

· 基础研究 ·

心肌短暂缺血后血管内皮生长因子表达的时间规律

路鹏 励建安 刘元标 金挺剑 王骏

【摘要】目的 观察心肌短暂缺血后血管内皮生长因子(VEGF)表达的时间规律。**方法** 阻断 50 只新西兰兔冠状动脉制作心肌缺血模型,分为对照组(S)、缺血组(0 h)及再灌注组(亚组:1 h,2 h,3 h,4 h,5 h,6 h,7 h)。采用 Western Blotting 法检测缺血和非缺血区心肌 VEGF,酶联吸附试验检测外周血心肌钙蛋白(CTn-I)。**结果** (1)再灌注 5 h CTn-I 无显著增高($P=0.863$)。(2)缺血区心肌 VEGF 表达在缺血组与对照组差异无显著性意义;再灌注 1 h 显著升高,3 h 达到高峰,4~7 h 逐渐降低;非缺血区表现类似趋势,但时间滞后 2~3 h。(3)再灌注各组缺血区 VEGF 表达均显著高于非缺血区,相关性良好。**结论** VEGF 表达在心肌缺血后 3 h 达到高峰,然后逐渐降低。非缺血区的改变与缺血区相关,但增加程度较低,时间相对滞后。

【关键词】 心肌缺血; 血管内皮生长因子; 时间规律

The temporal patterns of VEGF protein expression in rabbit myocardium after brief ischemia LU Peng, LI Jian-an, LIU Yuan-biao, JING Ting-jian, WANG Jun. Department of Rehabilitation Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

【Abstract】Objective To study the temporal patterns of VEGF protein expression in rabbit myocardium subject to brief ischemia. **Methods** Fifty New Zealand rabbits were subjected to brief occlusion of left ventricle coronary artery (LVA) for 2 minutes. They were divided into a control group, an ischemic group and a reperfusion group which was further divided into sub-groups of 1h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h and 7h. Each group had five rabbits. Expression of VEGF protein in ischemic and non-ischemic myocardium was quantified by Western Blotting. Peripheral plasma samples were taken for CTn-I analysis. **Results** (1) CTn-I did not change significantly. (2) VEGF levels remained similar in ischemic myocardium in both control and ischemic groups. However, it increased significantly in the reperfusion groups at 1h, reached the peak at 3h, and decreased gradually from 4h to 7h. The time pattern in the non-ischemic myocardium was similar to that in the ischemic one, but delayed 2~3h afterwards. (3) VEGF level in ischemic myocardium was higher than the non-ischemic myocardium in the reperfusion groups with high correlation($r=0.983$, $P<0.001$). **Conclusion** The expression of VEGF peaked at 3h in ischemic myocardium after transient ischemia. Temporal pattern in the non-ischemic myocardium was similar, but delayed. There was a close correlation with regard to VEGF expression between the ischemic and non-ischemic myocardium($r=0.983$, $P<0.001$).

【Key words】 Myocardium ischemia; VEGF; Temporal patterns

临床观察表明,心绞痛患者比无心绞痛者发生心肌梗死的面积小,并发症少,死亡率低^[1],这可能与缺血促进冠状动脉侧支循环形成有关^[2]。侧支循环形成是心肌缺血的适应性反应^[3]。

本实验室的前期研究中,采用 Ameriod 缩窄器制作慢性猪冠状动脉狭窄模型,并进行 4~8 周的有氧训练,发现训练组心肌中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)显著升高,同时伴有血管生成显著增多^[4,5]。提示运动可能通过诱发心肌缺血促进侧支循环生成发挥中心效应。VEGF 是血管内皮的丝分裂素,在生理和病理性血管再生过程中均是关键的调控因素^[6,7],因此成为冠心病康复研究的焦

点之一。但运动促进侧支循环形成的分子生物学机制仍有诸多未知因素,其中 VEGF 合成或者释放的时间规律是进一步研究的重要前提。

有报道称将离体心脏置于低氧环境下 5~10 min, 15 min 后即表达 VEGF mRNA,30 min 达到高峰,并至少可以维持 3 h^[6],但是没有完整描述 VEGF 表达的时间规律。时间规律的揭示对于此方向进一步的研究有较高价值。

本实验旨在通过系统观察心肌短暂缺血后 VEGF 表达的时间规律,为进一步研究运动锻炼对缺血心肌的保护机制提供基础。

材料与方法

一、实验动物

健康成年新西兰大白兔 50 只,雄性,体重(2.5 ±

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 30370687)

