论著

文章编号:1000-5404(2012)14-1422-04

缝隙连接蛋白43在七氟醚后处理保护大鼠离体心肌缺血再灌注中的作用

庞 勇,刘新伟,何东伟,刘 柳 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院麻醉科)

[摘要] **目的** 探讨缝隙连接蛋白(connexin,Cx)43在七氟醚后处理保护大鼠离体心肌缺血再灌注中的作用。**方法** 健康成年雄性SD大鼠40只,体质量200~250 g,采用随机数字表法将其分为4组($n=10$):缺血再灌注组(IR组)、七氟醚后处理组(S组)、七氟醚混合5-羟基葵酸钠(5-HD)组(SH组)及5-HD组(H组)。采用Langendorff装置进行离体心脏灌注。各组均在阻断左冠状动脉(LAD)前维持灌注10 min,然后阻断LAD血流30 min后开放,再灌注120 min,其中S、SH及H组分别于LAD开放后使用3%七氟醚预饱和的K-H液、3%预饱和的七氟醚预充饱和的K-H加5-HD(100 μmol/L)及加入5-HD(100 μmol/L)的K-H液灌注15 min,然后使用普通K-H液继续灌注105 min。分别于阻断LAD前即刻(T0),开放LAD即刻(T1),开放LAD后15 min(T2),开放LAD后135 min(T3)时记录HR、左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张压(LVDP)、左心室最大上升及下降速率($\pm dp/dt_{max}$)。再灌注结束后,取左心室TTC染色测定心肌梗死面积,采用免疫组化染色观测Cx43蛋白表达情况,采用Western blot法检测Cx43蛋白及磷酸化Cx43(p-Cx43)蛋白含量。**结果** 与IR组比较,S组的HR、LVSP、$\pm dp/dt_{max}$较高,LVDP降低,心肌梗死面积小,Cx43蛋白及p-Cx43蛋白含量增加,有统计学意义($P<0.05$)。IR组与SH组及H组之间相比HR、LVSP、$\pm dp/dt_{max}$、LVDP、心肌梗死面积、Cx43蛋白和p-Cx43蛋白差异无显著性($P>0.05$)。**结论** 七氟醚后处理减轻离体大鼠心肌IR损伤的作用可能与其开放线粒体敏感钾通道从而促进Cx43蛋白表达及其磷酸化有关。

[关键词] 七氟醚;缺血后处理;心肌再灌注损伤;缝隙连接蛋白43

[中图法分类号] R654.1;R965;R971.2 [文献标志码] A

Role of connexin 43 in protecting rat myocardium against ischemia/reperfusion injury *in vitro* at sevoflurane post-conditioning

Pang Yong, Liu Xinwei, He Dongwei, Liu Liu (Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the role of connexin43 (Cx43) in protecting rat myocardium against ischemia/reperfusion (I/R) injury *in vitro* at sevoflurane post-conditioning. **Methods** Forty healthy adult male SD rats, weighing 200 – 250 g, were randomly divided into I/R group, sevoflurane post-conditioning group (group S), combined sevoflurane and 5-HD group (group SH), and 5-HD group (group H), 10 in each group. *In vitro* heart was perfused with a Langendoff device for 10 min before the left coronary artery was occluded. The left coronary artery was reperfused after its blood flow was occluded for 30 min followed by 120 min-reperfusion. HR, LVSP, LVDP, and dp/dt_{max} were recorded at occlusion of left coronary artery (T0), intermediate reperfusion (T1), 15 min-reperfusion (T2) and 135 min-reperfusion (T3), respectively. After reperfusion, myocardial infarct size was measured with TTC staining and expression level of Cx43 and its phosporylation protein p-Cx43 was measured with immunohistochemistry staining and Western blotting, respectively. **Results** The HR, LVSP and dp/dt_{max} were higher, the LVDP was lower, the myocardial infarct size was smaller, and the expression level of Cx43 and its p-Cx43 was higher in group S than in I/R group ($P<0.05$). However, no difference was found in the above parameters among I/R group, group SH and group H ($P>0.05$). **Conclusion** The role of Cx43 in protecting rat myocardium against I/R injury *in vitro* at sevoflurane post-conditioning may be related with the open mito-KATP, and thus promote expression of Cx43 and its p-Cx43.

