论著

文章编号:1000-5404(2008)05-0402-04

低压稳恒直流电场促进兔梗死-缺血心肌血管新生的效应

何国祥,蒋清安,刘建平,苗 莉,景 涛 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨低压稳恒直流电场对兔梗死-缺血心肌毛细血管新生的效应。方法 将健康中国家兔40只分为心肌梗死(myocardial infarction, MI)组、平面电场2.0 V组、平面电场3.0 V组、透壁电场2.0 V组和透壁电场3.0 V组。4周后对梗死部位心肌组织进CD31免疫组织化学染色检测毛细血管密度。结果 透壁电场缩小梗死面积优于平面电场,透壁电场3.0 V可显著促进毛细血管新生和形成,尤以非梗死区明显。结论 适宜的低压稳恒直流电场具有促进兔MI/缺血模型心肌毛细血管新生的作用。

关键词:电场;稳恒直流;冠状动脉;心肌梗死;血管新生
中图法分类号:R322.12;R454.1;R541.02 文献标识码:A

Efficacy of weak steady direct current electrical fields in chronic myocardial infarction rabbits

HE Guo-xiang, JIANG Qing-an, LIU Jian-ping, MIAO Li, JING Tao (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

Abstract: Objective To investigate whether there is therapeutic angiogenic responses in ischemic myocardium of rabbit injured and chronic infracted heart under the weak steady direct current electrical fields (DCEFs) of 2.0 and 3.0 V/cm. Methods Forty Chinese rabbits established as myocardial infarction model without endotracheal intubation were randomly divided into 5 groups, *i. e.*, myocardial infarction (MI) group, plane electrical fields of 2.0 V (PEF2V) group, the plane electrical fields of 3.0 V (PEF3V) group, transmural electrical fields of 2.0 V (TEF2V) group, and transmural electrical fields of 3.0 V (TEF3V) group. Either plane or transmural DCEFs of 2.0 V or 3.0 V were applied to ischemic myocardium of rabbit models of chronic myocardial infarction. After 4 weeks, histopathological analyses were performed to evaluate the efficacy of the weak steady DCEFs applied on the surface of ischemic myocardium. Results Significant improvement was found in minimizing infarct area and lowering the extent of fibrosis among the 4 applied DCEFs groups, and the transmural electrical fields were superior to the plane electrical fields. Additionally, more CD31-immunostained vessels were also found in infarcted area, border zone infarcted area, and noninfarcted area in TEF3V group than that in the other groups, but predominant in noninfarcted area. Conclusion These preliminary results indicate that the eligible weak steady DCEFs applied on the surface of ischemic myocardium induces angiogenesis and possibly collateral circulation in ischemic myocardium, thereby protecting the myocardium.

Key words: direct current electrotherapy; coronary artery; myocardial infarction; therapeutic angiogenesis; cardiac function

已有研究表明,组织损伤后产生的内源性电场在损伤愈合的进程中起重要作用[1-3]。当机体自身产生的生物电场不足以促进损伤愈合的进程时,在损伤区和未损伤区之间施加外加电场能明显增强损伤愈合速率。而血管新生、组织得以血液灌注是损伤愈合的关键。促使这种血管新生及形成侧支循环所需的电场强

基金项目:国家自然科学基金(30470452)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30470452)
作者简介:何国祥,男,湖南省汨罗市人,主任医师,教授,主要从事冠心病发病机制与防治研究和心脏血管疾病介入治疗方面的研究。电话:(023)68754268,E-mail:yyxnk@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-11-30 修回日期:2008-01-04

度为 150 ~ 400 mV/mm（即 1.5 ~ 4 V/cm）[4]。缺血损伤组织如心肌其细胞外损伤电场为 5.8 mV/mm[5]，显然，如此弱的电场对血管新生是微不足道的[4]。研究表明，≤3.0 V/cm 稳恒直流电场作用于心肌是安全的[6,7]。但对于梗死-缺血心肌及由此引起的缺血和非缺血区域施加≤3.0 V/cm 稳恒直流电场，是否也促进大量血管新生及侧支循环形成？梗死-缺血心肌血供是否得以改善？本研究将对此进行初步探索。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验动物及分组　　健康中国家兔 40 只，三级（SPE 动物），雌雄各半，体质量为（2.62 ± 0.44）kg，由第三军医大学实验动物中心提供。家兔在开胸冠脉结扎的同时永久植入平面电场电极或透壁电场电极，分别给予不同电压强度（2.0 V 和 3.0 V）的稳恒直流电场干预。分为以下 5 组［根据围手术期（即术后 48 h 内）家兔存活情况，每组 7 ~ 9 只］：① 心肌梗死（MI）组，即对照组（无电场干预），指开胸暴露心包，同样结扎冠状动脉及埋植电极，但不给予电场刺激。② 平面电场 2.0 V 组；③ 平面电场 3.0 V 组；④ 透壁电场 2.0 V 组；⑤ 透壁电场 3.0 V 组。

