

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.11.011

右美托咪定诱导家兔心动过缓窦房结缝隙连接 基因蛋白 *Cx45* 和 *Cx31.9* 表达研究

田友芳¹, 吴江², 宋伟¹, 胡兵¹, 姚猛飞^{2△}

(1. 福建省漳州正兴医院第二手术室, 福建 漳州 363000; 2. 中国人民解放军第一七五医院麻醉科, 福建 漳州 363000)

摘要:目的 探讨右美托咪定诱导家兔心动过缓是否与窦房结缝隙连接基因蛋白 *Cx45* 和 *Cx31.9* 表达变化有关。方法 将36只8周龄健康家兔分为3组,各12只,均通过耳缘静脉注射构建家兔心动过缓模型。巴比妥钠麻醉后,进行心电图、血压监测。A组持续注射生理盐水15 mL/kg;B组注射右美托咪定20 µg/kg 负荷量10 min,10 µg/(kg·h)持续注射50 min;C组注射右美托咪定80 µg/kg 负荷量10 min,40 µg/(kg·h)持续注射50 min。观察3组家兔平均动脉压(MAP)和血液流变(HR)变化情况,记录数据后解剖,取出家兔心脏,分离窦房结组织,通过免疫组化和荧光定量PCR检测 *Cx45* 和 *Cx31.9* 的表达水平。结果 *Cx45* mRNA表达水平,A组高于B组,B组高于C组($P < 0.05$);*Cx31.9* mRNA表达水平,B组高于A组($P < 0.05$),C组与B组无明显差异($P > 0.05$);*Cx45* 和 *Cx31.9* 的蛋白表达变化趋势与mRNA一致。结论 右美托咪定诱导家兔心动过缓,导致窦房结缝隙连接基因蛋白 *Cx45* 和 *Cx31.9* 表达升高。

关键词:右美托咪定;心动过缓;窦房结缝隙连接基因;*Cx45*;*Cx31.9*;家兔

中图分类号:R965.2;R971+.2

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)11-0037-03

Expression of Sinoatrial Node Gap Junction Gene Proteins *Cx45* and *Cx31.9* Under Dexmedetomidine - Induced Bradycardia in Rabbits

TIAN Youfang¹, WU Jiang², SONG Wei¹, HU Bing¹, YAO Mengfei²

(1. The Second Operating Room, Zhangzhou Zhengxing Hospital, Zhangzhou, Fujian, China 363000; 2. Department of Anesthesiology, The 175th Hospital of PLA, Zhangzhou, Fujian, China 363000)

Abstract:Objective To investigate whether dexmedetomidine-induced bradycardia in rabbits is associated with the expression of sinoatrial node gap junction gene proteins *Cx45* and *Cx31.9*. **Methods** Totally 36 8-week-old healthy rabbits were divided into three groups, 12 rabbits in each group. The rabbit models with bradycardia were established by the marginal ear vein injection. After anesthesia with barbitol sodium, electrocardiogram and blood pressure monitoring were performed. Group A was continuously injected with 15 mL/kg normal saline, group B was injected with 20 µg/kg loading dose of dexmedetomidine for 10 min and continuous injection with 10 µg/(kg·h) for 50 min, and group C was injected with 80 µg/kg loading dose of dexmedetomidine for 10 min and continuous injection with 40 µg/(kg·h) for 50 min. The changes in mean arterial pressure (MAP) and hemorheology (HR) were observed in the three groups. After recording the data, the rabbit hearts were removed, and the sinoatrial node tissues were isolated. The expression levels of *Cx45* and *Cx31.9* were detected by immunohistochemistry and quantitative fluorescence PCR. **Results** The expression level of *Cx45* in group A was higher than that in group B, and that in group B was higher than that in group C ($P < 0.05$). The expression level of *Cx31.9* mRNA in group B was higher than that in group A ($P < 0.05$), but there was no significant difference between group C and group B ($P > 0.05$). The change trend of protein expression of *Cx45* and *Cx31.9* was consistent with that of mRNA. **Conclusion** Dexmedetomidine-induced bradycardia in rabbits can cause increased expression of sinoatrial node gap junction gene proteins *Cx45* and *Cx31.9*.

