

缺血预处理对心肌细胞超微结构及 CX43 蛋白表达的保护作用

庄梅¹, 罗红鹤², 刘晓冰³, 陈振光²

(中山大学附属第一医院 1.保健门诊; 2.胸外科, 广东广州 510080; 3.深圳孙逸仙心血管医院, 广东深圳 518001)

摘要:【目的】观察缺血预处理对缺血/再灌注心肌细胞超微结构及细胞连接蛋白 43 (Connexin43, CX43) 表达的保护作用。【方法】连续观察 54 例心瓣膜病接受瓣膜置换的病人, 随机分为缺血预处理组和对照组 (非缺血预处理)。体外循环前后取右心耳组织标本处理, 电子显微镜下观察心肌细胞超微结构的变化, 免疫组化方法测定心肌细胞纤维 CX43 蛋白表达水平, 并作图像定量分析。对比手术前后超声心动图的心功能指标。【结果】缺血/再灌注后, 缺血预处理组心肌细胞线粒体和闰盘结构基本完整, 对照组心肌细胞超微结构破坏严重。手术前两组间心肌细胞 CX43 表达无明显差异。缺血预处理组术前后 CX43 表达无明显变化 ($P > 0.05$), 而对照组术后明显降低 ($P < 0.05$)。术后两组心肌细胞 CX43 表达有显著性差异 ($P < 0.05$)。超声心动图测定左心室射血分数和短轴缩短率, 缺血预处理组术前后比较无显著性变化, 对照组术后左心室射血分数和短轴缩短率均降低, 而短轴缩短率明显低于缺血预处理组 ($P < 0.05$)。【结论】缺血预处理能维持缺血/再灌注后心肌细胞 CX43 蛋白表达的稳定, 保护心肌细胞超微结构的完整性, 有利于术后心功能恢复。

关键词: 心肌保护; 心功能, 缺血预处理; CX43

中图分类号: R654.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)05-0562-04

Protection Effect of Ischemia Preconditioning on Myocardial Cellular Ultrastructure and Expression of CX43 Protein

ZHUANG Mei¹, LUO Hong-he², LIU Xiao-bing³, CHEN Zhen-guang²

(1. Health Clinici, 2. Department of Thoracic Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Shenzhen SUN Yat-sen Cardiovascular Hospital, Shenzhen 518001, China)

Abstract: 【Objective】To study the protection effect of ischemia preconditioning (IP) on the myocardial cellular ultrastructure and expression of myocardial connexin 43 (CX43) protein before and after ischemia/reperfusion. 【Methods】Continuous 54 cases of heart valve replacement were involved in the study. IP group and control group (non IP) were divided randomly. Right atrial appendage specimen was taken and processed for the following tests in each case. Morphologic analysis of myocardial ultrastructure was processed under electronmicroscope. The expression of CX43 protein in myocardial cell was tested by an immunohistochemical approach with a quantitative imaging system. Pre- and post-operative cardiac function by echocardiogram were compared. 【Results】After ischemia/reperfusion, myocardial cellular mitochondria and intercalary disc of IP group were in almost normal morphology. However, identified disorganization of myocardial cellular ultrastructure could be seen in the control. There were no statistical differences of CX43 expression in myocardial cells in the two groups before operations. There were no differences of CX43 levels in IP group pre- and post operation. But it was notably lower in the control and showed statistical difference comparing with IP group ($P < 0.05$). For the ejection factor (EF) and the shortening factor (SF) of the left ventricle by echocardiography, there were no differences between pre- and post-operation in IP group. It appeared that EF and SF reduced in the control after operation. There was a

收稿日期: 2006-02-25

作者简介: 庄梅 (1965-), 女, 广东汕头人, 主治医师, 1997-1999 年留学美国 Montana 大学国际心脏研究所; 罗红鹤, 教授, 通讯作者。
E-mail address: lhhzm@hotmail.com

statistical difference in SF of the control comparing with IP group ($P < 0.05$).【Conclusion】 IP could retain the expression of CX43 protein in myocardial cell after ischemia/reperfusion, and maintain morphologic integrity of cellular ultrastructure. It is beneficial to the recovery of heart function after surgery.

