状态,于无菌环境下在兔左后肢坐骨神经处理植自制铂丝电极并从颈后皮下穿出、固定,制作 IE 训练动物模型^[1-3]。给予电刺激时手术肢体产生等长收缩提示造模成功。造模成功后,将兔按照随机数字表法分为 3 组,分别为对照组、高脂组和训练组,每组 8

只。对照组采用普通饮食,高脂组和训练组采用高脂饲料喂养制作动脉粥样硬化模型。

三、训练方法

实验分为 2 个阶段,第 1 阶段时间为 6 周,第 2 阶段时间为 4 周。对照组和高脂组安静笼养,训练组动物从第 2 阶段增加 IE 训练。进行 IE 训练时,将 SY-708A 型电刺激器与兔颈后的电极线相连,使肌肉产生持续等长收缩,输出频率 40 Hz、波宽 1 ms、电流强度 5 mA,每次 2 min,每日 3 次,每周 5 d。

四、检测指标

1. 外周血 VEGF 检测:实验前、实验第 6 周及第 10 周后,采用 ELISA 试剂盒(中国产)对兔进行血清 VEGF 检测。从冰箱取出试剂盒和待测血清,室温复温。在酶标包被板的标准品孔中加入 50 μ l 标准品,样本孔中依序加入 10 μ l 样本和 40 μ l 样本稀释液,空白孔中不加;37 $^{\circ}$ C 恒温箱温育 30 min。洗板 5 次后加入 50 μ l 酶标工作液,37 $^{\circ}$ C 恒温箱温育 30 min。再次洗板 5 次后加入 50 μ l 显色液 A、B,37 $^{\circ}$ C 显色 15 min。最后加入 50 μ l 终止液,15 min 内于酶标仪(澳大利亚 CliniBio 公司产)在 450 nm 波长下测量各孔的吸光度(optical density, OD),计算血清 VEGF 的浓度。

2. 外周血 VEGF mRNA 检测:实验前、实验第 6 周及第 10 周后,向每 50 ~ 100 mg 样品中加入 1 ml 的 Trizol 试剂裂解细胞,提取总 RNA。在紫外分光光度计 260 nm 和 280 nm 下确定浓度和纯度。根据反转录试剂盒提供的实验步骤,反转录合成 cDNA。稀释的 DNA 模板以及所有 cDNA 样品分别配置 Realtime PCR 反应体系。各样品的目的基因和管家基因分别在 PCR 仪上进行 Realtime PCR 反应并检测浓度。每个样品的目的基因浓度除以其管家基因的浓度,即为此样品此基因校正后的相对含量。

3. 外周血 NO 检测:实验前、实验第 6 周及第 10 周,采用 NO 试剂盒进行血清 NO 检测。用生理盐水稀释亚硝酸钾,将 5 mg 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)配置成 2 mM。硝酸还原酶在临用前取出,试剂盒中的

其余试剂溶解后均保存于冰浴上。格里斯试剂 I 和格里斯试剂 II 在使用前需达到室温。在 96 孔板中依次加入不同浓度的亚硝酸钾和样品各 60 μl , 然后依次加入 NADPH 5 μl , 黄素腺嘌呤二核苷酸 10 μl , 硝酸还原酶 5 μl , 混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 依次加入乳酸脱氢酶缓冲液和乳酸脱氢酶各 10 μl , 混匀后, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 依次加入格里斯试剂 I 和格里斯试剂 II 各 50 μl , 混匀后, 室温 (20 ~ 30 $^{\circ}\text{C}$) 孵育 10 min 后于 540 nm 波长下测量各孔的 OD 值。

4. 主动脉血管壁动脉粥样硬化斑块检测: 实验第 10 周后, 将用 10% 甲醛固定的主动脉血管纵向剪开、平铺, 滴上油红 O 染色, 约 10 min 后, 去掉染液用 70% 酒精漂洗, 看到正常组织变成乳白色为止。蒸馏水洗后肉眼观察并拍照观察。

五、统计学分析

采用 SPSS 13.0 版统计学软件包进行数据分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示, 各组不同时间 VEGF、VEGFmRNA 及 NO 含量之间比较采用方差分析, 组间两两比较采用最小显著差异法 (least significant difference, LSD), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

一、实验前后不同时间点兔外周血 VEGF 含量变化

实验前, 3 组兔外周血 VEGF 含量之间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与组内实验前比较, 高脂组实验 10 周后外周血 VEGF 含量显著升高 ($P < 0.05$)。与组内实验 6 周后比较, 3 组兔实验 10 周后外周血 VEGF 含量均有不同程度变化, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与高脂组训练后同时间点比较, 高脂组实验 10 周后外周血 VEGF 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 实验前后不同时间点兔外周血 VEGF 含量变化 (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	实验前	实验 6 周后	实验 10 周后
训练组	8	11.35 $\pm$ 1.97	16.14 $\pm$ 2.61	14.04 $\pm$ 3.44
高脂组	8	7.58 $\pm$ 1.92	17.51 $\pm$ 3.73	22.89 $\pm$ 3.94 ^a
对照组	8	8.29 $\pm$ 0.50	10.01 $\pm$ 1.84	9.00 $\pm$ 1.29 ^b

