

[文章编号] 1007-0893(2023)23-0004-05

DOI: 10.16458/j.cnki.1007-0893.2023.23.002

亚精胺对心肌梗死大鼠心肌保护的研究

黄宏亮 黄满香

(井冈山大学附属医院, 江西 吉安 343000)

[摘要] **目的:** 观察亚精胺对心肌梗死大鼠心肌缝隙连接蛋白 43 (Cx43) 表达的影响, 同步分析对应的心肌保护机制。**方法:** 24 只雄性 SD 大鼠被随机划分为假手术组、心肌梗死模型组、模型+亚精胺组, 每组 8 只大鼠。通过冠状动脉前降支在体结扎手法, 成功构建急性心肌梗死的动物模型。假手术组大鼠在左心耳下 2 mm 位置过线但不结扎, 其余操作同心肌梗死模型组; 假手术组和心肌梗死模型组大鼠术后给予普通饮用水 4 周; 模型+亚精胺组大鼠术后给予含亚精胺 (浓度 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 饮水 4 周。采用免疫组化方法检测 Cx43 在各组中分布特征; 采用蛋白印迹技术检测 Bcl2 关联 X 蛋白 (Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (Bcl-2)、半胱天冬蛋白酶-3 (Caspase-3) 与细胞色素 C (Cytochrome C) 的蛋白表达水平。**结果:** 心肌梗死模型组 Cx43 光密度值显著低于假手术组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与心肌梗死模型组比较, 模型+亚精胺组 Cx43 光密度值明显增高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型+亚精胺组在闰盘处的 Cx43 阳性表达明显增多, 分布模式接近于假手术组。与假手术组比较, 心肌梗死模型组的 Bax、Caspase-3 与 Cytochrome C 蛋白表达水平均明显升高, Bcl-2 蛋白表达水平明显下降, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与心肌梗死模型组比较, 模型+亚精胺组的 Bax、Caspase-3 与 Cytochrome C 蛋白表达水平明显降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但两组在 Bcl-2 蛋白表达水平上差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论:** 亚精胺能抑制心肌梗死大鼠心肌 Cx43 表达减少, 减少心律失常, 抑制心肌细胞凋亡, 保护心肌。

[关键词] 心肌梗死; 亚精胺; 缝隙连接蛋白 43; 心肌保护; 实验动物; 大鼠

[中图分类号] R 542.2² **[文献标识码]** A

Study on Myocardial Protection of Spermidine in Rats with Myocardial Infarction

HUANG Hongliang, HUANG Manxiang

(Affiliated Hospital of Jinggangshan University, Jiangxi Ji'an 343000)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of spermidine on the expression of connexin 43 (Cx43) in the myocardium of rats with myocardial infarction, and to analyze the corresponding myocardial protective mechanisms simultaneously. **Methods** Twenty-four male SD rats were randomly divided into sham operation group, myocardial infarction model group, and model + spermidine group, with 8 rats in each group. An animal model of acute myocardial infarction was successfully constructed through in vivo ligation of the anterior descending coronary artery. The rats in the sham operation group passed the line 2 mm below the left atrial appendage without ligation, and the other operations were the same as those in the myocardial infarction model group. The rats in sham operation group and the myocardial infarction model group were given ordinary drinking water for 4 weeks after surgery, the rats in the model + spermidine group underwent surgery were given drinking water containing spermidine (concentration $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) for 4 weeks. Immunohistochemistry was used to detect the distribution characteristics of Cx43 in each group. Western blotting was used to detect the protein expression levels of Bcl2-associated X protein (Bax), B lymphoma-2 gene (Bcl-2), Caspase-3 and Cytochrome C. **Results** The Cx43 optical density value of the myocardial infarction model group was significantly lower than that of the sham operation group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the myocardial infarction model group, The Cx43 optical density value of the model + spermidine group was significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The positive expression of Cx43 in the intercalary disc increased significantly in the model+spermidine group, and the distribution pattern was close to that of the sham operation group. Compared with the sham operation group, the protein expression levels of Bax, Caspase-3 and Cytochrome C in the myocardial infarction model group were significantly increased, and the expression level of Bcl-2 protein was significantly decreased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with

