

• 研究报告 •

丹参酮 I A 磺酸钠对大鼠心肌缺血/再灌注心律失常的影响

杜秋明, 李忠诚, 王贵荣, 高波, 宋淑萍

(天津市天和医院心内科, 天津 300050)

【关键词】 缺血/再灌注损伤, 心肌; 心律失常; 丹参酮 I A 磺酸钠; 缝隙连接; 离子通道

中图分类号: R285.5; R256.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1008-9691(2008)03-0183-02

缺血/再灌注(I/R)损伤性心律失常是心肌 I/R 损伤的一种表现, 临床上以室性心律失常为多见, 严重者可诱发致死性室性心动过速(VT)和心室纤颤(VF), 是造成患者猝死的重要原因。中药丹参酮 I A 磺酸钠(STS)是从唇形科植物丹参的干燥根及根茎中提取出的脂溶性二萜类化合物, 具有多种药理作用, 尤其在心血管方面具有很好的作用^[1]。本实验旨在观察 STS 对大鼠 I/R 性室性心律失常的影响, 评价其疗效, 从而从分子生物学水平上进一步探讨其在 I/R 性心律失常中的保护作用及机制。

1 材料与与方法

1.1 动物分组及模型建立: 5 月龄雄性 Wistar 大鼠 36 只, 体重(270±20)g, 购于军事医学科学院动物实验中心。按随机数字表法分成假手术组、I/R 组、STS 低剂量(20 mg/L)和高剂量(40 mg/L)组, 每组 9 只。采用结扎左冠状动脉前降支(LAD)10 min 后放开 120 min 的方法制备大鼠离体心肌 I/R 模型; 假手术组只穿线不结扎 LAD。STS 组于实验中分别给予 STS 20 mg/L 和 40 mg/L。

1.2 心律失常评价: 连续监测心电图, 记录室性期前收缩(PVC)、VT、VF 的发生次数和累计持续时间, 对室性心律失常按 0~6 分进行评分^[2]。

1.3 缺血心肌组织缝隙连接蛋白 43

(Cx43)、Cx40 和 Cav1.2 的 mRNA 提取及逆转录: 取 80 mg 缺血心肌组织, 加 TRIzol 裂解液匀浆, 经过加入氯仿/异戊醇、异丙醇、焦碳酸二乙酯(DEPC)、随机引物、RNA、5×Buffer、三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)、RNAsin、莫洛尼鼠白血病病毒(MMLV)等过程, 进行逆转录。

1.4 聚合酶链反应(PCR)过程: 取 Cav1.2/Cx43/Cx40 逆转录产物 cDNA 为模板, 依次加入 Buffer、10 mmol/L dNTP、Cav1.2/Cx43/Cx40 上下游引物、TaqDNA 多聚酶等, 加双蒸水混匀, 石蜡油封盖。内参照为三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)。反应参数: 95℃ 预变性 5 min; 接 35 个循环的 95℃ 30 s、60℃ 30 s、72℃ 1 min、72℃ 7 min 延伸, 4℃ 30 min。Cav1.2 引物(271 bp): 上游 5'-CCA GCC CAG AAA AGA AA-3', 下游 5'-ACT GCC TTT TCC AGG TGC A-3'。Cx43 引物(332 bp): 上游 5'-GGC TGC TCC TCA CCA ACG GCT-3', 下游 5'-AGG TCT TCA GGC CGA GGC CTG-3'。Cx40 引物(309 bp): 上游 5'-CTG GCC AAG TCA CGG CAG GGT GAC AAG ACA-3', 下游 5'-TTG TCA CTG TGG TAG CCC TGA GG-3'。内参照均为 242 bp。

1.5 电泳及成像: 反应结束后, 取 PCR 产物用质量分数为 2% 的琼脂糖凝胶电

泳, 在紫外线激发下拍照, 胶片采用 Gel-Pro 3.1 凝胶成像系统分析, 以特异 DNA 带灰度与内参灰度比值作为该 mRNA 表达的相对水平。

1.6 统计学处理: 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 均数间两两比较采用 SNK 法; 计数资料以百分率表示, 组间差异采用确切概率法; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 STS 对 I/R 性室性心律失常的影响(表 1): I/R 组 VT 和 VF 发生率分别为 75% 和 25%, 且持续时间较长。STS 能显著降低 I/R 性室性心律失常的发生率与持续时间, 使心律失常评分显著降低, 表现出明显的抗心律失常作用($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 虽然 STS 高剂量组比低剂量组作用明显, 但两者比较差异无统计学意义。

