

低温联合右美托咪啶对兔心肌细胞缝隙连接蛋白 43 分布的影响*

安 丽¹, 李 惠¹, 刘艳秋¹, 吕 洁¹, 姚 茵¹, 易 菁¹, 王子君², 高 鸿^{1**}

(1. 贵州医科大学附院 麻醉科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 麻醉学院, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 探讨低温条件下使用右美托咪啶对兔离体心脏心肌细胞缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 分布的影响。方法: 18 只健康成年新西兰家兔, 建立 Langendorff 离体心脏灌注模型, 造模后随机分为对照组 (C 组)、低温组 (L 组) 和低温及右美托咪啶组 (LD 组), C、L 组将离体心脏分别置于 37 ℃ 及 32 ℃ K-H 液持续灌注 60 min, LD 组将离体心脏置于含 25 μg/L 右美托咪啶的 K-H 液中持续灌注 60 min; 取各组左心室的前壁心肌组织采用免疫组织化学检测 Cx43 蛋白分布情况。结果: 与 C 组比较, L 组及 LD 组 Cx43 蛋白阳性着色颗粒减少, 并有端端链接转向侧侧链接的现象, 排列紊乱; Cx43 蛋白平均光密度值下调 ($P < 0.01$); L 组和 LD 组心肌细胞 Cx43 蛋白平均光密度值比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论: 右美托咪啶不加重低温条件下心肌细胞 Cx43 蛋白的分布改变。

[关键词] 低温; 右美托咪啶; 缝隙连接蛋白 Cx43; 心肌细胞; 离体心脏; 模型, 动物

[中图分类号] R614 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)03-0289-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.03.009

Effects of Hypothermia Combined with Dexmedetomidine on the Distribution of Gap Junction Protein Connexin 43 in Cardiomyocytes of Rabbits

AN Li¹, LI Hui¹, LIU Yanqiu¹, LV Jie¹, YAO Yin¹, YI Jing¹, WANG Zijun², GAO Hong¹

(1. Department of Anesthesiology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. School of Anesthesiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of hypothermia combined with dexmedetomidine on the distribution of gap junction protein connexin 43 (Cx43) in isolated heart cardiomyocytes of rabbit.

Methods: 18 NewZealand healthy adult rabbits weighing up to 2.0 ~ 2.5 kg were randomly divided into three groups ($n = 6$) after Langendorff isolated heart perfusion model was established: control group (group C), hypothermia group (group L), and hypothermia + dexmedetomidine group (group LD). The control group (group C) underwent continuous perfusion with Krebs-Henseleit solution (37 ℃) for 60 min. The hypothermia group (group L) underwent continuous perfusion with Krebs-Henseleit solution (32 ℃) for 60 min, and the hypothermia plus dexmedetomidine (group LD) underwent continuous perfusion with Krebs-Henseleit solution and dexmedetomidine for 60 min. The distribution of Cx43 protein in the anterior wall of the left ventricle of all groups was detected by immunohistochemistry. **Results:** Group L and group LD were compared with group C, there was a tendency for the proteins localized at end-to-end contact sites of ventricular cardiomyocytes to localize at side-to-side con-

*[基金项目] 贵州省科技厅联合基金[黔科合 LH 字(2016)7252 号]

** 通信作者 E-mail: 2169617@qq.com

网络出版时间: 2019-03-23 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190323.1455.009.html>

tact sites, and the distribution was messy, the average optical density of Cx43 protein decreased ($P < 0.01$). Comparison of average optical density of Cx43 protein between the groupL and groupLD showed that the difference had no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion:** Under 32 °C temperature condition, cardiomyocytes of rabbit is reduced protein distribution of CX43, which may be one of the mechanisms of the hypothermia inducing arrhythmia in rabbits. However, the use of dexmedetomidine in hypothermic conditions will not aggravate these hypothermia-related changes so as that there is no increased risk of arrhythmia.

