

七氟醚对低温全心缺血-再灌注心脏电传导及 Cx43 Ser368 磷酸化的影响

王贵龙 糜睿 徐雄坤 高鸿 刘艳秋

【摘要】 目的 观察七氟醚对低温全心缺血-再灌注心室肌电传导及 Cx43 Ser368 磷酸化的影响。方法 制备成功的离体灌注工作心脏 24 只,随机分为三组:对照组(C 组)、低温全心缺血-再灌注组(IR 组)和 1.0 MAC 七氟醚处理组(Sev 组),每组 8 只。C 组:37 °C K-H 液平衡灌注 15 min 后继续灌注 37 °C K-H 液 105 min;IR 组:37 °C K-H 液平衡灌注 15 min 后继续灌注 37 °C K-H 液 15 min,注射 Thomas 液(4 °C, 20 ml/kg)使心脏停搏 60 min,4 °C K-H 液保护心脏,停搏 30 min 时半量复灌 Thomas 液(4 °C, 10 ml/kg),60 min 时使用 37 °C K-H 液再灌注 30 min;Sev 组:37 °C K-H 液平衡灌注 15 min 后继续灌注含饱和 1.0 MAC 七氟醚的 37 °C K-H 液 15 min,注射 Thomas 液(4 °C, 20 ml/kg)使心脏停搏 60 min,4 °C K-H 液保护心脏,停搏 30 min 时半量复灌 Thomas 液(4 °C, 10 ml/kg),60 min 时使用含饱和 1.0 MAC 七氟醚的 37 °C K-H 液再灌注 30 min。于再灌注即刻至灌注结束,记录离体心脏复跳时间(再灌注即刻至心脏首次跳动所需的时间),室性心律失常(室性早搏、室性心动过速、室性颤动)发生情况和持续时间。采用心脏刺激仪行程控刺激,测定并记录有效不应期(ERP)、传导速度(CV)。采用免疫印迹法检测心室肌组织 Cx43 和 Cx43 Ser368 蛋白相对含量。结果 与 C 组比较,IR 组和 Sev 组 ERP 明显延长,CV 明显减慢($P < 0.05$);IR 组 Cx43 及 Cx43 Ser368 蛋白相对含量明显降低($P < 0.05$)。与 IR 组比较,Sev 组心脏复跳时间明显缩短,心律失常发生率明显降低,心律失常持续时间明显缩短,ERP 明显缩短,CV 明显增快,Cx43 及 Cx43 Ser368 蛋白相对含量明显升高($P < 0.05$)。结论 七氟醚可以上调低温全心缺血-再灌注心室肌组织 Cx43 和 Cx43 Ser368 的表达,促使心室肌电传导增快、有效不应期缩短,降低再灌注心律失常的发生。

【关键词】 七氟醚;缺血-再灌注;电传导;缝隙连接蛋白 43

Effect of sevoflurane on the electrical conduction and the phosphorylation of Cx43 Ser368 in the heart of hypothermic global ischemia-reperfusion WANG Guilong, MI Rui, XU Xiongkun, GAO Hong, LIU Yanqiu. Department of Anesthesiology, the People's Hospital of Zhijin County, Bijie 552100, China

Corresponding author: GAO Hong, Email: 2169617@qq.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of sevoflurane on the electrical conduction and the phosphorylation of Cx43 Ser368 on the heart of hypothermic global ischemia-reperfusion. **Methods** Twenty-four isolated perfused working hearts were randomly divided into 3 groups ($n = 8$ in each): control group (group C), hypothermia global ischemia-reperfusion group (group IR), and 1.0 MAC sevoflurane group (group Sev). In group C, the heart was perfused with 37 °C K-H solution for 15 minutes and then perfused with 37 °C K-H solution for 105 minutes. In group IR, the heart was perfused with 37 °C K-H solution for 15 minutes and then perfused with 37 °C K-H solution for 15 minutes. Thomas solution (4 °C, 20 ml/kg) was injected to make the heart stop beating for 60 minutes, and the surrounding of the heart was protected by 4 °C K-H solution, and Thomas solution (4 °C, 10 ml/kg) was refilled when the heart stopped for 30 minutes. In group Sev, the heart was perfused with 37 °C K-H solution for 15 minutes and then perfused with 37 °C K-H solution containing 1.0 MAC sevoflurane for 15 minutes. Thomas solution (4 °C, 20 ml/kg) was injected to stop the heart beating for 60 minutes, and the surrounding of the heart was protected by 4 °C K-H solution. Thomas solution (4 °C, 10 ml/kg) was refilled for 30 minutes, and 37 °C K-H solution containing 1.0 MAC sevoflurane was used for 30 minutes. From the instance to the end of reperfusion time, the rebeating time (the time from reperfusion to the first beating) of isolated heart was recorded, the number and du-

