文章编号:1000-5404(2007)21-2041-03

论著

血管紧张素Ⅱ对大鼠心房Cx40重构的影响及贝那普利的干预作用

邵 鹏,张卫泽,陈永清,马 凌,张明旭 (兰州军区兰州总医院心血管内科,兰州 730050)

提 要:目的 采用大鼠肾上腹主动脉部分结扎的模型,观察血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)对心房缝隙连接蛋白(connexin,Cx)40重构的影响及贝那普利的干预效果。**方法** 将30只雄性Wistar大鼠随机数字表法分为对照组(C组)、腹主动脉结扎组(A组)、结扎+贝那普利组(B组)。喂养8周后处死,用放射免疫法测血浆及心肌组织AngⅡ含量,用免疫组化方法检测大鼠心房Cx40的分布特征,半定量分析Cx40的含量。**结果** 与C组相比,A组血浆、心肌AngⅡ含量均明显升高($P<0.01$),而B组则无明显变化($P>0.05$)。A组大鼠心房Cx40含量减少($P<0.01$),并向侧边分布增加;而B组Cx40含量较A组增加($P<0.01$),且分布不均一程度减轻。**结论** AngⅡ升高可导致心房Cx40重新分布和表达减少;贝那普利通过降低AngⅡ水平,可有效减轻心房Cx40的重构。

关键词: 血管紧张素Ⅱ;缝隙连接蛋白40;贝那普利;重构
中图法分类号: R331.38; R541.7; R972.2 **文献标识码:** A

Effects of angiotensin Ⅱ and benazepril on connexin40 remodeling in rat atrium

SHAO Peng, ZHANG Wei-ze, CHEN Yong-qing, MA Ling, ZHANG Ming-xu (Department of Cardiology, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

Abstract: Objective To observe the effects of angiotensin Ⅱ (AngⅡ) and benazepril on gap junction connexin (Cx) 40 remodeling in atrium of suprarenal abdominal aorta ligated rats. **Methods** Thirty male Wistar rats were randomly assigned to three groups: control group (C), abdominal aorta ligated group (A), abdominal aorta ligated rats treated with benazepril (B). Eight weeks later, Ang Ⅱ in plasma and cardiac tissues was determined by RIA. The distribution of Cx40 was determined by immunohistochemistry and the levels of Cx40 in atrium were semi-quantitatively analyzed. **Results** The Ang Ⅱ levels in plasma and myocardium in group A were higher than those of group C ($P<0.01$), but those in group B showed no more changes than group C ($P>0.05$). The levels of Cx40 in group A declined and the side to side distribution pattern increased. Cx40 levels in group B were significantly higher than group A ($P<0.01$), and its inhomogeneity of Cx40 distribution decreased. **Conclusion** The increase of Ang Ⅱ level can induce the redistribution and protein expression reduction of Cx40 in atrium. Through lowering Ang Ⅱ levels, benazepril can attenuate Cx40 remodeling effectively.

Key words: angiotensin Ⅱ; gap junction connexin40; benazepril; remodeling

目前,血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ,AngⅡ)与心房电重构和心房结构重构的相关研究日益受到人们的重视[1]。但是,有关AngⅡ与心肌缝隙连接蛋白(connexin,Cx)重构的研究报道尚不多见,本研究采用大鼠肾上腹主动脉部分结扎的模型,初步探讨AngⅡ与心房Cx40重构之间的关系以及贝那普利的干预效果。

1 材料与方法

1.1 动物模型制作

将体质量(200±18)g的3月龄Wistar大鼠30只(购自本院动物实验科),随机数字表法分为对照组(C组)、腹主动脉结扎组(A组)、结扎+贝那普利组(B组),每组10只。按Doering等[2]报道的方法行肾上腹主动脉部分结扎:将一外径为0.7 mm穿刺针放于腹主动脉旁,用4号丝线在左肾动脉开口上方约5 mm处将腹主动脉和穿刺针一起结扎,然后将穿刺针抽出,使结扎处缩窄60%~70%,对照组大鼠在游离腹主动脉后不结扎。B组于结扎后第2天早晨空腹加喂贝那普利(商品名:洛汀新,北京诺华制药有限公司生产),按20 mg·kg^{-1}·d^{-1}放于2 ml生理

