

## 风心病慢性房颤心房连接蛋白表达与 AERP 的相关性研究

庄聪文, 李 莉\*, 黄盛东, 贾宝成, 徐志云, 张宝仁

(第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**通过检测风心病慢性房颤患者左、右心房缝隙连接蛋白 Cx40 和 Cx43 表达及相应部位的心房有效不应期 (AERP) 研究两者之间的相关性, 探讨 Cx40 和 Cx43 对慢性房颤左、右心房电生理特性的影响。**方法:**29 例风心病伴或不伴慢性房颤的患者, 共分 2 组: 窦性心律组 (SR 组,  $n=13$ ), 慢性房颤组 (CAF 组,  $n=16$ ), 另取 6 例非风心病患者作为正常对照组。在进行二尖瓣置换术时, 采用心外膜标测技术测定左、右心房的 AERP, 并在相应部位切取心房组织, 通过 Western 印迹法检测左、右心房肌 Cx40 和 Cx43 的表达, 同时对两者行相关性分析。**结果:**CAF 组患者左、右心房 Cx40 的表达和 AERP 较 SR 组有明显下降 ( $P<0.05$ ), 而 Cx43 无明显变化; 左心房后壁 Cx40 的相对表达量与 AERP 呈明显正相关 ( $r=0.762, P<0.01$ ), 而 Cx43 与 AERP 无明显相关。SR 组中, Cx40 和 Cx43 均与 AERP 无明显相关。**结论:**在风心病慢性房颤心房中, Cx40 表达下调参与慢性房颤的心房重构, 并影响心房的电生理特性, 提示 Cx40 的表达对风心病慢性房颤的发生和维持具有重要的作用。

**[关键词]** 风湿性心脏病; 慢性心房颤动; 连接蛋白; 心房有效不应期

**[中图分类号]** R 541.2; R 541.75 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0136-03

### Correlation of Cx40 and Cx43 expression with electrophysiological characteristics of atrium in atrial fibrillation of patients with rheumatic heart disease

ZHUANG Cong-wen, LI Li\*, HUANG Sheng-dong, JIA Bao-cheng, XU Zhi-yun, ZHANG Bao-ren (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate Cx40 and Cx43 expressions of atria in patients with rheumatic heart diseases and chronic atrial fibrillation and their relationship with correspondent atrial effective refractory period (AERP) for elucidating effects of Cx40 and Cx43 on electrophysiologic characters. **Methods:** Epicardial mapping for AERP was performed in 29 patients with or without atrial fibrillation before mitral replacement during operation. Correspondent atrial myocardial specimens were acquired for detecting Cx40 and Cx43 expression and location with Western blot. Correlative study were conducted between Cx40 and Cx43 expression and electrophysiologic characters. **Results:** Atria Cx40 expression and AERP in CAF group decreased significantly compared with those in SR group ( $P<0.05$ ), while Cx43 had no obvious changes. Cx40 expression in the posterior wall of left atrium was positively correlated with AERP ( $r=0.762, P<0.01$ ), while Cx43 expression had no relation with AERP. In SR group, neither Cx40 nor Cx43 had correlation with AERP. **Conclusion:** Downregulation of Cx40 expression participates in atrial reconstruction of chronic atrial fibrillation and has an effect on electrophysiologic characters in rheumatic heart diseases with chronic atrial fibrillation. Changes of Cx40 expression play an important role in origin and development of chronic atrial fibrillation in rheumatic heart diseases.

