

· 基础研究 ·

生理性缺血训练影响心肌缺血兔模型内皮祖细胞活力的基础研究

万春晓 励建安 杨承健

【摘要】目的 研究生理性缺血训练 (PIT) 对于心肌缺血兔模型内皮祖细胞 (EPCs) 细胞活性的影响。**方法** 选取健康成年雄性新西兰兔 18 只, 采用随机数字表法分为假手术组、心肌缺血组和 PIT 组, 每组新西兰兔 6 只。诱发靶肌肉 (腓肠肌) 产生缺血性等长收缩, 作为 PIT 的模型; 冠状动脉左室支安装水囊梗阻器, 制作可控性心肌缺血模型。造模成功 7 d 后, 心肌缺血组仅进行心肌缺血刺激, PIT 组同时进行心肌缺血刺激和肢体 PIT 训练, 假手术组为空白对照组, 仅进行常规饲养。心肌缺血训练每日 2 次, 每次 2 min, 每周 5 次, 连续训练 4 周; PIT 训练每日 2 次, 每次 4 min, 每周 5 次, 连续训练 4 周。3 组新西兰兔均于造模成功 7 d 后 (训练前) 和训练 4 周后 (训练后) 抽取外周血, 分离和培养 EPCs, 进行细胞迁移能力、粘附能力测定, 并进行外周血中 EPCs 和心肌缺血区毛细血管计数。**结果** 训练后, 心肌缺血组和 PIT 组与组内训练前比较, EPCs 的粘附能力均显著增加 ($P < 0.05$)。训练前, 假手术组、心肌缺血组和 PIT 组 EPCs 迁移细胞数量分别为 (77 ± 10) 个/高倍视野, (84 ± 11) 个/高倍视野, (81 ± 13) 个/高倍视野, 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 训练后, PIT 组 [(151 ± 16) 个/高倍视野] 与心肌缺血组 [(130 ± 17) 个/高倍视野] 迁移的细胞数与组内训练前和假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。训练后, PIT 组 [$(0.046 \pm 0.007)\%$] 和心肌缺血组 [$(0.038 \pm 0.016)\%$] 的 EPCs 与组内训练前和假手术组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 且 PIT 组训练后与心肌缺血组训练后比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。Pearson 相关分析表明, 训练后, 缺血心肌处的毛细血管数量与循环中的 EPCs 数量呈正相关。**结论** PIT 可以增加心肌缺血兔中内皮祖细胞的动员, 从而增加缺血心肌处血管新生。

【关键词】 生理性缺血训练; 内皮祖细胞; 细胞功能; 血管新生

The effects of physiological ischemia training on endothelial progenitor cells WAN Chun-xiao*, LI Jian-an, YANG Cheng-jian. *Department of Rehabilitation, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China
Corresponding author: LI Jian-an, Email: lijianan@carm.org.cn

【Abstract】Objective To explore the effects of physiological ischemia training (PIT) on the function of endothelial progenitor cells. **Methods** Eighteen male New Zealand rabbits (2.5 ± 0.5) kg were divided into 3 groups: a sham operation (SO) group, a myocardial ischemia (MI) group and a MI + physiological ischemia training (MI + PIT) group. The PIT was modeled by ischemic isometric contraction of gastrocnemius muscle induced by electric stimulation (40 Hz, 1 ms, 40% maximum current strength), and the MI was modeled by implantation of a water balloon to occlude the left ventricular branch of the heart. The experiment was conducted for 4 weeks. Before and after the experiments, the ability of mobilization and adhesion of endothelial progenitor cells were detected, the number and the capillary density were counted. **Results** Post-experiment, compared with groups SO and MI, PIT group significantly improved the ability of mobilization (151 ± 16 cells/HPF, $P < 0.01$) and adhesion (17.8 ± 2.8 cells/HPF, $P < 0.05$), increased the circulating amount ($P < 0.05$) and capillary density ($824.0 \pm 106.6 /\text{mm}^2$, $P < 0.05$). Pearson analyze showed that there was positive correlation between circulating EPCs and capillary density. **Conclusion** Physiological ischemia training could improve EPCs mobilization and function, resulted to neovascularization in the ischemic heart tissues.

