

# 大鼠心肌梗死后左心室重构、电重构和交感神经重构的关系

珠勒皮亚·司马义<sup>1</sup>, 娜几娜·吾格提<sup>2</sup>, 布海力且木·买买提<sup>3</sup>

(1. 新疆医科大学第一附属医院高血压科, 乌鲁木齐市 830054; 2. 新疆医科大学第一附属医院心律失常科, 乌鲁木齐市 830054; 3. 新疆库尔勒市第一人民医院内科, 库尔勒市 841000)

[关键词] 心肌梗死; 缝隙连接蛋白 43; 酪氨酸羟化酶; 生长相关蛋白; 有效不应期

[摘要] **目的** 应用超声心动图、免疫组织化学技术和电生理技术记录心肌梗死大鼠梗死周边区的有效不应期(ERP)及缝隙连接蛋白 43(Cx43)改变,交感神经神经(TH)及神经生长因子(GAP43)改变,探讨心肌梗死大鼠心室重构、电重构及交感神经重构之间的关系。**方法** 将成年 SD 大鼠 30 只,随机分为假手术组和心肌梗死组。假手术组仅开胸,不结扎冠状动脉。**结果** 与假手术组相比,心肌梗死组 LVIDd、LVIDs 均显著增大( $P<0.01$ ),EF 和 FS 缩短率显著降低( $P<0.01$ )。与假手术组相比,心肌梗死组梗死周边区 ERP 显著缩短,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。心肌梗死组 Cx43 阳性蛋白表达低于假手术组,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。与假手术组相比,心肌梗死组 GAP43 阳性神经密度明显增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。心肌梗死组 TH 阳性神经密度不均一明显增加,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。**结论** 大鼠心肌梗死后心室不但发生结构重构,同时也会发生神经重构和电重构,以及三者之间相互影响和共同作用导致恶性心律失常和猝死的发生。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

## Experimental Study on Left Ventricular Remodeling, Electrical Remodeling and Sympathetic Nerve Remodeling of Myocardial Infarction Model in Rat

SIMAYI · Zhulepiya<sup>1</sup>, NAJINAMAI · Wugeti<sup>2</sup>, and MAITI · Buhailiqiemu<sup>3</sup>

(1. Department of Hypertension, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 2. Department of Arrhythmia, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 3. Department of Cardiology, The First People's Hospital of Korla City, Korla 841000, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Connexin43(Cx43); Tyrosine Hydroxylase(TH); Nerve Growth Factor (GAP43); Effective Refractory Period (ERP)

[ABSTRACT] **Aim** To study on changes of infarcted border zone of effective refractory period (ERP), and expression of connexin43(Cx43), Tyrosine hydroxylase(TH) and nerve growth factor (GAP43) in MI SD rat by echocardiograph, electrophysiological techniques and immunohistochemical technique. To explore relation of left ventricular remodeling, electrical remodeling and sympathetic nerve remodeling of myocardial infarction rat. **Methods** 30 SD rats of either sex weighting 220 ~ 250 g were euthanized under chlorine hydrate 0.3 mL/100 mg anesthesia and were randomly divided into two groups: sham operation group ( $n=15$ ), MI group ( $n=15$ ). **Results** Compared with the sham operation group, LVIDd, LVIDs were significantly increased and EF, FS were shortened in MI group ( $P<0.01$ ). Compared with the sham operation group, ERP of infarcted border zone was significantly shortened in MI group ( $P<0.01$ ). Left ventricular CX43 immunofluorescence could be seen under the fluorescence microscope in two groups of rats. the fluorescence became weak in MI group. Immunohistochemistry of left ventricular 43 and TH could be seen under the light microscope in two groups of rats. Compared with the sham operation group, GAP43 and TH had significantly higher expression in MI group ( $P<0.01$ ), respectively. **Conclusions** Ventricular remodeling, sympathetic remodeling and electrical remodeling

[收稿日期] 2012-10-12  
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30960105)  
[作者简介] 珠勒皮亚·司马义,副主任医师,副教授,研究方向为临床心血管病专业,E-mail 为 zhulepiya@126.com。娜几娜·吾格提,副主任医师,研究方向为心脏电生理,E-mail 为 nazy619@163.com。布海力且木·买买提,副主任医师,研究方向为临床心血管专业,E-mail 为 sunjuande@hotmail.com。

eling occurred in left ventricle after myocardial infarction in SD rat. The mutual influence and interaction lead to malignant arrhythmias and sudden death.

