

复脉汤对心肌缺血大鼠心律失常发生率及 Cx43 蛋白表达影响的研究*

龚一萍, 程 臻

(浙江中医药大学, 浙江杭州 310053)

摘要: 目的 观察复脉汤灌胃预处理对心肌缺血大鼠心律失常发生率及 Cx43 表达的影响, 探讨其发生机制。方法 采用结扎冠状动脉左前降支的方法制备 SD 雄性大鼠的心肌缺血模型, 冠脉结扎 1h 后观察复脉汤灌胃预处理对大鼠体表心电图及心律失常评分的影响; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测缝隙连接蛋白 43(Cx43)总量表达的变化。结果 ①心律失常评价: 急性缺血期间, 各组大鼠均出现不同程度的心律失常, 模型组心律失常发生率为 87.5%, 复脉汤低、中、高剂量组心律失常发生率分别 62.5%, 50.0%, 62.5%, 心律失常评分比较, 3 组均低于模型组 ($P < 0.05$)。②Cx43 蛋白的表达: Cx43 相对表达量(Cx43/GAPDH)组间比较, 假手术组显著高于模型组 ($P < 0.01$); 复脉汤高剂量组显著高于模型组 ($P < 0.01$), 作用与酒石酸美托洛尔相似; 复脉汤低、中剂量组高于模型组 ($P < 0.05$), 复脉汤低、中、高剂量组组间比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 复脉汤灌胃预处理可以降低冠脉结扎 1h 后心肌缺血大鼠的心律失常发生率, 提高 Cx43/GAPDH, 其机制可能为改善心肌组织的供血和供氧而提高 Cx43 的表达, 降低心梗并发症心律失常的发生。

关键词: 心肌缺血模型; 心律失常; 复脉汤; Cx43

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)04-0004-05

作为心梗后最常见的并发症, 缺血性心律失常是导致患者猝死的重要原因之一^[1]。许多研究表明^[2-3], 心脏缝隙连接(gap junction, GJ)在缺血诱导的室性心律失常的发生中发挥着重要的作用。GJ 通道的关闭可引起相邻细胞发生失偶联, 从而导致电冲动的缓慢传导和差异性传导。作为心室 GJ 的主要成分, 缝隙连接蛋白 43(Cx43)^[4]的不均一降解将会引起缝隙连接通道的关闭。活血益气法能够减少心梗后心律失常的发生^[5-6], 推测可能与 Cx43 蛋白表达有关。本实验拟通过制作心肌缺血大鼠模型, 观察以益气活血法制方的复脉汤对心律失常发生率与心肌细胞 Cx43 蛋白表达的影响, 并对其作用机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

实验所需的中药材均由浙江中医药大学中医门诊部提供, 按照复脉汤处方比例取适量药材, 加 10 倍量水浸泡 30min, 煎煮 2 次(第 1 次 1.5h, 第 2

次 0.5h), 将过滤所得药液浓缩至 $4\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 炙甘草汤按相同方法制备, 浓缩为 $1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药液, 4°C 冰箱保存; 酒石酸美托洛尔: 阿斯利康制药有限公司(批号: 1304076); 兔抗总 Cx43(Total-Cx43)多克隆抗体(SANTA CRUZ 公司), 内参 GAPDH 抗体(update 公司), ECL 增强型化学发光显色试剂盒(Thermo 公司), PVDF 膜(Life Science 公司), 辣根碱过氧化物酶标记的二抗(Novogene 公司)。

1.2 实验分组与给药

SD 大鼠, 清洁级, 体质量 220~240g, 雄性, 上海西普尔-必凯实验动物有限公司(合格证号: 2008001632384)。随机分为 7 组, 假手术组(A 组), 模型对照组(B 组), 西药酒石酸美托洛尔对照组(C 组) $10.4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 中药炙甘草汤对照组(D 组) $0.940\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 复脉汤低剂量组(E 组) $0.938\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 复脉汤中剂量组(F 组) $1.875\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 复脉汤高剂量组(G 组) $3.750\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每组 10 只, 每只按照 $10\text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 每天 1 次, A 组和 B 组给予相同体积的

* 基金项目: 浙江省自然科学基金(LY12H27010)

