

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.02.007

压力 - 应激对大鼠心肌细胞 Cx43 蛋白表达及心肌纤维化的影响 *

善孝胜¹ 王 东¹ 王 芳² 康万荣³ 张 锦^{1Δ}

(1 兰州大学第一医院心脏中心 甘肃 兰州 730000;

2 兰州大学第一医院病理科 甘肃 兰州 730000; 3 甘肃中医药大学实验动物中心 甘肃 兰州 730000)

摘要 目的:探讨压力 - 应激对大鼠心肌细胞间隙连接蛋白 -43(Cx43)蛋白表达及心肌纤维化的影响。**方法:**将 20 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组(n=10)和模型组(n=10),对照组正常饲养,模型组给予不可预测性复合应激结合孤养建立压力 - 应激大鼠模型。监测两组大鼠的体重变化,并通过组织形态学方法,探讨压力 - 应激对大鼠心肌细胞 Cx43 蛋白表达及心肌纤维化的影响。**结果:**在为期 42 天的造模过程中,从应激第 7 天开始,模型组大鼠体重明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$)。且模型组体重增长缓慢,体重增长百分比明显低于对照组,差异有统计学意义($P<0.001$)。与对照组相比,模型组大鼠组织 HE 染色可见心肌细胞排列紊乱,横纹消失,细胞间隙增大,部分肌纤维断裂、溶解,Masson 染色可见心肌间质纤维化,胶原纤维增生、排列紊乱。心肌细胞免疫组化染色可见模型组 Cx43 蛋白表达明显下降(平均光密度值为 0.0110 ± 0.0028),与对照组相比(平均光密度值为 0.0268 ± 0.0025),差异具有统计学意义($t=-13.081, P<0.001$)。**结论:**过度疲劳导致猝死的发生可能与 Cx43 蛋白表达水平的下降引起的恶性心律失常有关。

关键词:压力 - 应激;间隙连接蛋白 43;心肌纤维化;恶性心律失常;猝死;模型

中图分类号:R-33;R541.78 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)02-237-05

Effects of Pressure-stress on the Expression of Cx43 Protein and Myocardial Fibrosis in Rat Cardiomyocytes*

SHAN Xiao-sheng¹, WANG Dong¹, WANG Fang², KANG Wan-rong³, ZHANG Jin^{1Δ}

(1 Cardiac Center, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730000, China;

2 Department of Pathology, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu, 730000, China;

3 Laboratory Animal Center, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu, 730000, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of pressure-stress on the expression of Connexin-43(Cx43) protein and myocardial fibrosis in rat cardiomyocytes. **Methods:** 20 male SD rats were randomly divided into normal control group (n=10) and model group (n=10). The control group was fed normally, while the model group was given unpredictable compound stress combined with solitary rearing to establish the pressure-stress rat model. The changes of body weight of rats in the two groups were monitored, and to investigate the effect of pressure-stress on the expression of Cx43 protein and myocardial fibrosis in rat cardiomyocytes by histomorphology. **Results:** During the 42 days modeling process, the weight of rats in the model group was significantly lower than that in the control group from the 7th day ($P<0.001$). The weight gain of model group was slow and the percentage of weight gain was significantly lower than that of control group ($P<0.001$). Compared with the control group, HE staining showed disordered arrangement of myocardial cells, disappearance of transverse striations, enlargement of intercellular space, breakage and dissolution of some muscle fibers in the model group. Masson staining showed myocardial interstitial fibrosis, proliferation and disordered arrangement of collagen fibers. Immunohistochemical staining of myocardial cells showed that the expression of Cx43 protein in the model group was significantly decreased (average optical density was 0.0110 ± 0.0028), compared with the control group (average optical density was 0.0268 ± 0.0025), the difference was statistically significant ($t=-13.081, P<0.001$). **Conclusion:** Sudden death caused by overwork may be related to malignant arrhythmia caused by decreased expression of Cx43 protein.

