

扶芳藤合剂对兔病态窦房结综合征 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达的影响¹⁾

朱智德, 卢健棋, 韦斌, 姜浩, 王庆高

摘要:目的 观察复方扶芳藤液对兔病态窦房结综合征模型心率(HR)及窦房结电生理、及心脏窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达的影响,并探讨其作用机制。**方法** 将 40 只清洁级健康日本大耳白兔采用随机、平行对照的方法,按随机数字表分为空白对照组、模型组、心宝丸组及复方扶芳藤液组(中药组)高、低剂量组,每组各 8 只。造模成功后空白对照组、模型组分别予生理盐水 15 mL/d,心宝丸组予心宝丸悬浮液,中药组高、低剂量组分别予复方扶芳藤液连续灌胃 14 d。取各组兔上下腔静脉之间的窦房结组织,常规切片,免疫组化检测窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达。**结果** 大剂量组窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达明显高于模型组($P < 0.05$);小剂量组干预后窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达较模型组增高,其中,Cx40 较模型明显增高($P < 0.05$)。**结论** 复方扶芳藤可上调损伤兔窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白的表达,可能是治疗病态窦房结综合征的机制之一。

关键词:病态窦房结综合征;复方扶芳藤合剂;窦房结;Cx45;Cx43;Cx40

中图分类号:R541.7 R285.6 **文献标识码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1672-1349.2013.12.041 **文章编号:**1672-1349(2013)12-1490-03

Effect of Fufang Fufangteng Mixture on CX45, CX43 and CX40 Protein in Rabbit with Sick Sinus Syndrome

Zhu Zhide, Lu Jianqi, Wei Bin, et al // Pharmaceutical Factory, Guangxi University of Chinese Medicine(Nanning 530001)

Abstract: Objective To observe the effect of Fufangteng Mixture on CX45, CX43 and CX40 protein in rabbit with sick sinus syndrome. **Methods** Forty Japanese white rabbits were randomly divided into five groups: Control group, model group, Xinbao pill group, high dose herb (Fufangteng Mixture) group and low dose herb group, 8 rabbits in each group. Control group and model group received physiological distilled water. Xinbao pill group received Xinbao pill. High dose herb group and low dose herb group received Fufangteng Mixture 3.6 g/(kg · d) and 0.9 g/(kg · d) respectively. After 14 days of continuous gavaging, sick sinus syndrome models were established by 20% formaldehyde hydropathic compressed on sinus node area. CX45, CX43 and CX40 protein in sinoatrial node tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** CX45, CX43 and CX40 protein in high dose of herb group was significantly higher than that in model group ($P < 0.05$). CX40 protein in low dose of herb group was significantly higher than that in model group ($P < 0.05$). **Conclusion** The Fufangteng Mixture could promote the expression of CX45, CX43 and CX40 in sick sinus.

Key words: sick sinus syndrome; Fufangteng Mixture; CX45; CX43; CX40

病态窦房结综合征(sick sinus syndrome, SSS)是由于心脏窦房结及其周围组织的结构与功能的病理改变,导致心肌起搏功能和/或心肌传导束冲动传导障碍,产生各种心律失常的综合征。窦房结(atrionector)是心脏的最高起搏点。窦房结由 P 细胞、T 细胞和心房肌细胞所组成;P 细胞(起搏细胞、窦房结细胞)形圆小(5 μm ~10 μm)、色淡苍白(pale)、分化程度低、类似原始心肌细胞。具有自动起搏的特性。窦房结细胞联结包括 P-P 细胞(起搏细胞)、P-T(移行细胞)、T-T 细胞、T-心房肌细胞之间的连接,其连接方式包括缝隙连接(gapjunction, GJ)、桥粒(desmosome)和黏着连接(adhering junction)三种。缝隙连接蛋白(connexin, Cx)是构成细胞间 GJ 的分子基础。缝隙连接由连接蛋白家族跨膜蛋白组成,研究已确定在心脏表达的 Cx 家族成员主要有 Cx43、Cx40、Cx45。