收稿日期: 2014-06-11

作者简介: 龚一萍(1956-), 女, 浙江杭州人, 教授、主任中医师、博士生导师。研究方向: 中医药防治心血管疾病及辨治规律, 舌诊临床应用。E-mail: tcmgong@126.com

生理盐水,共计 2 周。

1.3 急性心梗模型的建立^[7]

各组大鼠术前 1h 给药并称重后,以 3%戊巴比妥钠 $40\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射麻醉,仰卧位固定于鼠台上,连接 Medlab 生物信号采集系统,记录 II 导联心电图。颈部正中气管切开后进行气管插管,行正压人工呼吸(频率为 60 次/min,潮气量 $3.5\text{mL}/100\text{g}$,呼吸比为 2:1),于左前胸第 3、4 肋间打开胸腔,暴露心脏,剥开心包膜。以肺动脉圆锥与左心耳间的心大静脉为标志,用 6-0 号无创带针缝合线穿过左心耳下缘 1~2 mm 处心肌表层,进针深度约为 1~2mm,待心电稳定 15min 后,结扎冠状动脉左前降支,将心脏回纳入胸腔,肉眼可见心脏左室前壁及心尖部颜色变暗,同时心电监测可见 II 导联心电图 R 波振幅明显抬高,ST 段抬高 0.15mV 以上,大鼠心率明显加快,并出现室性早搏以及室性心动过速(见图 1),为手术成功,术后记录心电 1 h。假手术组除不结扎冠脉左前降支外,其余步骤相同。

1.4 室性心律失常评分法

参照 Curtis 等心律失常评分法^[8]对心律失常程度进行定量分析,规则如下:①室性心律失常比房性心律失常严重;②在室性心律失常中,严重程度按照心室颤动(VF)、室性心动过速(VT)、频发和偶发室性早搏(PVC)的顺序递减;③心律失常的持续时间越长或发生频率越高,其程度越严重。在观察时间内,取最严重的一种相对应的分数作为心律失常评分,见表 1。

表 1 心律失常评分规则表

分值	评分规则
0	无心律失常
1	房性心律失常或偶发 PVC
2	频发 PVC
3	1~2 阵 VT
4	多于 3 阵 VT
5	VF

1.5 Cx43 的检测

免疫印迹杂交(western blot)检测 Cx43 的表达,取缺血心室肌组织 100mg ,悬浮于 $400\text{ }\mu\text{L}$ 单去污剂裂解液裂(含 PMSF)中匀浆,离心($12\text{ }000\text{rpm}$, 4°C , 30min),取上清液,Bradford 法测定提取蛋白的浓度。根据样品浓度,取 $50\text{ }\mu\text{g}$ 制备好的总蛋白样品上样,进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,

至溴酚蓝到达分离胶的底部后停止电泳。 4°C 、 80V 恒压转 PVDF 膜 2h,5%脱脂奶粉 30mL 封闭 2h;分别将膜放入 TBST 稀释的兔抗总 Cx43 多克隆抗体(1:200)和内参 GAPDH 多克隆抗体(1:200), 4°C 过夜,加入辣根过氧化物标记的二抗(1:1 000)室温孵育 2h,与 ECL 显色剂(A 液:B 液=1:1)反应 2~3min 后,将 PVDF 膜置于塑料薄膜上,在化学发光凝胶成像系统下曝光显影,Image Pro-Plus 软件处理图像中的蛋白条带,比较各组 Cx43 蛋白灰度值和 GAPDH 蛋白灰度的比值,计算 Cx43 蛋白表达的相对量。

1.6 统计学分析

采用 SPSS17.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,计量资料采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 LSD 法,计数资料的比较采用 χ^2 分析, $P<0.05$ 为有统计学意义, $P<0.01$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 体表心电图

冠脉结扎前,大鼠心率多数高于 $380\text{次}/\text{min}$,P 波、QRS 波、T 波表现正常;冠状动脉左前降支结扎即刻可见心脏左室前壁及心尖部颜色变暗,II 导联心电图 R 波振幅明显抬高,ST 段抬高 0.15mV 以上,ST 段与 R 波融合成单向曲线,并出现室性早搏(PV),阵发性室性心动过速(VT),甚至室颤(见图 1)。

