

动脉粥样硬化并肢体缺血模型兔接受低频电磁场刺激促进新生血管形成

张建勇¹, 彭辉¹, 孟德凯², 陈辉¹, 张运强², 余化龙² (¹新疆医科大学附属中医医院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830000; ²新疆医科大学研究生院, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011)

文章亮点:

- 1 经腹腔结扎髂总动脉制作肢体缺血模型, 排除了经股部切开行股动脉结扎或切除造成的手术损伤性跛行, 使得术后观察缺血性跛行更加客观。
- 2 自制磁性饲养笼低频电磁场缺血肢体的实验研究克服了受试家兔顺应性差及所受磁场强度稳定性难以控制的两大难题。
- 3 实验结果揭示电磁场作用强度(因素 A)对无缺血肢体缺氧诱导因子 1 α 的表达起主要作用, 作用时间(因素 B)为次要作用, 但在肢体缺血状态下血管内皮生长因子及 CD34 表达除了受缺氧诱导因子 1 α 的调控作用外可能还受其他因素的影响。

关键词:

实验动物; 组织构建; 磁性饲养笼; 低频电磁场; 家兔; 肢体缺血; 缺氧诱导因子 1 α ; 血管内皮生长因子; CD34; 新疆维吾尔自治区自然科学基金

主题词:

电磁场; 动脉粥样硬化; 缺血; 肌, 横纹; 缺氧诱导因子 1, α 亚基; 血管内皮生长因子类

基金资助:

新疆维吾尔自治区自然科学基金资助(2011211A093)

摘要

背景: 磁场治疗肢体缺血性疾病的基础研究报道不多, 原因是受试动物的依从性差及所受磁场作用强度的稳定性难以掌控, 由此造成实验误差大, 结果可信度下降。作者针对此类问题, 采用磁性饲养笼进行低频电磁场治疗缺血肢体的实验研究, 由此克服了受试动物依从性差及磁场强度的稳定性难以掌控的两大难题。

目的: 探讨自制磁性饲养笼低频电磁场对家兔缺血肢体新生血管生长促进因子表达的影响。

方法: 构建动脉粥样硬化模型兔 96 只, 编号随机分入缺血组和无缺血组(每组 12 个处理组合), 按析因设计要求每组重复实验 4 次。因素 A 电磁场作用强度(0, 3, 6, 12 mT)和因素 B 电磁场作用时间(3, 5, 7 d)。

结果与结论: 低频磁场能够明显促进家兔缺血肢体缺氧诱导因子 1 α 、血管内皮生长因子及 CD34 表达, 磁场作用强度(因素 A)是促进缺氧诱导因子 1 α 、血管内皮生长因子及 CD34 表达的主要因素, 作用时间(因素 B)为次要因素。低频磁场也促进无缺血肢体缺氧诱导因子 1 α 的表达, 但对无缺血肢体血管内皮生长因子及 CD34 表达无明显促进作用, 揭示在肢体缺血状态下血管内皮生长因子及 CD34 表达除了受缺氧诱导因子 1 α 的调控作用外可能还受其他因素的调控。

张建勇, 彭辉, 孟德凯, 陈辉, 张运强, 余化龙. 动脉粥样硬化并肢体缺血模型兔接受低频电磁场刺激促进新生血管形成[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(27):4375-4382.

Low-frequency magnetic fields promote neovascularization in a rabbit model of atherosclerosis combined with limb ischemia

Zhang Jian-yong¹, Peng Hui¹, Meng De-kai², Chen Hui¹, Zhang Yun-qiang², Yu Hua-long² (¹Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Graduate School of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Studies on basic research of magnetic treatment of limb ischemic disease are not much, because poor compliance of animals and the stability of the magnetic field strength are difficult to control, resulting in big experimental error and decreased credibility of the results. For this kind of problem, experimental study on low-frequency electromagnetic magnetic cages for treatment of ischemic limbs was conducted, thus overcoming the two major issues of poor compliance of animals and difficult control of the stability of magnetic field strength.

OBJECTIVE: To investigate the effects of self-made low-frequency magnetic fields of rabbit cages on neovascular growth-promoting factor of rabbits with limb ischemia.

METHODS: A total of 96 rabbit models of atherosclerosis were constructed, numbered and randomly divided into ischemia group and non-ischemia group (12 treatment combination in each group). Experiments in each group were performed four times according to the requirement of factorial design. Electromagnetic field intensity factor A

张建勇, 男, 1960 年生, 新疆维吾尔自治区库尔勒市人, 汉族, 2000 年新疆医科大学研究生院毕业, 硕士, 硕士生导师, 主任医师, 副教授, 主要从事血管外科方向的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.27.018
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)27-04375-08
稿件接受:2014-05-28

Zhang Jian-yong, Master, Master's supervisor, Chief physician, Associate professor, Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China

Accepted: 2014-05-28

(0, 3, 6, 12 mT) and the time factor B (3, 5, 7 days) were set.

RESULTS AND CONCLUSION: Low-frequency magnetic field could apparently promote hypoxia inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and CD34 expression in ischemic limb of rabbits. Electromagnetic field intensity factor A was a key factor for contributing to the expression of hypoxia inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and CD34, and the time factor B was secondary factor. Low-frequency magnetic field also promoted hypoxia inducible factor-1 α expression in non-ischemia limb, but did not promote vascular endothelial growth factor and CD34 expression. Thus, the expression of vascular endothelial growth factor and CD34 was regulated by hypoxia inducible factor-1 α , as well as other factors, in the ischemic state.

Subject headings: electromagnetic fields; atherosclerosis; ischemia; muscle, striated; hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit; vascular endothelial growth factors

Funding: the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region, No. 2011211A093

Zhang JY, Peng H, Meng DK, Chen H, Zhang YQ, Yu HL. Low-frequency magnetic fields promote neovascularization in a rabbit model of atherosclerosis combined with limb ischemia. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(27):4375-4382.