[**Key words**] sevoflurane; myocardial reperfusion; post-conditioning; connexin 43

Corresponding author: Liu Xinwei, Tel:86-23-89011068, E-mail:xxwwliu@yahoo.com.cn

[通信作者] 刘新伟,电话:(023)89011068,E-mail:xxwwliu@yahoo.com.cn

经典的缺血后处理与预处理有着相似的心肌保护效果。在人的心血管系统内发现的缝隙连接蛋白 43(connexin 43,Cx43)是一种组成心肌缝隙连接的一种特殊通道蛋白,在细胞的活动中有着重要的协调功能[1-2]。它的正常表达与分布是缝隙连接通道传导性、通透率、心肌容积率和协调同步舒缩的重要保证[3-4]。研究者[5]在七氟醚后处理的缺血再灌注过程中发现可以通过激活敏感性钾离子(mito-K_{ATP})通道有效地保护缺血再灌注心肌。5-HD 是 mito-K_{ATP}通道的特异性阻断剂,可以减轻心肌之间的电脱偶联和取消心肌细胞膜上 Cx43 蛋白的磷酸化和向细胞内转移,加重对心肌的损伤作用[6]。缺血后处理也可通过改变心肌缝隙连接蛋白 Cx43 磷酸化程度达到心肌缺血再灌注保护作用[7]。而七氟醚后处理是否通过开放 mito-K_{ATP}通道激活 Cx43 蛋白来达到心肌保护效果尚少研究。本研究拟通过观察七氟醚后处理对离体大鼠心肌细胞缝隙连接蛋白 Cx43 的影响,探讨其对心肌缺血再灌注损伤的保护机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

健康成年雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 200 ~ 250 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。采用随机数字表法,将其分为 4 组(n = 10):缺血再灌注组(IR 组),七氟醚后处理组(S 组),七氟醚加 5-HD 组(SH 组)和 5-HD 组(H 组)。

1.2 药品及试剂

七氟醚(生产批号:1328,Abbott 雅培公司,美国);挥发罐(Vaporizer VP300 型,中国);K-H 液(mmol/L):NaCl 118.5,KCl 4.75,$MgSO_4$ 1.2,KH_2PO_4 1.2,$CaCl_2$ 2.5,$NaHCO_3$ 25.0,葡萄糖 11.1;5-羟奎酸盐(5-hydroxydecanoate sodium salt,5-HD,Sigma 公司,美国);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC,Sigma 公司,美国);兔抗 Cx43 单克隆抗体,兔抗 p-Cx43 单克隆抗体,兔抗鼠 IgG 抗体(Bioworld 公司,美国);单去污剂裂解液(北京普利莱生物);PVDF 膜(Millipore 公司);体外灌流装置:Radnoti 120101BEZ(Radnoti 公司,美国);Nikon SMZ1500 摄像系统(日本)。

1.3 离体心脏灌注模型的建立

入选大鼠首先肝素(2 μ/g)腹腔注射抗凝。20 min 后用乌拉坦(浓度 20%,1.5 mg/g)行腹腔注射麻醉。起效后,固定,褪毛,开胸暴露心脏,从主动脉弓上缘离断主动脉和静脉后取出心脏放入 4 ℃ K-H 液中,排空心腔内残血。30 s 内将离体心脏悬挂于 Radnoti 灌注装置,在肺动脉圆锥处及右心房处各剪一小口,使冠脉流出液自然流出。采用以 95% O_2 和 5% CO_2 混合气饱和的 K-H 液(pH 值 7.35 ~ 7.45)在 36.5 ~ 37.5 ℃下,以 75 cmH_2O,2 L/min 的流量恒压灌注。心脏外罩保温套,套内充满 37 ℃恒温循环水。心脏选择标准:HR < 200 次/min,LVSP < 75 mmHg,早搏 > 2 次/min 者舍弃不用,不符合上述标准者舍弃后另补充。

1.4 IR 模型的建立

各组均在阻断左冠状动脉(LAD)前维持灌注 10 min,然后阻断 LAD 血流 30 min 后开放,再灌注 120 min,其中 S、SH 及 H 组分别于 LAD 开放后使用 3% 七氟醚预饱和的 K-H 液(1 个大气压,3% 的七氟醚经过挥发罐氧合 K-H 液 15 min)、3% 预饱和的七氟醚预充饱和的 K-H 加 5-HD(100 μmol/L)及加入 5-HD(100 μmol/L)的 K-H 液灌注 15 min,然后使用普通 K-H 液继续灌注 105 min。

