

·基础研究·

生理性缺血训练对动脉粥样硬化进程中兔血管内皮的影响*

孔明涯¹ 陆 晓² 林 松³ 赵 彦⁴ 林爱翠^{5,6}

摘要

目的:研究动脉粥样硬化早期进行生理性缺血训练对斑块形成的影响。

方法:成年新西兰白兔24只,随机分为3组,每组8只,分别为对照组、高脂组和训练组。对照组采用普通饮食,其余两组采用高脂饮食,其中训练组左下肢用止血带结扎的方式进行生理性缺血训练3min/次,3次/d,5d/周,另外两组安静笼养。实验周期为4周。

结果:4周实验后,兔主动脉油红-O染色结果显示,高脂组主动脉血管壁上动脉粥样硬化斑块面积占 $1.84\pm 0.83\%$,而对照组和训练组却没有动脉粥样硬化斑块形成。血管横切面HE染色显示高脂组兔主动脉内膜上已经形成泡沫细胞,而对照组和训练组兔的主动脉内膜光滑,无泡沫细胞形成。实验前三组兔血液VEGF含量组间差异无显著性意义(对照组: $8.35\pm 0.37\text{pg/ml}$,高脂组: $8.27\pm 0.55\text{pg/ml}$,训练组: $8.63\pm 0.36\text{pg/ml}$, $P>0.05$),实验后三组兔血液VEGF含量均高于实验前,但组间差异无显著性意义(对照组: $16.93\pm 0.89\text{pg/ml}$,高脂组: $14.39\pm 0.97\text{pg/ml}$,训练组: $14.36\pm 0.73\text{pg/ml}$, $P>0.05$)。实验前三组兔血液NO含量组间差异无显著性意义(对照组: $0.888\pm 0.23\mu\text{mol/L}$,高脂组: $0.421\pm 0.09\mu\text{mol/L}$,训练组: $0.529\pm 0.134\mu\text{mol/L}$, $P>0.05$),实验后三组兔血液NO含量均高于实验前,组间差异具有显著性意义($P<0.01$),训练组($2.18\pm 0.144\mu\text{mol/L}$)和高脂组($1.82\pm 0.078\mu\text{mol/L}$)均显著高于对照组($1.27\pm 0.167\mu\text{mol/L}$)。实验前三组兔血液EPCs含量组间差异无显著性意义(对照组: 7.25 ± 0.86 个/每 10^5 个淋巴细胞,高脂组: 7.5 ± 0.6 个/每 10^5 个淋巴细胞,训练组: 8.87 ± 0.61 个/每 10^5 个淋巴细胞, $P>0.05$),实验后训练组EPCs含量(12.75 ± 0.94 个/每 10^5 个淋巴细胞)高于高脂组(8.25 ± 0.73 个/每 10^5 个淋巴细胞)和对照组(8.25 ± 0.73 个/每 10^5 个淋巴细胞)且组间差异具有显著性意义($P<0.01$)。

结论:在动脉粥样硬化形成过程中,生理性缺血训练可以促进机体产生血管内皮相关因子,保护血管内皮功能,减缓粥样硬化斑块形成速度。

关键词 生理性缺血训练;动脉粥样硬化;血管内皮生长因子;血管内皮功能障碍

中图分类号:R541.4,R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-01-0010-05

Effects of physiological ischemia training on rabbits' vascular endothelium during atherosclerotic plaque formation process/KONG Mingya, LU Xiao, LIN Song, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017,32(1): 10—14

Abstract

Objective: To investigate the effect of physiological ischemia training on atherosclerotic plaque formation at the early stage of atherosclerosis.

Method: Twenty-four adult New Zealand rabbits were randomly assigned into three groups: control group, high-fat diet group and training group. Rabbits in control group were feed with normal rabbit food, while animals

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.01.004

*基金项目:国家自然科学基金项目(81101456);南京市医学科技发展资金项目(QRX11248,YKK14097);江苏省高校自然科学基金项目(14KJB320002);南京医科大学科技发展基金项目(2013NJMU077)

1 南京林业大学体育部,210037; 2 南京医科大学第一附属医院康复医学科; 3 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)心内科; 4 南京体育学院运动健康科学系; 5 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)康复医学科; 6 通讯作者

作者简介:孔明涯,男,硕士,讲师; 收稿日期:2016-09-20

in high-fat diet group and training group were feed with high fat food. Rabbits in training group experienced physiological ischemia training with 3mins/time, 3 times/day, 5days/week. The total experiment was lasted for 4 weeks.

