

文章编号 1006-8147(2019)05-0459-04

论 著

间歇性低氧干预提高心肌梗大鼠心功能和运动耐量

徐凯月,孟祥雪,黄 传,史 昱,万春晓

(天津医科大学总医院康复医学科,天津 300052)

摘要 目的:观察4周间歇性低氧(IH)干预对心肌梗(MI)大鼠心功能及运动耐量的影响。方法:28只雄性SD大鼠随机分为4组:空白组(Sham)、空白低氧组(Sham-IH)、心肌梗组(MI)和心肌梗低氧组(MI-IH)。低氧组放入低氧仓(模拟海拔5 000 m,氧浓度13%),每天4 h。对照组置于常氧环境中。干预4周后检测心肌AMPK表达,梗死面积比例,左心室射血分数和运动耐量。结果:同MI组比较,MI-IH组(1)梗死面积比例减少($P<0.001$);(2)左心室射血分数增加($P<0.001$);(3)运动耐量增加($P<0.001$);(4)AMPK表达增加($P<0.05$)。结论:4周间歇性低氧干预能提高心功能和运动耐量,可能与心肌AMPK表达增加有关。

关键词 间歇性低氧;心肌梗死;心功能;运动耐量;AMPK

中图分类号 R54

文献标志码 A

Intermittent hypoxia intervention improves cardiac function and exercise tolerance of rats with myocardial infarction

XU Kai-yue, MENG Xiang-xue, HUANG Chuan, SHI Yu, WAN Chun-xiao

(Department of Physical and Rehabilitation Medicine, General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China)

Abstract Objective: To explore the effects of four-week intermittent hypoxia (IH) intervention on cardiac function and exercise tolerance in rats with myocardial infarction (MI). **Methods:** Twenty-eight male SD rats were randomly divided into four groups: Sham group, Sham-IH group, MI group and MI-IH group. The IH groups were placed in the hypoxic chamber (simulates 5 000 m altitude, 13% oxygen concentration), at 4 h/d. The control groups were placed in normal environment. The AMPK expression, infarct size ratio, left ventricular ejection fraction and exercise tolerance were measured after 4-week intervention. **Results:** Compared with MI group, MI-IH group showed (1) decreased infarct size ratio ($P<0.001$); (2) increased left ventricular ejection fraction ($P<0.001$); (3) increased the exercise tolerance ($P<0.001$); (4) increased the expression of AMPK ($P<0.05$). **Conclusion:** 4-week IH intervention can improve cardiac function and exercise tolerance in rats with MI, which may be related to AMPK elevation.

Key words intermittent hypoxia; myocardial infarction; cardiac function; exercise tolerance; AMPK

心血管疾病已成为威胁人类生存的重大疾病之一。尽管心血管疾病的治疗技术不断发展,但心肌梗死及其后的心力衰竭仍是现代社会心血管疾病死亡的主要原因^[1]。2013年美国心脏协会数据统计,全美每天有至少2 200人死于心血管疾病。心肌梗死后会引起心肌纤维化,心脏收缩功能下降,心室扩张^[2],导致心脏功能减退,影响生存质量。因此,梗死后的心肌保护,对于梗死后人群提高心脏功能和改善生存质量具有重要意义。

心脏康复作为心血管疾病治疗中药物和手术的有效补充,在改善心脏功能方面得到广泛认可^[3]。近年来,间歇性低氧干预在基础研究中得到关注,大量实验证明其能有效保护缺血再灌注大鼠的心

肌,改善心脏功能^[4],但对于梗死后存活心肌的影响以及相关分子机制尚不明确。相关研究发现腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)在适应低氧和缺血应激的过程中发挥关键作用^[5]。一方面,激活的AMPK可以通过抑制肿瘤坏死因子(TNF- α),减少细胞色素C和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3的释放,从而减少细胞凋亡^[6],降低心肌纤维化,减少梗死面积^[7];另一方面,可以通过增加葡萄糖的摄取^[8],从而促进骨骼肌收缩,提高运动耐量^[9]。因此,AMPK能在保护心肌细胞、提高运动耐量等方面发挥重要作用。但间歇性低氧干预与AMPK的相关研究甚少,本实验拟通过构建大鼠心肌梗模型进行间歇性低氧干预,观察AMPK表达及心功能和运动耐量变化关系,旨在探究间歇性低氧干预对梗死后心肌的影响以及分子机制,从而拓展心脏康复方案。