选择 T0:阻断 LAD 前即刻,T1:开放 LAD 即刻,T2:开放 LAD 后 15 min,T3:开放 LAD 后 135 min 4 个时间点,记录 HR、左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张压(LVDP)、左心室最大上升及下降速率($\pm dp/dt_{max}$)。

1.5 心肌梗死面积测定

再灌注结束后,每组随机选出 4 个心脏,以生理盐水冲洗后剪去心房和右心室组织,置于 -20 ℃冰箱冷冻 2 h,垂直心脏长轴方向切成厚度为 1 ~ 2 mm 的薄片,使用 2,3,5-氯三苯四唑(TTC,37 ℃,pH = 7.4)染色 20 min,生理盐水冲洗后使用 Nikon SMZ1500 摄像系统摄像保存,后期用 Image J 1.43u(National Institutes of Health,USA)软件进行分析。砖红色为非梗死区,灰白色为梗死区。心肌梗死面积以左心室梗死面积占左心室总切片面积的百分比表示。

1.6 免疫组化和 Western blot 测定

6 个心脏生理盐水冲洗后取左心室部分标本石蜡包埋切片,行心肌细胞缝隙连接蛋白 Cx43 免疫组化染色,采用 SABC 免疫组化检测 Cx43 蛋白,具体步骤:石蜡固定→4 μm 切片→二甲苯脱钠→梯度乙醇脱水→苏木精染色→乙醇分化→按照免疫试剂盒操作 DAB 染色→苏木精复染→树脂封片。阴性对照使用磷酸缓冲液代替一抗。阳性判断标准:以心肌细胞缝隙连接处棕黄色为阳性,每次随机选 10 个视野,Biosens Digital Imaging Systems V 1.6 分析系统分析阳性表达面积及平均光密度值(AOD),用 AOD × 面积计算积分光密度(IOD)。

取左心室部分标本,-80 ℃冰箱保存,Western blot 检测。冻存组织磨浆,使用单去污剂裂解液,上样样品与还原型 5 × SDS 上样缓冲液(0.25 mol/L Tris · HCl,pH = 6.8,0.5 mol/L 二硫叔糖醇,10% SDS,0.5% 溴酚蓝,50% 甘油)按 4∶1 比例混合,使用 10% 和 4% 分离胶,每泳道上样 50 μg,先 80 V 后 120 V 电泳,电泳结束后将电泳缓冲液换成转移缓冲液,恒定电流 200 mA,转移至 PVDF 膜,约 1.5 h,在 TBST 中清洗 1 min,然后用封闭液封闭过夜。用封闭液将一抗稀释成 1∶500 浓度,内参一抗的稀释浓度为 1∶3 000,然后温育 1.5 h,用 TBST 清洗 3 次,每次 5 min,用封闭液将二抗稀释成 1∶5 000 浓度,然后温育 1.5 h,用 TBST 清洗 4 次,每次 5 min,温育 2 min。化学发光法显色后立即定影,胶片晾干,扫描,使用 UVP 凝胶图像处理系统 Labworks 4.6 软件分析目的条带的灰度值。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计学软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 血流动力学变化

各组在 T0、T1 时血流动力学数据差异无统计学意义(P >

0.05)。T1时间点各组HR、LVSP、±dp/dt$_{max}$降低,LVDP增加($P<0.05$)。T2、T3时间点与IR组比较,S组HR、LVSP、±dp/dt$_{max}$上升,LVDP下降,有统计学意义($P<0.05$)。而T2、T3时间点IR组与SH组、H组比较,HR、LVSP、±dp/dt$_{max}$差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1　各组各时间点血流动力学比较($\bar{x}\pm s$)