1.1.2　主要试剂、仪器及材料　　Masson 三色染色剂及其他试剂等国产分析纯配制。心肌组织免疫组织化学染色：一抗 CD31 工作液（鼠抗人单克隆抗体）和二抗试剂盒（通用型 SP Kit）购于北京中杉公司；平面电场施加装置的电极［为自制的铂（Pt）电极，长 15 mm，宽 1.1 mm，厚 0.5 mm］；透壁电场施加装置的电极［正电极同平面电场施加装置的正电极；负电极由含量 99% 铂（Pt）丝（电泳仪电极丝，宽 0.5 mm，厚 0.5 m，北京市六一仪器厂）与 PTCA 导丝焊接，焊接处套上橡胶绝缘管并用强力粘胶封闭，裸露出的 10 mm 非绝缘部分作为电极极身，制成‘η’状铂电极］。RM 6280 多导生理记录仪（四川成都仪器厂）；WYJ 系列高精度直流稳压稳流电源（上海山杰科技有限公司）；E00240 小儿 7.5 cm 胸骨牵开器等。

1.2　实验方法

1.2.1　家兔非人工通气 MI 模型的建立　　参照 Fujita 法[8] 进行，不用气管插管和呼吸机，保持兔自然呼吸状态，麻醉后沿胸骨正中从剑突处开始剪开胸骨直至颈静脉切迹，纵行剪开心包，于左心室主支起点与心尖连线的中点位置（左心耳下 7 ~ 10 mm处）用 4-0 nylon 线结扎左冠脉左心室支。

1.2.2　低压稳恒直流电场平面施加模型的建立（图 1）　　在 MI 模型的基础上，以近心尖处室间沟为中线平行放置、用 0 号丝线缝合固定一对 Pt 电极，二者相距 1 cm，阴极在右，阳极在左。同时于腹腔皮下建立两条隧道，让连接正负电极尾线分别从两隧道下通过，两尾端分别露出少许非绝缘铜线，并用细钢丝牢固地缝合固定于腹壁皮肤。MI 模型成功及电极位置固定满意后，心包不缝合，逐层关胸。经静脉预防性使用青霉素。常规普通饲养。术后给予 2.0 V 或 3.0 V 稳恒直流电通电治疗。

1.2.3　低压稳恒直流电场透壁施加模型的建立（图 2）　　在近心尖处距离室间沟 0.5 cm，用 0 号丝线缝合固定一个 Pt 电极，作为正电极。负电极安放途径为右心室心外膜-右心室途径。



图 1　平面电场电极位置示意图

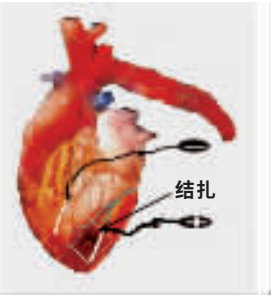


图 2　透壁电场电极位置示意图

1.2.4　低压稳恒直流电场施加程式　　电场干预均在开胸术 24 h 后进行。接上稳恒直流电场发生装置、接通电源后从 0 V 开始，按顺时针方向缓慢旋动电压输出电位器，以每次 0.1 ~ 0.5 V 递增电压，每次间隔 1 ~ 2 min，逐渐调大输出直至预定的电压强度。观察兔施治部位皮肤情况及全身状况。电场干预每日 1 次，每次 25 min，10 d 为 1 疗程。

