

白藜芦醇降低大鼠心肌梗死后室性心律失常的研究

王光宇 祝晓红 朱乔燕 张庆勇 魏 盟

【摘要】 目的:探讨白藜芦醇对大鼠心肌梗死(myocardial infarction, MI)后室性心律失常的影响及可能机制。方法:将成功建立心肌梗死模型的 24 只 SD 大鼠随机分为 MI 组($n=12$)和白藜芦醇组($n=12$),另设假手术组($n=12$),其中白藜芦醇组给予白藜芦醇 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃,MI 组和假手术组给予 5% 羧甲基纤维素钠灌胃。4 周后,所有大鼠行电生理检查;ELISA 法检测血清白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平;免疫组化和 Western blot 检测心肌缝隙连接蛋白 43(Cx43)表达水平。结果:与假手术组相比,MI 组室性心律失常的诱发率明显增加,心室颤动阈值显著降低,血清 IL-1 β 、TNF- α 水平明显增加,Cx43 表达水平显著降低($P<0.05$);与 MI 组相比,白藜芦醇组心律失常诱发率显著降低,心室颤动阈值增加,血清 IL-1 β 、TNF- α 水平明显降低,Cx43 表达明显增加($P<0.05$),但白藜芦醇不能使上述指标恢复到假手术组水平($P<0.05$)。结论:白藜芦醇可有效降低大鼠心肌梗死后室性心律失常的发生,其机制可能与提高心肌 Cx43 表达,降低炎症反应有关。

【关键词】 心肌梗死;心律失常;缝隙连接蛋白 43;白藜芦醇

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2015.04.015

Effect of resveratrol treatment on ventricular arrhythmias in rats after myocardial infarction WANG Guangyu, ZHU Xiaohong, ZHU Qiaoyan, ZHANG Qingyong, WEI Meng. Department of Cardiology, the Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effect of resveratrol on ventricular arrhythmias in rats after myocardial infarction and the potential mechanisms. **Methods:** Twenty-four SD rats were randomly divided into myocardial infarction group ($n=12$) and resveratrol group ($n=12$) after successful establishment of myocardial infarction, and another 12 rats served as sham operation group which were not ligated in the same part of heart. Resveratrol group was given a dose of $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ resveratrol, while MI group and sham group received 5% sodium carboxymethyl cellulose gavage. Four weeks after MI, electrophysiologic examinations were conducted. Immunohistochemistry and Western blot were used to determine the expression of connexin43(Cx43), and the levels of interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α were detected by ELISA. **Results:** Compared with sham operation group, the expression of Cx43 were remarkably lower, the levels of IL-1 β and TNF- α were much higher, and the prevalence of ventricular arrhythmias was significantly higher in MI group, with lower threshold of ventricular fibrillation ($P<0.05$ for all). Compared with MI group, the expression of Cx43 were remarkably higher, the levels of IL-1 β and TNF- α were much lower, and the prevalence of ventricular arrhythmias was significantly lower in resveratrol group, with higher threshold of ventricular fibrillation ($P<0.05$ for all). However, there were still significant differences in these parameters between resveratrol group and sham operation group ($P<0.05$). **Conclusion:** Resveratrol can effectively reduce

基金项目:上海市科学技术委员会基金项目(13ZR1431500)

作者单位:200233 上海市第六人民医院心内科(王光宇,朱乔燕,张庆勇,魏 盟);251500 山东省德州市临邑县人民医院内分泌代谢科(祝晓红)

通信作者:张庆勇,Email: Zhang_qingyong71@hotmail.com

the incidence of ventricular arrhythmias in rats with myocardial infarction, possibly by improving the expression of cardiac Cx43 and reducing inflammatory reaction.