基金项目 天津市卫生局2016年重点发展项目(16KJ122),天津市自然科学基金重点项目(18JCZDJC98900)

作者简介 徐凯月(1994-),女,硕士在读,研究方向:心脏康复;通信作者:万春晓,E-mail:wxc2226@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 28 只成年雄性 SD 大鼠, 体质量 220~250 g, 购于北京华阜通有限公司。饲养地点为天津医科大学总医院动物实验室, 室温为 $(23\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 $50\%\pm 10\%$, 昼夜节律为 12 h 明暗循环。无菌饲料喂养, 动物自由获取食物和水。

1.1.2 主要试剂 MASSON 三色染色试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司, 型号 G1340); HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (美国 Abcam 公司); HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (美国 Abcam 公司)。

1.1.3 主要仪器 小动物人工呼吸机 (安徽省淮北正华生物仪器设备有限公司, 型号 DW3000); 有机玻璃动物低氧仓 (山东烟台宏远氧业有限公司, 型号 DS-3); 动物实验跑台 (北京众实迪科技发展有限公司, 型号 ZS-PT); 超声仪 (加拿大 Visualsonics Inc 公司, 型号 Vevo770)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 按照随机数字表法将大鼠随机分为空白组 (Sham, $n=6$)、空白低氧组 (Sham-IH, $n=6$)、心梗组 (MI, $n=8$)、心梗低氧组 (MI-IH, $n=8$)。

1.2.2 动物模型制备 大鼠腹腔麻醉注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 后取仰卧位, 使用小动物呼吸机辅助呼吸, 对大鼠进行口腔插管, 保持呼吸节律与呼吸机模式一致。备皮, 胸骨左缘扪及心脏搏动处纵行切开皮肤约 3 cm, 逐层钝性分离, 于第四肋间开胸, 暴露心脏、血管。在肺动脉圆锥和左心耳之间, 以左冠状静脉主干为标志, 以 6/0 缝线于左心耳根部下方 2 mm 处进针, 进针深度 0.5 mm, 术中心肌颜色变白, 心电图 II 导联显示 ST 段升高 $> 0.1\text{ mV}$ 以上, 确认为心肌缺血。待心电图 ST 段抬高稳定 10 min 后, 予以结扎。空白组大鼠以同样方法暴露心脏, 但不进行左冠状动脉前降支的结扎。

1.2.3 干预方法 术后 1 周进行干预, 将 Sham-IH 组和 MI-IH 组放入动物低氧仓内, 模拟海拔 5 000 m、氧浓度 13% 的低氧环境。每天干预 4 h, 每周 5 d, 共干预 4 周。Sham 组和 MI 组放于常氧环境中, 干预时间与低氧组相同。

1.2.4 运动耐量 干预 4 周后, 将各组大鼠放于 15° 倾斜的跑台上, 起始速度为 6 m/min, 每 3 min 速度增加 3 m/min, 至大鼠力竭为止, 跑动的总距离作为大鼠的运动耐量^[10]。

1.2.5 超声检查 分别在术后 1 周和干预 4 周后对各组大鼠行心脏超声检查, 以 Sham 组大鼠为对照, 使用 M 模块采集左心室射血分数, 数值取测量

3 个心动周期的平均值。

1.2.6 免疫组织学染色 处死动物, 取下心脏, 生理盐水反复冲洗。在心脏结扎点至心尖部位取约厚度 3 mm 的横截面, 置 10% 的福尔马林中固定。包埋制备石蜡切片, 切成厚度 $7\text{ }\mu\text{m}$ 石蜡切片, 脱水并进行 MASSON 染色。胶原纤维成分呈蓝色, 正常心肌呈红色。采用 Image J 图像采集软件计算心肌梗死面积所占比例 (蓝色部分面积/蓝色+红色部分的总面积) 并进行统计学分析。