2.2 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)扩增结果: Cav1.2、Cx43、Cx40 的 mRNA 电泳图见图 1, 各目的基因和内参照的扩增条带位置与理论值相符。

2.3 STS 对 Cav1.2、Cx43、Cx40 的 mRNA 表达影响(表 2): 与假手术组比较, I/R 组 Cav1.2 mRNA 表达明显增强, STS 组 Cav1.2 mRNA 表达较 I/R

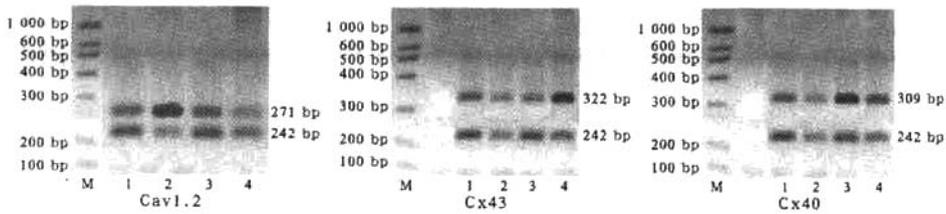
表 1 STS 对大鼠 I/R 性室性心律失常的影响

组别	动物数	PVC		VT		VF		心律失常评分 ($\bar{x} \pm s$, 分)
		发生率(%)	数量($\bar{x} \pm s$, 个)	发生率(%)	时间($\bar{x} \pm s$, s)	发生率(%)	时间($\bar{x} \pm s$, s)	
假手术组	9	35	10.5 ± 3.6	0	0	0	0	0.3 ± 0.2
I/R 组	9	95 ^b	46.0 ± 11.3 ^b	75 ^b	32.3 ± 11.7 ^b	25 ^b	16.1 ± 8.7 ^b	5.3 ± 2.9 ^b
STS 低剂量组	9	55 ^{ac}	21.3 ± 9.5 ^{ad}	35 ^{ac}	10.7 ± 5.6 ^{ad}	0 ^d	0 ^d	2.4 ± 0.9 ^{ad}
STS 高剂量组	9	40 ^d	16.7 ± 7.6 ^d	30 ^{ad}	8.2 ± 3.7 ^{ad}	0 ^d	0 ^d	1.9 ± 0.6 ^{ad}

注: 与假手术组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与 I/R 组比较, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$

基金项目: 天津市医药卫生科研基金资助项目(05KYZ39)

通讯作者: 李忠诚, 教授, 博士生导师, 主任医师 作者简介: 杜秋明(1974-), 女(汉族), 天津市人, 硕士研究生, 主治医师。



M, Marker; 1~4 依次为假手术组、I/R 组、STS 低剂量组、STS 高剂量组
 图 1 RT-PCR 测定各组大鼠缺血心肌组织 Cav1.2、Cx43、Cx40 的 mRNA 表达

表 2 各组大鼠缺血心肌组织 Cav1.2、Cx43、Cx40 的 mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	Cav1.2 mRNA	Cx43 mRNA	Cx40 mRNA
假手术组	9	1.065 ± 0.218	0.630 ± 0.084	2.300 ± 0.894
I/R 组	9	2.264 ± 0.423 ^b	0.233 ± 0.037 ^a	0.523 ± 0.197 ^a
STS 低剂量组	9	1.291 ± 0.638 ^d	1.418 ± 0.366 ^{bd}	4.317 ± 2.679 ^{cd}
STS 高剂量组	9	0.707 ± 0.389 ^{de}	1.492 ± 0.536 ^{bd}	2.495 ± 0.179 ^{ce}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 I/R 组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与 STS 低剂量组比较,^e $P < 0.05$

组明显降低,且高剂量组较低剂量组降低更明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。I/R 组 Cx43、Cx40 的 mRNA 表达较假手术组明显降低,STS 组则较 I/R 组明显增加,低剂量组 Cx40 mRNA 比高剂量组增加更明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);高、低剂量组间 Cx43 mRNA 表达比较差异无统计学意义。

3 讨论

细胞内钙超载是引起 I/R 性心律失常的重要因素,钙超载细胞 $Na^+ - Ca^{2+}$ 交换被激活,增加潜在起搏点舒张后期的除极,产生期外收缩,细胞内钙超载增加了 3 期和复极后期、早期后除极的发生率^[3]。Cav1.2 基因是 L-型钙通道 (Ica-1) 成分的基因,Ica-1 是动作电位平台期的主要离子流,决定平台期的长短和动作电位时程,是决定心肌自律性的一个重要因素^[4],在细胞兴奋时是外钙内流的重要途径,同时也是触发细胞内钙的释放引起心肌收缩耦联的主要离子流^[5]。本研究结果显示,STS 可下调 Cav1.2 基因表达,并且剂量越大效应越明显。