组别		T0	T1	T2	T3
IR组	HR(R/M)	302±33	155±37	161±43[a]	149±32[a]
S组		298±27	149±36	179±35	189±36
SH组		289±28	152±41	162±37[a]	148±39[a]
H组		301±27	148±35	156±41[a]	151±34[a]
IR组	LVSP(mmHg)	113±19	69±13	66±17[a]	63±16[a]
S组		105±16	67±11	74±19	81±16
SH组		112±18	66±15	65±13[a]	57±19[a]
H组		119±21	64±18	64±19[a]	60±17[a]
IR组	LVDP(mmHg)	8.45±2.12	48.24±8.28	51.16±9.23[a]	49.62±8.04
S组		8.58±2.61	46.24±7.66	31.66±8.43	28.25±8.11
SH组		8.34±2.39	42.94±9.08	52.12±8.63[a]	51.17±7.91[a]
H组		7.88±2.46	45.13±8.37	49.42±8.78[a]	52.72±9.23[a]
IR组	+dp/dt$_{max}$(mmHg/s)	2 863±277	1 678±289	1 598±315[a]	1 489±307[a]
S组		2 913±256	1 701±321	1 894±289	2 180±289
SH组		2 878±285	1 711±287	1 548±298[a]	1 517±313[a]
H组		2 911±267	1 698±307	1 604±301[a]	1 561±297[a]
IR组	−dp/dt$_{max}$(mmHg/s)	1 487±193	869±182	881±289[a]	917±268[a]
S组		1 571±203	872±193	1 031±272	1 258±241
SH组		1 499±186	873±201	884±301[a]	933±269[a]
H组		1 547±185	885±221	891±279[a]	931±314[a]

a:$P<0.05$,与S组比较

2.2　心肌梗死面积的变化

各组左心室质量差异无统计学意义($P>0.05$)。与S组比较IR组、SH组、H组心肌梗死面积增大,有统计学意义($P<0.05$)。与IR组比较,SH组和H组差异无统计学意义($P>0.05$),见表2。

2.3　免疫组化检测Cx43蛋白表达

免疫组化光镜下可以看到,S组Cx43蛋白主要分布在心室肌细胞与细胞之间的连接处,呈棕黄色,分布规律,多数存在于心肌纤维的端端连接闰盘处,少数位于长轴连接处。IR组、SH组、H组Cx43分布明显较少,偶尔可以见到少数和散点状的分布,无规律。与S组比较IR组、SH组、H组心肌梗死面积增大,有统计学意义($P<0.05$)。与IR组比较,SH组和H组差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

表2　各组心肌梗死面积比较($\bar{x}\pm s$)

组别	左心室质量(mg)	心肌梗死面积(%)
IR组	364±27	21±6[a]
S组	377±31	9±7
SH组	368±35	25±9[a]
H组	359±37	24±7[a]

a:$P<0.05$,与S组比较

表3　各组平均光密度值(AOD)和积分光密度(IOD)比较($\bar{x}\pm s$)

组别	AOD	IOD
IR组	0.24±0.84[a]	795.6±322.7[a]
S组	0.43±0.64	1 415.5±279.3
SH组	0.22±0.82[a]	803.3±302.5[a]
H组	0.22±0.80[a]	812.4±299.5[a]

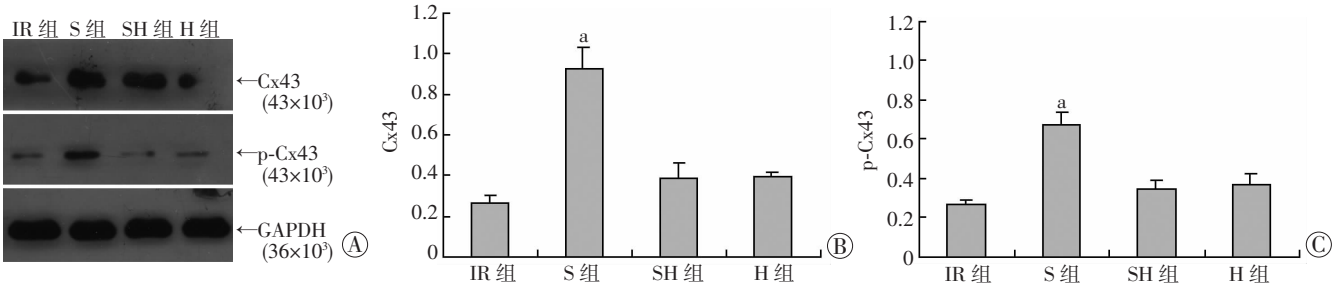
a:$P<0.05$,与S组比较

2.4　Western blot检测Cx43水平变化和磷酸化Cx43(p-Cx43)水平

各组的Cx43和p-Cx43均表达。S组与IR组、SH组、H组比较,有统计学意义($P<0.05$);IR组与SH组、H组比较,没有统计学意义($P>0.05$)。见图1。