**[KEY WORDS]** rheumatic heart disease; chronic atrial fibrillation; connexin; atrial effective refractory period

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 136-138]

在风湿性心脏病 (rheumatic heart disease, CHD) 二尖瓣病变中心房颤动 (atrial fibrillation, AF, 简称房颤) 的发病率高达 80%<sup>[1]</sup>, 但其具体发生机制尚未完全阐明。近年来研究发现, 缝隙连接蛋白 (connexin, Cx) 的含量改变及其在细胞间的分布不均一与房颤的稳定性增加有关, van der Velden 等<sup>[2]</sup> 认为缝隙连接 (gap junction, GJ) 重构使心房电生理和结构发生改变是导致持续性房颤的不良循环之一, 而至今未见有关 Cx 在风心病慢性房颤 (CAF) 中与心房电生理特性之间联系的报道。本

研究检测慢性房颤左房后壁和右房侧壁心房肌 Cx40 和 Cx43 的相对表达量, 同时采取心外膜标测的方法测量同部位的心房有效不应期 (AERP), 并对两者行相关性分析。

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30070749)。

**[作者简介]** 庄聪文 (1968-), 男 (汉族), 硕士, 主治医师。现在南京军区福州总医院胸心外科, 福州 350025。

\* Corresponding author. E-mail: lilihbs@online.sh.cn

## 1 资料和方法

1.1 病例选择 2002年8月至2003年7月,经患者及家属知情同意选择我院胸心外科拟行二尖瓣置换术的风湿性心脏瓣膜病二尖瓣病变的患者29例,平均年龄(46.4±11.8)岁,其中窦性心律(SR)患者13例(男7例,女6例),合并慢性房颤(CAF)的患者16例(男10例,女6例),心功能NYHA分级Ⅱ~Ⅲ级。另取6例非风心病的新鲜尸体左、右心房组织作为正常对照组。按照有无风湿性心脏病及慢性心房颤动分为如下3组:正常对照组( $n=6$ );SR组( $n=13$ );CAF组( $n=16$ )。所有患者术前均常规行心电图、超声心动图及麻醉中血流动力学检查,测量左房内径(LAD)、右房压(RAP)、左心室射血分数(LVEF)等。

1.2 心肌组织样本 换瓣术中取右房侧壁心肌标本,经房间隔至左房或经房间沟在换瓣后取左房下后壁心肌标本,快速置于液氮速冻储存备用。

1.3 蛋白提取与蛋白印迹法 取1g心肌组织悬浮于RIAP组织裂解缓冲液中匀浆,离心(15 000 r/min×1 min),取上清液,按Bradford法测定蛋白浓度,稀释后100℃变性后,取20 μg蛋白进行SDS-PAGE电泳,分离蛋白质,电转膜后脱脂牛奶封闭,分别加羊抗人Cx43多克隆抗体及兔抗鼠Cx40多克隆抗体(美国Santa Cruz公司)和抗β-actin抗体,4℃过夜,加入辣根过氧化物酶标记的兔抗羊抗体(1:200稀释)二抗孵育,封入保鲜膜中,压片,曝光1min,DAB显影,定影,采用Lab Works 4.0图像获取和分析系统软件分析所测量的Western印迹蛋白条带分光密度值Cx40和Cx43的相对光密度值。

1.4 心外膜标测方法 全部患者于术前停用影响心脏节律药品5个半衰期以上,并行常规12导联心电图检查及心脏彩超检查。手术时,行正中切口开胸,于上下静脉插管后、转流前进行标测。采用2根10极冠状窦电极对左房后壁及右房侧壁同步标测,每根电极双极间距为1 mm,标测双极对间距7

mm,在右心耳、左心耳、右室前壁缝双极扣状电极,电极间距1 mm,分别对应心房的上部、中上、中部、中下、下部,以Bard电生理记录仪作40导同步记录,电脑保存动态图像(移动速度100 mm/s),并连接电刺激仪,给予高位右心房S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>电刺激,S<sub>1</sub>500 ms,S<sub>2</sub>500 ms依次递减10 ms,S<sub>1</sub>:S<sub>2</sub>=10:1,电刺激到心房各标测部位的有效不应期。取4 s时间窗内最短的f-f间期作为局部AERP,AERP应>50 ms<sup>[3]</sup>。

1.5 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 11.0统计软件包进行分析。

## 2 结果

2.1 临床特征及血流动力学比较 见表1,SR组和CAF组中LVEF值和RAD均在正常范围内,且两组比较无显著差异;CAF组RAP和LAD均大于SR组( $P<0.05$ )。