Key words: Pressure-stress; Connexin 43; Myocardial fibrosis; Malignant arrhythmia; Sudden death; Model

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R541.78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)02-237-05

* 基金项目:甘肃省卫生行业科研计划项目(GSWSKY2016-0124)

作者简介:善孝胜(1991-),男,硕士,住院医师,研究方向:心肌能量代谢,E-mail: shanxsh16@126.com

Δ 通讯作者:张锦(1969-),女,博士,主任医师,研究方向:心血管病,E-mail: chzhangjin@163.com

(收稿日期:2019-05-21 接受日期:2019-06-15)

前言

近年来,随着经济的快速发展,一些行业由于长期加班、生活不规律等导致既往并无心脑血管病史的青中年人群过劳导致猝死发生率增加。据报道^[1],过劳导致猝死的发生多与心脑血管疾病有关。流行病学研究显示,不具有传统心血管疾病危险因素"过劳死"与长期加班、饮食不规律、低薪酬工作等因素相关^[2-5]。越来越多的研究表明,心理应激这一危险因素导致猝死的发生不容忽视^[6-8]。既往研究表明,长期心理应激可以引起机体内分泌及免疫系统紊乱,进而加重高血压、冠心病、糖尿病等疾病的进展^[9-11]。然而,在临床研究及法医学鉴定过程中,许多过劳死者生前并无心脑血管疾病。因此,研究者认为,压力-应激导致猝死的发生可能与恶性心律失常有关。在本研究中,我们建立复合型压力-应激模型,通过研究心律失常相关分子间隙连接蛋白-43(Cx43)及心肌纤维化的表达情况,探讨慢性应激引起过劳死的可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年雄性SD大鼠20只,体重(230±20)g,购于甘肃中医药大学实验动物中心[许可证号:SYXK(甘)2015-0005],饲养于无特定病原体(SPF)实验室。适应性饲养5天,适应期内所有大鼠处于周期12h的昼夜节律(光照时间07:30~19:30),恒温(23±2)℃,相对湿度40%~60%,每笼5只群养,自由摄食和进水。适应性饲养5天后,将20只大鼠随机分为模型组和正常对照组,每组各10只。本研究遵循《实验动物管理条例》的指导原则,并已获得甘肃中医药大学实验动物伦理委员会的批准(批号:2018-080)。

1.2 造模方法

对照组大鼠5只/笼正常饲养,自由摄食和饮水,不给予任何刺激。模型组大鼠单笼饲养,参照Willner P等研究者^[12,13]的方法并模拟青中年人群高竞争,饮食、作息不规律的状态,采用孤养与6种不可预见性应激相结合的方法建立压力-应激动物模型。6种不可预见性应激包括:①禁食:24小时;②禁水:24小时;③昼夜颠倒:保持昼夜颠倒各12小时;④夹尾:每次1min,用长尾夹夹住大鼠尾巴后1/3比较敏感的部位;⑤潮湿垫料:在动物笼中加入200~300mL水,使笼中垫料足够潮湿,维持24小时;⑥冰水游泳:4℃冰水中游泳7分钟。以上刺激每日随机安排2种,同一种刺激不连续进行两天,以免大鼠对同种刺激产生适应,为期6周。

1.3 体重变化监测

于造模期第7天、第14天、第21天、第28天、第35天、第42天上午分别对模型组和对照组大鼠进行称重,以监测实验期间大鼠体重变化,以造模开始前一天体重作为基线水平。若当天对大鼠有禁食或禁水处理,则待刺激结束后于第二天称重,以免大鼠在人为因素造成的空腹状态下体重波动过大。同时考察两组大鼠的体重增长百分比,即大鼠在6周内体重变化的总量的百分比:(第6周的体重-基线时的体重)/基线时的体重×100%。

