文章编号:1000-5404(2006)06-0573-04

论著

肺气肿兔膈肌力学模式对慢性超低频复合生理频率电刺激的适应性改变

李香彭,李军梅,刘 刚 (第三军医大学西南医院呼吸内科,重庆 400038)

提 要: 目的 研究不同频率慢性电刺激(CES)后肺气肿模型兔膈肌力学模式适应性变化,以了解慢性超低频电刺激对肺气肿兔膈肌力学特征的影响。**方法** 采用木瓜蛋白酶雾化吸入法建立兔肺气肿模型;测定正常对照组、肺气肿组和肺气肿CES组膈肌颤搐收缩张力(Pt)、强直颤搐收缩张力(Po)、峰值张力时间(TPT)、1/2松弛时间(1/2Rt)、疲劳指数(FI)和疲劳恢复指数(FRI)。**结果** ①同正常对照组比较,肺气肿组Pt、Po降低($P<0.01$),TPT、1/2Rt延长($P<0.01$),FI、FRI增加($P<0.01$)。②同肺气肿组比较,40 Hz和(2.5+40) Hz组Pt、Po明显增加($P<0.01$),TPT、1/2Rt明显缩短($P<0.01$),10 Hz组结果则相反($P<0.05$)。40 Hz、(2.5+40) Hz、10 Hz组FI、FRI明显下降($P<0.01$)。③(2.5+40) Hz组与40 Hz组比较,Pt、Po、TPT、1/2Rt无显著统计学差异($P>0.05$),FI、FRI下降($P<0.01$)。**结论** 超低频复合生理频率慢性电刺激[(2.5+40)Hz]可显著提高肺气肿兔的膈肌收缩力,较生理频率慢性电刺激(40 Hz)能使肺气肿兔膈肌抗疲劳能力得到更明显的提高。

关键词: 肺气肿; 膈肌; 慢性电刺激; 频率; 力学
中图法分类号: R322.1;R337.5;R563.302 **文献标识码**: A

Adaptation of emphysema rabbit diaphragm muscle mechanics to chronic ultra-low frequency electrical stimulation and chronic physiological frequency electrical stimulation

LI Xiang-peng, LI Jun-mei, LIU Gang (Department of Respiratory Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of chronic ultra-low frequency electrical stimulation on mechanical characteristic of diaphragmatic muscle of emphysema rabbit. Methods The rabbit model of emphysema was made by inhaling papain of ultrasonic atomization once a week for 3 weeks in 24 adult Japanese rabbits, 6 receiving 10 Hz chronic ultra-low frequency electrical stimulation, 6 receiving 40 Hz, 6 receiving 2.5 Hz and 40 Hz. Another 6 rabbits served as control. The twitch tension (Pt), titanic tension (Po), time to peak tension (TPT), half-relaxation time (1/2RT), fatigue index (FI) and fatigue recovery index (FRI) were measured in control group, emphysema group, emphysema + chronic ultra-low frequency electrical stimulation groups. Results As compared with the control rabbits, Pt and Po decreased, TPT and 1/2RT prolonged, FI and FRI increased in the only emphysema rabbits. Pt and Po were higher, TPR and 1/2Rt was shorter in the only emphysema rabbits than the rabbits in 40 Hz and (2.5+40) Hz groups ($P<0.01$), but completely opposite effect was observed in the rabbits in 10 Hz group ($P<0.05$). There was more significant decrease in FR and FRI in the rabbits in (2.5+40) Hz, 40Hz and 10 Hz groups than that in only emphysema group ($P<0.01$). No significant difference in Pt, Po, TPT, 1/2Rt ($P>0.05$), more increase in FR and FRI ($P<0.01$) in the rabbits in (2.5+40) Hz group than that in 40Hz group. Conclusion The resistance to diaphragm muscle fatigue was better improved in the combination of chronic ultra-low frequency electrical stimulation and chronic physiological frequency electrical stimulation (2.5+40) Hz than that of chronic physiological frequency electrical stimulation (2.5 Hz).

