

山莨菪碱对心搏骤停复苏猪心室肌 缝隙连接蛋白 43 表达的影响

刘亚华 沈洪 王立祥 杨慧宁 马立芝

【摘要】 目的 探讨山莨菪碱对心搏骤停猪复苏后心室肌缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 表达的影响。方法 选择健康家猪进行实验,按随机数字表法分为假手术组、肾上腺素复苏组(对照组)与山莨菪碱复苏组(实验组),复苏时加用山莨菪碱 0.4 mg/kg,每组 5 只。电刺激诱导心室纤颤(室颤)并维持 8 min 后开始心肺复苏(CPR),复苏成功后 24 h 留取左心室样本。经免疫荧光法观察心室肌 Cx43 的表达与分布,反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Cx43 mRNA 表达,蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 Cx43、磷酸化 Cx43 (p-Cx43) 蛋白表达。**结果** 假手术组心室肌 Cx43 阳性表达分布均匀,多位于心肌细胞的端-端连接部位,少数位于细胞的侧-侧连接部位;对照组 Cx43 阳性表达较假手术组显著减少,信号强度明显下降(4.35 ± 2.10 比 10.02 ± 3.66 , $P < 0.01$);实验组 Cx43 阳性表达在端-端连接与侧-侧连接分布较规则,信号强度明显高于对照组(7.91 ± 2.54 比 4.35 ± 2.10 , $P < 0.05$),但明显低于假手术组(7.91 ± 2.54 比 10.02 ± 3.66 , $P < 0.05$)。对照组和实验组 Cx43 的 mRNA 与蛋白表达均较假手术组显著降低[Cx43 mRNA (A 值): 0.32 ± 0.05 、 0.32 ± 0.03 比 0.48 ± 0.07 ; Cx43 蛋白 (A 值): 0.43 ± 0.03 、 0.50 ± 0.07 比 0.65 ± 0.04 , 均 $P < 0.01$],实验组与对照组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。对照组 p-Cx43 蛋白表达明显低于假手术组(A 值: 0.22 ± 0.03 比 0.37 ± 0.06 , $P < 0.01$);实验组 p-Cx43 蛋白表达高于对照组(A 值: 0.29 ± 0.07 比 0.22 ± 0.03 , $P < 0.01$),而与假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。假手术组、对照组、实验组 p-Cx43/Cx43 比值差异无统计学意义(0.57 ± 0.09 、 0.51 ± 0.05 、 0.58 ± 0.06 , 均 $P > 0.05$)。**结论** 山莨菪碱可以纠正心搏骤停猪复苏后心室肌 Cx43 表达的异常,维护正常的心脏传导功能。

【关键词】 心室纤颤; 心肺复苏; 山莨菪碱; 缝隙连接蛋白 43

Effect of anisodamine on myocardial connexin 43 expression in pig after resuscitation from cardiac arrest Liu Yahua*, Shen Hong, Wang Lixiang, Yang Huining, Ma Lizhi. *Department of Emergency, General Hospital of Chinese People Armed Police Forces, Beijing 100039, China

Corresponding author: Shen Hong, Department of Emergency, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China, Email: shenhong@em120.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of anisodamine on the expression of connexin 43 (Cx43) in swine ventricular myocardium after resuscitation from cardiac arrest. **Methods** The experiment was conducted on healthy pigs, and they were randomly divided into three groups, namely sham group, epinephrine group (control group) and anisodamine group (experimental group, animals were resuscitated combined with injection of 0.4 mg/kg of anisodamine), with 5 pigs in each group. Model of ventricular fibrillation was reproduced by alternating current challenge, and cardiopulmonary resuscitation (CPR) was performed 8 minutes after cardiac arrest. Left ventricular myocardium was harvested at 24 hours after restoration of spontaneous circulation. The expression and distribution of Cx43 were observed by immunofluorescence, Cx43 mRNA expression was assessed with reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), and the protein expressions of Cx43 and phosphorylation of Cx43 (p-Cx43) were analyzed by Western Blot. **Results** The positive expression of Cx43 in ventricular muscle was distributed uniformly, mostly at the end-to-end linkage of myocardial cells, with a few side-to-side linkage in sham group. The positive expression of Cx43 in control group was significantly weaker than that in the sham group, and the signal intensity was significantly declined (4.35 ± 2.10 vs. 10.02 ± 3.66 , $P < 0.01$). The positive expression of Cx43 at the end-to-end linkage and side-to-side linkage was irregular in experimental group, and the signal intensity was obviously higher than that in the control group (7.91 ± 2.54 vs. 4.35 ± 2.10 , $P < 0.05$), but it was significantly weaker than that in the sham