表1 两组患者主要心功能指标比较

Tab 1 Comparison of main cardiac function indices in 2 groups

		( $\bar{x} \pm s$ )			
Group	<i>n</i>	LVEF (%)	LAD (d/cm)	RAD (d/cm)	RAP (p/mmHg)
CAF	16	57.2±8.4	6.5±1.4*	5.9±1.1	5.2±1.1*
SR	13	58.3±4.9	4.9±1.0	5.8±1.1	3.5±0.2

\*  $P<0.05$  vs SR group; SR: Sinus rhythm; CAF: Chronic atrial fibrillation; LVEF: Left ventricular ejection fraction; LAD: Left atrial diameter; RAD: Right atrial diameter; RAP: Right atrial pressure; 1 mmHg=0.133 kPa

2.2 心房肌Cx40和Cx43的表达与AERP的相关性 见表2,CAF组左心房后壁Cx40的相对表达量与AERP呈明显正相关( $r=0.762, P<0.01$ ),而Cx43与AERP无明显相关( $r=0.223, P>0.05$ );SR组中,Cx40和Cx43均与AERP无明显相关( $r$ 分别为-0.133和0.029, $P>0.05$ )。

表2 三组患者左、右心房Cx40和Cx43相对表达量和AERP比较

Tab 2 Relation between Cx40 and Cx43 expression and AERP in LA and RA in 3 groups

		( $r \pm s$ )								
Locus	Control( $n=6$ )			SR( $n=13$ )			CAF( $n=16$ )			
	Cx40	Cx43	AERP(t/ms)	Cx40	Cx43	AERP(t/ms)	Cx40	Cx43	AERP(t/ms)	
LA	168.4±3.8	74.1±3.2	-	81.4±8.9	74.1±3.9	252.0±37.1	75.4±4.1	116.7±27.0*	51.4±7.0*	
RA	170.7±2.1	74.0±2.5	-	80.8±6.4	74.6±3.7	245.4±20.6	74.8±4.2	125.1±36.6*	53.9±6.4*	

LA: Left atrium; RA: Right atrium; SR: Sinus rhythm; CAF: Chronic atrial fibrillation; AERP: Atrial effective refractory period; \*  $P<0.05$  vs SR group

### 3 讨论

对于房颤在组织细胞水平上的机制,人们已进行了长时间的探索。既往研究的重点是单个的细胞膜上的离子通道,一般认为长期的房颤会导致 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  通道电流以及短暂外向  $\text{K}^{+}$  电流  $I_o$  减少<sup>[1]</sup>。然而房颤的维持途径是电活动在心房内的折返,细胞间的电传导特性才是形成房颤更直接的基础。已知心肌细胞间的连接处是闰盘,其内有特化的结构,称之为缝隙连接。GJ 的核心结构是缝隙连接蛋白通道,每个 GJ 通道由相邻的两个细胞上的半通道单位连接而成,而每个半通道是由 6 个通道蛋白构成的中空的一类圆柱形六聚体。已知心肌组织主要有 3 种 GJ 通道,分别由 Cx40、Cx43 和 Cx45 组成构成的十二聚体<sup>[3]</sup>。Cx40 主要分布于心房,在心室中只分布于束支传导系统中,而不分布于心室的工作细胞中;Cx43 则在心房、心室均有大量均衡地分布;而 Cx45 则主要分布在心脏的传导系统中表达。现已基本明确,Cx43 在房颤出现前后的含量不变;Cx45 由于其组织分布的特性,与房颤的发生及发展也无关;而 Cx40 在房颤时则会发生明显重构,但表达 Cx40 的 mRNA 含量无明显改变,Cx40 是心房电激动传导的主要决定者,它的缺失可使房性心律失常易感性增加<sup>[6]</sup>。最近在快速起搏的山羊房颤模型中发现心房组织的 Cx40 分布呈高度空间异质性,且其蛋白含量减少,上述变化程度和房颤持续性呈正相关<sup>[2]</sup>,同时检测 Cx43 分布和蛋白含量不变。但从目前研究的结果来看,许多结论存在着分歧。

