

网络出版时间: 2021-2-5 14:14 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210205.1050.012.html>

肾动脉去交感神经术对大鼠急性心肌梗死后室性心律失常的影响及相关机制的研究

肖蓉雪¹, 郝俊清², 汪 谓², 刘宗军^{1,2}

摘要 目的 研究肾动脉去交感神经术(RDN)对急性心肌梗死(AMI)后室性心律失常的影响及作用机制。方法 采用大鼠心肌梗死模型,将24只Sprague-Dawley(SD)大鼠分为4个组:对照组(Control组)、AMI组、RDN-1d+AMI组和RDN-2w+AMI组,按分组对SD大鼠进行RDN干预,饲养不同时间后建立AMI模型,术后即可采用PowerLab多导心电监护仪连续描记,监测RDN对室性心律失常发生的抑制作用。观察1h后,留取心脏组织,采用TH染色检测心脏交感神经活性。Western blot检测心肌梗死区各种离子通道蛋白的表达。用PowerLab/8SP生物信息采集仪检测肾脏交感神经活动情况。结果 与AMI组比较,RDN-1d+AMI组和RDN-2w+AMI组室性心动过速发生次数减少,差异有统计学意义($P < 0.01$),其中RDN-1d组减少次数更明显。与Control组肾脏交感神经放电情况比较,RDN-1d组和RDN-2w组下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),其中RDN-1d组效果更明显。TH染色提示RDN能够抑制AMI后心脏局部交感神经的活性。与Control组相比,AMI组Nav1.5、Cav1.2和Kir2.1蛋白表达下调,而与AMI组相比,RDN-2w+AMI组可抑制Nav1.5、Cav1.2和Kir2.1蛋白表达的下调,而RDN-1d+AMI组不能抑制上述蛋白表达的下调。结论 RDN能有效的减少AMI后室性心律失常的发生,早期主要通过抑制肾脏交感神经放电,后期通过抑制肾脏交感神经放电和离子通道蛋白上调发挥作用。

关键词 肾动脉去交感神经术;急性心肌梗死;室性心律失常;肾脏交感神经活动

中图分类号 R 541.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)03-0401-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.013

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)大多是在冠脉病变的基础上,发生冠状动脉

急性或持续性缺血缺氧所引起的心肌坏死,可并发心律失常、休克或心力衰竭,严重可危及生命。其中在AMI后发生的持续性室性快速性心律失常引起的心脏猝死占心血管死亡率的50%以上^[1]。既往研究^[2-3]表明心肌梗死后,心律失常的发生与交感神经兴奋过度及心肌细胞电生理特性改变密切相关。肾动脉去交感神经消融术(renal denervation, RDN)是近年来一种通过降低交感神经活性,抑制肾素血管紧张素醛固酮系统(renin angiotensin aldosterone system, RASS)激活治疗难治性高血压的新兴微创介入技术^[4-5]。已有研究^[6]证实RDN可减少心脏交感神经活动,并有效抑制房颤的发生,缩短房颤的持续时间。因此,RDN有望通过降低交感神经活性,抑制电重构等途径抑制心律失常的发生。该研究旨在探讨RDN对AMI后室性心律失常的影响,并进一步探究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 24只清洁型SD雄性大鼠,体重230g左右,均购于上海斯莱克实验动物有限公司,常规饲养,所有的实验程序均经上海市医学伦理委员会批准。将24只SD大鼠随机分成4组:Control组、AMI组、RDN-1d+AMI组、RDN-2w+AMI组,每组6只,建立模型作相应处理。

1.2 RDN手术模型建立 用2.5%的戊巴比妥钠溶液对SD大鼠进行腹腔注射麻醉,麻醉后大鼠平躺,固定于手术台上,备皮,用75%的酒精棉球消毒,于腹部中线做一个手术切口,用盐水浸过的无菌纱布覆盖肠子,分离双侧肾动脉,然后用溶于95%乙醇的10%苯酚溶液的无菌纱条轻轻缠绕双侧肾血管1周,尽量避免苯酚与周围脏器组织接触,1min后取出纱布^[7]。术毕,逐层缝合切口,青霉素连续注射3d预防感染,按照分组情况进行饲养;1d和2周后进行心梗造模,处死大鼠后取肾动脉进行病理检测,各组大鼠没有炎症渗出,感染不严重。