急性心肌梗死是冠心病的一种严重类型,已成为威胁生命的危重疾病之一。心肌梗死后左心室重构是临床上常见的慢性进展性发展的病理生理过程,是反映心肌梗死后心功能的敏感指标。心肌梗死后存在交感神经重构现象,表现为交感神经去神经支配,神经再生和过度再生,以梗死周边区最明显。交感神经重构可能与心肌梗死慢性期室性心律失常和猝死的发生有关。心肌梗死后交感神经重构和电重构心肌梗死后室性心律失常的发生需要基质和触发因素;心肌梗死和传导阻滞造成结构和功能上的异质性为基质,而交感神经过度再生则两方面的作用兼有。除此之外,长期存在的失神经超敏反应以及心肌细胞本身离子电流的改变加剧电不稳定性促进心脏电生理改变。本研究旨在探讨大鼠心肌梗死后心室不但发生结构重构,同时也会发生神经重构和电重构,以及三者之间相互影响和共同作用导致恶性心律失常和猝死的发生。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

成年 SD 大鼠 30 只,体重在 220 ~ 250 g 左右,雌雄不拘。随机分为 2 组:假手术组和心肌梗死组,每组 15 只。假手术组及心肌梗死组大鼠由新疆医科大学动物实验中心提供,动物质量属于一级标准,许可证号:SCXK(新)2003-001。

### 1.2 心肌梗死大鼠模型<sup>[1]</sup>

SD 大鼠采用 10% 水合氯醛溶液(0.3 mL/100 mg)麻醉,仰卧固定于实验台上,沿胸骨正中开胸,剪开心包,充分暴露心脏,在左心耳至心尖的 1/2 处以 5/0 号无菌缝线结扎前降支,以心电图 II 导联 ST 段持续抬高 0.1 mV 作为手术成功的标志。制作心肌梗死大鼠模型成功之后,置笼中饲养 4 周。

### 1.3 有效不应期测量<sup>[2]</sup>

各实验组大鼠腹腔静注麻醉,仰卧位固定于工作台上,用针刺电极刺入大鼠四肢皮下与体表心电图机相连,纸速 25 ~ 50 mm/s,行气管插管,暴露大鼠心脏。将双极电极接触导管缝合固定于左心室心外膜表面,双极刺激电极则置于心室游离壁外膜上,电极间距 1 mm。由心脏电生理刺激仪发出刺激信号,波宽 2 ms,电压为 2 v。由 LEAD2000 心内电生理仪器记录。先测量大鼠安静麻醉状态下的心

电图,计算出其的基础心率。由心脏电生理刺激仪发出刺激信号,基础刺激以高出基础心率 10% 的频率起搏心室,脉宽 2 ms。首先测定心室起搏阈值,以起搏阈值的 2 倍作为输出电压(2 ~ 4 v)。期前刺激 S2 脉宽和电压与 S1 相同,确定起搏刺激可以夺获心室后,在连续发放 4 个起搏刺激 S1 后发放早搏刺激 S2,然后以 10 ms 的步长进行负扫描,直到 S2 不能引起心肌产生可传播的动作电位,此时的 S1S2 间期定义为有效不应期(effective refractive period, ERP)。

### 1.4 心脏超声检查

假手术组、心肌梗死组大鼠分别行心脏超声检查,检测实验大鼠的心功能变化。超声测量指标:左室舒张末期内径(LVIDd)及收缩末期内径(LVIDs);左室射血分数(EF) =  $SV/LVEDV \times 100\%$ ;左室短轴缩短率(FS) =  $(LVDd - LVDs) / LVDd \times 100\%$ 。超声测量依据美国超声心动图学会制定的标准。

### 1.5 缝隙连接蛋白、生长相关蛋白和酪氨酸羟化酶的免疫组织化学检测

各实验组大鼠处死后心脏取材。用 10% 水合氯醛麻醉动物后开胸经心脏灌注生理盐水 250 mL,随后灌注 4% 多聚甲醛固定后取梗死周边区和非梗死区组织进行石蜡包埋,切片。采用 SP 免疫组织化学染色法染色。阴性对照以 PBS 代替一抗。