Key words: dexmedetomidine; bradycardia; sinoatrial node gap junction gene; *Cx45*; *Cx31.9*; rabbits

心动过缓又称心率过缓,是心律失常的一种类型。成人的正常心率是60~100次/分,而心率过缓是指心率低于60次/分,当低于45次/分时,常见临床表现有头晕、倦怠、乏力和精神不好等。目前,治疗心动过缓如纠正可逆转的原发病因及药品不良反应影响后,仍不可逆时,需植入心脏起搏器。右美托咪定是一种 α_2 肾上腺素受体激动剂,具有中枢性抗交感作用,产生良好的镇静作用,临床常用于全身麻醉的

手术患者气管插管和机械通气时的镇静;另外,对呼吸无抑制,能保护患者心、肾、脑等器官功能,具有镇痛、抗焦虑作用^[1]。本研究中用右美托咪定注射3组健康家兔,通过实验检测窦房结缝隙连接基因蛋白 *Cx45* 和 *Cx31.9* 表达变化情况。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器

仪器型号和厂家详见表1。

第一作者:田友芳,大学本科,主治医师,研究方向为老年麻醉学,(电子信箱)369629210@qq.com。

△通信作者:姚猛飞,大学本科,主治医师,研究方向为老年麻醉和神经阻滞,(电子信箱)369629210@qq.com。

表1 仪器型号和厂家

仪器名称	型号	检测精度	生产厂家/品牌
生物信号采集处理系统	MD3000	0.5% (F.S)	安徽正华生物仪器设备有限公司
bio-rad 凝胶成像仪	1708195	1360 × 1024	Bio-Rad
电泳仪	1645050		Bio-Rad
电泳槽	1658001		Bio-Rad
逆转录PCR仪	C1000		Bio-Rad
实时荧光定量PCR仪	CFX96 Touch	±0.2 °C	Bio-Rad

1.2 动物与分组

8周龄健康家兔,36只,雌雄各半,体质量2~3 kg,购于漳州正兴医院动物实验中心,在动物中心无菌条件下饲养,本实验由漳州正兴医院动物伦理委员会审核并通过。随机分为3组,各12只。对照组(A组)持续注射生理盐水15 mL/kg,作为空白对照;B组注射盐酸右美托咪定注射液(江苏恩华药业股份有限公司,国药准字H20090248,规格为每支2 mL:200 μg)20 μg/kg 负荷量10 min,10 μg/(kg·h)持续注射50 min;C组注射右美托咪定80 μg/kg 负荷量10 min,40 μg/(kg·h)持续注射50 min。

1.3 方法

采用司可巴比妥钠(北京益民药业有限公司,国药准字H11020900,规格为每支50 g)30 mg/kg 麻醉家兔后仰卧固定,四肢插入针灸电极监测心电活动,排除心电图(ECG)异常家兔,采用生物信号采集处理系统分别于右美托咪定注射前(T_0),注射后15 min(T_1),30 min(T_2),60 min(T_3)监测心率(HR)和平均动脉压(MAP)。当B组和C组家兔的检测指标与A组出现显著差异,即与正常心率相比,B组和C组心率下降30%视为建模成功,继续进行后续实验。实验观察结束后加深麻醉,迅速开胸,取出心脏置于有台氏液(现配现用)的托盘内,分离窦房结组织。每组6只提取总RNA和总蛋白,进行蛋白免疫印迹杂交(WB)、实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测Cx45和Cx31.9的mRNA表达水平;6只用甲醛固定,石蜡包埋,切片,进行免疫组化(IHC)染色,每只切片取3个视野,计算平均光密度,即为Cx45和Cx31.9蛋白表达水平。其中,RT-PCR的引物序列见表2。

表2 目的基因扩增引物序列

目的基因	引物序列	扩增长度(bp)	退火温度(°C)
Cx45	上游 AAGATCTGGCTCACTGTGCT	208	58
	下游 ACATCAGAGAGGAGTTGCA		
Cx31.9	上游 AGGACGAGCAAGAGGAGTTC	157	58
	下游 TGCATGGACTAGACGACGA		
GAPDH	上游 GGGTCCCAGCTTAGTTTCAT	248	58
	下游 CATTCTCGCCCTTGACTGTG		

1.4 统计学处理

采用SPSS 22.0统计学软件分析。计量资料用 $\bar{X} \pm s$ 表示,行t检验;不同时点组内比较采用重复测量的方差分析,同时点组间比较行单因素方差分析,两两比较采用Bonferroni法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 给药过程中HR和MAP比较

