论著

文章编号:1000-5404(2008)06-0510-04

低频复合生理频率慢性电刺激对肺气肿兔膈肌力学特性的影响

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

摘 要:目的 研究低频复合生理频率慢性电刺激后肺气肿兔膈肌肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MHC)亚型及其力学模式的适应性变化。**方法** 采用木瓜蛋白酶雾化吸入法建立肺气肿模型:测定正常对照组、肺气肿组和肺气肿各慢性电刺激(chronic electrical stimulation, CES)组膈肌MHC亚型及膈肌颤搐收缩张力(Pt)、峰值张力时间(TPT)、1/2松弛时间(1/2Rt)、强直颤搐收缩张力(Po)、疲劳指数(FI)和疲劳恢复指数(FRI)的适应性变化。**结果** ①40 Hz、10 Hz、(10+40) Hz慢性电刺激后肺气肿兔膈肌MHC的相对含量较刺激前都明显增加($P<0.05$)。10 Hz组MHC-I型比例明显增加($P<0.01$),(10+40) Hz组MHC-I、MHC-IIa型比例增加($P<0.05$)。②肺气肿组Pt、Po均较正常对照组明显减低($P<0.01$),TPT、1/2Rt延长($P<0.01$),FI、FRI增加($P<0.01$);(10+40) Hz组和40 Hz组与肺气肿组比较Pt、Po均明显增加($P<0.01$),TPT、1/2Rt均明显缩短($P<0.01$),FI和FRI下降($P<0.01$);(10+40) Hz组与40 Hz组比较,Pt、Po、TPT、1/2Rt无显著性差异($P>0.05$),FI和FRI降低($P<0.01$)。**结论** 不同频率的CES可导致膈肌MHC亚型及肌条力学产生不同的适应性变化,低频复合生理频率电刺激可显著提高肺气肿兔膈肌收缩力,增强膈肌抗疲劳能力,可能是体外膈肌起搏对COPD患者膈肌康复治疗更佳的频率模式之一。

关键词: 肺气肿;膈肌;慢性电刺激;MHC亚型;力学

中图法分类号: R332.1;R454.1;R563.3 **文献标识码:** A

Effect of chronic electrical stimulus of low and physiological frequency on diaphragmatic mechanical characteristics in rabbits with emphysema

DENG Yong-hong, 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 electrical stimulus (CES) of low frequency and physiological frequency on diaphragmatic subtype of myosin heavy chain (MHC) and mechanical characteristic in rabbits with emphysema. **Methods** The rabbit model of emphysema was made by inhaling papain of ultrasonic atomization once a week for 3 weeks in 30 adult Japanese rabbits, 6 receiving 10 Hz chronic low-frequency electrical stimulation, 6 receiving 40 Hz, 6 receiving 10 Hz plus 40 Hz. Another 6 emphysema rabbits and 6 normal 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 and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was used to observe the changes in subtype of MHC in control group, emphysema group, CES groups respectively. **Results** ①Following chronic electrical stimulus of 40 Hz, 10 Hz, and (10+40) Hz, the relative contents of MHC were increased in diaphragmatic muscle of rabbits with emphysema. The percentage of MHC-I was significantly increased in the 10 Hz group, while that of MHC-I and MHC-IIa were significantly increased in the (10+40) Hz group. ②Following chronic electrical stimulation using 40 Hz and (10+40) Hz, diaphragmatic muscle Pt and Po were significantly increased in rabbits with emphysema, TPT and 1/2Rt were significantly reduced, and FI and FRI were significantly decreased ($P<0.01$). In

基金项目: 重庆市科技攻关项目(CSJL,2005AC5060);西南医院临床研究专项基金(SW2004009)

Supported by the Key Sci & Tech Research Project of Chongqing Scientific Committee (CSJL,2005AC5060) and the Clinical Research Foundation of Southwest Hospital of Third Military Medical University (SW2004009)

作者简介: 邓永红,女,陕西省富平县人,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:13372613006

通信作者: 刘 刚,电话:(023)68754115,E-mail:liugang6399@sohu.com

收稿日期: 2007-11-27;**修回日期:** 2007-12-03

the 10 Hz group, Pt and Po were reduced ($P<0.05$), TPT and 1/2Rt increased, and FI and FRI decreased ($P<0.01$). FRI and the decrease of FRI were more significant in the (10 + 40) Hz group than in the 40 Hz group ($P<0.01$). **Conclusion** Different frequency electrical stimulation induced different adaptative changes in MHC and mechanical characteristic. Chronic electrical stimulation using low and physiological frequencies can increase diaphragmatic muscle inotropy and the fatigue tolerance of diaphragmatic muscle. It indicates that it may be the optimal frequency mode for the rehabilitation care of diaphragmatic muscle of COPD patients with extraorgan diaphragm pacing.