### 1.6 神经密度的测定<sup>[3]</sup>

应用计算机辅助图像分析系统(Motic Images 3000)计算神经密度,神经密度以神经纤维面积与总检测面积比值表示( $\mu m^2/mm^2$ ),切片全部面积被分割成连续的  $1\,024\,\mu m^2 \times 768\,mm^2$  大小的独立视野,所有视野神经密度的平均值为该切片平均神经密度,每个切片中选择 5 个神经密度最大和 5 个神经密度最小的视野,神经密度均值之差为局部神经分布的不均一性。

### 1.7 统计学处理

用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用独立样本 *t* 检验,组内前后比较采用配对样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 模型制作心电图结果

心肌梗死组在结扎左冠状动脉(LAD)后即可

出现心电图Ⅱ导联ST段抬高或QRS波增宽畸形并持续存在(图1)。

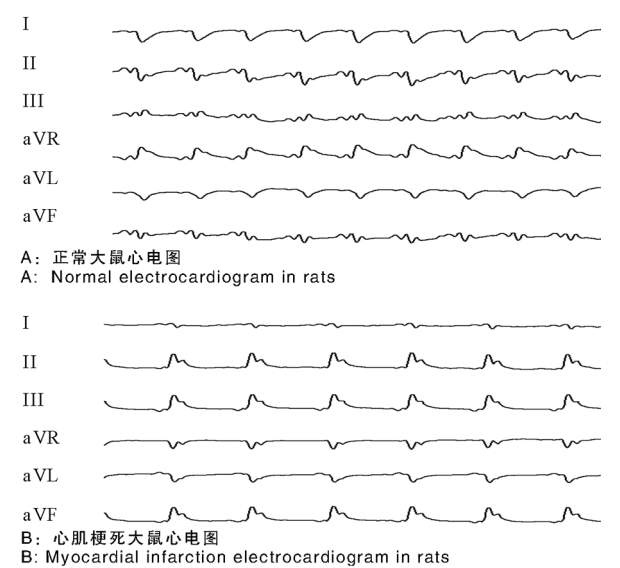


图1. 正常大鼠和心肌梗死大鼠心电图  
Figure 1. Normal and myocardial infarction electrocardiogram in rats

2.2 实验组大鼠模型成功率及死亡率

心肌梗死组模型成功率达到65%,但死亡率达到25%。手术后大鼠多死于呼吸衰竭,心力衰竭。

表2. 两组大鼠左室功能变化( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 2. Left ventricular function changes in two groups of rats( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

分 组	LVIDd (cm)	LVIDs (cm)	EF	FS( % )
假手术组	0.52 ± 0.01	0.23 ± 0.04	0.85 ± 0.01	52.81% ± 1.25%
心肌梗死组	0.62 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.05 <sup>a</sup>	45.51% ± 2.21% <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组相比。

表3. 两组大鼠梗死周边区和非梗死区ERP变化( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )  
Table 3. Infarcted border zone and non infarct zone ERP change in two groups of rats( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

分组	梗死周边区 (ms)	非梗死区 (ms)
假手术组	72.20 ± 2.28	72.00 ± 3.16
心肌梗死组	37.40 ± 5.13 <sup>a</sup>	66.40 ± 2.61

a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组相比。

假手术组左心室肌有大量缝隙边接蛋白43(Connexin43, Cx43)蛋白,表达较清楚,位于心肌闰盘处,分布较规则,部分表达呈斑点或颗粒状散在分布在心肌细胞侧边。心肌梗死组Cx43蛋白表达阳性着色较淡,在心肌闰盘处少有斑点散在分布,分布紊乱,心肌细胞侧边几乎无表达。与假手术组

心肌梗死组动物死亡后根据数量择日手术补齐(表1)。

表1. 各实验组大鼠成功率和死亡率比较( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

Table 1. Success rate and mortality rate compared in experimental rats( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )

分组	成功率( % )	死亡率( % )
假手术组	0	0
心肌梗死组	65 <sup>a</sup>	25 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组相比。

2.3 超声心动图对两组实验大鼠左室功能的评价  
与假手术组相比,心肌梗死组LVIDd、LVIDs均显著增大( $P < 0.01$ ),EF和FS缩短率显著降低( $P < 0.01$ ;表2)。

2.4 两组大鼠梗死和非梗死区有效不应期变化  
与假手术组相比,心肌梗死组梗死周边区ERP显著缩短( $P < 0.01$ ),非梗死区未见明显改变( $P > 0.01$ ;表3和图2)。