[**Key words**] hypothermia; dexmedetomidine; connexin 43; cardiomyocytes; isolated heart; model, animals

前期研究发现,低温可致心脏电生理不稳定、心室复极时程延长,可能增加心律失常的风险,而右美托咪啶不会延长低温条件下心室复极时程^[1]。心肌细胞间存在的电偶联的结构基础是缝隙连接,心肌细胞间缝隙连接异常是诱发心律失常的重要因素之一^[2-3]。有文献报道,构成心肌细胞间信号转导的主要成分是缝隙连接蛋白 43(Cx43)^[4]。前期研究中运用 Western blot 法定量观察了 Cx43 的表达水平,但未对 Cx43 进行组织定位和定性观察,故本实验通过取低温下右美托咪啶处理的家兔左心室前壁组织,观察 Cx43 蛋白分布情况,以明确低温联合右美托咪啶对心脏电生理稳定性的影响,为临床药物应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂及仪器

健康成年新西兰家兔(贵州医科大学实验动物中心提供)18只,体质量2.0~2.5 kg,雌雄不限。右美托咪啶(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号14070232)、肝素钠(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号H1 3020971)、戊巴比妥钠(美国Sigma公司批号,P11011)、羊抗兔Cx43 IgG(美国Abcam公司)、兔抗羊二抗(北京博奥森生物技术有限公司)、光学显微镜(奥林巴斯有限公司)、Langendorff装置(上海奥尔科特生物科技有限公司)。

1.2 离体心脏的制备

经兔耳缘静脉推注300 U/kg肝素钠、戊巴比妥钠(30 mg/kg),迅速开胸后取出心脏并置于4 °C K-H液中修剪,显露心脏主动脉后插管,与Langendorff装置链接,将混合气体(95% O₂及5% CO₂)置于37 °C下K-H液中,进行非循环式的逆行灌注,灌注压设为8.82 kPa。心脏灌注数秒内恢复跳动,

模型制备成功的标准为灌注约10 min内心跳恢复跳动。

1.3 实验分组

成功建立Langendorff离体心脏的灌注模型后,将制备成功的18个离体心脏随机分为对照组(C组)、低温组(L组)和低温及右美托咪啶组(LD组),每组6个。采用恒温槽和热交换器控制K-H液的温度,C组将离体心脏置于37 °C K-H液持续灌注60 min,L组将离体心脏置于32 °C K-H液持续灌注60 min,LD组将离体心脏置于32 °C含25 μg/L右美托咪啶的K-H液中持续灌注60 min。

1.4 左心室Cx43蛋白分布检测

采用免疫组织化学法检测左心室肌Cx43蛋白分布。灌注结束后,取左心室前壁心肌组织用10 g/L多聚甲醛溶液固定,用EDTA脱钙,常规乙醇脱水,使用石蜡包埋,然后切片,将切片置于室温、含20% H₂O₂蒸馏水中5~10 min灭活内源性酶,蒸馏水洗3次,每次洗5 min;将切片浸泡在0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液中修复抗原,通过高压锅加热沸腾后采用PBS洗涤2次;之后将切片置于5%牛血清白蛋白(BSA)中,置于37 °C温箱15 min;滴加羊抗兔Cx43 IgG(1:500),置于4 °C温箱过夜,经PBS洗3次;之后滴加二抗(1:10 000),并置于37 °C温箱20 min,PBS洗3次;最后滴加SABC,置于37 °C温箱15 min,随后PBS洗3次;DAB显色,通过苏木精复染后、脱水、透明和封存。置于光学显微镜下观察,以棕黄色染色为阳性,不着色者为阴性。选择5个视野拍照,所有图片用Image jv1.8.0图片分析软件定量分析心肌组织中Cx43的表达情况,计算平均光密度值(心肌组织截面总的积分光密度值/心肌组织截面的面积)。

1.5 统计学方法

采用SPSS 19.0统计学软件进行数据分析,计

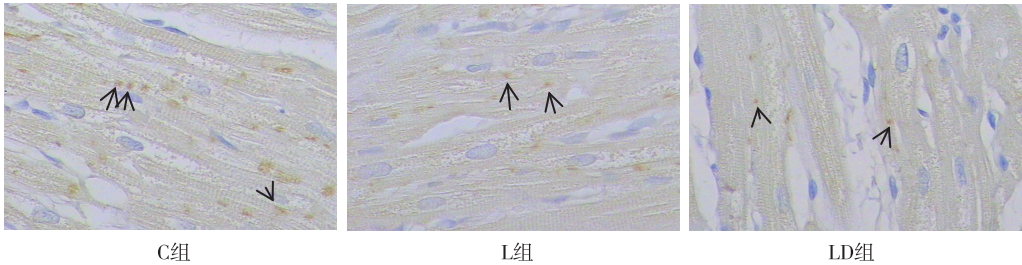
量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 左心室心肌细胞 Cx43 蛋白分布