[收稿日期] 2023 - 10 - 22

[基金项目] 吉安市指导性科技计划项目 (20233-043647)

[作者简介] 黄宏亮, 男, 主治医师, 主要研究方向是冠心病的诊断和治疗。

the myocardial infarction model group, the protein expression levels of Bax, Caspase-3 and Cytochrome C in the model + spermidine group were significantly reduced, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$), but there was no statistical difference in the expression levels of Bcl-2 protein between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Spermidine can inhibit Cx43 expression, reduce arrhythmia, inhibit myocardial cell apoptosis and protect myocardium in rats with myocardial infarction.

[Keywords] Myocardial infarction; Spermidine; Connexin 43; Myocardial protection; Experimental animals; Rat

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 属冠心病的严重类型, 死亡率高, 而室性心律失常是心肌梗死患者死亡的主要原因之一。AMI 导致心肌缝隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 表达减少及分布异常^[1], 而细胞缝隙连接通道的此种变化易导致室性心律失常的发生^[2], 定向地改变 Cx43 的表达可减少心律失常的发生^[3-5]。在哺乳动物细胞里富含的亚精胺是一种天然的多胺化合物。除了促进细胞增殖和修复, 它还涉及多种生理和病理条件下的细胞行为, 能够抵抗各类疾病^[6]。有研究表明, 亚精胺能够强化细胞自噬作用, 并在抗氧化、抗炎和抗细胞迁移方面展示优良效果, 有助于减轻由心肌梗死引发的心肌和心脏功能损害^[7]。然而, 关于亚精胺是否会影响心肌梗死中 Cx43 表达的问题, 至今尚未得出明确结论。本研究试图证明亚精胺能抑制心肌梗死心肌 Cx43 表达减少, 减少心律失常, 保护心肌。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

亚精胺 (Sigma-Aldrich 公司, 美国), 兔抗鼠 Cx43 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程公司), HX-200 动物呼吸机 (成都泰盟科技有限公司), RM6240B 型生理实验系统 (成都仪器厂), BI-2000 图像分析系统 (成都泰盟科技有限公司)。

1.2 动物分组和模型建立

24 只雄性 SD 大鼠, 体质量 220 ~ 250 g, 随机分为 3 组, 假手术组、心肌梗死模型组和模型 + 亚精胺组, 每组 8 只, 实验动物生产许可证号: SYXK (赣) 2022-1201, 由江西大医生物科技有限公司提供。实验动物使用许可证号: SYXK (赣) 2023-0009, 饲养于井冈山大学附属医院无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级基础动物饲养房, 温度 (23 ± 2) °C、湿度 45 % ~ 50 %、12 h 光 / 12 h 暗循环中适应性饲养 1 周后用于实验, 其间大鼠自由饮水和饮食。本研究获得医院伦理委员会批准 [(2023) 伦第 (76) 号]。

假手术组: 在左心耳下 2 mm 位置过线但不结扎, 其余操作同心肌梗死模型组。心肌梗死模型组: 大鼠予 40 mg · kg⁻¹ 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 于手术台固定, 气管插管后连接小动物呼吸机, 暴露大鼠左前胸部皮肤, 做一斜切口, 分离皮下胸大、小肌, 切开肋间隙暴露心脏, 在左心耳下缘 2 mm 处用 6-0 号缝线结扎左冠状动脉, 心

电图检测记录 ST 段持续抬高表示造模成功, 关闭胸腔后撤离呼吸机, 等待大鼠复苏。造模成功后, 假手术组和心肌梗死模型组给予普通饮用水 4 周; 模型 + 亚精胺组大鼠术后给予含亚精胺 (浓度 5 mmol · L⁻¹) 饮水 4 周, 4 周后分离心肌组织。