2.5 两组大鼠梗死周边区HE染色及缝隙连接蛋白表达结果

假手术组心肌细胞结构完整,排列整齐,细胞核清晰。心肌梗死阻心肌细胞排列紊乱,坏死。心肌细胞之间的间隔增宽(图3)。

相比,心肌梗死组Cx43蛋白表达显著减少,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ;图4)。

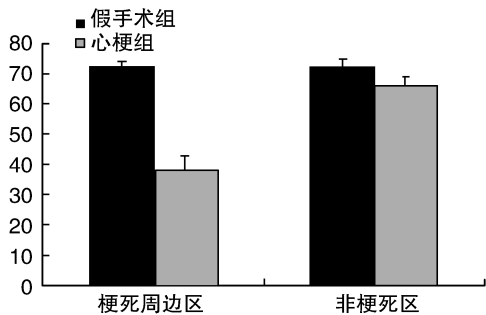


图2. 两组大鼠梗死周边区和非梗死区有效不应期变化  
Figure 2. Infarcted border zone and non infarct zone ERP change in two groups of rats

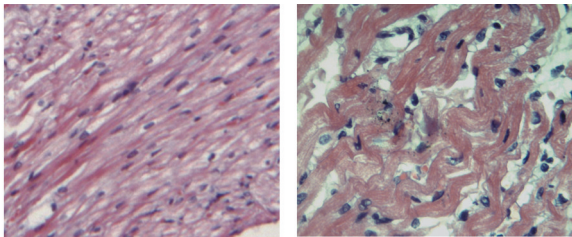


图 3. 两组大鼠心肌梗死周边区 HE 染色 A 为假手术组,B 为心肌梗死组。

Figure 3. HE staining in myocardial infarction border zone of two groups of rats

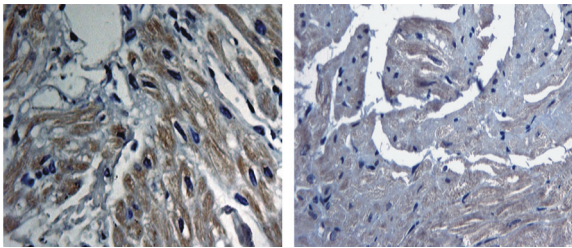


图 4. 两组大鼠心肌梗死周边区 Cx43 表达 A 为假手术组,B 为心肌梗死组。

Figure 4. Cx43 expression in myocardial infarction border zone of two groups of rats

2. 6 两组大鼠神经再生和神经分布不均一性比较

两组大鼠神经再生及活性比较:与假手术组比较,心肌梗死组生长相关蛋白(growth associated protein 43, GAP43)阳性神经密度明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ;表 4、图 5 和图 6)。与假手术组比较,心肌梗死组酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)阳性神经密度不均一明显增加,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ;表 4、图 5 和图 7)。

表 4. 两组神经活性和交感神经分布不均一性( $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2, \bar{x} \pm s$ )  
Table 4. Neural activity and sympathetic nerve distribution heterogeneity in two group of rats( $\mu\text{m}^2/\text{mm}^2, \bar{x} \pm s$ )

分 组	GAP43	TH
假手术组	3. 95 $\pm$ 0. 32	5. 87 $\pm$ 1. 17
心肌梗死组	11. 82 $\pm$ 1. 15 <sup>a</sup>	11. 99 $\pm$ 1. 26 <sup>a</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与假手术组比较。

3 讨 论

心肌梗死后发生的左心室进行性扩张和外形改变,这种现象称为梗死后心室重构,包括心室容积、形状、室壁厚度、心肌结构和超微结构等方面的改变。心肌梗死后功能心肌细胞丢失和心肌瘢痕组织形导致的心功能不全和继发心室重构,主要表现为梗死区

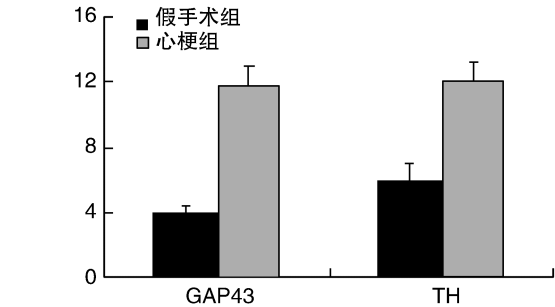


图 5. 两组神经活性和自主神经分布不均一性  
Figure 5. Neural activity and sympathetic nerve distribution heterogeneity in two group of rats