T_0 时,3组组间HR和MAP比较,差异无统计学意义($P > 0.05$), $T_1 \sim T_3$ 时,B组、C组的HR和MAP显著低于A组($P < 0.05$);C组的HR明显慢于B组($P < 0.05$);B组、C组的MAP差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见表3。

表3 3组家兔给药过程中HR和MAP比较($\bar{X} \pm s, n = 12$)

指标	组别	T_0	T_1	T_2	T_3
MAP(mmHg)	A组	83 ± 6	80 ± 5	80 ± 6	79 ± 5
	B组	83 ± 7	58 ± 6 ^a	63 ± 8 ^a	61 ± 5 ^a
	C组	85 ± 7	61 ± 7 ^a	64 ± 5 ^a	60 ± 6 ^a
HR(次/分)	A组	284 ± 21	271 ± 18	274 ± 21	275 ± 24
	B组	282 ± 25	193 ± 23 ^a	204 ± 19 ^a	223 ± 20 ^a
	C组	287 ± 18	158 ± 15 ^{ab}	163 ± 17 ^{ab}	164 ± 16 ^{ab}

注:与A组相比,^a $P < 0.05$;与B组相比,^b $P < 0.05$ 。下表同。

2.2 RT-PCR验证3组家兔窦房结组织Cx45和Cx31.9基因表达水平

Cx45 mRNA表达,A组<B组<C组,3组两两比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);Cx31.9 mRNA表达水平,B组高于A组($P < 0.05$),C组与B组差异无统计学意义($P > 0.05$)。详见图1。

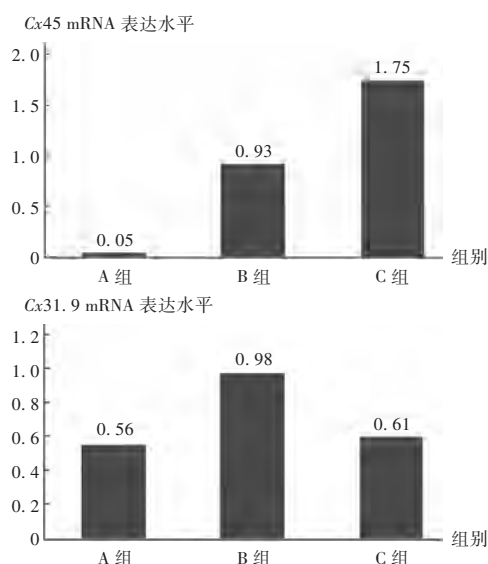


图1 3组家兔窦房结组织Cx45及Cx31.9 mRNA表达水平

2.3 IHC和WB验证3组家兔窦房结组织Cx45和Cx31.9蛋白表达水平

Cx45蛋白表达,A组<B组<C组,3组两两比较

差异有统计学意义($P < 0.05$); Cx31.9 蛋白表达水平, B 组高于 A 组($P < 0.05$), C 组与 B 组无明显差异($P > 0.05$); IHC 和 WB 结果一致。详见表 4 和图 2。

表 4 3 组家兔窦房结组织 Cx45 和 Cx31.9 蛋白表达水平比较
($\bar{X} \pm s, n = 6$)

指标	组别	Cx45	Cx31.9
平均光密度	A 组	0.215 ± 0.013	0.239 ± 0.021
	B 组	0.291 ± 0.021 ^a	0.315 ± 0.019 ^a
	C 组	0.383 ± 0.027 ^{ab}	0.273 ± 0.025