1.3 方法

1.3.1 Cx43 免疫组化 摘取心脏, 取心肌组织, 10 % 中性甲醛溶液固定 24 h, 常规石蜡包埋, 切片, 脱蜡至水, 按试剂盒说明书进行 Cx43 免疫组化染色, 二氨基联苯胺法 (3,3'-Diaminobenzidine, DAB) 显色, 严格依照标准流程处理后放置于显微镜下进一步观察, 并于每张切片中抽取 3 个固定视野拍照, 借助 BI-2000 图像系统进行光密度值测定。于光学显微镜下观察切片上组织染色效果, 细胞内有棕黄色颗粒为阳性。

1.3.2 蛋白印迹技术检测心肌组织凋亡相关蛋白表达水平 相关蛋白包括: Bcl2 关联 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、半胱天冬蛋白酶-3 (Caspase-3) 与细胞色素 C (Cytochrome C), 首先使用放射性免疫沉淀分析缓冲液从心肌样本中提取这些蛋白质。随后, 通过 BCA 方法对获得的蛋白质浓度进行评估。经过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 把这些蛋白转移到了 PVDF 滤膜上。然后该滤膜在脱脂牛奶粉的溶液中浸泡, 并在室温下封存 4 h。之后, 加入稀释比例为 1:1000 的 Bax、Bcl-2、Caspase-3 和 Cytochrome C 特异性一抗, 并将其存放在 4 °C 环境中过夜。并于第 2 天添加 1:500 的二抗, 并在室温下孵育 1.5 h 后进行显影。最终, 采用 β-actin 作为内部参照物, 以计算目标蛋白的相对表达水平。用凝胶成像系统 (美国 Aplegen 公司) 进行拍照, 并利用 Image J 软件分析。

1.4 观察指标

(1) 心肌组织 Cx43 免疫组化表达结果; (2) Bax、Bcl-2、Caspase-3 与 Cytochrome C 蛋白表达水平。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件分析数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组之间比较采用单因素方差分析, 两组之间比较用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌组织 Cx43 免疫组化结果比较 心肌梗死模型组大鼠心肌组织 Cx43 光密度值为

(0.203 ± 0.020)，显著低于假手术组的(0.541 ± 0.013)，差异具有统计学意义(P < 0.05)；与心肌梗死模型组比较，模型+亚精胺组大鼠心肌组织Cx43光密度值(0.395 ± 0.017)明显增高，差异具有统计学意义(P < 0.05)。模型+亚精胺组在闰盘处的Cx43阳性表达明显增多，分布模式接近于假手术组，见封三图1。

2.2 各组大鼠心肌组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 与 Cytochrome C 蛋白表达水平比较

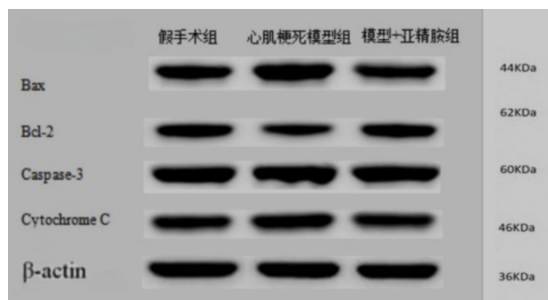
与假手术组比较，心肌梗死模型组大鼠心肌组织的 Bax、Caspase-3 与 Cytochrome C 蛋白表达水平均明显升高，Bcl-2 蛋白表达水平明显下降，差异均具有统计学意义(P < 0.05)；与心肌梗死模型组比较，模型+亚精胺组大鼠心肌组织的 Bax、Caspase-3 与 Cytochrome C 蛋白表达水平明显降低，差异均具有统计学意义(P < 0.05)，但两组大鼠心肌组织在 Bcl-2 蛋白表达水平上则无统计学意义(P > 0.05)，见表 1 和图 2。