1.3 AMI模型的建立 对不同分组的SD大鼠用2.5%的戊巴比妥钠溶液进行腹腔注射麻醉,麻醉后

2020-09-27 接收

基金项目:上海市卫计委临床研究专项(编号:201840247);上海市普陀区临床优势学科建设项目(编号:2019ysxk01);中华中医药学会青年人才托举工程项目(编号:QNRC2-B03)

作者单位:¹安徽医科大学上海普陀中心临床学院,上海 200062

²上海市普陀区中心医院心内科,上海 200062

作者简介:肖蓉雪,女,硕士研究生;

刘宗军,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: 95885209@qq.com

将大鼠用橡皮筋固定在手术台上,气管插管成功后连接呼吸机。给大鼠接上电极,采用上海然哲 PowerLab 多导生理记录仪采集信号,打开心电图采集软件,设置好测量参数,然后在胸骨左侧第3肋间处开胸,显露左冠状动脉前降支,于其中远段1/3交点处进行结扎^[7],心电监护提示ST段持续弓背样抬高,提示心肌梗造模成功,连续记录1h后处死,并留取大鼠心脏组织。

1.4 组织病理学检测 取出的心脏组织标本,清洗后,一部分用4%的多聚甲醛溶液固定,包埋在石蜡中,用于酪氨酸羟化酶(tyrosine hydroxylase, TH)染色,剩余样本于-80℃下保存。

1.5 Western blot 提取心肌组织蛋白,通过 Western blot 检测心肌梗死区各种离子通道 Nav1.5、Cav1.2 和 Kir2.1 的蛋白表达水平。

1.6 肾脏交感神经活性(renal sympathetic nerve activity, RSNA)检测 用2.5%的戊巴比妥钠溶液对SD大鼠进行腹腔注射麻醉,麻醉后将大鼠右侧卧位,备皮,剪开背部皮肤,剪开皮下筋膜组织,用湿棉签钝性分离,暴露出左侧肾血管和腹主动脉,在解剖显微镜下找到左侧肾动脉和肾神经,分离肾交感神经,将游离好的肾交感神经轻放于双极银丝记录电极上,经前置放大器将记录到的放电信号放大1000倍后,通过美国 Tektronix oscilloscope 示波器和澳大利亚 Pty. Ltd. Castle Hill 生物信息采样系统 Power Lab/8SP 仪器记录信号,并分析^[8]。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 26.0 软件进行数据分析。进行方差齐性检验,正态性检验。计量资料实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单变量两组资料之间的比较采用 *t* 检验;多组资料之间的比较采用单因素方差分析;方差不齐则采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RDN 对大鼠 AMI 后室性心律失常发生的影响 通过 PowerLab 多导生理记录仪记录模型建立的过程,并观察1h,结果显示,与AMI组(331.2 ± 74.8)次/h相比,RDN-1d + AMI组[(112 ± 59.2)次/h, $F = 0.615$, $P < 0.001$]和 RDN-2w + AMI组[(151 ± 87.9)次/h, $F = 0.260$, $P = 0.003$]室性心动过速(ventricular tachycardia, VT)发生次数减少,其中 RDN-1d 组较 RDN-2w 组减少次数更明显。其中AMI组有1只大鼠发生室颤死亡,其他两组大鼠没有因室颤死亡。

2.2 肾脏交感神经活动检测 通过 Power Lab/8SP 仪器检测记录肾交感神经放电信号,与 Control 组比较,RDN-1d 组肾交感神经放电减少($F = 6.989$, $P < 0.001$),差异有统计学意义,与 Control 组比较,RDN-2w 组肾交感神经放电也减少($F = 20.216$, $P = 0.033$),其中 RDN-1d 组放电减少更明显。见图1。

