

[文章编号] 1000- 4718(2005)08- 1552- 05

伊贝沙坦和培垛普利对左心室肥大时心肌连接蛋白 43、结蛋白与肌钙蛋白 T 表达的实验研究

毛斐斐¹, 朱有法², 王 钰¹, 姜庆军³, 余小锋¹

(¹ 浙江大学附属儿童医院临床药理学室, 浙江 杭州 310003; ² 浙江大学医学院病理科, 浙江 杭州 310031;

³ 宁波市医疗中心李惠利医院心内科, 浙江 宁波 315000)

[摘要] 目的: 探讨左室肥大时血管紧张素 II 受体 I 型拮抗剂伊贝沙坦和血管紧张素转换酶抑制剂培垛普利对心肌连接蛋白 43(CX43)、结蛋白与肌钙蛋白 T(cTnT) 表达的影响。方法: 分假手术组、SD 大鼠腹主动脉部分结扎的手术组及腹主动脉部分结扎的处理组即伊贝沙坦组(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig)、培垛普利组(2 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig)、两药联用组(伊贝沙坦组 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig+ 培垛普利组 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig), 术后次周起干预 8 周, 观察左室重量指数(LVMI)和心肌细胞横径(TDM), 免疫组织化学检测心肌 CX43、结蛋白与 cTnT 表达。结果: 培垛普利组、伊贝沙坦组和联合用药组 LVMI 和 TDM 均显著低于手术组(P < 0.05), 手术组心肌细胞闰盘区域和侧侧连接的胞膜上均有不规则 CX43 表达; 伊贝沙坦组、培垛普利和其联用组的 CX43 表达分布较有规律, 主要以带状表达于闰盘; 手术组心肌 CX43、结蛋白、cTnT 表达量明显少于伊贝沙坦组、培垛普利组和其联用组(P < 0.05)。结论: 左室肥大时伊贝沙坦和培垛普利有利于心肌 CX43、结蛋白与 cTnT 的表达与分布, 能减轻左室心肌肥大, 减少心肌细胞损伤, 促进心肌细胞骨架结构与缝隙连接的基本正常恢复。

[关键词] 伊贝沙坦; 培垛普利; 血管紧张素转换酶抑制药; 连接蛋白 43; 结蛋白; 肌钙蛋白 T; 肥大, 左心室; 大鼠

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of irbesartan and perindopril on the myocardial expression of connexin 43, desmin and cardiac troponin T in rat cardiac hypertrophy induced by pressure overload

MAO Fei-fei¹, ZHU You-fa², WANG Jue¹, JIANG Qing-jun³, YU Xiao-feng¹

(¹ Department of Clinical Pharmacology, Children's Hospital, Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China;

² Department of Pathology, Medical College, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China; ³ Department of Cardiovascular

Medicine, LI Hui-li Hospital of Ningbo City, Ningbo 315000, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate the effects of angiotensin II receptor type I antagonist irbesartan and angiotensin-converting enzyme inhibitor perindopril on the myocardial expression of connexin 43 (CX43), desmin and cardiac troponin T (cTnT) in the pressure overload-induced rat cardiac hypertrophy. **METHODS:** 40 male adult Sprague-Dawley rats were divided into 5 groups (8 animals for each): sham operation group and other four groups with ventricular hypertrophy caused by banding aortic artery. Drugs were given one week after operation as follows: sham operation group, normal saline (2 mL·kg⁻¹·d⁻¹ ig) was given; Operative groups: animals with ventricular hypertrophy were treated with normal saline 2 mL·kg⁻¹·d⁻¹ ig; Treatment groups: animals with ventricular hypertrophy were treated with perindopril 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig, irbesartan 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig or irbesartan 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig plus perindopril 2 mg·kg⁻¹·d⁻¹ ig, respectively. Left ventricular mass index (LVMI), transverse diameter of myocardial cell (TDM), and myocardial expression of CX43, desmin and cTnT by immunohistochemistry were performed at the end of 8 weeks of drug intervention. **RESULTS:** LVMI, TDM were remarkably decreased after drug intervention, compared to animals of operative group (P < 0.05). Left ventricular hypertrophy induced by aortic banding in rats were associated with marked disorganization of gap junction distribution. In hypertrophied myocytes, CX43 immunolabeling was dispersed over the entire cell surface rather than confined to the intercalated disks. The CX43 were mainly distributed in the intercalated disks in irbesartan group, perindopril group and their combined group. The myocardial expression of CX43, desmin and cTnT in the operative group was lower

[收稿日期] 2004- 08- 19

[修回日期] 2004- 11- 25

Tel: 0571- 87061007- 2404

than that in irbesartan group, perindopril group and their combined group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** These data indicate that irbesartan and perindopril play beneficial roles in the myocardial CX43, desmin and cTnT expression and their distribution, and the restoration of myocardial cell structure and gap junction in pressure-overload myocardium hypertrophy.