表 1 各组大鼠心肌组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3 与 Cytochrome C 蛋白表达水平比较 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	Bax	Bcl-2	Caspase-3	Cytochrome C
假手术组	0.98 ± 0.08	0.99 ± 0.08	0.98 ± 0.05	0.98 ± 0.09
心肌梗死模型组	1.89 ± 0.24 ^a	0.59 ± 0.12 ^a	1.56 ± 0.08 ^a	1.69 ± 0.08 ^a
模型+亚精胺组	1.42 ± 0.10 ^b	0.77 ± 0.14	1.22 ± 0.06 ^b	1.28 ± 0.16 ^b

注：Bax — Bcl2 关联 X 蛋白；Bcl-2 — B 淋巴细胞瘤-2 基因；Caspase-3 — 半胱天冬蛋白酶-3；Cytochrome C — 细胞色素 C。

与假手术组比较，^aP < 0.05；与心肌梗死模型组比较，^bP < 0.05。



注：Bax — Bcl2 关联 X 蛋白；Bcl-2 — B 淋巴细胞瘤-2 基因；Caspase-3 — 半胱天冬蛋白酶-3；Cytochrome C — 细胞色素 C。

图 2 Western blot 蛋白印迹检测心肌组织凋亡相关蛋白表达水平

3 讨论

近年来，心肌梗死的发病率逐年上升。临床上 AMI 的主要临床表现为胸痛，严重的会出现呼吸困难、意识障碍等。对于 AMI 患者，及时地进行救治是非常重要的。目前对于 AMI 的治疗手段主要包括溶栓治疗、支架植入治疗和心脏搭桥手术等。但是鉴于通过手术来治疗 AMI

的成效有限，并且患者在手术后仍面临复发的高风险，因此，探索有效的药物治疗手段已经变成了临床实践的焦点。最近罗宇涛等^[8]的实验表明，亚精胺可通过抑制急性肺损伤小鼠模型肺组织核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 的激活，使 NLRP3 炎症小体的表达及活化减少，从而抑制炎症因子的表达，最终达到减轻急性肺损伤的作用。

然而，亚精胺在心肌梗死的保护作用机制尚不清楚，因此本研究主要是通过心肌梗死模型来探讨亚精胺在 AMI 大鼠中的作用机制。但是对于亚精胺通过何种途径来保护心肌，目前尚无明确结论。本研究运用了心肌梗死模型，在急性心肌梗死的大鼠样本中，中层心肌纤维的排列出现混乱，大量纤维表现出坏死性变化，同时纤维的形态结构变得模糊不清，胞核收缩，胞浆发生溶解。然而，经过亚精胺处理后，心肌梗死的面积明显缩小，并且中层的心肌纤维更为集中和有序，纤维形态相对恢复正常，仅少数心肌纤维呈现坏死性改变。作为低电阻通道，小分子物质及离子的直接交换多于细胞缝隙连接进行，其负责电耦联且协助心脏收缩同步。而十几种缝隙连接通道蛋白共同构成细胞缝隙连接通道，其中 Cx43 即为心肌细胞表达最丰富的连接蛋白。相关动物实验表明^[9]，心肌细胞持续缺血时间 30 min 后，心肌 Cx43 表达量可降低 40%；顾国萍等^[10]的研究显示，左心室心肌梗死后心肌组织中 Cx43 降解，分布紊乱；王德国等^[4]在相关研究中证实，在心肌梗死大鼠梗死区域植入经 Cx43 基因修饰的骨髓间充质干细胞，可有效提升 Cx43 蛋白表达，从而实现心肌细胞保护作用。

心律失常的发生与心肌缝隙连接功能异常密切相关，有实验通过研究 Cx43 基因剔除小鼠发现，小鼠心脏横纵向传导速度降低且均因心律失常而死亡，并证实其横向传导速度相对更低^[11]。周露等^[5]的在相关报道中同样证实，通过提升 Cx43 表达可降低猝死心律失常风险。

