

下丘脑腹内侧核激活对大鼠急性心肌梗死后心脏电活动的影响

许晓 李泽衍 周雨扬 聂鹂庆 江洪

(武汉大学人民医院心内科 武汉大学心脏自主神经研究中心 武汉大学心血管病研究所 心血管病湖北省重点实验室,湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 探究激活下丘脑腹内侧核(VMH)对大鼠急性心肌梗死(AMI)后心脏电活动的影响。**方法** 将15只大鼠随机分为对照组、心肌梗死(MI)组和激活组,每组5只。激活组在VMH区域注射化学遗传激活病毒 rAAV-hSyn-hM3d(Gq)-EGFP-WPRE-pA2/2,MI组在VMH区域注射空载病毒 rAAV-hSyn-EGFP-WPRE-pA2/2。病毒注射3周后,各组接受氯氮平-N-氧化物腹腔注射2周。病毒注射5周后建立AMI模型。对照组大鼠接受假手术处理。造模24h后,测量各组大鼠心电图以及左心室有效不应期(ERP)。取大鼠脑组织冰冻切片做免疫荧光染色,观察大鼠VMH区域荧光蛋白表达情况,测量各组大鼠VMH c-fos表达量。**结果** (1)MI组和激活组VMH c-fos表达量均显著高于对照组,且激活组VMH c-fos表达量显著高于MI组(激活组 vs MI组: 25.39 ± 5.16 vs 18.76 ± 3.52 , $P < 0.05$)。(2)与对照组相比,MI组与激活组心率变异性频域分析指标低频功率(LF)升高,高频功率(HF)降低,LF/HF比值升高;与MI组相比,激活组LF升高,HF降低,LF/HF比值升高。上述结果均有显著统计学差异($P < 0.01$)。(3)与对照组相比,MI组PR间期、QRS波群时限升高,但结果无显著性差异;MI组QT间期显著延长($P < 0.01$)。与MI组相比,激活组PR间期、QRS波群时限和QT间期均显著延长($P < 0.05$)。(4)在电生理实验结果显示,MI组和激活组左心室心尖部、心中部和心底部ERP均显著降低,且激活组ERP显著低于MI组($P < 0.05$)。**结论** 激活VMH可加重大鼠AMI后心脏电活动紊乱。

【关键词】 下丘脑腹内侧核;化学遗传;心肌梗死;心脏电活动

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2022.04.021

Effect of Ventromedial Hypothalamic Nucleus Activation on Cardiac Electrical Activity After Acute Myocardial Infarction in Rats

XU Xiao, LI Zeyan, ZHOU Yuyang, NIE Liqing, JIANG Hong

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiac Autonomic Nerve Research Center of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of ventromedial hypothalamus nucleus (VMH) activation on cardiac electrical activity after acute myocardial infarction (AMI) in rats. **Methods** A total of 15 rats were randomly divided into control, myocardial infarction (MI) and activated groups, with 5 in each group. The activated group was injected with chemical genetic virus rAAV-hSyn-hM3d(Gq)-EGFP-WPRE-pA2/2 in VMH region, and the MI group injected with empty virus rAAV-hSyn-EGFP-WPRE-pA2/2. 3 weeks after virus injection, all rats received intraperitoneal injection of clozapine-N-oxide for 2 weeks. AMI model was established and the rats in the control group received sham operation. 24 hours later, ECG and left ventricular effective refractory period (ERP) were recorded. Brains were frozen-sectioned for immunofluorescence staining. Expressions of fluorescent proteins and c-fos were measured. **Results** (1) The expressions of c-fos were significantly higher in MI and activated groups than control group, and higher in activated group than MI group (activated group vs MI group: 25.39 ± 5.16 vs 18.76 ± 3.52 , $P < 0.05$). (2) Compared with control group, low frequency power (LF) of heart rate variability index was increased in MI and activated groups, and high frequency power (HF) decreased, the ratio of LF/HF increased. Compared with MI group, LF was increased in activated group, and HF decreased, the ratio of LF/HF increased. There were significant differences on above results ($P < 0.01$). (3) Compared with control group, PR interval and QRS wave duration were increased in MI group, yet with no significant difference ($P > 0.05$), and QT interval prolonged ($P < 0.01$). Compared with MI group, PR interval, QRS wave duration and QT interval were prolonged in activated group ($P < 0.05$). (4) The results of electrophysiological experiments in vivo showed that ERP of the left ventricular apex (LVA), the left ventricular base (LVB), and the median area between the LVA and the LVB in MI group and activation group were

基金项目:国家自然科学基金(81970287)

通信作者:江洪, E-mail: hong-jiang@whu.edu.cn

significantly shorter and ERP were obviously shorter in activated groups than MI group ($P < 0.05$). **Conclusion** The activation of VMH may aggravate the disturbance of cardiac electrical activity after AMI in rats.