【Key words】 Physiological ischemia training; Endothelial progenitor cell; Function; Angiogenesis

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2013.08.001

基金项目: 国家自然科学基金项目 81070181/H0206

作者单位: 100853 北京, 解放军总医院康复医学中心 (万春晓); 南京医科大学第一附属医院康复科 (励建安); 南京医科大学附属无锡二院 (万春晓, 杨承健)

通信作者: 励建安, Email: lijianan@carm.org.cn

缺血性心脏病是临床常见病和多发病, 新近的研究发现, 治疗性血管生成可作为挽救缺血组织的重要策略, 且干细胞治疗缺血性心脏病被认为是一种有效方式, 其中内皮祖细胞 (endothelial progenitor cells, EPCs) 作为血管内皮细胞的多功能干细胞, 具有自我

分化和增殖能力,能定向归巢^[1],参与出生后的血管新生过程。在机体缺血、组织损伤、细胞因子或药物等的刺激下,EPCs 可从骨髓向靶部位动员、分化、增殖,从而形成新生血管^[2]。有研究显示,高强度的运动可通过促进体内内皮祖细胞的增殖和血管的生成来改善心脏功能^[3,4],但也会引起不良心血管事件增加,使其临床应用受限^[5]。

生理性缺血训练(Physiological Ischemia Training, PIT)是本课题组提出的正常骨骼肌等长收缩的训练方式^[6-8],旨在避免高强度运动过程中心血管事件的发生。本课题组系列研究表明,PIT 可以增加缺血区域的血管发生^[6-8],但对于该过程中是否有内源性的 EPCs 的参与及其活性变化情形尚不了解。为此,本研究通过测定 PIT 前、后循环中的 EPCs 水平,观察训练前、后 EPCs 活性的变化,旨在探讨 PIT 对内源性 EPCs 活性影响及其相关临床意义。

资料与方法

一、动物分组

健康成年雄性新西兰兔 18 只,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,实验前常规饲养 24 h。采用随机数字表法分为假手术组、心肌缺血组和 PIT 组,每组 6 只新西兰兔。

二、主要试剂与仪器

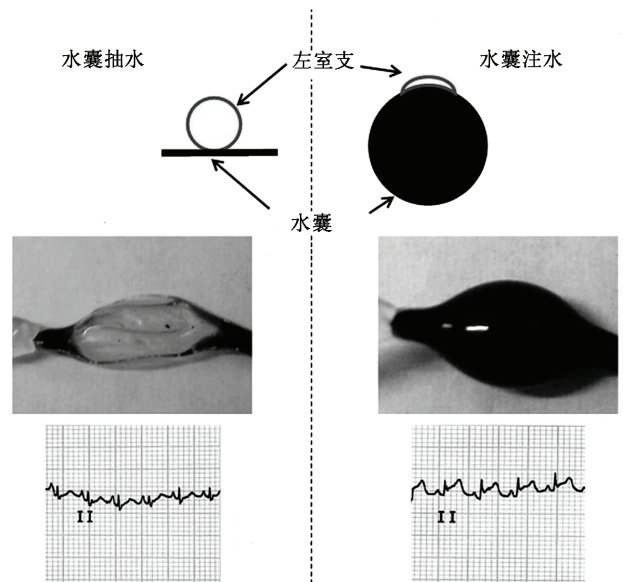
淋巴细胞分离液 Histopaque-1077 购自美国 Sigma 公司,EMG-2 培养液购自德国的 Lonza Cologne 公司,Dil 标记的乙酰化低密度脂蛋白(Dil-labelled acetylated low-density lipoprotein, Dil-ac-LDL)购自美国 Molecular Probes 公司,FITC 标记的荆豆凝集素 1 (Fluorescein isothiocyanate-labelled Ulex europaeus agglutinin-1, FITC-UEA-1)购自美国 Sigma 公司,PE-抗小鼠 CD₃₄ 抗体购自 BD Biosciences 公司,FITC-抗小鼠 Flk-1 抗体购自 R&D Systems 公司,改良 Boyden 小室购自江苏海门麒麟医用仪器厂;流式细胞仪购自美国 BD 公司,激光共聚焦购自德国 Zesis 公司,相差倒置显微镜购自德国 Zesis 公司;鼠抗人 CD₃₁ 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