有报道称，匹诺布林、稳心颗粒等具有降低大鼠心律失常风险的效应，可能机制为其增强了 Cx43 对应表达^[12-13]。其中匹诺布林在抗凋亡及氧化应激方面具有显著作用，且能促进缺血心肌细胞 Cx43 的磷酸化，对进一步缩小梗死病灶、提升心功能意义重大。给予心肌瘢痕区 Cx43 基因治疗后发现，心肌梗死后室速的发生率显著降低^[14]。由此可证实，Cx43 分布及其表达水平的变化提升，可产生室性心律失常减少及心肌梗死面积缩小等对应变化，该发现为后续心肌缺血性疾病患者心肌细胞保护方案的制定提供了新方向及新思路。心肌梗死模型组大鼠心肌组织 Cx43 光密度值显著低于假手术组，差异具有统计学意义(P < 0.05)；与心肌梗死模型组比较，模型+亚精胺组大鼠心肌组织 Cx43 光密度值明显增高，差

异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型+亚精胺组在闰盘处的 Cx43 阳性表达明显增多, 分布模式接近于假手术组。

另外, 在本研究中通过蛋白印迹法检测发现, 与假手术组比较, 心肌梗死模型组大鼠心肌组织的 Bax、Caspase-3 与 Cytochrome C 蛋白表达水平均明显升高, Bcl-2 蛋白表达水平明显下降, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与心肌梗死模型组比较, 模型+亚精胺组大鼠心肌组织的 Bax、Caspase-3 与 Cytochrome C 蛋白表达水平明显降低, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 但两组大鼠心肌组织在 Bcl-2 蛋白表达水平上则无统计学意义 ($P > 0.05$), 这可能是由于心肌细胞凋亡的发生是一个复杂的过程, 不同细胞其凋亡机制也不尽相同。Bax、Bcl-2、Caspase-3 在心肌梗死后的不同时间段存在着动态变化过程^[15]。通过蛋白印迹技术发现, 与假手术组相比, 心肌梗死模型组心肌 Bax 表达水平明显增加, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。Bax 能够使心肌细胞更容易受到损伤, 而心肌细胞的损伤是导致心脏收缩和舒张功能障碍的主要原因^[16]。Bcl-2 是一种重要的调节因子, 与肿瘤的发生、发展密切相关。同时也参与了心脏发育过程中心肌细胞凋亡的调控^[17]。在细胞凋亡过程中, Bax 表达增多, 进一步使线粒体损伤, 再使 Caspase-3 激活, 而目前认为 Caspase-3 被激活, 将不可避免地发生凋亡, Caspase-3 作为一种半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶, 在凋亡通路的下游扮演着关键角色^[18]。通过蛋白印迹法检测发现, 与心肌梗死模型组相比, 模型+亚精胺组大鼠心肌 Caspase-3 表达水平明显下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。这表明亚精胺能够抑制心肌细胞的凋亡, 从而起到保护心肌的作用。Cytochrome C 是一种细胞色素 C 氧化酶, 与线粒体内膜的紧密接触会引起细胞内活性氧的增加, 从而对心肌细胞产生氧化应激损伤, 促进细胞凋亡^[19-20]。心肌梗死后, 心肌细胞中 Cytochrome C 的表达水平明显增加, 而亚精胺可以显著抑制心肌细胞中 Cytochrome C 的表达水平, 从而对心肌细胞产生保护作用。

