

[文章编号] 1007-3949(2007)15-09-0683-04

• 实验研究 •

心力衰竭大鼠心脏缝隙连接蛋白 43 的变化 及厄贝沙坦的干预作用

杨 军¹, 全智华¹, 谭小进¹, 刘产辉¹, 龙霞英¹, 伍 卫²

(1. 南华大学附属第一医院心内科, 湖南省衡阳市 421001; 2. 中山大学附属第二医院心内科, 广东省广州市 510120)

[关键词] 内科学; 心力衰竭; 缝隙连接蛋白 43; 厄贝沙坦; 心肌细胞

[摘要] 目的 观察压力超负荷所致心力衰竭大鼠心室肌中缝隙连接蛋白 43 表达的变化以及厄贝沙坦对心力衰竭时缝隙连接重构的干预作用。方法 采用腹主动脉缩窄法建立大鼠心力衰竭模型, 随机分为厄贝沙坦组和心力衰竭组, 分别用厄贝沙坦(50 mg/kg)和安慰剂治疗, 另设假手术对照组。术后 16 周用颈总动脉插管法测定心功能, 用免疫印迹法检测心肌细胞缝隙连接蛋白 43 蛋白表达的变化, 并以透射电镜观察缝隙连接空间重构的变化。结果 心力衰竭大鼠心室肌中缝隙连接蛋白 43 表达明显下调并出现空间重构, 厄贝沙坦可明显上调缝隙连接蛋白 43 蛋白的表达并改善缝隙连接的空间重构。结论 压力超负荷所致心力衰竭大鼠心室肌存在明显缝隙连接重构, 这可能是心力衰竭时心肌电生理重构的机制之一, 而此过程与血管紧张素 II 的作用有关, 血管紧张素受体拮抗剂厄贝沙坦可以明显改善心力衰竭时出现的缝隙连接重构。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Irbesartan on Connexin 43 Expression and Space-Remodeling in Left Cardiac Ventricles of Congestive Heart Failure Rats

YANG Jun¹, QUAN Zhi-Hua¹, TANG Xiao-Jing¹, LIU Chan-Hui¹, LONG Xia-Ying, and WU Wei²

(1. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, China; 2. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China)

[KEY WORDS] Heart Failure; Connexin 43; Irbesartan; Myocardial; Gap Junction Remodeling

[ABSTRACT] Aim To determine the effects of irbesartan on gap junction remodeling and expression of connexin 43 (Cx43) in left cardiac ventricle of congestive heart failure (CHF) rats. Methods A heart failure model of experimental pressure overload induced by surgical abdominal aortic stenosis in adult SD rats was used. The rats with heart failure were confirmed by measuring the hemodynamic parameters and divided randomly into the group treated with irbesartan (50 mg/kg) and placebo. Sham operated (PS) group rats served as negative controls after 16 weeks. Sixteen weeks later, gap junction remodeling in left cardiac ventricle of rats in sham operated group, the irbesartan group, and placebo group was characterized by immunoblotting and electron microscopy. Results Compared with Sham operated group, the expression of Cx43 in left ventricles from failing hearts in the placebo group was decreased 25.7% (0.929 ± 0.095 vs 1.250 ± 0.083 , $P < 0.05$), the expression of Cx43 in left ventricles from irbesartan group increased to the same level of Sham operated group. Electron microscopy of LV tissue revealed that in contrast to left ventricles myocytes from Sham operated group, which showed Cx43 labeling largely confined to the intercalated disks, left ventricles myocytes from rats in placebo group showed dispersion of punctate Cx43 labeling over the entire cell surface. The proportion of Cx43 label at the intercalated disk decreased significantly. In rats from irbesartan group, the gap junction disorganization was markedly reduced. Conclusion In left ventricles from failing hearts, the expression of Cx43 decreased, while the expression of Cx43 in left ventricles from rats treated with irbesartan increased significantly. Meanwhile, Irbesartan can improve space remodeling of gap junction in failing hearts.

心力衰竭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, 而死亡原因通常为突发致死性室性心律失常所致^[1]。心力衰竭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, 已发现心力衰竭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改变, 甚至在某些情况下后者显得更为重要。近年来, 缝隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 作为心肌细胞缝隙连接的主要连接蛋白对心肌电生理重构的影响已经引起国内外学者的重视。人们已经在各种心力衰竭动物模型和心力衰竭患者临床观察中都发现心肌存在明显的缝隙连接重构, 并通常都伴随着心肌电生理失稳态的表现。

[收稿日期] 2007-07-05 [修回日期] 2007-09-01

[作者简介] 杨军, 博士, 主治医师, 主要从事冠心病和电生理研究, E-mail 为 yangjunen@163.com。全智华, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病和动脉粥样硬化研究。通讯作者伍卫, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事电生理研究及干细胞研究。

