

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)16-1449-03

心得力对心肌病大鼠心功能及心脏连接蛋白 43 表达的影响

刘平¹ 程功² 强华¹ 韩克¹ 吴格如¹ 马爱群¹(¹ 西安交通大学第一附属医院心内科 陕西 西安 710061, ² 陕西省人民医院心内科 陕西 西安 710045)

Effects of Xindly on heart function and myocardial connexin 43 protein expression in cardiomyopathy rats

LIU Ping¹, CHENG Gong², QIANG Hua¹, HAN Ke¹, WU Geru¹, MA Ai-Qun¹¹Department of Cardiology, First Affiliated Hospital, Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China, ²Department of Cardiology, People's Hospital of Shaanxi Province, Xi'an 710061, China

【Abstract】AIM: To investigate the effects of Xindly on heart function and myocardial connexin 43 (Cx43) protein expression in doxorubicin-induced cardiomyopathy rats, and to explore partly its molecular basis for treatment of cardiomyopathy. **METHODS:** Fifty male SD rats were randomly divided into 4 groups: normal group, placebo group, imidapril group and Xindly + imidapril group. After intervention for 4 weeks, ejection fraction (EF), left ventricular diastolic dimension (LVDD) and left ventricular end-systolic dimension (LVDS) were measured by Hp Sonos 2500 ultrasound inspectoscope; FITC-labeled anti-Cx43 antibody was used in immunohistochemical technology with a quantitative imaging system. **RESULTS:** The heart function was significantly improved in xindly + imidapril group than in placebo group. LVDS was better in xindly + imidapril group than in imidapril group ($P < 0.05$). The Per Area, Area, integrated optical density (IOD) of myocardial Cx43 in xindly + imidapril group were better than that in placebo group ($P < 0.05$). The Per Area in xindly + imidapril group was better than those in imidapril group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Xindly + imidapril administration is effective for the treatment of cardiomyopathy.

【Keywords】 cardiomyopathies; heart function; connexin 43; xindly

【摘要】目的:研究心得力(Xindly)对阿霉素(ADR)心肌病大鼠心功能及心脏连接蛋白 43(Cx43)的影响,部分探讨其治

收稿日期 2007-03-08; 接受日期 2007-05-22

基金项目 国家自然科学基金(30600835)

通讯作者:马爱群. Tel:(029)85323669 Email:maaiqun@hotmail.com

作者简介:刘平. 博士生(导师马爱群). Tel:(029)85324021

Email:pingdoctor@163.com

疗心肌病的分子基础。方法:SD大鼠50只随机分为正常组,ADR心肌病心衰模型组(含安慰剂组,达爽组和心得力+达爽组)。药物干预4wk用Hp Sonos 2500型多功能超声检查仪无创检测各组大鼠心脏射血分数(EF),左室舒张末内径(LVDD)左室收缩末内径(LVDS);FITC标记抗Cx43的免疫组化法染色,激光共聚焦显微镜测量Cx43荧光强度,并作图像定量分析。结果:心得力+达爽组心功能较安慰剂组改善,左室收缩末内径较达爽组改善($P < 0.05$)。心得力+达爽组Cx43的Area, Per Area, IOD均好于安慰剂组($P < 0.05$);心得力+达爽组Cx43的Per Area与西药组有统计学差异($P < 0.05$)。结论:心得力+达爽治疗心肌病有疗效。

【关键词】 心肌疾病; 心脏功能; 连接蛋白 43; 心得力

【中图分类号】 R542.2 **【文献标识码】** A

0 引言

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一种以心脏左心室和(或)右心室扩大、心肌收缩功能障碍为主要特征的原因不明的心肌疾病,即使在ACEI和 β -受体阻滞剂使用率较高、总体生存率已改善的情况下,恶性室性心律失常所导致的猝死仍是DCM患者除心力衰竭以外的重要原因^[1-2]。虽然离子通道的功能改变是心律失常发生的一个重要因素,但不正常的细胞耦联有时起主要作用^[3]。近年的研究表明,由GJ(gap junction, GJ)通道介导的心肌细胞间电耦联对心脏的电传导速度和传导的各向异性起着更为关键的决定性作用,是引起室性心律失常的重要原因^[4]。心室的间隙连接通道主要由连接蛋白43(connexin 43, Cx43)构成^[5-6]。以往的研究表明慢性缺血心肌Cx43大量降解和分布紊乱,导致心肌电传导速度和传导特性改变,并诱发心律失常的发生^[7]。为此我们以阿霉素(ADR)诱导的心肌病大鼠为模型,以心功能及心肌Cx43蛋白表达的变化为观察指标以初步探讨心得力和达爽联合治疗心肌病的分子作用机制,以探索一种比较有效的药物治疗方式,供临床参考使用。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性SD大鼠50只,体质量200~270g(由本院实验动物中心供给)。随机分为正常组(10