三、模型制作和干预方法

1. PIT 模型的制作:PIT 组参照本课题组实验方法制作生理性缺血模型^[6],兔经 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg 体重)静脉麻醉后,俯卧位下右侧坐骨结节下 1 cm 横行切口,钝性分离,暴露坐骨神经,将电极丝植入神经外膜后缝合固定,两电极及相连接的导线皮下引出固定于皮肤。根据课题组先前研究成果^[9],通过电刺激诱发右侧腓肠肌产生缺血性等长收缩。电刺激参数:电流强度为能产生最大收缩力的最大强度的

40%,1 ms,40 Hz,最佳训练参数为每次收缩时间 4 min,每日重复 2 次。假手术组仅在右侧坐骨结节下横行切口后暴露坐骨神经后缝合切口。

2. 可控性心肌缺血模型的制作:心肌缺血组参照本课题组实验研究方法制作兔可控性心肌缺血模型^[10]。在左心耳根部冠状动脉左室支(left ventricular branch, LVB)远端 5 mm 处安置水囊梗阻器。水囊充水时结扎部位以下 LVB 支配区心肌发绀,心电图 II 导联监测出现心肌缺血改变;抽水后发绀区心肌恢复正常颜色。2 min 后心电图恢复正常为水囊安置成功(图 1)。模型制作成功后,动物每天肌注青霉素钠 4 × 10⁵ U,连续 5 d。假手术组只打开胸腔,暴露心包后闭合胸腔。



注:将水囊固定在冠脉左室支,当水囊抽水时,冠脉左室支血流畅通,心电图 II 导联 ST 段正常;当水囊充水时,冠脉左室支血流阻断,心电图 II 导联 ST 段抬高

图 1 可控性心肌缺血模型

3. 干预方法:造模成功 7 d 后,心肌缺血组仅进行心肌缺血刺激,PIT 组同时进行心肌缺血刺激和肢体 PIT 训练,假手术组为空白对照组,仅进行常规饲养。心肌缺血训练每日 2 次,每次 2 min,每周 5 次,连续训练 4 周;PIT 训练每日 2 次,每次 4 min,每周 5 次,连续训练 4 周。

四、检测指标

3 组新西兰兔均于造模成功 7 d 后(训练前)和训练 4 周后(训练后)抽取动脉血 20 ml,测定 EPCs 的数量以及迁移能力的变化。训练 4 周后,处死动物,检测缺血心肌处的毛细血管密度。

1. EPCs 的分离和培养:抽取外周动脉血 20 ml,采用梯度密度法分离单核细胞。获得的单个核细胞悬浮于 EMG-2 培养液,种植于包被了人纤维连接蛋

白的培养板,置于 37 ℃,5% CO₂ 的孵箱培育。每隔 3 d 换液 1 次。倒置相差显微镜下观察细胞形态变化。

2. EPCs 的鉴定:培养 7 d 后,贴壁细胞加入 Dil-ac-LDL(10 μg/ml)培养液共孵 4 h 后,加入 FITC-UEA-1(10 μg/ml)10 min,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)清洗,激光共聚焦显微镜下观察。随机选 4 个视野,双荧光表达的为正在分化的 EPCs。镜下观察染色绿色表示与 FITC-UEA-1 结合(激发波长 488 nm),红色显示摄取了 Dil-ac-LDL(激发波长 514 nm)。

3. EPCs 的粘附实验:消化收集贴壁细胞,悬浮在 500 μl 培养液并计数,将同等数目的 EPCs 铺在包被人纤维连接蛋白的 24 孔板上,在 37 ℃,5% CO₂ 的孵箱培育 1 h 后计数贴壁细胞数量。

4. EPCs 的迁移实验:收集贴壁细胞并计数。将 200 μl 培养液和 50 ng/ml 的血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)20 μl 加入改良的 Boyden 小室的下室,将 2 × 10⁴ 的 EPCs 悬浮在 50 μl 的 EMG-2 培养液中,注入上室,37 ℃,5% CO₂ 培养 24 h,取出滤膜,刮去滤膜上面的未移动细胞,甲醛固定,Giemsa 染色,在倒置显微镜下随机选择 9 个 200 倍视野计数。

