

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.17.010

## 犬窦房结功能与年龄相关性研究

李强<sup>1</sup>, 邓松柏<sup>2</sup>, 余强<sup>2△</sup>, 梁晓芳<sup>1</sup>, 丁玲新<sup>1</sup>, 谭宪华<sup>1</sup>

(1. 重庆市南川区人民医院心内科 408400; 2. 重庆医科大学附属第二医院心内科 400010)

**[摘要]** **目的** 测定犬窦房结功能及其组织学的增龄性变化,初步探讨老年病态窦房结综合征形成的潜在机制。**方法** 分别检测幼年组(1~3个月龄)、成年组(2~5岁)和老年组(8~10岁)的杂交犬(1~25 kg, n=4)的窦房结功能,利用 HE 及 Masson 染色鉴定窦房结组织学变化。**结果** 犬窦房结功能随年龄递增而递减,固有心率(IHR)幼年组(167±11)次/min,成年组(119±9)次/min,老年组(85±7)次/min 组间差异有统计学意义( $P<0.05$ );校正窦房结恢复时间(CSNRT)幼年组(59±11)ms,成年组(122±27)ms,老年组(176±40)ms 组间差异有统计学意义( $P<0.05$ );犬窦房结组织中窦房结细胞数目随着年龄的增加而逐渐减少,窦房结间质随年龄增加而递增。**结论** 犬窦房结功能呈增龄性减退的现象,其可能与窦房结细胞数目减少及间质逐渐增多有关。

**[关键词]** 窦房结;病窦综合征;功能恢复**[中图分类号]** R541**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)17-2333-02

## The relationship between age and sinus node function and histology in dogs

Li Qiang<sup>1</sup>, Deng Songbai<sup>2</sup>, She Qiang<sup>2△</sup>, Liang Xiaofang<sup>1</sup>, Ding Lingxin<sup>1</sup>, Tan Xianhua<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, People's Hospital of Nanchuan District, Chongqing 408400, China;

2. Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the possible mechanism of sick sinus syndrome in the elderly by evaluating the age-related changes in dog's sinus node function and histology. **Methods** Evaluate the sinus node function of hybrid dogs(1 to 25 kg, n=4) in youth group(1 to 3 months), adult group(2 to 5 years) and elderly group(8 to 10 years) respectively, and determine histological changes by Masson staining. **Results** Sinus node function in dogs declined with age. Intrinsic heart rate was (167±11)/min in youth group, adult group was (119±9)/min, elderly group was (85±7)/min ( $P<0.05$ ), corrected sinus node recovery time was (59±11)ms in youth group, adult group was (122±27)ms, elderly group was (176±40)ms ( $P<0.05$ ). Sinoatrial node pacemaker cells in dogs decreased with age while sinoatrial interstitial cells increased. **Conclusion** Sinus node function declined with age, and this maybe caused by decreasing of sinoatrial node pacemaker cells and increasing of interstitial cells.

**[Key words]** sinoatrial node; sick sinus syndrome; recovery of function

窦房结在心脏传导系统中自律性最高,是正常心脏电活动的起搏点。窦房结起搏细胞自律性地产生动作电位并经传导系统到达心肌细胞而控制心脏的节律性收缩。病态窦房结综合征(sick sinus syndrome, SSS)是指由于窦房结及其邻近组织病变引起窦房结起搏功能和(或)窦房传导功能障碍,从而引起一系列心律失常及临床症状的一组综合征。临床研究表明 SSS 的发病率随着年龄的增加而增加,并以老年人群为甚<sup>[1]</sup>。目前研究发现窦房结功能呈增龄性递减与窦房结的重构相关<sup>[2-3]</sup>。本研究通过观察不同年龄组犬的窦房结功能及组织学的变化来探讨窦房结功能增龄性减退的可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 雌雄不拘的健康杂交犬共 12 只,幼年组(1~3个月龄)、成年组(2~5岁)和老年组(8~10岁)各 4 只(1~25 kg, n=4)。实验过程中对动物的饲养及取材均遵守实验动物管理与保护的有关规定。采用 LEAD2000 B 多道电生理记录仪(四川锦江通用实业有限公司)测定犬的窦房结功能。

**1.2 窦房结功能的测定** 以 3% 戊巴比妥钠按 30 mg/kg 经腹腔注射。经颈静脉插管置鞘,将 6F 四极电极导管尖端朝向右侧进入心腔,根据心内电生理图来调整导管的位置,当心内

电生理图显示 A 波明显时可有效刺激。固有心率(intrinsic heart rate, IHR)的测定:在心内程序刺激之前给予阿托品(0.04 mg/kg)及美托洛尔(0.1 mg/kg)静脉注射,记录药物注射 5~10 min 后最高最稳定的心率,即为 IHR。窦房结恢复时间(sinus node recovery time, SNRT)及校正的窦房结恢复时间(correct sinus node recovery time, CSNRT)的测定:在心房用 S1S1 250~500 ms 的刺激频率连续刺激 30 s,记录最后一个刺激脉冲 S1 的起点到第一个恢复 A 波的起点为 SNRT。用 SNRT 减去该次刺激前的窦性周期长度,即为 CSNRT。