Key words: emphysema; diaphragm muscle; chronic electrical stimulation; subtype of myosin heavy chain; mechanics

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种以肺功能的缓慢减退及进行性气流受限为特征的疾病,严重影响患者的劳动能力及生活质量,造成巨大的社会和经济负担。世界卫生组织(WHO)资料显示 COPD 的死亡率居所有死因的第四位,且有逐年增加之势[1]。目前为止,对 COPD 尚无非常有效的治疗手段,因此迫切需要开发新的治疗方法。本研究拟观察不同频率慢性电刺激(chronic electrical stimulation,CES)后肺气肿兔模型膈肌 MHC 亚型及肌条力学的适应性变化,从膈肌结构及力学特征的角度为 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　*动物和材料*

1.1.1　动物　　普通级成年日本大白兔 30 只(雌雄不拘),体质量(2.6 ± 0.2) kg。由第三军医大学新桥医院实验动物中心提供。

1.1.2　实验器材　　Rm6240 多道生理信号采集处理系统,动物呼吸机(HX-1),超声波雾化器,自制变频便携式体外膈肌起搏器,肌张力传感器(成都仪器厂),冷冻高速离心机(型号:BECKMAN Avanti J-20XP 美国),台式水平离心机(型号:BECKMAN CS-15R 美国),恒温水浴箱(型号:DK-8B 上海),电子天平(型号:R200D 美国),化学试剂均为国产分析纯。

1.2　*方法*

1.2.1　肺气肿兔模型的制作　　参照晋云等[2]方法,成年日本大白兔(雌雄不拘),采用木瓜蛋白酶雾化吸入法制备兔肺气肿模型。

1.2.2　肺气肿模型兔病理检查　　实验结束后,将各实验组兔断头处死,开胸游离气管,取出肺脏,固定 24 h 后送病理科,镜下观察肺组织病理变化。

1.2.3　动物分组　　正常对照组($n=6$);肺气肿模型兔用随机数字表随机分为 4 组(每组 6 只),分别为:①肺气肿组对照组;②10 Hz 慢性低频电刺激组;③40 Hz 慢性生理频率电刺激组;④(10 + 40) Hz 间断低频复合生理频率电刺激组。

1.2.4　CES 兔模型的制备　　慢性电刺激组兔用 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(电极呈圆形,约 0.56 cm^2)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。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[40 Hz、10 Hz、((10 + 40) Hz)],45 次/min,波宽 0.3 ms;输出电压 10 ~ 20 V,调节到胸部和腹部运动协调、强度一致为标准。刺激时间为: 2 h/次,上下午各 1 次,6 d/周,共 5 周。

1.2.5　兔膈肌力学特性测定　　25% 乌拉坦(1 g/kg)耳缘静脉麻醉后,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,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。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)作为刺激电极。分别测定膈肌颤搐收缩张力(Pt)、峰值张力时间(TPT)、1/2 松弛时间(1/2Rt)、强直颤搐收缩张力(Po)、疲劳指数(FI)和疲劳恢复指数(FRI)。以第 1 次强直颤搐收缩张力(F1)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 F1 减去疲劳后恢复 30 min 再测定的第一次强直颤搐收缩张力(F_1')的值,除以 F_1 为 FRI,即 $FRI=(F_1-F_1')/F_1$。

1.2.6　MHC 样品的制备　　将 25% 乌拉坦兔耳缘静脉注入麻醉后,剪去颈部及胸腹部的被毛,切开颈部皮肤,分离组织,暴露气管,气管切开,插管。切开腹部,取出完整膈肌,立即置预冷的标准 Hanks 液中备用。(以下操作均在 0 ~ 4 ℃下进行)取少量膈肌,在 1∶9(质量∶质量)预冷液中剪碎匀浆,30 s × 2 次,期间间歇 30 s,缓冲液含(mmol/L)KCl 300, KH_2PO_4 100, K_2HPO_4 50 和 EDTA10, pH 6.5; 置冰上 15 min 后, 10 000 × *g* 15 min 离心;取上清,弃沉淀,考马斯亮蓝 G-250 法蛋白定量后,加等量甘油,以 1 mg/ml 置 -70 ℃保存备用。