中医学根据 SSS 的临床表现,多将其归属于“心悸”、“头晕”、“胸痹”、“厥证”、“脉迟症”、“脉结代”等范畴。复方扶芳藤合剂主要由扶芳藤、人参、黄芪等药组成,有益气行血、温补心脾肾之功。在临床中发现扶芳藤合剂对 SSS 有较好的疗效,其作

用机制尚未明了。本实验在成功建立家兔 SSS 模型的基础上,通过观察扶芳藤合剂对窦房结细胞 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达的影响,探讨其治疗病态窦房结综合征的分子机制。

1 材料与方

1.1 实验动物 健康雄性家兔 40 只,体重(2.5 \pm 0.5)kg,由广西中医药大学实验动物中心提供,常规饲养,自由进食进水。

1.2 实验药品和试剂 复方扶芳藤合剂由广西中医学院制药厂提供(规格:每支 10 mL);心宝丸,广东省药物研究所制药厂生产(规格:每丸 60 mg),以蒸馏水配成 0.2 g/mL 供家兔灌胃用。Cx45、Cx43 蛋白特异性一抗(Rabbitanti-45, Rabbitanti-43, Rabbitanti-4, 美国 Sigma 公司)

1.3 实验仪器 电生理仪,常用手术器械,DF-5A 心脏电生理刺激仪(苏州市东方电子仪器厂),针形四极心电电极(广西中医药大学实验中心提供),DH-140 动物人工呼吸机(浙江医科大学仪器实验厂),BMJ-1 型生物组织包埋机(上海京工业有限公司),RM2315 切片仪(德国 Leica 公司),奥林巴斯 BX51T 生物显微镜(型号 BX51T-32F01,日本 OLYMPUS 公

1) 为广西青年基金资助项目(No. 桂科青 0832053)

司),奥林巴斯显微照相机(型号 C-7070,日本 OLYM-PUS 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组与给药方法 将 40 只大耳白兔按随机数字表随机分为正常组(A 组)、模型组(B 组)、复方扶芳藤合剂高剂量组(C 组)、复方扶芳藤合剂低剂量组(D 组)、心宝丸组(E 组),每组 8 只。正常组不进行造模,其余各组于模型成功后第 5 天开始灌胃给药,连续 2 周,每天 1 次。C 组给予复方扶芳藤合剂 3.6 g/(kg·d),D 组给予复方扶芳藤合剂 0.9 g/(kg·d),E 组给予心宝丸 0.3 g/(kg·d)。A 组、B 组以等体积的生理盐水灌胃。

1.4.2 SSS 模型制作 取以 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 耳缘静脉麻醉。四肢皮下固定针形心电电极并连接至 BL-420F 生物机能实验仪,记录体表心电图。气管插管连接呼吸机,潮气量 22 mL。沿胸骨正中右缘 2 mm~3 mm 剪断第 2~4 肋骨,纵行开胸,注意避免损伤右胸膜,经纵隔打开心包,暴露右心房及右心耳。用干棉签拭干心脏窦房结区(右上腔静脉与右心房交界处),用 20%甲醛溶液浸润 2 mm×3 mm 棉球外敷窦房结区 3 min~5 min,当出现心率较湿敷前下降 30%~50%,出现窦性停搏、快慢综合征、窦房阻滞或结性逸搏为窦房结急性损伤模型成功标志。取出棉球,持续观察 1 h,待心率稳定,青霉素生理盐水冲洗胸腔,逐层关胸。

1.4.3 窦房结取材 行窦房结电生理功能检测后于耳缘静脉注入空气栓塞致死,迅速取出心脏并用生理盐水冲洗,分离出右心耳及上、下腔静脉,剪开上、下腔静脉,于上腔静脉入口以下至从腔耳角向外下沿界嵴到下腔静脉口这一区域切取窦房结组织,将组织修剪为 3 mm×4 mm 的组织块,浸泡于 4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片。