DOI:10.12089/jca.2020.12.016

作者单位:552100 贵州省毕节市,织金县人民医院麻醉科(王贵龙、徐雄坤);织金县人民医院普外科(糜睿);贵州医科大学第三附属医院(高鸿);贵阳市第四人民医院麻醉科(刘艳秋)

通信作者:高鸿,Email: 2169617@qq.com

ration of ventricular arrhythmias (ventricular premature beat, ventricular tachycardia and ventricular fibrillation) were recorded. The effective refractory period (ERP) and conduction velocity (CV) were measured and recorded from programmed electrical stimulation by cardiac stimulator. The relative content of Cx43 and Cx43 ser368 protein in ventricular tissue were detected by Western blot. **Results** Compared with group C, ERP was significantly prolonged, and CV was significantly slowed in group IR and group Sev, the expression of Cx43 and Cx43 ser368 protein decreased in group IR ($P < 0.05$). Compared with group IR, the cardiac rebeating time was significantly shorter, the incidence of arrhythmia was significantly decreased, the ERP was significantly shorter, the CV was significantly faster, and the protein content of Cx43 and Cx43 ser368 were significantly higher in group Sev ($P < 0.05$). **Conclusion** Sevoflurane may upregulate the expression of Cx43 and Cx43 ser368 in the ventricular tissue of hypothermic global ischemia-reperfusion, accelerate CV and decrease ERP, so as to reduce the incidence of reperfusion arrhythmia.

【Key words】 Sevoflurane; Ischemia-reperfusion; Electrical conduction; Connexin 43

缺血-再灌注导致室性心律失常风险增加^[1], 有研究表明,七氟醚可降低再灌注心律失常的发生风险^[2-3]。再灌注心律失常的发生与心肌细胞间缝隙连接(gap junction, GJ)电传导障碍息息相关^[4]。GJ是心脏心肌细胞间电传导的结构基础,通过介导细胞间电化学信号维持正常的心电耦联^[5]。缝隙连接蛋白(connexin, Cx)是GJ的基本单位,成年哺乳动物心室肌主要表达Cx43, Cx43正常表达及丝氨酸368位点(Ser368)磷酸化水平对保证心肌细胞间正常的电传导至关重要^[4-6],七氟醚对低温全心缺血-再灌注心室肌电传导及Cx43 Ser368磷酸化水平的影响尚不清楚,故本研究采用低温全心缺血-再灌注离体心脏模型,探讨七氟醚对低温全心缺血-再灌注心室肌电传导及Cx43 Ser368磷酸化的影响。

材料与方 法

K-H 液的制备 分别称取 NaCl 120 mg、KCl 4.5 mg、CaCl₂ 1.25 mg、MgCl₂ · 6H₂O 1.2 mg、KH₂PO₄ 1.2 mg、NaHCO₃ 20 mg、C₆H₁₂O₆ 10 mg,用 ddH₂O 配制 1 000 ml,过滤后 4 ℃ 保存备用;含饱和 1.0 MAC 七氟醚的 K-H 液制备参照前期研究^[7],具体如下:采用 Vapor2000 挥发灌将浓度 2.4%七氟醚通入 K-H 液饱和 15 min,七氟醚浓度检测采用高效液相色谱仪进行,经 2.4%七氟醚饱和后,K-H 液中七氟醚含量为(0.50±0.04) mmol/L。

实验分组与处理 参照前期研究^[8],取成功制备的 24 只离体灌注工作心脏,采用随机数字表法分为三组:对照组(C组)、低温全心缺血-再灌注组(IR组)和 1.0 MAC 七氟醚处理组(Sev组),每组 8 只。三组经 37 ℃ K-H 平衡液灌注 15 min 后分别按以下方式进行灌注:C组继续灌注 37 ℃ K-H 液 105 min;IR组继续灌注 37 ℃ K-H 液 15 min 后,注射 Thomas 液(4 ℃, 20 ml/kg)使心脏停搏 60 min,4 ℃