注: 与组内实验前比较, ^a $P < 0.05$; 与高脂组训练后同时间点比较, ^b $P < 0.05$

二、实验前后不同时间点兔外周血 VEGF mRNA 含量变化

实验前, 3 组兔外周血 VEGF mRNA 含量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验 6 周后, 高脂组和训练组兔外周血 VEGF mRNA 含量均略高于对照组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 实验 10 周后, 训练组和

高脂组兔外周血 VEGF mRNA 含量均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。组内比较, 3 组兔外周血 VEGF mRNA 含量在第 10 周时显著高于实验前和实验 6 周后, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 实验前后不同时间点兔外周血 VEGF mRNA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	实验前	实验 6 周后	实验 10 周后
训练组	8	1.04 $\pm$ 0.08	1.16 $\pm$ 0.07	2.91 $\pm$ 0.28 ^{ab}
高脂组	8	1.02 $\pm$ 0.12	1.38 $\pm$ 0.25	3.57 $\pm$ 0.46 ^{ab}
对照组	8	0.98 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.09	1.38 $\pm$ 0.13 ^{abcd}

注: 与组内实验前比较, ^a $P < 0.05$; 与组内实验 6 周后比较, ^b $P < 0.05$; 与训练组训练后同时间点比较, ^c $P < 0.05$; 与高脂组训练后同时间点比较, ^d $P < 0.05$

三、实验前后不同时间点兔外周血 NO 含量变化

实验前, 3 组兔外周血 NO 含量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验 6 周后, 训练组 NO 含量高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验 10 周后, 高脂组 NO 含量高于对照组 ($P < 0.05$), 训练组 NO 含量略高于对照组, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。组内比较, 3 组兔外周血 NO 含量在第 6 周和第 10 周均高于实验前, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 详见表 3。

表 3 实验前后不同时间点兔外周血 NO 含量变化 (μM , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	实验前	实验 6 周后	实验 10 周后
训练组	8	0.24 $\pm$ 0.04	2.18 $\pm$ 0.17 ^a	1.89 $\pm$ 0.19 ^a
高脂组	8	0.27 $\pm$ 0.09	1.90 $\pm$ 0.30 ^a	2.16 $\pm$ 0.14 ^a
对照组	8	0.28 $\pm$ 0.08	1.28 $\pm$ 0.15 ^{ab}	1.46 $\pm$ 0.07 ^{ac}

注: 与组内实验前比较, ^a $P < 0.05$; 与训练组训练后同时间点比较, ^b $P < 0.05$; 与高脂组训练后同时间点比较, ^c $P < 0.05$

四、实验 10 周后兔主动脉血管壁的动脉粥样硬化斑块形成情况

实验 10 周后, 训练组兔主动脉血管壁有少量动脉粥样硬化斑块形成, 高脂组动脉粥样硬化斑块最多, 对照组则未见明显的动脉粥样硬化斑块形成, 详见图 1。

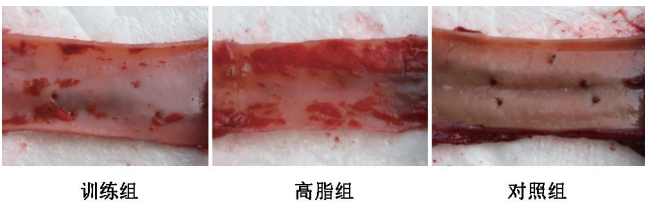


图 1 3 组兔主动脉血管壁的动脉粥样硬化斑块形成情况 (油红 O 染色)

讨 论

心脏康复对提高冠心病患者的生存率有积极作用, 但对冠状动脉侧支循环生成最有利的缺血阈强度持续时间过长会产生心血管危险^[3]。等张运动应用

于临床时,最受关注的是缺血阈强度运动的安全性,目前其应用频率尚不高^[4-5]。随着 IE 在冠心病康复研究中的进展,其安全性已得到证实^[6]。有研究发现,IE 促进心肌缺血动物侧支循环形成与其增加 VEGF 和 NO 分泌水平有关,提示此种内源性增多的 VEGF 有望改善心肌缺血并预防心肌梗死等疾病^[7]。然而,IE 促进 VEGF 分泌能否对动脉粥样硬化动物起到保护血管、减轻血管内皮损伤等作用尚不得而知。