Result: At the end of experiment, the result of oil-red O dyed aorta showed $1.84 \pm 0.83\%$ atherosclerotic plaque on the aortic vascular wall in high-fat diet group, but nothing in control group and training group. HE staining of vascular cross section showed foam cell formation, but no foam cell formation in control group and training group. At the beginning of experiment, there was no significant difference ($P > 0.05$) of VEGF concentration among control group (8.35 ± 0.37 pg/ml), high-fat diet group (8.27 ± 0.55 pg/ml) and training group (8.63 ± 0.36 pg/ml). It increased for control group (16.93 ± 0.89 pg/ml), high-fat diet group (14.39 ± 0.97 pg/ml) and training group (14.36 ± 0.73 pg/ml) at the end of experiment. However, there was no significant difference among the three groups ($P > 0.05$). At the beginning of experiment, there was no significant difference ($P > 0.05$) of nitric oxide among control group ($0.888 \pm 0.23 \mu\text{mol/L}$), high-fat diet group ($0.421 \pm 0.09 \mu\text{mol/L}$) and training group ($0.529 \pm 0.134 \mu\text{mol/L}$). At the end of experiment, nitric oxide concentration in high-fat diet group ($2.18 \pm 0.144 \mu\text{mol/L}$) and training group ($1.82 \pm 0.078 \mu\text{mol/L}$) increased significantly ($P < 0.01$) when compare with that in control group ($1.27 \pm 0.167 \mu\text{mol/L}$). There's no significant difference ($P > 0.05$) of EPCs concentration among control group ($7.25 \pm 0.86/10^5$ lymphocyte), high-fat diet group ($7.5 \pm 0.6/10^5$ lymphocyte) and training group ($8.87 \pm 0.61/10^5$ lymphocyte) at the beginning of experiment. At the end of experiment, EPCs concentration in training group ($12.75 \pm 0.94/10^5$ lymphocyte) was significantly higher than that in high-fat diet group ($8.25 \pm 0.73/10^5$ lymphocyte) and control group ($8.25 \pm 0.73/10^5$ lymphocyte) ($P < 0.01$).

Conclusion: During the formation of atherosclerosis, physiological ischemia training can promote the production of the vascular endothelial related factors that protect vascular endothelial function and slow down the formation of atherosclerosis plaque.

Author's address Dept. of Physical Education, Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037

Key word physiological ischemia training; atherosclerosis; vascular endothelial growth factor; vascular endothelial dysfunction

生理性缺血训练应用于心血管疾病康复的基础研究已被证明可以有效地促进心肌缺血动物体内产生较多的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)并促进缺血心肌部位侧支循环的生成^[1-3],为生理性缺血训练应用于临床治疗奠定了实验基础。然而,在冠心病进展到心肌缺血这样的严重状态之前,血管内皮功能已经受损,甚至动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)已经发生,生理性缺血训练能否在这一时期保护血管内皮功能,减缓动脉粥样硬化速度? 本文拟通过动物实验进行验证。

1 材料与方法

1.1 研究对象

成年雄性新西兰白兔24只,体重2.2—2.5kg,购于江苏省农科院动物实验中心。实验前一周饲养于12h昼/夜循环、不限量供应水和食物的设备中。实验方案遵循美国NIH公布的实验动物使用指南^[4],

并经南京医科大学附属南京医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与训练方法:将新西兰白兔随机分为3组,每组8只,分别为对照组、高脂组和训练组。对照组采用普通饮食,其余两组采用高脂成分比例为:胆固醇1%、蛋黄2%、猪油5%的高脂饲料喂养制作AS模型。对照组和高脂组安静笼养,训练组左下肢用止血带短时间结扎的方式实现下肢股动脉支配区域生理性缺血,该方法已在课题组前期实验中证明有效^[5]。结扎时间为3min/次,3次/d,5d/周。实验周期为4周。