【Key words】 Myocardial infarction; Arrhythmias; Connexin43; Resveratrol

心肌梗死(myocardial infarction, MI)后心律失常和心脏猝死的发生风险约为正常人群的 4 倍^[1]。恶性心律失常是继发于心肌传导速度降低,伴随梗死边界折返性途径形成^[2-3]。在心肌闰盘处,缝隙连接蛋白 43(connexin43, Cx43)组成的缝隙连接通道具有低电阻、高传速的特性,介导心肌细胞电信号和化学信号的传递^[2]。MI 后心肌细胞 Cx43 表达降低,室性心律失常的发生率也明显增加^[4-5]。

白藜芦醇是植物产生的一种多酚类化合物,富含于葡萄皮和红酒中^[6]。白藜芦醇具有抗动脉粥样硬化、抗炎、抗氧化和抗血小板聚集等作用^[6-7]。基础研究证实,白藜芦醇可以减少 MI 后心律失常的发生^[8-10]。本研究通过建立大鼠 MI 模型,探讨白藜芦醇减少 MI 后室性心律失常的作用及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

白藜芦醇购自 Sigma 公司,BCA 蛋白定量试剂盒、组织裂解液购自碧云天公司,白细胞介素(IL)-1 β 、肿瘤坏死因子(TNF)- α 检测试剂盒购自博士德公司,Cx43、GAPDH 抗体购自 CST 公司,稀释比为 1:1000,二抗购自 Epitomics 公司,稀释比 1:4000。

1.2 MI 模型的建立

健康雄性 SD 大鼠由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,体质量 200~250 g。用 5% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,背位固定,行气管切开并连接到微型动物呼吸机(ALC-V8, 上海奥尔科特生物科技有限公司),使用 GE Pruka Mac-Lab2000 心电生理工作站实时记录常规肢体导联及 V1、V3、V6 胸前导联心电图。于大鼠胸骨左缘第 3~4 肋间开胸,暴露心脏,剪开心包膜,于左心耳及肺动脉圆锥之间距左心耳下缘 1~2 mm 处穿线(6/0 丝线)结扎冠状动脉左前降支以建立 MI 模型。造模成功的标志为心电图 II 导联 J 点明显抬高,结扎线以下心肌组织颜色由正常变苍白。

1.3 实验分组

将大鼠随机分为 3 组。假手术组($n=12$):在相同位置只挂线不结扎; MI 组($n=12$):经上述步骤建立 MI 模型; 白藜芦醇组($n=12$):造模成功 24 h 后,白藜芦醇 10 mg/(kg·d)溶于羧甲基纤维素钠

中灌胃给药。MI 组及假手术组给予 5% 羧甲基纤维素钠灌胃。4 周后进行电生理检查。

1.4 电生理检查

麻醉大鼠后,气管切开连接呼吸机。开胸后在心尖处与心肌表面 45° 角斜行刺入心室电极,以同样方法在距离第 1 个穿刺位点 2~3 mm 处置入另一根心室电极,两根电极分别连接放大器输出端端口,程序刺激仪心室电极正极和负极则连接放大器输入端对应端口,完成心室电极的置入。将心室电极与心脏电生理仪(XD22A 型电生理刺激仪改良型)连接完毕后,启动电生理刺激仪,刺激部位选择心室,刺激强度为舒张期阈值的 2 倍,S1S1 间期为 100 ms,8 个 S1 后依次发放 2 个期前刺激(S2、S3),从最后一个刺激开始,期前刺激每次递减 2 ms,直至 S2 出现不应期。终点事件为连续出现 ≥4 个室性期前收缩或室性心动过速(室速)、心室颤动(室颤)的发生。

另设 S1S1 间期为 70 ms,每次定数刺激 10 次,强度从 1 V 开始,每串刺激后强度递增 0.5 V,以引起室颤的最低强度为室颤阈值。

电生理检查完毕,自主动脉取血,离心后留上清,置于 -80 °C 冰箱中保存,用于血清 TNF- α 、IL-1 β 水平检测。剪取动物心脏,一部分置于 4% 的多聚甲醛中固定,进行免疫组化,另一部分用于 Western blot。

1.5 血清 TNF- α 、IL-1 β 水平检测

将血清从 -80 °C 中取出,按照试剂盒使用说明进行 TNF- α 、IL-1 β 的检测。

1.6 免疫组织化学

将心脏组织制作成 3 μ m 厚石蜡切片,常规脱蜡、复水,用 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化酶活性等过程,用兔抗大鼠的 Cx43 一抗在 37 °C 恒温箱中孵育 1 h,冲洗后加入羊抗兔二抗进行孵育,加入底物显色 5 min,蒸馏水冲洗终止显色,苏木素复染核,常规脱水、透明及封片。用 Image-Pro Plus 4.0 分析软件进行 Cx43 染色强度分析。以总的 Cx43 染色面积与整张切片面积的比值作为每张切片的染色强度($\mu\text{m}^2/\text{mm}^2$)。

