

小脑顶核电刺激对心肌梗死大鼠心肌细胞内钙超载的影响

张润峰¹, 李霞², 胡大一³, 高文根³, 魏毅东⁴, 邢燕⁴

1. 四川省绵阳市第三人民医院心血管内科, 四川绵阳 621000

2. 复旦大学附属华山医院神经内科, 上海 200040

3. 北京大学人民医院心脏中心, 北京 100044

4. 同济大学心血管中心, 上海 200092

摘要 研究预先电刺激小脑顶核 (Fastigial Nucleus Stimulation, FNS) 对心肌梗死 (Myocardial Infarction, MI) 大鼠心肌细胞钙超载的干预作用。将 SD 大鼠 90 只, 随机分为 3 组, 每组 30 只: MI 组, 仅结扎左冠状动脉前降支 (LAD); FNS 组, 预先 FNS 1h 再予以 LAD 结扎; 小脑顶核毁损组, 毁损小脑顶核 5d 后 FNS 1h, 再行 LAD 结扎; 各组又分 MI 后 1, 7, 21d 3 个亚组。另取 8 只设为假手术组。LAD 结扎 1, 7, 21d 后, 摘取心脏, 分离大鼠左室心肌细胞, 激光扫描共聚焦显微镜下观察心肌细胞内钙含量变化。结果显示, LAD 结扎 1, 7d 后, 与假手术组比较, MI 组或小脑顶核毁损组大鼠心肌细胞内钙含量均明显增加 ($P < 0.05$); 与 MI 组比较, FNS 组大鼠心肌细胞内钙含量显著减少 ($P < 0.05$); 小脑顶核毁损组与 MI 组心肌细胞钙含量比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。LAD 结扎 21d 后, 各实验组大鼠心肌细胞内钙含量比较无统计学差异。因此认为, FNS 可减少心肌梗死大鼠早期心肌细胞内钙含量, 并可能通过抑制心肌细胞的钙超载减少 MI 后大鼠死亡率。

关键词 小脑顶核; 电刺激; 心肌梗死; 钙超载

中图分类号 R541.4

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.27.002

Effects of Fastigial Nucleus Electrical Stimulation on Calcium-overload in Myocardium of Rats after Myocardial Infarction

ZHANG Runfeng¹, LI Xia², HU Dayi³, GAO Wengen³, WEI Yidong⁴, XING Yan⁴

1. Department of Cardiology, Third People's Hospital of Mianyang, Mianyang 621000, Sichuan Province, China

2. Department of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

3. Heart Center, Peking University People's Hospital, Beijing 100044, China

4. Heart, Lung and Blood Vessel Center, Tongji University, Shanghai 200092, China

Abstract Exploring the effect of Fastigial Nucleus Stimulation (FNS) on intracellular calcium overload in rats after Myocardial Infarction (MI) is taken aim at. Ninety SD rats were randomly divided into three groups with 30 rats for each group, that is, MI group, FNS group, and fastigial nucleus lesion group. In the MI group, left anterior descending artery of rats was ligated. In the FNS group, rats were pretreated with fastigial nucleus electro-stimulation for 1h, and then left anterior descending artery was ligated. In the fastigial nucleus lesion group, rats were treated with fastigial nucleus electro-stimulation for 1h after their fastigial nucleus was damaged for 5d, and then left anterior descending artery was ligated. Each group was further divided into three subgroups according to the three time points of 1, 7, and 21d, respectively after the ligation of left anterior descending artery. Eight SD rats were chosen as the sham operation group. After

收稿日期: 2011-08-01; 修回日期: 2011-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571780); 中国博士后科学基金项目 (20100471798); 绵阳市科技局科研项目 (10S1-1); 四川省卫生厅科研课题 (080210)

作者简介: 张润峰, 副主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, 电子信箱: zrfwuhai@yahoo.com.cn; 李霞 (通信作者), 副教授, 研究方向为脑神经疾病的基础与临床, 电子信箱: lixiawuhai@yahoo.com.cn