心机的缝隙连接重构对心力衰竭时的心肌电生理失稳态有着极其重要的影响。已有研究证实血管紧张素 ① 对心肌的电生理重构和缝隙连接重构有着明显的影响,同时大量实验研究和一些大规模临床试验的结果也证实血管紧张素受体拮抗剂可以明显降低心源性猝死发生率,而血管紧张素受体拮抗剂改善心力衰竭时电生理重构的机制是否通过改善缝隙连接重构的机制目前仍缺乏足够的实验依据。本研究通过建立腹主动脉缩窄性心力衰竭大鼠模型,观察压力超负荷所致心力衰竭大鼠心室肌Cx43表达的变化以及厄贝沙坦对心力衰竭时缝隙连接重构的干预作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

兔抗大鼠Cx43多抗、GAPDH多抗、CY3荧光标记羊抗兔二抗和FITC荧光标记羊抗兔二抗购自博士德公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体购自Zymed公司;标准蛋白质分子量Marker购自CST公司;厄贝沙坦成药购自赛洛菲制药有限公司;二硫苏糖醇(DTT)、丙烯酰胺和亚甲双丙烯酰胺购自Sigma公司;其它常用生物化学试剂均为国产分析纯。实验动物采用标准雄性SD大鼠,体重150~200g,购自中山大学实验动物中心。

1.2 压力超负荷心力衰竭模型的制备

将大鼠随机分为假手术组、心力衰竭组和厄贝沙坦组。各组大鼠均用戊巴比妥钠35mg/kg腹腔注射麻醉,在无菌条件下,腹正中中线作一切口,暴露腹腔,心力衰竭组和厄贝沙坦组大鼠在肾动脉上方的腹主动脉处用4号手术缝线将一外径为0.6mm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,分层缝合关闭腹腔,术后肌注青霉素。假手术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16周行血流动力学检测,取左心室舒张末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP) ≥ 15 mmHg的动物进入实验。厄贝沙坦组通过灌胃的方法每天给予厄贝沙坦(50mg/kg,用1%纤维素钠混匀)治疗,而假手术组和心力衰竭组则用纤维素钠替代,灌胃给药16周。

1.3 免疫印迹杂交分析

以9%SDS-PAGE分离所取左心室前壁标本细胞膜蛋白,加入细胞裂解液冰浴20min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,再用第二抗体1:2000孵育封闭后,用化学发光剂进行曝光。放射自显影于X光胶上。凝胶成像系统分析各电泳条带的灰阶密度值。

1.4 透射电镜观察

自左心室游离壁切取数块大小约1mm³组织块,放入2.5%戊二醛多聚甲醛固定液中,4℃固定2h以上,经磷酸缓冲液浸洗后,用1%四氧化锇后固定30min,蒸溜水冲洗3次,每次5min,1%水质醋酸铀染色。依次用20%、30%、50%、70%、90%和100%乙醇4℃逐级脱水,每个浓度乙醇的作用时间2min,最后100%乙醇4℃脱水2次,每次5min。100%乙醇/Epon(1:1,体积比)的混合物处理2次,每次10min,吸去100%乙醇/Epon混合液,加入含1.5%DMP-30的100%乙醇/Epon混合液,置室温下过夜。次日从培养板中吸去含1.5%DMP-30的100%乙醇/Epon混合液,加新配制的含有2%DMP-30Epon,厚约5mm,置60℃烤箱内48h聚合包埋。聚合包埋物从培养板中取出,漂浮在预热至50℃的0.1%甲苯胺兰中染色1h。切取代表性区域,修块后,LKB超薄切片机用钻石刀进行切片(40~60 μ m)。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。形态学分析参照Luke等^[2]方法,在随机的细胞间连接摄像中测定闰盘缝隙连接长度。

1.5 统计学分析

采用SPSS 10.0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,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠心力衰竭模型的建立

共60只大鼠行腹主动脉缩窄术,术中因麻醉意外死亡2只,术后死亡13只,于16周行血流动力学检测,LVEDP ≥ 15 mmHg为心力衰竭大鼠。心力衰竭大鼠随机分为心力衰竭组和厄贝沙坦组,分别为23只和22只,假手术组大鼠20只。

2.2 电镜下心肌细胞缝隙连接变化

厄贝沙坦组大鼠心肌细胞的闰盘缝隙连接长度明显多于心力衰竭组($P < 0.01$),而心力衰竭组大鼠心肌闰盘缝隙连接长度明显少于假手术组($P < 0.01$),厄贝沙坦组和假手术组两组间的差异无统计学意义。心力衰竭组大鼠心室肌的正常闰盘结构和