1.2.2 取材:实验结束时将兔过量麻醉处死后取主动脉进行HE染色。分别于实验开始时和结束时取兔耳中动脉血,提取血清用于外周血VEGF、一氧化氮(nitric oxide, NO)的检测,肝素抗凝全血用于内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)检测。其中实验开始时的血清储存于-80℃冰箱中,待

与实验结束时的血清用同一批次试剂盒检测。EPCs检测为当天进行。

1.2.3 动脉粥样硬化斑块检测:将10%甲醛固定的主动脉血管纵向剪开、平铺,滴上油红-O试剂,约10min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。

1.2.4 血管内膜 HE 染色:主动脉取材后常规石蜡包埋,4 μ m切片后常规二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗、吸干。苏木素染色5min后自来水冲洗、吸干。盐酸乙醇分化30s后自来水浸泡15min、吸干。伊红染色2min后常规脱水、透明、封片。于显微镜下观察。

1.2.5 外周血 VEGF 检测:按操作说明在 VEGF 的 ELISA 试剂盒(凯基公司,中国)酶标包被板中加入标准品、样本和样本稀释液,经温育、洗板后加入酶标工作液,再经温育后加入显色液显色,最后加入终止液,于酶标仪(CliniBio 公司,澳大利亚)用450nm波长测量各孔的光学密度(optical density, OD)值,计算血清 VEGF 浓度。

1.2.6 外周血 NO 检测:按 NO 试剂盒(碧云天公司,中国)操作要求在96孔板中依次加入不同浓度的 KNO₂、样品、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)、黄素腺嘌呤二核苷酸、硝酸还原酶,混匀孵育后依次加入乳酸脱氢酶缓冲液和乳酸脱氢酶再混匀孵育,之后依次加入格里斯试剂I和格里斯试剂II后混匀孵育,10min后于540nm波长下测量各孔的OD值,计算NO浓度。

1.2.7 外周血内皮祖细胞检测:取65 μ l抗凝全血置

于流式细胞仪专用试管中,加1.2ml流式细胞仪溶血素(康源生物制品有限公司,中国)。室温孵育后离心、弃上清,加入胎牛血清磷酸缓冲液(fetal bovine serum phosphate buffer, PBS-FBS)洗2次获得含白细胞的PBS-FBS液体。流式细胞抗体 Anti-Mouse CD3、Anti-Mouse CD45、Anti-Mouse CD133(eBioscience, California 公司,美国)避光孵育45min后加入1ml的3%PBS-FBS混匀清洗2次,最后加入3% PBS-FBS 300 μ l混匀,进行EPCs检测(BD公司,美国)。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计分析。实验数据以均数 $\pm$ 标准误差表示,采用方差分析法比较组间差异, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 动脉粥样硬化斑块形成情况

主动脉整体油红-O染色结果显示(图1),经过4周的高脂饲养,高脂组主动脉血管壁上形成许多小型动脉粥样硬化斑块,平均面积 $1.84 \pm 0.83\%$,而对照组和训练组未观察到动脉粥样硬化斑块形成。

