

糖尿病兔心肌梗死后心脏自主神经的变化及其与室性心律失常的关系

郑松龄¹, 闫素华², 宋忠举¹, 胡和生², 程文娟², 薛梅², 张俊义¹

(1 山东大学医学院, 山东省济南市 250012 2 山东省千佛山医院心内科, 山东省济南市 250014)

[关键词] 糖尿病; 心肌梗死; 自主神经; 室性心律失常

[摘要] 目的 探讨糖尿病合并心肌梗死后心脏自主神经的变化及其与室性心律失常的关系。方法 选择新西兰兔作为研究对象, 通过高脂高糖喂养 2 月后由耳缘静脉注射四氧嘧啶 (80 mg/kg) 制作糖尿病模型, 并随机分为糖尿病+心肌梗死组、糖尿病假手术组和非糖尿病假手术组, 通过结扎冠状动脉前降支制作心肌梗死模型。手术后所有入选成活兔均常规喂养 8 周, 随之行活体电生理检查诱发心律失常, 并采用免疫组织化学法观察心脏交感神经的形态、分布及密度变化。结果 糖尿病+心肌梗死组室性心律失常诱发率显著高于糖尿病假手术组 ($P < 0.05$); 糖尿病+心肌梗死组梗死灶周及非梗死左心室游离壁酪氨酸羟化酶阳性神经纤维密度显著高于糖尿病假手术组 ($P < 0.05$), 且神经纤维分布较为紊乱。结论 糖尿病兔心肌梗死后在自主神经损害的基础上出现了交感神经增生和异常再生即自主神经重构, 从而使心肌梗死后室性心律失常的易感性增加。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Changes of Autonomic Nerves and Its Effects on Inducible Ventricular Arrhythmias in Diabetic Rabbits After Myocardial Infarction

ZHENG Song-Ling¹, YAN Su-Hua², SONG Zhong-Ju¹, HU He-Sheng², CHENG Wen-Juan², XUE Mei², and ZHANG Jun-Yi¹

(1 School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China; 2 Department of Cardiology, Qianfoshan Hospital of Shandong Province, Jinan 250014, China)

[KEY WORDS] Diabetes Mellitus; Myocardial Infarction; Autonomic Nerve; Ventricular Arrhythmia

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the characteristic of cardiac nerve and its influence of ventricular arrhythmias in diabetic rabbit after myocardial infarction. **Methods** New Zealand rabbits were fed with high-fat/high-sucrose diet in the first two months and then injected with alloxan (80 mg/kg of body weight) via the marginal ear vein to make diabetes mellitus. All alive rabbits were randomly divided into three groups: the diabetes and myocardial infarction group, the diabetes group and the control group. Left anterior descending branch was ligated to induce myocardial infarction model. After electrophysiological recordings, immunostaining was applied to detect the shape and density of ventricular nerve fibers. **Results** In the diabetes and myocardial infarction group, ventricular arrhythmias were increased compared with those in the diabetes group (85.7% vs 50%, $P < 0.05$). The densities of TH positive nerve fibers were significantly higher in the diabetes and myocardial infarction group than in the diabetes group ($P < 0.05$), and the distribution in the diabetes and myocardial infarction group was more chaotic. **Conclusions** There were cardiac neural remodeling in diabetic rabbit heart after myocardial infarction and partly associated with the post-MI ventricular arrhythmias.

糖尿病是冠心病的独立危险因素, 并发心肌梗死的比例高于非糖尿病患者, 糖尿病合并心肌梗死患者预后差, 其室性心律失常和猝死的发生率明显增高。近年一系列研究证明, 心肌梗死后心脏自主神经存在增生、过度增生即神经重构现象, 交感神经的过度增生与心肌梗死慢性期室性心律失常和猝死

的发生关系密切。但糖尿病心肌梗死后是否仍存在自主神经再生, 以及是否与糖尿病合并心肌梗死患者室性心律失常发生率较高有关鲜有报道。本研究通过构建糖尿病合并心肌梗死动物模型对糖尿病合并心肌梗死后自主神经再生的特点及其与室性心律失常的关系进行了探讨, 以期指导临床, 改善糖尿病合并心肌梗死患者的预后。

[收稿日期] 2008-09-16 [修回日期] 2009-01-01

[基金项目] 山东省自然科学基金项目 (Y2006C83)