0 引言 Introduction

老年下肢动脉流出道广泛硬化闭塞症目前仍属难治性疾病。Criqui等^[1-2]统计65岁以上的老年男性下肢动脉流出道闭塞性疾病发病率约10%，而75岁以上则为20%。目前60岁以上人群的发病率正逐渐增加，其中约20%的患者受到截肢/趾的威胁，有5%的患者需要截肢/趾治疗，严重影响着老年患者的身心健康和生活质量^[3]。随着新生血管生长促进因子的发现及治疗性血管新生概念的提出，人们将关注重点放在了通过增加新生血管生长促进因子的表达从而达到治疗肢体缺血目的，其中促血管生长相关因子的直接注射、其基因的转染及干细胞移植等研究较多^[4-14]，往年文献均可见报道，但其安全性、实施简便性及其疗效的可靠性等问题越发突出。因此寻找一种安全、实施简便、有效的方法成为治疗性血管新生的研究热点。

研究报道低频电磁场能够明显促进体外动物或体外人血管内皮细胞增殖^[15-20]，但动物肢体缺血实验的报道不多，原因是实验动物的依从性差及所受磁场作用强度稳定性难以掌控，由此造成实验误差大，结果可信度下降。作者采用磁性饲养笼进行低频电磁治疗缺血肢体的实验研究，由此克服了受试动物依从性差及磁场强度的稳定性难以掌控的两大难题^[21-23]。在此基础上观察低频磁场对家兔缺血肢体中血管内皮细胞增殖的影响，同时探讨这一影响所发生过程中的低频磁场对于缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达的影响，为下肢动脉硬化闭塞症的治疗提供了新的途径。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 析因实验设计加对照实验研究。

时间及地点: 实验于2012年4月至2013年6月在新疆医科大学附属中医医院动物实验室完成。

材料:

实验动物: 1.5月龄的清洁级雄性新西兰家兔96只，体质量1.0-1.5 kg，由新疆维吾尔自治区地方病研究所实验动物中心提供，许可证号: XJDFBYJS(新) 2012-04-01，实验室普通饲料喂养1周进行实验。

家兔饲料: 由新疆维吾尔自治区地方病研究所实验动物中心提供。

普通饲料: 每100 g普通饲料中，草粉48.4 g，玉米15 g，麸皮15 g，葵饼9 g，豆粉8 g，肉骨粉3 g，鱼粉1 g，食盐0.5 g，多种维生素0.1 g，配制成家兔普通饲料。

高脂高胆固醇饲料: 每94 g普通饲料中加入胆固醇1 g、胆盐1 g、猪油3 g、蛋黄粉1 g，配制成动脉粥样硬化造模的高脂高胆固醇家兔饲料。

主要试剂及仪器: 缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子、CD34(1:100)即用型及SP试剂盒(SP9000)由武汉博士德公司提供，德国莱卡产 Leica DM 6000B显微镜和Leica DFC 425照相机，II-604型数字皮温计(中国)，ES-1000 SPM超音波血流计(日本)，DEUTROMETER 3872磁场强度测量仪(德国卡尔德意志)，自制磁性饲养笼3个(磁场强度分别为3、6及12 mT)^[21]。计算机图像处理软件系统(IPP6.0)。

实验方法:

构建动脉粥样硬化模型兔: 入选家兔给予高脂高胆固醇饲料200 g/(只·d)连续喂养6周^[24]，期间正常饮水。

动脉粥样硬化模型兔造模成功标准: 预实验动脉粥样硬化造模42 d，获取股动脉作病理切片苏木精-伊红染色，与正常对照组股动脉病理切片苏木精-伊红染色对照观察，股动脉粥样斑块形成且所占血管面积超过正常对照组的20%，视为动脉粥样硬化造模成功。

缺血肢体模型: 将上述动脉粥样硬化造模成功的家兔俯卧位固定在家兔静脉麻醉卡槽内，10%水合氯醛2-4 mL/kg经耳缘静脉缓慢注射麻醉，然后将麻醉好的家兔仰卧位妥善将四肢固定在家兔手术架上。手术区用电动剪毛机去毛，碘伏消毒，铺自制无菌洞巾，腹部正中耻骨联合上缘向上纵行切口，长约5 cm，进入腹腔，找到左侧髂总动脉仔细游离并用1个“0”无菌丝线将其结扎。确认无渗血，逐层缝合腹壁切口^[25]。普通饲料喂养，正常饮水。

肢体缺血造模成功判断指标: 预实验肢体缺血造模后第24小时出现以下3种情况之一认为肢体缺血造模成功: 缺血肢体出现跛行; 室内温度20℃缺血肢体趾端皮肤温度小于

表 1 磁场作用强度与作用时间的处理组合表

Table 1 Treatment combination of magnetic field intensity and action time

因素 B: 磁场作用时间(d)	因素 A: 磁场作用强度(mT)			
	A1:0	A2:3	A3:6	A4:12
B1:3	A1 B1	A2 B1	A3 B1	A4 B1
B2:5	A1 B2	A2 B2	A3 B2	A4 B2
B3:7	A1 B3	A2 B3	A3 B3	A4 B3

对侧2 ℃以上; 缺血肢体腹股沟韧带下2 cm范围内的股动脉超音波血流仪检测血流量小于对侧股动脉血流量的1/4。

实验家兔分组和磁性饲养笼干预: 动脉粥样硬化造模结束96只家兔, 编号随机分入缺血组和无缺血组(每组12个处理组合), 按析因设计要求每组重复实验4次。因素A电磁场作用强度(0, 3, 6, 12 mT)和因素B电磁场作用时间(3, 5, 7 d), 处理组合见表1。

左右后肢体趾端皮肤温度测量差值: 室内温度20 ℃数字皮温计测量缺血及对侧肢体趾端皮肤温度, 读数稳定1 min计数, 计算差值。

左右股动脉多普勒彩超血流探测差值: ES-1000SPM超声波流量计测量缺血及对侧肢体腹股沟韧带下2 cm范

围股动脉血流量, 读数稳定1 min计数, 并计算差值。

缺血侧小腿横纹肌光学显微镜形态观察: 于缺血模型制备后第3, 5, 7天切取缺血侧小腿肌间隙组织。切取的标本用体积分数4%甲醛液固定48 h, 然后水洗、脱水, 石蜡包埋, 连续切片, 切片厚度为4 μm。切片于60 ℃烤片1 h后置入二甲苯中脱蜡, 梯度乙醇中脱水, 蒸馏水水洗, 苏木精染色8 min, 蒸馏水水洗, 体积分数5%乙醇分化, 伊红染色5 s, 蒸馏水水洗, 中性树胶封固^[26]。200及400倍光镜下观察小腿横纹肌组织形态学变化。