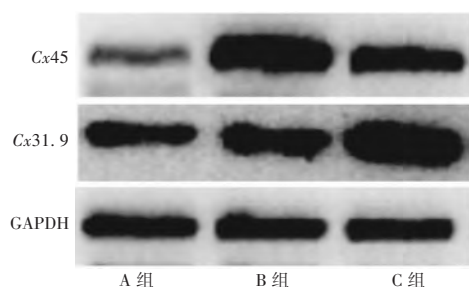


图 2 WB 验证 3 组家兔 Cx45 和 Cx31.9 蛋白表达水平

3 讨论

右美托咪定是一种无色透明液体,唯一同时具有镇痛和镇静作用的麻醉药物,能与中枢神经系统和周围神经系统,血管、肾脏等器官中广泛存在的 α_2 肾上腺素能受体结合,使用者进入非自然睡眠,产生催眠、抗焦虑作用^[2-3]。右美托咪定能减轻使用者短暂性整体或局部脑缺血后的神经损伤,具有保护神经的作用^[4]。家兔心动过缓模型建造成功的基本要求是家兔正常心率下降 30%,而右美托咪定能有效抑制窦房结和房室结的相关功能,临床麻醉和重症监护室中手术操作前或手术中镇静得到广泛使用^[5-7]。同时,临床上使用右美托咪定后存在不良反应,如诱发心动过缓,会导致心脏负性频率和负性传导,存在使心脏停搏的潜在危险^[8-9]。

本研究结果表明,家兔注射右美托咪定后导致心动过缓,从而使心脏组织中的 Cx45 和 Cx31.9 基因表达发生变化,间接表明 Cx45 和 Cx31.9 表达发生变化是导致家兔心动过缓的原因之一。由此可见,以 Cx45 和 Cx31.9 基因表达为作用靶点,干扰其表达,能缓解甚至治疗窦性心动过缓。但目前的研究结果表明, Cx45 和 Cx31.9 基因表达与家兔窦性心动过缓有关,但其作用途径与具体作用机制并不清楚。右美托咪定以何为靶

点,通过何种途径使 Cx45 和 Cx31.9 基因表达发生变化也需要进一步研究。

综上所述,基因 Cx45 和 Cx31.9 在给药前后,即家兔心动过缓前后发生差异表达。右美托咪定具有直接兴奋迷走神经的作用,影响自主神经的功能状态,而基因表达能直接影响窦房结缝隙连接蛋白的表达水平^[10]。探讨基因 Cx45 和 Cx31.9 差异表达在家兔心动过缓中的作用,以及调控的分子机制,阐明其调控的分子信号通路,可为后期临床上利用分子靶向治疗心动过缓奠定基础,探寻新思路。

参考文献:

- [1] 钟毅,殷永强,田磊,等. 右美托咪定致家兔窦性心动过缓模型中窦房结去甲肾上腺素、乙酰胆碱、毒蕈碱受体 2 及腺苷受体 1 的变化[J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2017, 38(1):17-21.
- [2] DESPLANTEZ T. Cardiac Cx43, Cx40 and Cx45 co-assembly: involvement of connexins epitopes in formation of hemichannels and Gap junction channels[J]. BMC Cell Biology, 2017, 18(1):3.
- [3] 赵静,王龙,孔倩,等. 右美托咪定对家兔窦房结细胞动作电位的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(1):17-20.
- [4] YE WG, YUE B, AOYAMA H, et al. Junctional delay, frequency, and direction-dependent uncoupling of human heterotypic Cx45/Cx43 gap junction channels[J]. Journal of Molecular & Cellular Cardiology, 2017, 111(8):17.
- [5] LIU H, LI XZ, PENG M, et al. Role of gap junctions in the contractile response to agonists in the mesenteric resistance artery of rats with acute hypoxia[J]. Molecular Medicine Reports, 2017, 15(4):1823-1831.
- [6] 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[J]. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(4):383-386.
- [7] PELLETIER RM, AKPOVI CD, CHEN L, et al. Cholesterol metabolism and Cx43, Cx46, Cx50 gap junction protein expression and localisation in normal and diabetic and obese ob/ob and db/db mouse testes[J]. American Journal of Physiology Endocrinology & Metabolism, 2018, 314(1):E21.
- [8] 王祁. 缝隙连接蛋白 Cx45、Cx40 及 TNF- α 在梗死心肌中表达及作用[D]. 大连:大连医科大学, 2016.
- [9] SUN B, CHEN ZH, LING L, et al. Mutation Analysis of Gap Junction Protein Beta 1 and Genotype-Phenotype Correlation in X-linked Charcot-Marie-Tooth Disease in Chinese Patients[J]. Chinese Medical Journal, 2016, 129(9):1011.
- [10] 余玉琦,高鸿,刘艳秋,等. 右美托咪定对大鼠心室肌电稳定性和缝隙连接蛋白 43 表达的影响:离体实验[J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(5):595-597.

(收稿日期:2018-10-16)

本栏目由

国药控股云南有限公司

协办