1.7 Western blot

提取心肌蛋白样本,采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,调至等浓度后加入上样缓冲液混

合,离心后上样。恒压 80 V 电泳,30 min 后改为恒压 120 V 至电泳结束。将蛋白转至 PVDF 膜上(恒流 250 mA,4 ℃ 转膜 2 h),用 5% 脱脂奶粉室温封闭 3 h,加入相应一抗在摇床上 4 ℃ 孵育过夜,0.1% TBST 洗膜 3 次后加相应二抗室温孵育 2 h,洗膜后显色,使用凝胶成像系统拍照分析,计算各条带 OD 值,以靶蛋白与内参蛋白的 OD 值比值代表蛋白的相对表达量。

1.8 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间发生率的比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



图 1 各组室性快速心律失常的诱发

表 1 各组室性快速心律失常诱发率及室颤阈值的比较

组别	室性快速心律失常/%	室颤阈值/V
假手术组	8.3	7.8 ± 0.2
MI组	83.3 ⁽¹⁾	3.3 ± 0.3 ⁽¹⁾
白藜芦醇组	41.7 ⁽¹⁾⁽²⁾	4.3 ± 0.3 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:与假手术组相比,⁽¹⁾ $P < 0.05$;与 MI 组相比,⁽²⁾ $P < 0.05$

2.3 各组血清 TNF- α 和 IL-1 β 的比较

与假手术组相比,MI 组 TNF- α 和 IL-1 β 水平明显升高;白藜芦醇组 TNF- α 和 IL-1 β 水平较 MI 组明显降低,但仍比假手术组高($P < 0.05$,见表 2)。

2.4 心肌 Cx43 表达

免疫组化显示,与假手术组相比,MI 组 Cx43

2 结果

2.1 各组 QTc 间期的比较

与假手术组相比,MI 组大鼠 QTc 间期明显延长,为 (135.64 ± 6.33) ms 对 (115.67 ± 2.04) ms ($P < 0.05$);与 MI 组比较,白藜芦醇组 QTc 间期明显缩短,为 (114.17 ± 3.52) ms 对 (135.64 ± 6.33) ms ($P < 0.05$)。

2.2 室性快速心律失常的诱发率和室颤阈值

MI 组室性快速心律失常诱发率达 83.3%,较其他各组明显升高($P < 0.05$)。白藜芦醇组诱发率为 41.7%,较 MI 组明显降低($P < 0.05$)。MI 组室颤阈值较假手术组明显降低,白藜芦醇组室颤阈值较 MI 组明显升高($P < 0.05$,见图 1 及表 1)。

表达明显降低;白藜芦醇组 Cx43 表达较 MI 组显著提高,但低于假手术组($P < 0.05$,见图 2)。Western blot 显示,与假手术组相比,MI 组 Cx43 表达明显降低;白藜芦醇组 Cx43 表达较 MI 组显著提高,但低于假手术组($P < 0.05$,见图 3)。

表 2 各组 TNF- α 和 IL-1 β 的比较/ $\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$

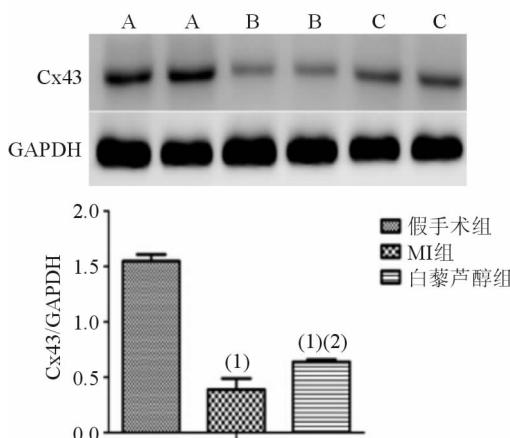
组别	TNF- α	IL-1 β
假手术组	187 ± 22	68 ± 7
MI组	681 ± 62 ⁽¹⁾	225 ± 18 ⁽¹⁾
白藜芦醇组	218 ± 13 ⁽¹⁾⁽²⁾	152 ± 12 ⁽¹⁾⁽²⁾