Key words: myocardial protection; heart function, ischemia; CX43

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(5):562-565]

体外循环心脏停搏后心肌的缺血/再灌注损伤是引起心肌细胞不可逆损伤的重要因素。它造成的心肌细胞线粒体和细胞间连接装置结构的损伤可以引起细胞间电耦联、电与化学信息交换通道变化和能量代谢障碍,其结果是心肌电生理和收缩力变化。研究表明:手术中进行心脏缺血预处理有良好的心肌保护作用。本文从心肌细胞连接结构蛋白 43(connexin 43, CX43)表达变化的角度研究缺血预处理对心肌细胞超微膜结构保护的作用机制。

1 材料与方法

1.1 一般资料

2003 年 2 月至 2005 年 4 月,连续观察慢性风湿性心瓣膜病接受心瓣膜置换手术的患者 54 例,男 31 例,女 23 例,年龄 13~62(38.2±12.6)岁。其中二尖瓣置换 35 例,主动脉瓣置换 5 例,三尖瓣置换 3 例,二尖瓣并主动脉瓣联合置换 10 例,二尖瓣并三尖瓣联合置换 1 例。术前均无冠状动脉供血异常的表现。

患者均被告知并同意接受本研究观察。按入院奇偶序号分为 2 组,缺血预处理组 22 例,手术中建立体外循环后阻断循环 2 min、开放主动脉 3 min,然后再次阻断主动脉、冷晶体停搏液灌注心脏停跳和进行心脏瓣膜置换手术。对照组 32 例;按常规体外循环行心脏手术,不作缺血预处理。

手术前和手术后 7 d 作彩色多普勒超声心动图检查左心室射血分数(ejection factor, EF)和短轴缩短率(shortening factor, FS)。观察记录围术期心功能等情况。

1.2 心肌活检

2 组病例均在体外循环转流前和心脏再灌注血流动力学指标稳定 20 min,剪取适量未损伤的右心耳组织,用电子显微镜观察心肌细胞超微结构形态学变化,用免疫组化方法检测心肌细胞 CX43 蛋白表达水平(抗 CX43 多克隆抗体和荧光 CY3 试剂盒由博士德公司提供)。以德国

KONTRON IBAS 2.5 全自动图像分析系统和日本 JVC ky-F30B-CCD 彩色图像摄录输入仪进行图像分析。根据以下公式计算 CX43 表达阳性单位(PU)^[1]: $PU = 100 \times (G - G_A) / [(A_A \times G_{max}) - (1 - A_A) \times G_{min}]$ 。

1.3 统计分析

SPSS11.0 统计软件包处理。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用两独立样本的 t 检验和完全随机化设计的单因素方差分析(one-way ANOVA),离散型分类记数资料采用比较两样本率的 χ^2 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。分别作术前 2 组比较、术前后 2 组自身和分组比较的差值 t 检验。

2 结果

2.1 一般资料统计

全组无住院期死亡。比较 2 组间的年龄、体重、身高、术前纽约心功能分级(NYHA)、总住院时间、手术中主动脉阻断时间、心肺转流时间、最低鼻咽黏膜温度、抗心律失常药物使用人数比例等临床指标,差异无统计学意义 $P > 0.05$ 。缺血预处理组术中心脏自动复跳率,明显优于对照组 $P < 0.05$ (表 1)。

表 1 两组一般临床资料比较

Items	Ischemia(n=22)	Control(n=32)
Age(yr)	38.1±12.8	38.3±12.7
Body mass(kg)	53.2±8.2	55.5±9.8
Height(cm)	160.5±8.8	161.6±7.1
NYHA heart function pre-operation.	2.7±0.6	2.7±0.7
Length of stay(d)	24.3±6.7	30.7±16.1
Auto heart re-beat rate(%)	86.4 ¹⁾	78.1
Bypass time(min)	111.6±44.3	89.9±35.7
Aortic cross clamping time(min)	77.2±49.0	60.4±29.3
Lowest temperature of mucous membrane of nasopharynx ()	32.7±1.6	33.1±1.1
Antiarrhythmic drug given during op(%)	27.3 ¹⁾	53.1