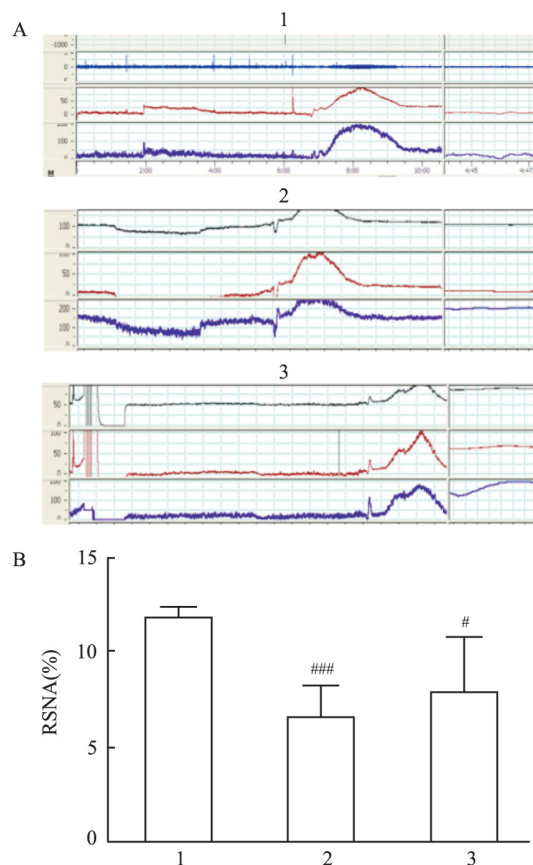


图1 RDN 对肾脏交感神经活动的影响

A: 各组肾脏交感神经电信号记录; B: 各组肾脏交感神经放电水平; 1: Control 组; 2: RDN-1d 组; 3: RDN-2w 组; 与 Control 组比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

2.3 RDN 对大鼠 AMI 后心脏神经活性的影响

酪氨酸羟化酶是儿茶酚胺合成的关键酶,分布在肾上腺素能轴突的胞质中,阳性表达可代表心脏局部交感神经的活性。通过 TH 染色法检测心脏局部交感神经活性,结果显示,AMI 组 TH 阳性表达水平高,RDN-1d 组和 RDN-2w 组 TH 阳性表达水平低。见图2。

2.4 Western blot 检测各组大鼠心肌梗死区各离子通道蛋白水平的表达结果 通过 Western blot 检测离子通道蛋白 Nav1.5、Cav1.2 和 Kir2.1 蛋白表达水平,与 Control 组 Nav1.5、Cav1.2 和 Kir2.1 水平对比,AMI 组 Nav1.5 ($F = 6.086$, $P = 0.030$)、