亚精胺作为一种天然的化合物, 广泛存在于生物界多种动植物体内, 在多种食物中含有, 口服含亚精胺食物能有效增加亚精胺在血液中的含量^[21], 既往研究表明其在多种心血管疾病中有保护作用。亚精胺也可以减轻载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE) 小鼠的粥样斑块形成; 本项研究表明, 亚精胺具有抑制梗死心肌 Cx43 表达下降、降低心律不齐并对心肌提供保护的效果。在本实验中, 对心肌梗死模型进行了亚精胺的处理, 研究结果表明, 亚精胺能够有效地抑制心肌细胞的凋亡过程, 并能显著降低心肌组织中 Bax、Caspase-3、Cytochrome C 蛋白的表达水平, 从而对心肌起到保护作用。

综上所述, 研究发现亚精胺能够抑制心肌梗死大鼠

心肌 Cx43 表达减少, 减少心律失常的发生, 抑制心肌细胞的凋亡, 保护心肌。

[参考文献]

- [1] COLLI-FRANZONE P, GIONTI V, PAVARION L F, et al. Role of infarct scar dimensions, border zone repolarization properties and anisotropy in the origin and maintenance of cardiac reentry [J]. *Math Biosci*, 2019, 315: 108228.
- [2] TOTLAND M Z, RASMUSSEN N L, KNUDSEN L M, et al. Regulation of gap junction intercellular communication by connexin ubiquitination: physiological and pathophysiological implications [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77 (4): 573-591.
- [3] CHEVALIER P, MOROREAU A, BESSÈRE F, et al. Identification of Cx43 variants predisposing to ventricular fibrillation in the acute phase of ST-elevation myocardial infarction [J]. *Europace*, 2023, 25 (1): 101-111.
- [4] 王德国, 王新, 王安才, 等. Taxol 对缺氧培养大鼠心肌细胞 Cx43 蛋白表达及分布的影响 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2013, 18 (9): 975-980.
- [5] 周露, 李冰艳, 顾霞飞, 等. 丹参酮 II_A 通过 PKC/Cx43 通路减轻大鼠心肌缺血再灌注致心律失常 [J]. *药物评价研究*, 2023, 46 (12): 2617-2623.
- [6] ATIYA ALI M, POORTVLIET E, STRÖMBERG R, et al. Polyamines in foods: development of a food database [J]. *Food Nutr Res*, 2011, 55: 5572.
- [7] 颜竞. 亚精胺通过 AMPK/mTOR 通路促进心肌自噬流减轻心肌梗死大鼠心功能障碍 [D]. 广州: 南方医科大学, 2019.
- [8] 罗宇涛, 粟青, 李锐, 等. 亚精胺通过抑制 NF- κ B/NLRP3 炎症小体通路减轻 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤 [J]. *湖南师范大学学报 (医学版)*, 2023, 20 (1): 6-12.
- [9] 陈虹霖, 梁仪琳. 缝隙连接蛋白 43 与心肌缺血再灌注心律失常的研究进展 [J]. *中国临床新医学*, 2020, 13 (6): 635-638.
- [10] 顾国萍, 张丽华. Cx30.2 和 Cx45 在急性心肌梗死大鼠心脏结区组织中的表达 [J]. *中国医药导报*, 2015, 12 (6): 22-25, 30, 封 3.
- [11] KIM J C, PEREZ-HERNANDEZ M, ALVARADOL F J, et al. Disruption of Ca²⁺ homeostasis and connexin 43 hemichannel function in the right ventricle precedes overt arrhythmogenic cardiomyopathy in Plakophilin-2-deficient mice [J]. *Circulation*, 2019, 140 (12): 1015-1030.
- [12] ZHANG P, XU J, HU W, et al. Effects of pinocembrin pretreatment on connexin 43 (Cx43) protein expression after rat myocardial ischemia-reperfusion and cardiac arrhythmia [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 5008-5014.
- [13] 刘珂珂. 稳心颗粒干预 UPR 相关蛋白降解途径保护梗死大鼠 Cx43 的研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [14] ROELL W, KLEIN A M, BREITBACH M, et al. Overexpression of Cx43 in cells of the myocardial scar: Correction of post-infarct arrhythmias through heterotypic cell-cell coupling [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8 (1): 7145.