[KEY WORDS] Irbesartan; Perindopril; Angiotensin-converting enzyme inhibitors; Connexin 43; Desmin; Troponin T; Hypertrophy, left ventricular; Rats

左心室肥大时细胞膜特性的改变可触发心电活动与收缩功能的异常^[1], 缝隙连接是直接连接邻近心肌细胞的跨膜通道, 连接蛋白 43 (connexin 43, CX43) 是其主要组成蛋白^[2]; 心肌肥大由代偿发展至失代偿阶段时可引起心肌缺血、缺氧性损伤与细胞骨架破坏、降解, 结蛋白(desmin) 是心肌细胞骨架中的中间丝蛋白, 与心肌细胞形态结构的维护与物质运输有关^[3]。本实验用大鼠腹主动脉缩窄模型, 观察心肌肥大时 CX43、结蛋白及肌钙蛋白 T (cardiac troponin T, cTnT) 的表达变化, cTnT 的主要功能是与 Ca^{2+} 结合来调控细丝与粗丝之间的滑行, 调节心肌收缩, 其表达可反映心肌缺血受损的程度^[4]; 同时观察血管紧张素 II 受体 I 型拮抗剂伊贝沙坦和血管紧张素转换酶抑制剂培垛普利对心肌肥大时 CX43、结蛋白与 cTnT 表达的影响。

材 料 和 方 法

1 动物模型与分组

成年雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 160–180 g, 购自中国科学院上海实验动物中心(中科动管第 003 号)。随机分假手术组、SD 大鼠腹主动脉部分结扎的手术组及腹主动脉部分结扎的处理组即伊贝沙坦 (Sanofi Winthrop Industries 公司, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig) 组、培垛普利 (Servier Industries 公司, $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig)、两药联用组(伊贝沙坦 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig+培垛普利 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ig), 每组 8 只鼠。手术组是指: 戊巴比妥钠 ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip) 麻醉下, 在肾动脉上方分离腹主动脉并部分结扎, 使结扎处动脉保留直径约 0.7 mm 空隙; 假手术组大鼠为游离腹主动脉后不结扎。结扎腹主动脉后次周起进行干预处理, 持续 8 周。

2 观察指标

干预结束后称体重, 戊巴比妥钠 ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip) 麻醉大鼠, 迅速取出心脏用冰生理盐水灌洗, 冲掉残留于血管与心脏内的血液, 分离左室心肌组织(包括左心室游离壁和室间隔), 滤纸吸干心肌表面水分、称重。部分左室游离壁心肌组织于 10% 中性甲醛中固定。(1) 左室重量指数(left ventricular mass index, LVWI): $\text{LVWI} = \text{左室湿重} / \text{体重} (\text{mg} / \text{g})$; (2) 心肌细胞横径(transverse diameter of myocardial cell, TDM) 测量:

心肌组织 HE 染色, 在光镜下观察各组细胞形态结构, 测量 TDM, 选择核居中的心肌细胞横切面测量, 每张切片随机测量 20 个心肌细胞, 取其均数; (3) 免疫组织化学检测 CX43、desmin、cTnT 表达水平: 切片常规处理后, 分别滴加兔抗大鼠 CX43 (1:50, Chemicon 公司)、兔抗大鼠 desmin (1:100, Neomarkers 公司)、兔抗大鼠 cTnT (1:100, Neomarkers 公司), 4 ℃ 过夜后加辣根过氧化物酶(HRP) 标志的羊抗兔 IgG (Dako 公司), 反应 30 min 后显色。

