

· 基础研究 ·

压力超负荷心力衰竭大鼠心室肌电生理失稳态及缝隙连接蛋白 Cx43 的变化

杨 军¹, 褚 春^{2*}, 伍 卫³, 周先令¹, 全智华¹, 刘厂辉¹

(¹南华大学第一附属医院心内科, ²第二附属医院药剂科, 衡阳 421001; ³中山大学附属第二医院心内科, 广州 510120)

【摘要】 目的 观察压力超负荷所致心力衰竭(HF)大鼠心室肌电生理失稳态和缝隙连接蛋白 Cx43 表达的变化。方法 采用腹主动脉缩窄法建立压力超负荷大鼠 HF 模型, 取左室舒张末压 ≥ 15 mmHg 的存活大鼠入 HF 组, 另设假结扎对照组。术后 32 周两组大鼠以颈总动脉插管法和心脏 B 超测定心功能, 并检测电生理指标, 以免疫印迹方法检测心肌细胞 Cx43 蛋白表达的变化, 通过透射电镜观察心室肌缝隙连接分布的变化。结果 HF 大鼠出现明显电生理失稳态和心功能不全, 左室舒张末压明显增高而心室有效不应期明显延长, 左室射血分数明显下降, 同时大鼠心室肌中缝隙连接蛋白 Cx43 表达明显下调(0.929 ± 0.095 vs 1.250 ± 0.083 , $P < 0.05$)并出现空间重构。结论 压力超负荷所致 HF 大鼠心室肌存在明显缝隙连接重构, 这可能是导致 HF 时心肌电生理重构的重要机制。

【关键词】 心力衰竭; 肌细胞; 心脏; 缝隙接合部; 连接蛋白 43

【中图分类号】 R331.3⁺8

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2011)01-0066-04

Electrical instability and connexin 43 expression changes in left ventricles of pressure overload induced heart failure rats

YANG Jun¹, CHU Chun^{2*}, WU Wei³, ZHOU Xianling¹, QUAN Zhihua¹, LIU Changhui¹

(¹Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital; ²Department of Pharmaceutics, the Second Affiliated Hospital, South China University, Hengyang 421001, China; ³Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

【Abstract】 Objective To investigate the electrical instability and connexin 43 (Cx43) expression changes in left ventricles of heart failure (HF) rats induced by pressure overload. **Methods** Surgical abdominal aortic stenosis was used to prepare pressure overload induced heart failure model in SD rats. The rats with left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) ≥ 15 mmHg were categorized into HF group. Sham-operated rats served as controls. After 32 weeks, cardiac function of the rats was analyzed with carotid artery canalization and ultrasound B examination. The electrophysiological markers were also investigated. The changes in cardiac electrical instability and gap junction remodeling in left ventricles of rats were characterized by immunoblotting and transmission electron microscopy. **Results** HF rats presented obvious cardiac electrical instability and cardiac dysfunction. The heart rate, QT-interval, LVEDP and ventricular effective refractory period (VERP) increased significantly, and left ventricular ejection fraction decreased significantly in HF group. The expression of Cx43 in left ventricle was decreased significantly (0.929 ± 0.095 vs 1.250 ± 0.083 , $P < 0.05$) in HF group. Transmission electron microscopy revealed gap junction remodelling in HF rats. **Conclusion** Pressure overload induced HF rats present obvious gap junction remodelling in ventricles, which may be related to electrical instability in ventricles.