基金项目:甘肃省自然科学基金(3ZS041-A25-057)
Supported by the Natural Science Foundation of Gansu Province (3ZS041-A25-057)
作者简介:邵 鹏(1970-),男,浙江省临安市人,硕士研究生,主治医师,主要从事心脏电生理方面的研究,现在甘肃省第二人民医院内四科。电话:(0931)4158260,E-mail:shaopeng20071111@163.com
通讯作者:张卫泽,电话:(0931)8975211,E-mail:zhangzwz@medmail.com.cn
收稿日期:2006-12-20;修回日期:2007-04-22

盐水中灌胃;C组和A组给予等量生理盐水灌胃,均喂养8周。

1.2 血压及血管紧张素Ⅱ测定

8周后给大鼠腹腔内注射戊巴比妥钠(20 mg/kg),麻醉后分离左颈动脉并插管,连接压力感受器于二导生理仪测定平均动脉压。取腹主动脉血2 ml,注入冰水浴冷却的预先加有酶抑制剂的抗凝管中,摇匀,以1 000 r/min低温离心机离心5 min,分离血浆,置于-20 ℃冰箱保存待测。打开大鼠胸腔,取100 mg心肌组织加入AngⅡ匀浆液匀浆,加入无水酒精5 ml,振荡后以2 500 r/min离心5 min,取上清液置于-20 ℃冰箱保存待测。血浆、心肌AngⅡ浓度均采用放射免疫法检测,按试剂盒(购自北京北方生物技术研究所)说明进行。

1.3 标本采集及处理

将其余心脏组织置于40 g/L中性福尔马林液中固定,经石蜡包埋后,取心脏冠状面最大横径处切片,连续切片3张,切片厚4 μm,其中1张用于HE染色,以观察组织的大致形态和心肌细胞走向,另2张用于免疫组化检测。

1.4 免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2处理5 min,双蒸水洗2 min×3次,置于pH 6.0枸橼酸缓冲液中,微波修复抗原10 min,滴加BSA封闭液,室温20 min,滴加1∶100稀释的Cx40多克隆抗体(武汉博士德公司生产),4 ℃过夜,PBS洗2 min×3次,滴加生物素化羊抗兔IgG,37 ℃ 1 h,PBS清洗2 min×3次,加入链霉亲和素-生物素-过氧化物酶,37 ℃ 20 min,PBS清洗,DAB显色(其中1张切片再经苏木精轻度复染,用于观察Cx40分布),脱水、透明、封固。光镜下观察左侧心房肌纵行组织,在每张切片中随机各取3个视野,测定每个视野下阳性物质的平均光密度(optical density,OD),利用BI-2000图像分析系统对大鼠Cx40的光密度参数进行半定量分析。

1.5 统计学分析

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件进行,组间比较方差分析,两两比较采用Bonferroni法,相关分析采用偏相关分析。

