

经皮迷走神经耳支刺激改善心力衰竭犬的心功能研究

赵利¹, 苏玮², 王坤¹, 郭玉君¹

(1.新疆医科大学第一附属医院心力衰竭科, 新疆 乌鲁木齐 830054;

2.贵州医科大学第二附属医院, 贵州 凯里 556000)

摘要:目的 探讨低强度经皮迷走神经耳支刺激(AB-VNS)治疗对心衰犬心功能改善情况的影响。方法 24 只 Beagle 犬均植入起搏器,分成假手术组($n=8$),心衰组($n=8$),AB-VNS 组($n=8$)。假手术组仅植入起搏器但不起搏;心衰组和 AB-VNS 组行起搏器起搏制作心衰模型,AB-VNS 组给予低强度经皮迷走神经刺激治疗 8 周。心脏超声测量射血分数(EF)和左室舒张末期直径(LVEDD);酶联免疫吸附法测定血清 NT-proBNP、CRP 和 TNF- α 浓度;电生理方法检测心率、ERP;取心肌组织做 Masson 染色观察心肌组织形态学改变。结果 经皮耳迷走神经刺激治疗 8 周后 AB-VNS 组的 EF[(53.50 \pm 2.59)%]高于心衰组[(45.17 \pm 3.06)%],LVEDD [(37.17 \pm 1.60)mm] 小于心衰组 [(53.83 \pm 6.15)mm], 差异有统计学意义 ($P<0.05$);AB-VNS 组 NT-proBNP 低于心衰组 [(388.56 \pm 40.94)pg/ml vs (674.91 \pm 56.78)pg/ml], CRP [(9.57 \pm 1.18)mg/L vs (9.57 \pm 1.18)mg/L], TNF- α [(6.40 \pm 0.63)ng/L vs (10.82 \pm 0.88)ng/L], 静息心率[(124.17 \pm 7.30)bpm vs (146.67 \pm 8.14)bpm], ERP 较心衰组延长[(158.50 \pm 5.24)ms vs (125.17 \pm 4.83)ms], 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。AB-VNS 组 Masson 染色示心肌细胞形态较规则,伴有少量胶原纤维。结论 低强度经皮迷走神经耳支刺激有助于提高心衰犬心射血分数、降低 NT-proBNP 和炎症因子,并减慢心率、延长有效不应期。

关键词:心力衰竭;迷走神经耳支;心功能;心衰犬

中图分类号:R541.6

文献标识码:A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2020.11.018

文章编号:1006-1959(2020)11-0058-04

Percutaneous Vagus Nerve Branch Stimulation Improves Heart Function in Dogs with Heart Failure

ZHAO Li¹, SU Wei², WANG Kun¹, GUO Yu-jun¹

(1.Department of Heart Failure, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China;

2.The Second Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Kaili 556000, Guizhou, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of low-intensity percutaneous vagal nerve branch stimulation (AB-VNS) on the improvement of heart function in dogs with heart failure. Methods All 24 Beagle dogs were implanted with pacemakers and divided into sham operation group ($n=8$), heart failure group ($n=8$), AB-VNS group ($n=8$). In the sham-operated group, only a pacemaker was implanted, but it was not worthwhile; the heart failure group and the AB-VNS group were paced to make a heart failure model, and the AB-VNS group was given low-intensity percutaneous ear vagus nerve stimulation treatment for 8 weeks. Cardiac ultrasound measures ejection fraction (EF) and left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD); enzyme-linked immunosorbent assay to determine serum NT-proBNP, CRP and TNF- α concentration; electrophysiological methods to detect heart rate, ERP; take myocardial tissue for Masson staining was used to observe the morphological changes of myocardium. Results After 8 weeks of percutaneous ear vagus nerve stimulation treatment, the EF [(53.50 \pm 2.59)%] in the AB-VNS group was higher than the heart failure group [(45.17 \pm 3.06)%], and the LVEDD [(37.17 \pm 1.60) mm] was smaller than the heart failure group [(53.83 \pm 6.15)mm], the difference was statistically significant ($P<0.05$); AB-VNS group NT-proBNP was lower than heart failure group [(388.56 \pm 40.94) pg/ml vs (674.91 \pm 56.78) pg/ml], CRP [(9.57 \pm 1.18) mg/L vs (9.57 \pm 1.18) mg/L], TNF- α [(6.40 \pm 0.63) ng/L vs (10.82 \pm 0.88)ng/L], resting heart rate [(124.17 \pm 7.30) bpm vs (146.67 \pm 8.14) bpm], ERP was longer than heart failure group [(158.50 \pm 5.24) ms vs (125.17 \pm 4.83) ms], the difference was statistically significant ($P<0.05$). Masson staining in AB-VNS group showed that the shape of myocardial cells was regular, with a small amount of collagen fibers. Conclusion Low-intensity percutaneous vagus nerve branch stimulation can help increase heart ejection fraction, reduce NT-proBNP and inflammatory factors, and slow heart rate and prolong the effective refractory period in dogs with heart failure.