【Key words】 heart failure; myocytes, cardiac; gap junction; connexin 43

This work was supported by Young Scholars Fund of Hu'nan Provincial Education Department (08B066)

心力衰竭(heart failure, HF)是各种心脏病发展的终末阶段, 约50%的患者在泵血功能稳定状态下突然死亡, 而其原因通常为突发致死性室性心律失常所致^[1]。HF时恶性室性心律失常发生的机制与心

肌电重构密切相关。目前人们已经发现HF过程的心肌电生理重构不仅包括细胞膜离子通道的变化, 也包括细胞间缝隙连接的重构, 甚至在某些情况下后者显得更为重要。缝隙连接蛋白43(Connexin 43,

Cx43)作为心肌细胞间的主要连接蛋白,其对HF心肌电生理重构的影响近年来已经引起国内外学者的广泛重视。本研究通过建立腹主动脉缩窄性CHF大鼠模型,观察了压力超负荷所致CHF大鼠电生理失稳态改变和心室肌Cx43蛋白表达以及缝隙连接空间重构变化。

1 材料与方法

1.1 材料

24只雄性SD大鼠,体质量200~250 g,由南华大学实验动物中心提供。兔抗大鼠Cx43多抗、Cy3荧光标记羊抗兔二抗(博士德公司);辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体(Zymed),化学发光剂(Amersham公司);标准蛋白质分子量标志物(CST公司);厄贝沙坦成药(赛洛菲制药有限公司);二硫苏糖醇(DTT),丙烯酰胺,亚甲双丙烯酰胺均购自Sigma公司;其他常用生化试剂均为国产分析纯。

1.2 压力超负荷心力衰竭大鼠模型的制备

随机将大鼠分为假结扎对照组和HF组。HF组大鼠用戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔注射麻醉,在无菌条件下,腹正中线作一切口,暴露腹腔,分离腹主动脉,在大鼠肾动脉上方的腹主动脉处,用4号手术缝线将一外径为0.7 mm的钢针与腹主动脉一并结扎,然后取出钢针,造成腹主动脉缩窄。手术动物分层缝合关闭腹腔,术后肌注青霉素。对照组大鼠除了不缩窄腹主动脉外其余步骤完全与上述相同。术后32周后作心脏B超和血流动力学监测,取左室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP) ≥ 15 mmHg的大鼠入HF组。术后32周时HF组大鼠存活9只;对照组大鼠存活11只。存活大鼠由右颈总动脉插管,经BL-420E生物信号采集与处理系统(四川成都泰盟科技电子有限公司)多导生理记录,测定动脉血压和左室舒张末压,并将动脉压力波形曲线引入电脑进行实时分析。

1.3 心电生理参数测定

大鼠术后32周麻醉后气管切开插管,机械通气,于大鼠四肢置皮下电极,连接BL-420E生物信号采集与处理系统多导生理记录,记录心电图。开胸暴露心脏,右心耳留置一根钢丝电极,参考电极置于皮下,供右心房起搏。于左心室前侧壁置一对钢丝电极记录心外膜下心肌心电图,测定2组大鼠电生理指标(心率,QRS时间,QT间期,校正QT间期)。将各对电极与生物信号采集处理系统连接,信号输入电

脑。采用程序刺激仪,行程序刺激测定心室有效不应期(ventricular effective refractory period, VERP)(S₁S₂负向扫描法,8个连续起搏周S₁S₁,120 ms,刺激后于舒张晚期发放一期外刺激负向扫描,每次递减5ms,VERP为S₂不能引起心室除极的最长S₁S₂)。

1.4 Western 免疫印迹杂交分析

取大鼠左心室前壁组织标本,以9%SDS-PAGE分离细胞膜蛋白,加入细胞裂解液冰浴20 min后离心提取总蛋白。制12%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶溶液,取总蛋白样品上样电泳后转硝酸纤维素膜,含5%脱脂奶粉的PBS进行非特异性封闭、洗膜后加入第一抗体1:100杂交,4℃过夜,再用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG第二抗体1:2000孵育封闭后,用化学发光剂进行曝光。凝胶成像系统分析各电泳条带的灰阶密度值。