缺氧诱导因子1α、血管内皮生长因子及CD34检测: ①缺血造模后第3, 5, 7天切取缺血小腿横纹肌组织。将组织块修剪为0.3 cm×1 cm×1 cm大小, 用体积分数4%中性甲醛固定24 h, 自动脱水透明, 52 ℃低熔点石蜡快速包埋, 切片(4 μm厚)。②脱蜡, 梯度脱水, 抗原修复, 清除内源性过氧化物酶, 血清封闭。③一抗孵育: 滴加1:200的缺氧诱导因子1α、血管内皮生长因子及CD34的兔抗兔抗体溶液各50 μL/片, 37 ℃孵育1 h, 0.01 mol/L PBS冲洗。④二抗孵育: 滴加生物素标记的兔抗兔二抗溶液50 μL/片, 室温下湿盒孵育30 min, 0.01 mol/L PBS冲洗。⑤S-P孵育: 滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶溶液(S-P)50 μL/片, 室温下湿盒孵育30 min, 0.01 mol/L PBS冲洗。⑥DAB显色,

表 2 无缺血组与缺血组兔各项指标检测结果均值

Table 2 Mean results of measurement parameters of rabbits in non-ischemia group and ischemia group

($\bar{x} \pm s$)

磁场强度	组别	n	STHTE(℃)	DVAFB	HIF-1α 表达(累积吸光度)	VEGF 表达(累积吸光度)	CD34 阳性染色细胞个数
0 mT	无缺血第 3 天组	4	0.4±0.1	0.6±0.1	442±45	126±48	3.0±0.14
	缺血第 3 天组	4	3.4±0.3	5.9±0.5	1 194±346	401±63	8.0±0.12
	无缺血第 5 天组	4	0.5±0.1	0.6±0.1	348±121	153±48	4.0±0.1
	缺血第 5 天组	4	2.6±0.2	4.8±0.5	1 142±442	486±84	11.0±0.2
	无缺血第 7 天组	4	0.5±0.1	0.4±0.1	489±124	246±68	4.0±0.1
	缺血第 7 天组	4	2.1±0.2	3.3±0.2	1 096±234	593±58	11.0±0.3
	3 mT	无缺血第 3 天组	4	0.4±0.1	0.7±0.1	822±212	282±63
缺血第 3 天组	4	2.9±0.2 ^{bd}	4.0±0.5 ^{bc}	1 313±385 ^d	581±104 ^b	13.0±2.0 ^b	
无缺血第 5 天组	4	0.4±0.1	0.5±0.1	916±307	373±88	4.0±0.1	
缺血第 5 天组	4	1.8±0.1	2.9±1.5	1 710±447	849±113	21.0±0.3	
无缺血第 7 天组	4	0.7±0.1	1.4±0.1	929±345	387±87	6.0±0.2	
缺血第 7 天组	4	1.6±0.1 ^{af}	2.8±0.1 ^{ag}	1 989±264 ^{ac}	1 083±134 ^{bd}	21.0±0.2 ^{bd}	
6 mT	无缺血第 3 天组	4	0.5±0.1	0.7±0.1	1 190±223	378±82	6.0±0.1
	缺血第 3 天组	4	1.9±0.1	2.8±0.5	1 839±298	1 189±164	28.0±0.15
	无缺血第 5 天组	4	0.8±0.1	0.5±0.1	1 773±217	401±81	7.0±0.2
	缺血第 5 天组	4	1.6±0.1	2.6±0.5	1 905±332	1 354±170	24.0±1.0
	无缺血第 7 天组	4	1.1±0.1	1.4±0.1	2 108±248	394±120	7.0±0.5
	缺血第 7 天组	4	1.4±0.1	1.8±0.1	2 167±312	1 776±135	30.0±1.5
	12 mT	无缺血第 3 天组	4	0.9±0.1	0.9±0.1	1 921±232	482±91
缺血第 3 天组	4	1.7±0.1 ^{ee}	2.1±0.1 ^{ee}	2 427±301 ^a	2 218±318 ^b	39±2 ^b	
无缺血第 5 天组	4	0.9±0.1	0.8±0.1	2 117±453	458±102	8.0±0.2	
缺血第 5 天组	4	1.2±0.1	1.6±0.2	2 703±331	2 189±328	39.0±1.5	
无缺血第 7 天组	4	0.7±0.1	0.9±0.1	2 528±411 ^{hi}	483±81	9.0±0.3	
缺血第 7 天组	4	1.0±0.1	1.2±0.2	3 013±432 ^{gg}	2 478±324 ^{bg}	40±3 ^{bg}	

表注: ①STHTE: 双侧后肢趾端皮肤温度差值; DVAFB: 双侧后肢股动脉血流差值; HIF-1α: 缺氧诱导因子 1α; VEGF: 血管内皮生长因子。②缺血组与无缺血组比较: ^aP<0.05, ^bP<0.01; 缺血组 3 mT-7 d 与 3 mT-3 d 比较: ^cP<0.05, ^dP<0.01; 缺血组 12 mT-7 d 与 12 mT-3 d 比较: ^eP<0.05; 缺血组 12 mT-7 d 与 3 mT-7 d 比较: ^fP<0.05, ^gP<0.01; 无缺血组 12 mT-7 d 与 12 mT-3 d 比较: ^hP<0.01; 无缺血组 12 mT-7 d 与 3 mT-7 d 比较: ⁱP<0.01。③无缺血组与缺血组、无缺血之间、缺血组之间的组间自由度为 1, 组内自由度为 7。

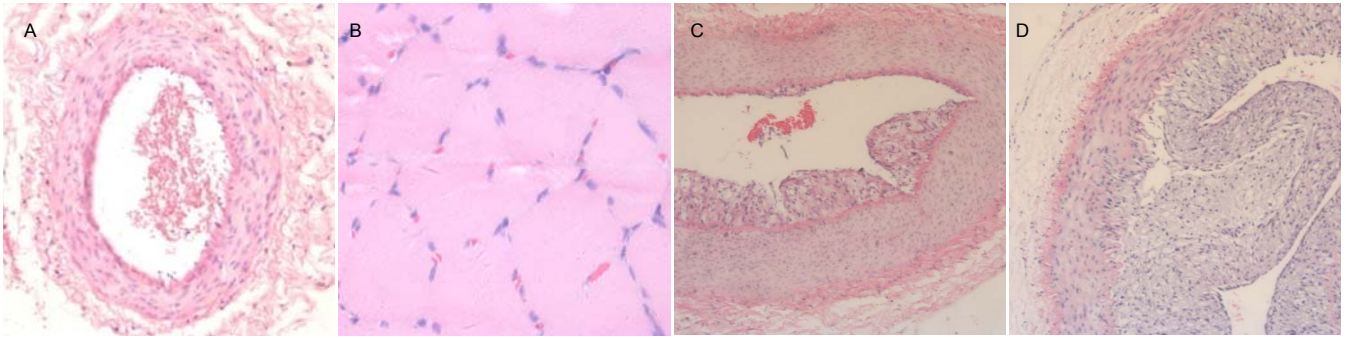


图 1 家兔动脉粥样硬化造模结果(×200)