3　讨论

本研究采用Varadarajan[8]的方法建立大鼠离体心脏灌注模型,采用Yao等[9]所选择的吸入七氟醚浓度[1个大气压,3%的七氟醚经过挥发罐氧合K-H液15 min后七氟醚溶解度(0.50±0.04)mmol/L]。本研究结果表明,缺血再灌注可导致大鼠的离体心脏损伤,心率减慢,血流动力学异常,心肌梗死面积增加,说明该研究的大鼠离体心脏模型制备成功。心肌梗死面积被认为是鉴定心肌缺血再灌注损伤的金标准。通过实验从心肌梗死面积上可以观察S组梗死面积明显小于IR组、SH组和H组;IR组、SH组和H组之间心肌梗死面积相似而没有统计学意义,证实七氟醚能明显减少缺血再灌注组后的心肌梗死面积,有明确的心肌保护效果。



A: Western blot检测结果; B、C:分别为Cx43、p-Cx43半定量分析　a:$P<0.05$,与IR组比较

图1　Cx43、p-Cx43蛋白的表达

本研究发现,在使用敏感性钾离子通道(mito-K_{ATP})阻断剂 5-HD 后,心肌梗死面积增加;而未使用 mito-K_{ATP}阻断剂 5-HD 的 S 组,心肌梗死面积明显减少,说明七氟醚后处理可以通过激活 mito-K_{ATP},从而影响心肌缺血再灌注后的损伤,其他相关文献也支持该观点[9]。在基础状态下,心肌细胞的 Cx43 蛋白是处于磷酸化的状态,当心肌缺血再灌注损伤时,Cx43 蛋白将出现脱磷酸化,导致缝隙连接处发生结构改变,表现在结构和功能上的变化,使心肌细胞间传递和偶联发生障碍,加重心肌缺血损伤[10]。同时我们观察到,S 组心肌细胞间的 Cx43 蛋白分布整齐,棕黄色颗粒较多,分布规律,多数存在于心肌纤维的端端连接闰盘处,少数位于长轴连接处。IR 组、SH 组、H 组 Cx43 分布明显较少,偶尔可以见到少数和散点状的分布,无规律。说明七氟醚后处理后,心肌细胞间的 Cx43 蛋白含量较使用阻断剂和单纯缺血再灌注增多,与心肌梗死面积成反比。缺血预处理能保护 Cx43 的磷酸化程度,稳定心肌电偶联状态,保持正常的心肌电生理状态;缺血后处理同样能减少心肌梗死面积、减少心肌缺血再灌注心律失常的发生。李永慧等[7]发现缺血后处理可使缺血再灌注心肌 Cx43 的表达改善,大小较一致,分布均一,Cx43 的 mRNA 水平明显增高,显著减少心律失常的发生率,这与本实验的结果一致。

通过本研究发现,单纯的缺血再灌注和使用了 mito-K_{ATP}阻断剂 5-HD 的实验组,其心肌梗死面积、心肌细胞膜 Cx43 蛋白的分布、含量均相似;而使用了七氟醚后处理的实验组,其心肌梗死面积小,心肌细胞膜 Cx43 蛋白分布规律,含量多。说明七氟醚后处理的心肌保护效果可能是通过激活 mito-K_{ATP},而后促使心肌细胞膜上的 Cx43 蛋白去磷酸减少,磷酸化增多。而通过对 Cx43 蛋白和 p-Cx43 蛋白的 Western blot 检测结果显示,S 组与 IR 组、SH 组、H 组比较,有统计学意义($P<0.05$),磷酸化作用对心肌细胞缝隙连接通道的开放性及其功能有着重要的影响。说明七氟醚后处理能减少 Cx43 蛋白的降解,增加 p-Cx43 蛋白的含量,减少其向非磷酸化转换并且减少了 Cx43 蛋白的内化和代谢。苏德淳等[11]的研究发现 mito-K_{ATP}的状态变化可以调节 Cx43 的磷酸化和内化,从而增强心肌细胞之间的偶联和内化,在使用了 mito-K_{ATP}的阻滞剂 5-HD 和开放剂二氮嗪后能调节缝隙连接的功能,提示 mito-K_{ATP}位于缝隙连接的上游。本研究中也发现使用5-HD 后拮抗了缺血后处理对心肌的保护作用,同时表现在 Cx43 蛋白的磷酸化程度的变化上,可以说明缺血后处理减少心肌梗死面积的机制与 Cx43 蛋白连接通讯相关,经过七氟醚的后处理,增加了 p-Cx43 蛋白的含量,降低了心肌细胞间的联系,也减少了心肌细胞的挛缩,降低了缺血再灌注对心肌细胞间有害物质的转运,使缺血区域的有害物质扩散得到阻止,从而使心肌缺血再灌注损伤得以减轻。