注:与假手术组相比,⁽¹⁾ $P < 0.05$;与 MI 组相比,⁽²⁾ $P < 0.05$



注:A、B、C 依次为假手术组、MI 组和白藜芦醇组 Cx43 免疫组化染色($\times 40$),D 为 Cx43 染色强度柱状图;与假手术组相比,⁽¹⁾ $P < 0.05$;与 MI 组相比,⁽²⁾ $P < 0.05$;棕黄色颗粒表示阳性染色

图 2 免疫组织化学法检测心肌 Cx43 表达



注: A、B、C 依次为假手术组、MI 组和白藜芦醇组;与假手术组相比,⁽¹⁾ $P<0.05$;与 MI 组相比,⁽²⁾ $P<0.05$

图 3 各组心肌 Cx43 蛋白表达水平的比较

3 讨论

恶性心律失常是 MI 后患者死亡最主要的原因。MI 后致命性心律失常的发生机制尚未阐明。研究表明,MI 后电信号传导速度下降,梗死边界形成折返环路^[2-3]。在梗死边界处传导速度降低更加明显,而且与心肌细胞 Cx43 表达减少相关。Cx43 是存在于心肌闰盘处的一种缝隙连接蛋白,其组成的缝隙连接通道具有低电阻特性,提高了相邻细胞间物质交换及电信号传导的效率^[2]。研究显示,MI 后心肌细胞 Cx43 表达降低且排列紊乱,Cx43 从心肌闰盘处向细胞侧面分布,导致心肌发生电重构,电传导速度下降^[4-5]。采用转基因技术提高梗死边界 Cx43 表达,可以显著减少心律失常的发生^[11]。

结果显示,MI 后的炎症反应也参与心律失常的发生,MI 患者应用抗炎药物后心律失常和心脏猝死风险明显降低^[12]。MI 可引起机体剧烈的炎症反应,释放大量炎症因子,如 IL-1 β 、TNF- α 等,炎症因子不仅损伤心肌细胞,同时可影响电生理重构。研究表明,炎症因子可通过抑制 Cx43 表达降低传导速度,进而诱发心律失常^[13-14]。本研究发现,MI 大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平显著提高,Cx43 水平显著下降,免疫组化结果也提示心肌 Cx43 分布紊乱,排列极不规则。电生理实验显示,大鼠 MI 4 周后,QTc 间期延长,提示心肌复极离散度增加,且室性心律失常的诱发率增加,室颤阈值降低。

白藜芦醇具有抗炎、抗氧化、抗血小板聚集、抗心律失常等作用^[6-9]。基础研究证实,白藜芦醇可以减少 MI 后心律失常的发生^[8-10]。本研究发现,白藜芦醇组心律失常的诱发率明显比 MI 组低,而且室

颤阈值显著性提高。进一步检测发现,与 MI 组相比,白藜芦醇组血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平显著下降,Cx43 表达水平显著提高,分布也较 MI 组明显改善。

本研究证实,MI 后长期服用白藜芦醇可以显著降低心律失常的发生,提高室颤阈值,其机制与心肌 Cx43 水平提高、抑制炎症反应密切相关。白藜芦醇调控 Cx43 表达升高的具体机制,以及是否存在其他抗心律失常信号通路需要进一步研究。