Figure 1 Establishment result of a rabbit model of atherosclerosis (×200)

图注: 图中 A 为未造模家兔髂动脉, 内皮平滑完整, 中膜平滑肌清晰; B 为未造模家兔横纹肌细胞核排列规整, 胞浆均匀, 未见脂肪变性征象; C 为动脉粥样硬化造模家兔, 股动脉粥样斑块形成, 所占血管面积大于 50%; D 为动脉粥样硬化造模家兔, 股动脉粥样斑块形成, 所占血管面积大于 70%。

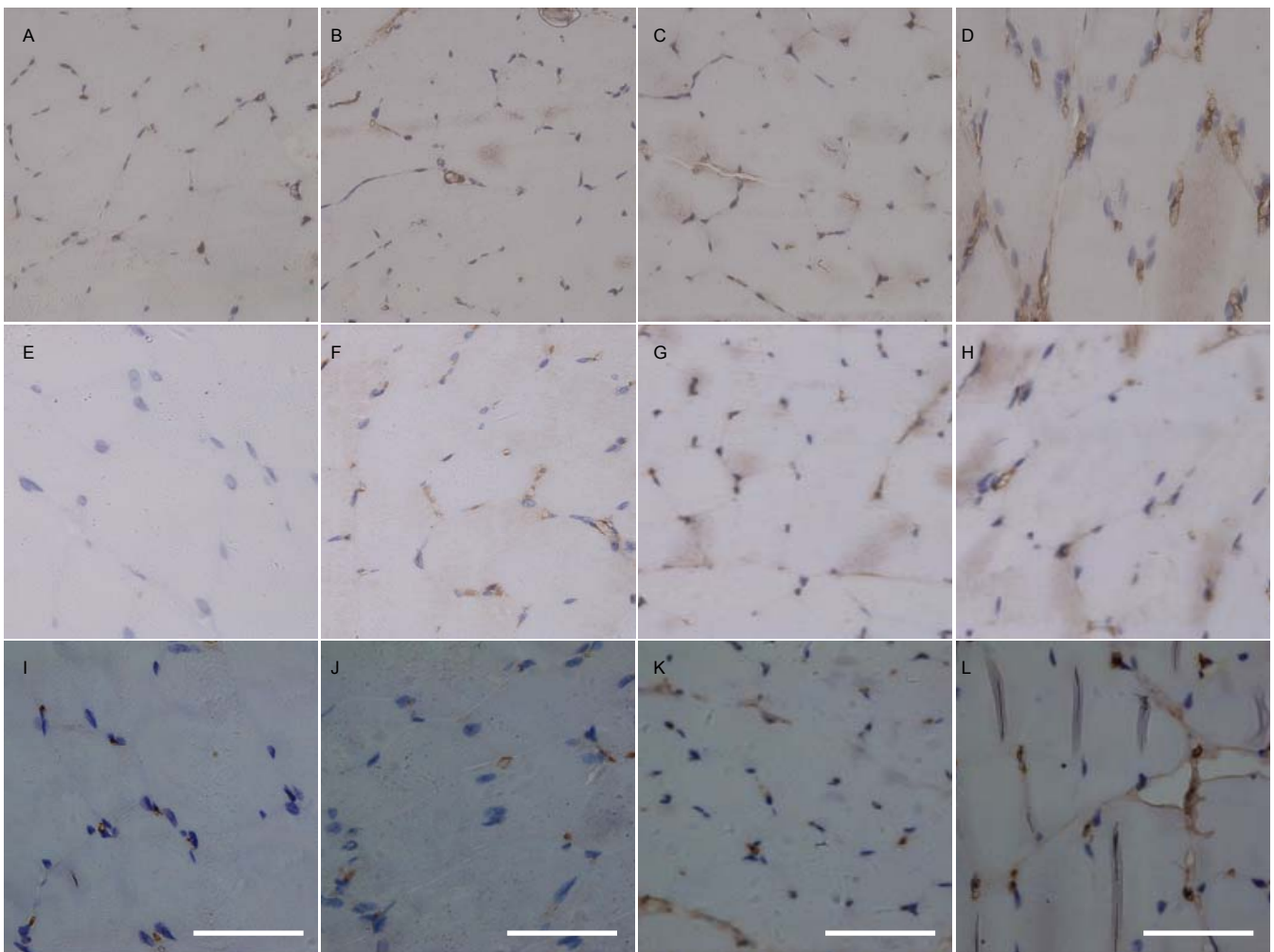


图 2 缺血组缺氧诱导因子 1α、血管内皮生长因子及 CD34 表达情况(×400)

Figure 2 Hypoxia inducible factor-1α, vascular endothelial growth factor and CD34 expression in ischemia group (×400)

图注: 图中 A 显示 0 mT-7 d 缺氧诱导因子 1α 轻度表达; B 显示 3 mT-7 d 缺氧诱导因子 1α 轻度表达; C 显示 6 mT-7 d 缺氧诱导因子 1α 中度表达; D 显示 12 mT-7 d 缺氧诱导因子 1α 高度表达; E 显示 0 mT-7 d 血管内皮生长因子无表达; F 显示 3 mT-7 d 血管内皮生长因子轻度表达; G 显示 6 mT-7 d 血管内皮生长因子中度表达; H 显示 12 mT-7 d 血管内皮生长因子高度表达; I 显示 0 mT-7 d CD34 无表达。J 显示 3 mT-7 d CD34 轻度表达; K 显示 6 mT-7 d CD34 中度表达; L 显示 12 mT-7 d CD34 高度表达。

显微镜下观察显色情况, 显色满意无背景, 即用自来水冲洗终止反应。⑦复染: 苏木精衬染细胞核 1 min, 流水冲洗, 盐酸乙醇分化 1 s, 流水冲洗 15 min 反蓝, 切片干燥后二甲