1.2.7　SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳　　配置 8% 分离胶和 5% 浓缩胶:8% 分离胶含 8% 丙烯酰胺,0.16% 聚丙烯酰胺,30% 甘油,0.4% SDS,0.2 mol/L Tris(pH 8.8),0.1 mol/L 甘氨酸,TEMED(终浓度为 0.05%),过硫酸铵(终浓度为 0.1%);5% 浓缩胶含 4.79% 丙烯酰胺,0.2% 聚丙烯酰胺,0.125 mol/L Tris(pH 6.8),0.1% SDS,TEMED(终浓度为 0.05%),过硫酸铵(终浓度为 0.1%)。

取 MHC 提取液 15 μl 加入等量加样缓冲液混匀,95 ℃变性 2 ~ 3 min 后点样。恒压 75 V,恒流 6 mA,持续 16 h。电泳结

束后取出凝胶,用0.125%考马氏亮蓝R-250染色4~8 h,染色后脱色4~8 h,其间换液3~4次,直至背景为淡蓝色,色带显示清楚,对比良好时终止。

1.2.8 光密度分布曲线下面积测定 用Quantity one软件对SDS电泳照片进行电泳条带光密度分布曲线下面积测定,其值表示MHC各亚型的相对含量。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 MHC各亚型比例的变化(表1)

与正常组比较,肺气肿组MHC-Ⅰ比例增高,MHC-Ⅱb比例降低。与肺气肿组比较,低频复合生理频率慢性电刺激组MHC-Ⅱa比例明显增高,MHC-Ⅱb比例明显降低。低频慢性电刺激组MHC-Ⅰ比例增高,MHC-Ⅱb比例明显降低。与低频复合生理频率慢性电刺激组比较,生理频率慢性电刺激组MHC-Ⅰ、MHC-Ⅱa比例降低,MHC-Ⅱb比例增高。

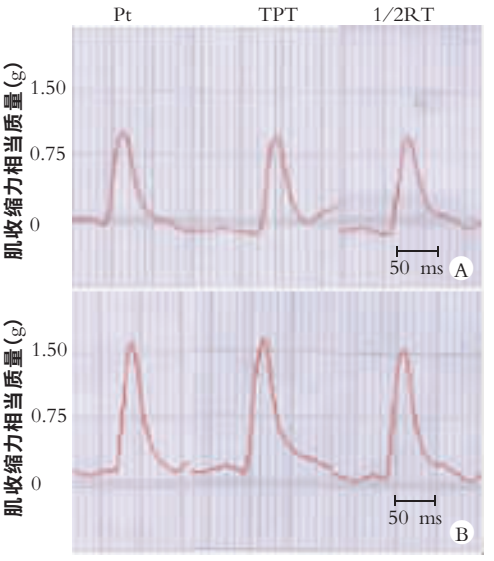
表1 不同频率慢性电刺激后肺气肿兔膈肌MHC亚型比例的变化

组别	MHC-Ⅰ	MHC-Ⅱa	MHC-Ⅱb
正常对照组	29.92±1.46	46.10±1.16	23.88±1.18
肺气肿组	37.70±0.86[a]	46.20±2.49	16.02±2.47[a]
40 Hz组	27.35±1.36[abc]	47.70±0.94[c]	24.87±0.94[bc]
10 Hz组	41.38±0.64[abc]	46.53±1.53[c]	11.97±1.52[ab]
(10+40)Hz组	32.70±1.62[ab]	53.76±2.54[ab]	13.40±1.07[a]

a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与肺气肿组比较;c:$P<0.01$,与(10+40)Hz组比较