作者单位:210029 南京,南京医科大学第一附属医院康复医学科

0.5) kg, 购自南京金陵实验动物繁殖调剂中心, 批号 SLXK(苏)2002-0025。

二、动物模型制作

参照何智明等^[8]的研究加以改进。30% 乌拉坦 (1 g/kg 体重) 腹腔注射麻醉, 胸骨左侧 3~4 肋间切口入胸。暴露心脏, 打开心包, 于左心耳根部冠状动脉左室支 (left ventricle coronary artery, LVA) 远端 0.5 cm 处用穿有 5-0 无创缝合线的 3/8 弯针钩绕冠状动脉左室支主干。线两端穿过一根聚乙烯小管以形成闭环; 拉紧闭环止血钳并固定即阻断血管造成缺血, 放松闭环即可发生再灌注。持续记录肢体导联心电图。

三、缺血、再灌注的判断

心电图 ST 段抬高或压低、肉眼见 LVA 支配区心肌发绀即为缺血成功; 心电图 ST 段恢复、肉眼见发绀区变红为再灌注标志。

四、剔除标准

有下列情况之一者不能入选: (1) 拉紧闭环既无心电图改变, 又无心肌发绀; (2) 未发生再灌注; (3) 呼吸、心跳停止超过 30 s; (4) 取材时发现心肌坏死灶。

五、实验分组

意外死亡 3 只, 剔除 2 只。对照组 5 只, LAV 穿线但未阻断血管; 缺血组 (0 h) 5 只, 缺血 2 min; 再灌注组 (共 7 个亚组: 缺血 2 min, 再灌注 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h 组) 每小组各 5 只。

六、标本采集

5 h 组术前及实验终点取耳缘静脉血检测外周血心肌肌钙蛋白 (CTn-I), 立即送检。麻醉下迅速于阻断部位远端 3 mm 处, 取 LVA 支配区及右心室游离壁心肌, 液氮中暂存, -80℃ 低温冰箱保存; 缺血组再灌注 2 min、对照组术后 3 h, 再灌注组分别于再灌注 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h 后取材。

七、VEGF 蛋白测定

Western Blotting 法检测: 取待测心肌组织约 150 mg, 预冷 PBS 洗涤至缓冲液清澈; 加入预冷的 1.5 ml 组织裂解缓冲液^[9] (Tris-HCl 50 mmol/L, NP-40 1%, 脱氧胆酸钠 0.25%, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, Aprotinin 1 μg/ml, Na₃VO₄ 1 mmol/L, PMSF 1 mmol/L), 冰水浴下机械匀浆; 4℃ 下 12 000 g/min

离心 20 min; 吸取上清, -25℃ 保存。用 Bradford 法测定蛋白浓度。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 每泳道加入 40 μg 总蛋白; 其中一泳道上加入预染蛋白 Marker 10 μl (6.5~175 KD, BioLabs 公司产)。湿式转移法转移蛋白至 PVDF (poly vinylidene fluoride, PVDF) 膜。膜在 4℃ 下于封闭液 (5% 的脱脂奶粉加入 TBST 中) 中孵育过夜。一抗结合: 膜与 VEGF 多克隆抗体 (0.5 μg/ml, sc-507, Santa Cruz 公司产) 4℃ 下孵育 10 h。二抗结合: 膜与标记有辣根过氧化物酶的羊抗兔 IgG (0.1 μg/ml, sc-2004, Santa Cruz 公司产) 常温下孵育 90 min。增强化学发光 (Supersignal Trial Kit, Pierce 公司产)。曝光 60 s, 显影 60 s, 定影 4 min。采用美国 UVP 公司的 Epi Chemi II Darkroom 及图像分析系统进行图像扫描及灰度分析。

八、心肌肌钙蛋白检测

采用酶联免疫吸附法, 由南京医科大学第一附属医院心血管研究中心执行。

九、统计学分析

所有数据均经 SPSS 10.0 软件检验, 呈正态分布且方差齐性。ANOVA 分析不同缺血心肌、非缺血心肌及两者间 VEGF 表达的差异性。对数时间-VEGF 含量拟合分析, 再采用简单回归法分析缺血区与非缺血区 VEGF 表达的相关性。P < 0.05 为差异有显著性意义。

