

美托洛尔对心肌梗死兔自主神经重构的影响

胡和生, 闫素华, 王清, 程文娟, 李晓鲁, 薛梅, 孙雪林

(山东省千佛山医院心内科, 山东省济南市 250014)

[关键词] 内科学; 心肌梗死; 重构; 心律失常; β 受体阻滞剂; 兔

[摘要] **目的** 探讨 β 受体阻滞剂美托洛尔治疗对心肌梗死后心脏自主神经重构的改善作用。**方法** 通过结扎新西兰大白兔冠状动脉前降支制作心肌梗死模型, 随机分成心肌梗死+美托洛尔组(10 mg/(kg·d), 治疗组)、心肌梗死组(模型组)和假手术组。8周后所有成活兔均进行统一的电生理检查, 诱发室性心律失常。并处死实验动物, 取心肌采用免疫组织化学的方法观察心室神经纤维的形态、密度及生长活性。**结果** 模型组室性心律失常诱发率明显高于假手术组(58.3%比16.7%, $P < 0.001$), 而美托洛尔治疗后其诱发率降至8.3%。模型组梗死灶周S100及GAP43阳性神经纤维密度分别达到 $3\ 889 \pm 521 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ 和 $3\ 090 \pm 622 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, 明显高于假手术组($1\ 727 \pm 304 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ 和 $718 \pm 177 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$; P 均 < 0.01), 且神经纤维空间分布紊乱; 而治疗组梗死灶周S100及GAP43阳性神经纤维密度降至 $2\ 725 \pm 283 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ 和 $1\ 922 \pm 508 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, 与模型组比差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且神经形态及分布更类似于假手术组, 非梗死左心室游离壁心肌梗死后密度上调的S100及GAP43阳性神经纤维经美托洛尔治疗后也明显下降($P < 0.05$)。**结论** 美托洛尔可改善心肌梗死动物模型的神经重构, 从而可能预防心肌梗死后室性心律失常的发生。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effects of Metoprolol Treatment on Neural Remodeling After Myocardial Infarction in Rabbits

HU He-Sheng, YAN Su-Hua, WANG Qing, CHEN Wei-Juan, LI Xiao-Lu, XUE Mei, and SUN Xue-Lin

(Department of Cardiology, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Remodeling; Cardiac Arrhythmia; Beta Blocker; Rabbit

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influence of β -blocker (metoprolol) on the ventricular neural remodeling and susceptibility to ventricular arrhythmias. **Methods** New Zealand rabbits were ligated with left anterior descending branch for myocardial infarction (MI) induction. The rabbits were randomized to metoprolol group treated with metoprolol [10 mg/(kg·d)], MI group and sham operation group. All groups were further followed up for 8 weeks. After electrophysiological recordings, immunostaining was applied to detect the shape and density of nerve fibers. **Results** Eight weeks after operation, metoprolol treatment reduced the increased incidence of post-MI ventricular arrhythmias compared with those placebo treatment (8.3% vs 58.3%, $P < 0.001$). The densities of S100 and GAP43 positive nerve fibers ($3\ 889 \pm 521 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, $3\ 090 \pm 622 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$) were significantly higher in MI group than in sham operation group ($1\ 727 \pm 304 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$, $718 \pm 177 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$) at infarct border. Additionally, the distribution of nerve fibers in the MI group were obviously diverse in contrast to sham group. The densities of S100 and GAP43 positive nerve fibers dropped to $2\ 725 \pm 283 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ and $1\ 922 \pm 508 \mu\text{m}^2/\text{mm}^2$ at infarct border after metoprolol treatment. Otherwise, metoprolol attenuated the heterogeneity of cardiac innervation. The densities of S100 and GAP43 positive nerve fibers at non-infarct left ventricular free wall were also lowered by metoprolol treatment in MI model.

Conclusion Metoprolol appeared to reduce the post-MI ventricular arrhythmias, partly by improving neural remodeling.

Conclusion Metoprolol appeared to reduce the post-MI ventricular arrhythmias, partly by improving neural remodeling.