1.2.7 Western blot 法检测 提取心肌组织蛋白, 冰上裂解并离心, 取上清液存于 EP 管中。BCA 法测定蛋白浓度, 加裂解液保存于 -80°C 冰箱备用。配制不同浓度的浓缩胶, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 电泳结束后转至 PVDF 膜上。TBST 清洗, 并用牛奶封闭 2 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 慢摇过夜孵育一抗, 清洗后室温慢摇 1 h 孵育二抗。ECL 化学发光试剂盒显色, 并用 Image J 分析软件进行光密度值计算。

1.3 统计学处理 所有数据采用统计软件 SPSS22.0 和 GraphPad Prism 6.0 软件处理, 并以 $\bar{x}\pm s$ 表示。统计方法采用单因素方差分析及组间比较。 $P<0.05$ 认为具有统计学显著差异。

2 结果

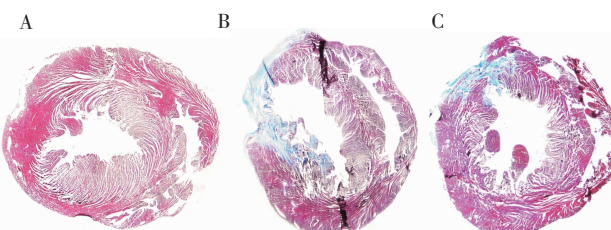
2.1 免疫组织学染色比较 如表 1 所示, 与 MI 组相比, 干预 4 周后 MI-IH 组的梗死面积比例明显下降 ($P<0.001$) (图 1)。

表 1 各组大鼠的心梗面积比例结果比较 ($\bar{x}\pm s, \%$)

Tab 1 Comparison of infarct size ratio between groups ($\bar{x}\pm s, \%$)

组别	<i>n</i>	心梗面积比例
Sham	6	0
Sham-IH	6	0
MI	8	25.78 ± 3.74
MI-IH	8	$14.23\pm 0.95^{***}$

MI-IH 组与 MI 组比较, $***P<0.001$



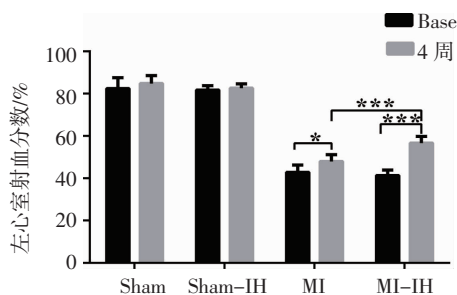
A. Sham 组; B. MI 组; C. MI-IH 组

图 1 干预 4 周后, 大鼠心脏石蜡切片 MASSON 染色 ($\times 40$)

Fig 1 MASSON staining of paraffin section for rats after four-week intervention ($\times 40$)

2.2 心脏超声检查结果比较 如图 2 所示, 干预 4 周后, MI-IH 组的左心室射血分数比干预前 (Base) 明

显著提高($P<0.001$),比4周MI组显著提高($P<0.001$),4周MI组比干预前也有提高($P<0.05$)。



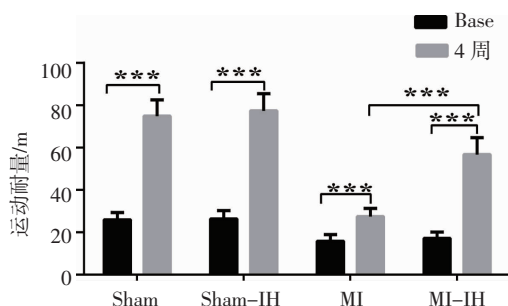
* $P<0.05$; *** $P<0.001$

图2 各组大鼠心脏超声检查结果

Fig 2 Results of cardiac ultrasound between groups

2.3 运动耐力比较 如图3所示,干预4周后,各组的运动耐力均较干预前(Base)有明显增高($P<0.001$),MI-IH组比MI组出现显著增高($P<0.001$)。