[作者简介] 郑松龄, 硕士, 主要从事心脏电生理研究。Email为 zhengsongling12@163.com。通讯作者闫素华, 博士, 主任医师, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心电生理和心律失常介入诊断治疗研究。宋忠举, 硕士, 医师, 主要从事心血管病学研究。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立及分组

35只新西兰兔 (1.9~2.3 kg) 制作糖尿病模

型:先用 10% 猪油、37% 蔗糖和 53% 基础饲料混合制成高脂高糖饲料^[1,2]饲养 2 月,之后禁食不禁饮 12 h 后由耳缘静脉注射四氧嘧啶 (80 mg/kg),并在注射后给予自由饮用 5% 葡萄糖液 24 h 以对抗起始阶段的注射后低血糖,后改为一般清洁饮水。以注射后 72 h 和 7 天时两次血糖均 ≥ 14 mmol/L 作为糖尿病成模标准^[3-5];如未达标,则按以上方法重复注射四氧嘧啶 (50 mg/kg) 一次;成模后改为普通饲料继续单笼喂养 4 个月。之后成模兔随机分为两组:

糖尿病 + 心肌梗死组以 3% 戊巴比妥钠腹腔内注射 (40 mg/kg) 麻醉,开胸暴露心脏,距前降支起始处约 1 cm 心肌浅层缝扎冠状动脉,逐层关胸,制作心肌梗死模型^[6-8];④糖尿病假手术组开胸后对应的冠状动脉穿线但不结扎。另外选取 14 只兔作为对照组,普通饲料同期喂养 6 个月后制作非糖尿病假手术组模型 (开胸后冠状动脉穿线但不结扎)。手术后所有成活兔继续普通饲料喂养 2 月。

1.2 电生理实验

术后 2 月,所有成模存活兔均进行统一的电生理实验。3% 戊巴比妥钠麻醉,心电监护并记录体表心电图,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 处或相应部位刺入 2.0 mm。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 S_1S_2 逆扫,每次递减 10 ms 测定梗死灶周心肌有效不应期 (ERP);随之在梗死灶周围 $S_1S_2S_3$ 刺激和 S_1S_1 持续刺激,反复刺激 8 min 后若仍未达刺激终点,则停止 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 (monomorphic ventricular tachycardia MVT)、直接诱发出心室颤动 (ventricular fibrillation VF) 或多形性室性心动过速 (polymorphous ventricular tachycardia PVT),完成所有操作仍未诱发 VT 及 VF。

1.3 免疫组织化学检测

电生理实验完毕后,迅速取心脏并分别取梗死

灶周 (梗死苍白边缘 3 mm 以内) 及非梗死左心室游离壁或相应部位心肌,立即投入 10% 中性甲醛固定液中。按程序制作成蜡块,切片厚 4 μ m。一抗为 TH 蛋白 (Millipore 美国),采用 SABC 法进行免疫组织化学检测, DAB 显色,常规封片。

1.4 神经纤维分布及密度测定

按文献 [6-8],并参照 Cao 等^[9]方法观察神经纤维形态、分布以及密度。选择血管周围作为镜下主要观察部位,以神经分布最多的区域作为观察点,观察神经分布的范围、形态。在高倍镜视野下 ($\times 40$) 采用 Image-Pro Plus 4.0 图像处理分析软件自动识别阳性神经纤维,计算阳性神经纤维或结构在选区中所占的面积,以 3 个被选中视野中的神经密度平均值代表该玻片的神经密度。

1.5 统计学方法

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;所有数据采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

实验过程中,非糖尿病假手术组兔精神状态良好,体重增加明显,反应敏捷,毛色白且有光泽。糖尿病 + 心肌梗死组和糖尿病假手术组兔出现多食、多饮、多尿和消瘦等症状,体重增加迟缓,部分兔出现体重下降,且精神萎靡,皮毛无光泽。实验期间各组兔各阶段空腹血糖变化情况见表 1。实验组 35 只兔制作糖尿病模型过程中,3 只未成模,2 只因血糖过高死亡,剩余 30 只随机分为糖尿病 + 心肌梗死组 ($n = 16$) 和糖尿病假手术组 ($n = 14$);制作心肌梗死模型过程中,糖尿病 + 心肌梗死组 2 只兔死亡,糖尿病假手术组和非糖尿病假手术组兔无死亡。最后各组均有 14 只兔进入统计分析。

