DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.024
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)19-1755-04

论著

心房颤动对风湿性心脏病心房肌细胞Cx40、Cx43表达的影响

黄 骥,宋治远,仝识非 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究风湿性心脏病(风心病)伴与不伴心房颤动(房颤)患者左、右心房肌细胞Cx40、Cx43的表达,探讨房颤与Cx40、Cx43之间的关系。方法 31例换瓣病人分为3组:①实验Ⅰ组(11例)为阵发性房颤或房颤持续时间≤6个月;②实验Ⅱ组(12例)为房颤持续时间均>6个月;③对照组(8例)为窦性心律。手术中分别切取左、右心耳处心房肌组织。用免疫印迹法和免疫组化技术检测左、右心房肌Cx40、Cx43的表达与分布。结果 ①每例患者左、右心房肌以及每组中左、右心房肌Cx40、Cx43表达量均值无显著性差异。②实验Ⅰ组与对照组比较,Cx40表达量明显降低($P<0.05$),而实验Ⅱ组与对照组比较其降低更加明显($P<0.01$)。③Cx43的表达量在3组间均无显著差异;④实验组Cx40阳性染色较对照组明显减少,且分布紊乱(除细胞头尾部外,细胞侧面染色增多)。⑤3组间Cx43阳性染色的分布无明显差别。结论 ①左、右心房肌Cx40、Cx43的表达与分布均无显著差异。②有房颤者心房肌Cx40表达量下调及分布不均可能与房颤的发生与维持有关。

关键词:风湿性心脏病;心房颤动;心房肌;缝隙连接
中图法分类号:R394.2;R541.2;R541.75 文献标识码:A

Effects of atrial fibrillation on expressions of connexin40 and connexin43 in atrial myocytes in rheumatic heart disease patients

HUANG Ji, SONG Zhi-yuan, TONG Shi-fei (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of atrial fibrillation (AF) on connexin40 (Cx40) and connexin43 (Cx43) in the left and right atrial myocytes when the patients with rhematic heart disease suffered from AF or not. Methods A total of 31 patients undergoing cardiac surgery for correction of valvular defect were divided into three groups: Group Ⅰ, AF lasting ≤6 months ($n=11$), Group Ⅱ, AF lasting >6 months ($n=12$), control group, without AF ($n=8$). Atrial muscle samples of the left and right atrial appendage were cut off during heart valve replacement. Expressions of Cx40 and Cx43 were detected by immunoblotting and immunohistologic analyses. Results ①No obvious change of Cx43 and Cx40 in the left and right atrium of each patient in each group was measured. ②Compared with that in the control group, the level of Cx40 was decreased signficantly in Group Ⅰ ($P<0.05$) and more signficantly in Group Ⅱ ($P<0.01$). ③No significant difference in the level of Cx43 was found in the three groups. ④There was an increase in the immunostaining of Cx40 at the lateral membrane and low density area of immunostaining of the atrial cells in the expriment groups. ⑤No change of expression of the Cx43 signal was found in the three groups. Conclusion ① No obvious difference in the level and distribution of Cx43 and Cx40 is found between the left and right atria. ② Down-regulation of level and unevern distribution of Cx40 may be associated with the occurrence and maintenance of AF.

Key words: rheumatic heart disease; atrial myocyte; atrial fibrillation; gap junction

心房颤动(简称房颤)是常见的心律失常,其发病机制尚不十分清楚。由于细胞离子通道改变只影响细胞的兴奋性,整个心肌组织的同步兴奋与由缝隙连接蛋白(connexin, Cx)组成的缝隙连接通道之间的快速

基金项目:第三军医大学科研基金资助课题(2001)
Supported by the Rearsorch Project Sponsored by Third Military Medical Vniversity (2001)
作者简介:黄 骥(1969-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事心律失常方面的研究。电话(023)65398648
收稿日期:2003-09-15;修回日期:2004-01-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

电流转移有关。在哺乳类动物心脏，经鉴定有3种Cx[1]，即Cx40、Cx43、Cx45，虽有研究结果显示Cx与房颤的发生与维持有关，但目前有关房颤与心房肌Cx40、Cx43表达的研究结果尚有争论[2~4]。本研究拟通过观察风湿性心脏病(简称风心病)二尖瓣病变伴与不伴房颤患者左、右心房肌细胞Cx40、Cx43的表达，探讨房颤对Cx40、Cx43表达的影响，从而揭示风心病患者房颤发生与维持的可能机制。