结 果

一、缺血区和非缺血区 VEGF 的表达

表 1 显示, 缺血和非缺血区心肌 VEGF 表达随时间变化的规律, 以及缺血和非缺血区心肌 VEGF 含量比较。缺血区心肌的 VEGF 在 1~2 h 显著升高, 3 h 时达到高峰, 4~7 h 时逐渐降低, 7 h 时与对照组比较, 差异仍有显著性意义 (P < 0.05); 非缺血区心肌 4 h 时显著升高, 5 h 时达最高峰, 6 h 时开始降低。再灌注组缺血区 VEGF 均显著高于非缺血区 (r = 0.983, P < 0.001)。

二、外周血 CTn-I

再灌注 5 h 组, 术前与再灌注 5 h 外周血 CTn-I 的浓度分别为 (1.77 ± 0.28) μg 和 (1.81 ± 0.42) μg, 两者间无统计学差异 (P = 0.863)。

表 1 各组心肌 VEGF 表达的灰度值 ($\bar{x} \pm s$)

部 位	对照组	缺血组 (0 h)	再灌注组						
			1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	7 h
缺血区	60.1 ± 10.2	60.3 ± 12.4	75.0 ± 5.6 ^{#△}	106.3 ± 10.3 ^{*△}	204.6 ± 7.8 ^{*△}	129.9 ± 8.2 ^{*△}	113.4 ± 13.2 ^{*△}	123.5 ± 8.8 ^{*△}	81.6 ± 6.4 ^{*△}
非缺血区	63.7 ± 3.7	63.9 ± 9.9	64.8 ± 10.6	65.6 ± 10.0	68.4 ± 5.2	75.4 ± 6.9 [#]	79.0 ± 8.4 [*]	76.0 ± 8.6 [#]	71.1 ± 7.4

注: 与非缺血区比较, [△]P < 0.01; 与对照组比较, [#]P < 0.05, ^{*}P < 0.05

讨 论

冠心病康复锻炼的重要机制之一是中心机制,即适当的活动,可能促进心肌侧支循环的形成,从而起保护作用。本系列研究旨在揭示中心机制的内涵和实用的可能性。而本文研究的目标是观察心肌短暂缺血后 VEGF 表达的时间规律,为进一步研究打下基础。

采用穿线法阻断家兔冠状动脉前降支制作急性短暂心肌缺血模型的可行性在本课题组的前期研究中已得到证实^[10]。CTn-I 和心电图是公认的反映心肌缺血/坏死的敏感指标,在本研究中得到应用,并证实 2 min 的短暂缺血不会导致心肌坏死。

本课题组前期研究证实,家兔冠状动脉固有侧支血管最大开放需要至少 2 min 缺血刺激^[2]。因此我们采用 2 min 的短暂缺血刺激。

VEGF 是国际上研究血管新生最普遍采用的观测指标,也是本研究的核心参数。尽管影响侧支血管生成的因素众多,但是影响最大的参数是 VEGF。

任何蛋白质的功能表达都有一定的时间规律。但是心肌短暂缺血后 VEGF 表达的时间规律目前尚不明瞭。

Estuo 等^[6]在离体心脏的研究中发现,5~10 min 的低氧后 15 min,即可检测到 VEGF mRNA 的表达,30 min 达到高峰,并至少维持 3 h。而我们的研究结果表明,完全阻断兔 LVA 2 min 后,缺血区心肌 VEGF 在缺血组无显著升高,再灌注 1~2 h 显著升高,3 h 达到高峰,4~7 h 逐渐降低,7 h 与对照组比较,差异仍有显著性意义($P < 0.05$)。该差异的原因在于本课题研究的是活体心肌缺血的反应,而 Estuo 研究的是离体组织,前者与固有侧支循环开放和全身反应有关。而离体心脏作为一个独立的器官,反映独立脏器对低氧刺激的反应。

有报道显示,持续阻断大鼠左冠状动脉,缺血心肌的 VEGF mRNA 在 30 min 后显著升高,1~2 h 时达到高峰,6 h 时开始降低^[11,12]。这些研究没有检测 2~6 h 间的情况,不能排除表达高峰出现在 2~6 h 之间的可能。心肌持续缺血的刺激强度远高于短暂缺血,对心肌的损伤较重,甚至引起坏死。该方向的研究结果不能类推到心肌缺血。

本研究表明,再灌注组缺血区 VEGF 均显著高于非缺血区,并具有较好相关性($r = 0.983$, $P < 0.001$),提示心肌局部缺血可能具有远隔效应。非缺血心肌 VEGF 的表达在 4 h 开始显著升高,5 h 达高峰,6 h 开始降低,7 h 与对照组没有差异。提示心肌局部缺血刺激后,远隔心肌 VEGF 的表达较缺血区延后 2~3 h。