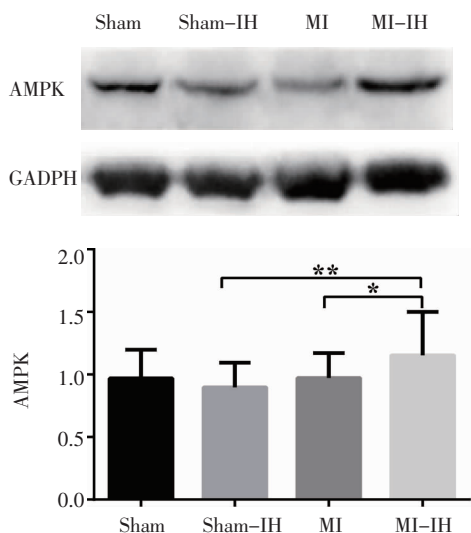
2.4 AMPK蛋白表达的影响 如图4所示,干预4周后,MI-IH组AMPK表达比MI组明显增加($P<0.05$),同时比Sham-IH组明显增加($P<0.01$)。



*** $P<0.001$

图3 各组大鼠运动耐力比较

Fig 3 Comparison of exercise tolerance between groups



* $P<0.05$; ** $P<0.01$

图4 各组大鼠AMPK蛋白的表达情况

Fig 4 The expressions of AMPK protein between groups

3 讨论

心肌梗死是当今世界主要的致死因素之一。随着现代科技的发展,药物和技术的开发应用以及管理模式的改进,梗死患者的死亡率显著下降^[1]。梗死后存活患者如何改善心脏功能,提高运动能力,以及预防再梗死和心血管事件,已经成为梗死后关注的主要内容。欧洲心脏病学会、美国心脏协会均将心脏康复列为心血管疾病治疗中最高级别I级推荐^[11]。心脏康复对于提高心脏和运动能力具有重要作用^[3]。在心脏康复研究中,间歇性低氧干预作为一种安全、无创、有效的方法,大多作为预处理手段应用于心肌缺血再灌注的研究中,发现可以减少氧化应激损伤和心肌梗死面积^[4,12]。但是对于梗死后心肌的影响鲜有研究。

本研究发现,心肌梗死后存活大鼠进行间歇性低氧干预可以显著减少梗死面积和提高左心室射血分数。梗死面积减少使存活心肌增加,能提高心肌收缩力,改善射血分数^[13]。射血分数是预测心肌梗死患者不良心血管事件和死亡率的重要指标^[14]。射血分数明显下降的心梗患者一年内的不良心血管事件发生率与死亡率比左心室功能正常的心梗患者显著升高^[15]。本研究通过心肌梗死面积比例和左室射血分数的变化,揭示了间歇性低氧干预对心肌梗死后大鼠的心脏保护作用。

运动耐力是体现机体活动能力的指标,对衡量心梗患者能否回归生活和工作具有重要意义^[16],同时也是预测心力衰竭和其他心血管疾病死亡率的重要因素^[17]。运动耐力的提高能有效预防心血管病人的心力衰竭^[18],提高患者的生活质量。美国一项长达19年的多中心临床试验发现,心肌梗死患者的死亡率的下降与运动耐力提高密切相关,运动耐力每增加1 MET,死亡率随之降低8%~14%^[19]。本研究显示4周干预后MI-IH组的运动耐力比干预前明显增加,同时比4周常氧干预的MI组明显增加,说明间歇性低氧干预有助于提高梗死后大鼠的活动能力,促进其更好地参与日常活动。

AMPK在控制炎症、调节能量代谢、保护心脏等方面发挥重要作用。相关研究发现,AMPK可以减少心肌细胞的凋亡^[20]。Kim等^[21]发现缺血再灌注小鼠模型心肌内激活的AMPK,可以减少梗死面积,产生心脏保护作用。本研究显示间歇性低氧干预4周后MI-IH组的AMPK蛋白表达明显增加,且研究中也证实了MI-IH组的心肌梗死面积比例减少,左室射血分数提高,提示梗死大鼠在间歇性低氧干预过程中,产生的梗死后心肌保护可能与心肌AMPK的增

加有关。

本研究通过4周的间歇性低氧干预,从AMPK蛋白表达、心梗面积比例、射血分数、运动耐量方面证明了间歇性低氧干预对心梗大鼠会产生有效的心脏保护作用,提高活动能力,这可能与心肌AMPK增加有关。由于间歇性低氧干预对心梗康复的作用机制极其复杂,本研究仅探讨了AMPK在心梗后心肌保护中的变化,对于AMPK上下游的信号通路变化未有进一步的探索,后续研究中将深入探讨,为临床上心梗患者的心脏康复提供新思路。