1 材料和方法

1.1 研究对象

选择2001年3月至2002年2月在我院胸心外科住院、接受心脏瓣膜置换术的风心病患者共31例为研究对象，其中男性11例，女性20例，年龄为18~56(40.5±10.5)岁，而有下列情况之一者不纳入本研究：①年龄小于18岁或大于60岁者；②合并有感染性心内膜炎者；③合并有高血压、糖尿病、冠心病或严重肝肾功能不全者；④非风心病而接受心脏瓣膜置换术者；⑤单纯主动脉瓣置换术者；⑥临床有风湿活动征象者。31例患者按有无房颤及房颤持续时间长短分为3组：实验Ⅰ组11例，均有阵发性房颤或房颤持续时间≤6个月；实验Ⅱ组12例，房颤持续时间均>6个月；对照组8例，均为窦性心律者。

1.2 标本留取

在行心脏瓣膜术建立体外循环时分别切取左、右心耳处心房肌组织标本，随即置于液氮中保存备用。

1.3 Cx40、Cx43定量检测

1.3.1 主要试剂 羊抗人Cx43抗体(美国Santa Cruz公司产品)，兔抗鼠Cx40抗体(购自美国ADI公司)，生物素化IgG(H+L)及辣根酶标记链亲合素(均购自北京中山公司)。

1.3.2 方法步骤 ①心房肌总蛋白提取：取心房肌组织块1 g，加入总蛋白提取液1 ml，匀浆、裂解、离心，即得总蛋白提取液，-70 ℃冰箱保存备用。②蛋白电泳：采用12%分离胶及5%浓缩胶的SDS-PAGE系统。③免疫印迹杂交：80 mA恒流电转印4 h，PVDF膜放入封闭袋中4 ℃过夜。一抗工作液，37 ℃孵育1 h，0.02 mmol/L PBST洗膜。二抗工作液，37 ℃孵育1 h，洗膜。三抗，37 ℃孵育1 h，洗膜。DAB增强显色法显色。④密度扫描定量：每张PVDF膜的第一样品均来自各组的同一标本，扫描、照相并在凝胶成像分析系统上分析处理。蛋白含量以条带的A值×面积(Int×mm²)表示。

1.4 Cx40、Cx43定性观察

采用免疫组化SP法。设立不加一抗，用PBS代替而其它条件均相同的阴性对照组。Cx43工作浓度1∶600，Cx40工作浓度1∶500。免疫组化切片光镜下定性分析，以背景适度、在心房肌纵切面上细胞相邻处出现点状或条状棕褐色显色为阳性表达。

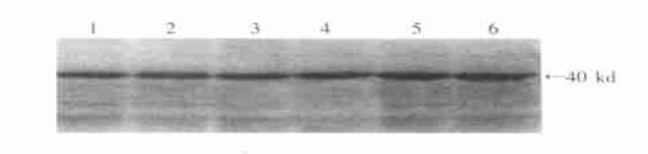
1.5 统计学处理

实验数据以$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS10.0统计软件进行单因素方差分析及均数间的两两比较。

2 结果

2.1 每例患者左、右心房肌Cx表达量比较

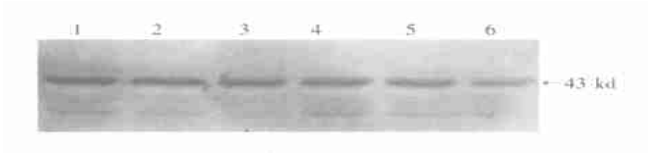
每例患者自身左、右心房肌标本Cx40和Cx43表达量比较均无显著差异($P>0.05$)，见图1、2。



1, 3: Left atrial of experimental group; 2, 4: Right atrial of experimental group; 5: Left atrial of control group; 6: Right atrial of control group

图1 **Western blot**分析各例患者自身左、右心房肌**Cx40**表达

Fig 1 Western blot analysis of Cx40 in left and right atrial myocytes in each patient



1, 3: Left atrial of experimental group; 2, 4: Right atrial of experimental group; 5: Left atrial of control group; 6: Right atrial of control group

图2 **Western blot**分析各例患者自身左、右心房肌**Cx43**表达

Fig 2 Western blot analysis of Cx43 in left and right atrial myocytes in each patient

2.2 3组间左、右心房肌Cx40表达比较

由表1可知，3组中每组患者左、右心房肌Cx40表达量比较均无显著差异($P>0.05$)。实验Ⅰ组与对照组比较，左、右心房肌Cx40表达量均明显降低($P<0.05$)，实验Ⅱ组与对照组比较，左、右心房肌Cx40表达量降低更为明显($P<0.01$)。