1.4 动物取材

于第6周末进行取材。具体方法:用10%水合氯醛进行腹腔注射(3-4 mL/kg)麻醉大鼠,组织剪剪开胸腔,暴露心脏,眼科剪剪开心包膜,剪断心脏出入血管,分离心脏,0.1 M PBS缓冲液清洗心腔积血,滤纸吸干,于心室长轴中点处分离左心室,将组织(大小约1.5 cm×1.5 cm×0.3 cm)在4%多聚甲醛固定液中固定48 h,脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋,以5 μm厚度连续切片制成石蜡切片用于病理染色及Cx43分子免疫组化。

1.5 病理染色

HE染色:切片用二甲苯脱蜡,经各浓度梯度乙醇脱水,用苏木素液染色10 min,自来水冲洗后经1%盐酸乙醇分化液分化30 s,1%伊红水溶液复染3 min。再经各浓度梯度乙醇脱水,用二甲苯透明加中性树脂封片。Masson染色:切片用二甲苯脱蜡,经各浓度梯度乙醇脱水,用Masson复合染液5 min,后依次以0.2%醋酸、1%磷酸、亮绿染色液染色,自来水冲洗。再经各浓度梯度乙醇脱水,用二甲苯透明加中性树脂封片。

1.6 免疫组化

将石蜡切片65℃烤片2 h,然后进行脱蜡、水合和抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,滴加封闭用正常山羊血清工作液在室温下对组织封闭15 min,加入一抗孵育(1:100稀释),4℃过夜,滴加二抗工作液,37℃孵育30 min,然后用HRP标记的链酶卵白素工作液孵育15 min,滴加新鲜配制的DAB显色液孵育10 min,苏木素复染,最后将切片用中性树脂封片,并在光镜下观察。Cx43蛋白阳性产物为分布于细胞闰盘处的棕黄色颗粒,阴性不显色。采用Image-pro plus 6.0软件系统对免疫组化结果进行半定量分析,每张切片随机选取3个视野(×100)分别测定两组大鼠免疫组化图像中的平均光密度值。

1.7 统计学方法

运用SPSS 22.0软件进行统计分析,所有计量资料均以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性检验采用SNK-q检验,两组间比较用独立样本t检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体重变化

实验前,两组大鼠的体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。在为期42天的造模过程中,从应激第7天开始,模型组大鼠体重明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$)。且模型组体重增长缓慢,体重增长百分比明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.001$),见表1、图1。

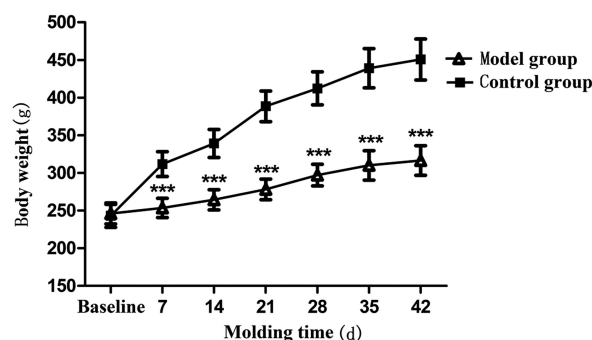


图1 造模期间大鼠体重变化的比较

Fig. 1 Comparison of body weight changes in rats during modeling

Note: Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

表 1 造模期间大鼠体重变化的比较($\bar{x} \pm s, g$)Table 1 Comparison of body weight changes in rats during modeling($\bar{x} \pm s, g$)