缝隙连接结构明显受损, 心肌细胞排列显得较为紊乱, 同时细胞间端一端连接, 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质中; 而厄贝沙坦组心肌细胞间闰盘结构处的缝隙连接明显增加, 侧壁的缝隙连接结构更为紧密和规则, 侧边缝隙连接斑脱离细胞膜的现象相对少见(图 1 和 2)。

2.3 缝隙连接蛋白 43 蛋白的表达

Cx43 蛋白的表达量在假手术组、心力衰竭组和厄贝沙坦组分别是 1.250 ± 0.083 、 0.929 ± 0.095 和 1.367 ± 0.094 , 心力衰竭组 Cx43 蛋白的表达较假手术组减少 25.7% ($P < 0.05$), 厄贝沙坦组 Cx43 蛋白

的表达较心力衰竭组明显增加($P < 0.05$; 图 3)。

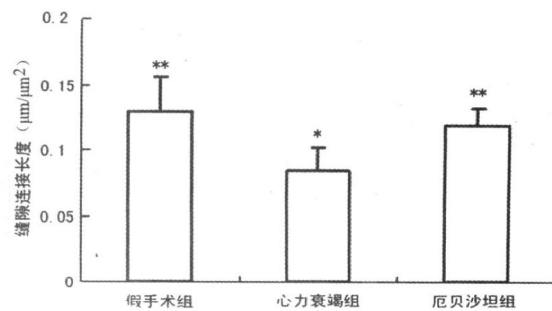


图 1. 电镜观察下单位面积闰盘缝隙连接长度的变化 * 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; ** 为 $P < 0.05$, 与心力衰竭组比较。

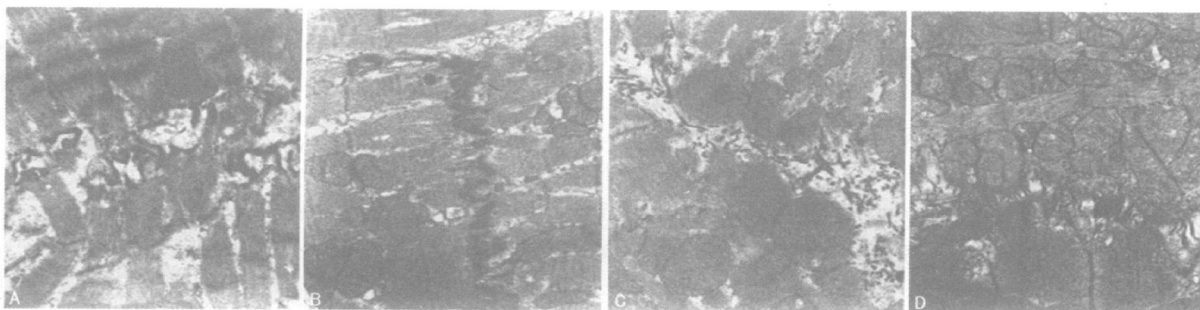


图 2. 透射电镜下的心肌缝隙连接 ($\times 5750$) A 为心力衰竭组心肌组织闰盘中的缝隙连接, B 为厄贝沙坦组心肌组织闰盘中的缝隙连接, C 为心力衰竭组心肌细胞侧壁的缝隙连接, D 为厄贝沙坦组心肌细胞侧壁的缝隙连接。



图 3. 免疫印迹法检测心肌缝隙连接蛋白 43 蛋白的表达

3 讨论

心力衰竭是各种心脏疾病发展过程中出现心功能不全的综合征, 其中约一半以上的患者死于室性心律失常。缝隙连接(GJ)作为心肌细胞间的电耦联和化学耦联, 目前已有研究证实与心律失常及心功能不全的关系非常密切^[3]。Cx43 作为心室工作肌细胞的主要连接蛋白, 在心力衰竭发生发展过程中可以发生明显的重构变化, Cx43 表达减少并伴有分布异常。研究发现终末期心衰时 Cx43 明显下调^[4,5]。也有研究进一步证实心力衰竭患者心肌中 Cx43 基因和蛋白表达都明显下调^[6,8]。心力衰竭时

Cx43 表达的下调对心力衰竭时的电生理重构有着明显的影响, 而在 Cx43 表达较低的区域跨壁 APD 离散度更大, Cx43 表达分布的不一致性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, 这可能是导致引起心力衰竭时恶性室性心律失常和心源性猝死发生的一个重要机制^[9]。为进一步探讨心力衰竭时缝隙连接重构的机制, 本研究建立了腹主动脉缩窄性大鼠心力衰竭模型, 这种心力衰竭模型与临床上的压力负荷下充血性心力衰竭的病理生理变化过程十分相似, 并可以更多的排除缺血、坏死和心肌损伤等因素对心肌缝隙连接重构的影响, 是一种较为理想的心力衰竭动物模型。本研究发现, 心力衰竭过程中心肌存在明显的缝隙连接重构, Cx43 的表达明显下调, 心力衰竭组 Cx43 蛋白的表达较假手术组减少 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^[4,8]。