**1.3 窦房结的取材及免疫组织化学 Masson 染色** 窦房结功能测定完毕后,即刻用空气栓塞法处死动物,无菌操作下取出心脏,沿冠状沟去除心室部分,保留冠状沟以上的组织,分辨出右房、腔耳角(上腔静脉与右心房相接处的夹角)、界沟等解剖位置,以腔耳角上方 0.5 cm 为起点,界沟为中线,取宽约 1.0 cm,长约 2.0 cm 的组织块即为窦房结组织,用 4% 多聚甲醛固定。按窦房结长轴(界沟走行方向)连续进行横切石蜡切片,片厚 10 μm,每 5 张为一组,行 Masson 染色。利用 Image-pro Plus 6.0 图像分析系统,高倍镜下随机选取 5 个视野(×400),统计每高倍视野窦房结间质所占比例,每高倍视野窦房结间质

比例(%)=(每高倍视野窦房结间质面积/每高倍视野窦房结组织面积)×100%。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用方差分析,两两间多重比较采用 *q* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

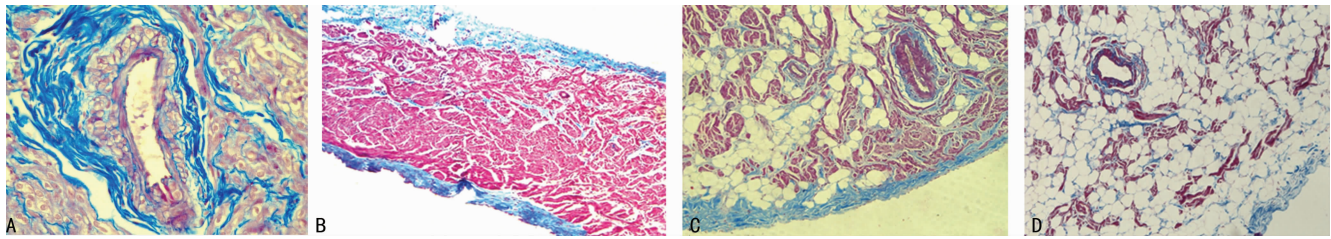
## 2 结 果

**2.1 犬窦房结功能的增龄性变化** 心内电生理检测方法测定犬窦房结功能结果显示:随着年龄的递增,犬窦房结功能呈现减退现象。IHR 逐渐降低,同时 CSNRT 逐渐增加,各组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 犬窦房结功能的增龄性变化( $\bar{x} \pm s$ )

窦房结功能	幼年组	成年组	老年组
INR(次/min)	167±11	119±9 <sup>a</sup>	85±7 <sup>ab</sup>
CSNRT(ms)	59±11	122±27 <sup>a</sup>	176±40 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ ,与幼年组比较;<sup>b</sup>:  $P < 0.05$ ,与成年组比较。



A:犬窦房结组织形态(Masson 3 色×400);B:幼年组(Masson 3 色×100);C:成年组(Masson 3 色×100);D:老年组(Masson 3 色×100)。

图 1 各年龄组窦房结组织 Masson 染色

## 3 讨 论

本实验发现犬的窦房结所在位置与其他哺乳类动物类似<sup>[4-7]</sup>,位于界嵴及上、下腔静脉之间的区域,其长轴与界嵴平行,并可以存在个体差异。光镜下发现它是由一组结构稀疏,细胞质淡染、细胞核深染的起搏细胞组成,这一组起搏细胞由胶原弹性及网织纤维包裹而形成。窦房结动脉提供窦房结的血运,其可在窦房结结构中央,也可以处于其周围。

本研究观察发现,随着年龄的递增,窦房结间质逐渐增多,窦房结功能逐渐减退,这与其组织学及电学重构相关<sup>[8]</sup>。在人体窦房结研究中发现,随着年龄增加,窦房结细胞减少,脂肪浸润加重<sup>[9]</sup>,I 型胶原纤维逐渐增加<sup>[10]</sup>,这与本研究结果相似。在窦房结退行性改变的病理学研究发现,这种组织学的重构主要与窦房结动脉硬化及脂肪浸润有关<sup>[11-12]</sup>。这一现象支持在老年病态窦房结综合征的患者中缺血因素可能是其主要原因。