1.4.4 窦房结组织 Cx45、Cx43、Cx40 蛋白表达的检测 采用 SABC 三步法:切片常规脱蜡至水,3%的 H₂O₂ 以消除内源性过氧化物酶活性,蒸馏水洗 3 次。再将切片浸入 0.01 mol/L 的枸橼酸盐缓冲液(pH=6.0)微波炉中加热 3 min,冷却后 PBS 洗涤 2 次,5%BSA 室温下封闭 20 min,滴加适当(50 μL)稀释一抗(兔抗鼠多克隆抗体)4 ℃过夜;PBS 冲洗,滴加生物素化三羊抗兔 IgG,37 ℃20 min,冲洗后滴加试剂 SABC,37 ℃20 min,再次冲洗后 DAB 室温显色,镜下控制反应时间,及时终止。苏木染色、脱水、透明、封片。对照组设计:以 PBS 代替一抗为阴性对照。阳性为棕黄色,阴性不显色。用 Image-pro plus 6.0 图像分析系统,每张切片随机选取 3 个高倍视野测定免疫组化图像中平均光密度。

1.5 统计学处理 用 SPSS 19.0 软件包进行统计学处理。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义,检验采用双侧检验。

2 结果

手术造模后模型组窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达下降,明显低于正常组,经过药物干预后,复方扶芳藤合剂大、小剂量中药组窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达增高,其中,大剂量组窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达明显高于模型组($P < 0.05$);而大剂量组与心宝丸组比较,窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。小剂量组干预后窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达较模

型组增高,其中 Cx40 较模型明显增高($P < 0.05$)。详见表 1。

表 1 窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cx45	Cx43	Cx40
A 组	6	0.321±0.012	0.329±0.010	0.332±0.007
B 组	6	0.281±0.008	0.259±0.009	0.280±0.011
E 组	6	0.310±0.011 ²⁾	0.313±0.013 ²⁾	0.323±0.012 ²⁾
C 组	6	0.296±0.010 ¹⁾	0.275±0.009 ¹⁾⁴⁾	0.318±0.015 ²⁾
D 组	6	0.314±0.013 ²⁾³⁾	0.326±0.016 ²⁾³⁾	0.339±0.014 ²⁾³⁾

与 A 组比较,1) $P < 0.05$;与 B 组比较,2) $P < 0.05$;与 C 组比较,3) $P < 0.05$;与 E 组比较,4) $P < 0.05$

3 讨论

窦房结是哺乳动物心脏传导系统的重要组成部分,是控制心脏电活动的中心,窦房结细胞间相互连接的独特性便决定着细胞间电传导的特殊性。在窦房结组织中,Cx 主要有两个职能:①维持心脏正常节律;②将冲动传到心房且不受超激化的影响^[1]。已证实心脏表达的 Cx 家族成员主要有 Cx43、Cx40、Cx45。运用免疫组化和电生理方法研究窦房连接区 GJ 特征,结果兔窦房结中央 P 细胞表达 Cx40,在结周围混合表达 Cx43、Cx40^[2]。Coppen 等^[3]对兔心脏免疫组化共聚焦显微镜观察研究发现 Cx45 和 Cx40 窦房结中央表达,窦房结与界嵴交界区大部分区域显示在界嵴表达 Cx43 心肌细胞与结区表达 Cx45 和 Cx40 细胞有明显的分界线,然而在心脏内面窦房结周围与界嵴的过渡带共同表达 Cx43 和 Cx45。窦房结组织损伤后,必将影响窦房结细胞间的特化连接,引起细胞间电偶联与机械耦联异常使窦房结功能下降,导致相应传导速度和各向异性传导发生改变,从而出现传导减慢及传导阻滞等现象,引起各种心律失常,故对 Cx 表达的干预情况,可以作为评价治疗病态窦房结综合征药物作用之一。