3 免疫组织化学图像分析

德国 Leica-Qwin 图像分析系统分析, 200 倍视野下分别测定连接蛋白 43、结蛋白与肌钙蛋白 T 的阳性表达面积率(视野框架面积为 $132\,951.98 \mu\text{m}^2$), 每张切片测定 5 个视野; 分别在同一光强度下测定心肌连接蛋白 43、结蛋白与肌钙蛋白 T 阳性表达的吸光度值(A)。

4 统计学处理

采用 SAS 8.0 软件包进行统计学分析, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析。

结 果

1 各组心肌组织结构的观察

结扎大鼠腹主动脉引起压力负荷性左室肥大, HE 染色病理切片显示手术组左室心肌肥大明显, 心肌细胞肥大, 胞核增大, 心肌细胞横径增加, 肌纤维排列紊乱; 单药处理组和两药联用组明显减轻左室心肌肥大, 细胞横径与假手术组相近, 胞核大小较一致, 肌纤维排列较整齐。

2 左室重量指数 (LVMI) 和心肌细胞横径 (TDM) (表 1)

经 6 周治疗后, 培垛普利组、伊贝沙坦组和联合用药组 LVMI 均显著低于手术组 ($P < 0.05$), 联合用药组 LVMI 低于培垛普利组或伊贝沙坦组 ($P < 0.05$); 药物干预组的 TDM 均显著低于手术组 ($P < 0.05$)。

3 免疫组织化学检测心肌 CX43、desmin、cTnT 的表达

假手术组心肌 CX43 阳性着色分布有规律(图 1), 主要以带状表达于闰盘, 成阶梯状排列, 少数位

于与心肌纤维长轴平行的侧侧相接部位;手术组心肌 CX43 表达不仅仅分布于闰盘区域,而且分布在侧侧连接的胞膜上,呈环状包绕心肌细胞;伊贝沙坦组、培垛普利组和联用组的 CX43 表达分布较有规律,呈带状主要表达于闰盘,细胞侧侧相接部位的表达较少,与假手术组类似。假手术组心肌 desmin、cTnT 的阳性着色分布有规律、染色清晰、呈横纹状(图 2 3),它们在手术组部分心肌表达呈灶状缺失,横纹样结构不明显;伊贝沙坦组、培垛普利组和其联用组

的心肌 desmin、cTnT 呈较均匀表达,横纹样结构较清晰,但染色较浅。病理半定量评分显示(表 2 3),假手术组心肌 CX43、desmin 和 cTnT 表达强于手术组与伊贝沙坦组、培垛普利和其联用组($P < 0.05$),手术组心肌 CX43、desmin 和 cTnT 表达量明显少于伊贝沙坦组、培垛普利组和其联用组($P < 0.05$),心肌 CX43、desmin 和 cTnT 表达程度在伊贝沙坦组、培垛普利组和两药联用组之间无明显差异。

表 1 大鼠压力负荷造成左心室肥大时伊贝沙坦、培垛普利及其联用对 LVMI、TDM 的影响

Tab 1 The effect of irbesartan, perindopril and their combination on left ventricular mass index (LVMI), transverse diameter of myocardial cell (TDM) in the pressure overload-induced rat cardiac hypertrophy ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

	Sham	Control	Perindopril	Irbesartan	Combination
LVMI(mg/g)	2.03 ± 0.16	2.99 ± 0.16*	2.39 ± 0.16	2.36 ± 0.13	2.14 ± 0.12
TDM(μm)	10.79 ± 0.39	15.13 ± 0.35*	11.73 ± 0.37	11.59 ± 0.42	11.43 ± 0.33

* $P < 0.05$ vs sham, perindopril, irbesartan, and combination group.

表 2 大鼠压力负荷造成左心室肥大时心肌连接蛋白 43、结蛋白与肌钙蛋白 T 的阳性面积表达率

Tab 2 The effect of irbesartan, perindopril and their combination on the positive expression ratio of myocardial connexin43, desmin, cardiac troponin T (cTnT) by immunohistochemistry in the pressure overload-induced rat cardiac hypertrophy ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

	Connexin43	Desmin	cTnT
Sham	0.124 ± 0.021*	0.536 ± 0.039*	0.468 ± 0.052*
Control	0.032 ± 0.006**	0.242 ± 0.042**	0.281 ± 0.078**
Perindopril	0.071 ± 0.014	0.400 ± 0.049	0.375 ± 0.054
Irbesartan	0.066 ± 0.018	0.372 ± 0.087	0.371 ± 0.046
Combination	0.089 ± 0.017	0.425 ± 0.065	0.394 ± 0.052