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.010

基金项目:全军医学科学技术研究“十二五”发展计划项目(BWS11Z078)

作者单位:100039 北京,武警总医院急救医学中心(刘亚华、王立祥、马立芝),灾害救援医学研究所(杨慧宁);100853 北京,解放军总医院急诊科(沈洪)

通讯作者:沈洪, Email: shenhong@em120.com

group (7.91 ± 2.54 vs. 10.02 ± 3.66 , $P < 0.05$). For control group and experimental group, the Cx43 mRNA and protein expressions were significantly lower than those of the sham group [Cx43 mRNA (*A* value): 0.32 ± 0.05 , 0.32 ± 0.03 vs. 0.48 ± 0.07 ; Cx43 protein (*A* value): 0.43 ± 0.03 , 0.50 ± 0.07 vs. 0.65 ± 0.04 , all $P < 0.01$], and there were no significant differences between experimental group and control group (all $P > 0.05$). The p-Cx43 protein expression of control group was significantly lower than that of the sham group (*A* value: 0.22 ± 0.03 vs. 0.37 ± 0.06 , $P < 0.01$), and it was significantly higher in the experiment group than that in the control group (*A* value: 0.29 ± 0.07 vs. 0.22 ± 0.03 , $P < 0.01$), but there was no significant difference with the sham group ($P > 0.05$). No significant difference in p-Cx43/Cx43 was found among sham, control, and experiment groups (0.57 ± 0.09 , 0.51 ± 0.05 , 0.58 ± 0.06 , all $P > 0.05$). **Conclusion** Anisodamine can improve the abnormal expression of Cx43 in ventricular muscle of pigs with cardiac arrest, which may be related to the protection effect of anisodamine on cardiac conduction.

【Key words】 Ventricular fibrillation; Cardiopulmonary resuscitation; Anisodamine; Connexin 43

心室肌缝隙连接蛋白(Connexin, Cx)是介导细胞间电学耦联的主要连接蛋白,心室肌中主要为Cx43,可使心室肌细胞间通道呈低阻力状态,对维持心室电生理功能正常、实现心室肌收缩同步起着关键作用,其表达异常可致缺血性室性心律失常发生率明显增加^[1]。心搏骤停的心电表现多为心室纤颤(室颤),本课题组前期研究已证明室颤复苏后Cx43的分布紊乱、含量下降^[2]。本研究通过建立猪心搏骤停模型,在标准心肺复苏(CPR)基础上联合静脉给予山莨菪碱,观察心室肌Cx43的表达水平及分布,进一步明确山莨菪碱对复苏后心室电-机械活动功能蛋白Cx43的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物:10~12周龄健康家猪,雌雄不拘,体质量(25.6 ± 0.7) kg,由解放军总医院动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(京)2011-0006。

1.2 研究方法

1.2.1 动物分组及准备:按随机数字表法将动物分为假手术组、对照组和实验组。以耳缘静脉注射2.5%戊巴比妥钠30 mg/kg和肌肉注射氯胺酮20 mg/kg麻醉动物,固定体位,经气管插管、心电监护、左颈总动脉及双侧颈外静脉置管,经左侧颈外静脉放置双极起搏电极至右心室,准备完毕后,维持生命体征稳定10 min。