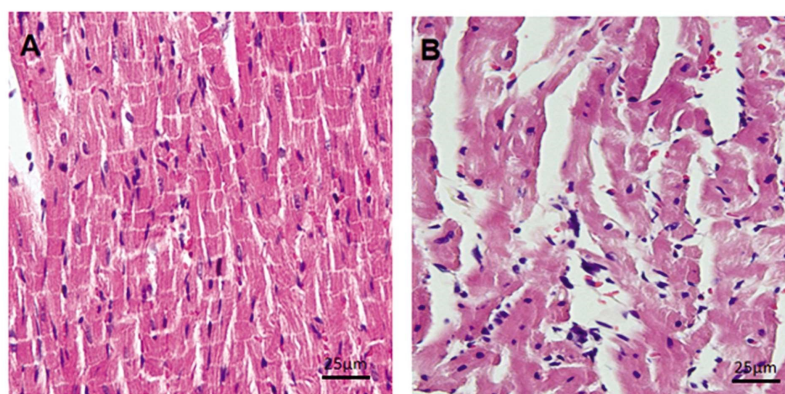
Molding time	Model group(n=10)	Control group(n=10)	t	P
Baseline	246.2 $\pm$ 14.0	243.1 $\pm$ 15.3	0.826	0.412
7th day	253.5 $\pm$ 12.7***	311.7 $\pm$ 16.4	-15.376	<0.001
14th day	264.3 $\pm$ 13.4***	339.1 $\pm$ 18.5	-17.910	<0.001
21th day	278.2 $\pm$ 13.7***	388.4 $\pm$ 20.3	-20.095	<0.001
28th day	297.1 $\pm$ 14.3***	412.3 $\pm$ 21.9	-19.662	<0.001
35th day	310.0 $\pm$ 19.5***	439.0 $\pm$ 26.1	-12.509	<0.001
42th day	316.5 $\pm$ 19.6***	450.6 $\pm$ 27.3	-12.618	<0.001
Percentage of weight gain(%)	29.67 $\pm$ 9.83***	79.00 $\pm$ 6.89	-12.997	<0.001

Note: Compared with the control group, *** $P < 0.001$.

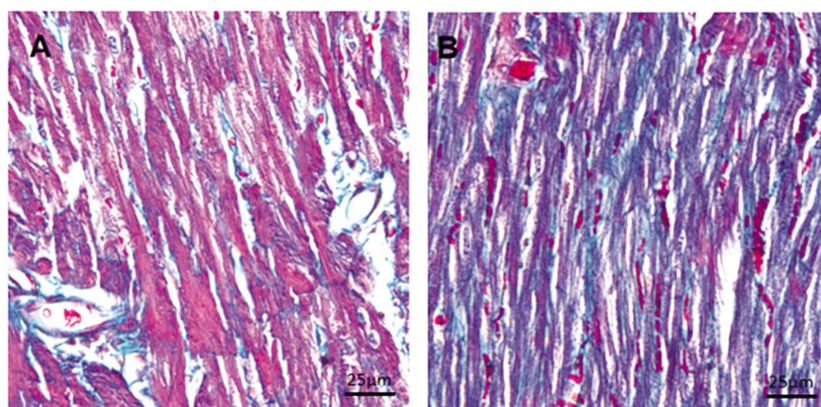
2.2 心肌组织形态学观察

光镜下,在应激 6 周后模型组大鼠 HE 染色可见心肌细胞组织结构模糊,部分萎缩,细胞间隙增大,肌纤维排列疏松紊乱,部分肌纤维有断裂、溶解等情况;在进行 Masson 染色后,镜下可见心肌间质纤维化,胶原纤维增生且排列无序,呈蓝绿色,

大量分布于心肌间质。而对照组大鼠 HE 染色心肌组织排列均匀整齐,肌纤维结构清晰完整,部分可见横纹,形态及分布未见异常;Masson 染色可见心肌细胞排列整齐,胞浆呈红色,核呈深蓝色,胶原纤维仅在心肌间质及血管周围可见少量分布。见图 2、图 3。

图 2 两组大鼠心肌组织 HE 染色结果($\times 200$)Fig. 2 HE staining results of myocardial tissue of rats in two groups ($\times 200$)

Note: A: Control group, B: Model group

图 3 两组大鼠心肌组织 Masson 染色结果($\times 200$)Fig. 3 Masson staining results of myocardial tissue of rats in two groups ($\times 200$)