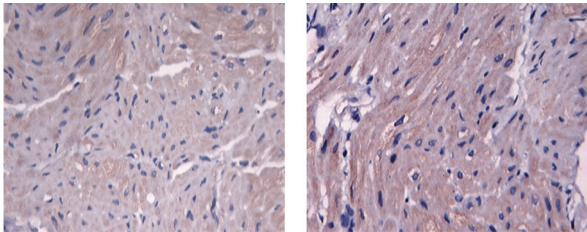


图 6. 两组大鼠心肌梗死周边区 GAP43 阳性表达 A 为假手术组,B 为心肌梗死组。

Figure 6. Positive expression of GAP43 in border zone in two groups of rats with myocardial infarction

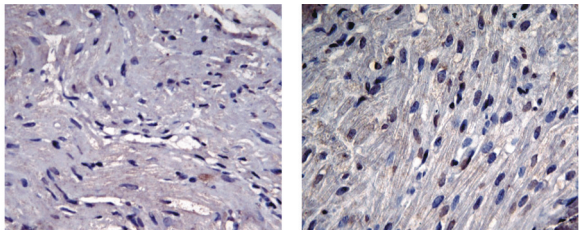


图 7. 两组大鼠心肌梗死周边区 TH 阳性神经纤维表达 A 为假手术组,B 为心肌梗死组。

Figure 7. Positive nerve fibers expression of TH in border zone in two groups of rats with myocardial infarction

膨展和非梗死区代偿性心肌肥大、间质纤维化和进行性心室腔扩大,严重影响了心脏的收缩和舒张功能,心脏收缩功能受损的程度和心室变形的程度是导致梗死恢复期左心室重构的病理生理学基础,是心肌梗死患者发生终末期心力衰竭的主要原因<sup>[4-7]</sup>。

心肌梗死后肥厚心室动作电位时程的不均匀延长<sup>[8]</sup>和/或缝隙连接蛋白表达的改变<sup>[9,10]</sup>都可以造成复极的异质性。心肌梗死后从急性期到恢复期再到心衰期,动作电位幅度下降,时程延长是心脏电生理特性改变的关键,并可通过触发机制促进折返性心律失常发生。越来越多的研究的证实,心脏特殊传导系统的电生理性质和缝隙连接及其连

接蛋白有着密切关系。缝隙连接介导心肌细胞间电偶联,为电兴奋的顺序传播构成细胞间的通路进而调控心肌同步收缩。缝隙连接蛋白 43 ( connexin43, Cx43) 的正常表达与分布是心肌缝隙连接通道电偶联功能正常和心脏正常电活动及协调舒缩的重要保证,其表达量、结构及分布的改变将导致心脏电活动的整体性发生异常,必然引起心律失常的发生。Perter 等<sup>[11]</sup>通过对狗心肌梗死灶的心外膜下边缘区尚存活心肌进行研究,发现 Cx43 的降解和分布的改变与心律失常的发生有着密切的关系,并且通过标测直接证实了 Cx43 分布改变与折返环路形成的关系,从分子水平揭示了心律失常发生的解剖学基础。本实验通过建立大鼠心肌梗死模型,观察心肌梗死组梗死周边区 ERP 和左心室组织中 Cx43 表达的变化。结果表明,梗死周边区 ERP 显著缩短,心肌梗死组 LVIDd、LVIDs 均显著增大,EF 和 FS 缩短率显著降低。心肌梗死组 CX43 蛋白表达阳性着色较淡,在心肌闰盘处少有斑点散在分布,分布紊乱,心肌细胞侧边几乎无表达,验证了心肌梗死组细胞间电生理特性改变,通讯发生改变,细胞间偶联重构,在心肌梗死时 Cx43 介导的偶联减少。

