

· 论 著 ·

SHR 大鼠左室肥厚与室性心律失常发生的相关性研究

黄 颖¹, 伍伟锋^{2△}

(1. 广西壮族自治区民族医院心血管内科二病区, 广西南宁 530001;
2. 广西医科大学第一附属医院心血管病研究所, 广西南宁 530021)

摘 要:目的 探讨有/无左室肥厚(left ventricular hypertrophy, LVH)的自发性高血压(SHR)大鼠诱发室性心律失常(VA)的敏感性差异和意义。方法 实验分 3 组, 每组 12 只, LVH 组为已出现明显高血压和 LVH 的 16 周龄 SHR 雄性大鼠, 以出现血压升高但未发生 LVH 的 8 周龄 SHR 雄性大鼠作为非 LVH 对照组, 并以 16 周龄的 Wistar 雄性大鼠作为空白对照组(12 只); 应用 Langendorff 低钾液灌注 3 组大鼠离体心脏并全程记录心电图, 比较各组心律失常诱发率和心律失常评分的差异; 苏木素-伊红(HE)染色和胶原纤维三色染色法(Masson)染色观察左室心肌组织病理学改变和胶原容积分数(CVF)。结果 与非 LVH 对照组和空白对照组比较, LVH 组开始发生心律失常的时间更早; LVH 组室性心动过速(VT)、短暂室颤(TVF)和持续性室颤(SVF)的发生率、心律失常评分和 CVF 改变均显著大于非 LVH 对照组和空白对照组($P<0.05$), 心肌细胞明显肥大, 细胞间质增多。结论 伴有 LVH 的 SHR 大鼠 VA 发生率和严重程度明显增加, 提示 LVH 与心律失常的发生密切相关。

关键词:心律失常; 心性; SHR 大鼠; 左室肥厚; Langendorff
doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.14.004 文献标识码:A 文章编号:1671-8348(2014)14-1690-03

The correlation between the hypertrophic ventricular tissue of SHR rats and ventricular arrhythmia occurred

Huang Ying¹, Wu Weifeng^{2△}

(1. Second Department of Cardiovascular Medicine National Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning, Guangxi 530001, China; 2. Institution of Cardiology Disease, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract:Objective To explore the susceptibility differences of ventricular arrhythmia(VA) in SHR rats with/without left ventricular hypertrophy(LVH) and the significance. **Methods** The experiments were performed on isolated hearts of 8-week(the non-LVH control group, $n=12$), 16 week-old SHR(the LVH group, $n=12$) and age-matched Wistar Kyoto rats(Wistar, the blank control group, $n=12$), which were perfused in Langendorff mode with oxygenated Krebs-Henseleit solution followed by a K^+ -deficient solution. The epicardial electrocardiogram was continuously monitored during all experiments. HE staining and collagen volume fraction(CVF) was used to evaluate the condition of LVH. **Results** Compared with the non-LVH control group and the blank control group, the low K^+ induced ventricular arrhythmia occurred earlier with increased incidences and duration in the hearts of the LVH Group, the incidences of ventricular tachycardia(VT), transient ventricular fibrillation(TVF), sustained ventricular fibrillation(SVF) and CVF were higher in the hearts of the LVH Group($P<0.05$), myocardial cell hypertrophy and myocardial cells interstitial increased. **Conclusion** The ventricular arrhythmia occurred earlier with increased incidences and duration in the LVH tissue of SHR rats, which implies that LVH is associated with VA.

Key words: arrhythmia; cardiac; SHR rat; left ventricle hypertrophy; Langendorff

临床研究已明确, 约 30% 高血压患者有左室肥厚(left ventricular hypertrophy, LVH), 这类患者的心血管病病死率较无 LVH 的高血压患者高 8 倍(16% vs. 2%)^[1-2], 一个十分重要的原因在于前者容易发生室性心律失常(ventricular arrhythmia, VA), 但与之相关的基础性研究较少, 特别是有关 SHR 大鼠 LVH 与 VA 发生关系方面, 目前尚无报道。Langendorff 灌注是采用恒压或恒流方式从主动脉根部逆向用含氧灌流液灌流, 保持哺乳动物离体心脏存活从而对 VA 动物模型观察心功能的方法, 排除了神经、体液因素和心脏前后负荷等对实验的影响。本研究旨在通过观察 SHR 大鼠和对照大鼠的离体心脏在 Langendorff 灌注低钾液时诱发 VA 的敏感性差异, 从动物实验角度为 LVH 在高血压患者诱发 VA 中的作用