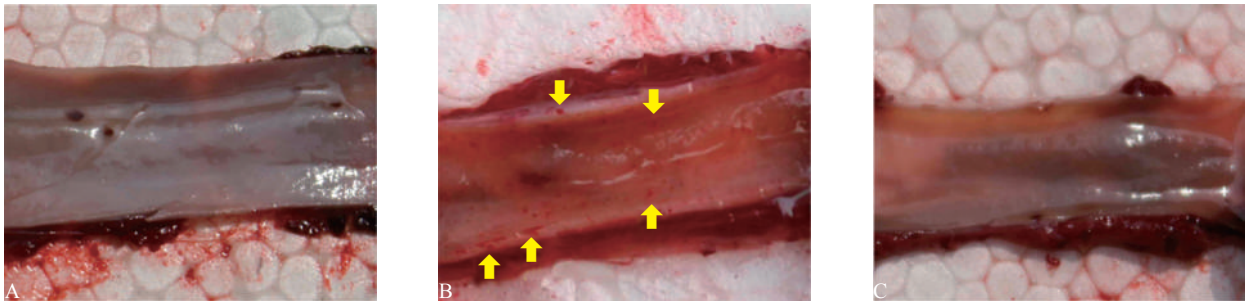
2.2 血管内膜浸润情况

主动脉血管横切面HE染色显示(图2),经过4周的实验后,高脂组兔主动脉内膜上已经形成了泡沫细胞,而对照组和训练组兔的主动脉内膜光滑,无泡沫细胞形成。

2.3 外周血 VEGF 含量变化

从图3A可以看出,实验前兔血液 VEGF 含量组间差异无显著性意义(对照组: 8.35 ± 0.37 pg/ml,高脂

图1 各组主动脉油红-O染色结果



A:对照组主动脉

B:高脂组主动脉

C:训练组主动脉

组: $8.27 \pm 0.55 \text{ pg/ml}$, 训练组: $8.63 \pm 0.36 \text{ pg/ml}$, $P > 0.05$), 实验后兔血液 VEGF 含量均高于实验前, 但组间差异无显著性意义(对照组: $16.93 \pm 0.89 \text{ pg/ml}$, 高脂组: $14.39 \pm 0.97 \text{ pg/ml}$, 训练组: $14.36 \pm 0.73 \text{ pg/ml}$, $P > 0.05$)。

2.4 外周血 NO 含量变化

图 3B 显示实验前兔血液 NO 含量组间差异无显著性意义(对照组: $0.888 \pm 0.23 \mu\text{mol/L}$, 高脂组: $0.421 \pm 0.09 \mu\text{mol/L}$, 训练组: $0.529 \pm 0.134 \mu\text{mol/L}$, $P > 0.05$), 实验后兔血液 NO 含量均高于实验前, 组间差异具有显著性意义($P < 0.01$), 训练组 ($2.18 \pm$

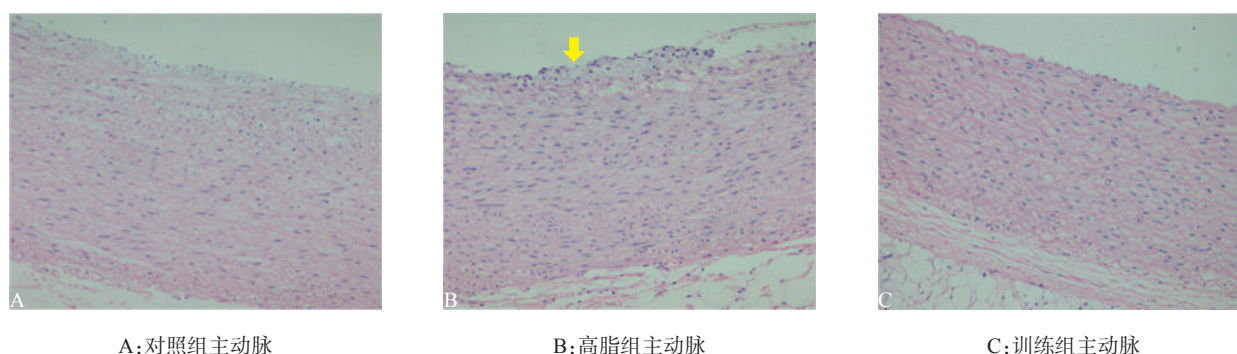
$0.144 \mu\text{mol/L}$) 和高脂组 ($1.82 \pm 0.078 \mu\text{mol/L}$) 均显著高于实验组 ($1.27 \pm 0.167 \mu\text{mol/L}$)。

2.5 外周血 EPCs 含量变化

图 3C 显示实验前兔血液 EPCs 含量组间差异无显著性意义(对照组: 7.25 ± 0.86 个/每 10^5 个淋巴细胞, 高脂组: 7.5 ± 0.6 个/每 10^5 个淋巴细胞, 训练组: 8.87 ± 0.61 个/每 10^5 个淋巴细胞, $P > 0.05$), 实验后训练组 EPCs 含量 (12.75 ± 0.94 个/每 10^5 个淋巴细胞) 高于高脂组 (8.25 ± 0.73 个/每 10^5 个淋巴细胞) 和对照组 (8.25 ± 0.73 个/每 10^5 个淋巴细胞), 组间差异具有显著性意义($P < 0.01$)。