表1 3组间左、右心房肌**Cx40**表达比较($\bar{x}\pm s$，Int×mm²)

Tab 1 Comparison of Cx40 in left and right atrial myocytes in the three groups($\bar{x}\pm s$，Int×mm²)

Group	n	Left atrium	Right atrium
Control group	8	8 674.8±1 008.3	8 617.4±1 004.7
Experimental groupⅠ	11	5 949.2±832.9★	5 992.1±806.5★
Experimental groupⅡ	12	4 169.0±955.9★★	4 120.2±954.9★★

$F_{Left}=74.087$, $P=0.000$; $F_{Right}=109.189$, $P=0.000$;
★: $P<0.05$; ★★: $P<0.01$, *vs* control group

2.3 3组间左、右心房肌Cx43表达量比较

表2表明，3组中每组患者左、右心房肌Cx43表达量比较均无显著差异($P>0.05$)。而组间比较发现，实验Ⅰ组及实验Ⅱ组左、右心房肌Cx43表达量虽较对照组增高，但无统计学意义($P>0.05$)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　3 组患者左、右心房肌细胞 Cx43 表达量比较($\bar{x}\pm s$, Int× mm²)

Tab 2　Comparison of Cx43 in left and right atrial myocytes in the three groups ($\bar{x}\pm s$, Int× mm²)

Group	n	Left atrium	Right atium
Control group	8	8 194.2±773.1	8 174.7±749.4
Experimental group Ⅰ	11	8 268.4±1 210.9	8 294.8±1 216.4
Experimental group Ⅱ	12	8 216.8±818.4	8 269.1±828.2

$F_{Left}=36.548$, $P=0.515$; $F_{Right}=24.687$, $P=0.667$

2.4　Cx40、Cx43 定性检测结果

2.4.1　Cx43 分布　　免疫组化检测发现, 实验Ⅰ组和实验Ⅱ组比较 Cx43 分布无明显差别, 它们分别与对照组比较 Cx43 分布也无明显差别, 都主要在细胞闰盘处出现"阶梯状"阳性染色, 密度均一(图 3)。

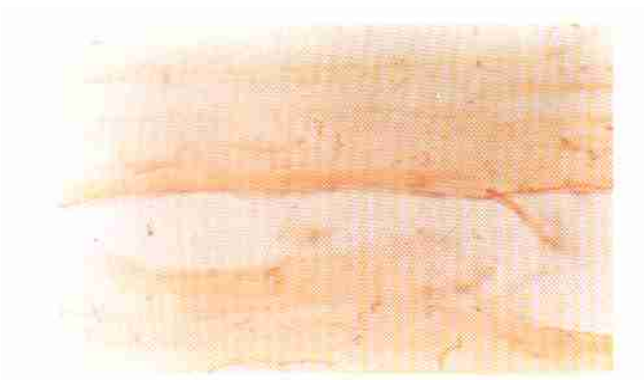


图 3　对照组患者心房肌细胞 Cx43 主要分布于闰盘处, 呈"阶梯"状排列　(S-P× 400)

Fig 3　Cx43 in atrial myocytes in the control group mainly distributed in the intercalated discs with "ladder" shape　(S-P× 400)

2.4.2　Cx40 分布　　免疫组化检测发现, 实验Ⅰ组和实验Ⅱ组分别与对照组比较, 实验组的阳性染色均明显减少, 且分布紊乱(除细胞头尾部外, 细胞侧面染色增多)。而实验Ⅰ组和实验Ⅱ组之间比较, Cx40 分布无显著差异(图 4)。

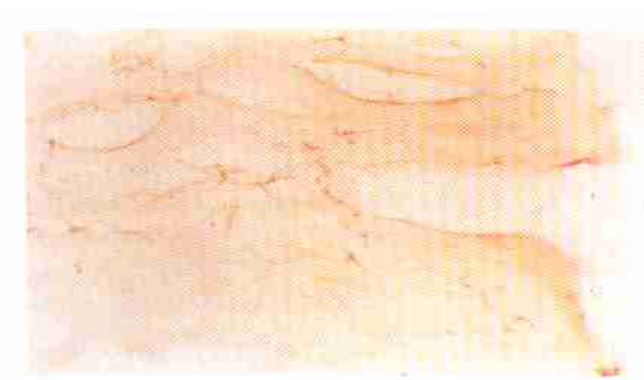


图 4　实验Ⅰ组心房肌细胞 Cx40 阳性染色减少, 细胞表面见阳性染色分布紊乱, 细胞测面染色增多　(S-P× 400)

