

· 实验研究 ·

右美托咪定致家兔窦性心动过缓模型中心脏
窦房结 Cx45 和 Cx31.9 基因表达的变化

祝瑜 田磊 黄燕若 史静 钟毅 殷永强

【摘要】目的 观察右美托咪定致家兔窦性心动过缓模型中心脏窦房结中缝隙连接基因蛋白 Cx45 和 Cx31.9 表达量的变化,探讨右美托咪定致心脏传导减慢的作用是否与缝隙连接基因蛋白的表达量改变有关。**方法** 成年健康新西兰家兔 48 只,随机均分为三组,通过耳源静脉注射右美托咪定制备家兔窦性心动过缓模型。戊巴比妥钠基础麻醉后,迅速完成心电图、血压监测的基本操作。C 组持续泵注生理盐水, D1 组泵入右美托咪定 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 负荷量 10 min,持续泵注量 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 输入 50 min, D2 组泵入右美托咪定 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 负荷量 10 min,持续泵注量 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 输入 50 min,观察结束后迅速开胸取出心脏准确分离心脏窦房结组织,通过免疫组化法检测 Cx45、Cx31.9 蛋白平均光密度,通过实时荧光定量法检测 Cx45、Cx31.9 基因相对表达量变化。**结果** Cx45 基因相对表达量 D2 组明显多于 C、D1 组 ($P < 0.05$);蛋白平均光密度的改变与之一致;Cx31.9 基因相对表达量 D1 组比 C 组显著增加 ($P < 0.05$), D2 组与 C 组、D1 组与 D2 组差异无统计学意义,蛋白平均光密度的改变与之一致。**结论** 右美托咪定使家兔窦房结低导电性缝隙连接基因蛋白 Cx45、Cx31.9 的表达增加,缝隙连接基因蛋白表达的变化是导致窦房结区的传导速度减慢原因之一。

【关键词】 家兔;右美托咪定;窦房结;连接蛋白

Expression changes of cardiac sinus node Cx45, Cx31.9 on sinus bradycardia model caused by dexmedetomidine in rabbit ZHU Yu, TIAN Lei, HUANG Yanruo, SHI Jing, ZHONG Yi, YIN Yongqiang. College of Anesthesiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China
Corresponding author: ZHONG Yi, Email: 490173559@qq.com

【Abstract】Objective To investigate the changes of cardiac sinus node connexin 45 (Cx45), connexin 31.9 (Cx31.9) of gap junction in rabbits' sinus bradycardia model caused by dexmedetomidine, and to discuss whether the negative frequency and negative conduction caused by Dexmedetomidine are related to the expression changes of connexin. **Methods** Forty-eight healthy adult New Zealand rabbits were divided into three groups ($n = 16$). Sinus bradycardia rabbits were prepared by intravenous injecting Dexmedetomidine through ear vein. After rabbits were anesthetized by sodium pentobarbital, basic procedures were quickly completed in order to monitor MAP and ECG. Rabbits in group C were injected with normal saline. Rabbits in group D₁ were injected a loading dose of dexmedetomidine 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 10 min, and then continuously pumped 5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ for 50 min. Rabbits in group D₂ were pumped a loading dose of dexmedetomidine 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for 10 min, and then continuously pumped 30 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ for 50 min. After observation hearts were quickly removed and sinus node tissue was dissected. The average optical density of sinus node Cx45, Cx31.9 were detected by immunohistochemistry, and the genes expression were detected by real-time quantitative. **Results** Cx45 gene expression of group D₂ showed remarkable increase than groups C and D₁ ($P < 0.05$), there were no significant differences between groups D₁ and C, Cx45 average optical density change were consistent with the gene expression. Cx31.9 gene expression of group D₁ showed a more remarkable increase than group C ($P < 0.05$), there were no significant differences between groups D₂ and C, D₁ and D₂, Cx31.9 average optical density changes were consistent with the gene expression. **Conclusion** Dexmedetomidine increases the expression of low electrical conductivity Cx45, Cx31.9 of gap junction on rabbits' sinus node, which is one of the possibly reasons that slow down cardiac conduction velocity in sinus node.