做进一步验证。

1 材料与方法

1.1 主要材料 7 周和 15 周的雄性 SHR 大鼠(由上海斯莱克实验动物中心提供), 用尾袖法连续无创测鼠尾动脉压 1 周, 时间均固定于 8:00~14:00, 每只大鼠在其安静状态下测量血压 3 次, 随机取血压平均值超过正常上限的大鼠各 12 只入组, 分为 16 周高血压的 LVH 组和 8 周高血压无 LVH 的非 LVH 对照组, 另购 15 周雄性 Wistar 大鼠 12 只连续测压 1 周确定血压在正常水平后作为空白对照组。Masson 染色试剂盒(上海生工); Langendorff 离体心脏灌流系统、ALC-B5 恒流泵、MPA-心功能分析系统(上海奥尔科特生物科技有限公司); MS4000U 生物信号定量记录分析系统(广州市龙飞达科技有

限公司);XD-2A 型心脏电生理诊疗仪(苏州东方电子仪器厂);针灸针电极,自制。本实验所需其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 Langendorff 离体心脏灌注 用木锤击昏动物后,迅速将心脏连同一段主动脉取出,将主动脉套进心脏插管口内固定。心脏经充氧的温 K-H 液(以 95%O₂+5%CO₂ 混合气饱和,恒温 37℃,NaCl 6.92 g/L,KCl 0.35 g/L,CaCl₂ 0.28 g/L,MgSO₄·7H₂O 0.29 g/L,KH₂PO₄ 0.16 g/L,NaHCO₃ 2.1 g/L,葡萄糖 2.0 g/L,pH 7.4)预灌流。将 2 个电极分别置于心脏心尖部和主动脉根部,连接多道生物信号记录仪。首先灌流 K-H 液 20 min 后,灌入低钾液(KCl 0.175 g/L,其余同普通 K-H 液)60 min(除非持续时间大于 2 min 的 SVF 提早出现),同时记录心脏心室内压和流出液,心电示波器全程监测并记录心电图(ECG),观察各组发生心律失常的情况。参照心律失常评分标准^[2]进行评分,并参考文献^[3]剔除不合格样本。

1.2.2 大鼠心肌组织病理学检查 将大鼠离体心脏用生理盐水冲洗吸干,将左心室游离壁心肌组织固定于 10%甲醛液中作常规石蜡切片,苏木素-伊红(HE)染色后镜检以检测大鼠心肌组织病理学改变。

1.2.3 大鼠心肌组织 Masson 染色观察左室心肌间质纤维沉积 5 μm 组织切片;常规脱蜡;苏木素染色 2 min,水洗;1%盐酸乙醇分化,流水冲洗 10 min;丽春红酸性品红染 5 min,水洗。1%磷钼酸处理 1 min;2%苯胺蓝染 1 min,1%冰醋酸浸洗 1 min;95%乙醇快速滴洗 3 次;常规脱水、透明、封片;光镜观察。计算心肌组织胶原纤维面积占整个组织面积的百分比,即胶原容积分数(CVF)=胶原面积/总面积,所有标本均取 3 个视野测量,计算其均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 ANOVA 中的 *q* 检验法;计数资料采用 Fisher 确切概率法检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Langendorff 离体心脏灌注各指标比较 Langendorff 灌注标准 K-H 液过程中,各组心率未见明显差异(*P*>0.05);灌注低钾液 1~5 min 后各组心率有所降低。灌注低钾液后,室性心动过速(ventricular tachycardia,VT)、室性早搏(ventricular premature beat,PVB)出现时间早于短暂室颤(transient ventricular fibrillation,TVF)或持续性室颤(sustained ventricular fibrillation,SVF)。灌流低钾液后,LVH 组开始出现 VA 的时间明显早于非 LVH 对照组和空白对照组(*P*<0.05)。随后,LVH 组出现 SVF 的时间(8 min 后)也明显早于非 LVH 对照组和空白对照组(18 min 后)。LVH 组的 VA 评分与非 LVH 对照组和空白对照组相比较均显著增高(*P*<0.05),见表 1。

表 1 Langendorff 离体心脏灌注各指标比较			
项目	LVH 组	非 LVH 对照组	空白对照组
入组例数(<i>n</i>)	12	12	12
收缩压(mm Hg)	186±15 ^a	150±13	110±8
舒张压(mm Hg)	120±19 ^a	90±10	76±9