此外,窦房结细胞的 4 期自动除极是多种离子通道及相应离子流参与的电活动,其中,超极化激活的环核苷酸门控的阳离子通道超极化激活环核苷酸门控通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel,HCN)通道在窦房结自动除极的作用最为显著,也是窦房结组织的特异性标志。窦房结自动除极的相关离子通道的增龄性变化也会导致窦房结功能的降低,L 型、T 型钙通道和 HCN4 通道产生的 If 电流的增龄性降低被认为是老年窦房结功能降低的主要原因<sup>[13]</sup>。也有研究发现窦房结 HCN2 及缝隙连接蛋白 cx43 表达降低也有可能是导致窦房结功能增龄性降低的原因<sup>[14-15]</sup>。

本研究发现犬窦房结在组织学及功能学上的增龄性变化

**2.2 犬窦房结组织学表现** 低倍镜下观察犬窦房结组织切片发现犬窦房结组织为形状不规则的淡染色区域,并能与窦房结周围的组织明显区分开来。窦房结表面为心外膜组织,偶尔可见少量的心房肌于窦房结组织内,其深面有较厚的心房肌组织及心内膜,也可发现一些区域的心房肌纤维可深入到窦房结组织中。供应窦房结血供的窦房结动脉大多位于窦房结组织的中央部分,也有部分位于窦房结组织的外周,窦房结动脉的管壁较厚,周围被胶原纤维所环绕,并向四周辐射。高倍镜下观察发现窦房结起搏细胞,细胞核大,约占细胞直径的 1/2 以上,呈圆形或多边形,细胞质透亮呈浅染。见图 1A。

光镜下观察各年龄组窦房结组织形态发现,窦房结起搏细胞数目在幼年组最多,间质细胞较少,并随着年龄的增长起搏细胞数目逐渐减少,而在老年组中脂肪细胞最多,起搏细胞数目较少,间质细胞随着年龄递增而呈增加的趋势[幼年组(0.20±0.03)%,成年组(0.42±0.05)%,老年组(0.59±0.05)%],差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 1B~D。

初步揭示老年性窦房结功能退化的可能原因,但仍需要进一步深入研究其潜在的分子机制。

## 参考文献

- [1] Adan V, Crown LA. Diagnosis and treatment of sick sinus syndrome[J]. Am Fam Physician, 2003, 67(8): 1725-1732.
- [2] Rose RA. Keeping the clocks ticking as we age: changes in sinoatrial node gene expression and function in the ageing heart[J]. Exp Physiol, 2011, 96(11): 1114-1115.
- [3] Yanni J, Tellez JO, Sutyagin PV, et al. Structural remodeling of the sinoatrial node in obese old rats[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(4): 653-662.
- [4] 武俊芳,郭志坤,汪艳丽,等. 家猫窦房结的光镜观察[J]. 解剖学研究, 2007, 29(6): 454-456.
- [5] 段炼,宋智钢,徐志云,等. 猪心窦房结的形态学特点[J]. 解剖学杂志, 2008, 31(6): 792-794, 798.
- [6] 吴洪海,苏庆,吴庚华,等. 毕格狗窦房结 P 细胞的形态学观察[J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2005, 26(2): 18-20, 36.
- [7] 张海东,刘帅,李亚鲁,等. 绵羊窦房结的光镜观察[J]. 中国医药指南, 2012, 10(27): 3-5.
- [8] 汪艳丽,刘如秀. 窦房结细胞结构及电生理研究进展[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2013, 27(3): 260-262.
- [9] 罗斌,宋一璇,祝家镇,等. 窦房结主、间(下转第 2337 页)

前列腺癌中有较高的突变率<sup>[16]</sup>。SPOP 作为一个抑癌基因,是否可以通过促进 Gli2 蛋白全长降解或抑制 Gli2 全长蛋白的入核,从而使得 Hh/Gli 信号通路受到抑制?

为了研究 SPOP 是否通过介导 Hh/Gli 信号通路参与胃癌的发生发展,本研究利用基因转染技术成功构建 SPOP 表达质粒 PUB6/V5-HisB-SPOP,并将其转入靶细胞胃癌 AGS 细胞系,成功构建稳定表达 SPOP 的细胞模型以便研究 SPOP 在胃癌细胞中的功能。

本研究中表达质粒采用的载体是 pUB6/V5-HisB,选择酶切位点 *Kpn* I 和 *Not* I,先 PCR 法获得 SPOP 基因全长,双酶切接入载体,成功构建表达质粒 PUB6/V5-HisB-SPOP。为了构建稳转表达 SPOP 的胃癌细胞系,将表达质粒 PUB6/V5-HisB-SPOP 转染入胃癌细胞系 AGS,根据 pUB6/V5-HisB 载体上有 BSD 耐受基因,作者选择杀稻瘟菌素进行反复筛选,以便得到稳定表达 SPOP 的同源细胞系,用于后续观察。

