

## 参松养心胶囊改善心力衰竭大鼠 QT 离散度 及缝隙连接蛋白 43 的表达

杨 军, 周先令, 褚 春, 彭葳锐, 谭 芳, 丁赛良, 谭小进

(南华大学附属第一医院心内科, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 参松养心胶囊; 心力衰竭; 大鼠; QT 离散度; 缝隙连接蛋白 43

[摘 要] 目的 观察参松养心胶囊对压力超负荷所致心力衰竭大鼠的 QT 离散度及缝隙连接蛋白 43 表达的干预作用。方法 采用腹主动脉缩窄法建立大鼠心力衰竭模型, 经参松养心胶囊治疗 8 周。用皮下插入自制电极检测心室电生理变化, 经 HE 染色观察其形态结构变化, Masson 染色判断心肌纤维化沉积, 免疫组织化学法观察缝隙连接蛋白 43 在左心室心肌组织的分布。结果 心力衰竭大鼠 QT 离散度明显延长 ( $37.20 \pm 9.94$  ms,  $P < 0.05$ ), 心肌细胞排列紊乱, 心肌组织纤维沉积面积明显增加 ( $101217.30 \pm 33970.02 \mu\text{m}^2$ ,  $P < 0.05$ ), 心肌组织缝隙连接蛋白 43 表达明显减少 ( $55.93 \pm 11.61$ ,  $P < 0.05$ )。参松养心胶囊可缩短心力衰竭大鼠的 QT 离散度 ( $25.50 \pm 8.21$  ms), 减少心肌组织纤维沉积面积 ( $13580.64 \pm 8213.73 \mu\text{m}^2$ ) 并增加缝隙连接蛋白 43 的表达 ( $69.09 \pm 16.59$ )。结论 参松养心胶囊可以缩短心力衰竭大鼠的 QT 离散度, 增加心肌组织缝隙连接蛋白 43 表达并减少纤维化面积。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effect of Shensongyangxin Capsule on QT Dispersion and Connexin43 Expression in Heart Failure Rats

YANG Jun, ZHOU Xian-Ling, CHU Chun, PENG Wei-Rui, TAN Fang, DING Sai-Liang, and TAN Xiao-Jin

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Shensongyangxin Capsule; Heart Failure; Rat; QT Dispersion; Connexin43

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of Shensongyangxin capsule on QT dispersion and connexin43 expression in heart failure rats. **Methods** Heart failure rats models were built by constricting abdominal aorta, and were lavaged with Shensongyangxin capsule for 8 weeks. Ventricular electrophysiology were measured by inserting home-made electrode into subcutaneous, left ventricular morphostructure, myocardial fibrosis, and connexin43 distribution were respectively observed by HE staining, Masson staining, immunohistochemical staining. **Results** Heart failure rats' QT dispersion were significantly longer ( $37.20 \pm 9.94$  ms,  $P < 0.05$ ), cardiomyocytes were misaligned, myocardial fibrosis area were significantly increased ( $101217.30 \pm 33970.02 \mu\text{m}^2$ ,  $P < 0.05$ ), and connexin43 distribution were significantly decreased ( $55.93 \pm 11.61$ ,  $P < 0.05$ ). Shensongyangxin capsule can shorten QT dispersion ( $25.50 \pm 8.21$  ms) of heart failure rats, increase connexin43 distribution ( $69.09 \pm 16.59$ ) and decrease myocardial fibrosis area ( $13580.64 \pm 8213.73 \mu\text{m}^2$ ) in myocardium of heart failure rats. **Conclusion** Shensongyangxin capsule can shorten QT dispersion of heart failure rats, increase connexin43 distribution and decrease myocardial fibrosis area in myocardium of heart failure rats.

心力衰竭是各种心脏病发展的终末阶段, 约 50% 的患者在泵血功能稳定状态下突然死亡, 而死亡原因通常为突发致死性室性心律失常<sup>[1]</sup>。缝隙连接 (gap junction, GJ) 的主要功能是完成细胞间的电偶联、化学信息交流。细胞间缝隙连接的功能与

心律失常有着密切关系。缝隙连接蛋白 43 (connexin43, Cx43) 是心室缝隙连接的主要构成成分, 其分布和功能的改变对于缝隙连接的活性有重要影响。通络药物参松养心胶囊 (Shensongyangxin capsule, SSYX) 是根据中医络病理论, 由人参、麦冬、甘松等

[收稿日期] 2010-11-26

[基金项目] 中华医学会临床医学科研专项基金 (09010280183)