Key words: Heart failure; Vagus nerve ear branch; Heart function; Heart failure dog

心力衰竭(heart failure)简称心衰,是各种心脏疾病的共同终末结局,也是最主要的死亡原因,目前已成为严重威胁人类健康的一大类疾病。调节自主神经失衡的状态,可以改善心衰的症状,干预自主神经成为心衰治疗的研究方向。通过增强迷走神经活性,与交感神经建立新的平衡状态,可作为心衰治疗的手段之一。本研究运用起搏器起搏制作 Beagle 犬

心衰模型,给予经皮迷走神经耳支刺激(auricular branch of the vagus nerve stimulation, AB-VNS)8 周,分析低强度迷走神经刺激改善心衰犬的心功能情况,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象 健康 Beagle 犬(8~12 周龄),体重(12.21 \pm 2.66)kg,雌雄不拘。实验设计及实施均经过新医大一附院动物伦理委员会审核批准。根据随机数字表法将实验犬分为 3 组,假手术组($n=8$),心衰组($n=8$),AB-VNS 组($n=8$)。由有经验的专业人士定时喂养。

1.2 持续快速起搏右心室致心衰犬模型的建立 本

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81660055)

作者简介:赵利(1983.6-),女,新疆喀什人,博士,主治医师,主要从事心血管疾病基础与临床研究

通讯作者:郭玉君(1974.10-),女,新疆伊犁人,硕士,副主任医师,硕士生导师,主要从事心血管疾病基础与临床研究

实验采用物理埋藏式高频起搏器起搏(250 次/min)右心室诱发犬心衰,用低频维持心衰(190 次/min)、10 周后建立充血性心衰模型。行微创开胸术,均植入起搏器。假手术组:植入起搏器但不起搏;心衰组和 AB-VNS 组植入起搏器并起搏制作心衰模型。心衰模型成功后,心衰组不予以经皮迷走神经耳支刺激,AB-VNS 组给予低强度经皮耳迷走神经刺激 8 周。

1.3 经皮迷走神经耳支刺激心衰犬 本实验用远程控制系统监测犬的血压、心率。左/右耳屏用 2 个鳄鱼夹每隔 1 d 给予 2 h 电刺激,每次一侧刺激 2 min,间隔 2 min,刺激对侧,左/右侧交替刺激,共 8 周,刺激强度为 80%的阈值电压(刺激频率 20 Hz、低强度电压 0.5~1 V,脉宽 1 ms)。刺激的电压阈值是达到窦房传导速度减慢 20%以上的最低电压。在刺激过程中用 Lead7000 记录体表心电图。