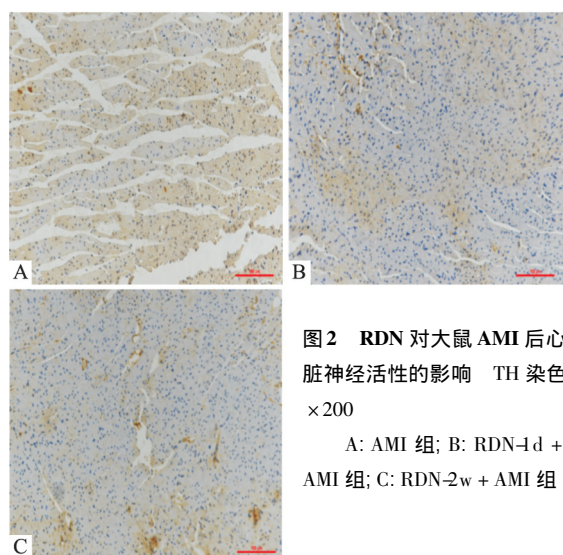


图2 RDN对大鼠AMI后心脏神经活性的影响 TH染色
×200

A: AMI组; B: RDN-1d + AMI组; C: RDN-2w + AMI组

Cav1.2 ($F=3.769$, $P=0.011$) 和 Kir2.1 ($F=0.324$, $P=0.007$) 水平下调; 与 AMI 组比较, RDN-1d 组 Nav1.5 ($F=3.933$, $P=0.136$)、Cav1.2 ($F=0.144$, $P=0.296$) 和 Kir2.1 ($F=2.067$, $P=0.133$) 水平有上调趋势, 差异无统计学意义。与 AMI 组比较, RDN-2w 组 Nav1.5 ($F=1.397$, $P=0.004$)、Cav1.2 ($F=6.464$, $P=0.027$) 和 Kir2.1 ($F=1.093$, $P=0.005$) 水平上调, 表明 RDN 能抑制 Nav1.5、Cav1.2 和 Kir2.1 蛋白表达水平的下调, 并与 RDN 治疗时间有密切关系。见图 3。

3 讨论

AMI 患者大多数并发不同程度的心律失常, 其中持续性室性心律失常是最常见的并发症, 尽管目前有多种方法可以降低心肌梗死后室性心律失常的

发生, 但室性心律失常引起的心脏猝死仍占心血管病死亡率的 50% 以上^[1]。肾动脉去交感神经术是近年来可以通过降低交感神经活性, 抑制 RASS 系统激活治疗难治性高血压的一种微创介入技术。目前有研究^[9]显示 RDN 能减少心肌梗死后室性心律失常的发生, 但相关作用机制仍不明确。在本研究中, 在大鼠发生 AMI 前进行了 RDN 术, 研究表明 RDN 组室性心动过速的发生次数明显减少, 其中 RDN 术后 1 d 组效果更显著, 实验过程中 AMI 组有 1 只大鼠发生室颤死亡, 其他 2 组大鼠没有因室颤死亡, 说明 RDN 能够抑制急性心梗后室性心律失常的发生, 从而降低死亡率。

有研究^[9]显示心肌梗死区心肌交感神经支配不均衡, 儿茶酚胺类物质的分布出现不均衡, 引起跨室壁极化离散度增加, 最终引起室性心律失常发生。该研究中, 通过肾交感神经活性检测和心脏 TH 染色法检测交感神经活性, 结果显示, 与正常组比较, RDN 组肾交感神经放电都减少, 其中 RDN-1d 组放电减少更明显。与 AMI 组比较, RDN 组 TH 阳性表达都有减少, 而 TH 在很多研究中被用来标记心脏神经纤维分布, 该研究中, 心肌梗死 1 h 后心脏交感神经纤维尚未形成, 但 TH 阳性表达增加说明 AMI 组心脏局部交感神经活性增强, 而 RDN 组心脏局部交感神经活性减弱。综上可得, RDN 通过阻断肾交感传入神经, 抑制中枢反馈机制, 从而抑制 TH 表达, 降低心脏局部交感神经活性, 最终减少室性心律失常的发生, 其中 RDN 术后早期抑制效果较后期可能更明显。