从本研究 3 组动物的主动脉血管油红 O 染色结果中可以看出,训练组主动脉血管的粥样硬化斑块明显少于高脂组,说明 IE 可以有效减缓动脉粥样硬化进程。VEGF 是一种重要的促血管生成因子,在动脉粥样硬化斑块中,VEGF 促进血管新生的功能分为生理性新生血管功能和病理性新生血管功能,生理性血管生成有助于斑块稳定和逆转,病理性血管生成可使内皮细胞持续合成 VEGF,持续刺激血管增生并失去消退斑块功能,增加斑块增生和脱落的风险^[8]。故随着动脉粥样硬化狭窄程度的加重,血浆中 VEGF 水平也呈上升趋势^[9]。本研究结果显示,6 周(动脉粥样硬化斑块形成初期)内给予高脂饮食,动物血液中 VEGF 及 VEGF mRNA 水平高于对照组,但差异无统计学意义($P>0.05$)。当继续给予动物高脂饮食一段时间后,高脂组动物血液中 VEGF 及 VEGF mRNA 继续增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。训练组动物仅 VEGF mRNA 明显增加,说明高脂组动物在动脉粥样硬化进程中,血管内皮功能已经发生障碍,不能起到阻碍斑块形成和消退斑块的作用,即 VEGF 处于病理性新生血管功能状态;训练组动物 VEGF 及 VEGF mRNA 含量虽有所增加,但斑块少,体积小,说明血管内皮细胞功能明显优于高脂组,动物体内合成的 VEGF 可以在一定程度上消退斑块或防止斑块增生,提示训练组动物体内的 VEGF 正处于生理性新生血管功能状态。

NO 不仅可以防止冠状动脉的不正常收缩,还可以抑制血小板聚集、粘附分子在内皮细胞表面表达及巨噬细胞的粘附和渗透等,在防止冠心病时起着保护血管内皮细胞的关键作用^[10]。NO 的分泌除受 VEGF 的影响外,主要与 NO 生成量及类型有关^[11]。合成 NO 的一氧化氮合酶分为神经元型、诱导型和内皮型^[12]。其中,调节血管内皮功能的 NO 主要由内皮型一氧化氮合酶合成。在动脉粥样硬化进程中,内皮型一氧化氮合酶合成 NO 减少,诱导型一氧化氮合酶合成 NO 显著增多^[13]。虽然 NO 总量增多,但这种 NO 的显著增多并不能有效调控内皮依赖性血管舒张功能,即并不能有效保护血管内皮。另一方面,某些因素导致的 NO 生物利用率下降也会促进动脉粥样硬化形

成^[14]。本研究中,发生动脉粥样硬化的高脂组和训练组动物体内的 NO 含量在 6 周后和 10 周后均高于对照组,但训练组的动脉粥样硬化程度明显优于高脂组,这一结果是否与动物体内合成的 NO 类型有关还需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Shen M, Gao J, Li J, et al. Effect of stimulation frequency on angiogenesis and gene expression in ischemic skeletal muscle of rabbit[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2009, 87(5): 396-401. DOI: 10.1139/y09-007
- [2] Lin A, Li J, Zhao Y, et al. Effect of physiologic ischemic training on protection of myocardial infarction in rabbits[J]. Am J Phys Med Rehabil, 2011, 90(2): 97-105. DOI: 10.1097/PHM.0b013e3182017483
- [3] 韩良, 励建安, 余滨宾. 等长收缩负荷对家兔股动脉固有侧支循环开放的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2010, 32(1): 13-16. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1421.2010.01.005.
- [4] 陆晓, 励建安, 吴涛, 等. 短暂缺血阈强度运动促进心肌侧支循环生成的机制[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2009, 31(9): 587-592. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1421.2009.09.004.
- [5] 陆晓, 郑瑜. 冠心病康复治疗[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32(9): 656-659. DOI: 1005-2194(2012)09-0656-04.
- [6] 李咏雪, 林松, 陆晓, 等. 生理性缺血训练对冠心病患者循环血管内皮祖细胞的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2012, 27(4): 293-299. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1242.2012.04.001.
- [7] 李玲, 陆晓, 励建安, 等. 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[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2013, 35(4): 241-244. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.04.001.
- [8] 郝扬. 斑块内新生血管的作用及应对[J]. 国际心血管病杂志, 2014, 41(1): 14-17. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6583.2014.01.005.
- [9] 唐智敏, 凌芳. 颈动脉系统 TIA 患者血管内皮生长因子水平与脑动脉粥样硬化狭窄及侧支循环形成的关系[J]. 中华神经医学杂志, 2013, 12(2): 141-146. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2013.02.008.
- [10] 张洪侠, 刘善云, 李宁, 等. 耐力运动对 ApoE 基因敲除小鼠一氧化氮系统的影响及其对 AS 形成的干预作用[J]. 天津体育学院学报, 2010, 25(2): 122-124. DOI: 1005-0000(2010)02-0122-03.
- [11] Michel T, Vanhoutte PM. Cellular signaling and NO production[J]. Pflugers Arch, 2010, 459(6): 807-816. DOI: 10.1007/s00424-009-0765-9.
- [12] 张蕾, 阮君山, 严令耕, 等. 内皮素和一氧化氮致血管损伤性疾病的分子机制及药物研发策略[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2): 162-165. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2012.02.004.
- [13] Zhong XN, Wang HH, Lu ZQ, et al. Effects of Naioxintong on atherosclerosis and inducible nitric oxide synthase expression in atherosclerotic rabbit [J]. Chin Med J, 2013, 126(6): 1166-1170.
- [14] Vita JA. Endothelial Function[J]. Circulation, 2011, 124(25): 906-912. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.078824.

(修回日期: 2016-08-23)

(本文编辑: 凌 琛)