参考文献:

- [1] Writing Group Members, Mozaffarian D, Benjamin E J, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics -2016 update: a report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2016,133(4):447
- [2] Wan C X, Lan Y F, Jiang H, et al. Hypoxia training attenuates left ventricular remodeling in rabbit with myocardial infarction[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2014, 11(3):237
- [3] Buckley J P, Furze G, Doherty P, et al. BACPR scientific statement: British standards and core components for cardiovascular disease prevention and rehabilitation[J]. *Heart*, 2013, 99(15):1069
- [4] Gu S, Hua H, Guo X Q, et al. PGC-1 α participates in the protective effect of chronic intermittent hypobaric hypoxia on cardiomyocytes[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 50(5):1891
- [5] Zheng C, Lin J F, Lin Z H, et al. Sodium houthuyfonate alleviates post-infarct remodeling in rats via AMP-Activated protein kinase pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9:1092
- [6] Peng W, Zhang Y, Zhu W Z, et al. AMPK and TNF- α at the crossroad of cell survival and death in ischaemic heart[J]. *Cardio-vasc Res*, 2009,84(1):1
- [7] Castanares-Zapatero D, Bouleti C, Sommereyns C, et al. Connection between cardiac vascular permeability, myocardial edema, and inflammation during sepsis: role of the α (1)AMP-Activated protein kinase isoform[J]. *Crit Care Med*, 2013,41(12):E411
- [8] Hardie D G, Ross F A, Hawley S A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012,13(4):251
- [9] Campbell M D, Duan J, Samuelson A T, et al. Improving mitochondrial function with SS-31 reverses age-related redox stress and improves exercise tolerance in aged mice[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 134:268
- [10] Moreira J B, Bechara L R, Bozi L H, et al. High- versus moderate-intensity aerobic exercise training effects on skeletal muscle of infarcted rats[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2013,114(8):1029
- [11] Roger V L, Go A S, Lloyd-Jones D M, et al. Heart disease and stroke statistics --2012 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2012,125(1):e2
- [12] Lien C F, Lee W S, Wang I C, et al. Intermittent hypoxia-generated ROS contributes to intracellular zinc regulation that limits ischemia/reperfusion injury in adult rat cardiomyocyte[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018,118:122
- [13] Van Hout G P, Teuben M P, Heeres M, et al. Invasive surgery reduces infarct size and preserves cardiac function in a porcine model of myocardial infarction[J]. *J Cell Mol Med*, 2015,19(11):2655
- [14] Dagres N, Hindricks G. Risk stratification after myocardial infarction: is left ventricular ejection fraction enough to prevent sudden cardiac death[J]. *Eur Heart J*, 2013,34(26):1964
- [15] Perelshtein Brezinov O, Klempfner R, Zekry S B, et al. Prognostic value of ejection fraction in patients admitted with acute coronary syndrome: a real world study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017,96(9):e6226
- [16] Kato M, Kubo A, Nihei F, et al. Effects of exercise training on exercise capacity, cardiac function, BMI, and quality of Life in patients with atrial fibrillation: a meta-analysis of randomized-controlled trials[J]. *Int J Rehabil Res*, 2017,40(3):193
- [17] Reibis R K, Treszl A, Wegscheider K, et al. Exercise capacity is the most powerful predictor of 2-year mortality in patients with left ventricular systolic dysfunction[J]. *Herz*, 2010,35(2):104
- [18] Papasavvas T, Alhashemi M, Micklewright D. Association between depressive symptoms and exercise capacity in patients with heart disease: a meta-analysis[J]. *J Cardiopulm Rehabil Prev*, 2017, 37(4):239
- [19] Myers J, Prakash M, Froelicher V, et al. Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing[J]. *N Engl J Med*, 2002, 346(11):793
- [20] Ma X W, Fu Y N, Xiao H, et al. Cardiac fibrosis alleviated by exercise training is AMPK-Dependent[J]. *PLoS One*, 2015,10(6):e0129971
- [21] Kim A S, Miller E J, Wright T M, et al. A small molecule AMPK activator protects the heart against ischemia-reperfusion injury[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 51(1):24

(2018-12-18 收稿)