[作者简介] 杨军, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事冠心病和电生理研究, E-mail 为 yangjunincn@163.com。周先令, 硕士, 医师, 主要从事冠心病和电生理研究。通讯作者褚春, 主管药师, 主要从事心肌重构和血管重构的研究。

十二种中药组成的复方制剂,方中多数药物均有较好的抗心律失常作用<sup>[2,3]</sup>。但是参松养心胶囊的作用机制尚未完全阐明,参松养心胶囊是否能改善心力衰竭时的缝隙连接重构目前尚不清楚。故本研究从电生理及缝隙连接方面研究和评价参松养心胶囊的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物和试剂

标准雄性 SD 大鼠,体重 150 ~ 200 g (南华大学实验动物中心);兔抗大鼠 Cx43 一抗、羊抗兔二抗和 DAB 显色试剂盒、免疫组织化学染色试剂盒(博士德公司);Masson 染色试剂盒(福州迈新);HE 染色试剂盒(碧云天公司);参松养心胶囊成药(河北以岭制药有限公司);Powlab 16 导生理记录仪(澳大利亚埃得公司);SEC-2102 型心脏程控刺激器(日本光电公司);自制四极心肌插入电极;刺激电极(张家口教学仪器厂)。

### 1.2 压力超负荷心力衰竭模型的制备

将大鼠随机分为假手术组、心力衰竭组和参松养心胶囊组。各组大鼠均用戊巴比妥钠 35 mg/kg 腹腔注射麻醉,在无菌条件下,腹正中线作一切口,暴露腹腔,心力衰竭组和参松养心胶囊组大鼠在肾动脉上方的腹主动脉处用 4 号手术缝线将一外径为 0.6 mm 的钢针与腹主动脉一并结扎,然后取出钢针,造成腹主动脉缩窄,分层缝合关闭腹腔,术后肌注青霉素。假手术组大鼠除了不缩窄腹主动脉外其余步骤完全与上述相同。术后 8 周行心脏彩超检查,取射血分数(ejection fraction, EF)  $\leq 50\%$  的动物进入实验。参松养心胶囊组通过灌胃的方法每天给予参松养心胶囊 [1 g/(kg · d), 用自来水混匀] 治疗,而假手术组和心力衰竭组则用自来水替代,灌胃给药 8 周。

### 1.3 心室电生理测定

各组大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)后,仰卧位固定,用针状电极刺入大鼠皮下记录同步 12 导联心电图,信号输入 16 导生理记录仪,以最大 QT 间期(QT<sub>max</sub>)与最小 QT 间期(QT<sub>min</sub>)的差值代表 QT 离散度(QT dispersion, QTd)。每个导联连续测量 5 个 QT 间期,各取其平均值,从不同导联中 QT<sub>max</sub> 减去 QT<sub>min</sub> 即为 QTd。

### 1.4 HE 染色观察心肌组织形态结构变化

取 2 ~ 3 mm 厚的左心室截面,以 10% 甲醛固定 6 ~ 12 h,充分水洗 10 ~ 20 min;经 80% 酒精 2 h、

95% 酒精(2 次)各 1.5 ~ 2 h、100% 酒精(3 次)各 1.5 ~ 2 h 梯度脱水,以二甲苯(2 次)各 30 ~ 60 min 透明;浸蜡,第一次 30 min,第二次 90 min,第三次 90 min;硬蜡包埋;切片厚度 4  $\mu$ m;展片,切片粘贴于玻片中、下 1/3;60℃ 温箱烤片 0.5 ~ 1 h,用 3 次二甲苯脱蜡,经高浓度的酒精到低浓度的酒精洗去二甲苯至水;苏木素染色 5 ~ 10 min,经水略洗,盐酸酒精分化;水洗后温水蓝化,充分水洗 5 min,伊红复染(5 ~ 20 s);脱水,80% 酒精 1 次(3 ~ 5 min),95% 酒精 2 次(每次 3 ~ 5 min),纯酒精 2 次(每次 10 min),二甲苯 2 次,树胶封片;光镜观察。

### 1.5 Masson 染色判断心肌纤维化沉积

标本常规固定、脱水、石蜡包埋,5  $\mu$ m 厚度切片;常规脱蜡;苏木素 2 min,水洗;1% 盐酸酒精分化,流水冲洗 10 min;丽春红酸性品红染 5 min,水洗。1% 磷钼酸处理 1 min;2% 苯胺蓝染 1 min,1% 冰醋酸浸洗 1 min;95% 酒精快速滴洗 3 次;常规脱水、透明,中性树胶封固;显微镜下观察心肌组织染色,拍照。该方法染色的切片上,胶原纤维呈蓝色,肌纤维呈红色。以 Image-Pro Plus 6.0 计算心肌组织胶原纤维面积;每个标本选取 5 个视野,取均值;由两位不了解动物分组情况的研究者分析结果,取均值。