1.2.5　心肌毛细血管密度检测[9,10]　　行 CD31 免疫组织化学染色，定性及半定量检测上述区域毛细血管密度。采用 Non-Blotin HRP Detection System 即用型二步法（非生物素）检测，即 PV 系列二步法免疫组化检测。同时以 PBS 缓冲液代替一抗，进行反应作阴性对照，显微镜下观察。Masson 染色界定非梗死区、梗死区边缘带及梗死区，CD31 免疫组织化学方法检测内皮细胞，伊红 Y 复染以鉴别心肌细胞[11]。口径小于 60 μm 被看作是毛细血管，能与邻近的微血管、炎症组织或心肌细胞明显区分的任何棕染的内皮细胞和内皮细胞丛都被看成一个可计数的毛细血管。用光学显微镜计数每 400 倍视野中的毛细血管数，以毛细血管数/视野表示毛细血管密度。

1.2.6　图像的采集和处理　　心脏水平横切片 Masson 三色染色肉眼大体观用 FUJIFILM（F440）数码相机自然光下直接照相；所有显微镜下图像用 Olympus BX4 1 显微图像采集系统采集图像。使用 Image Pro Plus 6.0（IPP6.0）分析软件进行图像分析。

1.3　统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。SPSS 13.0 统计软件对计数资料采用 χ^2 检验；计量资料采用单因素方差分析或析因设计资料两因素多水平方差分析，LSD-t 检验及 Dunnett-t 检验作多重比较。

2　结果

2.1　实验动物一般情况

纳入本研究进行心脏冠状动脉左心室支结扎手术干预的动物共 40 只。各组围手术期（冠脉结扎术后 48 h 内）死亡率、后期（冠脉结扎 48 h 后至被安乐处死前）死亡率，以及被安乐处死前存活率均无统计学差异（$P > 0.05$）。围手术期死亡率、慢性期死亡率和 1 个月内总死亡率分别为 12.5%、20.0% 和 32.5%。

本研究中直至术后 4 周被安乐处死前仍然存活的家兔 22 只，在 5 个实验组间分配无统计学差异（每组实验兔为 5 只或 6 只，$P > 0.05$），虽然心肌梗死组术前和被处死时的体质量较 4 个电场处理组重，其心脏湿质量也相应地比电场处理组大（均 $P < 0.001$），但 4 个电场处理组间上述参数均无统计学差异（$P > 0.05$），表明本研究中体质量和心脏湿质量对 4 个处理因素的效应观测无明显影响。

2.2 心肌毛细血管密度的变化

本研究结果显示，透壁电场3.0 V组不仅可明显促进非梗死区毛细血管的形成，而且也可促进梗死区边缘带和梗死区毛细血管的形成，尤以非梗死区明显（$P<0.01$，图3）。而其他电场干预组仅促进了非梗死区毛细血管的形成（$P<0.05$，$P<0.01$），对梗死区边缘带和梗死区毛细血管的形成无明显作用。各区毛细血管形成总体效应，透壁电场优于平面电场（$P<0.01$）。