引起 Cx43 减少的机制现在还不清楚, 但我们在体外实验中发现心肌细胞在血管紧张素 E 刺激 72 h

后可导致 Cx43 的下调,提示心力衰竭时 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^[10]。本实验中也证实灌服厄贝沙坦可以明显改善心力衰竭大鼠的缝隙连接重构,提示血管紧张素 ① 受体信号通路可能参与心力衰竭时心肌的缝隙连接重构过程。在使用洛沙坦干预压力超负荷所致心肌肥大时发现,心肌缝隙连接重构可被血管紧张素 ① 受体拮抗剂洛沙坦阻断^[9]。本实验结果也进一步提示血管紧张素 ① 对心力衰竭过程中的缝隙连接重构可能起着重要作用,而血管紧张素 ① 受体拮抗剂可以抑制心力衰竭时心肌的缝隙连接重构。

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^[11,12]。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。心肌肥大时缝隙连接的空间重构主要表现为 GJ 的侧边化,心肌肥大时缝隙连接分布和排列混乱可被 Ang ② 受体拮抗剂洛沙坦阻断^[9]。而本实验在电镜下观察发现心力衰竭组大鼠心室肌闰盘区的缝隙连接减少,排列紊乱,心肌细胞侧壁的缝隙连接松散离乱,侧边大量 GJ 斑内陷胞质中。但厄贝沙坦可以改善心力衰竭时心室肌缝隙连接的空间重构。目前尚不清楚的是缝隙连接侧边化对传导特性究竟有何影响,但最近有一项研究发现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^[11]。在右心室肥厚心肌中也观察到一个相似的结果^[13],故这一结果提示这种明显空间重构区的侧边化缝隙连接很有可能并不能实现连接通讯的功能。而厄贝沙坦明显改善心力衰竭时缝隙连接侧边化的空间重构,减少 GJ 斑内

陷对于其改善心力衰竭时心肌的电生理失稳态和电生理重构可能有着重要的意义。

[参考文献]

- [1] 方明,彭健. 血管紧张素 ① 型受体与高血压左心室重构[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (5): 457-460.
- [2] Luke R, Saffitz JE. Remodeling of ventricular conduction pathways in healed canine in far border zones [J]. *J Clin Invest*, 1991, **87** (4): 1594-602.
- [3] Severs NJ, Coppens SR, Dupont E, Yeh HI, Ko YS, Matsushita T. Gap junction alteration in human cardiac disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, **62** (2): 367-376.
- [4] Hall DG, Morley GE, Vaidya D, Ard M, Kimball TR, Witt SA, et al. Early onset heart failure in transgenic mice with dilated cardiomyopathy [J]. *Pediatr Res*, 2000, **48** (1): 36-42.
- [5] Dhein S, Polontchouk L, Salameh A, Haefliger JA. Pharmacological modulation and differential regulation of the cardiac gap junction proteins connexin 43 and connexin 40 [J]. *Biol Cell*, 2002, **94** (7-8): 409-422.
- [6] Dupont E, Matsushita T, Kaba RA, Vozzi C, Coppens SR, Khan N, et al. Altered connexin expression in human congestive heart failure [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, **33** (2): 359-371.
- [7] Yamada KA, Rogers JG, Sundset R, Steinberg TH, Saffitz JE. Up-regulation of connexin45 in heart failure [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2003, **14** (11): 1205-212.
- [8] 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.
- [9] Poelzing S, Rosenbaum DS. Nature, significance, and mechanisms of electrical heterogeneities in ventricle [J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2004, **2**: 1010-017.
- [10] 杨军,伍卫,梁蔚文,王景峰,方昶,黄至斌. 血管紧张素 ② 诱导心肌细胞肥大后缝隙连接蛋白 Cx43 表达的变化[J]. 中山大学学报(医学版), 2007, **28** (3): 292-296.
- [11] Emdad L, Uzzaman M, Takagishi Y, Honjo H, Uchida T, Severs NJ, et al. Gap junction remodeling in hypertrophied left ventricles of aortic banded rats: prevention by angiotensin type iv receptor blockade [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, **33** (2): 219-231.
- [12] Akar FG, Spragg DD, Tunin RS, Kass DA, Tomaselli GF. Mechanisms underlying conduction slowing and arrhythmogenesis in nonischemic dilated cardiomyopathy [J]. *Circulation Research*, 2004, **95**: 717-721.
- [13] Uzzaman M, Honjo H, Takagishi Y, Emdad L, Magee AI, Severs NJ, et al. Remodeling of gap junction coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline induced pulmonary hypertension [J]. *Circ Res*, 2000, **86**: 871-878.

(此文编辑 文玉珊)