续表 1 Langendorff 离体心脏灌注各指标比较			
项目	LVH 组	非 LVH 对照组	空白对照组
K-H 液预灌例数(<i>n</i>)	12	11	11
K-H 液期心率(beats/min)	275±13	265±15	258±12
低钾液期实际例数(<i>n</i>)	11	10	10
低钾液期心率(beats/min)	205±18	195±13	203±16
灌注低钾液后异常心律出现时间(min)	1.47±0.83 ^a	3.07±1.48	3.33±0.58
VA 评分(分)	4.6±0.7 ^a	3.4±1.3	3.0±1.2
VT 发生率(%)	72.7 ^a	30	30
TVF 发生率(%)	72.7 ^a	30	30
SVF 发生率(%)	63.6 ^a	20	20

^a:*P*<0.05,与非 LVH 对照组、空白对照组比较。

2.2 大鼠心肌组织病理变化 空白对照组表现为大鼠左室心肌纤维间质和细胞形态大小接近正常,胞浆染色均匀。LVH 组大鼠的心肌细胞间质增多,心肌纤维可见溶解断裂,细胞明显肥大。非 LVH 对照组病理改变介于 LVH 组和空白对照组之间。

2.3 Masson 染色观察左室心肌间质纤维沉积 LVH 组心肌内胶原组织明显增多,围绕心肌细胞的胶原纤维网断裂、排列紊乱;空白对照组肌间隙很窄,无明显胶原组织分布,相邻细胞的胶原纤维网完好,着色淡;非 LVH 对照组介于 LVH 组和空白对照组之间。LVH 组(0.30±0.05)与非 LVH 对照组(0.10±0.03)、空白对照组(0.08±0.03)比较,CVF 明显增高(*P*<0.05),表明 LVH 组大鼠左心室出现了明显重构现象,与非 LVH 对照组、空白对照组比较差异有统计学意义(*P*<0.05),非 LVH 对照组和空白对照组比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。

3 讨 论

多项临床研究证明,伴有 LVH 的高血压患者容易引发 VA,从而增加心血管事件尤其是猝死风险。Fialová 等^[4]对由 L-NAME 诱导的高血压大鼠和 SHR 大鼠 2 种模型的 Langendorff 离体心脏灌注低钾液后发现,室颤发生率均明显高于正常对照组(83.3% vs. 62.5% vs. 25%~33.3%),并伴随着连接蛋白 43(Cx43)表达降低。作者由此认为,由高血压介导的缝隙连接重构是促使恶性 VA 发生的重要因素,这为本研究提供了先证。

高血压左室重构主要表现为 LVH 和心肌纤维化,而 LVH 即心肌细胞肥厚主要表现为心肌细胞体积的增大和“胎儿化表型”的出现。SHR 大鼠的病理生理状态与人类原发性高血压非常接近,5~6 周龄时开始逐渐出现血压增高,14~16 周龄时 LVH 已明确形成并逐渐进展,是应用于高血压发病机制研究的理想动物模型。本研究采用 Langendorff 低钾液灌流对 SHR 大鼠以及正常大鼠的左室心肌组织进行 VA 的诱发后发现,LVH 组大鼠心肌间质增多,心肌细胞明显肥大。LVH 组大鼠心脏在灌流低钾液后发生各种 VA 的概率明显高于非 LVH 对照组和空白对照组,提示 K⁺ 紊乱更容易促使 LVH 心肌诱发恶性心律失常,与 Tribulova 等^[5]研究结论相一致。可能的机制为^[6]:肥厚心肌增加了细胞兴奋性和传导性,

纤维化和灶性肌溶坏死使局部心肌细胞电活动不稳定而产生折返环、室壁肥厚、耗氧量增加导致心肌复极的延缓及离散等。在此病理基础上由低钾液灌流引发急性电生理失衡时,细胞外 K^+ 浓度降低,依赖于膜电位的快钠通道失活,进一步恶化 LVH 所致心肌病理改变,导致心肌产生钙超载^[7-8]。后者能够激活 Ca^{2+} 依赖的蛋白酶 Calpains 而导致溶酶体释放^[9],还可促使 Cx43 降解增加^[10]。而 Cx43 是哺乳动物心肌缝隙连接中主要的连接蛋白之一,其数量和分布的异常正是多种 VA 发生的解剖学基础^[11]。