5. 外周血中 EPCs 计数:先采用密度梯度分离法,取外周动脉血 5 ml,分离出单个核细胞分置于测定管和同型对照管。测定管中加入 PE-CD₃₄(Phycoerythrin-CD₃₄)和 FITC-Flk-1(Fluorescein isothiocyanate-Fetal Liver Kinase 1)各 20 μg,同型对照管加入相应的同型对照抗体,上机检测。每次测定 1 × 10⁶ 个细胞,用 Cellquest 软件分析双阳性细胞所占比例,百分数表示。

6. 心肌毛细血管密度测定:采用免疫组织化学 CD₃₁ 染色方法测定远隔缺血心肌处毛细血管密度。实

验终点处死动物,取出前后乳头肌之间的左心室组织,石蜡包埋切片(厚度 5 μm),采用二氨基联苯胺(diaminobenzidine,DAB)染色法,选用 CD₃₁(1:100)进行孵育。切片在高倍显微镜(200 倍)下随机选取 5 个视野进行毛细血管计数。直径 < 10 μm,棕色封闭的圆形和类圆形为可计数的毛细血管。

四、统计学处理

采用 SAS 9.1.3 版统计学软件进行数据分析,数据均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。连续正态分布的变量用 Kolmogorov-Smirnov test 检验,组内比较采用 *t* 检验,组间比较采用方差检验。采用 Pearson 相关性分析实验第四周时外周血 EPCs 与缺血心肌局部毛细血管密度的相互关系。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

一、内皮祖细胞的鉴定

贴壁细胞具有摄取 Dil-ac-LDL 和结合 FITC-UEA-1 能力,贴壁细胞摄取 Dil-ac-LDL 呈红色荧光,结合 FITC-UEA-1 呈绿色荧光,荧光叠加后显示双荧光阳性光贴壁细胞为正在分化的 EPCs(图 2)。

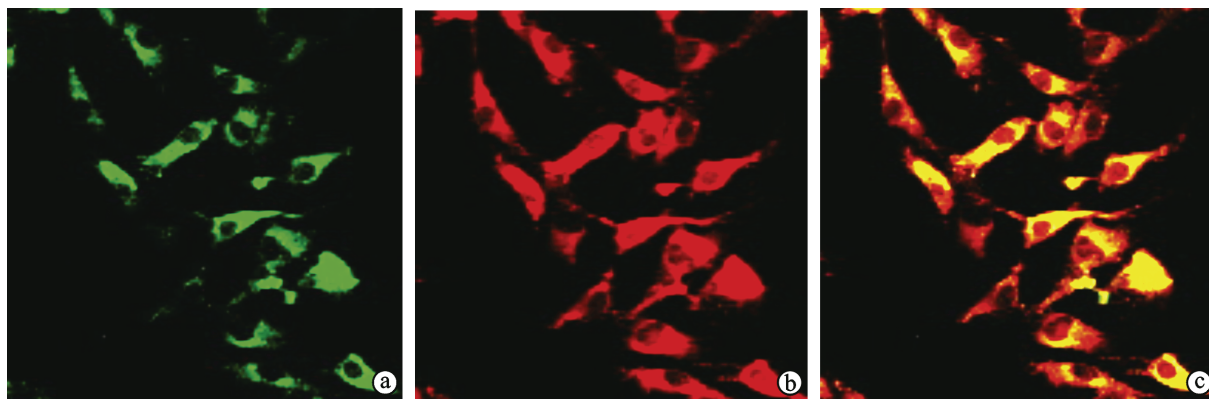
二、3 组新西兰兔 EPCs 的黏附能力比较

与组内训练前比较,心肌缺血组和 PIT 组训练后,EPCs 的粘附能力均显著增加(*P* < 0.05),详见表 1。

表 1 3 组新西兰兔训练前、后 EPCs 的情况变化
(个/高倍镜视野, $\bar{x} \pm s$)