Fig 4　Immunoreactivity of Cx40 distributed disorderly. Low density area and an increase in the immunostaining of Cx40 at the lateral membrane were found in the expriment group Ⅰ　(S-P× 400)

3　讨论

本研究表明每例患者自身左、右心房肌对比, 其 Cx40、Cx43 表达量无显著差异, 每组内左、右心房肌比较, 其 Cx40、Cx43 的表达也无显著差异。理论上讲, 风心病二尖瓣病变最先累及左侧心腔的血流动力学, 左心房肌的病理改变也应较右心房肌明显, 但由于接受心脏瓣膜置换术的病人病史一般较长[本组 31 例患者发病至手术平均时间为(5.3±3.7)年], 病情逐渐加重, 右侧心腔到晚期承受的压力负荷和容量负荷均增加, 心肌也反复受损, 最终出现与左侧心脏相同的改变[5]。

近年研究表明, 构成细胞间直接通讯的缝隙连接通道与房颤的发生与维持密切相关, 而缝隙连接通道主要由缝隙连接蛋白组成。目前认为, 与房颤有关的缝隙连接蛋白主要有 Cx40 和 Cx43。有研究显示房颤时 Cx43 的表达水平增高[6], 但 Kostin 等[4] 对房颤者右心耳标本研究发现 Cx43 表达水平是降低的。上述研究结果的差异, 可能与研究对象、人类种族及心房肌的保存方法不同有关。Cx40 与房颤的关系, 现有研究结果也不完全一致, 有研究报道房颤病人 Cx40 表达量增加 2.7 倍[7,8]。尽管如此, 目前多数研究者认为房颤时 Cx40 表达量减少。

Van der 等[2] 发现房颤时正常 Cx40 密度区域内存在直径 0.15 ~0.6 mm 的 Cx40 低密度区域, 这种 Cx40 分布明显不均一可使心肌的激动波阵面发生弯曲, 容易发生传导阻滞和折返激动。电极标测发现心房传导速度与 Cx40 免疫标测信号强弱有关, Cx40 的缺乏可造成房内传导紊乱, 并增加心房易损性[9,10]。

本研究结果显示: 无论有无房颤, 心房肌细胞 Cx43 的表达量无显著差异。但与无房颤组比较, Cx40 的表达量在有房颤者中明显降低, 且随房颤持续时间的延长, 有下降更明显的趋势, 表明心房肌 Cx40 表达量降低可能是房颤发生与维持的重要因素之一。而进一步研究 Cx40 减少及分布不均的原因, 将有助于房颤的临床防治。

参考文献:

[1] Van der Velden H M, Van Kempen M J, Wijffels M C, *et al*. Altered pattern of connexin40 distribution in persistent atrial fibrillation in the goat[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 1998, 96(6): 596—607.

[2] Van der Velden H M, Ausma J, Rook M B, *et al*. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat[J]. Cardiovasc Res, 2000, 46(3): 476—486.

[3] Van der Velden H M, Van Kempen M J, Groenewegen W A, *et al*. Comparative analysis of the distribution of the gap junction proteins connexins 40

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

and 43 in chronic atrial fibrillation in patients and a goat model[J]. Circulation, 1997, 96(8): 237.

[4] Kostin S, Kleina G, Szalayb Z, *et al*. Structural correlate of atrial fibrillation in human patients[J]. Cardiovasc Res, 2002, 54(2): 361—379.

[5] 苏丕雄, 官颖鹏, 尤 斌, 等. 风湿性瓣膜病心肌损害的体视学分析[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2000, 16(6): 324—326.

[6] Elvan A, Huang X D, Pressler M L, *et al*. Radiofrequency catheter ablation of the atria eliminates pacing-induced sustained atrial fibrillation and reduces connexin 43 in dogs[J]. Circulation, 1997, 96(6): 1675—1685.

[7] Polontchouk L, Haefliger J A, Ebelt B, *et al*. Effects of chronic atrial fibrillation on gap junction distribution in human and rat atria[J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38(3): 883—891.

[8] Dupont E, Ko Y S, Rothery S, *et al*. The gap-junctional protein connexin40 is elevated in patients susceptible to postoperative atrial fibrillation[J]. Circulation, 2001, 103(6): 842—849.

[9] Kanagaratnam P, Rothery S, Patel P, *et al*. Relative expression of immunolocalized connexins 40 and 43 correlates with human atrial conduction properties[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 39(1): 116—123.

[10] Hagendorff A, Schumacher B, Kirchhoff S, *et al*. Conduction disturbances and increased atrial vulnerability in connexin40-deficient mice analyzad by transesophageal stimulation[J]. Circulation, 1999, 99: 1508.