表 1 实验期间各组兔各阶段空腹血糖变化情况 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	实验前	注射四氧嘧啶前	注射四氧嘧啶后 1 周	实验结束时
非糖尿病假手术组	4.64 \pm 0.46	4.75 \pm 0.48	4.81 \pm 0.48	4.88 \pm 0.55
糖尿病假手术组	4.60 \pm 0.45	5.97 \pm 0.60 ^a	19.54 \pm 3.82 ^a	18.46 \pm 4.47 ^a
糖尿病 + 心肌梗死组	4.74 \pm 0.48	6.18 \pm 0.56 ^a	18.67 \pm 3.41 ^a	17.44 \pm 4.03 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与实验前及非糖尿病假手术组比较。

2.2 各组兔心室肌电生理学指标比较

糖尿病 + 心肌梗死组和糖尿病假手术组梗死灶

周 ERP 较非糖尿病假手术组明显延长 ($P < 0.05$),但糖尿病 + 心肌梗死组和糖尿病假手术组之间差异

并无统计学意义;糖尿病+心肌梗死组和糖尿病假手术组心律失常诱发率较非糖尿病假手术组明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且糖尿病+心肌梗死组显著高于糖尿病假手术组 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 各组电生理数据比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	有效不应期 (ms)	室性心律失常诱发率
非糖尿病假手术组	90.4 ± 4.6	14.3%
糖尿病假手术组	116.2 ± 7.9 ^a	50% ^a
糖尿病+心肌梗死组	127.6 ± 8.7 ^a	85.7% ^{bc}

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与非糖尿病假手术组比较; c为 $P < 0.05$ 与糖尿病假手术组比较。

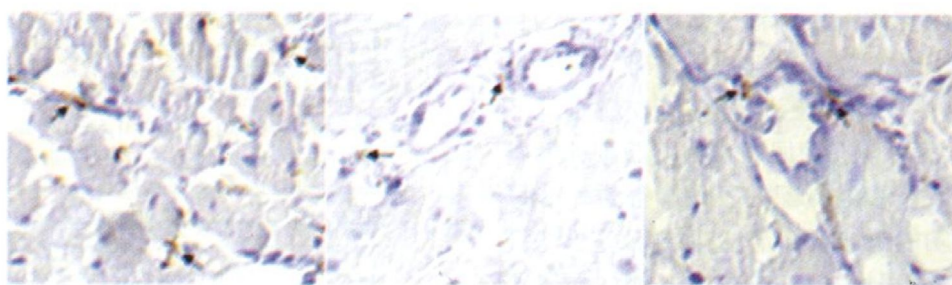


图 1 免疫组织化学标记梗死灶周 TH 阳性神经纤维 (40×, 图中棕色区域, 如箭头处) 从左至右分别为糖尿病+心肌梗死组、糖尿病假手术组和非糖尿病假手术组。

表 3 各组神经纤维密度比较 ($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$)

分 组	梗死灶周	非梗死游离壁
非糖尿病假手术组	14268.1 ± 1422.5	14002.9 ± 1369.6
糖尿病假手术组	12839.4 ± 1460.5 ^a	9417.0 ± 1088.0 ^a
糖尿病+心肌梗死组	14728.8 ± 1193.8 ^b	12006.4 ± 1623.6 ^b

a为 $P < 0.05$ 与非糖尿病假手术组比较; b为 $P < 0.01$ 与糖尿病假手术组比较。

3 讨论

急性心肌梗死是糖尿病患者的严重心血管并发症之一, 而急性心肌梗死患者中大约 2/3 存在糖代谢异常。糖尿病合并心肌梗死患者预后差, 室性心律失常和猝死的发生率明显增加, 但其具体机制尚未明确。

糖尿病是心血管疾病的主要危险因素, 多伴有心脏自主神经病变, 对糖尿病患者心率变异性功率谱分析结果显示, 其交感神经和副交感神经均受到不同程度的损害, 但以副交感神经受损较早且较重^[10]; 对糖尿病心脏交感神经核素成像的大量研究显示, 在糖尿病患者及实验动物心脏上存在不同程度的交感神经损害, 交感神经支配缺失随病变程度不同由左心室下壁远段逐渐扩展至左心室近