[Key words] Ventromedial hypothalamic nucleus; Chemogenetic; Myocardial infarction; Cardiac electrical activity

中国的心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 发病率正逐年升高, 2016 年中国有近 400 万人死于 CVD^[1]。根据全球疾病负担研究^[2], 高血压、高血脂、吸烟、高体重指数和高空腹血糖等 CVD 传统危险因素每年可导致 50 万 ~ 200 万人死于 CVD。除了传统危险因素, 负面情绪状态在 CVD 的发生与发展中起着重要作用^[3]。已有大量研究^[4]表明, 抑郁、焦虑等负面情绪可通过影响自主神经系统、诱发炎症反应和改变血管内皮功能等途径增加心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 的发生风险。

下丘脑腹内侧核 (ventromedial hypothalamic nucleus, VMH) 是下丘脑的亚核, 也是大脑中调控能量代谢和情绪的关键脑区^[5-6]。有研究^[6-7]表明, VMH 与抑郁、焦虑和惊恐等情绪的产生相关。另有文献表明, VMH 可调控自主神经系统, 激活 VMH 可增加交感神经活性^[8-10], 而交感神经过度激活可诱发室性心律失常及心源性猝死^[11]。然而, 鲜有文献记载 VMH 活性与心律失常间的直接关系。

本研究旨在探讨化学遗传激活 VMH 后对大鼠急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 后心脏电活动的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

15 只雄性健康 Sprague-Dawley 大鼠 (220 ~ 250 g) 均由武汉大学动物实验中心提供。所有动物都饲养在 12 h 光照-黑暗循环下温度可控的环境中 [温度 (24 ± 2) °C]。对所有动物进行 7 d 的适应性饲养后, 完全随机分为对照组、MI 组和激活组, 每组 5 只。所有实验步骤均经武汉大学人民医院动物福利伦理委员会批准。

1.2 VMH 化学遗传激活

MI 组和激活组大鼠在禁食 12 h 后以 40 mg/kg 体重经腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉。大鼠麻醉后俯卧位固定于大鼠立体定位仪 (深圳瑞沃德生命科技有限公司), 在头皮上沿正中中线开口充分暴露颅骨。参考 Paxinos & Watson 大鼠脑图谱, 以前囟为坐标原点定位大鼠 VMH (前后: 前囟后 2.85 mm; 旁开: 中缝外侧 0.6 mm; 深度: 颅骨表面以下 9.0 mm)。使用 10 μL Hamilton 注射器, 以 20 nL/min 的速度将 100 nL 腺相关激活病毒 [rAAV-hSyn-hM3d (Gq)-EGFP-WPRE-pA2/2, 武汉枢密脑科学技术有限公司] 注射至

激活组大鼠双侧 VMH。MI 组以相同速度、体积注射腺相关空载病毒 (rAAV-hSyn-EGFP-WPRE-pA2/2, 武汉枢密脑科学技术有限公司)。注射完成后, 注射器在原位置停留 5 min, 然后缓慢拔出。病毒注射 3 周后, 所有大鼠均接受 3.3 mg/kg 体重浓度氯氮平-N-氧化物 (clozapine-N-oxide, CNO) (武汉枢密脑科学技术有限公司) 腹腔注射, 持续 2 周。

1.3 AMI 模型建立

MI 组和激活组大鼠在 CNO 腹腔注射 2 周后, 建立 AMI 模型。术前禁食 12 h, 以 40 mg/kg 浓度腹腔注射 2% 戊巴比妥钠实施麻醉。以仰卧位固定于实验台上, 连接至小动物呼吸机予以正压通气。经左前胸暴露心脏, 结扎左冠状动脉造成 MI。观察大鼠心电图 ST 段变化及心肌组织颜色变化。心电图出现 ST 段抬高及心肌组织由红色变为白色视为造模成功。对照组大鼠经左前胸暴露心脏后关闭胸腔, 不结扎冠状动脉。