心肌梗死(myocardial infarction, MI)后室性心律失常的防治一直是科研工作者研究的热点, 2000年Cao等^[1]提出MI修复期室性心律失常及心脏性猝死与心脏自主神经再生和增生有关, 这为进一步探讨MI后室性心律失常甚至猝死的发病机制及其防

治提供了一个新的研究方向; 随之多个动物模型证实MI后心脏自主神经过度生长、增生引起的神经重构与心律失常发生率增加密切相关^[2-4]。 β 受体阻滞剂可降低MI恢复期的室性心律失常及猝死的发生率, 其作用机制尚未完全明了。 β 受体阻滞剂具有心脏神经突触前效应^[5], 改善MI后梗死灶周交感神经功能^[6]。本研究在兔MI模型基础上, 早期采用美托洛尔进行干预直至8周, 结合免疫组织化学及电生理试验来探讨 β 受体阻滞剂在神经重构过程中的作用及其抗心律失常机制。

[收稿日期] 2006-10-26 [修回日期] 2007-02-09

[基金项目] 山东省卫生科技发计划项目(2003HZ118)

[作者简介] 胡和生, 硕士, 医师, 主要从事心脏电生理方面的研究, E-mail为hyperhhs@163.com。通讯作者闫素华, 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事心脏介入方面的研究。王清, 博士, 副教授, 主要从事冠心病的基础与临床研究。

1 材料和方法

1.1 动物模型建立及分组

30只新西兰大白兔[普通级,编号SCXK(鲁)20050015,2.5~3 kg]术前采用3%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔内注射麻醉。沿胸骨中线切开皮肤,紧贴胸骨左缘剪断第4~5肋骨,在撑开器辅助下暴露心脏,保持两侧胸膜完整,距前降支起始处约1 cm心肌浅层缝扎冠状动脉,心电图提示ST段上抬,左心室前壁及心尖部颜色变暗,搏动减弱,观察20 min后逐层关胸。MI模型制作完毕后所有兔随机分成MI组(模型组, $n=15$)及MI+美托洛尔组(治疗组, $n=15$),术后第1天起分别给予生理盐水[5 mL/(kg·d)]和美托洛尔[10 mg/(kg·d),中国阿斯利康]灌胃8周。另选取12只兔作为假手术组,开胸后对应的冠状动脉穿线,但不结扎。术后给予青霉素肌肉注射3天预防感染,单笼喂养,予自主饮食(水)。

1.2 电生理试验

术后8周,所有成活兔均进行统一的电生理试验。具体操作如下:3%戊巴比妥钠再次麻醉,心电图监护,开胸,缝制心包吊床。双极起搏电极,直径0.3 mm,两针相距0.3 cm,在梗死的苍白色心肌边缘2 mm处,刺入2 mm深,假手术组起搏电极放置于心脏的相应部位。首先用DF-5A型心脏电生理刺激仪(苏州市东方电子仪器厂)以S1S2逆扫,每次递减5 ms,测定梗死灶周心肌有效不应期。随之在梗死灶周围S1S2S3刺激和S1S1持续刺激8 min。未达刺激终点停止5 min后再重复一次上述电刺激。刺激终点为:诱发出持续性单形性室性心动过速(ventricular tachycardia, VT);直接诱发出心室颤动(ventricular fibrillation, VF)或多形性VT;完成所有操作仍未诱发VT及VF。

1.3 免疫组织化学检测

电生理试验完毕后,迅速取下心脏分别取梗死灶周(梗死苍白色边缘3 mm以内)及非梗死左心室游离壁(远离梗死苍白色边缘2 cm)心肌用10%中性甲醛固定并按程序制作成蜡块,切片厚4 μ m。一抗为S100蛋白(DAKO,丹麦,代表心脏自主神经分布)及GAP43蛋白(Chemicon,美国,代表心脏神经生长活性),根据SA01020免疫组织化学试剂盒(武汉博士德)说明采用SABC法进行免疫组织化学检测,DAB显色,复染后封片。

1.4 神经纤维分布及密度的测定

参照Cao等^[1]进行神经纤维的分析统计,选择梗死周围及血管周围的心肌作为主要观察点,如果

梗死区域不清楚或者非梗死区域,选择神经分布最多的区域作为观察点,在显微镜下观察神经分布的范围和形态。在高倍镜视野($\times 20$)下采用ImagePro Plus 4.0图像处理分析软件定量分析神经密度。

1.5 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验;计数资料用百分率(%)表示,采用 χ^2 检验;所有数据均采用SPSS 13.0进行统计分析。