AMI 后心律失常的发生与静息膜电位的去极

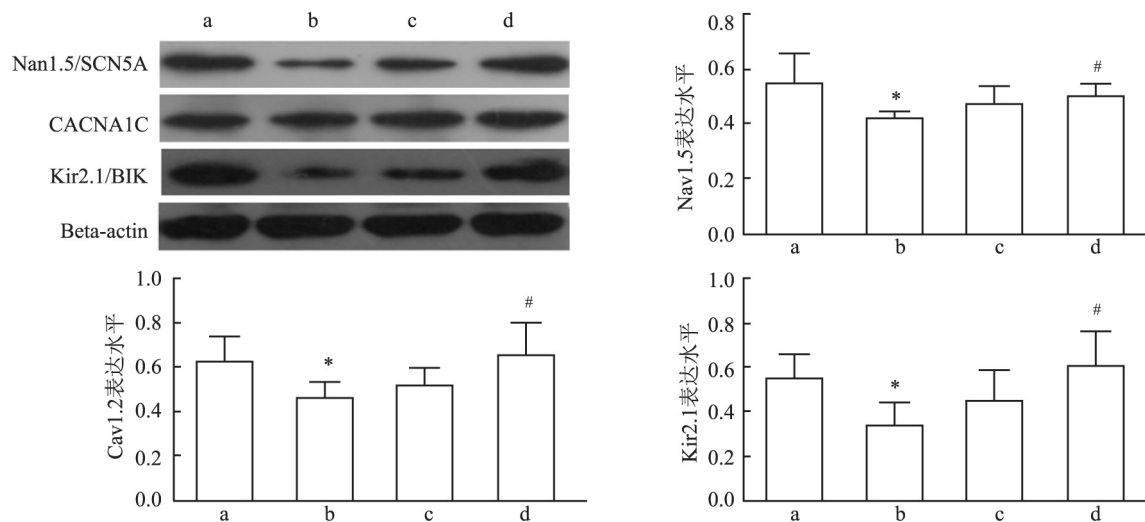


图3 RDN对大鼠心肌梗死区各离子通道蛋白表达水平的影响

a: Control组; b: AMI组; c: RDN-1d + AMI组; d: RDN-2w + AMI组; 与Control组比较: * $P < 0.05$; 与AMI组比较: # $P < 0.05$

化、动作电位的延长以及内向整流钾离子 (IK1/Kir2.1) 通道减少有关^[10-11], 其中 Ca^{2+} 和 Na^{+} 通道参与动作电位的形成。Yamada et al^[12] 在探讨 RDN 对心衰大鼠发生房颤的机制中发现 4 组大鼠 Cav1.2、Nav1.5、Kir2.1 SERCA2 和 NCX 离子通道蛋白表达相似, 没有差异性。随后在心衰缺血模型兔中发现 RDN 可以通过抑制 Cav1.2、Nav1.5、Kir2.1 和 KvLQT1 的 mRNA 表达显著下调, 抑制心肌梗死后心衰家兔模型的电重构并缩短有效不应期和动作电位时程^[13]。本研究结果提示 RDN 术后 2w 能够抑制 Nav1.5、Cav1.2 和 Kir2.1 蛋白表达水平的下调, 而术后 1d 蛋白表达没有下调, 说明 RDN 术后后期能够通过抑制离子通道蛋白的表达, 逆转电重构, 缩短有效不应期和动作电位时程, 从而抑制心梗后室性心律失常的发生。

综上 RDN 能够有效地降低 AMI 后室性心动过速的发生, 该机制可能与肾脏交感神经放电活动减少及离子通道蛋白表达的调节有关, 其中 RDN 术后 1d 肾脏交感神经放电活动减少, 蛋白表达调节变化不明显, 而 RDN 术后 2w 肾脏交感神经放电活动和蛋白表达水平调节都有改变, 说明 RDN 早期主要通过抑制肾脏交感传入神经这一途径起作用, 后期通过交感神经兴奋和离子通道蛋白两个途径同时起到抑制作用, 最终抑制 AMI 后室性心律失常的发生。