2.3 神经纤维形态、分布及密度

非糖尿病假手术组 TH 阳性神经纤维主要分布在血管周围, 与血管相伴行, 心肌束间的结缔组织也有分布, 与心肌细胞走行方向一致。糖尿病假手术组 TH 阳性神经纤维分布与非糖尿病假手术组相似, 但密度降低 ($P < 0.05$)。糖尿病+心肌梗死组 TH 阳性神经纤维空间分布紊乱, 多分布于梗死灶周, 且部分神经纤维粗大, 聚集成束, 密度较糖尿病假手术组增高 ($P < 0.01$; 图 1 和表 3)。

段^[11-13]。也就是说糖尿病心脏不仅存在交感迷走失衡, 也存在不同部位交感神经支配的明显差异, 从而造成心肌电生理的不稳定, 易致室性心律失常的发生^[14]。本研究结果发现, 与非糖尿病假手术组相比, 糖尿病兔心脏存在明显的自主神经失支配, ERP 延长, 室性心律失常诱发率明显增加, 提示糖尿病对心脏自主神经的影响与较高的室性心律失常诱发率有关。

近年一系列及我们既往的研究证实心肌梗死后存在心脏神经重构现象^[6-8, 15, 16], 表现为部分神经纤维形态粗大, 数量增多, 甚至聚集成束, 空间分布紊乱, 梗死灶周最为明显, 并通过以下机制引起室性心律失常的增加: 交感神经活性增加, 心肌细胞自律性增加; 神经支配不均衡, 电生理异质性增加; 再生神经功能不稳定, 不恰当地释放儿茶酚胺; 神经重构、电重构和心室重构相互作用等。本研究中糖尿病+心肌梗死组 TH 阳性神经纤维密度明显增加, 且部分神经纤维形态粗大, 甚至聚集成束, 分布紊乱, 室性心律失常诱发率明显高于糖尿病假手术组, 说明在糖尿病兔心脏自主神经损害的基础上, 出现心肌梗死后自主神经重构现象, 且该重构可部分解释糖尿病合并心肌梗死后较高的室性心律失常发生率。

糖尿病本身对自主神经的影响和心肌梗死造成的自主神经重构均可造成室性心律失常和猝死的发生增加,糖尿病和心肌梗死之间相互影响,对心脏的可能存在共同作用。例如糖尿病可减小 I_{to} 、 I_k 、 I_{CaL} , 延长动作电位时程和 ERP^[17, 18]; 而心肌梗死后梗死周边区 I_{to} 、 I_k 、 I_{CaL} 也明显减小^[19]。但糖尿病合并心肌梗死后室性心律失常发生率增高的具体机制较为复杂, 本研究的电生理结果中, 糖尿病 + 心肌梗死组和糖尿病假手术组 ERP 均明显延长, 但两组之间并无明显差异也反应出这个问题。但近年来对自主神经与心律失常的关系研究中发现, 心脏的自主神经支配失衡、活性异常等均能导致心律失常的发生^[9, 15, 20, 21]。糖尿病对自主神经有不同程度的损害, 包括交感神经和迷走神经; 而急性心肌梗死早期也存在自主神经失支配现象, 同样包括交感神经和迷走神经^[22]。因而推测, 糖尿病合并心肌梗死后神经再生会更加紊乱, 神经支配的不均衡性进一步增加, 再生神经的功能更加不稳定, 进而导致室性心律失常和猝死的发生率增加。本研究中, 糖尿病 + 心肌梗死组出现了 TH 阳性神经纤维密度增加、形态改变和空间分布紊乱, 以及室性心律失常诱发率增加, 说明糖尿病合并心肌梗死后在左心室异常的神经损害基础上出现了神经再生和过度增生, 即自主神经重构, 进一步加重了神经支配和功能的非均质性, 从而导致心肌电生理的不稳定, 增加心肌易损性, 从而使糖尿病合并心肌梗死后室性心律失常的发生率增高。当然糖尿病合并心肌梗死对自主神经影响的具体机制尚需进一步深入研究。

总之, 本研究提示糖尿病兔心肌梗死后在自主神经失支配的基础上出现了自主神经再生和异常增生, 也就是神经重构现象, 且与室性心律失常的发生有关。为糖尿病与心肌梗死的研究提供了一个新的思路, 并为临床糖尿病合并心肌梗死患者减少室性心律失常的发生、改善预后提供了理论基础。

[参考文献]