本研究通过 Western 印迹法检测发现在 CAF 患者的左、右心房肌 Cx40 的表达下降,通过心外膜标测发现 CAF 组中与 SR 组相比较,左、右心房 AERP 等明显降低,通过对两者之间的相关性研究,结果发现:(1)CAF 组左心房后壁 Cx40 的表达量与同部位的 AERP 呈正相关;(2)Cx43 与 AERP 无明显相关;(3)在 SR 组中,Cx40 和 Cx43 的表达量均与 AERP 无明显相关,表明 Cx40 的表达下调对 CAF 的心房电生理特性上具有重要的作用,是风心病慢性房颤的发生和维持的重要因素之一,而 Cx43 可能在慢性房颤的左、右心房重构中不参与作用。近来 Kanagaratnam 等<sup>[7]</sup>在对慢性房颤患者的心房电生理特性与 Cx40 表达进行相关性研究时发现,Cx40 的表达量与慢性房颤心房复杂激动形式呈正相关,而在窦性心律和正常窦性心律诱导房颤期间的患者并无这种相关性,提示 Cx40 表达的改变参与慢性房颤的心房重构,这与我们研究的结果相符。

房颤的本质是一种折返性心律失常,任何折返激动产生的前提是缓慢传导和单向阻滞,Cx 的异常变化在促成这两大要素上都起了相当重要的作用。房颤引起心房肌细胞端-端连接处 Cx40 蛋白水平的降低,导致细胞间电耦联能力的进一步下降,改变心肌的电传导特性,使传导速度减慢或发生传导阻滞的程度加重,更易于形成折返。由于折返的波长=传导速度×不应期,房颤时的电重构使心房细胞电生理特性发生改变,不应期缩短和频率适应不良,传导速度的减慢进一步使折返的波长缩短,易于在缓慢传导区内形成多个微小折返子波。此外,由于正常心肌细胞电冲动沿长轴传导速度远大于横向传导速度,即传导存在各向异性,这不仅与心肌细胞膜上的离子通道有关,也与 GJ 有关。GJ 由正常时主要位于心肌细胞闰盘处,房颤时转向分布于细胞侧侧连接处,减低了纵向和横向间传导速度的差异,即各向异性传导减低,使得各向异性传导表现出非均一性,这为多个子波同时沿改变了的传导径路扩布并导致房颤的维持提供了条件。我们初步得出结论:左、右心房肌 Cx40 表达的下调与心房有效不应期的缩短密切相关,且在风心病慢性房颤的发生与维持中参与心房折返的电重构,并影响左、右心房肌的电生理特性。

### 【参考文献】

- [1] 李莉,张宝仁,汪曾炜,等. 风湿性心脏病手术前后房颤发生率及其预后分析[J]. 第二军医大学学报, 1997, 18(增刊):89-91.
- [2] van der Velden HM, Ausma J, Rook MB, et al. Gap junctional remodeling in relation to stabilization of atrial fibrillation in the goat[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 46(3):476-486.
- [3] 李莉,汪曾炜,张宝仁,等. 风湿性心脏病心房颤动的电生理机制的研究[J]. 中国心脏起搏及电生理杂志, 1996, 10(4):78-81.
- [4] Bosch RF, Zeng XR, Grammer JB, et al. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation[J]. *Cardiovasc Res*, 1999, 44(6):121-131.
- [5] van Veen TAB, van Rijen HVM, Opthof T. Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties[J]. *Cardiovasc Res*, 2001, 51(2):217-229.
- [6] Verheule S, Batenburg CA, Coenjaerts FE, et al. Cardiac conduction abnormalities in mice lacking the gap junction protein connexin 40[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1999, 10(10):380-399.
- [7] Kanagaratnam P, Ashok CH, Rex D, et al. Relationship between connexins and atrial activation during human atrial fibrillation[J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2004, 15(2):206-216.

【收稿日期】 2004-07-09

【修回日期】 2004-11-26

【本文编辑】 尹 茶