1.5 透射电镜下观察细胞间缝隙连接

在两组大鼠左室游离壁切取约1mm³组织块,4℃固定后经磷酸盐缓冲液浸洗,用1%的四氧化钬后固定30 min,冲洗后1%水质醋酸铀染色。依次用不同浓度乙醇4℃下逐级脱水,100%乙醇/Epon(1:1,V/V)处理后,加入含1.5% DMP-30的100%乙醇/Epon混合液,置室温下过夜。加含有2% DMP-30Epon聚合包埋。0.1%甲苯胺蓝中染色后切片。超薄切片用乙醇系列脱水,Epon8.2包埋,铅、铀染色,用日立H2600电子显微镜观察拍照。在随机的细胞间连接摄像中测定闰盘和缝隙连接长度以确定缝隙连接相对大小和数目以及单位细胞区域的闰盘长度。

1.6 统计学处理

所有数据输入计算机,用SPSS11.0统计软件包进行t检验和单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 压力超负荷心力衰竭大鼠模型的建立

HF组共12只大鼠行腹主动脉缩窄术,术后死亡3只,死亡率25%。于32周行血流动力学检测和心脏B超检查,取LVEDP ≥ 15 mmHg的动物入HF组。HF大鼠多发现有明显气促,活动迟缓,体质量减轻,处死后病理切片显示明显肺淤血和肝淤血。假结扎对照大鼠因麻醉意外死亡1只。

2.2 心力衰竭大鼠心功能的变化

两组大鼠术后32周血流动力学检测结果显示,HF组血压和LVEDP与对照组比较均有明显升高($P < 0.01$),提示心力衰竭大鼠动物模型成功建立。两

组心脏B超的结果提示HF组大鼠左室射血分数和短轴缩短率与对照组相比明显减少($P<0.01$), 而左室舒张末内径与对照组相比明显增加($P<0.01$; 表1)。

表1 两组大鼠血流动力学和心脏超声功能参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	动脉血压 (mmHg)	LVEF(%)	LVEDd (mm)	LVEDP (mmHg)
对照组	11	96±15/68±11	83±6	5.1±0.7	10±5
HF组	9	130±20/108±13**	47±10*	5.8±0.5*	37±7**

注: LVEF: 左室射血分数; LVEDd: 左室舒张末内径; LVEDP: 左室舒张末压。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.3 心力衰竭大鼠电生理参数的变化

两组大鼠术后32周经心脏电生理检测可见: HF

组大鼠校正QT间期和左心室前壁VERP均明显延长, 与对照组相比存在统计学意义的差异($P<0.05$; 表2)。同时HF组和对照组比较心率明显增快($P<0.05$)。

2.4 Western免疫印迹检测Cx43蛋白的表达

CHF组较对照组Cx43蛋白的表达明显下调(图1), 经 β 肌动蛋白(β -actin)表达量校正后的Cx43蛋白的表达量在对照组和CHF组分别是 1.250 ± 0.083 和 0.929 ± 0.095 。与对照组相比, CHF组左心室心肌组织Cx43蛋白的表达减少25.7%, 两组差异有统计学意义($P<0.05$)。

表2 两组大鼠心电生理参数测定结果的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	心率(次/min)	校正QT间期(s)	QRS时间(ms)	VERP(ms)
对照组	11	297±63	0.13±0.05	26±5	45±8
HF组	9	416±17**	0.22±0.03**	22±4	58±14*

注: VERP: 心室有效不应期。与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

2.5 电镜标本观察

术后32周对照组和CHF组大鼠心肌细胞标本透射电镜结果显示, 与假结扎对照组相比, HF组的大鼠心肌细胞缝隙连接长度明显减少($P<0.01$; 图2), HF组大鼠的心室肌的细胞间正常闰盘和缝隙连接结构明显受损, 心肌细胞排列显得较为紊乱, 同时细胞间端-端连接, 即闰盘处的缝隙连接明显减少, 而细胞侧壁的缝隙连接相对增多, 但分布零乱, 结构也显得较为松散, 侧边缝隙连接斑很多已脱离细胞膜而内陷于细胞膜的胞浆中(图3A, 3B)。而对照组的心肌细胞间闰盘结构处的缝隙连接较多, 侧壁的缝隙连接结构更为紧密和规则, 侧边缝隙连接斑很脱离细胞膜的现象相对少见(图3C)。