2 结果

2.1 动物一般情况

在制作MI动物模型过程中,心电图iv导联和aVL导联ST段上抬,部分动物Ⅱ、Ⅲ和aVF导联出现ST段上抬,冠状动脉结扎线以下局部心肌搏动减弱,心肌颜色发紫。饲养过程中模型组及治疗组均有3只兔不明原因死亡;而假手术组无死亡。死亡的动物不列入统计分析。模型组及治疗组二次开胸前心电图iv、aVL导联可见病理性Q波,假手术组心电图前后变化不大。开胸后在冠状动脉结扎附近梗死心肌呈现苍白色,而假手术组冠状动脉穿线附近心肌颜色无变化。经过8周的美托洛尔治疗后,治疗组心率较模型组有所下降($P < 0.05$,表1)。

2.2 电生理参数

模型组梗死灶周有效不应期较假手术组相应部位有效不应期有所延长($P < 0.01$),治疗组经过美托洛尔治疗后梗死灶周有效不应期较模型组有所恢复($P < 0.05$)。假手术组有2例(2/12, 16.7%)诱发出心室颤动;模型组有3例诱发出单形性室性心动过速(3/12, 25.0%),1例诱发出多形性室性心动过速(1/12, 8.3%),3例诱发出心室颤动(3/12, 25%),总的室性心律失常诱发率达58.3%;而治疗组只有1例(1/12, 8.3%)诱发出心室颤动;各组间心律失常诱发率无统计学差异(表1)。

表1. 各组电生理数据比较

分 组	心率 (次/min)	有效不应期 (ms)	VT 诱发率	VF 诱发率
假手术组	273.6 \pm 6.9	92.5 \pm 5.0	0	16.7%
模型组	314.3 \pm 6.9	120.4 \pm 8.1 ^a	33.3%	25.0%
治疗组	289.4 \pm 8.1 ^b	110.4 \pm 6.5 ^b	0	8.3%

a为 $P < 0.01$,与假手术组比;b为 $P < 0.05$,与模型组比。

2.3 神经分布及密度

模型组梗死灶周及非梗死的左心室游离壁

S100 及 GAP43 阳性神经纤维密度均明显高于假手术组 ($P < 0.001$)。模型组 S100 阳性神经纤维空间分布紊乱, 除分布于小血管周围及心肌束间的结缔组织中, 还分布于梗死心肌与存活心肌相互交错的梗死灶周, 部分神经纤维粗大, GAP43 阳性神经纤维密度明显增多。而假手术组 S100 阳性神经纤维非均态分布, 主要分布在小血管周围及心肌束间的结

缔组织中, 与心肌细胞走行的方向一致, GAP43 阳性神经纤维鲜见。经过 8 周的美托洛尔治疗后, 梗死灶周 S100 及 GAP43 阳性神经纤维密度均有所降低, 且形态及分布更趋于正常化, 神经纤维的走向大致与心肌纤维平行, 聚集及粗大的神经纤维未见(图 1)。各组 S100 及 GAP43 阳性神经纤维密度统计见表 2。