Key words: emphysema; diaphragm muscle; chronic electrical stimulation; frequency; mechanics

作者简介:李香彭(1972-),男,河北省万全县人,硕士研究生,主治医师,主要从事呼吸内科疾病方面的研究。电话:(023)68754115
通讯作者:刘 刚,电话:(023)68754115,E-mail:liugang6399@sohu.com
收稿日期:2005-12-08;**修回日期**:2006-01-20

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary diseases, COPD)是呼吸系统常见病、多发病,迄今国内外对本病的治疗尚缺乏有效的方法。目前,许多研究关注于控制肺气肿的病情发展[1-4],尤其是肺气肿的膈肌功能障碍,认为膈肌无力或疲劳是呼吸衰竭发病过程中的重要环节。现临床常用生理频率(40 Hz)慢性电刺激(chronic electrical stimulation, CES)对COPD患者进行膈肌康复治疗,取得一定疗效,但40 Hz是否为治疗COPD的最佳频率尚不明确,关于不同频率CES后肺气肿膈肌力学特征的适应性变化亦少见报道。为此,本实验观察不同频率CES后肺气肿兔模型膈肌力学模式的变化,旨在为CES对COPD患者膈肌康复治疗的最佳频率选择提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

Rm6240多道生理信号采集处理系统(由放大器、记录仪、刺激器和示波器组成,成都仪器厂),肌张力传感器(成都仪器厂),超声雾化器,木瓜蛋白酶(广州华美生物工程公司)。成年日本大白兔(雌雄不拘)30只,由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 兔肺气肿模型的制备 成年日本大白兔(雌雄不拘)24只,体质量2.0~2.5 kg,经自制雾化箱吸入5 g/L木瓜蛋白酶50 ml,雾化颗粒直径在5 μm以下占90%以上。50 ml大约4 h雾化完,每周1次,共3次,末次雾化1个月后作为肺气肿模型动物。正常兔6只作对照组。

1.2.2 动物分组和CES兔模型的制备 肺气肿模型兔用随机数字表随机分为4组,分别为肺气肿组、10 Hz慢性低频电刺激(CLFES)组、40 Hz慢性生理频率电刺激(CPFES)组和(2.5+40)Hz慢性超低频复合生理频率电刺激(CULFES+CPFES)组,每组6只。CES组兔用25%乌拉坦(1 g/kg)经耳缘静脉注射麻醉,常规消毒手术区后,在颈部、胸部分别切开皮肤1~1.5 cm,钝性分离皮下组织,将铂金刺激电极置于颈部膈神经上,无关电极置于胸部皮下,电极导线从皮下潜行至颈后皮肤切口处引出、固定。电极呈圆形,约0.56 cm^2。术后1周采用自行研制的变频电刺激仪进行CES。各CES组选择相应的刺激频率[10、40 Hz和(2.5+40)Hz],刺激次数为45次/min,波宽0.3 ms,输出电压10~20 V,调节到胸腹最佳运动为标准。对照组不刺激。刺激时间为:2×2 h/d,上下午各1次,6 d/周,共5周。

1.2.3 兔膈肌力学测定指标 25%乌拉坦(1 g/kg)耳缘静脉注射麻醉,麻醉平稳后气管切开,插管,行持续性机械通气术。切开腹部,暴露膈肌,在左侧膈腰部1/2处肋膈肌与脚膈肌交接部位连接肌张力传感器,沿肌纤维方向向肋端约1 cm处放置两不锈钢针状电极(相距约0.3 cm)。肌张力传感器连接Rm6240多道生理信号采集处理系统,信号放大、记录。分别测定Pt、TPT、1/2Rt、Po、FI和FRI。以第1次强直颤搐收缩张力(F_1)减去160次强直颤搐收缩张力(F_{160})的值除以F_1为FI,即$FI=(F_1-F_{160})/F_1$;以F_1减去疲劳后恢复30 min再测定的第1次强直颤搐收缩张力(F_1')的值,除以F_1为FRI,即$FRI=(F_1-F_1')/F_1$。

1.2.4 兔肺气肿病理标本的制备及观察 肺气肿模型动物测定完膈肌力学指标后处死,开胸,游离气管,取肺,在25 cmH_2O压力下,经气管灌注10%甲醛,固定肺脏30 min,然后在10%甲醛中固定24 h。分别在左、右肺取材,切片,脱水,埋蜡,HE染色,光镜观察。

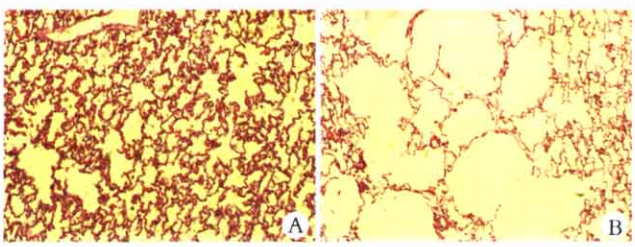
1.3 统计学分析

结果以$\bar{x}\pm s$表示,用SPSS 11.0软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 肺气肿模型动物肺组织的形态学变化