参考文献

- [1] Kolettis T M. Autonomic function and ventricular tachyarrhythmias during acute myocardial infarction [J]. *World J Exp Med*, 2018, 8(1): 8-11.
- [2] Ardell J L, Foreman R D, Armour J A, et al. Cardiac sympathectomy and spinal cord stimulation attenuate reflex-mediated norepinephrine release during ischemia preventing ventricular fibrillation [J]. *JCI Insight* 2019, 4(23): e131648.
- [3] Zipes D P, Rubart M. Neural modulation of cardiac arrhythmias and sudden cardiac death [J]. *Heart Rhythm* 2006, 3(1): 108-13.
- [4] Glybochko P V, Svetankova A A, Rodionov A V, et al. Renal denervation with a resistant arterial hypertension: the results of a five-year follow-up [J]. *Ter Arkh* 2018, 90(9): 88-91.
- [5] Sata Y, Head G A, Denton K M, et al. Role of the sympathetic nervous system and its modulation in renal hypertension [J]. *Front Med (Lausanne)*. 2018, 5: 82.
- [6] Wang W, Jiang Z, Lu R, et al. Effects of renal denervation via renal artery adventitial cryoablation on atrial fibrillation and cardiac neural remodeling [J]. *Cardiol Res Pract*, 2018, 2018: 2603025.
- [7] Hu J, Li Y, Cheng W, et al. A comparison of the efficacy of surgical renal denervation and pharmacologic therapies in post-myocardial infarction heart failure [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96996.
- [8] Tan X, Jiao P, Wang Y, et al. The phosphoinositide-3 kinase signaling is involved in neuroinflammation in hypertensive rats [J]. *CNS Neurosci Ther* 2017, 23(4): 350-9.
- [9] Jiang H, Lu Z, Yu Y, et al. Relationship between sympathetic nerve sprouting and repolarization dispersion at peri-infarct zone after myocardial infarction [J]. *Auton Neurosci* 2007, 134(1-2): 18-25.
- [10] Zhai X W, Zhang L, Guo Y F, et al. The IK1/Kir2.1 channel agonist zacopride prevents and cures acute ischemic arrhythmias in the rat [J]. *PLoS One* 2017, 12(5): e0177600.
- [11] Zhai X, Qiao X, Zhang L, et al. IK1 channel agonist zacopride suppresses ventricular arrhythmias in conscious rats with healing myocardial infarction [J]. *Life Sci* 2019, 239: 117075.
- [12] Yamada S, Fong M, Hsiao Y, et al. Impact of Renal Denervation on Atrial Arrhythmogenic Substrate in Ischemic Model of Heart Failure [J]. *J Am Heart Assoc* 2018, 7(2): e007312.
- [13] Yamada S, Lo L, Chou Y, et al. Renal denervation regulates the atrial arrhythmogenic substrates through reverse structural remodeling in heart failure rabbit model [J]. *Int J Cardiol* 2017, 235: 105-13.

Effects of renal denervation on ventricular arrhythmia after acute myocardial infarction in rats and the related mechanisms

Xiao Rongxue¹, Gao Junqing², Wang Xu², et al

(¹ Shanghai Putuo Center, Anhui Medical University, Shanghai 200062; ² Dept of Cardiology, Shanghai Putuo District Central Hospital, Shanghai 200062)

Abstract Objective To investigate the effects of renal denervation (RDN) on ventricular arrhythmia after acute myocardial infarction (AMI) and its mechanism. **Methods** Using a rat myocardial infarction model, 24 Sprague-Dawley (SD) rats were divided into four groups: the control group (Control), the AMI group, the RDN-1d + AMI group and the RDN-2w + AMI group. The SD rats were subjected to RDN intervention, and the AMI model was established after feeding for different times. PowerLab multi-channel ECG monitor was continuously recorded after surgery to monitor the inhibitory effect of RDN on the occurrence of ventricular arrhythmia. After 1 h of observation,

网络出版时间: 2021-2-5 17:04 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210205.1050.013.html>

长链非编码 RNA PVT1 对宫颈癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响

李力 郭祥翠 王倩青 李君 郝智慧

摘要 目的 探讨 PVT1 加重宫颈癌细胞的恶性生物学行为的作用机制。方法 设计 shRNA 干扰 PVT1, 接着用 sh-PVT1 单独或联合 miR-484 inhibitor 转染 SiHa 细胞, 荧光定量检测 PVT1 及 miR-484 的表达水平; 荧光素酶报告实验确定 PVT1 和 miR-484 的靶向关系; BrdU 染色检测 PVT1 对细胞生长的影响; Transwell 和划痕实验检测细胞侵袭迁移能力; Western blot 检测细胞增殖、侵袭迁移相关蛋白的表达及 p38MAPK 的磷酸化情况; 免疫荧光检测 p38 的细胞核转位情况。结果 sh-PVT1 转染能降低宫颈癌细胞 PVT1 表达水平 ($P < 0.05$), 促进 miR-484 表达 ($P < 0.05$); miR-484 inhibitor 能明显减弱 sh-PVT1 对 miR-484 表达的促进作用 ($P < 0.05$); 荧光素酶报告实验表明 PVT1 上有 miR-484 的结合位点; 干扰 PVT1 可抑制宫颈癌细胞增殖及增殖细胞核抗原-67 (Ki-67) 和增殖细胞核抗原 (PCNA) 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$); sh-PVT1 还能抑制宫颈癌细胞侵袭、迁移及血管内皮细胞生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9)、E-cadherin 的蛋白表达, 显著增强 N-cadherin 的蛋白表达 ($P < 0.05$); 此外, 抑制 miR-484 表达明显减弱 sh-PVT1 对宫颈癌细胞侵袭、迁移和上皮-间质转化 (EMT) 过程的抑制作用 ($P < 0.05$)。结论 PVT1 可通过干扰 miR-484 促进宫颈癌