K-H 液保护心脏,停搏 30 min 时半量复灌 Thomas 液(4 ℃, 10 ml/kg),60 min 时使用 37 ℃ K-H 液再灌注 30 min;Sev 组继续灌注含饱和 1.0 MAC 七氟醚的 37 ℃ K-H 液 15 min 后,注射 Thomas 液(4 ℃, 20 ml/kg)使心脏停搏 60 min,4 ℃ K-H 液保护心脏,停搏 30 min 时半量复灌 Thomas 液(4 ℃, 10 ml/kg),60 min 时使用含饱和 1.0 MAC 七氟醚的 37 ℃ K-H 液再灌注 30 min。

心律失常的监测 参照前期研究^[8],具体如下:于左心室前游离壁置入自制的单相动作电位复合电极,于再灌注即刻至灌注结束,记录离体心脏复跳时间(再灌注即刻至心脏首次跳动所需的时间)、室性心律失常(室性早搏、室性心动过速、室性颤动)发生例数和持续时间。

有效不应期的测定 采用 DF-5A 心脏刺激仪行程控刺激。于再灌注 30 min 时将心脏刺激仪的刺激电极置于左室前壁,BL-420F 生物机能实验系统记录有效不应期(effective refractory period, ERP)。发放 8 个起搏刺激波 S1 后,发放一个早搏刺激波 S2,设置 S1S1 为 250 ms, S1S2 为 250 ms, S1S2 自 250 ms 每次减少 10 ms 的幅度逐渐缩短 S1S2,当 S2 不能诱发动作电位时,将 S1S2 增加 10 ms,然后以 1 ms 负扫至 S2 不能诱发动作电位,此刻 S1S2 即为 ERP。

传导速度的测定 采用 DF-5A 心脏刺激仪行程控刺激,于再灌注 30 min 时在左室前壁安置心脏刺激仪的刺激电极,记录电极距其 3 mm,用 BL-420F 生物机能实验系统记录激动潜伏期(刺激波起点和 MAP 峰值的时间间隔);传导速度(conduction velocity, CV)=3 mm/激动潜伏期。

Cx43 和 Cx43 Ser368 蛋白相对含量的测定 程控电刺激结束后,取上述实验左心室肌,按说明书加入恰当的细胞裂解液及蛋白酶抑制剂(PMSF),冰上匀浆,采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量。根

据分子量大小,制备 12% 的分离胶,5% 的浓缩胶,上层胶电压 80 V 下层胶电压 120 V 进行电泳,200 mA 恒电流转膜 2 h,用封闭液封闭 2 h,分别孵育兔抗大鼠一抗(Cx43 抗体,1:800;Cx43 Ser368,1:1 000) 4 ℃ 过夜,次日采用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:10 000)室温孵育 1 h。ECL 显色曝光,显影。并以内参 GAPDH 蛋白条带光密度值为标准,计算 Cx43 及 Cx43 Ser368 蛋白的相对含量。

统计分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析;计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

心脏复跳时间和心律失常 C 组未发生心律失常,再灌注期间 IR 组和 Sev 组均有不同程度室早、室速及室颤等心律失常发生,其中 IR 组心律失常 6 例,1 例自动恢复正常节律;Sev 组有 2 例发生心律失常,且自动恢复正常节律。与 IR 组比较,Sev 组心脏复跳时间及心律失常持续时间明显缩短,心律失常发生率明显降低($P<0.05$) (表 1)。

表 1 两组心脏复跳时间和再灌注心律失常发生情况的比较

组别	只数	心脏复跳时间 (s)	心律失常 [例(%)]	心律失常持续时间 (min)
IR 组	8	23.60±5.20	6(75)	6.90±1.70
Sev 组	8	11.87±4.69 ^a	2(25) ^a	3.56±1.34 ^a

注:与 IR 组比较,^a $P<0.05$

程控电刺激 与 C 组比较,IR 组及 Sev 组 ERP 明显延长,CV 明显减慢($P<0.05$);与 IR 组比较,Sev 组 ERP 明显缩短,CV 明显增快($P<0.05$) (表 2)。