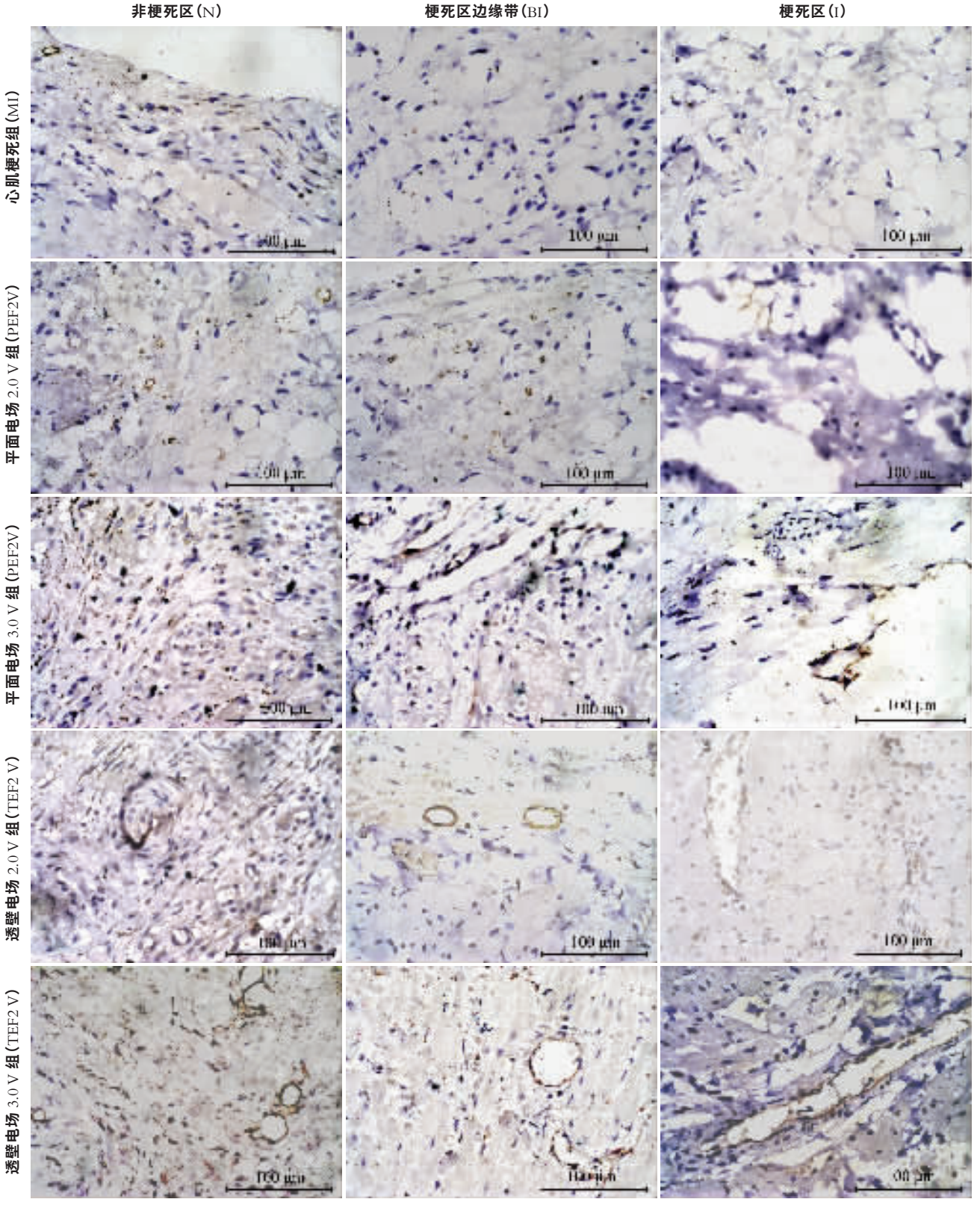


图3 开胸术后4周心脏组织水平横切片CD31免疫组织化学染色 （S-P×400）

3　讨论

现有的资料证实，侧支循环对冠心病患者心肌收缩力有着极其重要的保护作用[11－13]。目前，通过改善心肌局部微环境的方式来促进心肌侧支循环的形成和发展的研究备受关注[11，14]。

研究表明，弱的直流电场其阈值大于 75 mV/mm 时能诱导内皮细胞明显地狭长化、垂直取向和向正极（或负极）定向迁移，而这些行为正是血管新生过程[4，15]。进一步研究表明，1.5～4.0 V/cm 直流电场不仅触发了血管新生，也促进了其成熟并发展为具有功能作用的侧支循环血管[4，15]。如前所述，组织缺血性损伤后往往血管再生不足，而缺血心肌细胞自发损伤电场又不足以对血管新生产生影响[4，15]。因而通过增加缺血心肌组织局部电场来诱导血管新生及侧支循环形成的治疗方式可能是治疗缺血性心肌病的又一希望。本研究基于上述理论，设计了能满足上述要求、同时是安全的外加稳恒直流电场（≤3.0 V/cm）作用于兔心肌梗死模型，有利于以此探索其治疗缺血性心肌病的有效性。

由于本研究透壁电场施加模型，其负极游离在右心室内，加之兔心的大小有一定变异，该模型正极和负极之间的距离具有一定不确定性，只能通过解剖少许动物估计二者距离为 1～2 cm，因而此电场施加模型难以用标准单位 V/cm 准确表示。因此，本研究为了表述的一致性，电场大小一律用电压强度单位“V”表示，而不用“V/cm”表示。