Note: A: Control group, B: Model group

2.3 Cx43 蛋白表达情况

心肌组织免疫组化染色可见,对照组大鼠心肌细胞大量表达 Cx43 蛋白,表达产物为棕黄色颗粒,分布于心肌细胞闰盘

处。模型组 Cx43 蛋白表达明显下降(平均光密度值为 0.0110 ± 0.0028),与对照组相比(平均光密度值为 0.0268 ± 0.0025),差异具有统计学意义($t = -13.081, P < 0.001$),见图 4。

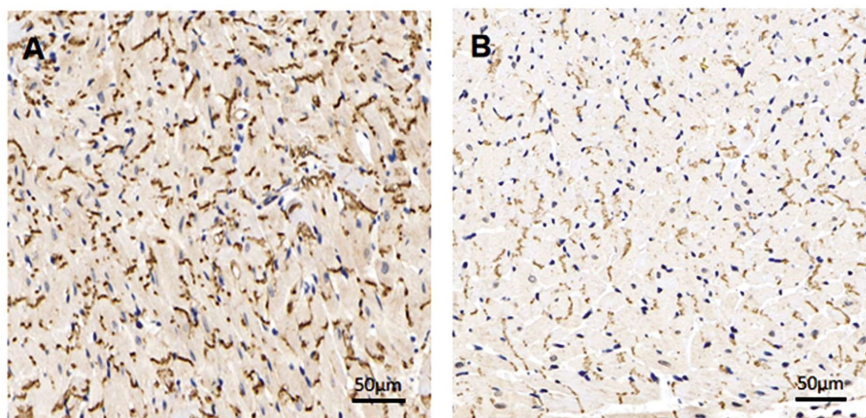


图 4 两组大鼠心肌组织 Cx43 蛋白表达情况($\times 100$)

Fig. 4 The expression of Cx43 protein in myocardial tissue of rats in two groups ($\times 100$)

Note: A: Control group, B: Model group

3 讨论

应激是一种普遍的社会现象,随着现代社会的发展,人们在日常生活中会不可避免地受到工作、生活方面的压力,常常使人们处于不同强度的应激中。一般来说,应激对机体的影响是与应激源种类、频率、持续时间成正比的^[14-16]。既往研究表明^[12,13],压力-应激会降低大鼠体重增长量,导致一般状态和行为表现发生明显变化,与人群中长期处于应激状态的人员表现相似。在本研究中,模拟青中年人群高竞争,饮食、作息不规律的生活状态,参考 Willner P 等研究者的慢性应激大鼠造模方法,采用 6 周孤养结合每日 2 种不可预见性应激造成大鼠的压力-应激模型,造模期间模型组大鼠体重增长较对照组明显减低,并表现出一系列情绪行为学反应,表现为情绪烦躁不安,紧张焦虑,对外界反应易怒、易攻击,睡眠程度浅,易惊醒。这些一般状态和行为表现与既往研究结果相符,表明本次压力-应激大鼠模型建立成功。

HE 染色主要用于显示组织细胞形态学分布,Masson 染色主要用于显示组织的胶原纤维,两者共同为压力-应激对大鼠心肌造成器质性损伤提供病理学依据。在本研究中,模型组大鼠在受到应激刺激后,心肌组织出现了不同程度的肌纤维排列紊乱,部分细胞萎缩,肌纤维萎缩后由成纤维细胞代偿性增生而出现心肌间质纤维化。结果表明,压力-应激会对心肌组织产生器质性损害。既往研究表明,心肌纤维化不仅降低心脏收缩性,还会影响心脏传导性,导致心律失常的发生^[17,18]。增加的间质纤维组织可通过早期后去极和延迟后去极,进而引起室性心动过速和室颤^[19,20]。此外,间质成纤维细胞还可以活化成为肌成纤维细胞,后者通过改变缝隙连接和离子通道蛋白的表达进而影响心肌细胞的电偶联,最终导致恶性心律失常的发生^[21-23]。