光镜下正常肺组织可见支气管、肺泡和肺血管结构正常(图1A)。模型兔肺组织可见肺组织稀疏,肺泡间隔变窄,其内毛细血管受压,部分肺泡间隔断裂消失,由若干肺泡融合形成肺大泡,呈典型肺气肿病理表现(图1B)。



A:正常兔;B:模型兔

图1 兔肺组织的光镜观察 (HE×40)

2.2 CES后兔膈肌收缩力学参数变化(表1)

2.2.1 兔膈肌收缩张力的比较 肺气肿组颤搐收缩张力(Pt)、强直颤搐收缩张力(Po)均较正常对照组明显减低($P<0.01$);CULFES+CPFES组和CPFES组与肺气肿组比较,Pt、Po均明显提高($P<0.01$),二组之间收缩张力无显著性差异($P>0.05$);CLFES组与肺气肿组比较,Pt、Po降低($P<0.05$)(图2)。

2.2.2 兔膈肌收缩、舒张时间的比较 与正常对照组比较,肺气肿组峰值张力时间(TPT)、1/2松弛时间(1/2Rt)延长($P<0.01$);CULFES+CPFES组和CPFES组与肺气肿组比较,TPT、1/2RT均明显缩短($P<0.01$),二组之间收缩、舒张时间无显著性差异($P>0.05$);CLFES组与肺气肿组比较,TPT、1/2RT延长($P<0.05$)(图3)。

表 1　不同频率慢性电刺激后肺气肿兔膈肌力学参数变化（$\bar{x} \pm s, n=6$）

组别	膈肌力学参数					
	Pt(g)	TPT(s)	1/2RT(s)	Po(g)	FI	FRI
正常对照组	1.97 ±0.20	0.30 ±0.04	0.19 ±0.02	6.23 ±0.40	0.31 ± 0.02	0.22 ±0.01
肺气肿组	1.11 ± 0.09[ac]	0.51 ±0.03[a]	0.36 ±0.04[ac]	3.39 ±0.30[ac]	0.51 ± 0.02[ac]	0.46 ± 0.01[ac]
10 Hz 组	0.83 ± 0.10[ac]	0.59 ±0.05[ac]	0.51 ±0.04[ac]	2.78 ±0.23[ac]	0.36 ± 0.02[a]	0.28 ± 0.03[a]
40 Hz 组	1.57 ± 0.08[a]	0.37 ±0.03[b]	0.24 ±0.02[b]	5.43 ±0.26[a]	0.41 ± 0.01[ac]	0.35 ± 0.01[ac]
(2.5 +40) Hz 组	1.49 ±0.07[a]	0.42 ±0.02[a]	0.28 ±0.03[a]	5.00 ±0.33[a]	0.35 ±0.01[a]	0.26 ±0.01[a]

a：$P<0.01$，b：$P<0.05$，与正常对照组比较；c：$P<0.01$，与(2.5 +40) Hz 组比较

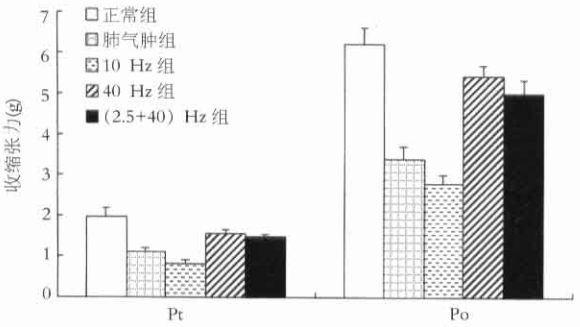


图 2　不同频率慢性电刺激对肺气肿兔膈肌收缩张力的影响

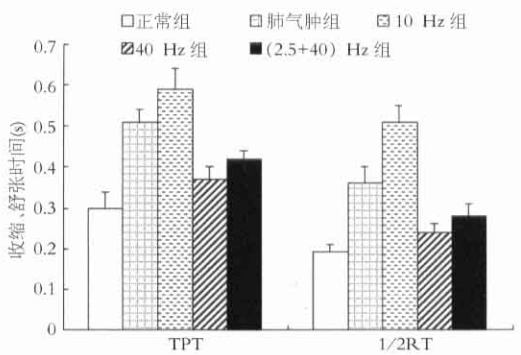


图 3　不同频率慢性电刺激对肺气肿兔膈肌收缩、舒张时间的影响

2.2.3　兔膈肌耐疲劳能力的比较　　与正常对照组比较，肺气肿组疲劳指数（FI）、疲劳恢复指数（FRI）增高（$P<0.01$）；CULFES + CPFES 组、CLFES 组和 CPFES 组与肺气肿组比较，FR、FRI 下降（$P<0.01$），前两组较后组下降更加明显（$P<0.01$），但两组之间抗疲劳能力无显著性差异（$P>0.05$）（图 4）。