苯透明, 中性树胶封固。用 PBS 代替一抗做阴性对照^[26]。

结果判定: ①缺氧诱导因子 1α、血管内皮生长因子表达测定: 经过免疫组化染色, 细胞核出现蓝染, 胞浆可见黄染

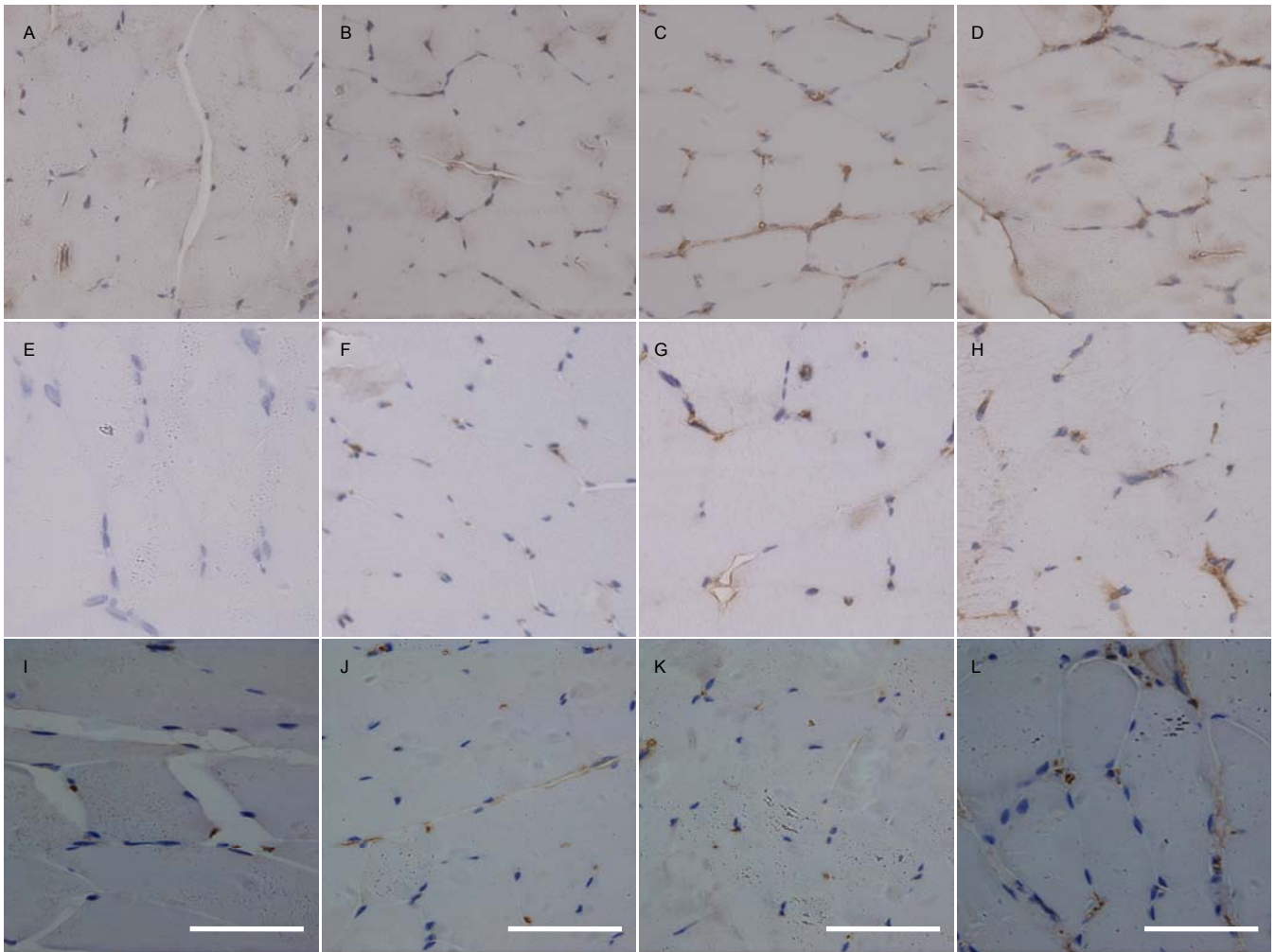


图3 无缺血组缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达情况($\times 400$)

Figure 3 Hypoxia inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor and CD34 expression in non-ischemia group ($\times 400$)

图注: 图中A显示0 mT-7 d 缺氧诱导因子1 α 无表达; B显示3 mT-7 d 缺氧诱导因子1 α 轻度表达; C显示6 mT-7 d 缺氧诱导因子1 α 中度表达; D显示12 mT-7 d 缺氧诱导因子1 α 高度表达; E显示0 mT-7 d 血管内皮生长因子无表达; F显示3 mT-7 d 血管内皮生长因子无表达; G显示6 mT-7 d 血管内皮生长因子无表达; H显示12 mT-7 d 血管内皮生长因子轻度表达; I显示0 mT-7 d CD34无表达; J显示3 mT-7 d CD34无表达; K显示6 mT-7 d CD34轻度表达; L显示12 mT-7 d CD34轻度表达。

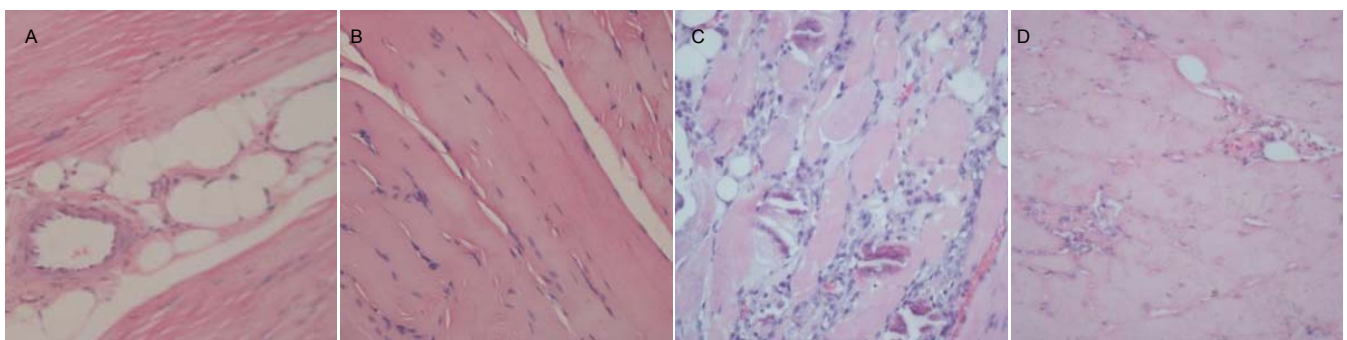


图4 小腿横纹肌组织在光学显微镜下观察($\times 200$)

Figure 4 Leg striated muscle observed under a light microscope ($\times 200$)

图注: 图中A显示无缺血组0 mT 横纹肌脂肪变性; B显示无缺血组12 mT-7 d 横纹肌细胞脂肪变性; C显示缺血组0 mT-7 d 横纹肌片状坏死、萎缩及单核细胞浸润; D显示缺血组12 mT-7 d 横纹肌空泡样变性、灶状坏死。