Cx43 是一种跨膜蛋白,在心肌细胞膜广泛表达的 Cx43 蛋白介导心肌细胞间电化学信号的传递^[24,25]。本研究中,与正常对照组相比,应激模型组阳性染色显著减低,表明压力-应激可引起心肌细胞 Cx43 蛋白表达下降。既往研究表明,Cx43 蛋白是心肌工作细胞表达的主要通道蛋白,其表达水平的下降或分布异常会引起心室传导速率明显降低,细胞间缝隙连接发生收缩,进而导致心律失常的发生^[26-28]。在大鼠心肌梗死模型的研究

中,心肌细胞 Cx43 表达降低,室性心律失常的发生率明显增加,而增加 Cx43 表达后,室性心律失常的发生率随之减低^[29]。此外,有研究发现,在右心室发育异常的患者中,与非持续性室性心律失常的患者相比,持续性室性心律失常发生的患者 Cx43 蛋白表达分布异常且表达水平显著下降,提示 Cx43 蛋白表达的下降与室性心律失常的发生有关^[30]。因此,本研究者认为,过度疲劳导致猝死的发生可能与 Cx43 蛋白表达水平的下降或分布异常引起的恶性心律失常有关。

综上所述,压力-应激可以引起大鼠心肌纤维排列紊乱,间质纤维化等病理学改变,以及心肌细胞 Cx43 表达下调,可能与压力-应激导致猝死的发生相关。通过本研究,可以为压力-应激引起猝死的发生提供理论依据,但由于压力-应激导致 Cx43 下调进而引起心肌细胞离子通道蛋白表达和室性心律失常的具体机制目前尚不清楚,期待进一步研究证实。

参考文献(References)

- [1] Otsui K, Yamamoto J, Inoue N. Overwork accelerates thrombotic reaction: implications for the pathogenesis of Karoshi [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2018, 45(2): 222-224
- [2] Yin RX, Huang F, Zhang, et al. Karoshi, a new epidemic in Chinese medical practitioners[J]. *Intensive Care Med*, 2018, 44(7): 1187-1188
- [3] Yamauchi T, Yoshikawa T, Takamoto M, et al. Overwork-related disorders in Japan: recent trends and development of a national policy to promote preventive measures[J]. *Ind Health*, 2017, 55(3): 293-302
- [4] Lin RT, Chien LC, Kawachi I. Nonlinear associations between working hours and overwork-related cerebrovascular and cardiovascular diseases (CCVD)[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9694
- [5] Inoue N, Otsui K, Yoshioka T, et al. A Simultaneous Evaluation of Occupational Stress and Depression in Patients with Lifestyle-related Diseases[J]. *Intern Med*, 2016, 55(9): 1071-1075
- [6] Cheng Y, Du CL, Hwang JJ, et al. Working hours, sleep duration and the risk of acute coronary heart disease: a case-control study of middle-aged men in Taiwan[J]. *Int J Cardiol*, 2014, 171(3): 419-422
- [7] Kang MY, Cho SH, Yoo MS, et al. Long working hours may increase risk of coronary heart disease [J]. *Am J Ind Med*, 2014, 57(11): 1227-1234
- [8] Kivimäki M, Jokela M, Nyberg ST, et al. Long working hours and risk