2.2 心律失常评分

A 组有 1 只大鼠因穿线后出血而发生 1 阵 PV,其余心电正常;其他各组均发生不同程度的心律失常,其中 B 组最明显,心律失常发生率(87.5%)最高,心律失常评分(2.38 ± 1.598)最高,显著高于 A 组($P<0.01$);E、F、G 组心律失常发生评分(分别为 1.13 ± 1.246 , 1.00 ± 1.069 , 1.13 ± 1.126),与 B 组比较,具有统计学意义($P<0.05$)(见表 2)。

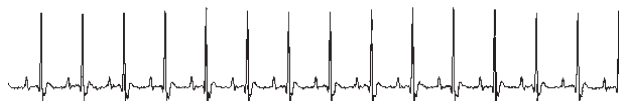


图 1-a 正常心电图

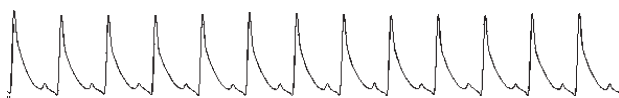


图 1-b 结扎即刻心电图,S-T 段抬高

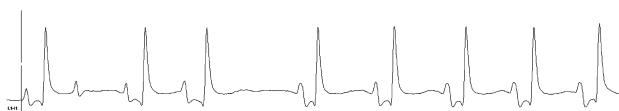


图 1-c 传导阻滞

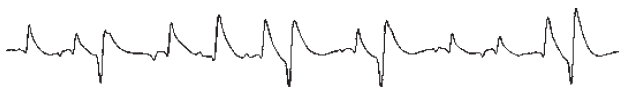


图 1-d 室性早搏

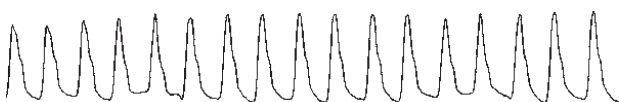


图 1-e 室性心动过速



图 1-f 室颤

表 2 心律失常发生情况

组别	n	PVC	VT	VF	心律失常	心律失常评分
A	8	1	0	0	12.5	0.13±0.354
B	8	4	2	1	87.5	2.38±1.598 [△]
C	8	5	0	0	62.5	1.00±0.926 [*]
D	8	4	1	0	62.5	1.13±1.356 [*]
E	8	4	1	0	62.5	1.13±1.246 [*]
F	8	3	1	0	50.0	1.00±1.069 [*]
G	8	4	1	0	62.5	1.13±1.126 [*]

注:与 A 组比较;[△] $P<0.01$;与 B 组比较;^{*} $P<0.05$

2.3 Cx43 蛋白的表达

Cx43 多克隆抗体可以检测 Cx43 蛋白总的表达量,其分子量为 43KD。如图 2-a 和图 2-b 所示,A 组 Cx43 相对表达量 (Cx43/GAPDH) 为 1.6694 ± 0.02382 ,B 组为 0.9322 ± 0.1286 ,Cx43/GAPDH 组间比较,A 组显著高于模型组 ($P<0.01$);C 组为 1.2568 ± 0.0490 ,E、F、G 组 Cx43/GAPDH 分别为 1.0716 ± 0.0352 , 1.1063 ± 0.0723 , 1.1838 ± 0.0839 。Cx43/GAPDH 组间比较,C 组、G 组显著高于 B 组 ($P<0.01$),C 组与 G 组之间比较无统计学意义 ($P>0.05$);E、F 组高于模型组 ($P<0.05$),E、F、G 组组间比较无统计学意义 ($P>0.05$)。各组之间 GAPDH 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

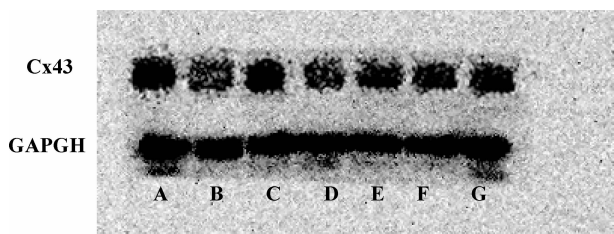
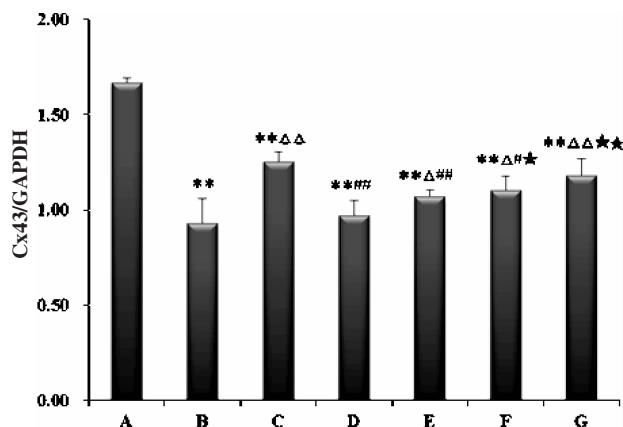