只)和 ADR 心肌病心衰模型组(40 只)。ADR 组腹腔注射 ADR(深圳万乐药业有限公司提供)4 次/wk, 每次 2.5 mg/kg, 共用药 2 wk^[8]。正常对照组用相同容量的生理盐水代替 ADR, 给药方法同 ADR 组。于第 6 次腹腔注射注射后 2 wk 用 Hp Sonos 2500 型多功能超声检查仪及 7.5 MHz 相控阵探头(美国惠普公司)无创检测各组大鼠心功能。根据干预方式再次将 ADR 心肌病心衰模型组(共 30 只造模成功)随机分为安慰剂组、达爽(西药)组和心得力+达爽(中西药)组, 每组 10 只。

盐酸阿霉素(深圳万乐药业有限公司)、达爽(天津田边制药有限公司)、心得力煎剂(西安交通大学药学院制, 主要含西洋参 10 g, 黄芪 15 g 等, 其中含生药 1 g/L)。其余试剂购于各试剂公司。

1.2 方法 造模成功后正常组和安慰剂组给予等体积双蒸水灌胃, 达爽组给予 1 mg/(kg·d)灌胃, 心得力[1 mg/(kg·d)]+达爽[1 mg/(kg·d)]组给予灌胃, 1 次/d, 共 4 wk。

1.2.1 心功能检测 实验结束时用 Hp Sonos 2500 型多功能超声检查仪及 7.5 MHz 相控阵探头无创检测各组大鼠射血分数(EF), 左心室舒张末内径(LVDD)左心脏收缩末内径(LVDS)。

1.2.2 染色 将组织切片晾干, PBS 洗去 OCT, 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗 10 min × 3 次, 1 mL/L tritonx-100-PBS 浸泡 30 min, PBS 洗 10 min × 3 次, 山羊血清室温下封闭 1 h, 加上特异性一抗, 为兔抗 Cx43 抗体(sigma 公司)稀释比例为 1:3000, 置于湿盒中 4℃ 过夜。PBS 洗 10 min × 3 次, 加入 FITC 标记的山羊抗兔 IgG 特异性二抗, 置于 37℃ 恒温箱中 50 min, PBS 洗 10 min × 3 次, 水溶性封片剂封片。立即在激光共聚焦显微镜下观察, 在 495 nm 波长时激发, 在 525 nm 波长时可见组织片上产生绿色荧光。

1.2.3 Cx43 蛋白表达水平的测定 利用激光共聚焦显微镜每组选取 10 张片子, 每张片子选取 5 处区域测量 Cx43 蛋白荧光强度值, 计算其平均值, 减去阴性对照组织片中相应部位的荧光强度值后, 即得到了实际荧光强度值。分别测 Cx43 面积, 平均面积及其 A 值。

统计学处理: 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 结果应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析。各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心功能的比较 药物干预 4 wk 后心得力+达爽组 EF 值、心脏舒张末内径(LVDD)、心

脏收缩末内径(LVDS)比安慰剂组改善, 且与西药组相比 LVDS 也有改善($P < 0.05$ 表 1)。

2.2 各组大鼠心肌 Cx43 结果比较 心得力+达爽组心肌 Cx43 的面积、平均面积、积分光密度与安慰剂组相比有统计学差异($P < 0.05$), 与西药组相比平均面积也有统计学差异($P < 0.05$ 表 2, 图 1)。

表 1 药物干预后各组大鼠心脏超声心功能比较

(n=10, $\bar{x} \pm s$)			
组别	EF	LVDD(mm)	LVDS(mm)
正常	78.9 ± 1.5	6.7 ± 0.28	3.86 ± 0.21
西药	74.0 ± 2.8	6.99 ± 0.44	4.26 ± 0.39 ^a
安慰剂	67.9 ± 2.6 ^a	7.86 ± 0.18 ^a	5.23 ± 0.30 ^a
中西药	77.1 ± 3.0	6.64 ± 0.55	3.98 ± 0.45