由于家兔心肌梗死后 4 周其损伤愈合的组织病理进程达到最高峰，4 周后胶原纤维重塑等心室重塑病理进程缓慢[16]，因而本研究实验终点为 4 周。

对于缩小梗死面积，透壁电场优于平面电场，且平面电场 3.0 V 时作用不明显。体外实验表明，当场强在 50～100 mV/mm（0.5～1.0 V/cm）时的直流电场作用下，对培养的人类脐静脉内皮细胞的增殖无影响，而当场强达 200 mV/mm（2.0 V/cm）时细胞密度、细胞生长速率以及分裂指数呈显著下降[11]。平面电场 3.0 V 时，场强达 3.0 V/cm（>2.0 V/cm），可能使心脏组织内皮细胞增殖受到抑制，进而影响血管新生及侧支循环的形成，不利于梗死面积的缩小，也不利于心室重塑和心功能改善。而透壁电场 3.0 V 时由于正负电极间距离为 1.5 cm 左右，加之右心室负电极可能随血流漂动，位置不固定，故场强难以达到稳定的 2.0 V/cm 以上，内皮细胞增殖不会受到抑制，因而有利于毛细血管的新生、心肌保护和心功能改善，从而延缓心室重塑。

参考文献：

[1] Kloth L C. Electrical stimulation for wound healing：a review of evidence from *in vitro* studies，animal experiments，and clinical trials[J]. Int J Low Extrem Wounds，2005，4(1)：23－44.

[2] Bayat M，Asgari-Moghadam Z，Maroufi M，*et al*. Experimental wound healing using microamperage electrical stimulation in rabbits[J]. J Rehabil Res Dev，2006，43(2)：219－226.

[3] Hampton S，King L. Healing an intractable wound using bio-electrical stimulation therapy[J]. Br J Nurs，2005，14(15)：S30－S32.

[4] Bai H，McCaig C D，Forrester J V，*et al*. DC electric fields induce distinct preangiogenic responses in microvascular and macrovascular cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol，2004，24(7)：1234－1239.

[5] Vermeulen J T，Tan H L，Rademaker H，*et al*. Electrophysiologic and extracellular ionic changes during acute ischemia in failing and normal rabbit myocardium[J]. J Mol Cell Cardiol，1996，28(1)：123－131.

[6] 蒋清安，何国祥，刘建平，等. 外加稳恒直流电场对心电活动的影响[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2007，21(2)：149－153.

[7] 蒋清安，何国祥，苗　莉，等. 低压稳恒直流电场对组织间液的电化学作用[J]. 中国医学物理学杂志，2007，24(2)：116－118，146.

[8] Fujita M，Morimoto Y，Ishihara M，*et al*. A new rabbit model of myocardial infarction without endotracheal intubation[J]. J Surg Res，2004，116(1)：124－128.

[9] Garcia L，Baim D S，Post M，*et al*. Therapeutic angiogenesis using endocardial approach to administration：techniques and results[J]. Curr Interv Cardiol Rep，1999，1(3)：222－227.

[10] Scholz D，Schaper J. Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) is localized over the entire plasma membrane of endothelial cells[J]. Cell Tissue Res，1997，290(3)：623－631.

[11] Hasanovic A，Kulenovic A，Sisic F. The role of collateral circulation in preserving myocardial function[J]. Bosn J Basic Med Sci，2006，6(4)：29－31.

[12] Verhoye J P，Abouliatim I，Drochon A，*et al*. Collateral blood flow between left coronary artery bypass grafts and chronically occluded right coronary circulation in patients with triple vessel disease. Observations during complete revascularisation of beating hearts[J]. Eur J Cardiothorac Surg，2007，31(1)：49－54.

[13] Sato Y，Matsumoto N，Komatsu S，*et al*. Coronary artery abnormalities after Kawasaki disease in an adult：depiction at whole heart coronary magnetic resonance angiography[J]. Int J Cardiol，2007，116(3)：396－398.

[14] 郭　鹞，任东青. 微循环学基础与实验方法[M]. 西安：第四军医大学出版社，2005：15－358.

[15] Tang Y L，Zhao Q，Zhang Y C，*et al*. Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium[J]. Regul Pept，2004，117(1)：3－10.

[16] Morales C，Gonzalez G E，Rodriguez M，*et al*. Histopathologic time course of myocardial infarct in rabbit hearts[J]. Cardiovasc Pathol，2002，11(6)：339－345.

（编辑　邓强庭）