* $P < 0.05$ vs control, perindopril, irbesartan, and combination group;

** $P < 0.05$ vs perindopril, irbesartan, and combination group.

表 3 大鼠压力负荷造成左心室肥大时心肌连接蛋白 43、结蛋白与肌钙蛋白 T 表达的光密度

Tab 3 The effect of irbesartan, perindopril and their combination on the optical density of myocardial connexin43, desmin, cardiac troponin T (cTnT) expression by immunohistochemistry in the pressure overload-induced rat cardiac hypertrophy ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

	Connexin43	Desmin	cTnT
Sham	0.424 ± 0.039*	0.277 ± 0.012*	0.372 ± 0.021*
Control	0.248 ± 0.041**	0.158 ± 0.042 [△]	0.156 ± 0.036**
Perindopril	0.376 ± 0.094	0.219 ± 0.012	0.242 ± 0.044
Irbesartan	0.345 ± 0.047	0.205 ± 0.018	0.248 ± 0.053
Combination	0.364 ± 0.051	0.223 ± 0.024	0.284 ± 0.045

* $P < 0.05$ vs control, perindopril, irbesartan, and combination group;

** $P < 0.05$ vs perindopril, irbesartan, and combination group; [△] $P < 0.05$ vs combination.

讨 论

压力负荷性左室肥大时呈现明显的细胞缝隙连接排列紊乱, CX43 在闰盘分布减少、细胞侧-侧面和其表面的免疫组化阳性表达增多,呈无序排列,与哺乳动物胚胎期和新生儿期的特征相似,即缝隙连接分布于整个细胞表面,随着出生后年龄增长缝隙连接逐渐分布于成熟的闰盘^[5];临床代偿性心肌肥大时 CX43 表达量多且主要分布于闰盘,心肌肥大失代偿时 CX43 表达量减少且闰盘分布减少、细胞侧-侧面和其表面分布显著增加^[6]。血管紧张素 II 明显上调新生大鼠心室心肌细胞 CX43 表达^[7],血管紧张素 II 受体 I 型拮抗剂伊贝沙坦和血管紧张素转换酶抑制剂培垛普利均能明显改善心肌细胞缝隙连接的塑型与显著减少左室肥大^[8]。这提示腹主动脉结扎诱导压力负荷性左室肥大时机体血管紧张素 II 水平上升,血管紧张素 II 可能有助于缝隙连接的分布向新生儿期转化;血管紧张素 II 受体 I 型拮抗剂和血管紧张素转换酶抑制剂促进 CX43 以闰盘为主的有序分布,使细胞纵向阻抗减少,冲动传导速度增加,减少心律失常发生的病理基础。

结蛋白为心肌细胞骨架中间丝蛋白,在肌节 Z 线浓集,形成横纹,并与其它收缩装置、线粒体和细胞核等相联系,在核孔处与核骨架 Lamine B 相锚着,其功能是提供张力支持、保持细胞形态、提供生化反应的支架、参与物质运输,极可能与基因表达调节和信息传导有关^[3, 9]。心肌缺血所致终末期心衰时心肌结蛋白表达显著减少与心功能明显减低有关^[10],结蛋白缺乏的小鼠心肌发生进行性变性、坏死并广