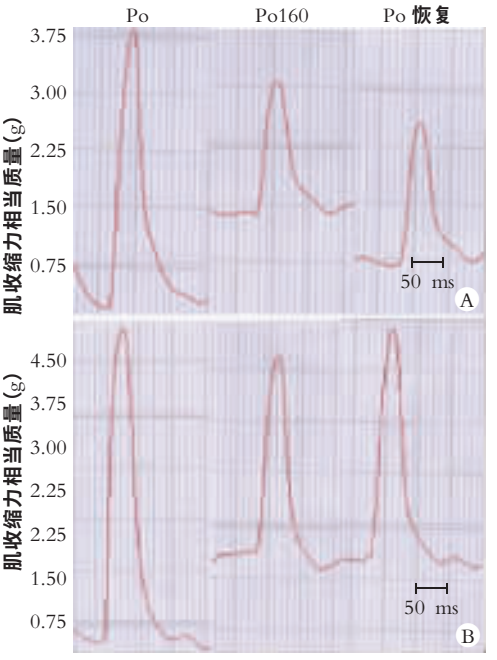
2.2 CES后兔膈肌收缩力学参数变化

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($P<0.01$);峰值张力时间(TPT)、1/2松弛时间(1/2Rt)延长($P<0.01$);疲劳指数(FI)和疲劳恢复指数(FRI)增高($P<0.01$)。(10+40)Hz组和40 Hz组与肺气肿组比较Pt、Po均明显提高($P<0.01$);TPT、1/2Rt均明显缩短($P<0.01$);FI和FRI下降($P<0.01$)。(10+40)Hz组与40 Hz组比较,Pt、Po、TPT、1/2Rt无显著性差异($P>0.05$);FI和FRI降低($P<0.01$)。10 Hz组与肺气肿组比较,Pt、Po降低($P<0.01$);TPT、1/2Rt均明显延长($P<0.01$);FI和FRI下降($P<0.01$);(10+40)Hz组与10 Hz组比较,FI和FRI无显著性差异($P>0.05$)(表2和图1、2)。



A:肺气肿组:Pt:1.11,TPT:48.5 ms,1/2RT:32 ms;
B:(10+40)Hz组:Pt:1.48,TPT:40 ms,1/2RT:24 ms

图1 兔膈肌单收缩力学图



A:肺气肿组 Po:3.63 g,Po160:1.74 g,Po恢复:1.92 g;
B:(10+40)Hz组 Po:4.5 g,Po160:2.8 g,Po恢复:3.28 g

图2 兔膈肌强直收缩力学图形

表2 不同频率慢性电刺激后肺气肿兔膈肌力学参数变化($n=6$,$\bar{x} \pm s$)

组别	Pt(g)	TPT(s)	1/2RT(s)	Po(g)	FI	FRI
正常对照组	1.97±0.20	0.030±0.004	0.019±0.002	6.23±0.40	0.31±0.02	0.22±0.01
肺气肿组	1.11±0.09[ac]	0.051±0.003[a]	0.036±0.004[ac]	3.39±0.30[ac]	0.51±0.02[ac]	0.46±0.01[ac]
10 Hz组	0.83±0.10[ac]	0.059±0.005[ac]	0.051±0.004[ac]	2.78±0.23[ac]	0.36±0.02[a]	0.28±0.03[a]
40 Hz组	1.57±0.08[a]	0.037±0.003[b]	0.024±0.002[b]	5.43±0.26[a]	0.41±0.01[ac]	0.35±0.01[ac]
(10+40)Hz组	1.45±0.09[a]	0.043±0.003[a]	0.027±0.002[a]	4.79±0.38[a]	0.38±0.02[a]	0.28±0.03[a]

a:$P<0.01$,与正常对照组比较;b:$P<0.01$,与肺气肿组比较;c:$P<0.01$,与(10+40)Hz组比较

3　讨论

膈肌起搏的应用源于膈肌对电刺激的适应性变化与骨骼肌相似的实验基础。慢性生理性电刺激后肢体骨骼肌纤维的适应性变化是肌纤维类型的比例在正常生理范围,各类型纤维功能增强。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。慢性低频电刺激(CLES)可使肌肉快收缩纤维和肌球蛋白重链(MHC)向慢收缩肌纤维和 MHC 转化,结果是肌肉抗疲劳能力增加,疲劳恢复时间缩短。