1, 7, and 21d with the ligation of left anterior descending artery, the left ventricular myocytes were isolated from rat hearts. The Ca^{2+} concentration was determined by using laser scanning confocal microscopy. The results indicate that the fluorescence intensity of the labeled intracellular Ca^{2+} in MI group and fastigial nucleus lesion group is significantly higher than that in sham-operated group at the day one and day seven after MI ($P<0.05$), however the intensity in FNS group was significantly lower than that in MI group ($P<0.05$). There is no significant difference in Ca^{2+} concentration between MI group and fastigial nucleus lesion group ($P>0.05$). At the day 21 after MI, there are no significant differences in Ca^{2+} concentration among these four groups. Therefore, it might be concluded that FNS could decrease the Ca^{2+} concentration in myocytes at an early stage after MI, and might control MI mortality by inhibiting intracellular Ca^{2+} overload.

Keywords fastigial nucleus; electrical stimulation; myocardial infarction; calcium overload

0 引言

长达 26 年的 Framingham 研究结果表明,75%的猝死为心脏性猝死(Sudden Cardiac Death,SCD),而心脏性猝死中有 88%为心律失常性猝死。目前认为,心肌细胞内钙增加的个体具有猝死的最高风险;胞浆 Ca^{2+} 浓度的改变实际上是最后的“共同通路”,联系着心脏自主神经活动的改变和恶性心律失常的发生^[1]。心肌缺血、心肌梗死时细胞内游离钙浓度增加,出现心肌细胞内钙超载,并激活多种磷脂酶,使膜磷脂分解,破坏细胞膜,从而使心肌细胞受到损伤,心肌电生理特性发生改变,导致心律失常如室颤的发生^[2]。以往的研究发现,预先电刺激小脑顶核(Fastigial Nucleus Stimulation,FNS)可促进心肌梗死(Myocardial Infarction,MI)后心脏自主神经纤维再生^[3],改善 MI 大鼠心率变异性^[4],减少 MI 大鼠死亡率^[5],揭示 FNS 有可能通过抑制心肌细胞钙超载减少 MI 后的猝死事件。因此,本研究进一步探讨 FNS 对 MI 大鼠心肌细胞钙超载的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康雄性 SD 大鼠 98 只,体重为 250—300g,购于复旦大学医学院动物中心。

1.2 仪器与试剂

激光扫描共聚焦显微镜(MRC 1024 型,美国 BioRad 公司生产);胶原酶 II(美国 Sigma 公司);Fluo23/AM 荧光染料(美国 Biotium 公司)。

1.3 造模与分组

心肌梗死模型制备:用无菌生理盐水配成 0.3%戊巴比妥钠溶液,按 1mL/100g 剂量对 SD 大鼠进行尾静脉注射浅麻醉(当大鼠呼吸减慢、肌肉松弛,即进入浅麻醉状态时,停止静

脉推药)。麻醉后气管插管辅助呼吸,于左心耳与肺动脉圆锥间距左心耳根部下 2mm 处结扎左冠状动脉前降支。以针形电极描记肢体导联心电图,I、aVL 导联 ST 段弓背向上抬高持续 0.5h 以上作为心肌梗死模型制备成功标志(图 1)。

小脑顶核电刺激:按照大鼠脑立体定位图谱,结合鼠大小进行小脑顶核定位。小脑顶核电刺激仪刺激参数为 70 μA ,直流方波脉冲,频率 50Hz,时程 0.5ms;均为浅麻醉状态下刺激左侧小脑顶核,恒定刺激 1h。实验结束后,小脑连续切片,苏木精-伊红染色,刺激部位不在小脑顶核者予以剔除。

小脑顶核毁损:使用微量进样器分别将 0.2 μL 鹅膏氨酸注入双侧小脑顶核,留针 5min。实验结束后,小脑连续切片,尼氏染色证实毁损的小脑顶核处神经元数量减少,尼氏体大量消失;否则剔除。

