

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)07-0645-03

去辣椒素敏感性窦房结传入神经的大鼠模型的建立

张艳辉¹, 马爱群¹, 席雨涛²(¹ 西安交通大学医学院第一附属医院心内科, 陕西 西安 710061; ² 美国德克萨斯州心脏研究院, 美国 休斯顿 77030)

Modeling of capsaicin-sensitive sinoatrial node deafferented rat

ZHANG Yan-Hui¹, MA Ai-Qun¹, XI Yu-Tao²¹Department of Cardiology, First Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China, ²Texas Heart Institute, Texas 77030, USA

【Abstract】 AIM: To investigate the way to establish capsaicin-sensitive sinoatrial node deafferented rat models. **METHODS:** High concentration of capsaicin was applied around rat superior vena cava. In the postoperative 3 d, 2 weeks, 1, 2 and 3 months, we observed the expressions of sinoatrial node afferent nerve transmitters [substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP)] in the sinoatrial node area through immunofluorescent staining and laser confocal microscopy. **RESULTS:** At planned time points after the deafferentation operation and the sham operation, immunohistochemistry showed CGRP positive nerve and SP positive nerve around the sinoatrial node artery in the sham-operated rats, while there were no CGRP positive nerve and SP positive nerve in the sinoatrial node area of the deafferented rats. **CONCLUSION:** Application of high concentration of capsaicin around rat superior vena cava can induce sinoatrial node deafferentation, which is a repeatable and stable method.

【Keywords】 sinoatrial node; afferents; capsaicin; model

【摘要】目的 探讨建立去除大鼠辣椒素敏感性窦房结传入神经模型的方法。方法 在大鼠上腔静脉周围应用高浓度的辣椒素建立去辣椒素敏感性窦房结传入神经模型, 通过免疫荧光染色和激光共聚焦显微镜检测传入神经递质 P 物质 (SP) 和降钙素基因相关肽 (CGRP) 的变化。结果: 经辣椒素处理后在不同的观察时间, 激光共聚焦显微镜观察显示窦房结区域 CGRP 和 SP 阳性神经纤维消失, 而假手术组大鼠则清楚地呈现 CGRP 和 SP 的阳性神经纤维。结论: 应用高浓度的辣椒素于大鼠上腔静脉根部周围可以建立去辣椒素敏感性窦房结传入神经大鼠模型。该模型指标稳定, 造模方法可重复性强。

收稿日期 2006-08-24; 接受日期 2006-11-10

通讯作者: 马爱群. Tel (029) 85261809 Email maaqun@medmail.com.cn

作者简介: 张艳辉. 硕士生(导师马爱群). Tel (029) 85323524

Email rebeccazyh@yahoo.com.cn

【关键词】窦房结; 传入神经; 辣椒素; 模型

【中图分类号】R541.7.3 【文献标识码】A

0 引言

近年来, 一些研究者发现传入神经参与了冠心病的发病过程和心脏缺血预适应的调节机制^[1]. 而有关窦房结传入神经作用的文献报道较少. 建立去神经模型是研究神经生理病理的一种重要途径. Dainius 等^[2]通过一系列的研究认为位于上腔静脉根部周围的神经节经由心脏表面神经丛与窦房结相联系. 高浓度的辣椒素是一种高度选择性的传入神经毒素^[3]. 我们通过在去神经大鼠窦房结神经心外膜走行部位应用高浓度辣椒素建立去辣椒素敏感性窦房结传入神经模型. 旨在为进一步的揭示窦房结病理情况下传入神经的重要作用 and 病态窦房结综合征的病因与发病机制奠定基础.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级健康雄性 SD 大鼠 60 只, 6~7 wk 龄, 体质量 180~200 g, 均予正常饮食(西安交通大学医学院实验动物中心). 辣椒素(美国 Sigma 公司); Tween80(中国华美生物工程公司); OCT(日本樱花公司); Triton X-100(中国华美生物技术公司); 一抗: HCN4 兔抗大鼠 mAb 浓度为 1:200(以色列 Alomone Labs 公司); SP 兔抗大鼠 mAb 为 1:6000(美国 Chemicon 公司); 降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)小鼠抗大鼠 mAb 浓度为 1:8000(美国 Sigma 公司); 荧光二抗(中国华美生物工程公司): 山羊抗兔 IgG-FITC 浓度为 1:100; 山羊抗兔 IgG-TRITC 浓度为 1:200; 山羊抗小鼠 IgG-FITC 浓度为 1:100; 其他试剂均为国产分析纯. HX-200 动物呼吸机(成都泰盟生物技术有限公司); 202-B 型电热恒温干燥箱(北京科伟永鑫实验仪器设备厂); AG135 精密电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); HM500 O 型冰冻箱切片机(德国 Zeiss 公司); 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司).