心肌梗死时支配心脏的神经受到损伤,受损的神经发生重构,以梗死周边区最明显。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,提高心律失常发生率<sup>[12]</sup>。由于心肌组织中交感神经密度增加,交感神经兴奋时释放入心肌组织的去甲肾上腺素、神经肽 Y 等交感神经递质也相应增加。这些神经递质通过其对  $Ca^{2+}$ 、 $K^{+}$ 、 $Cl^{-}$  离子通道及  $Ca^{2+}$  转运体的作用,加重升高的心室复极离散度,从而易化室性心律失常。目前国内外报道的心脏自主神经再生相关主要标记物有:酪氨酸羟化酶(TH)其阳性表达可代表交感神经在心脏中的分布。生长相关蛋白(GAP43),其存在标志着神经生长,可用来评价自主神经的生长活性<sup>[13]</sup>。本实验结果显示,心肌梗死组 GAP-43 阳性神经密度明显增加,心肌梗死组 TH 阳性神经密度不均一明显增加。实验证实,左心室心肌梗死发生后,其梗死区周围出现神经重构现象,表现为自主神经过度支配,并受心肌中神经生长因子蛋白表达的调节。作者认为心肌梗死后心脏神经纤维存在形态、分布及的密度改变,即神经重构,其可促进心肌梗死后心律失常的维持。有研究结果显示,心肌梗死不仅造成梗死区域心肌去神经支配,并且通过损伤经过梗死区域心外膜的交感神经轴突,在心肌梗死后 5 ~ 10 min 起始造成梗死区域远

端非梗死区域心肌不均一去神经支配,其去神经化呈进行性加重。随后在梗死区域及非梗死区域心肌均出现神经再生,且部分区域心肌出现交感神经过度再生<sup>[14]</sup>。GAP43 阳性细胞在心肌呈散在分布,其密度在梗死周边区域大于非梗死区域。交感神经标志物 TH 阳性神经细胞分布亦呈现上述特征。本研究结果给我们在临床治疗上提供依据,从影响结构重构、电重构和神经重构的因素着手,限制左室重构,减轻左室负荷,抑制交感神经过度再生及重构,改善电重构等,进而改善病人预后。

[参考文献]

[1] 赵 静, 邵素霞, 张 雷, 等. 改良法制备大鼠心肌梗死模型[J]. 河北医科大学学报, 2010, 31(1): 1-4.

[2] 瞿 龙, 李风云, 黄德嘉. 慢性心力衰竭对兔心室肌电重构的影响[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2000, 14(2): 75-78.

[3] 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, 13(3): 185-188.

[4] 李树仁, 齐晓勇. 骨髓干细胞移植影响急性心肌梗死后心室重构的研究现状[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(28): 5 574-579.

[5] 王喜梅, 张新萍. 大鼠心肌梗死后应用瑞舒伐他汀对左室重构和心功能的影响[J]. 武汉大学学报, 2010, 31(5): 604-607.

[6] Li RK, Jia ZQ, Weisel RD, et al. Cardiomyocyte transplantation improves heart function[J]. Ann Thorac Surg, 1996, 62: 654-661.

[7] Roell W, Lu ZJ, Bloch W, et al. Cellular cardiomyoplasty improves survival after myocardial injury[J]. Circulation, 2002, 105: 2 435-441.

[8] Qin D, Zhang ZH, Caref EB, et al. Cellular and ionic basis of arrhythmias in post-infarction remodeled ventricular myocardium[J]. Circ Res, 1996, 79: 461-473.

[9] Park DJ, Freitas TA, Wallick CJ, et al. Molecular dynamics and vitroanalysis of Connexin43: A new 14-3-3 mode-1 interacting protein[J]. Protein Sci, 2006, 15 (10): 2 344-355.

[10] 吴爱明, 王硕仁. 扶正化瘀胶囊对心肌梗死大鼠心肌缝隙连接蛋白 43 表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2007, 11(5): 1 079.

[11] Peters NS, Coromilas T, Severs NJ, et al. Disturbed connexin43 gap junction distribution correlates with the location of reentrant circuits in the epicardial border zone of healing canine infarcts that cause ventricular tachycardia[J]. Circulation, 1997, 95: 988-996.

[12] Kiriazis H, Du XJ, Feng X, et al. Preserved left ventricular structure and function in mice with cardiac sympathetic hyperinnervation [J]. AmJ PhysiolHeart Circ Physiol, 2005, 289 (4): H1 359-365.

[13] 吴 擎, 江 洪, 陆 志, 等. Semaphorin 3A 对大鼠慢性心肌梗死周边区交感神经重构的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2010, 31(2): 145-148.

[14] Zhou S, Chen LS, Miyauchi Y, et al. Mechanisms of cardiac nerve sprouting after myocardial infarction in dogs[J]. Circ Res, 2004, 95: 76-83.

(此文编辑 李小玲)