为表达阳性(强阳性的地方会呈现棕黄色), 选取阳性表达最多的3个区域, 400倍镜下采集图像, 通过计算机图像处理软件(IPP6.0)测定图像上黄色染色的深浅与面积, 并以黄色部分的

累积吸光度表示出来。②CD34染色计数细胞: 缺血小腿横纹肌组织中CD34阳性细胞的细胞核及细胞浆染成为棕色或棕黄色为阳性, 在显微镜下观察, 选取3个细胞阳性表达最多的

区域, 400倍镜下采集图像, 通过计算机图像处理软件(IPP6.0)计数阳性染色细胞个数, 凡染色的单个内皮细胞或内皮细胞群者均作为1个血管计数, 但肌层较厚及管腔面积大于8个红细胞直径的血管不计数, 将计数结果取平均值^[27]。

主要观察指标: ①缺血肢体跛行情况。②左右后肢体趾端皮肤温度差值。③左右股动脉多普勒彩超血流探测差值。④缺血小腿横纹肌组织光学显微镜形态观察。⑤小腿横纹肌组织缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达强度。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件对实验数据进行单因素方差分析, 所有数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 设 $\alpha=0.05$, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达量由计算机图像处理软件系统(IPP6.0)处理并计算表达强度。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 缺血组48只清洁级雄性新西兰大家兔, 肢体缺血造模过程中因麻醉死亡2只, 预备动脉粥样硬化造模家兔补充2只, 手术中出血死亡3只, 预备动脉粥样硬化造模家兔补充3只, 最终缺血组48只实验动物进入结果分析。无缺血组48只实验动物进入最终结果分析。

2.2 家兔动脉粥样硬化造模结果 应用加胆盐的高脂高胆固醇饲料200 g/(d·只)连续喂养42 d, 结果动脉粥样硬化造模成功100%(图1)。

2.3 无缺血组和缺血组双侧后肢体趾端皮肤温度差值(STHTE)及股动脉血流差值(DVAFB)分析结果 3 mT-3 d两组各指标差异均有显著性意义($P < 0.01$), 3 mT-7 d两组各指标差异均有显著性意义($P < 0.05$); 12 mT-3 d两组各指标差异均有显著性意义($P < 0.05$), 12 mT-7 d两组各指标差异均无显著性意义($P > 0.05$)。缺血组3 mT-7 d双侧后肢体趾端皮肤温度差值及股动脉血流差值均显著高于12 mT-7 d($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表2。

2.4 缺血组和无缺血组缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达强度分析结果 3 mT-3 d的缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达强度两组差异均有显著性意义($P < 0.01$), 3 mT-7 d的缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达强度两组差异均有显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$); 12 mT-3 d的缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达强度两组差异均有显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 12 mT-7 d两组缺氧诱导因子1 α 表达差异无显著性意义($P > 0.05$), 血管内皮生长因子及CD34表达差异均有显著性意义($P < 0.01$), 见表2。

2.5 缺血组缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34在第3, 7天表达强度差异分析结果 缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达3 mT-7 d均显著高于3 mT-3 d($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$); 缺氧诱导因子1 α 表达

12 mT-7 d显著高于12 mT-3 d($P < 0.05$)。但缺血组缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达12 mT-7 d较3 mT-7 d均显著增高($P < 0.01$), 见表2, 图2。

2.6 无缺血组缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34在第3, 7天表达强度分析结果 缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达3 mT-7 d与3 mT-3 d比较差异均无显著性意义($P > 0.05$, $P > 0.05$, $P > 0.1$); 缺氧诱导因子1 α 表达12 mT-7 d显著高于12 mT-3 d($P < 0.01$)。缺氧诱导因子1 α 表达12 mT-7 d较3 mT-7 d显著升高($P < 0.01$), 血管内皮生长因子及CD34表达12 mT-7 d与3 mT-7 d比较差异均无显著性意义($P > 0.05$, $P > 0.1$), 见表2, 图3。

2.7 小腿横纹肌组织在光学显微镜下观察 无缺血组为横纹肌组织脂肪样变性(图4A, B); 缺血组0 mT-7 d横纹肌浑浊肿胀、空泡样变性伴片状坏死及横纹肌萎缩伴脂肪样变性(图4C); 12 mT-7 d分别为横纹肌浑浊肿胀伴灶状坏死及脂肪样变性(图4D)。

3 讨论 Discussion

家兔动脉粥样硬化造模的成功率与高脂高蛋白饲料的组成及其构成比密切相关^[24]。在本实验中每99 g高脂高胆固醇饲料中加入胆盐1 g, 可促进高脂高胆固醇饲料中的胆固醇、猪油和蛋黄粉吸收, 提高动脉粥样硬化造模的成功率, 与谢作焯等^[24]的方法比较有较大改进。不同肢体缺血模型设计和手术方式是产生不同效果的关键^[28-33], 本实验先通过42 d的动脉粥样硬化造模, 再结扎髂总动脉造成肢体缺血, 其机制是通过开腹手术结扎髂总动脉, 保留了腰动脉与髂内动脉及其侧支动脉的交通建立, 保证了术后肢体存活需要的侧支血液循环来源。此方法与既往文献报道中股内侧切开结扎并切除股动脉及其分支相比^[34], 排除了手术创伤对缺血肢体造成的跛行, 使得术后观察家兔肢体缺血性跛行变化更加客观。

该实验家兔动脉粥样硬化造模后髂总动脉结扎肢体缺血模型与下肢动脉硬化闭塞症导致的肢体缺血具有相似的病理过程, 其具备了以下4个条件^[35-36]: ①出现一定程度的缺血。②缺血可以保持一段时间。③缺血可以通过实验测得的数值所证实。④缺血肢体和正常肢体可以进行比较。本研究0, 3, 6及12 mT分别作用3, 5及7 d, 观察缺血及对侧趾端皮肤温度及股动脉血流差值, 病理观察横纹肌组织的缺血坏死、代偿和修复的变化过程, 显示该模型完全符合上述4点要求。左右肢体对比可以消除指标检查的系统误差。研究显示缺血组趾端皮肤温度及股动脉血流差值12 mT-7 d较3 mT-7 d降低均有显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 12 mT-3 d缺血组和无缺血组的趾端皮肤温度及股动脉血流差值差异均有显著性意义($P < 0.05$), 12 mT-7 d差异均无显著性意义($P > 0.05$)。揭示该实验随着磁场强度和作用时间增加, 缺血肢体的血供明显增加。