（编辑 张大春）

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2004)19-1758-01

米非司酮终止“早早孕”40 例的效果分析

Analysis of the therapeutic efficacy of mifepristone for termination of early pregnancy in 40 cases

程 湘, 王 欣, 王 智, 钟序素, 林桂兰 （第三军医大学新桥医院妇产科, 重庆 400037）

米非司酮联合米索前列醇用于终止早孕, 是较好的药物流产方法, 但这一配伍方案使用的前提, 是 B 超能够确定宫腔内孕囊。如何有效的处理 B 超能够确定宫腔内孕囊或者异位妊娠包块之前的更早期的妊娠, 是值得临床探讨的课题。我们对这部分患者, 采用米非司酮进行催经止孕, 收到了较好的效果。

1 资料与方法

入选病例: 育龄妇女, 有停经史, 尿 HCG 阳性, 阴道 B 超宫内宫外均未见妊娠物, 我们称之为早早孕。选自愿用米非司酮终止早早孕的健康妇女 40 例, 均为在本院门诊就诊患者。无米非司酮使用禁忌及严重心肺肝肾疾病史。无宫内节育器。停经 30～63 d, 尿酶联法 HCG 定性为阳性, 阴道 B 超见宫内膜增厚, 宫内宫外均未见妊娠物。

服药方法: 口服米非司酮 25 mg, 2 次/d, 共 3 d。于饭前或饭后 2 h 服用。总量 150 mg。门诊随访 1 个月。

疗效判断: 有效: 服药期间出现阴道流血, 服药完后出现阴道流血量基本同往常月经量, 1 周内干净。无效: 服药完后没有出现似月经量的阴道流血, B 超检查宫内外有妊娠物, 需要进一步处理。血 HCG 测定: 服药当天抽血查 HCG, 每 1 周后复查, 至降为正常。

统计学方法: 计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 软件进行数据库分析。组间比较用 t 检验。

2 结果

有效率: 40 例早早孕妇女, 用药后 39 例有效, 有效率 97.5%。1 例用药无效, 患者为停经 34 d, 服药期间出现少量阴道流血, 服药完后未出现阴道流血量基本同往常月经量的表现。3 周后来复查, 为宫内双胎妊娠, 行吸宫术终止妊娠。

阴道流血情况: 有效者服药后第 2～3 天开始出血, 持续 4～5 d 后干净。1 周后复查, 已经有过流血量基本似往常月经量的情况, 已经干净或者基本干净。

血 HCG 测定: 服药前血 HCG 值为 115.94～5 314.22 (1 734.55±148.74) mIV/ml。服药后 1 周, 血 HCG 值为 3.12～1 341.56(763.82±51.67)mIV/ml, 服药后 2 周, 血 HCG 值为 1.20～568.35(249.23±32.11)mIV/ml, 服药后 3 周, 血 HCG 值为 1.45～4.26(2.69±0.16)mIV/ml。统计学检验, 服药后 1 周的血 HCG 值低于服药前($P<0.05$), 服药后 2 周的血 HCG 值低于服药后 1 周($P<0.05$), 服药后 3 周的血 HCG 值低于服药后 2 周($P<0.05$), 差异均显著。

药物不良反应: 1 例服药后恶心明显, 改为饭后 30 min 服药好转。其他 39 例无明显不良反应。

3 讨论

米非司酮为孕激素受体拮抗剂, 进入体内可与孕激素受体结合, 具有诱发月经、抑制排卵、抗着床等作用。米非司酮还能够增加妊娠子宫对外源性前列腺素的敏感性, 因而用米非司酮配伍米索前列醇是较为理想的终止早孕的药物流产方法[1]。在终止中孕的研究中也有较好的效果[2]。但这一配伍方案使用的前提, 是 B 超能够确定宫腔内孕囊。随着血、尿 HCG 测定的普及, 敏感性提高, 能够及早发现有妊娠, 但妊娠部位的确定时间相对延迟, 部分早孕患者, 尤其是异位妊娠患者, 等到确诊时已经丧失了最佳的治疗时间, 因此如何更早期有效的处理妊娠, 是值得探讨的课题。

（下转 1764 页）

作者简介: 程 湘(1963—), 女, 重庆市人, 博士, 副主任医师, 副教授, 主要从事妇科肿瘤, 女性内分泌失调及心理咨询方面的的研究, 发表论文 10 篇。电话: (023)65215190

收稿日期: 2003-09-24; 修回日期: 2004-03-08

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net