1.4 心电图记录及心室刺激 将多极电极缝合到心室的自由壁以给出程序化的心室刺激,并通过 LEAD 7000 (Lead 7000, Jinjiang Electronics, China)记录体表 ECG。进行程序化刺激以确定心室有效不应期(Ventricular Effective refractory period, VERP),并将 ERP 定义为未能做出反应的最长 S1-S2 间期。基础心脏周长 S1S1 为 300 ms,刺激率比为 8:1,步长为 -10 ms。测量了 3 次后取平均为最终的 ERP。

1.5 超声心动图检查心脏形态和功能 在动物清醒状态下行超声心动图检查,在二维超声引导下用 M 超声进行心脏功能和大小的测量,所得到的计量资料连续测量 3 个心动周期后取其平均值。测量左室舒张末内径(LVEDD)和左室射血分数(EF),EF ≤ 50%作为判断心衰发生的指标。

1.6 Masson 染色观察犬心室肌病理改变 各实验组犬左心室组织(1 mm×3 mm~1 mm×5 mm)用 10%福尔马林固定,经过石蜡包埋切片:①石蜡切片脱蜡至水,自来水和蒸馏依次水洗;②将切片用 Regaud 苏

木精染液染核 5~10 min;③将切片充分水洗,若过染可盐酸酒精分化,酒精分化后再蒸馏水水洗;④先将切片用 Masson 丽春红酸性复红液室温下泡 5~10 min;⑤将切片用 2%冰醋酸水溶液浸洗几秒钟,然后用 1%磷钼酸水溶液分化 3~5 min;⑥将切片直接用苯胺蓝 5 min,以 0.2%冰醋酸水溶液浸洗几秒钟;⑦用 95%酒精、无水酒精、二甲苯透明、中性树脂等材料封固。取玻片覆盖,显微镜下观察组织像。

1.7 血清学指标测定 采集腹壁静脉或者耳静脉血约 5 ml,室温静置 30 min,3000 r/min 离心 10 min,将血清分装于 EP 管中,于 -80 ℃冷冻保存,通过酶联免疫吸附法测定 N 末端脑钠肽前体(N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide, Nt-proBNP)、C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)和肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α, TNF-α)水平。

1.8 统计学处理 应用统计学软件 SPSS 25.0 处理实验数据。计量资料以($\bar{x} \pm s$)差表示,组内比较采用配对资料的 *t* 检验,组间比较采用独立样本 *t* 检验。计数资料以(*n*)表示。*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组 Beagle 犬心脏超声结果分析比较 心衰组 EF 基线水平及 8 周后水平均低于假手术组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);心衰组 LVEDD 基线水平及 8 周后水平均高于假手术组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);8 周后,AB-VNS 组的 EF 高于心衰组,差异有统计学意义(*P* < 0.05);AB-VNS 组的 LVEDD 小于心衰组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 1。

2.2 三组 Beagle 犬血清学指标结果比较 心衰组基线水平和 8 周后的 Nt-proBNP、CRP 和 TNF-α 均高于假手术组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。治疗 8 周 AB-VNS 组 Nt-proBNP、CRP、TNF-α 均低于心衰组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见表 2。

表 1 三组实验犬的心脏 EF 和 LVEDD 比较(*n*=8)

组别	EF(%)		LVEDD(mm)	
	基线水平	8 周后	基线水平	8 周后
假手术组	57.83±2.56	56.17±2.04	34.67±3.01	32.83±2.72
心衰组	40.00±1.79*	45.17±3.06*	52.78±2.45*	53.83±6.15*
AB-VNS 组	38.67±3.07	53.50±2.59#	51.67±4.37	37.17±1.60#

注:与假手术组比较,**P* < 0.05;与心衰组比较,#*P* < 0.05

表 2 三组实验犬的 Nt-proBNP、CRP 和 TNF-α 浓度变化(*n*=8)

组别	Nt-proBNP(pg/mL)		CRP(mg/L)		TNF-α(ng/L)	
	基线水平	8 周后	基线水平	8 周后	基线水平	8 周后
假手术组	89.15±21.18	86.27±12.73	4.75±1.29	5.20±0.80	6.37±0.91	6.31±0.85
心衰组	662.42±158.37*	674.91±56.78*	9.99±0.87*	9.57±1.18*	10.97±0.98*	10.82±0.88*
AB-VNS 组	775.13±113.78	388.56±40.94#	9.90±1.23	7.30±0.69#	11.29±0.70	6.40±0.63#