- [1] Yin W, Yuan Z, Tsutsumi K, et al. A lipoprotein lipase-promoting agent NO-1886 improves glucose and lipid metabolism in high fat high sucrose-fed New Zealand white rabbits [J]. *Int J Exp Diabetes Res* 2003; **4** (1): 27-34
- [2] 张秋菊, 袁中华, 堤一彦, 等. NO-1886对高糖高脂饲料喂养新西兰兔糖代谢的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2003; **13** (22): 37-41
- [3] Hansen PS, Clarke RJ, Buhagiar KA, et al. Alloxan-induced diabetes reduces sarcolemmal Na^+ - K^+ pump function in rabbit ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; **292** (3): C1 070-077.
- [4] Utkan T, Yildirim MK, Yildirim S, et al. Effects of the specific phosphodiesterase inhibitors on alloxan-induced diabetic rabbit cavemous tissue in vitro [J]. *Int J Impot Res* 2001; **13** (1): 24-30
- [5] Lenich CM, Chobanian AV, Brecher P, et al. Effect of dietary cholesterol and alloxan-diabetes on tissue cholesterol and apolipoprotein E mRNA levels in the rabbit [J]. *J Lipid Res* 1991; **32** (3): 431-438
- [6] Yan SH, Hu HS, Wang XL, et al. Effects of prolonged metoprolol treatment on neural remodeling and inducible ventricular arrhythmias after myocardial infarction in rabbits [J]. *Int J Cardiol* 2007; **117** (3): 317-322
- [7] 胡和生, 闫素华, 王清, 等. 美托洛尔对心肌梗死兔自主神经重构的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007; **15** (3): 185-188
- [8] Yan SH, Hu HS, Wang LX, et al. Effects of angiotensin converting enzyme inhibition on cardiac innervation and ventricular arrhythmias after myocardial infarction [J]. *Clin Invest Med* 2008; **31** (4): E198-205
- [9] Cao JM, Fishbein MC, Han JB, et al. Relationship between regional cardiac hyperinnervation and ventricular arrhythmia [J]. *Circulation*, 2000; **101** (16): 1 960-969
- [10] Vinik AI, Ziegler D. Diabetic cardiovascular autonomic neuropathy [J]. *Circulation*, 2007; **115** (3): 387-397.
- [11] Schmid H, Foman LA, Cao XH, et al. Heterogeneous cardiac sympathetic denervation and decreased myocardial nerve growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Diabetes* 1999; **48** (3): 603-608
- [12] Stevens MJ, Dayanikli F, Raffel DM, et al. Scintigraphic assessment of regionalized defects in sympathetic innervation and myocardial blood flow in diabetic patients with autonomic neuropathy [J]. *J Am Coll Cardiol* 1998; **31** (7): 1 575-584
- [13] Kreiner G, Wolzt M, Fasching P, et al. Myocardial m-[¹²³I] iodo-benzylguanidine scintigraphy for the assessment of adrenergic cardiac innervation in patients with IDDM [J]. *Diabetes* 1995; **44** (5): 543-549
- [14] 宋忠举, 闫素华. 糖尿病心脏自主神经病变与室性心律失常 [J]. *中国心血管病研究*, 2008; **6** (2): 141-143
- [15] Zhou S, Cao JM, Tebb ZD, 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): 1 068-073
- [16] Cao JM, Chen LS, KenKnight BH, et al. Nerve sprouting and sudden cardiac death [J]. *Circ Res* 2000; **86** (7): 816-821
- [17] Pandit SV, Giles WR, Demir SS. A mathematical model of the electrophysiological alterations in rat ventricular myocytes in type-1 diabetes [J]. *Biophys J*, 2003; **84** (2 Pt 1): 832-841
- [18] Zhang YQ, Xiao JN, Lin HX, et al. Ionic mechanisms underlying Abnormal QT Prolongation and the Associated Arrhythmias in Diabetic Rabbits: A Role of Rapid Delayed Rectifier K^+ Current [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2007; **19** (5-6): 225-238
- [19] Amond F, Alvarez JL, Rauzier M, et al. Ionic basis of ventricular arrhythmias in remodeled rat heart during long term myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res* 1999; **42** (2): 402-415
- [20] 刘志华. 自主神经系统与心律失常 [J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2005; **19** (2): 83-88
- [21] Anderson KP. Sympathetic nervous system activity and ventricular tachyarrhythmias: recent advances [J]. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 2003; **8** (1): 75-89
- [22] Inoue H, Zipes DP. Time course of denervation of efferent sympathetic and vagal nerves after occlusion of the coronary artery in the canine heart [J]. *Circ Res* 1988; **62** (6): 1 111-120

(此文编辑 文玉珊)