参 考 文 献

- Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics—2015 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2015, 131(4): e29-e322.
- Peters NS, Coromilas J, 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(4): 988-996.
- Verma A, Marrouche NF, Schweikert RA, et al. Relationship between successful ablation sites and the scar border zone defined by substrate mapping for ventricular tachycardia post-myocardial infarction [J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2005, 16(5): 465-471.
- Gu Y, Wu G, Wang X, et al. Artemisinin prevents electric remodeling following myocardial infarction possibly by upregulating the expression of connexin 43 [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(4): 1851-1856.
- Rutledge CA, Ng FS, Sulkin MS, et al. c-Src kinase inhibition reduces arrhythmia inducibility and connexin43 dysregulation after myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(9): 928-934.
- Husken A, Baumert A, Milkowski C, et al. Resveratrol glucoside (Picied) synthesis in seeds of transgenic oilseed rape (*Brassica napus L.*) [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111(8): 1553-1562.
- Bhat KPL, Kosmeder JW 2nd, Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol [J]. Antioxid Redox Signal, 2001, 3(6): 1041-1064.
- Xin P, Pan Y, Zhu W, et al. Favorable effects of resveratrol on sympathetic neural remodeling in rats following myocardial infarction [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 649(1-3): 293-300.
- Li W, Wang YP, Gao L, et al. Resveratrol protects rabbit ventricular myocytes against oxidative stress-induced arrhythmogenic activity and Ca²⁺ overload [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(9): 1164-1173.
- Chen YR, Yi FF, Li XY, et al. Resveratrol attenuates ventricular arrhythmias and improves the long-term survival in rats with myocardial infarction [J]. Cardiovasc Drugs

- Ther, 2008, 22(6): 479-485.
- [11] Greener ID, Sasano T, Wan X, et al. Connexin43 gene transfer reduces ventricular tachycardia susceptibility after myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2012, 60(12): 1103-1110.
- [12] Doi M, Nosaka K, Miyoshi T, et al. Early eicosapentaenoic acid treatment after percutaneous coronary intervention reduces acute inflammatory responses and ventricular arrhythmias in patients with acute myocardial infarction: a randomized, controlled study [J]. Int J Cardiol, 2014, 176 (3): 577-582.

(上接第 263 页)

- [3] Chen YL, Wu XM, Yu SS, et al. Neuroprotective capabilities of Tanshinone II A against cerebral ischemia/reperfusion injury via anti-apoptotic pathway in rats[J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35(2):164-170.
- [4] Yan MY, Chien SY, Kuo SJ, et al. Tanshinone II A inhibits BT-20 human breast cancer cell proliferation through increasing caspase 12, GADD153 and phospho-p38 protein expression[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(5):855-863.
- [5] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2012, 298: 229-317.
- [6] 李上海, 梁伟钧, 孙炎华, 等. 缺血预处理对心肌缺血再灌注诱发凋亡的保护机制[J]. 国际心血管病杂志, 2014, 41(1): 48-50.
- [7] Wu B, Lin R, Dai RZ, et al. Valsartan attenuates oxidative stress and NF- κ B activation and reduces myocardial apoptosis after ischemia and reperfusion[J]. Eur J Pharmacol, 2013, 705(1-3):140-147.
- [8] Sehirli O, Tozan A, Omurtag GZ, et al. Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2008, 71(1):301-308.

- [13] Baum JR, Long B, Cabo C, et al. Myofibroblasts cause heterogeneous Cx43 reduction and are unlikely to be coupled to myocytes in the healing canine infarct [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012, 302(3): H790-H800.
- [14] Lindsey ML, Escobar GP, Mukherjee R, et al. Matrix metalloproteinase-7 affects connexin-43 levels, electrical conduction, and survival after myocardial infarction [J]. Circulation, 2006, 113(25): 2919-2928.

(收稿:2014-12-29 修回:2015-06-05)

(本文编辑:梁英超)

- [9] Aldakkak M, Camara AK, Heisner JS, et al. Ranolazine reduces Ca²⁺ overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts[J]. Pharmacol Res, 2011, 64(4): 381-392.
- [10] Montecucco F, Lenglet S, Braunersreuther V, et al. Single administration of the CXC chemokine-binding protein Evasin-3 during ischemia prevents myocardial reperfusion injury in mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(7):1371-1377.
- [11] Inafuku H, Kuniyoshi Y, Yamashiro S, et al. Determination of oxidative stress and cardiac dysfunction after ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts[J]. Ann Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 19(3): 186-194.
- [12] Guan WW, Wang Z, Liu YK, et al. Protective effects of tirofiban on ischemia/reperfusion-induced renal injury in vivo and in vitro[J]. Eur J Pharmacol, 2015, 761:144-152.
- [13] Tsutsui H, Kinugawa S, Matsushima S. Oxidative stress and heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301 (6):H2181-H2190.

(收稿:2015-01-19 修回:2015-06-05)

(本文编辑:梁英超)