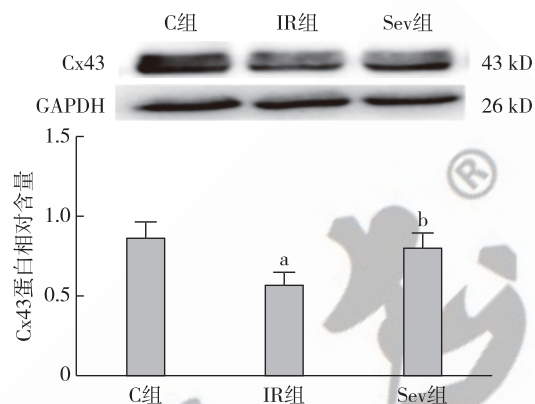
表 2 三组心室肌 ERP 和 CV 的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	ERP (ms)	CV (mm/ms)
C 组	8	41.63±0.65	0.23±0.01
IR 组	8	54.62±1.21 ^a	0.17±0.02 ^a
Sev 组	8	46.50±0.63 ^{ab}	0.21±0.02 ^{ab}

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

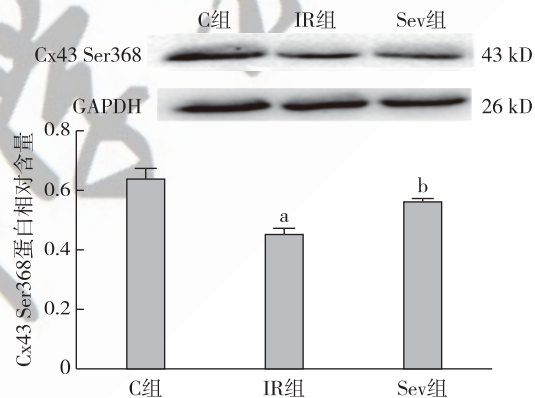
免疫印迹实验 与 C 组比较,IR 组 Cx43 及 Cx43 Ser368 蛋白相对含量明显降低($P<0.05$);与

IR 组比较,Sev 组 Cx43 及 Cx43 Ser368 蛋白相对含量明显升高($P<0.05$);C 组与 Sev 组 Cx43 及 Cx43 Ser368 蛋白相对含量差异无统计学意义(图 1—2)。



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

图 1 三组心室肌 Cx43 蛋白相对含量的比较



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

图 2 三组心室肌 Cx43 Ser368 蛋白相对含量的比较

讨 论

再灌注心律失常 (reperfusion arrhythmia, RA) 指心肌血流阻断后恢复心肌灌注所致的心律失常,可引发血流动力学紊乱甚至造成心源性猝死 (sudden cardiac death, SCD)^[9]。本实验研究结果显示,七氟醚可缩短低温全心缺血-再灌注离体心脏复跳时间、减少室性心律失常的发生。有研究表明,七氟醚可通过激活 PI3K 和 ERK1/2 信号通路及线粒体 ATP 敏感性 K^+ 通道、阻断线粒体通透性转运孔等机制降低 RA 的发生风险和减少心肌梗死面积等,从而对缺血-再灌注心肌产生保护作用^[10]。

本课题组前期研究显示,0.5 MAC、1 MAC 和 2 MAC 七氟醚对离体大鼠心肌缺血-再灌注损伤均具有保护作用,但无浓度依赖性^[2],考虑临床七氟醚

常用浓度为 1 MAC,且成年大鼠七氟醚 1 MAC 为 $(2.32 \pm 0.13)\%$ ^[11],参考既往文献^[12]和前期实验结果^[1-3],本实验选取七氟醚浓度为 2.4%,因此本研究探讨 1 MAC(2.4%)七氟醚对低温全心缺血-再灌注心脏电传导及 Cx43 Ser368 磷酸化的影响。