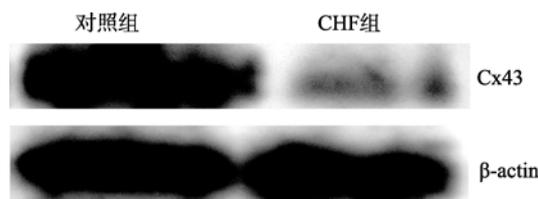


图1 Western免疫印迹法检测对照组和HF组心肌组织Cx43蛋白的表达

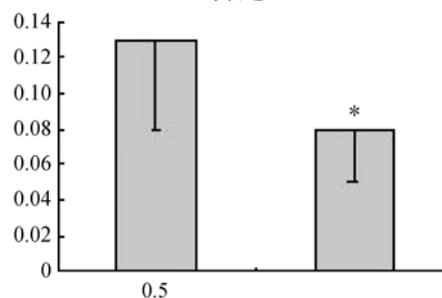


图2 单位面积中间盘缝隙连接长度的变化与对照组比较, * $P<0.05$

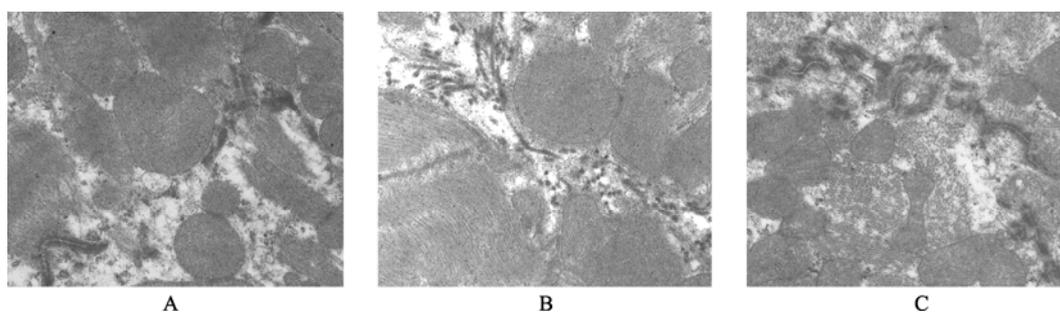


图3 透射电镜下心室肌细胞间的缝隙连接

A: HF组心肌细胞间的缝隙连接 (TEM×8900); B: HF组心肌细胞侧壁的缝隙连接 (TEM×11500); C: 对照组心肌细胞间的缝隙连接 (TEM×8900)

3 讨论

HF是各种心脏疾病发展到终末阶段而出现的死亡率很高的综合征,而其中约一半以上的患者最后死于恶性室性心律失常。缝隙连接作为心肌细胞间的电耦联和化学耦联,与心律失常及心力衰竭时的电生理重构密切相关^[1,3]。Cx43作为心室肌细胞的主要连接蛋白,在心力衰竭心肌重构过程中可以发生明显的缝隙连接重构,并对心肌电生理重构有着明显的影响。Cx43的下调不仅可明显影响心室肌细胞的传导性,由于在Cx43表达较低的区域跨壁APD离散度更大,故Cx43表达分布的不一致性还可以导致心室壁不同部位的传导时间和复极时间离散性明显增加,并与恶性室性心律失常和心源性猝死发生密切相关^[1]。为进一步探讨心力衰竭时心室肌的缝隙连接重构,本研究建立了腹主动脉缩窄的压力负荷HF大鼠模型。这种心力衰竭模型与临床上的压力负荷下充血性HF的病理生理变化过程十分相似,并可以更多地排除缺血、坏死和心肌损伤等因素对心肌缝隙连接重构的影响,是一种较为理想的研究缝隙连接重构的HF动物模型。在本实验中发现, HF过程中心室肌存在明显的缝隙连接重构, Cx43的表达明显下调,与假结扎对照组比较, HF组Cx43蛋白的表达减少25.7%。这一结果与其他学者在不同的动物模型以及临床观察中得出的结论相似^[2]。引起Cx43减少的机制目前还不清楚,但我们在体外实验中发现心肌细胞在血管紧张素II刺激72h后可导致Cx43下调^[3,4],提示HF时肾素-血管紧张素-醛固酮(RAAS)系统的激活可能参与了心力衰竭时缝隙连接重构的过程,而交感神经系统的激活也可能参与重构机制^[5]。本研究发现心力衰竭大鼠不仅动脉血压、心率和LVEDP明显增加,同时还存在明显的心肌电生理重构,校正QT间期和VERP明显延长,而通过多因素相关分析发现, VERP的延长与左室舒张末压LVEDP的增加呈正相关(结果未显示)。而心力衰竭大鼠出现的电生理失稳态可能与心力衰竭时的心室肌的缝隙连接重构有关。