近年研究表明[3],膈肌至少含有 4 种肌球蛋白异构体,即 MHC 分为Ⅰ、Ⅱa、Ⅱx、Ⅱb 4 种亚型。由于普通的 6% SDS-聚丙烯酰胺电泳无法将Ⅱx 从Ⅱa 中分离出,通常将Ⅱx 归于Ⅱa。本实验采用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法,标本检测出 3 条肌球蛋白条带,分别对应于快和慢肌肌球蛋白重链亚型。MHC 与肌纤维最大收缩速度、收缩力有关[4,5],而且 MHC 在肌球蛋白中含量最丰富,因此通常用 MHC 亚型来决定肌纤维的类型。MHC-Ⅰ、MHC-Ⅱa、MHC-Ⅱb 分别对应于 mATP 酶组化染色的Ⅰ、Ⅱa、Ⅱb 型纤维。Ⅰ型纤维肌力弱,耐疲劳能力强。Ⅱa 型纤维肌力较高,不易疲劳。Ⅱb 型纤维收缩力强,但易疲劳。研究已证实[6],Ⅰ型纤维与Ⅱa 型纤维较Ⅱb 型纤维有较高的抗疲劳能力。另外有研究证实[7],MHC 的转化反映了 MHC 基因表达的特定路线:Ⅰ⇆Ⅱ⇆Ⅱx⇆Ⅱb。本实验结果显示,不同频率慢性电刺激可诱导肺气肿兔膈肌 MHC 亚型的适应性转换,其膈肌力学特征也发生相应的变化。

COPD 患者膈肌 MHC 含量和亚型随着病情进展出现相应的变化。Orozco 等[8]研究发现,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。国内白冲等[9]研究报道,膈肌中的肌球蛋白存在一定的可塑性,为适应慢性过度负荷情况下呼吸功能需要,COPD 患者膈肌快 MHC 表达减少,慢 MHC 表达增加。本实验 MHC 电泳结果显示肺气肿组 MHC 含量降低,MHC-I 比例有所增加,膈肌力学特征表现为膈肌 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。这与上述研究结果相一致。

不同频率的慢性电刺激可以引起肺气肿兔膈肌 MHC 含量的增加,MHC 亚型发生适应性的转化。低频慢性电刺激后膈肌 MHC-I 比例增高,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,但收缩力量和速度降低。生理频率慢性电刺激后膈肌 MHC 各亚型比例相对维持正常,低频复合生理频率慢性电刺激后膈肌 MHC-Ⅰ、MHC-Ⅱa 比例增高。此两种电刺激后肺气肿兔膈肌均表现为 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,但低频复合生理频率慢性电刺激组 FI、FRI 较生理频率慢性电刺激组 FI、FRI 下降更加明显,抗疲劳能力得到更明显的增强。

低频复合生理频率慢性电刺激综合了低频和生理频率两种电刺激的优势[10],既提高膈肌的收缩力又提高膈肌的耐力。提示低频复合生理频率慢性电刺激可能是体外膈肌起搏对 COPD 患者膈肌康复治疗更佳的频率模式之一。

参考文献:

[1] 郝伟欣. 慢性阻塞性肺疾病[J]. 实用心脑肺血管病杂志, 2006, 14(3): 172 - 174.

[2] 晋　云, 梁崇礼, 陈训如, 等. 兔肺气肿模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(2): 108 - 111.

[3] Mercadier J J, Schwartz K, Schiaffino S, *et al*. Myosin heavy chain gene expression changes in the diaphragm of patients with chronic lung hyperinflation[J]. Am J Physiol, 1998, 274(4 Pt 1): L527 - L534.

[4] Seward D J, Haney J C, Rudnicki M A, *et al*. bHLH transcription factor MyoD affects myosin heavy chain expression pattern in a muscle-specific fashion[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280(2): C408 - C413.

[5] Andruchov O, Andruchova O, Wang Y, *et al*. Kinetic properties of myosin heavy chain isoforms in mouse skeletal muscle: comparison with rat, rabbit, and human and correlation with amino acid sequence[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(6): C1725 - C1732.

[6] Gueguen N, Lefaucheur L, Fillaut M, *et al*. Muscle fiber contractile type influences the regulation of mitochondrial function[J]. Mol Cell Biochem, 2005, 276(1 - 2): 15 - 20.

[7] Schiaffino S, Reggian C. Myosin isoforms in mammalian skeletal muscle[J]. J Appl Physiol, 1994, 77(2): 493 - 501.

[8] Orozco-Levi M, Gea J, Lloreta J L, *et al*. Subcellular adaptation of the human diaphragm in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Eur Respir J, 1999, 13(2): 371 - 378.

[9] 白　冲, 陈若华, 陆方林, 等. 慢性阻塞性肺病患者膈肌肌凝蛋白重链表型的变化[J]. 第二军医大学学报, 2004, 25(7): 733 - 736.

[10] 李香彭, 李军梅, 刘　刚. 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[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(6): 573 - 576.

(编辑　栗　嘉)