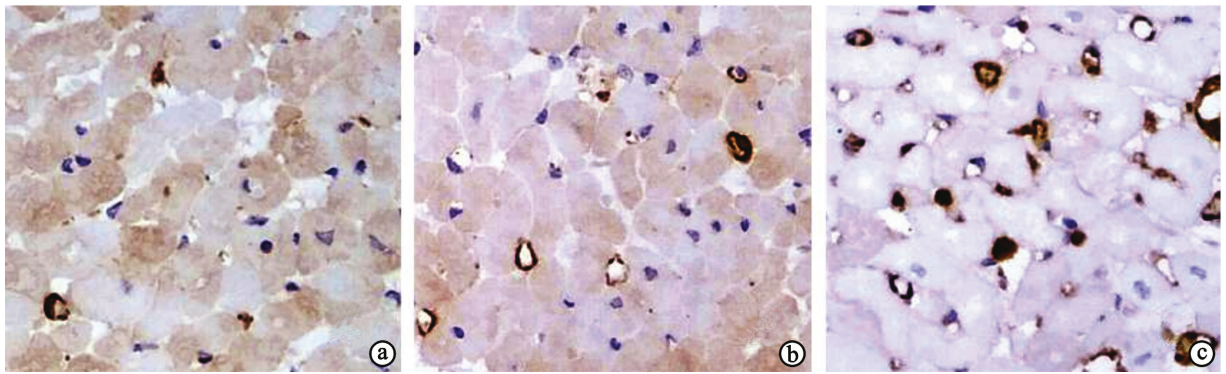
| 组别 | 只数 | 迁移能力 | | 粘附能力 | |
|-------|----|--------|-------------------------|------------|--------------------------|
| | | 训练前 | 训练后 | 训练前 | 训练后 |
| 假手术组 | 6 | 74 ± 7 | 77 ± 10 | 10.5 ± 1.5 | 11.3 ± 1.6 |
| 心肌缺血组 | 6 | 78 ± 9 | 130 ± 17 ^{abc} | 10.2 ± 1.5 | 17.5 ± 2.8 ^{ab} |
| PIT 组 | 6 | 75 ± 6 | 151 ± 16 ^{ab} | 11.3 ± 1.9 | 17.8 ± 2.8 ^{ab} |

注:与组内训练前比较,^a*P* < 0.05;与假手术组同时点比较,^b*P* < 0.01;与 PIT 组同时点比较,^c*P* < 0.05



注:a 可见细胞结合了 FITC-UEA-1,显示为绿色;b 可见细胞吞噬了 Dil-ac-LDL,显示为红色;c 可见双阳性细胞正在分化的 EPCs,既显示红色又显示绿色

图 2 EPCs 的鉴定



注:a 为假手术组;b 为心肌缺血组;c 为 PIT 组
图 3 3 组新西兰兔训练后缺血心肌处毛细血管密度(CD₃₁染色, ×200)

三、3 组新西兰兔 EPCs 迁移能力比较

训练前,假手术组、心肌缺血组和 PIT 组 EPCs 迁移细胞数量分别为(77 ± 10)个/高倍视野,(84 ± 11)个/高倍视野,(81 ± 13)个/高倍视野,组间差异无统计学意义($P > 0.05$);训练后,PIT 组[(151 ± 16)个/高倍视野]与心肌缺血组[(130 ± 17)个/高倍视野]迁移的细胞数与组内训练前和假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

四、3 组新西兰兔 EPCs 数量的比较

训练前,假手术组、心肌缺血组和 PIT 组的 EPCs 分别为(0.014 ± 0.008)%、(0.016 ± 0.009)%和(0.012 ± 0.006)% ,组间差异无统计学意义($P > 0.05$);训练后,PIT 组[(0.046 ± 0.007)%]和心肌缺血组[(0.038 ± 0.016)%]的 EPCs 与组内训练前和假手术组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);且 PIT 组训练后与心肌缺血组训练后比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