### 1.6 免疫组织化学法检测缝隙连接蛋白 43 的表达

标本常规固定、脱水、石蜡包埋,5  $\mu$ m 厚度切片;脱蜡至水;阻断内源性过氧化物酶(10 份蒸馏水 + 1 份 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 室温 10 min,蒸馏水洗;浸入枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)高压锅加帽出气后 3 min,快速冷却;pH7.2 PBS 缓冲液洗 3 次;滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min。甩去多余液体;加兔抗大鼠 Cx43 抗体(1:200 稀释),37℃、60 min;pH7.2 PBS 缓冲液洗 3 次;滴加生物素化山羊抗兔 IgG 孵育,37℃、30 min;pH7.2 PBS 缓冲液洗 3 次;DAB 显色液显色;蒸馏水洗;苏木素复染 1 min;脱水,透明,封片;显微镜下观察,拍照。心肌闰盘有密集的深棕色颗粒为阳性。以 Image-Pro Plus 6.0 计算出染色区域的总光密度值(integrated optical density, IOD)和染色面积(area),用 IOD/Area 计算出平均光密度值;每个标本选取 5 个视野,取均值;由两位不了解动物分组情况的研究者分析结果,取均值。

### 1.7 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 软件处理数据,多组间均数的比较采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 术后 8 周心脏彩超测量结果

与假手术组 ( $80\% \pm 2\%$ ) 比较, 心力衰竭组 ( $41\% \pm 2\%$ ) 和参松养心胶囊组 ( $37\% \pm 2\%$ ) EF 值均  $\leq 50\%$ , 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 心力衰竭组与参松养心胶囊组 EF 值比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 参松养心胶囊对心室电生理的影响

心力衰竭组 QTd ( $37.20 \pm 9.94$  ms) 较假手术组 ( $25.81 \pm 4.96$  ms) 明显延长 ( $P < 0.05$ ), 而参松养心胶囊组 QTd ( $25.50 \pm 8.21$  ms) 较心力衰竭组显著缩短, 且与假手术组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.3 参松养心胶囊对心肌形态结构的影响

HE 染色显示心力衰竭组心肌细胞排列紊乱, 用参松养心胶囊治疗后心肌细胞排列规则, 与假手术组相仿 (图 1)。

### 2.4 参松养心胶囊对心肌纤维化的影响

大鼠心肌组织 Masson 染色结果发现, 心力衰竭组心肌组织间质出现大量纤维沉积, 参松养心胶囊治疗显著抑制了心肌组织纤维化 (图 2)。纤维沉积面积定量分析结果发现, 与假手术组相比, 心力衰竭组心肌组织纤维沉积显著增加 ( $P < 0.05$ ); 参松养心胶囊组心肌组织纤维沉积显著低于心力衰竭组 ( $P < 0.05$ ), 而与假手术组相比差异无显著性 ( $P > 0.05$ ; 表 1)。

### 2.5 参松养心胶囊对心肌缝隙连接蛋白 43 表达的影响

在左心室心肌切面上观察免疫标记的 Cx43 的表达情况, 结果发现 Cx43 阳性颗粒在参松养心胶囊组和假手术组规则分布于闰盘; 心力衰竭组 Cx43 阳性颗粒表达减少, 即心力衰竭组 Cx43 缝隙连接发生了重构 (图 3)。参松养心胶囊组 Cx43 表达较心力衰竭组明显增加 ( $P < 0.05$ ), 与假手术组相仿 ( $P > 0.05$ ), 提示参松养心胶囊对心力衰竭大鼠 Cx43 缝隙连接重构有抑制作用 (表 2)。