【Key words】 Rabbits; Dexmedetomidine; Sinus node; Connexins

基金项目:贵州省科技厅省校合作计划项目(黔科合 LH 字 [2015]7438)

作者单位:550004 贵州医科大学麻醉学院(祝瑜、田磊、黄燕若、殷永强);贵州医科大学附属医院麻醉科(钟毅、史静)

通信作者:钟毅,Email:490173559@qq.com

右美托咪定广泛用于临床麻醉及 ICU 镇静,但有诱发窦性心动过缓的不良反,右美托咪定致心脏负性频率和负性传导的作用引心脏停搏的潜在

危险已有多篇文献报道^[1],目前研究可以明确的是右美托咪定通过抑制交感神经活动诱发迷走神经占优势及直接增加中枢迷走神经张力的情况下产生心内传导系统不良反应。心脏缝隙连接通道的连接蛋白(connexins, Cx)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^[2]。越来越多的研究证实,心脏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^[3]。本研究通过观察右美托咪定致家兔窦性心动过缓模型中窦房结 Cx45、Cx31.9 表达量的变化,探讨右美托咪定致心脏传导减慢的作用是否与缝隙连接蛋白的表达量改变有关。

材料与方 法

实验动物与分组 本实验经贵州医科大学动物伦理委员会审查批准实施。健康新西兰大白兔 48 只,雌雄各半,体重 1.5~2.8 kg,由贵州医科大学实验动物中心提供。48 只家兔分为随机分为三组($n=16$),对照组(C 组)持续泵注生理盐水 12 ml/kg;实验组(D₁、D₂ 组)通过耳源静脉注射右美托咪定制备家兔窦性心动过缓模型。小剂量组(D₁ 组)泵入右美托咪定 10 μg/kg 负荷量 10 min(批号:14030732),持续泵注剂量 5 μg·kg⁻¹·h⁻¹ 输入 50 min;大剂量组(D₂ 组)泵入右美托咪定 60 μg/kg 负荷量 10 min,持续泵注剂量 30 μg·kg⁻¹·h⁻¹ 输入 50 min。

实验方法 耳缘静脉注射戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉家兔。麻醉后将家兔仰卧位固定,四肢皮下插入针灸针电极连接 Cardiofax S 多道心电图机(ECG-1250C)监测心电活动,排除 ECG 异常的家兔。监测 SpO₂,行股动脉穿刺置管术,用于监测有创动脉压,接生物信号采集处理系统(BL-420 型)监测 MAP。

监测 实验全程使用生物信号采集处理系统监测 HR、MAP,于右美托咪定注射前(T₀)、右美托咪定注射后 15 min(T₁)、30 min(T₂)、60 min(T₃) 监测 HR、MAP。

家兔窦房结标本的取材 实验观察结束后使用 3% 戊巴比妥钠 15 mg/kg 经兔耳静脉缓慢推注加深麻醉,0.5% 的利多卡因局部麻醉浸润胸部,迅速开胸取出心脏置于盛有冰水混合的台氏液的小盘内,使心脏停跳,暴露出界嵴后再进一步细致修剪。实验窦房结组织标准取材的范围:上界高出腔耳角 2 mm,下界至下腔静脉下 2 mm,以在界嵴中

上部以界沟为中线取长 10 mm,宽 5 mm 的组织块,静脉窦侧 3mm,右心耳侧 2 mm。取下组织 8 例 RNA Later -4℃ 冰箱保存过夜后 -80℃ 冰箱保存待进行目的基因的实时荧光定量(RT-PCR)检测,组织 8 例 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋切片行免疫组织化学染色。

实验指标的检测 RT-PCR 检测家兔窦房结 Cx45、Cx31.9 基因相对表达量的变化,使用蛋白酶 K(瑞士罗氏 Roche 公司)二甲苯蓝 FF(美国 Sigma 公司),溴酚蓝钠盐(美国 Sigma 公司)迅速裂解细胞并灭活细胞内核酸酶,使用磁珠法 mRNA 提取试剂盒(美国 Ambion/Invitrogen 公司)提取窦房结组织中的分离纯化高质量 mRNA,第一链 cDNA 合成试剂盒(瑞士罗氏 Roche 公司)进行逆转录,荧光定量试剂盒(LightCycler 480 SYBR GREEN 1 Master,瑞士罗氏 Roche 公司)完成扩增反应。仪器设备为实时荧光 PCR 仪(CFX96,美国 Bio-Rad 伯乐公司),Bio-Rad CFX Manager 软件计算基因的相对表达量。扩增引物的序列由大连宝生物技术有限公司设计合成(表 1)。