^a $P < 0.05$ vs 中西药。

表 2 药物干预后各组大鼠心肌 Cx43 表达的比较

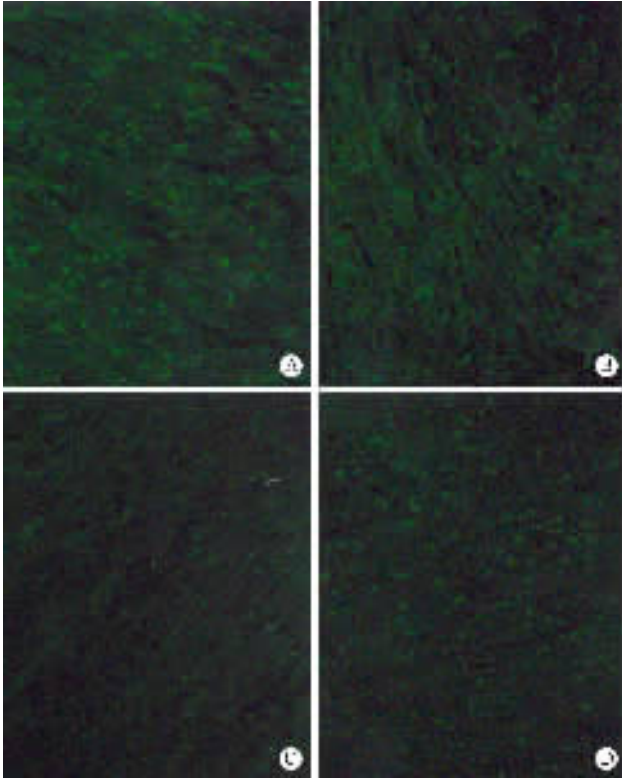
(n=10, $\bar{x} \pm s$)			
组别	面积(μm^2)	平均面积(μm^2)	A
正常	1.41 ± 0.03	4.65 ± 0.031	1.61 ± 0.032
安慰剂	1.29 ± 0.02 ^a	4.79 ± 0.027 ^a	1.48 ± 0.030 ^a
西药	1.41 ± 0.03	4.58 ± 0.030 ^a	1.58 ± 0.031
中西药	1.41 ± 0.03	4.64 ± 0.032	1.60 ± 0.034

^a $P < 0.05$ vs 中西药。

3 讨论

扩张型心肌病是以左心室或左右心室扩张和收缩功能减退为特征^[9], 为慢性充血性心衰代表性疾病。近年的研究结果表明心室重构对心功能的影响极为重要, 而在早期心室重构主要表现为心肌细胞的电重构。在此过程中心肌细胞之间及心肌细胞与基质之间的改变必然会导致缝隙连接结构(GJ)数量的改变、分布的紊乱和功能的变化^[10]。存在于心肌细胞间的间隙连接不仅是细胞间连接的一种形式, 而且还是心肌细胞间电信号快速传导的低电阻通道, 它确保了心肌电机械活动的同步有序进行。心肌细胞间广泛存在间隙连接, 对维持心肌细胞的电同步性有重要意义, 是动作电位正常一致的各向异性传播的决定因素, 对均一传播的波阵面非常重要。已证实 GJ 的改变是心肌电重构的重要原因。正常心肌细胞的间隙连接是呈簇状分布在连接心肌细胞的闰盘处, 在心力衰竭等病理状态下, 间隙连接重新分布, 导致冲动传导不均一, 这种不均一性可能是在上述病理情况下发生折返性心律失常的解剖和电生理基础。在哺乳动物心肌, 虽然可有多种 Cx 表达^[11], 但主要是

Cx43 被认为是心脏间隙连接的特有组成部分. 闰盘是 CX43 蛋白的主要分布部位, 其表达和分布的异常表示细胞膜和细胞间连接结构的破坏与功能紊乱^[6], 是产生心律失常和心功能不全的形态学基础或高危因素. 闰盘处的特殊结构, 介导细胞间电和化学信号的传递, 确保心肌细胞间电耦联与机械耦联得以正常进行^[12].



A: 中西药组 Cx43 阳性颗粒为斑点状或带状, 呈阶梯状排列主要分布于心肌细胞侧连接处, 部分在闰盘处; B: 正常组 Cx43 阳性颗粒为斑点状或带状, 呈阶梯状排列大量分布于心肌细胞侧连接处, 部分在闰盘处; C: 安慰剂组 Cx43 在心室肌细胞的分布极度紊乱, 表现为不同区域的极度增多或减少, Cx43 颗粒除存在于闰盘、细胞侧连接处外还有部分出现于细胞质中; D: 西药组 Cx43 阳性颗粒发生重排, 开始向细胞侧连接处除迁移, 呈斑点状杂乱地分布于心肌细胞的各个部位.