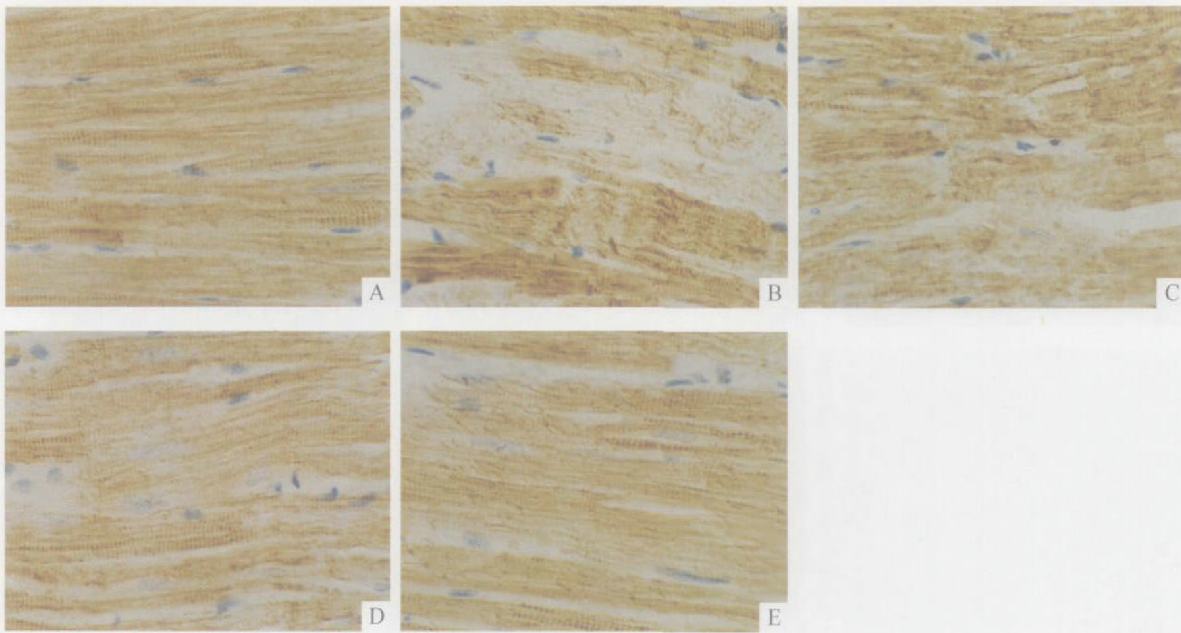


Fig 3 The expression of cardiac troponin T by immunohistochemistry assay (× 600). Photograph shows that the expression degree of cardiac troponin T in operative group was significant less than that in any other group. A: sham group; B: operative group; C: perindopril group; D: irbesartan group; E: combination group.

图3 免疫组织化学法检测心肌肌钙蛋白 T 表达

可能与心肌肥大所引起心肌缺血缺氧有关, 促发细胞膜通透性增加、破裂, cTnT 可从细肌丝上分离、脱落^[11]。

[参 考 文 献]

- [1] Levy D, Anderson KM, Savage DD, et al. Risk of ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: the Framingham heart study[J]. *Am J Cardiol*, 1987, 60(3): 560- 565.
- [2] Severs NJ, Rothery S, Dupont E, et al. Immunocytochemical analysis of connexin expression in the healthy and diseased cardiovascular system[J]. *Microsc Res Tech*, 2001, 52(3): 301- 322.
- [3] Milner DJ, Weitzer G, Tran D, et al. Disruption of muscle architecture and myocardial degeneration in mice lacking desmin[J]. *J Cell Biol*, 1996, 134(10): 1255- 1270.
- [4] 邓大中, 陈玉川, 胡丙杰, 等. 大鼠早期心肌缺血心肌肌钙蛋白 T 脱失的免疫组化研究[J]. *法医学杂志*, 2002, 18(1): 12- 14.
- [5] Angst BD, Khan LUR, Severs NJ, et al. Dissociated spatial patterning of gap junctions and cell adhesion junctions during postnatal differentiation of ventricular myocardium[J]. *Circ Res*, 1997, 80(1): 88- 94.
- [6] Kostin S, Dammer S, Hein S, et al. Connexin 43 expression and distribution in compensated and decompensated cardiac hypertrophy in patients with aortic stenosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2): 426- 436.
- [7] Dodge SM, Beardslee MA, Darrow BJ, et al. Effects of angiotensin II on expression of the gap junction channel protein connexin43 in neonatal rat ventricular myocytes[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 32(3): 800- 807.
- [8] 姜庆军, 徐 耕, 朱有法. 伊贝沙坦和培垛普利对大鼠压力负荷性心肌肥厚的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(5): 827- 831.
- [9] Lockard VG, Bloom S. Trans- cellular desmin- lamin B intermediate filament network in cardiac myocytes[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1993, 25(3): 303- 309.
- [10] Somma D, Benedetto D, Salvatore G, et al. Desmin- free cardiomyocytes and myocardial dysfunction in end stage heart failure S[J]. *Eur Heart J Fail*, 2004, 6(4): 389- 398.
- [11] Silverman HS, Stern MD. Ionic basis of ischaemic cardiac injury: insights from cellular studies [J]. *Cardiovasc Res*, 1994, 28(5): 581- 592.