另一方面,本实验发现,随着低钾液灌注时间的延长, LVH 组与非 LVH 对照组、空白对照组比较,大鼠离体心脏在低钾液灌注后明显易感恶性 VA,且 VA 发生严重程度更高,起始时间更早,持续时间更长,见表 1。由此说明, LVH 不仅与心血管事件密切相关,而且还可能是急慢性心血管事件(如急性低钾血症)引发 VA 的重要背景环境,甚至可能作为心血管事件重要的预测指标。在此之前, Kannel 等^[12-13]就观察到,当个体在心脏超声下确诊 LVH 时,总病死率增加 5 倍,心血管事件病死率增加 8 倍,男性和女性的猝死率各增加 6 倍和 3 倍。在另一项多因素分析研究中^[14],有人指出男性患者左心室体积每增加 50 g/m^2 ,心血管疾病死亡的相对风险指数就增加 1.73,而女性数值为 2.12。Martins 等^[15]也发现,将 22 只正常血压和 18 只慢性高血压伴有 LVH 的犬进行左前降支冠状动脉结扎术 3 h 后,在存活下来的 8 只 LVH 犬中有 7 只和 8 只无 LVH 的正常血压犬中出现持续性单型 VA。这些研究也强烈支持本实验观点。

本研究运用 Langendorff 低钾液灌流 SHR 大鼠 LVH 离体心脏模型,结果显示伴有 LVH 的 SHR 大鼠 VA 的发生概率和严重程度较无 LVH 的 SHR 大鼠明显增加,提示 LVH 与 VA 的发生密切相关, LVH 可能正是高血压负荷下急慢性心血管事件引发 VA 的必要背景环境,进一步地确证了临床上认为伴有 LVH 的高血压患者的 VA 发生率较无 LVH 的高血压患者明显增高的观点,为 VA 发生的分子机制研究提供了可靠的数据基础。

参考文献:

- [1] Audrius A, Aleksandras L, Germanas M. Hypertension and cardiac arrhythmias[J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(25):2545-2555.
- [2] Walker MA, Curtis MJ, Hearse DJ, et al. The lambeth conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischemia, infarction, and reperfusion[J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22(7):447-455.
- [3] Rees SA, Curtis MJ. Specific IK1 blockade: a new antiarrhythmic mechanism? Effect of RP58866 on ventricular arrhythmias in rat, rabbit, and Primate[J]. *Circulation*, 1993, 87(6):1979-1989.
- [4] Fialová M, Dlugosová K, Okruhlicová L, et al. Adaptation of the heart to hypertension is associated with maladaptive gap junction connexin-43 remodeling[J]. *Physiol Res*, 2008, 57(1):7-11.
- [5] Tribulova L, Okruhlicova S, Novakova D, et al. Hypertension-related intermyocyte junction remodeling is associated with a higher incidence of low- K^+ -induced lethal arrhythmias in isolated rat heart[J]. *Exp Physiol*, 2002, 87(2):195-205.
- [6] Mclenachan JM, Dargie HJ. Ventricular arrhythmias in hypertensive left ventricular hypertrophy. Relationship to coronary artery disease, left ventricular dysfunction, and myocardial fibrosis[J]. *Am J Hypertens*, 1990, 3(10):735-740.
- [7] Blake J, Devereux RB, Herrold EM, et al. Relation of concentric left ventricular hypertrophy and extracardiac target organ damage to supranormal left ventricular performance in established essential hypertension[J]. *Am J Cardiol*, 1988, 62(4):246-252.
- [8] Polese A, De Cesare N, Fabbicchi F, et al. Coronary autoregulation in hypertension: correlation with left ventricular mass[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1990, 15(2):111.
- [9] 张家明, 李大强, 于世龙, 等. 坎地沙坦对家兔快速心房刺激所致缝隙连接蛋白 40 重构的影响[J]. *中国心脏起搏与心电生理杂志*, 2005, 19(5):385-387.
- [10] Saffitz JE, Green KG, Kraft WJ, et al. Effects of diminished expression of connexin43 on gap junction number and size in ventricular myocardium[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278(5):H1662-H1670.
- [11] Nakagami T, Tanaka H, Dai P, et al. Generation of reentrant arrhythmias by dominant-negative inhibition of connexin43 in rat cultured myocyte monolayers[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 79(1):70-79.
- [12] Kannel WB, Gordon T, Castelli WP, et al. Electrocardiographic left ventricular hypertrophy and risk of coronary heart disease. The Framingham study[J]. *Ann Intern Med*, 1970, 72(6):813-822.
- [13] Kannel WB. Prevalence and natural history of electrocardiographic left ventricular hypertrophy[J]. *Am J Med*, 1983, 75(3A):4-11.
- [14] Levy D, Garrison RJ, Savage DD, et al. Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study[J]. *N Engl J Med*, 1990, 322(22):1561-1566.
- [15] Martins JB, Kim W, Marcus ML, et al. Hypertrophy facilitate induction of sustained ventricular tachycardia in dogs 3 hours after left circumflex coronary artery occlusion[J]. *J Am Coll Cardiol*, 1989(14):1365-1373.