细胞的生长、运动和上皮间质转化, 并诱导 p38MAPK 通路的活化, 进而加重宫颈癌细胞的恶性生物学行为。

关键词 lncRNA PVT1; miR-484; p38MAPK; 宫颈癌

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)03-0405-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.014

宫颈癌是女性生殖系统常见的恶性肿瘤, 发病率仅次于乳腺癌。在诊断时, 大多数患者已经处于疾病的中晚期, 近几年来, 年轻患者的发病率逐年上升。因此, 研究肿瘤的发生发展过程, 寻找新的治疗靶点, 已成为宫颈癌研究的重点。近年来, 随着治疗手段的进步, 提高了患者的生存率和生活质量。然而, 肿瘤复发和转移仍然是宫颈癌患者死亡的主要原因^[1-2]。

生物信息学分析已确定浆细胞瘤变异易位 1 基因 (plasmacytoma variant translocation 1, PVT1) 是胃癌、肺癌、胰腺癌和宫颈癌等多种癌症类型中少数关键功能性 lncRNA 之一^[3]。PVT1 对宫颈癌的发生发展具有调节作用, 但是, 潜在的机制尚未完全清楚。miR-484 位于 chr6 上, 最初被发现与癌症对化疗药物的耐药性有关^[4]。有研究^[5]表明 miR-484 在肝细胞癌的癌前病变中过表达, 并且可以在促进

2020-09-17 接收

基金项目: 河南省医学科技攻关计划 (编号: 201602157)

作者单位: 新乡市中心医院妇瘤科 新乡 453000

作者简介: 李力, 女, 主治医师, 责任作者, E-mail: li_fq1111@sina.com

the heart tissue was collected, and TH staining was used to detect cardiac sympathetic nerve activity. Western blot was used to detect the expression of various ion channel proteins in the myocardial infarction area. Renal sympathetic nerve activity was detected by Power Lab/8SP biological information acquisition instrument. **Results** Compared with the AMI group, the frequency of ventricular tachycardia in the RDN-1d + AMI group and RDN-2w + AMI group reduced, the difference was statistically significant ($P < 0.01$), and the decrease in the RDN-1d group was more obvious. Compared with the sympathetic nerve discharge in the Control group, the RDN-1d group and the RDN-2w group decreased, the difference was statistically significant ($P < 0.01$), and the RDN-1d group was more effective. TH staining suggested that RDN could inhibit local sympathetic nerve activity after AMI. Compared with the control group, the protein expressions of Nav1.5, Cav1.2 and Kir2.1 in the AMI group were down-regulated, while compared with the AMI group, the RDN-2w + AMI group could inhibit the down-regulation of Nav1.5, Cav1.2 and Kir2.1 protein expression, while the RDN-1d + AMI group could not inhibit the down-regulation of protein expression. **Conclusion** RDN can effectively reduce the occurrence of ventricular arrhythmias after AMI. In the early stage, it mainly inhibits renal sympathetic nerve discharge, and later inhibits renal sympathetic discharge and ion channel protein upregulation.

Key words renal denervation; acute myocardial infarction; ventricular arrhythmia; renal sympathetic nerve activity