注:与假手术组比较,**P* < 0.05;与心衰组比较,#*P* < 0.05

2.3 三组 Beagle 犬基线水平和 8 周后心率和 ERP 结果比较 心衰组基线水平和 8 周后静息心率均高于假手术组,心衰组基线水平和 8 周后 ERP 均低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$)。8 周后 AB-VNS 组的静息心率低于心衰组、ERP 高于心衰组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.4 三组 Beagle 犬左心室心肌组织 Masson 染色形态学观察 假手术组犬试验结束后心肌组织:心肌

细胞大小均一,心肌细胞形态整齐,排列有序正常,心肌间质无纤维组织增生。心衰组犬试验结束后心肌组织:心肌细胞大小不一、较粗大、排列紊乱,心肌间质有胶原纤维组织,伴有炎症细胞浸润。AB-VNS 组犬试验结束后心肌组织:心肌细胞粗大,排列较心衰组整齐,总体纤维增生和炎症细胞浸润较心衰组少,部分细胞脂肪浸润,见图 1。

表 3 三组实验犬静息心率和 ERP 变化($n=8$)

组别	静息心率(bpm)		ERP(ms)	
	基线水平	8 周后	基线水平	8 周后
假手术组	120.50±3.60	115.00±4.90	152.17±4.02	154.33±4.76
心衰组	153.83±7.22*	146.67±8.14*	127.83±3.97*	125.17±4.83*
AB-VNS 组	154.83±6.15	124.17±7.30#	130.17±5.04	158.50±5.24#

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与心衰组比较,# $P<0.05$

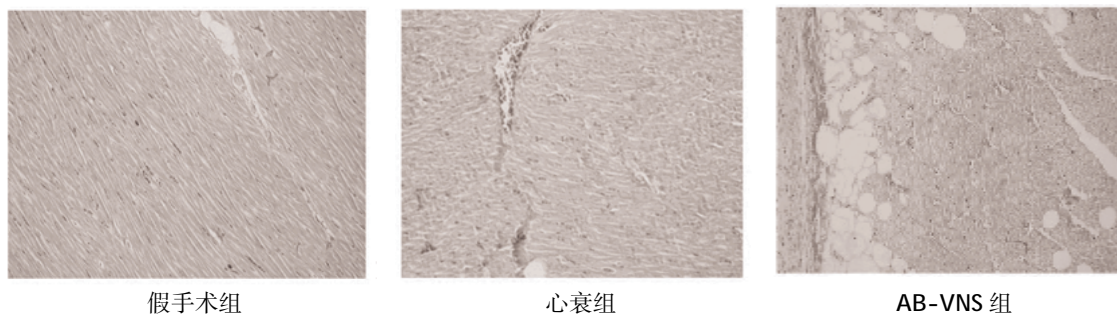


图 1 三组实验犬心肌 Masson 染色($\times 200$)

3 讨论

利用 Beagle 犬心脏植入起搏器制作心衰模型是安全且实用的心衰模型,与人的心衰状态基本相似,适合于模拟、研究人体心衰机制。本研究中,心衰组 EF 基线水平及 8 周后水平均低于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$);心衰组 LVEDD 基线水平及 8 周后水平均高于假手术组,差异有统计学意义($P<0.05$);符合心脏超声判断心衰的标准,说明心衰犬模型建立成功。