- of coronary heart disease and stroke: A systematic review and meta-analysis of published and unpublished data for 603 838 individuals[J]. *Lancet*, 2015, 386(10005): 1739-1746
- [9] Gafarov VV, Gromova EA, Panov DO, et al. Effect of stress at work on the risk of cardiovascular diseases among the population of 25-64 years in Russia/Siberia (WHO program "MONICA-psychosocial")[J]. *Ter Arkh*, 2019, 91(1): 13-18
- [10] Guner U. Is there a relationship between working hours and hypertension? Evidence from the United States[J]. *Work*, 2019, 62(2): 279-285
- [11] Bannai A, Yoshioka E, Saijo Y, et al. The Risk of Developing Diabetes in Association With Long Working Hours Differs by Shift Work Schedules[J]. *J Epidemiol*, 2016, 26(9): 481-487
- [12] Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1997, 134(4): 319-329
- [13] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1981, 5(2): 247-251
- [14] 张月, 苏允爱, 李继涛, 等. 应激对大脑的差异性影响及其意义[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2018, 44(1): 62-64
- [15] 金齐颖, 吴红芳, 张园园, 等. 慢性不可预见性温和应激对大鼠海马星形胶质细胞凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(8): 1226-1230, 1235
- [16] 张丽, 黄瑶, 王重卿, 等. 不同慢性应激综合模式下慢性疲劳动物实验研究概况[J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(8): 1015-1020
- [17] Nguyen MN, Kiriazis H, Gao XM, et al. Cardiac Fibrosis and Arrhythmogenesis[J]. *Compr Physiol*, 2017, 7(3): 1009-1049
- [18] Morita N, Mandel WJ, Kobayashi Y, et al. Cardiac fibrosis as a determinant of ventricular tachyarrhythmias[J]. *J Arrhythm*, 2014, 30(6): 389-394
- [19] Xiao N, Yang BF, Shi JZ, et al. Karoshi May Be a Consequence of Overwork-Related Malignant Arrhythmia [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 357-364
- [20] 晏煜昊, 单其俊. 心肌纤维化: 室性心律失常的重要预测因子[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2018, 32(2): 166-169
- [21] Dzeshka MS, Lip GY, Snezhitskiy V, et al. Cardiac Fibrosis in Patients With Atrial Fibrillation: Mechanisms and Clinical Implications[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66(8): 943-959
- [22] 孙丽芳, 杨波, 石少波, 等. 慢性应激对心脏交感神经和室性心律失常易感性的影响[J]. *中国循环杂志*, 2015, 30(3): 272-275
- [23] Disertori M, Masè M, Ravelli F. Myocardial fibrosis predicts ventricular tachyarrhythmias[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2017, 27(5): 363-372
- [24] 沈文娟, 张琛, 刘语新, 等. Connexin43 介导的缝隙连接与心血管疾病研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(21): 116-119
- [25] Gonzalez JP, Ramachandran J, Xie LH, et al. Selective Connexin43 Inhibition Prevents Isoproterenol-Induced Arrhythmias and Lethality in Muscular Dystrophy Mice[J]. *Sci Rep*, 2015, 5(1): 13490
- [26] Gao J, Zhao Y, Wang Y, et al. Anti-arrhythmic effect of acupuncture pretreatment in the rats subjected to simulative global ischemia and reperfusion-involvement of intracellular Ca^{2+} and connexin 43 [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15(1): 5
- [27] 沈文娟, 张琛, 刘语新, 等. Connexin43 介导的缝隙连接与心血管疾病研究进展[J]. *国际检验医学杂志*, 2018, 39(21): 2702-2705
- [28] 刘亚军, 钟江华. Cx43 重构对缺血性室性心律失常影响的研究进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(17): 3368-3372
- [29] Ng FS, Kalindjian JM, Cooper SA, et al. Enhancement of Gap Junction Function During Acute Myocardial Infarction Modifies Healing and Reduces Late Ventricular Arrhythmia Susceptibility[J]. *JACC Clin Electrophysiol*, 2016, 2(5): 574-582
- [30] Chen X, Chen L, Chen Z, et al. Remodelling of myocardial intercalated disc protein connexin 43 causes increased susceptibility to malignant arrhythmias in ARVC/D patients [J]. *Forensic Sci Int*, 2017, 275: 14-22