1.2 方法

1.2.1 模型的建立 将 60 只大鼠随机分为去神经

组和假手术组,每组 30 只。再根据观察时间各组又随机分为 3 d 组、2 wk 组、4 wk 组、8 wk 组和 12 wk 组,每组 6 只。动物称重后,氯胺酮(1.5 mL/kg)腹腔注射麻醉。以自制的大鼠喉镜经口插管,固定后将气管插管接于小动物呼吸机上,开胸后在上腔静脉根部周围剪开心包,充分暴露上腔静脉,仔细分离出主动脉及其周围血管和结缔组织。去神经组大鼠经上腔静脉根部穿过经 10 g/L 辣椒素处理的试纸(宽 2~3 mm,长 2~3 cm)围绕上腔静脉根部一圈,放置 30 min。每 10 min 更换试纸 1 次,建立大鼠去辣椒素敏感性窦房结传入神经模型。假手术组动物手术用无水乙醇、Tween80 和生理盐水混合制成溶剂代替辣椒素溶液,其余手术步骤与去神经组相同。

1.2.2 窦房结传入神经递质的表达 观察各组在术后不同时间大鼠模型窦房结区传入神经递质的表达。20 g/L 戊巴比妥麻醉大鼠,取出心脏,用肝素和 PBS 冲洗心脏内残留血液。分离出窦房结,HM500 O 型冰冻箱切片垂直于界嵴切片,厚度为 10 μ m。采用文献[4]中的方法进行免疫荧光染色。一抗和二抗均由小牛血清白蛋白稀释。封片后在激光共聚焦显微镜下观察。

2 结果

手术后各组免疫荧光结果显示窦房结组织区 HCN4 免疫荧光染色呈强阳性。共聚焦显微镜观察显示假手术组大鼠 HCN4 强阳性表达的窦房结区域可见条索状不规则形的传入神经递质 P 物质(substance P, SP)阳性纤维,以窦房结动脉周围分布密度最大,结动脉壁上也有一定量分布。同样,在窦房结区域可见细线状或串珠状的 CGRP 阳性纤维,以窦房结动脉周围分布密度最大。

去神经组大鼠 HCN4 强阳性表达的窦房结区域未见到 SP 阳性纤维。而心房区域仍有一定量 SP 阳性纤维分布。窦房结区域未见到 CGRP 阳性纤维。而心房区域仍有细线状的 CGRP 阳性纤维分布。在同一大鼠中 SP 的表达与 CGRP 相比略少(图 1)。

3 讨论

以往研究者们也一直在探索着如何利用去除窦房结的神经来研究其调节作用及其机制。但是哺乳动物的窦房结本身形态结构小,支配它的神经更是难以用肉眼观察到。而且心脏的传入神经在形态上不自成系统,而是串行于交感神经和副交感神经之内,因此利用外科方法难以实现窦房结传入神经的去除。同时窦房结神经的心外走向的复杂性和不确定性为

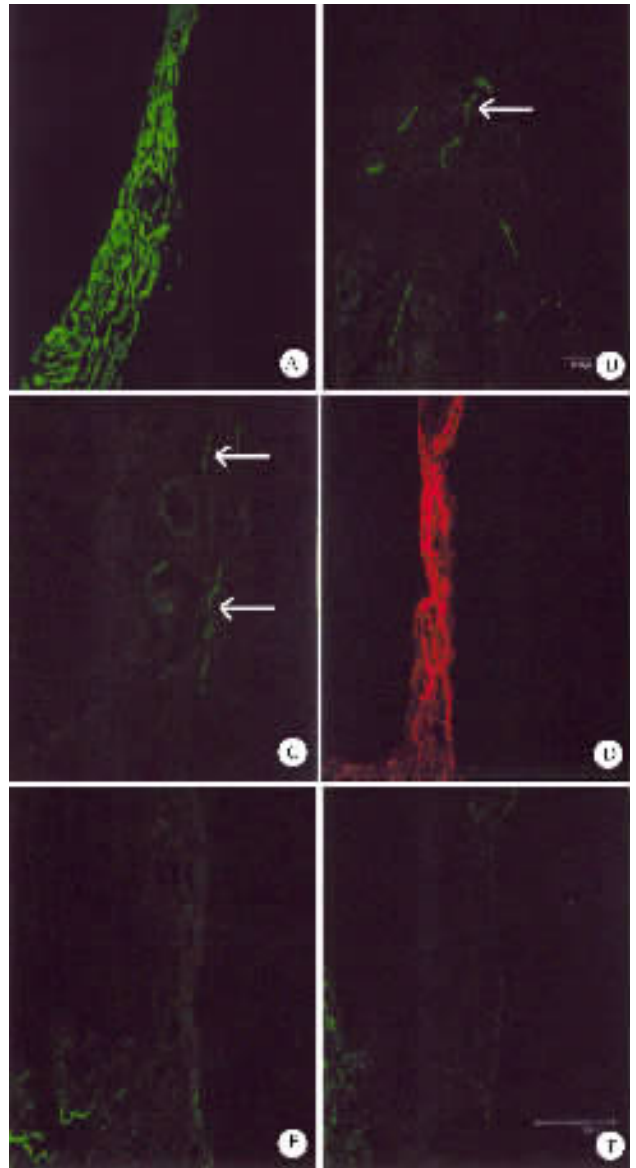


图 1 大鼠去神经组和假手术组的神经递质变化比较
A:假手术组大鼠窦房结区 HCN4 染色 FITC 标记(绿色);B:箭头所指处为假手术组大鼠窦房结区 CGRP 染色 FITC 标记(绿色);C:箭头所指处为假手术组大鼠窦房结区 SP 染色 FITC 标记(绿色);D:去神经组大鼠窦房结区 HCN4 染色 TRITC 标记(红色);E:去神经组大鼠窦房结区 CGRP 染色 FITC 标记(绿色);F:去神经组大鼠窦房结区 SP 染色 FITC 标记(绿色)。