1.2.2 致颤及复苏方法^[3]:经起搏电极给予动物交流电(1 mA、20 V、50 Hz)刺激10 s,以心电显示室颤波形及主动脉压快速下降为制模成功。室颤维持8 min后行CPR,予以呼吸机支持(吸入氧浓度1.00),按照标准CPR方法进行胸外按压,与按压同步经右颈外静脉快速推注药物复苏,对照组为1 mg肾上腺素(3 min 1次),实验组在对照组基础上联用10 mg山莨菪碱(0.4 mg/kg)。复苏2 min后行200 J双相电流除颤,2 min 1次。自主循环恢复

(ROSC)标准:恢复自主心律,平均动脉压(MAP) > 60 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),持续10 min。复苏30 min后仍未恢复自主循环即停止复苏。复苏成功家猪生命体征平稳后拔除导管,缝合伤口。假手术组仅进行上述准备工作而不致颤。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法:复苏成功并存活24 h的动物入组,对照组及实验组各5只。复苏成功24 h后处死动物,留取左心室游离壁3份,1份经甲醛固定后石蜡包埋,2份保存于 -70 °C低温冰箱中备用。

1.3.1 免疫荧光法检测心室肌Cx43分布:将石蜡包埋的左心室进行切片,厚度3 μ m,60~65 °C烤片4 h后脱蜡、水化,0.01 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS, pH值7.2)洗涤切片5 min \times 3次;以高压修复方法对石蜡切片组织进行抗原修复, PBS洗涤后滴加封闭液(正常山羊血清)室温放置;60 min后甩去切片上的液体,滴加1:400 Cx43一抗(bs-0651R,北京博奥森生物公司)50 μ L,4 °C过夜。PBS洗涤3次后滴加Alexa Fluor[®] 488荧光标记的兔抗羊二抗(1:200, A11078,美国Invitrogen公司),避光室温放置60 min。PBS洗涤后在荧光显微镜下观察并拍照(激发波长494 nm、发射波长520 nm),在激光共聚焦显微镜下对单位面积内心肌细胞间Cx43表达面积进行半定量测定。

1.3.2 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测Cx43 mRNA表达:应用Primer 5.0及Oligo 6软件设计Cx43和内参照三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的引物序列。Cx43引物序列:上游5'-GAAAATGCCAGGGGCTT-3',下游5'-TCACTCTTCCCTTACACGAT-3',扩增产物大小300 bp;GAPDH引物序列:上游5'-GAACATCATCCCTGCTTCTA-3',下游5'-GAAGTCACAGGACACAACCT-3',扩增产物大小247 bp。提取左心室组织总RNA,进行反转录-扩

增,扩增产物进行电泳,以 Gel pro 4.0 凝胶吸光度(A)分析软件分析阳性条带,测定 A 值,以 Cx43 与 GAPDH 的 A 值比值表示其表达量。

1.3.3 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测 Cx43 及磷酸化 Cx43 (p-Cx43) 蛋白表达:按照组织裂解提取膜蛋白操作步骤提取 Cx43 和 p-Cx43 蛋白(试剂盒由德国默克公司提供)。将提取的样本加热使蛋白质变性后进行 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE);转膜后切下宽 3 mm 膜条,按顺序置于加样槽中,分别加入 p-Cx43、Cx43 的山羊单克隆一抗(SANTA sc-17220、SANTA sc-6560),稀释度 1:500,4 ℃摇床孵育;过夜后洗涤,加入 1:40 000 稀释的兔抗羊 IgG(辣根过氧化物酶标记),4 ℃摇床过夜。将膜洗涤后风干,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色成像。以 GAPDH 为内参,采用内参照法校正,测定反应产物的 A 值并进行半定量分析,以 Cx43、p-Cx43 蛋白与 GAPDH 的 A 值比值表示蛋白表达量。

1.4 统计学分析:实验数据录入 SPSS 16.0 统计软件,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组方差齐性检验后,组间比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复苏时联用山莨菪碱可改善心室肌 Cx43 分布(图 1;表 1):绿色荧光信号为 Cx43 阳性表达。假手术组 Cx43 荧光信号分布均匀,多位于心肌细胞的端-端连接部位,少数位于细胞的侧-侧连接部位。对照组 Cx43 荧光信号较假手术组显著减弱($P < 0.01$),细胞间侧-侧连接部位的 Cx43 荧光信号增强。实验组 Cx43 荧光信号较假手术组减弱,但强于对照组(均 $P < 0.05$),端-端连接与侧-侧连接荧光信号分布较均匀。