图2 主动脉血管横切面 HE 染色结果

($\times 200$)

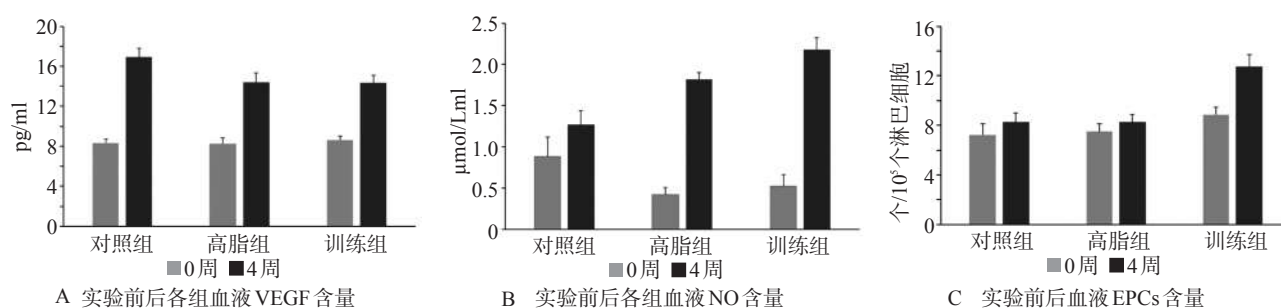


A: 对照组主动脉

B: 高脂组主动脉

C: 训练组主动脉

图3 实验前后兔血液指标变化情况



3 讨论

冠状动脉粥样硬化性心脏病的康复治疗通常着手于手术之后, 如果能够在这种疾病的早期进行康复的一级预防, 将有可能减缓 AS 进程, 然而康复的一级预防如何影响 AS 进程, 目前还缺乏实验数据。

本文采用高脂饲养新西兰白兔的方法模拟血管粥样硬化进程, 采用止血带结扎下肢的方式实现生理性缺血训练^[5], 通过油红-O 染色发现, 经过 4 周生理性缺血训练的高脂饲养兔与对照组兔主动脉内

壁无明显粥样硬化斑块形成, 而单纯高脂饲养兔主动脉内壁已出现少量粥样硬化斑块。主动脉血管 HE 染色结果也显示, 训练组与对照组兔血管内膜光滑, 无泡沫细胞形成, 而高脂组兔血管内膜已有泡沫细胞形成^[6]。说明生理性缺血训练可以在 AS 形成早期对血管起保护作用, 减缓血管粥样硬化进程。

VEGF 可以修复损伤的血管内皮、促进血管新生^[7], 而已有的研究显示生理性缺血训练可以促进机体产生较多 VEGF^[1-2,5,8], 并在促进侧支循环生成、

减少心肌梗死面积上起重要作用^[1]。本文的研究显示,经过4周的实验后,三组兔血管 VEGF 含量均有所上升,但组间无显著差异。其原因可能是为了保证采用同一批次试剂盒进行检测,在进行 VEGF 检测时,实验开始时的血清已经储存过一段时间,导致 VEGF 检出量下降^[9],另一方面 VEGF 的表达升高不仅与缺氧和/损伤有关^[10],还与 NO 的增加存在双向调节机制等因素有关^[11],所以三组兔血液 VEGF 值在第4周时均有所升高不能简单地归结于与生理性缺血训练有关。