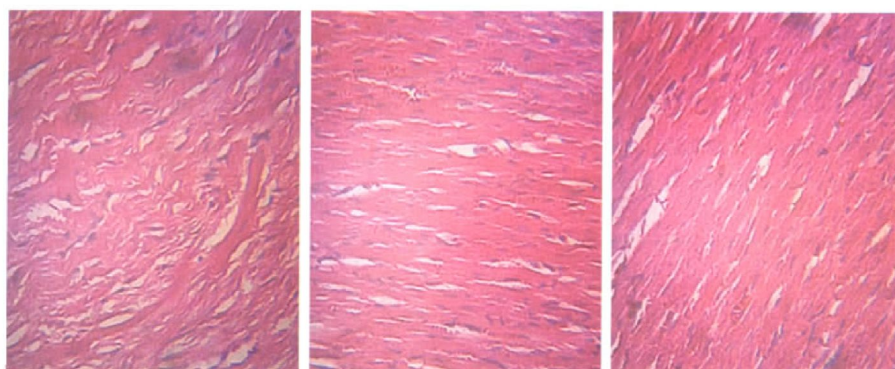


图 1. 心肌组织形态结构变化 (HE 染色,  $\times 40$ ) 从左到右依次为心力衰竭组、假手术组和参松养心胶囊组。

Figure 1. Change of myocardial tissue morphostructure

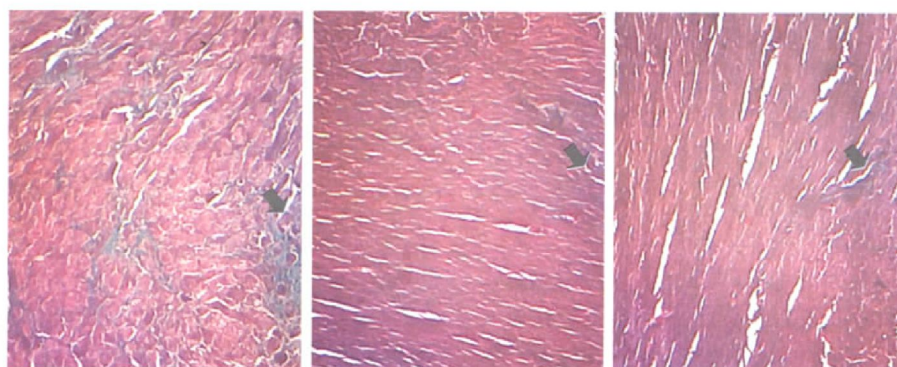


图 2. 心肌间质纤维沉积 (Masson 染色,  $\times 40$ ) 从左到右依次为心力衰竭组、假手术组和参松养心胶囊组。

Figure 2. Myocardial interstitial fiber deposition



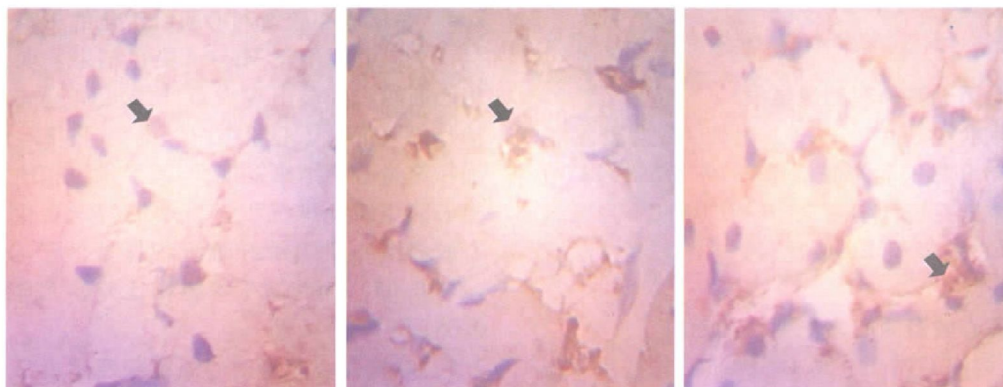


图3. 心肌组织缝隙连接蛋白43免疫组织化学染色结果(SABC法, ×100) 从左到右依次为心力衰竭组、假手术组和参松养心胶囊组。

Figure 3. Connexin43 distribution were observed by immunohistochemical staining

表1. 各组心肌间质纤维沉积面积( $\mu\text{m}^2$ )

Table 1. Myocardial fibrosis area in every group

分 组	n	纤维沉积面积
假手术组	9	11374.11 ± 5164.71
心力衰竭组	20	101217.30 ± 33970.02 <sup>a</sup>
参松养心胶囊组	11	13580.64 ± 8213.73 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与心力衰竭组比较。

表2. 左心室心肌缝隙连接蛋白43的表达

Table 2. Connexin43 expression in left ventricular myocardium

分 组	n	Cx43
假手术组	9	72.70 ± 7.43
心力衰竭组	19	55.93 ± 11.61 <sup>a</sup>
参松养心胶囊组	17	69.09 ± 16.59 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.05$ , 与假手术组比较; b 为  $P < 0.05$ , 与心力衰竭组比较。