病态窦房结综合征动物模型较多,各有不同的特点,用甲醛溶液湿敷窦房结区建立病态窦房结综合征模型的方法被广泛用于基础实验研究。此法操作简单,容易被实验人员掌握,对窦房结损伤程度较轻,损伤后去除甲醛溶液,心肌组织功能还能一定程度的恢复,因此,实验进程容易被实验人员掌控。在实验过程中采用从胸骨右缘纵行开胸,经纵隔打开心包,可以避免破坏胸膜腔,减少了气胸等并发症的发生^[4]。

中医学里没有“病态窦房结综合征”的病名,根据其临床表现,多将其归属于“心悸”、“头晕”、“胸痹”、“厥证”、“脉迟症”、“脉结代”等范畴。对其病机,古代早有论述。如《素问·痹论》亦指出:“脉痹不已,复感于邪,内舍于心”,“心痹者,脉不通,烦则心下鼓”,《濒湖脉学》云:“迟而无力定虚寒,代脉都因元气虚,结脉皆因气血凝”。中医学认为病态窦房结综合征以阳气虚衰为本,即以心阳虚、肾阳虚、脾阳不足为主;寒凝气滞、血瘀、痰浊为标,乃本虚标实之证。血瘀、寒凝、痰湿等标实均因阳气不足而成,而阳虚则为气虚之甚,故病窦之治应以益气助阳为法,尤应以大补元气为治疗关键。

复方扶芳藤合剂主要由扶芳藤、人参、黄芪等药组成,扶芳藤补肾强筋,行气活血;现代药理发现扶芳藤具有良好的心血管药理作用,可延长小鼠心肌缺氧的存活时间,抑制血栓形成,改善去甲肾上腺素(NA)所致的肠系膜微循环障碍,并可扩张耳廓微血管。人参大补元气,现代药理研究认为,人参含有人参皂苷等多种有效成分,具有强心、升压、兴奋心脏,增强心肌收缩

缩,提高心率的作用。黄芪补益心气,填补胸中宗气,以助心阳而令血行。现代药理研究表明其主要成分有改善心功能,改善心肌代谢等作用。人参、黄芪还具有强心、升压、提升心率及扩张血管,增加冠脉血流量,改善心肌缺血,改善微循环与抗血小板聚集等作用。诸药合用,共奏益气行血,温补心脾肾之功,使心气充裕,心阳振奋,心肌鼓动有力,心率增加,诸症缓解。同时,复方扶芳藤合剂是具有抗心肌缺氧、抗衰老、抗应激、改善微循环等作用。

本研究结果提示,大剂量的复方扶芳藤液对窦性心律失常有明显的调节作用,研究显示大剂量复方扶芳藤液能提高心率,其治疗机制可能与降低窦房结恢复时间(SNRT)、校正窦房结恢复时间(CSNRT)、窦房传导时间(SACT),提高窦性心律,促进窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达有关。小剂量的复方扶芳藤液对窦性心律失常也有一定的调节作用,研究显示小剂量复方扶芳藤液也能提高心率,降低 SACT、SNRT、CSNRT,提高窦性心律,促进窦房结组织 Cx45、Cx43 及 Cx40 蛋白表达,实验数据虽然与模型组比较差异无统计学意义,但在小剂量的基础上适当再增加剂量可能对窦房结病变的预防有意义,因此小剂量的复方扶芳藤液需要进一步研究。

本次试验研究能证实复方扶芳藤合剂对 SSS 有良好的疗效,并进一步揭示其分子作用机理,必将扩大复方扶芳藤合剂的

临床应用范围,从而产生巨大的经济效益和社会效益。鉴于中药治疗的多靶点性,该药的其他药理作用尚待进一步挖掘并加以证实。

参考文献:

[1] Jongsma HJ. Diversity of gap junctional proteins: Dose it play a role in cardiac excitation[J]. *Cardiovasc Electrophysiol*, 2000, 11: 2008-2230.