缺血-再灌注后心律失常的发生与心肌细胞的兴奋及传导等密切相关^[13]。ERP 是反应心肌兴奋性的重要指标。ERP 由心肌细胞膜绝对不应期和局部反应期组成,指动作电位周期中膜电位从 0 期去极化开始到 3 期复极化至 -60 mV 的时段,能反映膜的再去极化能力^[14]。一般认为,ERP 延长则期前兴奋不易产生,折返容易中断,心律失常不易发生^[15],对整个心室而言,心室肌局部 ERP 明显延长或缩短导致其离散度增大,使得心室肌处于空间分布不均匀状态,激动在传导中局部受阻而形成折返,造成心律失常。CV 则是反应心肌电传导的重要指标。CV 的减慢提示心肌细胞间传导减慢和电耦联能力下降,心肌发生心律失常风险增加。本研究结果显示,低温全心缺血-再灌注心室肌 CV 减慢、ERP 延长,导致 RA 的发生风险增加,而七氟醚可使低温全心缺血-再灌注心室肌 CV 增快、ERP 缩短,进而降低心律失常的发生。

细胞间电偶联的结构基础是 GJ,心肌缝隙连接表达和功能的异常改变导致的缓慢非均一传导均会引起心脏电活动的异常^[4]。Cx 是 GJ 的基本单位^[4-6],成年哺乳动物心室肌主要表达 Cx43^[5],Cx43 正常表达对保证心肌细胞间正常的电偶联及电传导至关重要。Cx43 含量下降约 90%可使传导速度下降 50%左右^[16]。Tse^[17]研究表明,当 Cx43 磷酸化水平在小鼠心肌细胞中表达减少 50%时,心室传导率下降 38%,心电图显示 QRS 持续时间延长。在急性心肌缺血和心肌缺血传导速度与 Cx43 降解关系的研究中发现,缺血区传导速度不均匀,在缺血区中部分区域持续存在传导阻滞,这些区域的磷酸化的 Cx43 严重降解,表明 Cx43 磷酸化的严重降解是缺血区域持续传导阻滞的重要解剖学基础^[18]。磷酸化的 Cx43 表达下调会导致传导速度下降和异质性增加,严重的降解会导致持续传导阻滞,成为诱发折返性心律失常的重要原因^[19]。本研究结果显示,低温全心缺血-再灌注心律失常心室肌组织 Cx43 及 Cx43 Ser368 的表达明显减少,而七氟醚上调 Cx43 和 Cx43 Ser368 的表达。

本研究并未在加入 Cx43 的抑制剂后观察七氟醚对再灌注心律失常的影响,这为本研究的不足之

处,有待进一步深入研究。

综上所述,七氟醚可以上调低温全心缺血-再灌注心室肌组织 Cx43 和 Cx43 Ser368 的表达,促使心室肌电传导增快、有效不应期缩短,从而降低再灌注心律失常的发生。

参 考 文 献

- [1] 何幼芹,高鸿,刘艳秋,等.低温缺血-再灌注对心房肌电稳定性的影响.临床麻醉学杂志,2019,35(11):1118-1121.
- [2] 王贵龙,高鸿,王子君,等.不同浓度七氟醚对缺血-再灌注心肌单相动作电位影响.临床麻醉学杂志,2018,34(5):478-482.
- [3] 王贵龙,高鸿,王子君,等.七氟醚对大鼠离体心脏全心缺血-再灌注心律失常及电生理的影响.临床麻醉学杂志,2018,34(12):1223-1226.
- [4] Tse G, Yeo JM. Conduction abnormalities and ventricular arrhythmogenesis: the roles of sodium channels and gap junctions. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2015, 9: 75-82.
- [5] Desplantez T. Cardiac Cx43, Cx40 and Cx45 co-assembling: involvement of connexins epitopes in formation of hemichannels and Gap junction channels. *BMC Cell Biol*, 2017, 18(Suppl 1): 3.
- [6] Elnakish MT, Canan BD, Kilic A, et al. Effects of zacopride, a moderate IK1 channel agonist, on triggered arrhythmia and contractility in human ventricular myocardium. *Pharmacol Res*, 2017, 115: 309-318.
- [7] Li WC, Gao H, Gao J, et al. Antiarrhythmic effect of sevoflurane as an additive to HTK solution on reperfusion arrhythmias induced by hypothermia and ischaemia is associated with the phosphorylation of connexin 43 at serine 368. *BMC Anesthesiol*, 2019, 19(1): 5.
- [8] Li W, Gao H, Gao J, et al. Upregulation of MMP-9 and CaMKII prompts cardiac electrophysiological changes that predispose denervated transplanted hearts to arrhythmogenesis after prolonged cold ischemic storage. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108641.
- [9] Bernikova OG, Sedova KA, Artyeva NV, et al. Repolarization in perfused myocardium predicts reperfusion ventricular tachyarrhythmias. *J Electrocardiol*, 2018, 51(3): 542-548.
- [10] Tse G, Yan BP, Chan YWF, et al. Reactive oxygen species, endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction: the link with cardiac arrhythmogenesis. *Front Physiol*, 2016, 7: 313-321.
- [11] 黄艳,杨小霖,黄三.新生及成年大鼠七氟醚 MAC 值的测定.临床麻醉学杂志,2016,32(8):803-805.
- [12] Wang C, Hu SM, Xie H, et al. Role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel-mediated PKC-ε in delayed protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated hearts of sevoflurane-preconditioned rats. *Braz J Med Biol Res*, 2015, 48(6): 528-536.
- [13] 黄芸,翁俊美,孟一迪,等.特异性抑制内向整流性钾电流对缺血再灌注心脏的保护作用.中华老年多器官疾病杂志,2018,17(10):771-774.
- [14] 查木哈格,于建设.七氟烷在大鼠心脏再灌注心律失常中的