### 3 讨 论

心力衰竭时发生心律失常和猝死的危险性明显增大,以往对心力衰竭时心律失常发生机制的研究大多集中于膜离子通道改变所致的细胞兴奋性异常,但这并不能完全阐明其发生机制。

QTd 是体表 12 导联心电图图中  $QT_{\max}$  与  $QT_{\min}$  差值,能够精确反映心肌复极不同步性和电不稳定性,充血性心力衰竭后心室肌的不均一性明显加重,致 QTd 增大<sup>[4,5]</sup>。本研究发现,心力衰竭大鼠 QTd 延长,经参松养心胶囊治疗后 QTd 缩短,与假手术组相仿,这提示心力衰竭时心脏电生理状态发生了明

显的改变,这种改变表现为 QTd 延长,这可能是心力衰竭时易于发生心律失常和参松养心胶囊稳定心律的重要原因。

心肌重构是指由一系列复杂的分子及细胞机制导致心肌结构、功能和表型的变化。主要包括:心肌细胞增殖与肥大,以及心肌细胞外基质主要是胶原纤维过度沉积或降解减少,同时细胞外基质的结构和特性也发生了相应的改变,即发生了细胞外基质重构。本研究发现,心力衰竭大鼠心肌细胞间质纤维化沉积面积明显增加,经参松养心胶囊治疗后纤维化沉积面积明显减少,与假手术组相仿,这提示心力衰竭时心脏发生了明显的心肌重构,而参松养心胶囊可以逆转心肌重构,这可能是参松养心胶囊治疗心律失常以外的另一个作用。

Cx43 是构成心室缝隙连接通道的主要结构蛋白<sup>[6]</sup>。心力衰竭时组织发生重构,但心力衰竭时缝隙连接通道将发生何种改变以及参松养心胶囊对这种改变有何影响尚极少有人研究。本研究发现,心力衰竭组大鼠出现缝隙连接重构, Cx43 表达减少;参松养心胶囊干预 8 周可抑制缝隙连接重构, Cx43 表达增加。参松养心胶囊不仅可以改善电生理失稳态,而且还可以抑制 Cx43 缝隙连接重构。表明 Cx43 缝隙连接重构是心力衰竭发展的一部分,参松养心胶囊可以抑制这个过程,增加衰竭心肌 Cx43 的表达。

总之,本研究表明参松养心胶囊对心力衰竭患者是一个值得推荐的选择,它可以抑制心肌重构及 Cx43 缝隙连接重构,从而改善细胞间通讯,可作为心肌重构治疗的一个靶点。但是参松养心胶囊抑制心力衰竭大鼠 Cx43 缝隙连接重构的机制需要进一

步的研究。同时,随着对缝隙连接通道在心脏电活动中作用的深入了解,人们开始认识到缝隙连接通道功能障碍对心律失常的发生更具有决定性作用<sup>[7]</sup>。因此以缝隙连接通道为作用靶点的抗心律失常药,通过影响心肌细胞间电化学耦联,将具有更有效的抗心律失常作用。目前,这种以缝隙连接通道为作用靶点的药物正在开发中,如抗心律失常多肽 AAP10 和 ZP123<sup>[8,9]</sup>,它们是令人期待的新型抗心律失常药物。

#### [参考文献]

- [1] 方明,彭健. 血管紧张素 II 1 型受体与高血压左心室重构 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(5): 457-460.
- [2] 易京红. 中医药治疗快速性心律失常的研究现状 [J]. 北京中医, 1999, 18(4): 55.
- [3] 黄伯舜. 甘松的临床应用心得 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(4): 283.
- [4] 陈春安. 急性心肌梗死 QT 离散度临床意义 [J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(4): 367-369.

- [5] 朱强,栾怡华,王博. 心梗患者 QT 离散度与心率变异性的关系 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(21): 1949-952.
- [6] Haefliger JA, Meda P. Connexins, renin and hypertension [J]. Med Sci (Paris), 2006, 22: 826-827.
- [7] Kojodjojo P, Kanagaratnam P, Segal OR, et al. The effects of carbenoxolone on human myocardial conduction: a tool to investigate the role of gap junctional uncoupling in human arrhythmogenesis [J]. J Am Coll Cardiol, 2006, 48: 1242-249.
- [8] Weng S, Lauven M, Schaefer T, et al. Pharmacological modification of gap junction coupling by an antiarrhythmic peptide via protein kinase C activation [J]. FASEB J, 2002, 16: 1114-116.
- [9] Dhein S, Larsen BD, Petersen JS, et al. Effects of the new antiarrhythmic peptide ZP123 on epicardial activation and repolarization pattern [J]. Cell Commun Adhes, 2003, 10: 371-378.

(此文编辑 许雪梅)