1.4 体表心电图记录

MI 造模后 1 d, 对大鼠进行体表心电图测量。40 mg/kg 体重腹腔注射 2% 戊巴比妥钠溶液麻醉。颈部和胸前区备皮消毒, 仰卧位固定于操作台, 行气管插管术并连接呼吸机正压通气, 大鼠四肢用针刺电极连接 Powerlab 数据采集系统记录心电图, 利用 Labchart 8.0 分析 PR 间期、QRS 波群时限和 QT 间期以及心率变异性频域指标 [低频功率 (low frequency, LF)、高频功率 (high frequency, HF) 及 LF/HF 比值]。

1.5 有效不应期

经左前胸暴露心脏, 在以下心外膜部位测量心室有效不应期 (effective refractory period, ERP): 左心室心尖部 (left ventricular apex, LVA)、左心室心底部 (left ventricular base, LVB) 和左心室心中部 (the median area of left ventricle, LVM)。用 Powerlab 可编程多通道刺激器对上述部位进行程序电刺激。程序电刺激由 8 个连续周长为 100 ms 的 S1S1 刺激外加 1 个 S2 刺激组成, S1S2 间期从 100 ms 开始, 以 10 ms 递减, 接近 ERP 时以 2 ms 递减, 直至达到 ERP。ERP 定义为不能夺获心室的最长 S1S2 间期。

1.6 免疫荧光

取材, 将脑组织快速取下, 浸泡在多聚甲醛中固定。脱水后使用冰冻切片机取 VMH 脑区 5 μm 冠状面冰冻切片, 冰冻切片 37 °C 烘箱烘烤 10 min, 控干水

分。置于 4% 多聚甲醛固定 30 min,于磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。再将组织切片置于盛满乙二胺四乙酸抗原修复缓冲液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复。自然冷却后将玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈,甩干 PBS,滴加牛血清白蛋白,封闭 30 min 后甩掉封闭液,在切片上滴加 c-fos 一抗 (GB11069,武汉赛维尔生物科技有限公司),切片平放于湿盒内 4 °C 孵育过夜。而后将玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加荧光二抗覆盖组织,避光室温孵育 50 min。再将玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染液,避光室温孵育 10 min。再将玻片置于 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5 min。在圈内加入自发荧光淬灭剂 5 min,流水冲洗 10 min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。最后在显微镜下观察荧光表达情况。

1.7 统计学方法

本实验所有数据均以平均数 ± 标准差表示。采用 GraphPad 9.0 进行统计学分析与作图。先对所有计量数据进行 Kolmogorov-Smirnov 检验以明确是否符合正态分布。两组比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析。不符合正态分布的数据采用非参数检验分析。将 $P < 0.05$ 定义为差异具有统计学意义。

2 结果

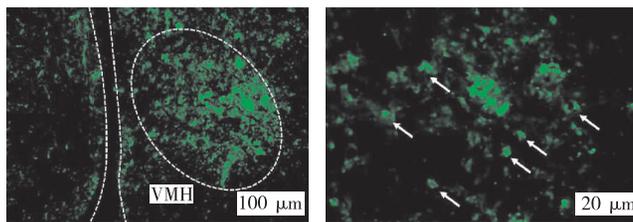
2.1 化学遗传激活 VMH

MI 组和激活组大鼠经化学遗传病毒及 CNO 注射后,VMH 脑区可见携带绿色荧光蛋白的病毒表达 (图 1)。对三组大鼠 VMH 神经元活性进行比较,发现 MI 组和激活组 VMH c-fos 表达量均显著高于对照组,且激活组 VMH 神经元活性显著高于 MI 组 (c-fos 标准化计数,激活组 vs MI 组: 25.39 ± 5.16 vs 18.76 ± 3.52 , $P < 0.05$) (图 2A 和图 2B),结果提示 VMH 被化学遗传激活,且激活组 VMH 神经元活性显著升高。