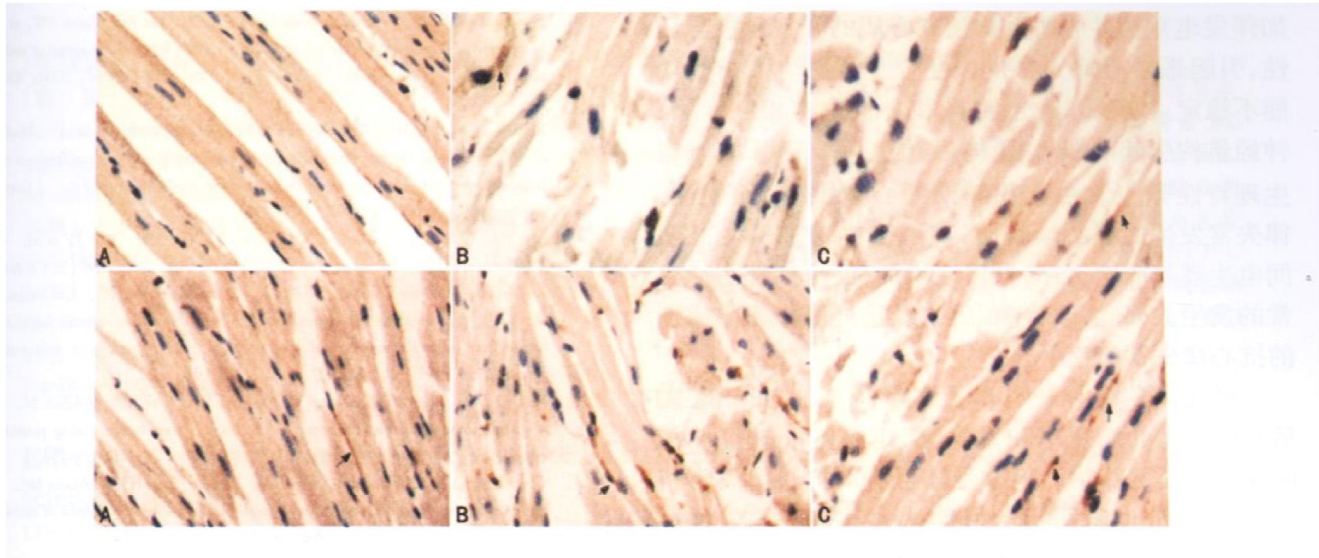


图 1. 免疫组织化学标记梗死灶周 GAP43(上)与 S100 蛋白(下)阳性心脏神经纤维(20×) A 为假手术组, B 为模型组, C 为治疗组。

表 2. 各组梗死灶周及非梗死左心室游离壁神经纤维密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	S100 ($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$)		GAP43 ($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$)	
	梗死灶周	非梗死左心室游离壁	梗死灶周	非梗死左心室游离壁
假手术组	1 727 \pm 304	1 763 \pm 272	718 \pm 177	610 \pm 136
模型组	3 889 \pm 521 ^a	3 146 \pm 459 ^a	3 090 \pm 622 ^a	2 475 \pm 429 ^a
治疗组	2 725 \pm 283 ^b	1 849 \pm 251 ^b	1 922 \pm 508 ^b	1 904 \pm 398 ^b

a 为 $P < 0.001$, 与假手术组比; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比。

3 讨论

心肌梗死后神经重构是神经纤维对损伤的保护性反应, 有利于维持血流动力学稳定^[7], 保持左心室结构及功能^[8]。但近年研究发现神经重构可改变心脏自主神经功能, 降低心室颤动阈值, 增加心肌易损性, 提高心律失常及心源性猝死的发生率^[1-4,7]。

我们研究中参照国外相关文献采取 S100 阳性神经纤维代表心脏大体的自主神经功能分布^[11], GAP43 阳性神经纤维代表心脏神经生长的活性^[9]。在模型组 MI 后 8 周在梗死区及非梗死区均存在不同程度 S100 阳性神经纤维生长和密度增加, 且神经形态差异较大即出现所谓的神经重构现象; 而在治

疗组神经纤维的密度较模型组明显降低, 且分布及形态接近于假手术组。此外, 治疗组 GAP43 阳性神经纤维密度较模型组也明显降低。电生理试验研究提示模型组梗死灶周有效不应期延长(120.4 \pm 8.1 ms), 美托洛尔治疗可部分恢复延长的有效不应期(110.4 \pm 6.5 ms); 在相同条件的程序电刺激下模型组室性心律失常的总诱发率是 58.3%, 而经过 8 周的美托洛尔治疗后其发生率降至 8.3%。以上研究结果提示美托洛尔治疗可降低 MI 后神经生长活性, 改善 MI 后神经重构, 降低室性心律失常的诱发率。

心脏 S100 蛋白阳性神经纤维大部分为交感神经纤维, 其密度与室性心律失常发生率呈正相关^[11]。

程序电刺激对预测 MI 患者的心律失常事件有很高的特异性,常被用来评价患者对室性心律失常甚至猝死的易感性。我们的实验揭示了 MI 后神经重构的存在增加了心室对室性心律失常的易感性。目前认为神经重构引起室性心律失常增加的可能机制有: 交感神经活性增加; 再生空间分布不均衡导致交感兴奋时心脏电生理异质性增加, 局部交感神经活性的变化可加重局部心肌电活动的不均一性, 且增加伴发电重构并心肌重构梗死心肌的心室复极异质性, 引起恶性心律失常的发生^[10]; 再生幼稚神经功能不稳定; 神经重构、电重构和心室重构相互作用; 神经重构引起心肌 β_3 受体表达上调改变了心脏电生理特性等^[11]。由此我们推断心室重构是心脏心律失常发生的解剖学基质, 神经重构增加病变心肌间电生理异质性, 各向异性增加, 促进室性心律失常的发生。因此, 改善 MI 后神经重构可作为临床新的抗心律失常治疗手段。