表 1 目的基因扩增引物的序列

目的基因	引物序列	扩增长度 (bp)	退火温度 (°C)
Cx45	上游 5' ACCCAACCTAAAC-CCAAGCA 3'	111	58
	下游 5' CAGAAAGCCCACCTCAAACAC 3'		
Cx31.9	上游 5' GTCTCCCAGACG-CACTCATTC 3'	122	58
	下游 5' CACCATCCCCGTTTT-CAGTT 3'		
GAPDH	上游 5' TGGTGAAGGTCG-GAGTGAAC 3'	121	58
	下游 5' ATGTAGTGGAGGTC-AATGAATGG 3'		

注:GADPH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶

免疫组化染色及蛋白平均光密度分析 石蜡包埋切片经抗原修复后滴加一抗兔抗 Cx45 多克隆抗体 1:250,兔抗 Cx31.9 多克隆抗体 1:500(北京博奥森生物有限公司)50 μl 即可盖住标本,4℃ 一抗孵育过夜。第 2 天复温后二抗生物素标记的羊抗兔 IgG 孵育,二氨基联苯氨显色,苏木素复染,脱水封

片。缝隙连接蛋白免疫组化染色呈现清晰棕黄色颗粒,位于细胞膜上。每例切片 200 倍显微镜下随机选取的窦房结区 5 个阳性视野,用 Image-pro-plus6.0 图像分析系统,分别检测阳性细胞的积分光密度 IOD (Integral optical density,IOD)和 AOI (area of interest,AOI)面积,利用公式,求得平均光密度的值:IOD (sum)/Area (sum) = (mean) Optical Idensity。

统计分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各监测指标不同时点组内比较采用重复测量的方差分析,同一时间点不同分组进行组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 Bonferroni 法。

结 果

实验过程中 SpO₂ 均大于 90%,且每组抽取动脉血气 PaO₂ 用药前后均大于 65 mm Hg, SpO₂ 大于 95%。T₁~T₃ 时 D₁、D₂ 组的 MAP 明显低于,HR 明显慢于 C 组($P < 0.05$),且 D₂ 组 HR 明显慢于 D₁ 组($P < 0.05$)(表 2)。

D₂ 组 Cx45 基因相对表达量和蛋白平均光密度明显多于 C 和 D₁ 组($P < 0.05$);D₁ 组 Cx31.9 基因

相对表达量和蛋白平均光密度明显多于 C 组($P < 0.05$)(表 3)。

讨 论

高选择性 α₂ 肾上腺素受体激动药右美托咪定在临床研究及动物实验中均显示显著抑制窦房结和房室结功能^[4, 5],心率较基础心率下降 30%是家兔窦性心动过缓模型造模成功标准^[6]。本实验根据前期实验确定制备家兔窦性心动过缓模型的最低负荷剂量 10 μg/kg,6 倍最低剂量确定为高剂量组^[7]。

缝隙连接通道蛋白分布和数量的改变可导致相应部位心肌组织的传导速度及方向发生改变,引起各类心律失常的发生。大量文献显示不同类型的缝隙连接通道蛋白的导电性不同,其离子选择性和分子通透性亦不同。心内传导系统的缝隙连接蛋白 Cx40 和 Cx43 是高导电性的,Cx30 和 Cx45 是低导电性的,Cx30 的导电性较 Cx45 低^[3]。在传导速度慢的结区组织的两种缝隙连接蛋白 Cx30(家兔及人蛋白同源直系物为 Cx31.9)、Cx45 的导电性都较低,它们之间的电偶联可能也是比较低的,低导电性的缝隙连接蛋白可能传导方式相对慢且体

表 2 三组家兔给药过程中 MAP、HR 的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
MAP (mm Hg)	C 组	16	84±7	81±7	81±5	80±5
	D ₁ 组	16	84±8	59±9 ^a	67±7 ^a	62±7 ^a
	D ₂ 组	16	87±7	61±5 ^a	63±4 ^a	61±4 ^a
HR (次/分)	C 组	16	286±25	272±18	273±17	273±19
	D ₁ 组	16	285±19	195±24 ^a	206±16 ^a	241±23 ^a
	D ₂ 组	16	287±26	162±28 ^{ab}	165±24 ^{ab}	167±26 ^{ab}

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 D₁ 组比较,^b $P < 0.05$

表 3 三组家兔窦房结组织 Cx45、Cx31.9 基因相对表达量和蛋白平均光密度的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	Cx45	Cx31.9
基因相对表达量	C 组	8	6.91±6.99	1.86±1.29
	D ₁ 组	8	12.66±5.90	7.42±4.34 ^a
	D ₂ 组	8	27.98±7.40 ^{ab}	5.23±2.60
蛋白平均光密度	C 组	8	0.190 9±0.021 3	0.192 4±0.011 8
	D ₁ 组	8	0.182 6±0.033 4	0.281 4±0.017 6 ^a
	D ₂ 组	8	0.328 0±0.062 0 ^{ab}	0.201 9±0.060 8