五、3 组新西兰兔心肌毛细血管密度的比较

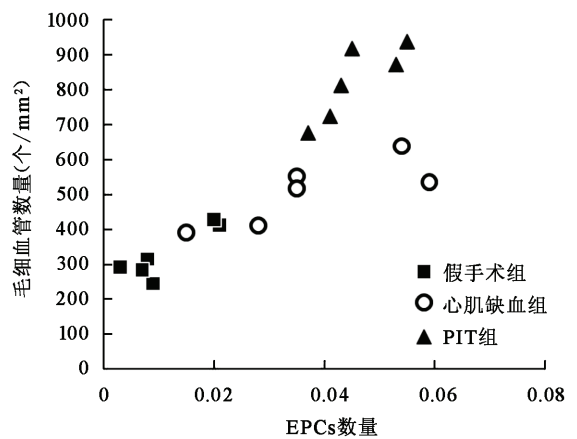
训练后,同假手术组比较,PIT 组和心肌缺血组均能显著提高缺血心肌处毛细血管密度($P < 0.01$),且以心肌缺血组缺血心肌处的毛细血管密度提高程度最为显著($P < 0.05$),如图 3 所示。

六、外周血中 EPCs 数量同心肌局部毛细血管密度的相互关系

Pearson 相关分析显示,训练 4 周后,在心肌缺血组和 PIT 组中,外周血 EPCs 同缺血心肌处的毛细血管密度呈正相关(图 4)。

讨 论

在缺血性心脏病的治疗中,应用干细胞进行血管生成的治疗是挽救缺血组织的一种有效方式。EPCs 作为血管内皮细胞的前体细胞,体内和体外实验均证实了其可以分化为血管内皮细胞,形成新生血管,从而



注:心肌缺血组 $r = 0.812, P < 0.05$; PIT 组 $r = 0.844, P < 0.05$

图 4 外周血中 EPCs 与缺血心肌处毛细血管密度的相关性比较

起到改善血流灌注和保护组织的功能^[2]。

有氧运动作为非药物心血管干预的一种重要手段,可以改善缺血性心脏病患者的焦虑情绪、提高患者的活动耐力。研究显示,有氧运动训练还可以动员干细胞、改善心肌灌注,提高心脏功能^[3]。但是由于引起干细胞动员的有氧运动其运动强度大,需要 70% 至 80% 的最大摄氧量,容易引起心血管事件,临床应用受到一定的限制^[4]。

PIT 是本课题组首先提出的一项安全的缺血运动训练模式,旨在避免高强度有氧运动导致的心血管不良事件。PIT 通过电刺激诱导正常骨骼肌反复进行等长收缩,产生可控的可逆性缺血^[5-8]而不增加血压和心率。

正常的生理状态下,骨髓中的干细胞大部分处于静止期,外周血中的干细胞数目较少。利用粒细胞集落刺激因子或者组织损伤如心肌梗死、脑缺血、肾脏损伤、肝脏损伤、血管损伤等情况下,可动员骨髓中的干细胞进入外周血,导致外周血中的干细胞数目明显增加。此即为干细胞的动员^[9]。归巢是指自体或外源性

干细胞在多种因素作用下,定向趋向性迁移,越过血管内皮细胞至靶向组织并定植存活的过程^[10]。

本研究结果显示,PIT 可促进 EPCs 的动员和归巢。数据显示,PIT 后,动物体内的 EPCs 数量与假手术组和单纯心肌缺血组训练后比较,均明显增加。迁移和粘附实验也表明,PIT 能够增加 EPCs 的迁移能力和粘附能力,有利于 EPCs 的动员和归巢,同时研究结果表明,PIT 对于 EPCs 的细胞周期却无影响。训练后,与假手术组比较,PIT 组和心肌缺血组的毛细血管密度均出现增加,并且以 PIT 组增加更为明显。相关性分析表明,缺血心肌处的毛细血管密度同外周血中的 EPCs 数量呈正相关,说明 PIT 可通过增加外周血中 EPCs 来增加缺血心肌处的新生毛细血管。

由于本研究为动物研究,采用坐骨神经植入电极,通过电刺激产生 PIT,这在临床上应用有一定困难。故而课题组正在采用上肢抓握产生缺血性等长收缩的方式^[11],此类研究尚在进行中。