对于低频电磁场改善缺血肢体血供的机制, 文献报

道生物组织细胞中的离子、水分子和其他分子的偶极子随正弦电磁波频率的变化而出现取向改变, 进而使这些极性分子发生旋转摆动摩擦, 产生热效应。被吸收的电磁波能在体内转变成热能促使毛细血管扩张和细胞代谢加速^[37], 增加耗氧并促进缺血肢体缺氧诱导因子1 α 和血管内皮生长因子生成。研究报道缺氧诱导因子1 α 是在缺氧条件下广泛地存在于哺乳动物和人体内的一种转录因子^[38], 它能够与靶基因结合, 通过调节转录及转录后的调控, 使机体产生对缺血、缺氧的适应性反应。缺氧诱导因子1 α 也是缺氧状态下血管生成的核心调控因子, 通过影响血管内皮生长因子及其他因子表达, 直接参与血管生成全过程^[39-40]。血管内皮生长因子是一种多功能蛋白, 可由多种细胞表达分泌, 且其表达可受多种因素的影响^[41-43]。研究报道内皮祖细胞是分化成血管内皮细胞、形成新生血管的重要细胞。目前尚缺乏高度特异性的内皮祖细胞表面标志物, CD34是目前常用内皮祖细胞识别的共同表面分子。CD34表达阳性是内皮祖细胞形成新生血管的重要特性^[44-49]。

本研究显示缺血组缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达强度3 mT-7 d均显著高于3 mT-3 d($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$); 缺氧诱导因子1 α 表达6 mT-7 d高于6 mT-3 d不显著($P > 0.05$), 血管内皮生长因子及CD34表达差异均显著(P 均 < 0.05); 缺氧诱导因子1 α 12 mT-7 d显著高于12 mT-3 d($P < 0.05$), 血管内皮生长因子及CD34表达差异不显著($P > 0.05$)。提示磁场作用强度(因素A)是促进缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达的主要因素, 作用时间(因素B)为次要因素。该研究也显示缺血组 0 mT-3 d横纹肌浑浊肿胀、空泡样变性伴片状坏死、0 mT-5 d为横纹肌间隙脂肪样变性伴有单核细胞浸润、0 mT-7 d为横纹肌萎缩伴脂肪样变性, 12 mT-3 d、12 mT-5 d及12 mT-7 d为横纹肌出现浑浊肿胀、伴灶状坏死及横纹肌萎缩伴脂肪样变性。这一过程与家兔髂总动脉结扎后造成缺血后触发缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达一致: 即12 mT-7 d明显高于3 mT-7 d(P 均 < 0.01), 与两侧股动脉血流量和趾端皮肤温度差值3 mT-7 d均显著高于12 mT-7 d(P 均 < 0.01), 也与腰动脉与髂内动脉的侧支交通建立, 改善缺血肢体血供过程一致。

该研究显示缺血组缺氧诱导因子1 α 表达12 mT-7 d显著高于12 mT-3 d($P < 0.05$), 血管内皮生长因子及CD34表达不显著($P > 0.05$, $P > 0.1$), 但缺氧诱导因子1 α 、血管内皮生长因子及CD34表达强度12 mT-7 d均显著高于 3 mT-7 d(P 均 < 0.01); 无缺血组显示缺氧诱导因子1 α 表达强度随磁场强度增强而增强, 即缺氧诱导因子1 α 表达强度12 mT-7 d 显著高于3 mT-7 d($P < 0.01$), 血管内皮生长因子及CD34强度差异均无显著意义(P 均 > 0.05), 揭示低频磁场能够明显促进缺血肢体缺氧诱导因子1 α 、

血管内皮生长因子及CD34表达, 也能促进无缺血肢体缺氧诱导因子1 α 的表达, 但对血管内皮生长因子及CD34表达作用不明显, 提示血管内皮生长因子及CD34表达除了受缺氧诱导因子1 α 的调控外还可能受其他因素的影响, 有待进一步探讨。

作者贡献: 实验设计、实验评估为张建勇, 实验实施为彭辉、陈辉及孟德凯, 资料收集为陈辉及孟德凯, 张建勇及彭辉成文, 张建勇审校, 张建勇对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 血管内皮生长因子-早期亦称作血管通透因子, 是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子, 可在体内诱导血管新生。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Criqui MH, Fronek A, Barrett-Connor E, et al. The prevalence of peripheral arterial disease in a defined population. *Circulation*. 1985;71(3):510-515.
- [2] Newman AB, Sutton-Tyrrell K, Vogt MT, et al. Morbidity and mortality in hypertensive adults with a low ankle/arm blood pressure index. *JAMA*. 1993;270(4):487-489.
- [3] Klinkert P, Schepers A, Burger DH, et al. Vein versus polytetrafluoroethylene in above-knee femoropopliteal bypass grafting: five-year results of a randomized controlled trial. *J Vasc Surg*. 2003;37(1):149-155.
- [4] van Weel V, van Tongeren RB, van Hinsbergh VW, et al. Vascular growth in ischemic limbs: a review of mechanisms and possible therapeutic stimulation. *Ann Vasc Surg*. 2008;22(4):582-597.
- [5] Kalka C, Baumgartner I. Gene and stem cell therapy in peripheral arterial occlusive disease. *Vasc Med*. 2008;13(2):157-172.
- [6] Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*. 2002;360(9331):427-435.
- [7] Hoshino J, Ubara Y, Hara S, et al. Quality of life improvement and long-term effects of peripheral blood mononuclear cell transplantation for severe arteriosclerosis obliterans in diabetic patients on dialysis. *Circ J*. 2007;71(8):1193-1198.
- [8] 刘倪, 张湘生, 雷霆, 等. 带部分松质骨小牛皮质骨支架复合兔骨髓间充质干细胞植入兔体内血管内皮生长因子的表达[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(34):6287-6292.
- [9] 孙英华, 王莉, 焦兆德. 血管内皮生长因子对异体重建后交叉韧带血管再生的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(42):8225-8229.
- [10] 樊国华. 干细胞移植干预下肢缺血性疾病[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(50):10154-10156.
- [11] 王三明, 赵刚, 胡世雄, 等. 血管内皮生长因子转染内皮祖细胞治疗大鼠缺血后肢的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2009, 26(12):1625-1627.
- [12] 马丽, 黄鲁刚, 林苹. 体外诱导脂肪干细胞向内皮细胞及成血管的分化[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(10):1730-1735.
- [13] 高延明, 张路. 骨髓间充质干细胞移植治疗糖尿病足过程中血管内皮生长因子的表达[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(40):7169-7174.