1) Compared with control group $P < 0.05$

2.2 心肌细胞超微结构的电镜观察

缺血预处理组术后心肌细胞的线粒体膜基本完整,体嵴密集,电子密度高,无空泡形成,细胞连接结构的闰盘基本正常、连续,心肌纤维结构基本正常。对照组术后心肌细胞线粒体肿胀,膜结构模糊不清,破裂;线粒体嵴明显疏松溶解,大量空泡形成;闰盘结构不连接,断裂,崩解。心肌纤维坏死,挛缩,排列紊乱,肌丝Z线增宽,其它各结构带模糊,部分肌纤维断裂(图1)。

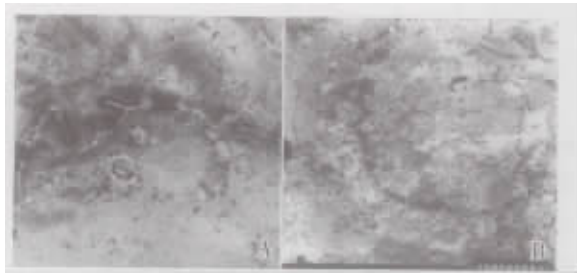


图 1 心肌细胞超微结构

Fig.1 Ultrastructure of myocardial cell ($\times 15\ 000$)

A: Integrity and consecutive intercalary disc post-operation in observation group; B: Interrupted and confused intercalary disc post-operation in control group

2.3 心肌细胞 CX43 蛋白阳性表达

缺血预处理组术前 CX43 表达(21.6 ± 8.2) PU, 术后(16.2 ± 4.4) PU, $P > 0.05$ 。心肌细胞膜和胞浆内的 CX43 棕褐色表达斑片状颗粒清楚。对照组术前 CX43 表达(26.6 ± 3.9) PU, 术后(11.9 ± 1.3) PU, $t = 8.074, P < 0.05$ 。心肌细胞膜和胞浆内 CX43 棕褐色斑片状颗粒不明显。术前 2 组间心肌细胞 CX43 表达无明显统计学差异($P > 0.05$); 术后 2 组心肌细胞 CX43 表达比较有显著性统计学差异($t = -2.181, P < 0.05$) (图 2)。



图 2 心肌细胞 CX43 蛋白表达

Fig.2 Expression of CX43 protein in myocardial cells (SABC $\times 400$)

A: Clear brown granula and patch of CX43 in myocardial cellular membrane and endochylema post-operation in IP group; B: Reduced and unclear brown granula and patch of CX43 in myocardial cellular membrane and endochylema post-operation in control group

2.4 术前后超声心动图检查

手术前 2 组左心室射血分数 (63.8 ± 9.7 vs 63.7 ± 7.3) 和短轴缩短率 (35.8 ± 7.5 vs 34.8 ± 4.9) 比较无明显差异 $P > 0.05$ 。缺血预处理组手术后左心室射血分数和短轴缩短率与术前比较无显著性变化 (63.8 ± 9.7 vs 63.5 ± 10.4) ($P > 0.05$), 对照组手术前后的左心室射血分数 (63.7 ± 7.3 vs 58.0 ± 8.8) ($t = 2.707, P < 0.05$), 短轴缩短率 (34.8 ± 4.9 vs 30.5 ± 5.8) ($t = 3.063, P < 0.05$) 均有降低; 缺血预处理组术后的左心室短轴缩短率明显高于对照组 ($t = 2.206, P < 0.05$), 左心室射血分数绝对值高于对照组 ($t = 1.864, P = 0.069 > 0.05$)。

3 讨论

心肌细胞缺血/再灌注损伤的亚细胞成分和超微结构改变是术后心律失常和心功能恢复不良等问题的基础,倍受临床关注。单次或多次短时间缺血/再灌注的心脏缺血预处理可以使组织产生更长时间的对缺血/再灌注损伤的耐受性,减少不可逆性的损伤。研究认为 CX43 蛋白是细胞连接装置闰盘的重要通道蛋白。由蛋白激酶引导的 CX43 磷酸化影响了通道的传导和通透性。在持续的缺血状态下, CX43 脱磷酸化,引起心肌细胞间的电失耦联。缺血预处理能使这种 CX43 脱磷酸化和细胞间的电失耦联终止。杂合子 CX43 缺乏鼠的研究发现,缺血预处理对其心肌保护作用完全丧失。分离的杂合子 CX43 缺乏鼠心肌细胞对缺血预处理后缺血/再灌注的保护作用丧失^[2]。一般认为,缺血预处理保护作用的重要细胞元素是半通道,但是, CX43 蛋白如何介导保护机制仍不清楚^[3]。