内皮细胞功能障碍是 AS 形成之前的早期表现,在 AS 的发展过程中也起着极为重要的作用^[12]。NO 是内皮细胞实现功能最重要的递质。在内皮细胞功能障碍早期,NO 分泌量增加可调节血管张力,抑制血管平滑肌增生、抗血小板聚集及炎症反应^[11],对抗 AS 进程。但随着病变进展,NO 的生物活性会呈下降趋势^[13]。本实验结束时三个组的 NO 检出值均高于实验开始时,可能与实验开始时的血清储存过一段时间从而影响检出值有关,但高脂组与训练组 NO 含量增加明显多于对照组,训练组 NO 含量明显多于高脂组,进一步印证了在在皮细胞功能障碍早期,生理性缺血训练可以促进机体产生较多的 NO 来保护血管内皮这一说法,而训练组 NO 含量明显高于高脂组有可能与生理性缺血训练有关。

在生理情况下,血管内皮细胞的完整性还依赖于 EPCs 的归巢,内源性动员内皮祖细胞可改善血管内皮的功能,降低 AS 的形成速度^[14]。在 AS 斑块形成早期,EPCs 数量增加可预防粥样斑块形成,而在粥样硬化斑块形成晚期,内皮损伤严重,EPCs 却促使血管壁滋生新生血管,新生血管可能破裂导致斑块内出血,转变为不稳定性斑块^[15]。本文中训练组兔血液 EPCs 含量明显高于高脂组和对照组,且血管内壁无明显粥样硬化斑块形成,说明生理性缺血训练可以促使兔体内产生更多的 EPCs,以有效改善血管内皮的功能,减缓粥样硬化斑块形成的速度。

本文研究显示在动脉粥样硬化形成过程中,生理性缺血训练可以促进机体产生血管内皮相关因子,保护血管内皮功能,减缓粥样硬化斑块形成速度。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Gao J, Shen M, Guo X, et al. Proteomic mechanism of myocardial angiogenesis augmented by remote ischemic training of skeletal muscle in rabbit [J]. *Cardiovasc Ther*, 2011, 29(3):199—210.
- [3] 李玲,陆晓,励建安,等.血管内皮生成因子和一氧化氮对兔生理性缺血冠状动脉侧支血液流量的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*, 2013, 35(4):241—244.
- [4] Health UNIo. Revised Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. NIH publication No. 85_23. NIH Guide. 1996;25:34. National Institutes of Health, 1996.
- [5] Zhao Y, Li J, Lin A, et al. Improving angiogenesis and muscle performance in the ischemic limb model by physiological ischemic training in rabbits [J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2011, 90(12):1020—1029.
- [6] 黄成磊,罗心平,李剑,等.兔股动脉粥样硬化斑块模型中 TF 及 TFPI 的变化[J].*中国病理生理杂志*, 2008, 24(12):2311—2314.
- [7] Anthony S. Jaipersad, BA, MBBS, et al. The role of monocytes in angiogenesis and atherosclerosis [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(1):1—11.
- [8] 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.
- [9] Hosnutter M, Aslan C, Isik D, et al. Functional assessment of autologous platelet-rich plasma (PRP) after long-term storage at -20°C without any preservation agent [J]. *J Plast Surg Hand Surg*, 2016, 7: 1—5.
- [10] Hui Guo, Hui Zhou, Jie Lu, et al. Vascular endothelial growth factor: an attractive target in the treatment of hypoxic/ischemic brain injury [J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(1):174—179.
- [11] Takahilo Nakagawa, Waichi Sato, Tomoki Kosugi, et al. Uncoupling of VEGF with endothelial NO as a potential mechanism for abnormal angiogenesis in the diabetic nephropathy [J]. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 2013: 184539.
- [12] Cavieres V, Valdes K, Moreno B, et al. Vascular hypercontractility and endothelial dysfunction before development of atherosclerosis in moderate dyslipidemia: role for nitric oxide and interleukin-6 [J]. *Am J Cardiovasc Dis*, 2014, 4(3): 114—122.
- [13] Seinosuke Kawashima, Mitsuhiro Yokoyama. Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(6):998—1005.
- [14] Endtmann C, Ebrahimian T, Czech T, et al. Angiotensin II impairs endothelial progenitor cell number and function in vitro and in vivo: implications for vascular regeneration [J]. *Hypertension*, 2011, 58(3):394—403.
- [15] 吴倩倩,方涛.内皮祖细胞与粥样斑块稳定性研究进展[J].*心血管病学进展*, 2014, 7(35):488—491.