- [14] 李华, 高建华, 颜玲. 成人外周血单个核细胞体外培养过程中分化为早及晚期内皮祖细胞生物学表征[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(24):4682-4685.
- [15] Yen-Patton GP, Patton WF, Beer DM, et al. Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol.* 1988;134(1):37-46.
- [16] Matsumoto H, Kira K, Kondoh K, et al. Effects of alternately aligned static micromagnetic fields on intravascular endothelial lining. *Angiology.* 1992;43(9):757-764.
- [17] 李飞, 贾国良, 张荣庆, 等. 弱恒磁场对人脐静脉及兔主动脉内皮细胞增殖的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(6): 772, 777.
- [18] 张杰, 陆洪英, 金成文, 等. 恒磁场对人脐静脉内皮细胞增殖、凋亡及分泌功能的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2011, 33(10): 742-745.
- [19] 郭影, 李飞, 郭文怡, 等. 低频脉冲磁场对大鼠骨髓源内皮祖细胞增殖和体外血管化的影响[J]. 岭南心血管病杂志, 2009, 15(2):131-135.
- [20] 冯玉, 白文芳, 许伟成, 等. 低频电磁场促进骨髓间充质干细胞移植修复大鼠脊髓损伤的实验研究[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(32):5819-5826.
- [21] 张建勇, 陈辉, 刘小庆, 等. 磁性饲养笼的研制[J]. 新疆中医药, 2013, 31(2):5-7.
- [22] 张建勇, 彭辉, 陈辉, 等. 磁性饲养笼低频电磁场对家兔缺血肢体新生血管形成的实验研究[J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(8): 1086-1090.
- [23] 张建勇, 彭辉, 陈辉. 家兔髂总动脉结扎后不同时间缺血肢体病理变化特征研究[J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(9):1268-1271.
- [24] 谢作焯, 李梅兰, 何文芳. 家兔和大鼠实验性动脉粥样硬化的比较研究[J]. 解剖学研究, 2000, 22(2):98-101.
- [25] Babucco O, Peksoy I, Hosnuter M, et al. Evaluation by scintigraphy of hindlimb ischemia in a rat model. *J Reconstr Microsurg.* 2004;20(5):405-410.
- [26] 张刚, 谭军, 李高峰. 兔耳瓣痕成熟过程中血管内皮生长因子与缺氧诱导因子1 α 的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(7): 1191-1194.
- [27] 黄焯, 陈登峰, 袁璐, 等. 乳腺肿块微血管密度与血氧近红外光参数的实验研究[J]. 肿瘤防治研究, 2007, 34(1):51-53.
- [28] 肖建伟, 胡芸, 李翔, 等. 早期动脉硬化斑块的MSCT动物实验研究及病理学对照[J]. 实用放射学杂志, 2011, 27(12):1925-1927.
- [29] 张桂运, 王硕, 王岩, 等. 动脉粥样硬化兔不同程度血液动力性脑缺血模型的建立[J]. 同济大学学报(医学版), 2011, 32(2):15-18.
- [30] 邵娜, 陈文强, 李大庆, 等. 口服雷帕霉素抑制支架内再狭窄的血管内超声的实验研究[J]. 山东大学学报(医学版), 2011, 49(6):59-63.
- [31] 薛峰, 杜大勇, 李运田. 瑞舒伐他汀对兔动脉粥样硬化斑块内CD147的表达及斑块稳定性的影响[J]. 山西医科大学学报, 2013, 44(4):258-262.
- [32] 李运田, 杨柳, 杜大勇, 等. 白藜芦醇对兔动脉粥样硬化基质金属蛋白酶表达的影响[J]. 军医进修学院学报, 2010, 31(4): 356-357, 366.
- [33] 沈伟, 施海明, 罗心平, 等. 兔实验性动脉粥样硬化和急性心肌梗死双模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(4):318-321.
- [34] 方伟, 郭曙光, 庞荣清, 等. 兔后肢缺血模型的制作[J]. 云南医药, 2008, 29(2):126-129.
- [35] 孙晓峰, 所剑, 王琦, 等. 家兔后肢缺血模型制作[J]. 中国实验诊断学, 2009, 13(1):52-53.
- [36] Pu LQ, Jackson S, Lachapelle KJ, et al. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit. *J Invest Surg.* 1994;7(1):49-60.
- [37] 刘昭鸿, 孙崇新, 张文道, 等. 磁光复合疗法的临床研究[J]. 生物医学工程杂志, 2003, 20(2): 305-307.
- [38] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* 2003;9(6):677-684.
- [39] Mazure NM, Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Protein kinases and the hypoxia-inducible factor-1, two switches in angiogenesis. *Curr Pharm Des.* 2003;9(7):531-541.
- [40] 张刚, 谭军, 李高峰, 等. 兔耳瓣痕成熟过程中血管内皮生长因子与缺氧诱导因子1 α 的表达[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(7):1191-1194.
- [41] Kagiwada H, Yashiki T, Ohshima A, et al. Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2(4): 184-189.
- [42] Bekhite MM, Finkensieper A, Abou-Zaid FA, et al. Static electromagnetic fields induce vasculogenesis and chondro-osteogenesis of mouse embryonic stem cells by reactive oxygen species-mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor. *Stem Cells Dev.* 2010;19(5): 731-743.
- [43] 孙晓峰, 所剑, 王琦. HIF-1 α 与VEGF在动脉粥样硬化闭塞症患者缺血下肢血管及肌组织中的表达及意义[J]. 吉林大学学报:医学版, 2009, 35(2):337-340.
- [44] 董智慧, 魏征, 符伟国, 等. 纯化自体外周血CD34+细胞移植治疗下肢重度缺血[J]. 中华普通外科杂志, 2011, 26(3):184-187.
- [45] Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet.* 2002;360(9331):427-435.
- [46] Horie T, Onodera R, Akamatsu M, et al. Long-term clinical outcomes for patients with lower limb ischemia implanted with G-CSF-mobilized autologous peripheral blood mononuclear cells. *Atherosclerosis.* 2010;208(2):461-466.
- [47] 师天雄, 缪健航, 张明光, 等. 自体外周血干细胞移植治疗患者下肢动脉缺血性疾病的随访研究[J]. 中华普通外科学文献:电子版, 2008, 2(5):371-373.
- [48] 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(3):221-228.
- [49] Tepper OM, Galiano RD, Kalka C, et al. Endothelial progenitor cells: the promise of vascular stem cells for plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 2003;111(2):846-854.