2.2 VMH 激活改变大鼠心率变异性

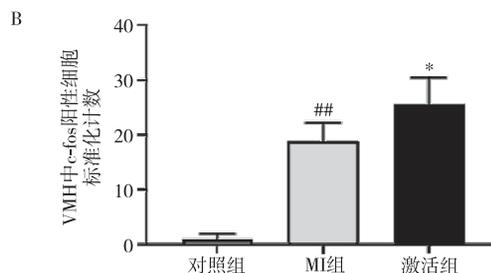
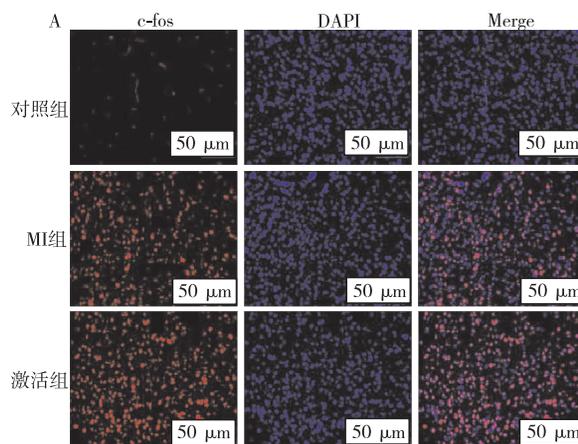
对三组大鼠体表心电图进行测量,分析心率变异性。与对照组相比,MI 组与激活组 LF 升高, HF 降低, LF/HF 比值升高;与 MI 组相比,激活组 LF 升高, HF 降低, LF/HF 比值升高。上述结果均有显著统计学差异 ($P < 0.01$) (表 1)。对三组大鼠心电图指标进行进一步分析,发现与对照组相比,MI 组 PR 间期、QRS 波群时限升高,但结果无显著性差异;MI 组 QT 间期显

著延长 ($P < 0.01$)。与 MI 组相比,激活组 PR 间期、QRS 波群时限和 QT 间期均显著升高 ($P < 0.05$) (表 2)。



注:左图为 100 μm 视野下转染化学遗传病毒 rAAV-hSyn-hM3d (Gq)-EGFP-WPRE-pA2/2 后局部脑区增强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 荧光图,白色椭圆虚线为 VMH;右图为 20 μm 视野下转染化学遗传病毒 rAAV-hSyn-hM3d (Gq)-EGFP-WPRE-pA2/2 后局部脑区 EGFP 荧光图,白色箭头所指为转染化学遗传病毒后表达 EGFP 的神经细胞。

图 1 VMH 中化学遗传病毒表达情况



注:A 为 50 μm 视野下各组 VMH c-fos 表达情况。Merge 为荧光图叠加 (c-fos + DAPI)。B 为各组 VMH 中 c-fos 阳性细胞标准化计数。与对照组相比,## 表示 $P < 0.01$;与 MI 组相比,* 表示 $P < 0.05$ 。

图 2 VMH 中神经元激活情况

表 1 三组大鼠心率变异性比较

组别	LF/nu	HF/nu	LF/HF
对照组	4.29 ± 1.99	74.87 ± 2.08	0.06 ± 0.03
MI 组	14.47 ± 1.99 ^{##}	65.00 ± 1.32 ^{##}	0.22 ± 0.03 ^{##}
激活组	21.85 ± 1.85 ^{**}	62.16 ± 1.08 ^{**}	0.35 ± 0.03 ^{**}

注:与对照组相比,^{##} 表示 $P < 0.01$;与 MI 组相比,^{**} 表示 $P < 0.01$ 。

表 2 两组大鼠心电图指标比较 单位:ms

组别	PR 间期	QRS 波群时限	QT 间期
对照组	41.4 ± 2.6	17.0 ± 2.1	30.2 ± 2.0
MI 组	44.2 ± 3.3	19.5 ± 2.2	54.4 ± 9.3 ^{##}
激活组	51.7 ± 4.5 [*]	40.7 ± 8.2 ^{**}	77.4 ± 5.5 ^{**}

注:与对照组相比,^{##}表示 $P < 0.01$;与 MI 组相比,^{*}表示 $P < 0.05$,^{**}表示 $P < 0.01$ 。

2.3 VMH 激活降低心室 ERP

通过在体电生理实验技术测量三组大鼠 LVA、LVM、LVB 的 ERP。研究发现,与对照组相比,MI 组和激活组左心室三个部位 ERP 均显著降低,且激活组 ERP 显著低于 MI 组($P < 0.05$)(表 3)。

表 3 三组大鼠 ERP 比较 单位:ms

组别	LVA	LVM	LVB
对照组	89.20 ± 13.97	94.40 ± 7.80	89.20 ± 7.69
MI 组	67.20 ± 7.29 ^{##}	71.20 ± 7.82 ^{##}	68.00 ± 9.38 ^{##}
激活组	47.80 ± 1.92 [*]	48.80 ± 3.27 ^{**}	50.60 ± 8.20 [*]