七氟醚后处理对心肌保护的机制还可能通过激活 PI3K,抑制 mPTP 的开放减轻缺血再灌注损伤[12]。同时还有研究显示,在心肌细胞的线粒体内同样发现有 mito-K_{ATP}和 Cx43 蛋白的存在,并且 mito-K_{ATP}可能是细胞内的信号传递的起始[13]。因此在七氟醚预处理缺血再灌注心肌时线粒体内的 Cx43 蛋白对心肌缺血再灌注损伤有何作用及其具体机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Bloor D J, Wilson Y, Kibschull M, *et al*. Expression of connexins in human preimplantation embryos *in vitro*[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2004, 2: 25.

[2] Dhein S. Gap junction channels in the cardiovascular system: pharmacological and physiological modulation[J]. Trends Pharmacol Sci, 1998, 19(6): 229-241.

[3] Schulz R, Heusch G. Connexin43 and ischemic preconditioning[J]. Adv Cardiol, 2006, 42: 213-227.

[4] Schulz R, Boengler K, Totzeck A, *et al*. Connexin 43 in ischemic pre- and postconditioning[J]. Heart Fail Rev, 2007, 12(3/4): 261-266.

[5] Yu L N, Yu J, Zhang F J, *et al*. Sevoflurane postconditioning reduces myocardial reperfusion injury in rat isolated hearts *via* activation of PI3K/Akt signaling and modulation of Bcl-2 family proteins[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2010, 11(9): 661-672.

[6] Jain S K, Schuessler R B, Saffitz J E. Mechanisms of delayed electrical uncoupling induced by ischemic preconditioning[J]. Circ Res, 2003, 92(10): 1138-1144.

[7] 李永慧, 王电烨, 李胜建. 缺血后处理对大鼠缺血再灌注心肌缝隙连接蛋白 43 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(4): 418-420.

[8] Varadarajan S G, An J, Novalija E, *et al*. Sevoflurane before or after ischemia improves contractile and metabolic function while reducing myoplasmic Ca(2+) loading in intact hearts[J]. Anesthesiology, 2002, 96(1): 125-133.

[9] Yao Y, Li L, Li L, *et al*. Sevoflurane postconditioning protects chronically-infarcted rat hearts against ischemia-reperfusion injury by activation of pro-survival kinases and inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening upon reperfusion[J]. Biol Pharm Bull, 2009, 32(11): 1854-1861.

[10] 刘超, 王云, 顾继伟, 等. 缝隙连接蛋白43 在缺血预处理心肌保护中的作用[J]. 宁夏医科大学学报, 2010, 32(2): 198-200, 216.

[11] 苏德淳, 常志文, 范苏英. 缝隙连接在大鼠缺血预适应心肌保护中的作用[J]. 中华心血管疾病杂志, 2006, 34(8): 690-694.

[12] 姚允泰, 方能新, 李立环, 等. PI3K、ERK1/2、mito-K_{ATP}通道及 mPTP 在七氟醚后处理减轻大鼠离体心脏缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2009, 29(10): 915-922.

[13] Boengler K, Dodoni G, Rodriguez-Sinovas A, *et al*. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning[J]. Cardiovasc Res, 2005, 67(2): 234-244.

(**收稿**:2011-11-22;**修回**:2011-12-29)

(编辑 吴培红)