本实验进行 PIT 时,骨骼肌产生等长收缩,当肌内压接近和超过动脉压时,穿行于肌肉内的血管受压,引起不同程度的血流阻断,产生暂时的可逆性骨骼肌缺血。

有研究证明,组织的缺血缺氧是动员骨髓 EPCs 最主要的信号,其可通过上调 VEGF 和骨髓中基质金属蛋白酶的分泌,来增加外周血中 EPCs 的数量^[12]。EPCs 进入缺血部位,进行定位、黏附、分化和增殖,转化为血管内皮细胞形成血管新生^[1]。其中低氧环境下产生的低氧诱导因子是一个关键的转录因子,其与靶基因的缺氧应答元件结合,可激活多种靶基因的转录^[13],使组织细胞适应此种缺氧环境。相关研究证实,如果 EPCs 对低氧诱导因子的反应低下,会导致 EPCs 的迁移能力的下降和缺血局部毛细血管形成的障碍^[14]。

本研究侧重 PIT 对 EPCs 活性的影响,对于低氧诱导因子与 EPC 的相互关系及分子调控机制研究还有待于进一步深入。本研究以兔为模型,发现生理性缺血性训练可以增加兔心肌缺血模型内皮祖细胞的动员,从而增加缺血心肌处血管新生。该研究结果为临床心肌缺血性疾病的治疗提供了一种新的治疗思路,有望在药物应用同时,协助延缓获逆转病情向心肌梗死发

展的进程,减轻病变,保持心功能,延长寿命,提高生活质量。

参 考 文 献

- [1] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res*, 1999, 85: 221-228.
- [2] Garmy-Susini B, Varner JA. Circulating endothelial progenitor cells. *Br J Cancer*, 2005, 93: 855-858.
- [3] Rehman J, Li J, Parvathaneni L, et al. Exercise acutely increases circulating endothelial progenitor cells and monocyte-/macrophage-derived angiogenic cells. *J Am Coll Cardiol*, 2004, 43: 2314-2318.
- [4] Walther C, Adams V, Bothur I, et al. Increasing physical education in high school students; effects on concentration of circulating endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2008, 15: 416-422.
- [5] Shen M, Gao J, Li J, et al. Effect of ischaemic exercise training of a normal limb on angiogenesis of a pathological ischaemic limb in rabbits. *Clin Sci (Lond)*, 2009, 117: 201-208.
- [6] Wan C, Li J, Yi L. Enhancement of homing capability of endothelial progenitor cells to ischaemic myocardium through physiological ischaemia training. *J Rehabil Med*, 2011, 43: 550-555.
- [7] Lin A, Li J, Zhao Y, et al. Effect of physiologic ischemic training on protection of myocardial infarction in rabbits. *Am J Phys Med Rehabil*, 2011, 90: 97-105.
- [8] 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. *中华物理医学与康复杂志*, 2010, 32: 13-16.
- [9] 李雅彬, 唐俊明. 基质细胞衍生因子-1 的介导机制及心血管疾病干细胞治疗. *国际心血管病杂志*, 2010, 37: 45-48.
- [10] 马绍华, 浦波, 舒钧. 间充质干细胞归巢的研究进展, 医学综述, 2011, 17: 507-510.
- [11] Lin S, Lu X, Chen S, et al. Human coronary collateral recruitment is facilitated by isometric exercise during acute coronary occlusion. *J Rehabil Med*, 2012, 44: 691-695.
- [12] 张美华, 张艳萍, 盖凌, 等. 内皮祖细胞临床应用的研究进展. *国际病理科学与临床杂志*, 2012, 32: 356-360.
- [13] 邹志兵, 毛淑章, 郑澜. 低氧训练大鼠骨骼肌组织低氧诱导因子 1 对血管新生的影响. *中国组织工程研究*, 2012, 16: 3654-3659.
- [14] Chang EI, Loh SA, Ceradini DJ, et al. Age decreases endothelial progenitor cell recruitment through decreases in hypoxia-inducible factor 1 α stabilization during ischemia. *Circulation*, 2007, 116: 2818-2829.

(修回日期:2013-07-19)

(本文编辑:阮仕衡)

欢迎订阅 《中华物理医学与康复杂志》