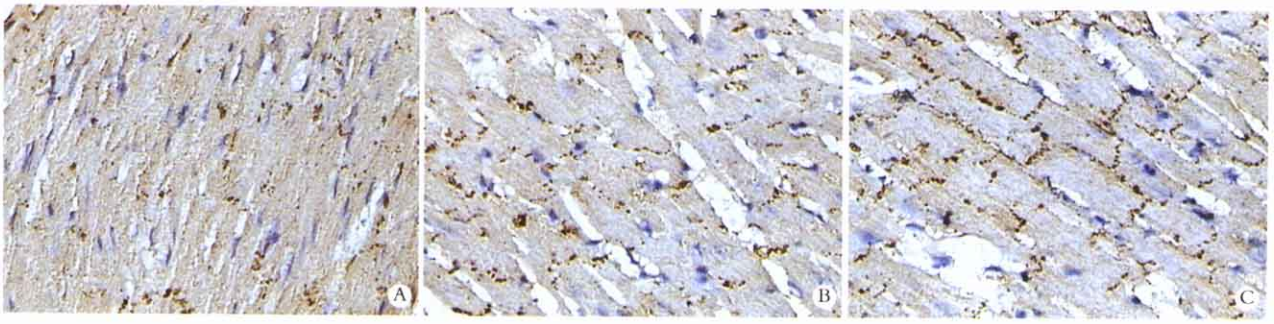
2 结果

2.1 血压及血管紧张素Ⅱ测定

3组大鼠颈动脉血压显示,A组平均动脉压较C组明显升高($P<0.01$);B组较A组降低($P<0.01$),而和C组无明显差异。A组大鼠血浆及心肌AngⅡ水平较C组均明显升高($P<0.01$),B组较A组明显降低($P<0.01$),而较C组无明显差异($P>0.05$),见表1。

2.2 免疫组化染色观察

由图1所示,C组大鼠心房Cx40阳性的缝隙连接(棕黄色颗粒)排列规律,多数位于心肌细胞长轴垂直的端-端相接处,少数位于与长轴平行的细胞侧-侧相接部位,而A组Cx40端-端分布减少,侧-侧分布相对增多,B组Cx40分布不均一程度则明显减轻。半定量分析表明,与C组相比,A组Cx40表达量(OD值反映)明显降低($P<0.01$),而B组无明显变化($P>0.05$),见表1。



A:结扎组;B:贝那普利组;C:对照组

图1 大鼠心房肌Cx40(棕黄色颗粒)的表达 (SABC ×200)

表1 3组大鼠血压、AngⅡ浓度及心房Cx40的比较($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

组别	平均动脉压(kPa)	血浆AngⅡ(pg/ml)	心肌AngⅡ(pg/ml)	Cx40(OD)
C组	14.71±0.55	267.11±45.96	20.34±1.56	0.32±0.03
A组	22.65±1.45 [a]	610.27±76.98 [a]	75.99±4.58 [a]	0.23±0.01 [a]
B组	15.57±1.03 [b]	316.41±97.94 [b]	23.24±2.50 [b]	0.29±0.02 [b]

a:$P<0.01$,与C组比较;b:$P<0.01$,与A组比较

2.3 相关性分析

心房Cx40与平均动脉压之间无相关关系($r=-0.250\,5$,$P>0.05$),而与血浆、心肌AngⅡ水平有相关关系,且呈负相关($r=-0.759\,4$和$r=-0.842\,1$,$P<0.01$)。

3 讨论

AngⅡ作为肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system,RAS)中主要的效应分子,除存在于循环系统外,还广泛存在于局部组织,在局部组织中调节细胞生长、重建以及生物活性物质的释放[3]。本研究采用大鼠肾上腹主动脉部分结扎,不仅能增加左室压力负荷,而且能激活血浆和组织中的RAS系统,使血浆和组织中的AngⅡ水平升高。从实验结果来看,结扎组大鼠颈动脉平均压较对照组升高,且血浆、心肌组织中AngⅡ浓度均较对照组明显升高,说明模型制作达到实验要求。

以往研究表明,在心肌组织中,由特殊细胞膜结构所构成的缝隙连接(gap junction,GJ)提供心肌细胞间的化学和电的交流通路,以保证协同的动作电位扩布。每个GJ由不同的连接蛋白Cx构成,Cx40是心房主要

的连接蛋白，主要以端-端连接的形式分布于心肌细胞闰盘处，其分布和数量的变化会导致相应传导速度和各向异性传导发生改变，从而引起房颤等多种心律失常。实验结果显示：对照组大鼠心房肌 Cx40 分布密集，排列规律，多数位于与心脏长轴垂直的端-端相接部位，而结扎组大鼠不仅 Cx40 含量较对照组明显减少，而且分布紊乱，端-端分布减少，侧-侧分布相对增多，提示 AngⅡ升高可能导致 Cx40 重构。有研究表明[4]，AngⅡ水平增高，通过与 AT1 受体结合，可激活丝裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）家族中重要的信号分子——细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase，ERK），使缝隙蛋白 S255，S279，S282 多位点磷酸化，导致 Cx 合成增加；同时升高的 AngⅡ与 AT1 受体结合，经与 G 蛋白偶联，导致细胞内 Ca^{2+} 内流增加[5]，从而激活 Ca^{2+} 依赖的蛋白酶 Calpains，破坏细胞亚微结构，导致溶酶体释放，又使 Cx 降解增加，含量降低。这种合成与降解的失衡可能是 Cx 重构的机制之一。Cx40 降解后重新分布，或蓄积于细胞质内，或转移到细胞边缘，正如上述实验结果所见。