图 2-a Cx43 蛋白表达 (Western blot)



注:图 2-b 中,与 A 组比较,^{*} $P<0.01$;与 B 组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与 C 组比较,[#] $P<0.05$,^{###} $P<0.01$;与 D 组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$ 。

图 2-b Cx43 蛋白的相对值 (Cx43/GAPDH)

3 讨论

3.1 缺血性心律失常与 Cx43

缺血性心律失常的发生与缝隙连接 (gap junction, GJ) 的功能及结构状态的改变密切相关。缺血梗死区尤其是梗死边缘带的心肌细胞 GJ 的重构是导致心律失常高发的一个重要原因。GJ 主要由缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 构成,它被认为是细胞间信息 (电信号和化学信号) 传导的惟一通道,其结构和功能状态的改变是心肌缺血后心律失常发生的重要组织学和分子病理学基础^[9]。而作为心室肌间电流的主要导体,Cx43 结构和功能的稳定,可以提高心肌细胞间的电偶联,减少缺血性心律失常的发生^[10]。Cx43 表达和分布的异常是缺血性心律失常发生的结构基础,短时间内心肌缺血时 Cx43 的不均一降解是导致急性缺血性心律失常的重要原因。当 Cx43 含量减少 50% 时,心室内的传导显著减慢,缝隙连接通道的电耦联功能障碍,心肌不能实现同步化收缩,引发包括缺血性心律失常在内的多种心血管疾病^[11]。Lerner 等^[12]研究报道,Cx43 在缺血坏死心肌细胞中的表达显著降低,通过 ECG 检测显示室性心动过速发生率是正常心肌细胞的 3 倍,室性早搏发生

率也明显增加。以上证据表明,Cx43在心律失常的发生发展中发挥了重要作用。

益气活血中药对缺血性心律失常有着明确的疗效和可靠的安全性^[13],能够针对由缺血引起的心律失常做出很好的修复性治疗。有关益气活血中药治疗心律失常的研究^[14]表明,人参皂苷与川芎嗪联合应用对混合型心室重构的电生理有良好的正性改善作用。张早华、储载农等^[15]发现,红景天注射液可扩张冠脉血管,降低心脏后负荷,明显增加心输出量和每搏输出量,增强心脏有效做功;并能显著增加冠状静脉窦血氧含量,降低心肌耗氧指数及心肌耗氧量,改善心肌的供血供氧。益气活血复方双参通冠方(人参、丹参、元胡)可抑制在体急性心肌缺血再灌注模型大鼠心肌细胞Cx43的降解,改善心肌细胞间通讯,降低心肌激动传导速度不均性,消除或减少折返形成,减少心律失常的发生^[16]。

3.2 实验结果

复脉汤系我们临床经验方,以益气活血法立方,由黄芪、生晒参、丹参、川芎、红景天、甘松、酸枣仁等中药组成,临床用于治疗冠心病伴发心律失常患者,可有效缓解胸闷胸痛、心悸心慌、气短乏力等不适症状,改善冠脉供血。其作用机制:①从整体观出发,以补益心气为本。②结合的心主神明生理特性,以枣仁养血敛阴,安神定悸,使扰动的心神复归于心,则心悸自平。③辨病与辨证相结合,在辨证论治的同时结合辨病用药:以丹参、川芎扩张冠状动脉,增加冠脉血流量,改善心肌血氧供应^[17-18];红景天扩张冠脉血管,降低心脏后负荷;甘松抑制心肌细胞膜Na⁺通道和Ca²⁺通道,防止细胞内钙超载,稳定细胞膜结构,保护心肌细胞,并能延长心肌细胞动作电位时程及有效不应期,阻止折返激动,有效治疗多种心律失常。