本研究显示,心脏瓣膜置换手术中给予改良的缺血预处理,在其第一相保护期就维持了心肌细胞膜和胞浆内 CX43 蛋白的表达水平,保护了心肌细胞线粒体和闰盘等超微膜结构,减少了心肌缺血/再灌注损伤,有利于心脏瓣膜置换术后心功能的稳定和恢复。

细胞膜结构保护的首要部位是细胞线粒体。心肌细胞线粒体不但是产生和储存 ATP 的“动力工厂”;同时,它在调节细胞渗透压、钙稳态、pH 值和细胞信号转导等方面起重要的作用。研究认为,线粒体结构损伤直接与单个和群发性细胞凋亡启动有关,术后心肌细胞凋亡的发生将导致心脏收

缩功能抑制^[4]。显然,缺血预处理对细胞线粒体结构完整性的保护有利于心脏手术后心功能的稳定与恢复。Boengler等^[4]在离体兔2次5min的缺血/再灌注心脏实验中发现,心肌细胞线粒体内CX43蛋白水平分别快速增加262%和63%;由此可见,缺血预处理能增强心肌细胞线粒体内的CX43蛋白表达。Schulz等^[2]研究认为缺血预处理能增加CX43的共区域化缺血时的磷酸化。本研究结果提示,缺血预处理能维持整个心肌细胞膜和胞浆内的CX43蛋白表达,细胞器超微结构能得以保持基本完整。这提示经缺血预处理后,CX43介导的保护作用基础是直接保护细胞超微结构完整性。

细胞膜结构保护的另一重要部位是细胞间连接结构。一般认为,哺乳类动物心肌细胞缝隙连接结构闰盘是CX43蛋白的主要分布部位^[5],其表达和分布的异常表示细胞膜和细胞间连接结构的破坏与功能紊乱,是产生心脏手术后心律失常和心功能不全的形态学基础或高危因素^[6]。在新生鼠心肌细胞体外培养中发现,环磷酸腺苷(c-AMP)可使CX43蛋白表达明显上调,动作电位传导明显增快。CX43蛋白缺陷鼠的心肌细胞处于低水平电耦联,传导性下降60%^[7]。缺血心肌边缘的细胞间缝隙连接分布紊乱导致心电“折返环”出现^[8]。CX43蛋白再分布使心室肌细胞间电耦联发生改变。也有研究发现;随着培养时间的延长,心肌细胞CX43蛋白表达的荧光点数和面积增加、CX43蛋白磷酸化/非磷酸化比例增加有利于建立心肌同步收缩。可以认为,稳定以CX43蛋白为主的心肌细胞通道电耦联能维持心肌细胞同步收缩和心电正常节律,其直接的临床表现是心肌收缩功能稳

定和异常心电活动减少。

参考文献:

- [1] 申洪. 免疫组织化学染色定量方法研究() [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1995, 4(1):89-91.
- [2] SCHULZ R, GRES P, SKYSCHALLY A, et al. Ischemic preconditioning preserves connexin 43 phosphorylation during sustained ischemia in pig hearts in vivo [J]. FASEB J, 2003, 17(10):1355-1357.
- [3] SCHULZ R, HEUSCH G. Connexin 43 and ischaemic preconditioning [J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(2):335-344.
- [4] BOENGLER K, DODOMI G, RODRIGUEZ-SINOVAS A, et al. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning [J]. Cardiovasc Res, 2005, 67(2):234-244.
- [5] GROS D B, JONGSMA H J. Connexin in mammalian heart function [J]. Bioessays, 1996, 18(9):719-730.
- [6] PETERS N S. New insights into myocardial arrhythmogenesis: distribution of gap junctional coupling in normal, ischemic and hypertrophied human hearts [J]. Clin Sci (Lond), 1996, 90(6):447-452.
- [7] MORLEY G E, VAIDYA D, SAMIE F H, et al. Characterization of conduction in the ventricles of normal and heterozygous CX43 knockout mice using optical mapping [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 1999, 10(10):1361-1375.
- [8] PETERS N S. Myocardial gap junction organization in ischemia and infarction [J]. Microsc Res Tech, 1995, 31(5):375-386.

(编辑 黄小延)