总之,本研究成功构建 PUB6/V5-HisB-SPOP 表达质粒,并成功筛选出稳定表达外源性人 SPOP 基因的胃癌 AGS 细胞系,为进一步研究 SPOP 对胃癌细胞生物学行为实验研究及为胃癌发生发展的研究奠定基础。

#### 参考文献

- [1] Liu J, Ghanim M, Xue L, et al. Analysis of drosophila segmentation network identifies a JNK pathway factor over-expressed in kidney cancer[J]. *Science*, 2009, 323(5918): 1218-1222.
- [2] Li C, Ao J, Fu J, et al. Tumor-suppressor role for the SPOP ubiquitin ligase in signal-dependent proteolysis of the oncogenic co-activator SRC-3/AIB1 [J]. *Oncogene*, 2011, 30(42): 4350-4364.
- [3] Zhuang M, Calabrese MF, Liu J, et al. Structures of SPOP-Substrate complexes: insights into molecular architectures of BTB-Cul3 ubiquitin ligases[J]. *Mol Cell*, 2009, 36(1): 39-50.
- [4] Han ME, Lee YS, Baek SY, et al. Hedgehog signaling regulates the survival of gastric cancer cells by regulating the expression of Bcl-2[J]. *Int J Mol Sci*, 2009, 10(7): 3033-3043.
- [5] Shiotani A, Kamada T, Yamanaka Y, et al. Sonic hedgehog and CDX2 expression in the stomach[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008, 23(2): S161-166.

- [6] Wan J, Zhou J, Zhao H, et al. Sonic hedgehog pathway contributes to gastric cancer cell growth and proliferation [J]. *Biores Open Access*, 2014, 3(2): 53-59.
- [7] Yan RW, Peng X, Yuan XG, et al. Suppression of growth and migration by blocking the hedgehog signaling pathway in gastric cancer cells[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2013, 36(5): 421-435.
- [8] Eaton S. Multiple roles for lipids in the Hedgehog signaling pathway[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008, 9C(6): 437-445.
- [9] Wang Y, McMahon AP, Allen BL. Shifting paradigms in Hedgehog signaling[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(2): 159-165.
- [10] Wilson CW, Chuang PT. New "hogs" in hedgehog transport and signal reception[J]. *Cell*, 2006, 125(3): 435-438.
- [11] Ruizi Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer [J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(9): 438-447.
- [12] Chen MH, Wilson CW, Li YJ, et al. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(16): 1910-1928.
- [13] Wang C, Pan Y, Wang B. Suppressor of fused and Spop regulate the stability, processing and function of Gli2 and Gli3 full-length activators but not their repressors [J]. *Development*, 2010, 137(12): 2001-2009.
- [14] Ruel L, Théron PP. Variations in Hedgehog signaling: divergence and perpetuation in Sufu regulation of Glii [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(16): 1843-1848.
- [15] Ding D, Song T, Jun W, et al. Decreased expression of the SPOP gene is associated with poor prognosis in glioma [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(1): 333-341.
- [16] Garcia-Flores M, Casanova-Salas I, Rubio-Briones J, et al. Clinico-pathological significance of the molecular alterations of the SPOP gene in prostate cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2014, 50(17): 2994-3002.

(收稿日期:2014-11-08 修回日期:2015-03-14)

(上接第 2334 页)

- 质形态学改变与年龄的相关研究[J]. *中华心血管病杂志*, 1995, 23(4): 288-291
- [10] 宋一璇, 胡小领, 姚青松, 等. 人窦房结胶原纤维比例与分型年龄变化的研究[J]. *解剖学杂志*, 2000, 23(4): 306-308.
  - [11] 李娜娜, 王庆志, 周立, 等. 动脉粥样硬化致兔窦房结起搏细胞和细胞间质脂质浸润[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2011, 29(4): 433-435.
  - [12] 王超群, 梁栋. 窦房结间质增生与年龄及右冠状动脉病变程度的关系[J]. *中国法医学杂志*, 2010, 25(6): 395-397.
  - [13] Larson ED, St Clair JR, Sumner WA, et al. Depressed

pacemaker activity of sinoatrial node myocytes contributes to the age-dependent decline in maximum heart rate [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(44): 18011-18016.

- [14] 杨晓梅, 杨琳, 孙超峰, 等. 兔窦房结 HCN2 通道蛋白表达的不均一性和增龄性变化[J]. *中华心律失常学杂志*, 2005, 4(4): 295-299.
- [15] 王超群, 包义喜, 陈飞, 等. 人窦房结缝隙连接蛋白 cx43 表达的增龄性变化[J]. *中国医药指南*, 2012, 10(33): 234-235.

(收稿日期:2014-10-25 修回日期:2015-02-28)