2.2 复苏时联用山莨菪碱对心室肌 Cx43 mRNA 及蛋白表达无明显影响(表 1):对照组和实验组 Cx43 mRNA 与蛋白表达水平均较假手术组显著降低(均 $P < 0.01$);而实验组与对照组比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

2.3 复苏时联用山莨菪碱可增加心室肌 p-Cx43 蛋白表达(表 1):对照组 p-Cx43 蛋白表达明显低于假手术组($P < 0.01$);实验组 p-Cx43 蛋白表达明显高于对照组($P < 0.01$),且与假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。3 组 p-Cx43/Cx43 比值差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

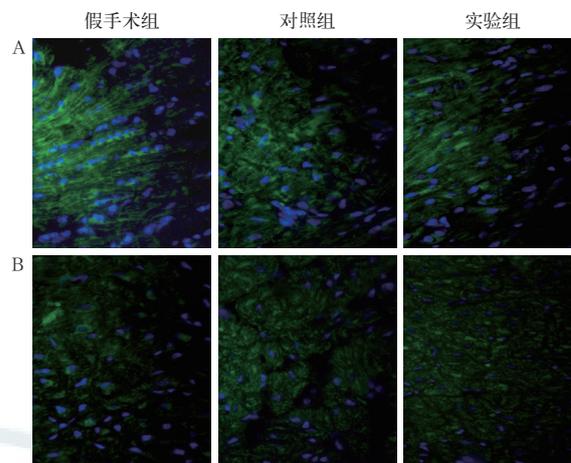


图 1 激光共聚焦显微镜下观察各组家猪心室肌缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 的分布 绿色荧光为 Cx43 阳性表达,蓝色为心肌细胞核染色信号。假手术组心肌细胞核分布规则,Cx43 荧光信号强,以心肌细胞间端-端分布为主;对照组[心室纤颤(室颤)+心肺复苏(CPR)]心肌细胞核排列紊乱,Cx43 荧光信号减弱,以细胞间侧-侧连接部位分布较多;实验组(室颤+CPR+山莨菪碱)心肌细胞核排列轻度紊乱,Cx43 荧光信号端-端、侧-侧分布较均一,荧光信号较强。A 为纵切面,B 为横切面 免疫荧光染色 低倍放大

表 1 心肺复苏时联用山莨菪碱对心搏骤停家猪心室肌 Cx43 荧光信号及其 mRNA 和蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	Cx43 荧光信号	Cx43 mRNA (A 值)	Cx43 蛋白 (A 值)	p-Cx43 蛋白 (A 值)	p-Cx43/ Cx43
假手术组	5	10.02 ± 3.66	0.48 ± 0.07	0.65 ± 0.04	0.37 ± 0.06	0.57 ± 0.09
对照组	5	4.35 ± 2.10 ^a	0.32 ± 0.05 ^a	0.43 ± 0.03 ^a	0.22 ± 0.03 ^a	0.51 ± 0.05
实验组	5	7.91 ± 2.54 ^{bc}	0.32 ± 0.03 ^a	0.50 ± 0.07 ^b	0.29 ± 0.07 ^d	0.58 ± 0.06

注: Cx43 为心室肌缝隙连接蛋白 43, p-Cx43 为磷酸化 Cx43; 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与对照组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$