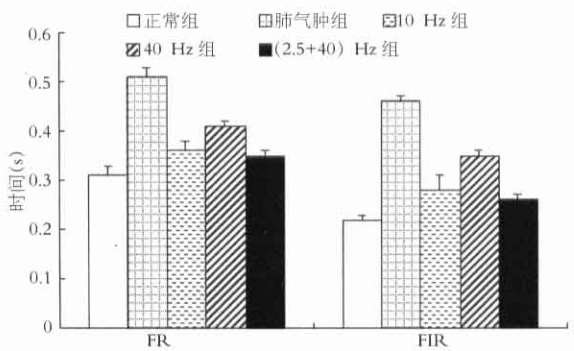


图 4　不同频率慢性电刺激对肺气肿兔膈肌耐疲劳能力的影响

3　讨论

膈肌功能减退是慢性阻塞性肺疾病（COPD）的显著病理特征之一，临床常采用体外膈肌起搏（EDP）通过对膈神经进行慢性电刺激以改善膈肌功能。膈肌起搏的应用缘于膈肌对电刺激的适应性变化与骨骼肌相似的实验基础，不同频率的电刺激可使骨骼肌结构、代谢及功能发生不同的变化。膈肌属于骨骼肌，CES 后可产生与骨骼肌类似的适应性变化。

本实验结果显示，肺气肿兔膈肌较正常兔膈肌 Pt、Po 降低，FI、FRI 增加，TPT、1/2RT 延长，肌肉收缩力量和速度明显下降，耐疲劳能力差。近年研究表明[5,6]，COPD 患者在轻、中度时其膈肌Ⅰ、Ⅱ型纤维萎缩，重度者则表现为Ⅰ型纤维比例增加，膈肌收缩功能受损，蛋白降解增加，对 Ca^{2+} 敏感性降低，横桥周期性的运动减慢。本实验中肺气肿兔膈肌力学特征与之相符。

CPFES 和 CULFES + CPFES 后肺气肿兔膈肌 Pt、Po 增加，膈肌收缩力提高；TPT、1/2RT 缩短，膈肌收缩、舒张速度加快；FI、FRI 降低，膈肌耐疲劳能力增加、疲劳恢复时间缩短，总的效应是肺气肿膈肌收缩力增强及耐疲劳能力提高，但 CULFES + CPFES 组 FI、FRI 较 CPFES 组 FI、FRI 下降更加明显，抗疲劳能力得到更明显的增强。CPFES 可以使萎缩的膈肌运动单位重新募集，各类型纤维功能增强，即使膈肌行使其正常生理职责，同时保持了肌纤维比例的相对正常。这与本实验 CPFES 后肺气肿膈肌的功能改善相一致。CULFES + CPFES 不仅具有生理频率电刺激的效应，而且肺气肿膈肌耐疲劳能力较单纯生理频率电刺激增强。这可能与超低频电刺激使膈肌Ⅱ_B型纤维向Ⅱ_A型纤维转化有关。膈肌由两种肌纤维组成：Ⅰ型纤维称慢性收缩氧化型纤维，以有氧氧化方式获能，有耐疲劳的特点，但肌力较弱。Ⅱ型纤维又分为Ⅱ_A、Ⅱ_B两型。

Ⅱ_A型称快收缩氧化糖酵解型纤维，以有氧氧化和糖酵解两种方式获能，收缩速度较快，不易疲劳；Ⅱ_B型称快收缩糖酵解纤维，以无氧糖酵解途径获取能量，收缩速度快，肌张力高，但易疲劳。近年研究表明[7,8]，2.5 Hz的持续性超低频电刺激可引起骨骼肌Ⅱ_B型纤维向Ⅱ_A型纤维转化，少部分转化为Ⅰ型纤维，并伴有相应的MHC亚型合成的改变，肌肉组织血液灌注和氧分压均增高，既增强了肌肉耐疲劳能力，又对其收缩功能影响较小。CULFES可能使膈肌产生同样的变化，即Ⅱ_B型纤维向Ⅱ_A型纤维转化。Ⅱ_A型纤维比例增高，膈肌仍保持较快的收缩速度和较高的肌张力，并且肌纤维线粒体密度增高，琥珀酸脱氢酶与3-羟酰基-CoA脱氢酶（分别为线粒体三梭酸循环和脂肪酸氧化的标志酶）活性增高，有氧氧化能力增强，可以有效的利用毛细血管提供给肌肉组织的氧气，葡萄糖摄取和磷酸化能力增加。同时，组织毛细血管密度及血管内皮生长因子表达增加[9]，改善组织微循环，使肌肉组织更快的利用氧和营养物质。膈肌耐疲劳能力增强可能归结于这些因素。