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 D₁ 组比较,^b $P < 0.05$

表心电图的特点表现为传导时间延长^[8]。冲动传导慢的特定区域的窦房结和房室结只表达 Cx30 和 Cx45,低导性的缝隙连接蛋白表达量的增加是心脏结区组织传播速度缓慢的原因之一。

实验组的心率随药物剂量增加降低更显著,血压变化两实验组均比对照组显著降低,但两实验组间血压比较无显著差异。我们实验中从荧光 PCR 和免疫组化均检测到家兔心脏中有鼠 Cx30 蛋白同源直系物为 Cx31.9 的存在。右美托咪定致窦性心动过缓模型中窦房结组织中低导性 Cx45 在高剂量组增加显著,低导性 Cx31.9 在低剂量组增加显著,高剂量组无显著增加,以上两种缝隙连接蛋白基因相对表达量及蛋白平均光密度检测上的变化是一致的。低剂量组心率已较基础心率下降 30%,但无窦房阻滞和窦性停搏,Cx31.9 的表达量也显著增加,说明其参与窦房结的心率调节,Daniel Gros^[9]等的研究也发现鼠的 Cx30 参与窦房结心率的调节。随着药物剂量的增加 Cx31.9 没有出现显著的增加,而是增加了 Cx45 的表达来降低窦房结区的传导速度。

右美托咪定具有中枢及外周抗交感作用,近年来研究发现右美托咪定有直接兴奋迷走神经的作用^[10],影响自主神经的功能状态。心脏缝隙连接蛋白的表达受基因的调控,国外学者研究显示 Tbx5 和 Gata4 基因在传导系统的正确表达与传导系统功能相关,并调节心脏缝隙连接蛋白的表达^[11]。右美托咪定从哪方面引起心脏缝隙连接蛋白表达的改变还要做更深入的研究。

综上所述,右美托咪定使家兔窦房结低导电性缝隙连接基因蛋白 Cx45、Cx31.9 的表达量增加,缝隙连接基因蛋白表达的变化是导致窦房结区的传导速度减慢的原因之一。

参 考 文 献

- [1] Zhang X, Schmidt U, Wain JC, et al. Bradycardia leading to asystole during dexmedetomidine infusion in an 18 year-old double-lung transplant recipient. *J Clin Anesth*, 2010, 22 (1): 45-49.
- [2] Jansen JA, van Veen TA, de Bakker JM, et al. Cardiac connexins and impulse propagation. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48 (1): 76-82.
- [3] Lo CW. Role of gap junctions in cardiac conduction and development: insights from the connexin knockout mice. *Circ Res*, 2000, 87(5): 346-348.
- [4] Ergul Y, Unsal S, Ozyilmaz I, et al. Electrocardiographic and electrophysiologic effects of dexmedetomidine on children. *Pacing Clin Electrophysiol*, 2015, 38: 682-687.
- [5] 殷永强, 钟毅, 高鸿, 等. 右美托咪定对家兔窦房结和房室结功能的影响. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(4): 383-386.
- [6] Liu RX, Wang YL, Li HB, et al. Comparative study between original and traditional method in establishing a chronic sinus node damage model in rabbit. *J Appl Physiol* (1985), 2012, 113(11): 1802-1808.
- [7] 钟毅, 殷永强, 祝瑜, 等. 右美托咪定对家兔心率的影响: 离体和体实验. *中华麻醉学杂志*, 2015, 35: 1061-1064.
- [8] Kreuzberg MM, Schrickel JW, Ghanem A, et al. Connexin30.2 containing gap junction channels decelerate impulse propagation through the atrioventricular node. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(15): 5959-5964.
- [9] Gros D, Théveniau-Ruissy M, Bernard M, et al. Connexin 30 is expressed in the mouse sino-atrial node and modulates heart rate. *Cardiovasc Res*, 2010, 85(1): 45-55.
- [10] Sharp DB, Wang X, Mendelowitz D. Dexmedetomidine decreases inhibitory but not excitatory neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. *Brain Res*, 2014, 1574: 1-5.
- [11] Munshi NV, McAnally J, Bezprozvannaya S, et al. Cx30.2 enhancer analysis identifies Gata4 as a novel regulator of atrioventricular delay. *Development*, 2009, 136(15): 2665-2674.

(收稿日期:2016-10-15)