3 讨论

3.1 山莨菪碱可改善心室肌缺血/再灌注(I/R)损伤后电生理功能:研究发现,缺血、病毒感染等各种可能改变 Cx43 结构及功能的损伤都将导致心律失常^[1,4]。通过诱导 Cx43 结构部分缺失小鼠急性心肌梗死的实验发现, Cx43 结构部分缺失小鼠的心肌梗死面积较正常小鼠增大,室性心动过速(室速)发生率增高^[5]。对离体心脏的研究发现, I/R 损伤后 Cx43 减少导致缝隙连接膜通道沉默,而细胞间信号传递功能减弱是出现室性心律失常的重要原因^[6]。缺血预处理能够上调 Cx43 蛋白表达,修复信号传递膜通道的结构与功能,最终减少 I/R 心律失常的发生^[7-8]。山莨菪碱能改善心肌微循环,减轻心肌线粒体损伤,减少心肌凋亡,从而减轻心肌 I/R 损伤^[9-10];同时,本研究显示,山莨菪碱可能通过提高 Cx43 的表达和分布,达到修复 I/R 损伤后心肌电生理功能

的作用。

3.2 山莨菪碱可改善室颤复苏后缝隙连接通道功能:使用缝隙连续改造剂可以减少或逆转室颤模型Cx43的降解,并且使其分布趋于均一^[11],山莨菪碱不仅可以纠正复苏后心室肌Cx43降解,还能增加心室肌p-Cx43蛋白表达。Cx43蛋白转录后磷酸化生成的p-Cx43是生理状态下的主要存在方式,组织缺氧、损伤后细胞间膜结构中的p-Cx43将发生去磷酸化,导致缝隙连接通道解耦联,结构破坏、功能缺失,所以I/R损伤后的缝隙连接通道关闭与p-Cx43的去磷酸化相关^[6]。Cx43磷酸化后利于缝隙连接成分的合成与运输,利于缝隙连接结构稳定和在心室肌闰盘中的正常分布,组成的膜通道导电性强于其非磷酸化状态,是心室肌同步性收缩的重要机制^[12]。室颤持续时间不论是2 min还是10 min,心室肌总Cx43的表达都明显减少^[13]。离体心脏实验进一步证实,室颤导致心室肌Cx43磷酸化/去磷酸化的比例显著降低^[14]。生理状态下,Cx43的磷酸化/去磷酸化形态在心室肌细胞间缝隙连接中均有表达,共同构建有序的低电阻膜通道,传递电化学信号,实现心脏节律性收缩,不论是Cx43表达减少或分布变化,还是其磷酸化修饰改变,都会因传导异常引起心律失常。因此,Cx43在缝隙连接中磷酸化/去磷酸化水平能直接反映细胞间通道结构与功能的状态^[6]。山莨菪碱可能通过增加心室肌p-Cx43蛋白表达进而改善室颤复苏后缝隙连接通道功能。

3.3 山莨菪碱抗心律失常作用的机制探讨:既往动物实验证实,对于一些药物或毒物诱导的恶性心律失常,如肾上腺素和乌头碱诱导的室速,山莨菪碱治疗有稳定心脏电生理活动、减少心律失常发生的作用^[15],该保护作用可能与山莨菪碱抑制心肌细胞钙超载、降低室颤阈、增加心电稳定性有关^[16-17]。研究显示,室颤发生时心肌组织Cx43表达减少^[13]。本研究采用临床引起心搏骤停最主要的心电类型室颤模型,发现复苏时联用山莨菪碱比单纯使用肾上腺素可以使Cx43荧光定量增加,并且使心肌细胞间Cx43分布趋于正常,所以说山莨菪碱对Cx43的保护作用是其维持正常心电传导、抗心律失常的机制之一。另外,CPR后对照组和实验组动物Cx43蛋白表达绝对值均较假手术组明显减少,但两个复苏组p-Cx43/Cx43比值与假手术组比较差异无统计学意义,说明两个复苏组虽然Cx43总蛋白表达减少,但作为缝隙连接功能成分的p-Cx43相对含量却

增加。因此,复苏成功的动物存活24 h后,心室肌Cx43磷酸化修饰增多,体现在p-Cx43/Cx43比值增加,说明缝隙连接受影响的电化学传导功能在恢复。对照组和实验组的重要区别在于,单纯使用肾上腺素的p-Cx43蛋白含量最低,而复苏过程中联用山莨菪碱可提高p-Cx43蛋白含量,恢复低电阻膜通道的功能,这与免疫荧光检测发现实验组Cx43在心室肌细胞间端-端分布较对照组增多的现象一致。