图1 FITC 标记的各组心肌细胞间 Cx43 染色 $\times 10^4$

本实验中正常心肌的 Cx43 阳性颗粒为斑点状或带状, 呈阶梯状排列大量分布于心肌细胞侧连接处, 部分在闰盘处. 其分布密度在心肌细胞横向较纵向高, 推测这是正常情况下动作电位在横向传导速度较纵向快的缘故. 安慰剂组 Cx43 在心室肌细胞的分布极度紊乱, 表现为不同区域的极度增多或减少, Cx43 颗粒除存在于闰盘、细胞侧连接处外还有部分出现于细胞质中, Cx43 的面积、平均面积及其积分光密度与其余三组相比有显著性差异 ($P < 0.05$). 中西药组

Cx43 阳性颗粒为斑点状或带状, 呈阶梯状排列主要分布于心肌细胞侧连接处, 部分在闰盘处. 西药组 Cx43 阳性颗粒发生重排, 开始向细胞侧连接处除迁移; 呈斑点状杂乱地分布于心肌细胞的各个部位, Cx43 的平均面积与正常组和中西药组有显著性差异 ($P < 0.05$). 可见在衰竭心肌 Cx43 的变化主要表现在其面积的减少和分布的异常, 与文献报道一致^[13].

随着近年来人们对心肌缝隙连接的深入研究, 药物对心肌缝隙连接的蛋白结构及电传导性的调控可能成为 21 世纪研究抗心律失常药的一个重要领域. 缝隙连接的重要之处在于介导冲动在细胞之间的功能偶联. 目前大多数作用于离子通道的治疗心力衰竭和心律失常药物都有许多不良反应, 因而, 中药可能成为作用于心肌缝隙连接防治心律失常药物开发的新靶点.

【参考文献】

- [1] Grimm W, Maisch B. Sudden cardiac death in dilated cardiomyopathy—therapeutic options[J]. Herz, 2002, 27: 750–759.
- [2] 程宽, 王齐兵, 杨英珍, 等. 扩张型心肌病 280 例临床分析[J]. 临床心血管病杂志, 2006, 22(7): 393–396.
- [3] Peters NS. New insights into myocardial arrhythmogenesis: Distribution of gap-junction coupling in normal ischaemic and hypertrophied human hearts[J]. Clin Sci, 1996, 90: 447–452.
- [4] 闫纯英, 林吉进, 李玉光, 等. 间隙连接通道蛋白不均一降解对心肌传导速度影响的研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2003, 11(8): 226–229.
- [5] Van kempen MJ, Fromaget C, Gros D, et al. Spatial distribution of connexin43, the major cardiac gap junction protein in the developing and adult rat heart[J]. Circ Res, 1991, 68(6): 1638–1651.
- [6] Gros DB, Jongsma HJ. Connexins in mammalian heart[J]. Bioessays, 1996, 18(9): 719–730.
- [7] Jongsma HJ, Wilders R. Gap junction in cardiovascular disease[J]. Circ Res, 2000, 86(12): 1193–1197.
- [8] 赖平, 马郁文, 杜军保, 等. 1, 6-二磷酸果糖对大鼠阿霉素心肌病的防治作用及机理的探讨[J]. 中华儿科杂志, 1997, 35(7): 368.
- [9] Richardson P, Mckenaw W, Bristow M, et al. Report of the 1995 WHO/ISFC Force on the definition of cardiomyopathy[J]. Circulation, 1996, 93: 841–842.
- [10] 毛建斌, 黄德嘉. 心肌重构过程中间隙连接的变化[J]. 心脏杂志, 2002, 14(5):
- [11] Kanter HL, Saffitz JE, Beyer EC. Cardiac myocytes express multiple gap junction proteins[J]. Circ Res, 1992, 70: 438–444.
- [12] Saffitz JE, Schuessler RB, Yamada KA. Mechanisms of remodeling of gap junction distributions and the development of anatomic substrates of arrhythmias[J]. Cardiovasc Res, 1999, 42: 309–317.
- [13] 张卫泽, 王方正. 心肌细胞缝隙连接及其与心血管病和心律失常的关系[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2002, 16(2): 146–149.