C 组心肌细胞间的闰盘处见 Cx43 阳性表达, Cx43 阳性细胞的计数较多,且分布规律;L 组和 LD 组 Cx43 蛋白着色颗粒分布减少,两组有端端链

接转向侧侧链接的现象,排列凌乱。见图 1。
2.2 Cx43 蛋白平均光密度值
C、L、LD 组家兔左心室心肌细胞 Cx43 蛋白平均光密度值分别为 0.348 ± 0.04 、 0.154 ± 0.02 及 0.159 ± 0.01 ;与 C 组比较,L 组和 LD 组心肌细胞 Cx43 蛋白平均光密度值下调($P < 0.01$);L 组和 LD 组心肌细胞 Cx43 蛋白平均光密度值比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。



C组 L组 LD组

注:箭头为 Cx43 蛋白表达阳性

图 1 各组家兔左心室肌 Cx43 蛋白分布(DAB, ×400)

Fig. 1 The black arrow points to show the protein distribution of Cx43 detected by immunohistochemical in the three groups

3 讨论

低温为临床上最常用的保护器官的手段之一,其机制可能为降低组织器官的耗氧量、减慢新陈代谢,从而保护线粒体功能、减少心肌细胞的损伤和凋亡、抑制氧化和应激水平^[5]。但也有研究表明,低温后可出现心率减慢,心电图的 PR 间期,QRS 间期和 QTc 均延长,部分患者出现 J 波,心脏电生理稳定性降低,增加了心律失常发生率^[6-7]。右美托咪啶为全身麻醉的辅助药,具有镇静、镇痛、稳定血流动力学的作用,无呼吸抑制,并且可减少其他麻醉药物的用量,因此目前被广泛运用于临床^[8-9]。但 2007-2010 年美国医学会对多中心需长期在 ICU 行镇静的患者进行随机双盲实验,发现使用右美托咪啶后低血压和心动过缓的发生率分别为 21% 和 14%^[10]。近年来也有不少使用右美托咪啶后诱发 QT 间期显著延长,甚至心脏骤停的报道^[11]。在围术期麻醉管理过程中,需实施低温器官保护时,为减少其他麻醉药物的用量常使用右美托咪啶。

由十几种缝隙连接蛋白形成的缝隙连接通道为心肌细胞间电偶联和交流化学信息的结构基础,Cx43 表达在哺乳动物的心室肌分布较多,尤其在

心室肌细胞之间的闰盘处,在心肌细胞之间起到传导电化学信号的作用,对心室肌细胞的电生理活动的稳定性起到非常重要的作用^[12]。如果 Cx43 的表达及分布改变,将引起心脏的电活动发生异常,从而诱发心律失常^[13]。在正常情况下,心肌细胞端与端之间的连接处 Cx43 的含量约是心肌细胞侧与侧之间连接处的 3 倍,电冲动的传导常常通过心肌细胞间的端与端的连接处,而侧与侧连接主要是平衡相连侧面的心肌细胞之间的电冲动,在电脉冲传导中起到协调作用^[14]。

前期研究显示,低温可致心脏电生理的稳定性发生改变,可延长心室肌复极时程,Cx43 蛋白表达下降,增加了心律失常诱发的风险,而在低温条件下,右美托咪啶的联合应用并不会加重延长心室肌复极时程和下降 Cx43 蛋白的表达,推测低温条件下应用右美托咪啶并不增加心律失常诱发的风险^[15]。上述研究仅是通过 western blot 对 Cx43 蛋白进行定量测定,Cx43 蛋白含量的多少虽能反映心肌动作电位的传导速度^[16],但不能直观的了解细胞间 Cx43 蛋白分布情况,为进一步了解低温组和低温联合右美托咪啶组之间是否存在 Cx43 蛋白分布差异,本研究通过取左心室肌免疫组织化学检测 Cx43 蛋白分布。结果显示,对照组分布于心肌闰盘处的 Cx43 棕黄色颗粒状阳性着色分布规律并