参考文献

- [1] 胡笑容,周晓亚,徐昌武,等. 缝隙连接蛋白43在老年大鼠缺血性室性心律失常中的作用[J]. 中华心律失常学杂志,2010,14(3):219-223.
- [2] 刘亚华,王立祥,郭晓东,等. 心脏骤停复苏猪心肌闰盘超微结构变化的研究[J]. 中国急救医学,2014,34(2):166-170.
- [3] Zhou M, Ran Q, Liu Y, et al. Effects of sustained abdominal aorta compression on coronary perfusion pressures and restoration of spontaneous circulation during cardiopulmonary resuscitation in swine [J]. Resuscitation,2011,82(8):1087-1091.
- [4] 张明雪,何伟,顾平,等. 益气活血中药复方对CVB3病毒性心肌炎心肌细胞actin、Cx43表达及GJIC功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2010,30(8):880-883.
- [5] Maass K, Chase SE, Lin X, et al. Cx43 CT domain influences infarct size and susceptibility to ventricular tachyarrhythmias in acute myocardial infarction [J]. Cardiovasc Res,2009,84(3):361-367.
- [6] Sánchez JA, Rodríguez-Sinovas A, Fernández-Sanz C, et al. Effects of a reduction in the number of gap junction channels or in their conductance on ischemia-reperfusion arrhythmias in isolated mouse hearts [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2011,301(6):H2442-2453.
- [7] Chen Z, Luo H, Zhuang M, et al. Effects of ischemic preconditioning on ischemia/reperfusion-induced arrhythmias by upregulation of connexin 43 expression [J]. J Cardiothorac Surg,2011,6:80.
- [8] 杜秋明,王存选. 缝隙连接与抗心肌缺血/再灌注损伤[J]. 中国中西医结合急救杂志,2011,18(6):383-384.
- [9] 刘亚华,张杰,代正,等. 山莨菪碱对心搏骤停猪氧化应激致心肌线粒体损伤的保护作用[J]. 中华危重病急救医学,2013,25(5):290-293.
- [10] 刘亚华,周满红,代正,等. 山莨菪碱对心搏骤停家猪线粒体途径心肌细胞凋亡的保护作用[J]. 中华危重病急救医学,2013,25(2):88-91.
- [11] 刘红臻,钟敬泉. 缝隙连续改造剂ZP123对室颤模型心肌缝隙连接蛋白Cx43的影响研究[D]. 山东:山东大学,2011.
- [12] Jeyaraman MM, Srisakuldee W, Nickel BE, et al. Connexin43 phosphorylation and cytoprotection in the heart [J]. Biochim Biophys Acta,2012,1818(8):2009-2013.
- [13] 刘红臻,钟敬泉,李景莎,等. 心室纤颤时心肌缝隙连接蛋白Cx43的变化[J]. 中华危重病急救医学,2010,22(10):595-598.
- [14] Radošinská J, Knežl V, Benová T, et al. Alterations of the intercellular coupling protein, connexin-43, during ventricular fibrillation and sinus rhythm restoration demonstrated in male and female rat hearts: A pilot study [J]. Exp Clin Cardiol,2011,16(4):116-120.
- [15] Chen JM, Gu SL. Antiarrhythmic effects of anisodamine [J]. Acta Pharm Sinica,1988,23(11):857-859.
- [16] Norby FL, Ren J. Anisodamine inhibits cardiac contraction and intracellular Ca²⁺ transients in isolated adult rat ventricular myocytes [J]. Eur J Pharmacol,2002,439(1-3):21-25.
- [17] 丁超,傅向华,薛玲,等. 山莨菪碱对兔心肌缺血再灌注后QT间期离散度及室颤阈值的影响[J]. 中国循证心血管医学杂志,2010,2(2):83-85,88.

(收稿日期:2014-12-03)

(本文编辑:保健媛)