本研究心衰犬模型建立后,心衰组和假手术组不给予低强度经皮迷走神经耳支刺激,AB-VNS 组给予低强度经皮迷走神经耳支刺激,干预 8 周后心衰犬的 EF 明显提高,LVEDD 回缩,心功能得到改善,可能与增强心迷走神经活性,增强其负性变力、负性变时作用有关^[1]。本研究中,低强度迷走神经耳支刺激降低心衰犬血清 Nt-proBNP、CRP、TNF- α 浓度,炎症因子下降,考虑与延缓心肌结构重构有关。低强度迷走神经刺激延缓了左心室纤维化,并阻止左心室心肌细胞肥大,整体改善心衰症状。试验后各组给予取心肌组织做 Masson 染色,观察病理变化:AB-VNS 组炎症因子和心肌纤维组织明显减少,

进一步证实了迷走神经刺激能够降低心衰炎症因子水平、抑制心衰进一步恶化的理论^[2]。

本研究中,AB-VNS 组给予低强度迷走神经刺激后,基础心率减慢,心肌有效不应期延长;减慢心率有利于心脏充分休息并且是预防心衰进一步进展的重要因素,解释了低强度迷走神经刺激预防恶性心律失常的潜在机制。研究表明^[3,4],副交感神经系统活性减弱会导致基础心率增加和心率变异性降低,均作为自主功能障碍的标志物,与增加死亡率有关,而且较高的静息心率是心衰恶化的一个独立的危险因素^[5]。低强度迷走神经刺激在心衰中引起窦性心律减慢取决于刺激电压、刺激电流、刺激频率、刺激持续时间等,通过调整迷走神经刺激参数,可以实现窦性心律地逐渐减慢^[6]。有研究分析了近 50000 例患者的资料结果显示迷走神经刺激心动过缓发生比率较低,约为 0.1%^[7],进一步说明低强度迷走神经刺激是安全的。因心衰患者中本身存在着静息心率偏快的现象,低强度迷走神经刺激能够达到减慢心率,减少患者胸闷不适症状。

本研究中仅进行了低强度刺激,没有设高强度的刺激进行对照,在今后的实验中需要进一步完善。

(下转第 71 页)

(上接第 60 页)

AB-VNS 为经皮刺激,具有无创性,且刺激装置安全、简便、经济,更易于临床接受。心衰患者生存质量低,再住院率高,寻找更加积极有效的治疗心衰的方法,对改善心衰患者的症状,降低病死率具有重要意义,希望今后更多有关迷走神经刺激与心衰的研究,为心衰的治疗提供新思路。

参考文献:

- [1]Adair D,Truong D,Esmailpour Z,et al.Electrical stimulation of cranial nerves in cognition and disease[J].Brain Stimul,2020,13 (3):717-750.
- [2]Tanaka S,Hammond B,Rosin DL,et al.Neuroimmunomodulation of tissue injury and disease:an expanding view of the inflammatory reflex pathway [J].Bioelectron Med,2019,13 (5):13-16.
- [3]Brandt EB,Bashar SJ,Mahmoud AI,et al.Stimulating ideas for heart regeneration:the future of nerve-directed heart therapy[J].Bioelectron Med,2019,26(5):8-12.

[4]Anand IS,Konstam MA,Klein HU,et al.Comparison of symptomatic and functional responses to vagus nerve stimulation in ANTHEM -HF,INOVATE -HF,and NECTAR -HF [J].ESC Heart Fail,2020,7(1):75-83.

[5]Papademetriou V,Rashidi AA,Tsioufis C,et al.Renal nerve ablation for resistant hypertension:How did we get here present status,and future directions [J].Circulation,2014,129 (13):1440-1451.

[6]Schauerte P,Scherlag BJ,Pitha J,et al.Catheter ablation of cardiac autonomic nerves for prevention of vagal atrial fibrillation [J].Circulation,2018,102(22):2774-2780.

[7]Ardesch JJ,Buschman HP,van der Burgh PH,et al.Cardiac responses of vagus nerve stimulation:intraoperative bradycardia and subsequent chronic stimulation [J].Clinical Neurology and Neurosurgery,2017,109(10):849-852.

收稿日期:2020-04-11;修回日期:2020-04-18

编辑/肖婷婷