Western blot检测结果表明,正常情况下,Cx43表达量较高,与以往研究相同。与之相比,心室肌缺血1h后,Cx43表达量明显降低($P<0.01$),提示心室肌Cx43大量降解。使用复脉汤干预后,缺血区Cx43降解的程度有所减轻,其中高剂量组作用与酒石酸美托洛尔相似,较模型组有显著性差异;中、低剂量组Cx43表达量较模型组升高($P<0.05$);复脉汤高剂量组Cx43表达量较炙甘草汤组明显升高($P<0.01$),中剂量组Cx43表达量较炙甘草汤组升高($P<0.05$);复脉汤低、中、高剂量组之间比较无统计学差异($P>0.05$),表明复脉汤能抑制缺血区Cx43的降解。其原

因可能与复脉汤中的益气活血中药成分改善心肌血氧供应,减轻细胞酸中毒及心肌缺血损伤,增加心肌Cx43的表达程度有关,其具体作用机制则有待进一步深入研究。推测复脉汤中的益气活血中药成分可能参与调节了Cx43的表达。我们的前期研究表明,复脉汤能够改善心肌的血氧供应,稳定细胞膜结构,减少CK、LDH等心肌酶的释放,减轻缺血心肌损伤,抑制心律失常的发生。因此,我们推测,复脉汤在改善心肌血氧供应的同时,上调了Cx43的表达,从而抑制了心梗大鼠室性心律失常的发生。

参考文献:

- [1] 郝国贞,傅向华,范卫泽,等.静脉注射美托洛尔治疗急性冠状动脉综合征合并室性心动过速风暴的临床观察[J].临床心血管病杂志,2010,26(11):816-817.
- [2] Van Rijen HV, Van Veen TA, Gros D, et al. Connexins and cardiac arrhythmias[J]. Adv Cardiol, 2006, 42: 150-160.
- [3] Rysa J, Leskinen H, Ilves M, et al. Distinct upregulation of extracellular matrix genes in transition from hypertrophy to hypertensive heart failure [J]. Hypertension, 2005, 45(5): 927-933.
- [4] Hashiguchi A, Hitachi K, Inui M, et al. TSC-box is essential for the nuclear localization and antiproliferative effect of XTSC-22[J]. Dev Growth Differ, 2007, 49(3): 197-204.
- [5] 王振涛,王硕仁,赵明镜,等.活血和益气方药对心肌梗死后左心衰大鼠左心室重构影响的比较研究[J].中国中西医结合杂志,2002,22(5):376-378.
- [6] 赵明镜,王硕仁,李敏,等.早期应用活血和益气中药抑制心衰大鼠左室重构和凋亡的对比研究[J].中国中药杂志,2007,32(8):710-714.
- [7] Kuniyasu A, Kaneko K, Kawahara K, et al. Molecular assembly and subcellular distribution of ATP-sensitive potassium channel proteins in rat hearts[J]. FEBS Letters, 2003, 55(2): 259-263.
- [8] Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia [J]. Cardiovasc Res, 1988, 22(9): 656-65.
- [9] Mayama T, Matsumura K, Lin H, et al. Remodelling of cardiac gap junction connexin 43 and arrhythmogenesis[J]. Exp Clin Cardiol, 2007, 12(2): 67-76.
- [10] Patel PM, Plotnikov A, Kanagaratnam P, et al. Altering ventricular activation remodels gap junction distribution in canine heart [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2001, 12(5): 570-577.
- [11] Dhein S, Polonteouk L, Salameh A, et al. Pharmacological modulation and differential regulation of the cardiac gap

- junction Proteins connexin43 and connexin40[J].Biol Cell, 2002, 94(7-8):409.
- [12] Lemer D L, Yamada K A, Schuessler R B, et al. Accelerated onset and increased incidence of ventricular arrhythmia included by ischemia in Cx-43 deficient mice[J]. Circulation, 2000, 101(5):547.
- [13] 李奎生. 谈益气活血法治疗心律失常的临床体会[J]. 医药世界, 2007(2):102-102.
- [14] 王硕仁, 倪量, 赵明镜, 等. 川芎嗪、人参皂苷对心室重构大鼠离体心脏电生理作用研究 [J]. 美国临床心脏学杂志, 2007, 30(S):310.
- [15] 储载农, 张早华, 刘建勋, 等. 红景天注射液对动物血小板聚集、体外血栓形成及血液黏度的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(6):56-57.
- [16] 刘建勋, 韩笑, 马晓斌, 等. 双参通冠方对急性心肌缺血再灌注模型核因子- κ B 信号途径及细胞间隙连接通讯的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(3):228.
- [17] 陈一清. 缓慢性心律失常证治规律若干问题探讨[J]. 新中医, 1998, 30(4):3-5.
- [18] 马清钧, 王淑玲. 临床实用中药学[M]. 南昌: 江西科学技术出版社, 2001:488.