同时，本研究结果显示，应用贝那普利后，结扎大鼠心房肌 Cx40 含量明显增加，且分布不均一程度减轻，推测其通过抑制血管紧张素转换酶，减少 AngⅡ的生成，进而减少心肌细胞内 Ca^{2+} 的内流，抑制与 Ca^{2+} 有关的蛋白酶和溶酶体酶的合成、释放，减轻其对 Cx40 的破坏降解，同时稳定 Cx40 合成和降解的平衡，从而减轻了 Cx40 的重构。已有研究显示，心房 Cx 重构可导致心肌细胞间传导减慢和电传导耦联能力的下降，从而在房颤的发生和维持上起着重要作用[6]。ACEI 能够防治房颤[7]，其机制之一可能是通过抑制 AngⅡ的作用，减轻心房 Cx40 重构，从而改善了细胞间的耦联和传导，消除了折返性心律失常的病理基础，最终降低房颤的发生率。

参考文献：

[1] Kumagai K, Nakashima H, Urata H, *et al*. Effects of angiotensin Ⅱ type 1 receptor antagonist on electrical and structural remodeling in atrial fibrillation[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(12): 2197-2204.

[2] Doering C W, Jalil J E, Janicki J S, *et al*. Collagen network remodelling and diastolic stiffness of rat left ventricle with pressure overload hypertrophy [J]. Cardiovasc Res, 1988, 22(10): 686-695.

[3] Matsushita K, Wu Y, Okamoto Y, *et al*. Local renin angiotensin expression regulates human mesenchymal stem cell differentiation to adipocytes [J]. Hypertension, 2006, 48(6): 1095-1102.

[4] 严　卉，陈君柱，朱建华，等. 缝隙连接蛋白在心房纤颤患者心房肌的表达及其信号转导途径 [J]. 中华医学杂志，2004，84(3)：209-213.

[5] 张家明，李大强，于世龙，等. 坎地沙坦对家兔快速心房刺激所致缝隙连接蛋白 40 重构的影响[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2005，19(5)：385-387.

[6] 张卫泽，王方正，张　澍，等. 风湿性心脏病心房颤动患者心房肌缝隙连接重构分布的研究[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2003，17(5)：364-366.

[7] Healey J S, Baranchuk A, Crystal E, *et al*. Prevention of atrial fibrillation with angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers: a meta-analysis [J]. J Am Coll Cardiol, 2005, 45(11): 1832-1839.

（编辑　王小寒）

关于数字的用法

在各种出版物上数字的用法总的原则是：凡是可以使用阿拉伯数字，而且又很得体的地方均应使用阿拉伯数字。以下两种情况必须使用阿拉伯数字：

1　公历世纪、年代、年、月、日和时刻　　例如：公元前 5 世纪、20 世纪 90 年代、1995 年 6 月 8 日 14 时 30 分。

表示年份要写全称，1995 年不能写成 95 年或 95′年；1953－1958 年不能写成 1953－58 年。年月日可以写成 1995-06-08。时刻用“：”分隔的形式。如：13 时 45 分 8 秒可以写成 13:45:08。

2　计数和计量（整数、小数、分数、百分数、均数）包括序数、编号　　4 位和 4 位以上的数字采用三位分节法，不用“千分撇”，节与节之间留半个阿拉伯数字的空隙（如 2,431 改为 2 431）。年份、部分代号、仪器型号等非计量数字不用分节，也不加千分撇。尾数“0”多，5 位以上的数字，可以用“万”“亿”表示，但不得以十、百、千、百万、十亿等汉字表示，例如 3 579 000 可写成 357.9 万但不能写成 3 百 57 万千或 357 万 9 千。

本刊编辑部