[2] Verheule S, Marian JA, Van Kempen, *et al*. Gap junctions in the rabbit sinoatrial node[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280: 2103-2115.

[3] Coppens SR, Kodama I, Boyett MR, *et al*. Connexin 45, a major connexin of rabbit sinoatrial node, is coexpressed with connexin 43 in the restricted zone at the nodal-crista terminals border[J]. *J Histochem Cytochem*, 1999, 47(7): 907-918.

[4] 歌乃志,张守红. 手术方法建立窦房结功能损伤模型进展. *现代临床医学*, 2009, 35(2): 83-85.

作者简介:朱智德,男,副教授,博士,现工作于广西中医药大学(邮编:530001);卢健棋、姜浩、王庆高,工作于广西中医药大学第一附属医院;韦斌(通讯作者),工作于广西中医药大学附属瑞康医院(邮编:530011)。

(收稿日期:2013-07-06)

(本文编辑 郭怀印)

类肝素酶、MMP-9 在大鼠肺动脉高压模型肺组织中的表达及意义

王利梅

摘要:目的 通过比较肺动脉高压模型大鼠和正常大鼠肺组织中类肝素酶、基质金属蛋白酶(MMP-9)表达特征的影响,探讨两者与肺动脉高压的关系,同时研究其在大鼠肺动脉高压及肺血管结构重建中的可能作用机制。方法 采用野百合碱单次腹腔注射的方法建立肺动脉高压模型。20 只大鼠随机分为正常对照组、肺动脉高压模型组(模型组)每组 10 只。彩色多普勒超声测量大鼠肺动脉峰值流速、肺动脉根部内径的变化。测量大鼠平均肺动脉压(mPAP)、右心室壁厚指数和平均颈动脉压(mCAP)的变化。HE 染色观察肺组织血管病理形态改变。采用免疫组化 SABC 法测定两组大鼠肺组织中类肝素酶和 MMP-9 的表达。结果 模型组肺动脉峰值流速、肺动脉根部内径、mPAP、MMP-9、右心室壁厚指数较对照组明显增高($P < 0.01$);两组平均颈动脉压、类肝素酶表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 野百合碱单次腹腔注射的方法建立肺动脉高压模型具有操作简便、对动物损伤小及成功率高等特点;抑制 MMP-9 合成或降低 MMP-9 活性,可能为其抑制野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压及肺血管结构重建的作用机制之一。

关键词:肺动脉高压;野百合碱;类肝素酶;基质金属蛋白酶

中图分类号:R543.2 R256.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1672-1349.2013.12.042 文章编号:1672-1349(2013)12-1492-03

1 材料与方

1.1 实验动物 雄性 SD 大鼠 20 只,体重 250 g~400 g,由山西医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 野百合碱(MCT),SABC 试剂盒,基质金属蛋白酶抗体,DAB 显色剂及苏木精,二抗(生物素化的羊抗兔 IgG)。

1.3 主要器材 电子天平,彩色多普勒超声仪(philips iE33 型),探头(L11-3 线阵,频率 3 MHz~11 MHz),压力传感器(YL-3 和 YL-4 型),生理记录仪(SJ-42 型),显微镜,微波炉,电

冰箱,恒温孵箱,BI-2000 图像分析仪。

1.4 方法

1.4.1 大鼠肺动脉高压(PAH)模型的建立和分组 雄性(SD)大鼠,称取体重后,以 2%野百合碱(MCT)按 60 mg/kg 剂量一次性在大鼠背部脊柱旁皮下注射,诱导肺动脉高压模型。正常对照组则同期皮下注射等体积生理盐水。于注射后第 21 天(3 周末)做彩色多普勒超声检查。随后测量平均肺动脉压(mPAP)和平均颈动脉压(mCAP)的变化。肺部组织做病理切片 HE 染色观察肺动脉结构的改变,确定肺动脉高压动物模型