(编辑: 杨阳)

Study the Effect of Fumai Decoction on the Incidence of Arrhythmia in Rat Myocardial Ischemia Model and the Expression of Cx43

GONG Yi-ping, CHENG zhen

(Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: **Objective** To investigate the effect and possible mechanism of pretreatment of Fumai decoction on the incidence of arrhythmia in rat myocardial ischemia model and the expression of Cx43. **Methods** SD male rats of myocardial ischemia model were induced by left anterior descending ligation. The continuous electrocardiographic was monitored for one hour to observe the effect of pretreatment of Fumai decoction and the arrhythmia score. The Cx43 expression was characterized by Western blot. **Results** (1) Evaluation of arrhythmia: after myocardial ischemia models were induced, all the groups responded in arrhythmia, but with different degrees. The incidence of arrhythmia in model group was 87.5%. The incidence of arrhythmia in low dose, middle dose and high dose groups of Fumai decoction were 62.5%, 50.0%, 62.5%, respectively. Compared the arrhythmia score, all the three groups of Fumai decoction was lower than the model group ($P < 0.05$). (2) Expression of Cx43: ham operation group showed the highest relative expression of Cx43/GAPDH and higher than the model group ($P < 0.01$). High dose groups of Fumai decoction was significantly higher than model group ($P < 0.01$), which was similar to tartaric acid metoprolol group. Low dose and middle dose of Fumai decoction were higher than model group ($P < 0.05$), while the three groups of Fumai decoction showed no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Pretreatment of Fumai decoction can reduce the incidence of arrhythmia in myocardial ischemia model induced by left anterior descending ligation and increase the relative expression of Cx43/GAPDH. This might be the result of improving the myocardial tissue blood flow and oxygen supply to improve the expression of Cx43, reduce the occurrence of arrhythmia.

KEY WORDS: myocardial ischemia model; arrhythmia; Fumai decoction; Cx43

(原文见第 1 页)

Study on Correlation between TCM Dialectical Type and T Lymphocyte Subsets, IL-4, IFN- γ in Patients with HBeAg-negative Chronic Hepatitis B

LUO Jun-hua^{1,2}, CAO Qiu-shi²

(1. Wuhan General Hospital of PLA Guang-zhou Military Command, Wuhan 430070, China;

2. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

ABSTRACT: **Objective** To evaluate the correlation between TCM dialectical type and T lymphocyte subsets, IL-4, IFN- γ in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. **Methods** 120 patients with HBeAg-negative CHB were diagnosed with differential Chinese medicine syndrome, and their peripheral blood T lymphocyte subsets (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ and CD4⁺/CD8⁺), IL-4 and IFN- γ level were determined. **Results** Compared with those in the normal control group, CD4⁺ was lower, CD8⁺ was higher, CD4⁺/CD8⁺ was decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), IL-4 was significantly elevated ($P < 0.01$) and IFN- γ was significantly lower ($P < 0.01$) in the HBeAg-negative CHB patients. Comparison among the different syndrome types revealed that in damp heat resistance and blood-stasis in meridian, T lymphocyte subsets was statistically different with liver-kidney yin deficiency, spleen-kidney yang deficiency ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). In the damp heat resistance, liver stagnation and spleen deficiency, blood-stasis in meridian, liver-kidney yin deficiency, spleen-kidney yang deficiency sequence, IL-4 rose gradually and IFN- γ decreased gradually, with significant differences between groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusions** It is related that the peripheral blood T lymphocyte subsets, IL-4, IFN- γ levels and TCM dialectical type in patients with HBeAg-negative CHB.

KEY WORDS: chronic hepatitis B; HBeAg; TCM dialectical type; T lymphocyte subsets; IL-4; IFN- γ