有学者认为,与缝隙连接蛋白的数量下调相比,缝隙连接的空间重构对心肌电重构可能有着更大的作用^[6]。缝隙连接空间蛋白分布的零乱和异常,可导致心肌传导的各向异性,而不均匀性各向异性传导正是折返性心律失常发生的重要机制之一。我们在电镜下也看到 HF组心肌细胞侧壁的缝隙连接增多

但分布零乱,结构也显得较为松散离乱,侧边缝隙连接斑很多已脱离细胞膜而内陷在靠近细胞膜的胞浆中。这一结果与 Emdad 等^[7]心肌肥大动物模型上观察到的缝隙连接侧边化的空间重构相似,他们发现心肌肥大时缝隙连接分布和排列混乱可被血管紧张素II受体拮抗剂洛沙坦阻断。目前尚不清楚缝隙连接侧边化对传导特性究竟有何影响。但最近有一项研究显示,在心肌梗死边界区的大鼠心室肌细胞,许多侧边 GJ 斑位于肌膜内陷后的胞内,不参与细胞间的交流^[6]。在右室肥厚心肌中也观察到一个相似的结果^[9],故这一结果提示这种侧边化的缝隙连接很有可能并不能实现连接通讯的功能。因此缝隙连接的空间重构可能也参与心力衰竭时电生理失稳态的机制。

【参考文献】

- [1] Poelzing S, Rosenbaum DS. Nature, significance, and mechanisms of electrical heterogeneities in ventricle [J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004, 280(2): 1010-1017.
- [2] Pogwizd SM. Connexin 43 downregulation and dephosphorylation in nonischemic heart failure is associated with enhanced colocalized protein phosphatase type-A[J]. *Circ Res*, 2005, 96(1): 54-63.
- [3] 杨军, 伍卫. 血管紧张素对心肌细胞缝隙连接蛋白Cx43表达的时相性调控[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2008, 5(5): 371-373.
- [4] 杨军, 伍卫. 血管紧张素下调肥厚心肌细胞缝隙连接蛋白Cx43的表达[J]. *中华高血压杂志*, 2008, 16(2): 149-153.
- [5] 胡笑容, 江洪, 温华知, 等. 交感神经刺激对大鼠急性心肌缺血时连接蛋白43和室性心律失常的影响[J]. *中华医学杂志*, 2008, 88(24): 1707-1710.
- [6] Poelzing S, Rosenbaum DS. Altered connexin 43 expression produces arrhythmia substrate in heart failure[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287: H1762-H1770.
- [7] Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y, et al. Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic-banded rats: prevention by angiotensin type I receptor blockade [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(3): 219-231.
- [8] Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, et al. Remodeling of gap-junction coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension [J]. *Cir Res*, 2000, 86(8): 871-878.
- [9] Jin H, Lyon AR, Akar FG. Arrhythmia mechanisms in the failing heart[J]. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2008, 31(8): 1048-1056.