有少数文献报道了非缺血区心肌 VEGF 表达的时

间规律^[12-14],但均是心肌持续缺血模型,因此不能类推到心肌短暂和间断缺血。

有研究显示,1 次 5~10 min 低氧可诱导大鼠心肌显著表达 VEGF,当低氧时间超过 20 min 时,表达量显著降低;缺血 5 min 再灌注 15 min 和缺血 5 min 再灌注 35 min 的反复缺血刺激并不能增强 VEGF 表达,相反只有单次 5 min 缺血刺激的一半。研究者认为延长缺血时间,增加缺血频率不能增加 VEGF 表达量的原因可能在于过度低氧造成了心肌损害^[6]。这提示存在诱导心肌表达 VEGF 的适量缺血时间和缺血频率,即适量缺血负荷。

何等程度的缺血负荷是适量缺血负荷,目前知之甚少。本研究表明,短暂缺血后 VEGF 的表达以再灌注 2~4 h 为最高,提示再灌注时间为 2~4 h 的重复缺血刺激,可能使 VEGF 的表达维持在恒定的高表达水平。

本研究首次在动物模型中研究了短暂缺血后心肌 VEGF 表达的时间变化规律,为研究适量缺血负荷奠定了基础;同时为 VEGF 相关研究的取材时间选择提供了参考,也为研究 VEGF 的调控机制打下了基础。

本课题组尝试性地研究了适量缺血负荷对侧支循环开放和生成的影响,为探索缺血负荷促进侧支循环生成的特点和规律,以发挥积极有利的中心效应提供理论基础。该理念的引入将使临床上对缺血负荷的认识更加全面和深刻,对冠心病康复治疗中运动训练强度的制定具有积极意义。

参 考 文 献

- 1 Yoshio K, Shunichi M, Akira I, et al. Previous angina reduces in-hospital death in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*, 1998, 81: 117-122.
- 2 White F, Carroll S, Magnet A, et al. Coronary collateral development in swine after coronary artery occlusion. *Circ Res*, 1992, 71: 1490-1500.
- 3 Charney R, Cohen M. The role of the coronary collateral circulation in limiting myocardial ischemia and infarct size. *Am Heart J*, 1993, 126: 937-945.
- 4 黄澎,励建安,袁红洁,等. 有氧运动训练对慢性冠状动脉狭窄后侧支循环生成的初步研究. *中国康复医学杂志*, 2002, 17: 22-25.
- 5 袁红洁,励建安,黄澎,等. 有氧训练对猪慢性冠状动脉狭窄后心肌血管内皮生长因子表达的影响. *中国康复医学杂志*, 2002, 17: 72-74.
- 6 Estuo H, Teruhiko O, Takashi N, et al. Rapid induction of vascular endothelial growth factor expression by transient ischemia in rat heart. *Am J Physiol*, 1994, 267: 1948-1954.
- 7 Buschmann I, Schaper W. The pathophysiology of the collateral circulation (arteriogenesis). *J Pathol*, 2000, 190: 338-342.
- 8 何智明,陈东风,邹香云,等. 家兔心肌缺血模型与冠状动脉左室支解剖特点关系. *中国临床解剖学杂志*, 1994, 12: 54-56.
- 9 Liu J, Bhooma S, Bian X, et al. Vascular endothelial growth factor is increased following coronary artery occlusion in the dog heart. *Mol Cell*

- Biochem, 2000, 214: 23-30.
- 10 王红星, 励建安, 路鹏, 等. 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.
 - 11 Masahiro M, Hironobu T, Mitsuru N, et al. Duration of ischemia is vital for collateral development: repetitive brief coronary artery occlusion in conscious dogs. Circ Res, 1989, 64: 287-296.
 - 12 Li J, Brown LF, Hibberd MG, et al. VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. Am J Physiol, 1996, 270 (5 Pt 2): 1803-1811.
 - 13 Xu XH, Chen JG, Zhu JZ. Primary study of vascular endothelial growth factor immunohistochemical staining in the diagnosis of early acute myocardial ischemia. Forensic Sci Int, 2001, 118: 11-14.
 - 14 Chen J, Xu X, Wu X, et al. Rapid expression of vascular endothelial growth factor in early acute myocardial ischemia in rats. Chin Med J, 1999, 112: 758-760.
- (收稿日期: 2004-04-19)
(本文编辑: 熊芝兰)