注:与对照组相比,^{##}表示 $P < 0.01$;与 MI 组相比,^{*}表示 $P < 0.05$,^{**}表示 $P < 0.01$ 。

3 讨论

焦虑、愤怒和抑郁等负面情绪与 CVD 的发生发展密切相关^[4]。有研究^[12]表明,抑郁症会增加 MI、心房颤动和心源性猝死的发生率。而 Roest 等^[13]的 meta 分析纳入 249 846 例冠心病患者,结果发现焦虑与冠状动脉疾病以及心源性猝死风险增加有关。

情绪相关核团及脑区在调节外周各器官生理活动中起到重要作用。在大脑中,情绪相关核团或脑区包括额叶皮层、下丘脑和杏仁核等,而这些核团可对心血管系统起调节作用^[14]。Ruiz Vargas 等^[15]的 meta 分析显示,利用神经影像学技术可有效分析神经核团的活性,而前额叶皮层的活性与心率、心率变异性正相关。而 Chen 等^[16]的研究发现,抑制下丘脑室旁核中活化的星形胶质细胞可减少 AMI 大鼠室性心律失常的发生,改善心室电活动紊乱。

VMH 是下丘脑的亚核,参与各种体内稳态调节,例如负面情绪、骨骼稳态、糖代谢和能量代谢^[17-18],此外,VMH 也是调节自主神经系统的关键脑区,激活 VMH 可增加交感神经活性^[8-10],而交感神经的过度激活与心律失常的发生发展密切相关^[19]。早期研究表明,交感神经激活引起心电图复极化改变和颤动阈值降低,促进心室颤动的发生^[20],而这些效应在心肌缺血的状态下被放大^[21]。James 等^[22]的影像学研究表明,VMH 活性升高与血压、心率上升具有显著相关性,但目前并无 VMH 激活诱发恶性心律失常的证据。

为了特异性激活 VMH,本研究采用化学遗传技术,激活 VMH 神经元上通过腺相关病毒转染的激活型受体 hM3Dq,实现精确调控。Coutinho 等^[23]曾通过该方法特异性激活 VMH,发现 VMH 激活可增加外周胰岛素敏感性。而 Dyavanapalli 等^[24]也通过化学遗传特异性激活心内胆碱能神经元,发现心功能障碍得到改善。本实验中,通过化学遗传特异性激活 VMH。免疫荧光结果显示,激活组 VMH 脑区中 c-fos 表达水平较对照组显著上升,提示 VMH 神经元被成功激活。

在本研究中,通过在体心电图检查发现,激活 VMH 后,AMI 大鼠 LF 显著升高,HF 降低,LF/HF 升高。LF 主要反映交感神经功能,而 HF 主要反映迷走神经功能^[25]。已有研究^[26]表明,交感神经过度激活可引起心肌缺血后电生理紊乱,从而促进恶性心律失常的发生。此外,与对照组相比,激活组 PR 间期、QRS 波群时限和 QT 间期均显著延长。PR 间期是反映房室传导的重要指标。大型队列研究结果表明,PR 间期延长与房性及室性心律失常、心力衰竭和死亡风险增加有关^[27]。PR 间期延长是心房电重构和结构重构的标志,也是心脏自主神经功能紊乱的标志^[27-29]。QT 间期反映房室结至心室的电传导速度,是心室电活动的评价指标。QT 间期与自主神经功能联系紧密。研究^[30]显示,在交感神经张力升高或副交感神经张力降低的情况下,QT 间期延长,而 QT 间期延长与心肌缺血、恶性室性心律失常密切相关。根据上述研究结果可推测,VMH 激活可导致交感神经过度激活,从而引起 PR 间期、QT 间期延长,引起心脏电活动紊乱,而激活组 ERP 的缩短进一步验证了 VMH 激活对心脏电活动的影响。

虽然 VMH 活性与恶性心律失常的关系以及内在机制尚不明确,但本研究结果初步提示,VMH 激活可能通过交感神经引起心脏电活动紊乱。这为 MI、心律失常患者的情绪管理重要性提供了一定的依据,也为 CVD 患者特别是合并不良情绪的患者提供了治疗方向。未来需进一步研究 VMH 激活诱发恶性心律失常的具体神经通路及分子机制。

参考文献

- [1] Liu S, Li Y, Zeng X, et al. Burden of cardiovascular diseases in China, 1990-2016: findings from the 2016 Global Burden of Disease Study [J]. *JAMA Cardiol*, 2019, 4(4): 342-352.
- [2] Zhou M, Wang H, Zeng X, et al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [3] Nabi H, Kivimäki M, Batty GD, et al. Increased risk of coronary heart disease