慢性低频电刺激（CLFES）组表现Pt、Po、FI、FRI降低，TPT、1/2RT延长，力学特征为疲劳恢复时间缩短，抗疲劳能力增加，但收缩力量和速度亦降低。文献[10]报道CLEFS后肌细胞生成素（调控慢收缩纤维表型）mRNA表达增加，进行增量调节。CLFES使肌纤维由Ⅱ_B型向Ⅰ型转换，肌肉收缩力下降，而耐疲劳能力增加。骨骼肌型二氢吡啶受体和RyR表达下调，心肌型二氢吡啶受体表达上调[11,12]，Ca^{2+}-ATP酶活性降低，使Ca^{2+}瞬时和SR摄入Ca^{2+}速度减慢，TPT及1/2RT明显延长。这与本实验所观察的CLFES力学特征结果相符。

本实验结果提示：CLFES后肺气肿兔膈肌的疲劳阻力提高，疲劳恢复时间缩短，抗疲劳能力增强，但肌肉收缩力明显降低；CPFES与CULFES＋CPFES均提高肺气肿兔膈肌的收缩力及收缩速度，增强抗疲劳能力，但CULFES＋CPFES可更显著的提高肺气肿兔膈肌耐疲劳能力。所以，在临床上采用CULFES＋CPFES可能是COPD膈肌康复治疗更佳的频率选择。

参考文献：

[1] VASSILAKOPOULOS T, ZAKYNTHINOS S, ROUSSOS C H. Respiratory muscles and weaning failure[J]. Eur Respir J, 1996, 9(11): 2383－2400.

[2] SMITH-BLAIR N. Mechanisms of diaphragm fatigue[J]. AACN Clin Issues, 2002, 13(2): 307－319.

[3] O'DONNELL D E, REVILL S M, WEBB K A. Dynamic hyperinflation and exercise intolerance in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(5): 770－777.

[4] LOPEZ-GUAJARDO A, SUTHERLAND H, JARVIS J C, *et al*. Induction of a fatigue-resistant phenotype in rabbit fast muscle by small daily amounts of stimulation[J]. J Appl Physiol, 2001, 90(5): 1909－1918.

[5] LEVINE S, NGUYEN T, KAISER L R, *et al*. Human diaphragm remodeling associated with chronic obstructive pulmonary disease: clinical implications[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168(6): 706－713.

[6] OTTENHEIJM C A, HEUNKS L M, SIECK G C, *et al*. Diaphragm dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(2): 200－205.

[7] JARVIS J C, SUTHERLAND H, MAYNE C N, *et al*. Induction of a fast-oxidative phenotype by chronic muscle stimulation: mechanical and biochemical studies[J]. Am J Physiol, 1996, 270(1 Pt 1): C306－C312.

[8] BARRON D J, ETHERINGTON P J, WINLOVE C P, *et al*. Muscle transformation in cardiomyoplasty: the effect of conditioning and mobilisation on perfusion, oxygenation and fatigue resistance in the latissimus dorsi muscle[J]. Eur J Cardiothorac Sung, 1998, 13(5): 588－598.

[9] AMARAL S L, LINDERMAN J R, MORSE M M, *et al*. Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF[J]. Microcirculation, 2001, 8(1): 57－67.

[10] VISSING K, ANDERSEN J L, HARRIDGE S D, *et al*. Gene expression of myogenic factors and phenotype-specific markers in electrically stimulated muscle of paraplegics[J]. J Appl Physiol, 2005, 99(1): 164－172.

[11] PETTE D, VRBOVA G. What does chronic electrical stimulation teach us about muscle plasticity[J]? Muscle Nerve, 1999, 22(6): 666－677.

[12] 张睢扬，刘 刚，王东林，等. 不同频率慢性电刺激膈神经对兔膈肌骨骼肌型二氢吡啶受体$_{\alpha 1}$亚单位、ryanodine受体mRNA和蛋白表达的影响[J]. 生理学报，2004，56(2)：198－203.

（编辑 薛国文）