98 只雄性 SD 大鼠,其中 90 只随机分为 3 组,每组 30 只:(1)心肌梗死组(MI 组),单纯结扎大鼠左冠状动脉前降支(LAD);(2)小脑顶核电刺激组(FNS 组):结扎大鼠 LAD 前 1h 定位小脑顶核,预先电刺激 1h;(3)小脑顶核毁损组,先用鹅膏氨酸毁损两侧小脑顶核,5d 后电刺激小脑顶核 1h,再结扎 LAD。以上各组再分 LAD 结扎后 1,7,21d 3 个亚组进行研究,每组 10 只。另外 8 只为假手术组,开胸手术后仅在左冠状动脉前降支下穿线但不结扎,电极插入小脑顶核,但不予以电刺激。

1.4 观察指标

利用钙离子敏感探针 Fluo-3 与钙离子络合后被激发产生荧光的特点,应用激光共聚焦显微镜观察心室肌细胞内钙离子的荧光强度,应用图像分析技术进行处理。具体操作方法如下:摘取心脏后,取结扎 LAD 下方左心室部分,生理盐水压力灌注左心室,冲净血液后剪取梗死区心肌组织(0.3cm $\times$ 0.3cm),并剪碎置器皿内加入 25%胶原酶 II 5mL,分离心肌细胞。将心肌细胞于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中避光条件下用 Fluo23/AM(生理记录液稀释为 5.0 $\mu\text{mol/L}$)负载 30—60min 后,用生理记录液洗涤细胞 3 次,洗去细胞外液残余染料。Fluo23/AM 染色后的细胞,置于激光共聚焦显微镜下,通过显微镜发出 488nm 波长的氩离子激光,激发心肌细胞内与染料结合的 Ca^{2+} ,产生荧光。 Ca^{2+} 荧光图像经光电倍增管和数字传入式摄像机,输入高速计算机系统,经软件处理得到清晰的细胞内分布图像,

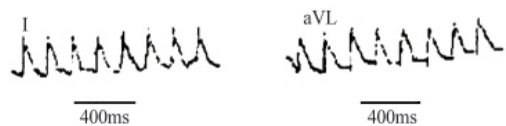


图 1 左冠脉前降支结扎后心电图改变
Fig. 1 Electrocardiograph change after the occlusion of left coronary artery

提示 FNS 可通过神经环路抑制心肌细胞钙超载。为进一步证实 FNS 对心肌细胞钙超载具有抑制作用,对大鼠双侧小脑顶核进行毁损,则以上抑制作用消失,表明小脑顶核参与对心肌细胞钙超载的神经调控机制。本研究于心肌梗死后 21d,各实验组心肌细胞内 Ca^{2+} 荧光强度与分布无显著性差异,这表明,预先 FNS 对钙超载的抑制作用不能维持到 3 周。

FNS 对心肌梗死后心肌细胞钙超载的影响机制,尚不清楚。一般认为,缺血心肌细胞内钙超载主要与氧自由基大量产生致使细胞膜受损、通透性增加、 Ca^{2+} 大量内流有关^[13]。有研究证实,FNS 具有抗缺血心肌氧化损伤的保护作用^[14]。因此,FNS 抑制心肌梗死后心肌细胞钙超载,可能与其抗心肌氧化损伤作用相关。

4 结论

FNS 可减少心肌梗死大鼠早期心肌细胞内钙含量,并可能通过抑制心肌细胞的钙超载减少 MI 后大鼠死亡率。

参考文献 (References)