STS 具有抑制钙内流、减轻细胞内钙超载的作用。缝隙连接(GJ)是细胞间通讯的主要方式。GJ 通道的主要功能是介导细胞间电信号和化学信号的传递,在心肌细胞中,这种耦联与离子流介导的动作电位扩布有关^[6]。Cx43、Cx40 则是心肌细胞间 GJ 通道的主要连接蛋白,决定电传导的速度甚至折返路径^[7],它们的正常表达是 GJ 通道电耦联功能正常、心脏正常电活动和协调舒缩的重要保证^[8]。GJ 通道 Cx 数目减少可造成局部心肌电传导速度减慢,心肌间电传导速度差异增大,此外,对膜离子通道也有影响,这些都是导致心律失常的原因^[6]。细胞间 GJ 通道的电传导不仅受 GJ 通道两侧电压的影响,而且还受细胞内 pH 值、细胞内游离钙离子 (Ca^{2+}) 等多种因素的影响^[9]。Cx43 严重减少与

冲动传播减慢有关,并可引起室性心律失常易感性升高^[10]。由此可见, $[Ca^{2+}]_i$ 升高,Cx43、Cx40 表达下降,可导致心肌兴奋性、传导性改变,心电活动与传导不均一性是形成 I/R 性心律失常的基础。

本研究中,Cx43 和 Cx40 的 mRNA 表达变化表明 STS 对其可产生上调效应。STS 可能是通过上调 Cx43、Cx40 表达和下调 Cav1.2 表达抑制钙内流,减轻钙超载,改善心肌细胞间通讯,降低心肌激动传导速度不均一性,消除或减少折返形成,降低 I/R 性心律失常的发生。

综上,Cx 表达异常可影响 GJ 通道的正常功能,GJ 通道功能异常会影响 Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$ 改变又会使 GJ 的传导性发生改变。说明心肌 I/R 时细胞内钙超载与 Cx 介导的 GJ 功能改变是相互影响的,它们之间是否存在某种物质来介导调节过程,尚有待进一步研究。

参考文献

[1] 巢胜吾,王玲,樊济海,等.丹参酮 I A 抑制急性心肌梗死患者左室重构的近期疗效观察[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(3):145-146.
 [2] Ravingerova T, Tribulova N, Slezak J, et al. Brief, intermediate and prolonged ischemia in the isolated crystalloid perfused rat heart: relationship between susceptibility to arrhythmias and degree of ultrastructural injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 1995, 27(9):1937-1951.
 [3] 常明,何金森.丹参酮 I A 对心血管影响的研究进展[J].河南中医,2006,26(1):85-87.

[4] 李喆,黄从新,等.血管紧张素 I 对大鼠心室肌三种离子通道基因表达的效应[J].中国心脏起搏与心电生理杂志,2006,20(2):168-169.
 [5] Puglisi J L, Bassani R A, Bassani J W, et al. Temperature and relative contributions of Ca transport systems in cardiac myocyte relaxation[J]. Am J Physiol, 1996, 270(5 Pt 2): H1772-H1778.
 [6] 刘岩,赵世祥.膜离子通道及缝隙连接在心率失常中的作用[J].国际心血管病杂志,2007,34(2):77-79.
 [7] Wu T J, Ong J J, Chang C M, et al. Pulmonary veins and ligaments of Marshall as sources of rapid activations in canine model of sustained atrial fibrillation[J]. Circulation, 2001, 103(8):1157-1163.
 [8] Arenzana-Seisdedos F, Turpin P, Rodriguez M, et al. Nuclear localization of I- κ B promotes active transport of NF- κ B from the nucleus to the cytoplasm[J]. J Cell Sci, 1997, 110(Pt 3):369-378.
 [9] Nao T, Ohkusa T, Hisamatsu Y, et al. Comparison of expression of connexin in right atrial myocardium in patients with chronic atrial fibrillation versus those in sinus rhythm[J]. Am J Cardiol, 2003, 91(6):678-683.
 [10] 方鹤鸾,吴士尧.连接蛋白与心率失常[J].国际心血管病杂志,2006,33(5):305-308.

(收稿日期:2007-10-10)
 (本文编辑:李银平)