表达较多,低温组 Cx43 蛋白在心肌闰盘处表达较少,有端端连接转向侧侧连接的现象,排列凌乱,说明低温影响心肌细胞的缝隙连接,由于心肌去极及复极过程均与离子通道的功能紧密相关,说明低温通过降低 Cx43 蛋白表达及分布从而影响离子通道功能,进而造成延长了心肌复极化时程,心律失常易于发生。相对于低温组,低温联合右美托咪啶组 Cx43 蛋白着色颗粒分布无明显差异,故进一步证实低温条件下合用右美托咪啶并不增加心律失常风险。

综上所述,在 32 ℃ 低温条件下,Cx43 蛋白在兔心肌细胞的分布改变是心律失常诱发的可能机制之一;但 32 ℃ 低温条件下,联合应用右美托咪啶并不加重心肌细胞 Cx43 蛋白的分布情况,即进一步推测在低温条件下使用右美托咪啶不会增加心律失常风险。

4 参考文献

- [1] 李惠,高鸿,赵艳,等. 低温联合右美托咪啶对兔心肌单动作电位的影响[J]. 中华麻醉学志, 2015,35(3): 419-422.
- [2] 罗海燕,郑昭芬. 低频脉冲磁场对大鼠心肌微血管内皮细胞增值和缝隙连接蛋白 43 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013,22(5):5673-5675.
- [3] SALAMEH A, HAUNSCHILD J, BRÄUCHLE P, et al. On the role of the gap junction protein Cx43 (GJA1) in human cardiac malformations with fallot-pathology: a study on paediatric cardiacs pecimen[J]. PLoSOne, 2014, 9(4):e95344.
- [4] 张凯强,高鸿,刘军,等. 缝隙链接 Cx43 在右美托咪啶预防缺血-再灌注离体兔心复灌性心律失常中的作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2017,33(4):369-373.
- [5] PACINI D, PANTALEO A, DI MARCO L, et al. Visceral organ protection in aortic arch surgery: safety of moderate hypothermia[J]. Eur J Cardiothorac Surg 2014, 46: 438-443.
- [6] ROSENKILDE C, VAMOSI M, LAURIDSEN J T, et al. Efficacy of prewarming with a self-warming blanket for the prevention of unintended perioperative hypothermia in patients undergoing hip or knee[J]. J Perianesth Nurs, 2017, 32(5):419-428.
- [7] SALINAS P, LOPEZ-DE-SA E, PENA-CONDE L, et al. Electrocardiographic changes during induced therapeutic hypothermia in comatose survivors after cardiac arrest[J]. World J Cardiol, 2015,7:423-430
- [8] 徐斐,敖虎山. 盐酸右美托咪啶的临床研究[J]. 中国循环杂志, 2015,30(4):401-403.
- [9] 张晔,席宏杰. 右美托咪啶在临床麻醉中应用的研究进展[J]. 医学综述, 2014,20(2):317-319.
- [10] JAKOB S M, RUOKONEN E, GROUNDS R M, et al. Dexmedetomidine vs midazolam or propofol for sedation during prolonged mechanical ventilation: two randomized controlled trials[J]. JAMA, 2012, 11:1151-1160.
- [11] CHAR D, DROVER D R, MOTONAGA K S, et al. The effects of ketamine on dexmedetomidine-induced electrophysiologic changes in children[J]. Pediatric Anesthesia, 2013,23(10):898-905.
- [12] OYAMADA M, TAKEBE K, OYAMADA Y. Regulation of connexin expression by transcription factors and epigenetic mechanisms[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1828(1):118-133.
- [13] FONTES MS, PAPAZOVA DA, VANKOPPEN A, et al. Arrhythmogenic remodeling in murine models of deoxycorticosterone acetate-salt-induced and 5/6-subtotal nephrectomy-salt-induced cardiorenal disease[J]. Cardiorenal Med, 2015,5(3):208-218.
- [14] 刘艳秋,张凯强,李惠,等. 不同浓度瑞芬太尼对兔心肌细胞缝隙链接蛋白 43 表达及分布的影响[J]. 中华麻醉学志, 2016(36):311-313.
- [15] 李惠,高鸿,赵艳,等. 低温联合右美托咪啶对家兔心室复极时程和 CX43 蛋白表达的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2017(42):275-278.
- [16] DONAHUE J K, LAURITA K R. Tachyarrhythmia therapies: approaches to atrial fibrillation and postinfarction ventricular arrhythmias[J]. Humana Press, 2011, (3) 349-378.

(2019-01-05 收稿,2019-03-10 修回)

中文编辑:周 凌;英文编辑:冉海勇