· 短篇论著 ·

脑卒中住院患者的身体安全事件调查

皮绍文 刘钦刚

关于老年人跌倒的研究比较多, 而关于脑卒中住院患者身体安全事件的报道却不多, 但脑卒中患者在住院康复期间常常遇到一些安全方面的问题, 发生一些危险事件, 如跌倒、烫伤、挫伤等。我们对脑卒中住院患者的身体安全事件进行了回顾性调查, 分析了危险因素, 并提出预防措施。

一、对象与方法

观察 2002 年 8 月 ~ 2003 年 8 月在解放军康复中心住院康复的 100 例脑卒中患者, 其中脑出血 32 例, 脑梗死 68 例; 男 64 例, 女 36 例; 平均住院时间 46 d; 所有患者均无严重意识、精神交流障碍。复习患者的病历, 记录他们的身体安全事件发生情况 (包括危险事件、发生时间、发生原因等)。

二、结果

有 22 例患者在病程中发生了身体安全事件, 发生率为 22%, 其中跌倒 17 例, 烫伤 2 例, 面部挫伤 1 例, 踝扭伤 2 例。因身体安全事件致严重后果 3 例, 其中外伤性脑出血 2 例 (死亡 1 例), 骨折 1 例。因身体安全事件引起医疗纠纷 2 例。身体安全事件多发生在病程的 1 个月左右。事件分类和原因见表 1。

表 1 身体安全事件分类、例数及发生原因

事件分类	例数	发生原因
床边跌倒	5	坐位平衡差, 床边缺少护栏、扶手
椅子上跌倒	4	坐位平衡差, 椅子缺少扶手、靠背
轮椅上跌倒	2	使用轮椅不当, 监护不当
入厕、洗澡跌倒	3	地面滑, 扶手不牢固, 洗澡设施不全
站立、行走跌倒	3	站立不稳, 没有达到行走条件而独立行走
面部挫伤	1	存在视觉-空间忽略, 面部碰撞门框
烫伤	2	严重感觉缺失
踝扭伤	2	足内翻、髁外旋, 下楼时致踝扭伤

三、讨论

脑卒中偏瘫患者在治疗、恢复过程中, 跌倒的发生率为 14% ~ 39%^[1]。本调查中跌倒发生率为 17%。跌倒的发生主要与坐位、站位平衡差, 姿势调整能力下降及缺少安全设施有关^[2]。

脑卒中患者发生烫伤的报道不多, 本调查中有 2 例患者发生烫伤。烫伤的发生可能与丘脑和感觉传导束受损而引起严重感觉缺失, 患者不能感受温热刺激有关。

发生面部碰伤的患者为右顶叶梗死, 早期存在视觉-空间忽略, 对左侧物体感知存在忽略现象, 导致左面部撞到门框引起挫伤。此类患者的危险事件应引起重视。

发生踝部扭伤的患者主要是因患者存在严重足内翻、髁外旋, 导致在下楼梯和走坡路时发生踝扭伤, 如使用踝关节支具则可避免踝部损伤的发生。

脑卒中患者的危险事件多发生在病程的早期, 即 1 个月左右, 这可能与患者早期运动能力较差、临床病症相对比较稳定而开始加强功能训练有一定关系。

护理管理也是需要加强的一个方面。在一些发达国家的医院或长期照顾机构, 由专职的护工、护理助手管理患者的生活护理问题, 患者不需另请护理人员。在我国则相反, 患者几乎都是自带或雇佣陪护人员, 而陪护人员也不固定, 水平不一, 受过专业训练的很少; 同时医护人员把大量的安全问题交给了家属及陪护。

以上情况并没有包含脑卒中患者的所有身体安全问题和事件, 但应对发生安全事件的危险因素有所了解。

脑卒中患者的身体安全事件不是并发症, 其发生有一定的偶然性和危险发生的环境及因素, 通过采取适当的措施是可以预防的。防止身体安全事件的发生, 应了解脑卒中患者的安全、危险因素, 熟悉每个患者的临床病症和医疗诊断, 制定安全教育计划, 如加强对日常生活不能自理患者的监护、使用正确的转移技术、教患者正确使用辅助器具及改善环境设施等。

参 考 文 献

- 1 彭楠, 摘. 亚急性期中风患者注意力缺陷与平衡控制及跌倒的研究. 国外医学物理医学与康复学分册, 2002, 22: 43.
- 2 翁长水, 高怀民. 急性脑卒中偏瘫患者初诊时坐位保持姿势对判断功能预后的价值. 中华物理医学与康复杂志, 2002, 24: 40-42.

(收稿日期: 2003-12-02)

(本文编辑: 郭正成)