- 作用及对心肌细胞电生理的影响. 中国老年学杂志, 2017, 37(20): 4971-4973.
- [15] Tse G, Liu T, Li G, et al. Effects of pharmacological gap junction and sodium channel blockade on S1S2 restitution properties in Langendorff-perfused mouse hearts. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 85341-85352.
- [16] Alesutan I, Voelkl J, Stöckigt F, et al. AMP-activated protein kinase $\alpha 1$ regulates cardiac gap junction protein connexin 43 and electrical remodeling following pressure overload. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(1): 406-418.
- [17] Tse G. Mechanisms of cardiac arrhythmias. *J Arrhythm*, 2016, 32(2): 75-81.
- [18] Hermans MM, Kortekaas P, Jongsma HJ, et al. pH sensitivity of the cardiac gap junction proteins, connexin 45 and 43. *Pflügers Arch*, 1995, 431(1): 138-140.
- [19] 田环环, 邓倩, 庞韵婷, 等. 七氟醚预处理对大鼠心肌缺血再灌注时紧密连接蛋白 1 的影响: 离体实验. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(10): 1263-1266.
- (收稿日期: 2020-03-31)

· 消息 ·

本刊两篇论文入选“2020 年中华医学百篇优秀论文”

为鼓励科技工作者多出科研精品和原创性研究成果,把论文写在祖国大地上,把更多优秀成果在我国科技期刊首发,助推世界一流科技期刊建设,中国科协决定继续开展中国科协优秀科技论文遴选计划。为响应第五届中国科协优秀科技论文遴选活动,中华医学会面向全国医药卫生领域期刊(不局限于中华医学会系列杂志)开展“2020 年中华医学百篇优秀论文评选活动”。第五届中国科协优秀科技论文通过专家评审将从中华医学百篇优秀论文中产生。本次优秀论文评选活动继续由中华医学会杂志社承办。

2020 年 6 月 10—24 日,本刊编辑部从 2016—2019 年所有刊出的论文中遴选出 2 篇具有较高学术和临床价值的论文,并按照要求登录“2020 年中华医学百篇优秀论文遴选平台”(http://top100.medline.org.cn)进行申报。最终,经过专家评审,天津市第三中心医院发表的论文《轻度认知功能障碍老年患者腰椎减压植骨融合术七氟醚复合丙泊酚的适宜配伍剂量》(第一作者:陈一萌,通信作者:王海云)和上海交通大学医学院附属瑞金医院发表的论文《实施加速康复外科麻醉管理对甲状腺手术应激水平的影响》(第一作者:吕卓辰,通信作者:罗艳)入选“2020 年中华医学百篇优秀论文”。

据悉,本次遴选出的“2020 年中华医学百篇优秀论文”,类别包括基础研究、临床研究及综述三类,涵盖内科、外科、妇产科、儿科、眼科、耳鼻喉、病理科、影像科、护理学等 42 个专业,涉及期刊 75 种。这是继 2017 年本刊 1 篇论文入选“中华医学百篇优秀论文”后再次有论文入选。