图 1 大鼠去神经组和假手术组的神经递质变化比较

在心外神经段去除窦房结的传入神经来研究其对心血管功能和窦房结功能的影响造成一定的难度。近来 Dainius 等^[2]发现了上腔静脉根部区域为支配窦房结的神经进入窦房结的必经之路,为在心脏表面利用化学方法去除窦房结传入神经的创造了机会。心脏的神经位于心外膜内,同时在心脏传入神经上发现了有 VR1 受体(辣椒素特异性受体)^[5]。辣椒素亲脂性强,组织吸收好。心脏外膜表面应用辣椒素同样可以实现传入神经的去除。Matthew 等^[6]采用心脏外膜表面涂抹辣椒素 0.01 g/L 的方法来研究辣椒素敏感

神经对心脏源性交感神经的调节作用. Kaufman 等^[7]在上腔静脉和右心房的交界处心外膜上局部灌注辣椒素选择性的去除传入神经来研究辣椒素敏感性传入神经和局部的牵拉作用在心房利钠肽分泌过程中的作用. 我们采用心脏上腔静脉根部区域外膜表面应用辣椒素的方法去除辣椒素敏感性窦房结传入神经, 浓度为 10 g/L. 此浓度为反复试验的结果. 我们发现浓度为 5 g/L 亦可以去除辣椒素敏感性传入神经但是结果不稳定. 我们在试验中应用的浓度 10 g/L 可以较稳定的去除窦房结辣椒素敏感性传入神经.

通过传入神经递质的检测证实传入神经的去除具有高敏感性、可靠性等特点. SP 和 CGRP 是窦房结重要的传入神经递质, 两者共表达于窦房结的传入神经纤维中^[8]. Marta 等^[9]在研究辣椒素敏感性传入神经对用阿霉素建立的心肌病模型大鼠心衰发生发展过程的影响的时候也同样用免疫组织化学方法观察到心肌组织中 CGRP 阳性神经的消失来证实辣椒素敏感性传入神经的去除. Zvara 等^[10]通过大量的试验研究发现辣椒素可以耗竭传入神经递质, 可以不可逆的去除辣椒素敏感性传入神经. 本研究在术后不同的观察时间用免疫组织化学的方法检测窦房结区传入神经递质 CGRP 和 SP 的表达情况, 证实了辣椒素敏感性传入神经的去除.

【参考文献】

- [1] Tamas C, Csaba C, Peter K. Capsaicin-sensitive sensory neurons regulate myocardial nitric oxide and cGMP signaling [J]. *Eur J Pharmacol*, 2003, 476(1-2): 107-113.
- [2] Dainius H, Pauza VS, Neriga P. Ganglionated plexus in the canine right atrium: Implications for selective denervation and electrophysiology of the sinoatrial node in dog [J]. *Anat Record*, 1999, 255(3): 271-294.
- [3] 郭峰, 姜晓钟, 赵云富. 辣椒素的作用机制及其镇痛应用 [J]. *第二军医大学学报*, 2002, 23(1): 96-98.
- [4] Ming L, Sandra AJ, Jie L, et al. Requirement of neuronal and cardiac type sodium channels for murine sinoatrial node pacemaking [J]. *J Physiol*, 2004, 559(3): 835-848.
- [5] Pan HL, Chen SR. Sensing tissue ischemia: Another new function for capsaicin receptors [J]? *Circulation*, 2004, 110(13): 1826-1831.
- [6] Mathew RZ, Li DP, Chen SR. Cardiac vanilloid receptor 1 expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats [J]. *J Physiol*, 2003, 551(2): 515-523.
- [7] Kaufman S, Deng Y. Capsaicin-sensitive neural pathway mediates atrial natriuretic factor (ANF) release in response to physiological stimuli [J]. *Regul Pept*, 2004, 117(3): 175-178.
- [8] 李激. 窦房结 [M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2001: 4-5.
- [9] Marta K, Krisztina B, Peter S, et al. Selective sensory denervation by capsaicin aggravates adriamycin-induced cardiomyopathy in rats [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2004, 370(6): 436-443.
- [10] Zvara A, Bencsik P, Fodor G, et al. Capsaicin-sensitive sensory neurons regulate myocardial function and gene expression pattern of rat hearts: A DNA microarray study [J]. *FASEB J*, 2006, 20(1): 160-162.

编辑 王睿