循证医学资料表明 β 受体阻滞剂能够降低 MI 后心律失常的病死率和发生率, 也是唯一被证明能够降低猝死的药物。但 β 受体阻滞剂抗心律失常机制复杂, 目前尚未明了。目前认为其抗心律失常机制主要与其降低交感神经活性有关。我们研究中发现 β 受体阻滞剂美托洛尔可改善 MI 后神经重构, 部分恢复延长的有效不应期, 减少室性心律失常的诱发率。但其改善机制目前尚未明了, 可能与其改善 MI 后心室重构、血流动力学效应及减慢心率、心肌耗氧量和改变神经生长内环境等有关。心脏神经过度增生心肌中, 交感神经兴奋可影响心肌细胞复极, 使复极电流异常, 延长心肌细胞的动作电位时程及有效不应期^[12]; 美托洛尔可能通过改善神经重构, 间接影响心肌细胞复极, 从而影响到有效不应期。美托洛尔治疗后心脏自主神经分布和密度降低, 间接降低了交感神经活性; 此外其生长活性降低, 证明幼稚状态的神经减少, 使时间或空间上释放异常儿茶酚胺的机会减少, 心肌间电生理异质性降低, 从而降低对室性心律失常的易感性。

总之, MI 后神经重构改变了心肌间的电生理特性, 增加对室性心律失常的易感性; 而 β 受体阻滞剂美托洛尔可降低 MI 后神经再生活性, 改善 MI 后神经重构, 从而降低 MI 后室性心律失常的发生。

[参考文献]

- [1] Cao JM, Fishbein MC, Han JB, Lai WW, Lai AC, Wu TJ, et al. Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia [J]. *Circulation*, 2000, **101** (16): 1960-969.
- [2] Swissa M, Zhou S, Gonzalez-Gomez I, Chang CM, Lai AC, Cates AW, et al. Long-term subthreshold electrical stimulation of the left stellate ganglion and a canine model of sudden cardiac death [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2004, **43** (5): 858-864.
- [3] Zhou S, Cao JM, Tebb ZD, Ohara T, Huang HL, Omichi C, et al. Modulation of QT interval by cardiac sympathetic nerve sprouting and the mechanisms of ventricular arrhythmia in a canine model of sudden cardiac death [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2001, **12** (9): 1068-073.
- [4] Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, Ohara T, Lee MH, Tsai J, et al. Nerve sprouting and sudden cardiac death [J]. *Circ Res*, 2000, **86** (7): 816-821.
- [5] de Milliano PA, de Groot AC, Tijssen JG, van Eck-Smit BL, Van Zwieten PA, Lie KI. Beneficial effects of metoprolol on myocardial sympathetic function: evidence from a randomized, placebo-controlled study in patients with congestive heart failure [J]. *Am Heart J*, 2002, **144** (2): E3.
- [6] Kramer CM, Nicol PD, Rogers WJ, Seibel PS, Park CS, Reichel N. Beta-blockade improves adjacent regional sympathetic innervation during postinfarction remodeling [J]. *Am J Physiol*, 1999, **277** (4 Pt 2): H1429-434.
- [7] Chen PS, Chen LS, Cao JM, Sharifi B, Karagueuzian HS, Fishbein MC. Sympathetic nerve sprouting, electrical remodeling and the mechanisms of sudden cardiac death [J]. *Cardiovasc Res*, 2001, **50** (2): 409-416.
- [8] Kiriazis H, Du XJ, Feng X, Hotchkiss E, Marshall T, Finch S, et al. Preserved left ventricular structure and function in mice with cardiac sympathetic hyperinnervation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, **289** (4): H1359-365.
- [9] Okuyama Y, Pak HN, Miyauchi Y, Liu YB, Chou CC, Hayashi H, et al. Nerve sprouting induced by radiofrequency catheter ablation in dogs [J]. *Heart Rhythm*, 2004, **1** (6): 712-717.
- [10] Swann MH, Nakagawa H, Vanoli E, Lazzara R, Schwartz PJ, Adamson PB. Heterogeneous regional endocardial repolarization is associated with increased risk for ischemia-dependent ventricular fibrillation after myocardial infarction [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2003, **14** (8): 873-879.
- [11] Zhou S, Paz O, Cao JM, Asotra K, Chai NN, Wang C, et al. Differential beta-adrenoceptor expression induced by nerve growth factor infusion into the canine right and left stellate ganglia [J]. *Heart Rhythm*, 2005, **2** (12): 1347-355.
- [12] Heath BM, Xia J, Dong E, An RH, Brooks A, Liang C, et al. Overexpression of nerve growth factor in the heart alters ion channel activity and beta-adrenergic signalling in an adult transgenic mouse [J]. *J Physiol*, 1998, **512** (Pt 3): 779-791.

(此文编辑 许雪梅)