- [1] 宋凌鲲, 钟杭美. 钙超载与缺血性心室颤动 [J]. 心电学杂志, 2010, 29(4): 348-351.
Song Lingkun, Zhong Hangmei. *Journal of Electrocardiology*, 2010, 29(4): 348-351.
- [2] Rubart M, Zipes D P. Mechanisms of sudden cardiac death [J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2005, 115(9): 2305-2315.
- [3] 张润峰, 陈运贞, 唐克新, 等. 电刺激小脑顶核对大鼠心肌梗死后心脏神经再生的影响[J]. 科技导报, 2006, 24(1): 27-30.
Zhang Runfeng, Chen Yunzhen, Tang Kexin, et al. *Science and Technology Review*, 2006, 24(1): 27-30.
- [4] 张润峰, 胡大一, 陈运贞, 等. 电刺激小脑顶核对心肌梗死大鼠心率变异性的作用[J]. 同济大学学报: 医学版, 2006, 27(2): 1-4.
Zhang Runfeng, Hu Dayi, Chen Yunzhen, et al. *Journal of Tongji University: Medical Science Edition*, 2006, 27(2): 1-4.

- [5] 张润峰, 高连如, 张宁坤, 等. 小脑顶核电刺激对心肌梗死大鼠死亡率及动脉压力感受性反射敏感性的影响 [J]. 山西医科大学学报, 2010, 41(7): 588-590.
Zhang Runfeng, Gao Lianru, Zhang Ningkun, et al. *Journal of Shanxi Medical University*, 2010, 41(7): 588-590.
- [6] Billman G E, Mellroy B, Johnson J D. Elevated myocardial calcium and its role in sudden cardiac death[J]. *FASEB Journal*, 1991, 5(11): 2586-2592.
- [7] Dai D Z. Vulnerable substrate and multiple ion channel disorder in a diseased heart will be new targets for antiarrhythmic therapy [J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2000, 21(4): 289-295.
- [8] Golanov E V, Zhou P. Neurogenic neuroprotection [J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2003, 23(4/5): 651-663.
- [9] 董为伟. 神经保护的基础与临床[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 197-203.
Dong Weiwei. Basic and clinical neuroprotection [M]. Beijing: Science Press, 2002: 197-203.
- [10] Zhou P, Qian L, Zhou T, et al. Mitochondria are involved in the neurogenic neuroprotection conferred by stimulation of cerebellar fastigial nucleus [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 95(1): 221-229.
- [11] 王健, 董为伟, 何为. 小脑电刺激对大鼠脑缺血早期神经元线粒体的影响[J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(1): 9-13.
Wang Jian, Dong Weiwei, He Wei. *Chinese Journal of Physical Medicine and Rehabilitation*, 2005, 27(1): 9-13.
- [12] Glickstein S B, Golanov E V, Reis D J. Intrinsic neurons of fastigial nucleus mediate neurogenic neuroprotection against excitotoxic and ischemic neuronal injury in rat [J]. *The Journal of Neuroscience*, 1999, 19(10): 4142-4154.
- [13] 田岳凤, 吴富东, 乔海法, 等. 针刺手厥阴心包经穴对心肌缺血再灌注损伤心肌细胞钙超载的影响[J]. 针刺研究, 2005, 30(3): 161-163.
Tian Yuefeng, Wu Fudong, Qiao Haifa, et al. *Acupuncture Research*, 2005, 30(3): 161-163.
- [14] 张润峰, 陈运贞. 电刺激小脑顶核防治心肌梗死后大鼠心肌氧化损伤[J]. 重庆医科大学学报, 2004, 29(3): 311-314.
Zhang Runfeng, Chen Yunzhen. *Journal of Chongqing Medical University*, 2004, 29(3): 311-314.

(责任编辑 胡兴平)

· 学术动态 ·



“第三十四届 FISITA 世界汽车工程年会”征文

中国汽车工程学会将于 2012 年 11 月 27—30 日在北京举办“第三十四届 FISITA 世界汽车工程年会”。

征文范围: 先进内燃机技术; 未来汽车动力; 先进变速器及动力传动系统; 汽车电子; 汽车设计与测试; 汽车安全技术; 先进汽车制造技术; 底盘系统与集成技术; 智能交通(ITS)与车联网; 振动噪声控制(NVH)。

全文截止日期: 2011 年 11 月 30 日。

联系电话: 010-63345809。

电子信箱: fisita2012@sae-china.org。

大会网站: <http://www.fisita2012.com/>。