

丹皮酚对大鼠缺血性心律失常 及其心肌细胞 miRNA-1 表达的影响

张金花, 熊永爱*

(深圳市松岗人民医院, 广东 深圳 518105)

[摘要] 目的:探讨丹皮酚对大鼠缺血性心律失常及其心肌细胞 miRNA-1 表达的影响。方法:SPF 级 SD 大鼠,按体重随机分为正常组、模型组、阳性药组(盐酸普萘洛尔注射液 $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)、丹皮酚组($6, 3, 1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。除正常组外,其余各组以 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量尾静脉注射乌头碱生理盐水溶液制作缺血性心律失常模型。给药后记录 30 min 内各实验组大鼠心电图变化,早搏(VPB)次数和首次出现时间,以及室速(VT)和室颤(VF)次数和持续时间。实验结束后剖取心脏,测定心肌梗死面积,并用 RT-qPCR 法测定心肌细胞 miRNA-1 的 mRNA 表达。结果:与正常组比较,模型组出现缺血性心律失常,VPB,VT 和 VF 频数明显增加($P < 0.05, P < 0.01$),VPB 首发时间明显缩短($P < 0.05$),VT 和 VF 持续时间明显增长($P < 0.05$),心肌梗死面积明显增加($P < 0.01$),明显增加心肌细胞 miRNA-1 的 mRNA 表达($P < 0.01$);给药治疗后,与模型组比较,丹皮酚可明显改善大鼠缺血性心律失常,明显减少 VPB,VT 和 VF 频数($P < 0.05, P < 0.01$),明显推迟 VPB 首发时间($P < 0.05$),明显缩短 VT 和 VF 持续时间($P < 0.05, P < 0.01$),明显减少心肌梗死面积($P < 0.05, P < 0.01$),明显降低心肌细胞 miRNA-1 的 mRNA 表达($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:丹皮酚对缺血性心律失常具有明显地改善作用,并能明显的降低心肌细胞 miRNA-1 的 mRNA 表达。

[关键词] 丹皮酚; 心肌缺血; 心律失常

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)05-0129-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015050129

Effect of Paeonol on Rats' Ischemic Arrhythmia and miRNA-1 Expression ZHANG Jin-hua, XIONG Yong-ai* (Pharmacy Department, People's Hospital of Songgang, Shenzhen 518105, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of paeonol on ischemic arrhythmia and the expression of miRNA-1 of rats. **Method:** SPF SD rats were randomly divided into the normal group, the model group, the positive group (propranolol hydrochloride injection $2\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$) and the paeonol group ($6, 3, 1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The ischemic arrhythmia models were induced by injecting $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose of aconitine intravenously. ECG changes of each group were recorded, premature beat (VPB) frequency and time for the first time, and ventricular tachycardia (VT) and ventricular fibrillation (VF) frequency and duration were recorded. Hearts were taken out on the end of the experiment, myocardial infarct sizes were measured, and the expression of miRNA-1 in myocardial cells was measured by RT-qPCR method. **Result:** Compared with the normal group, the ischemic arrhythmia was occurred, the frequencies of VPB, VT and VF increased, the VPB time for the first time shortened, the VT and VF durations increased, myocardial infarct sizes and miRNA-1 expression increased in the model group ($P < 0.05, P < 0.01$). The above indicators had good improvement in the paeonol group ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Paeonol has an obvious effect in treating ischemic arrhythmias.

[Key words] paeonol; myocardial ischemia; arrhythmia

急性心肌梗死并发心律失常是冠心病患者死亡的重要原因,在急性心肌梗死后幸存的人群中,有 50% 以上死于致命的室性心律失常^[1]。然而目前部分抗心律失常药物的应用却反而具有导致心失

常急症甚至发生猝死的风险,这给抗心律失常药物的开发和应用提出了更高的要求。

丹皮酚(paeonol)又称牡丹酚,是中药牡丹皮和徐长卿的主要活性成分^[2]。丹皮酚药理活性具有

[收稿日期] 20140727(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373620)

[第一作者] 张金花,副主任药师,从事临床药学研究,Tel:0755-27718530,E-mail:644724075@qq.com

[通讯作者] *熊永爱,博士,副研究员,从事中药制剂学研究,Tel:0755-27718530,E-mail:625221174@qq.com

镇静、解热、催眠、抗炎、抗过敏、抗肿瘤、免疫调节等作用。近年来其在心血管方面的药理活性越来越受到人们重视,如抗冠状动脉粥样硬化、抗血栓、缺血再灌注损伤等。在抗心律失常方面,体内外研究表明丹皮酚可通过拮抗钙心肌细胞内钙超载、降低自由基活性、延迟后去极等途径发挥抗心律失常作用^[3]。但目前还没有关于丹皮酚用于缺血性心律失常治疗的报道,本实验拟以丹皮酚为研究对象,通过其对乌头碱所致大鼠缺血性心律失常的干预,探讨其治疗作用,并初步探究其作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级,雌雄各半,体重(200 ± 20) g,由成都达硕生物科技有限公司提供,动物合格证号 SCXK(川)2008-0024。

1.2 药物及试剂 丹皮酚(批号 111562-201312),乌头碱(批号 111275-201309),均购于中科院成都生物,盐酸普萘洛尔注射液(批号 130921,西南药业股份有限公司),乌拉坦(批号 20100809,上海抚生生物技术有限公司),Trizol 试剂盒(批号 S130928),RNAiso Plus 试剂盒(批号 BK3303),Prime Script RT reagent 试剂盒(批号 BK501),SYBR Premix Ex Taq II 试剂盒(批号 BK402),均购自美国 Amresco 公司。miRNA-1 和 β -actin 引物均由北京博奥森生物科技公司合成。

1.3 仪器 BL-420 型生物机能实验系统(成都泰盟生物科技有限公司),BSA224S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司),PIKORed96 型 RT-PCR 扩增仪(美国 Thermo Fisher 仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物筛选 实验前禁食不禁水 16 h,20% 乌拉坦溶液 ip 麻醉,背位固定,连接皮下针式电极用 BL-420 生物机能实验系统测定二导联心电图,连续观察 10 min,心电图有异常者弃用,选用心电正常动物进行实验。

2.2 分组与给药 大鼠按体重随机分为正常组、模型组、阳性药组(盐酸普萘洛尔注射液)、丹皮酚高、中、低剂量组,每组 12 只动物。其中阳性药组按 2 mL·kg⁻¹ 剂量尾静脉注射盐酸普萘洛尔生理盐水溶液(1 g·L⁻¹);丹皮酚高、中、低剂量组分别按 6,3,1 mg·kg⁻¹ 剂量尾静脉注射丹皮酚生理盐水溶液,正常组和模型组尾静脉注射生理盐水。

2.3 模型制备^[4] 大鼠经乌拉坦麻醉后,仰卧位固定,气管插管后连接人工呼吸机。各实验组尾静脉注射给予相应的药物或生理盐水后,除正常组外,其余

各组以 5 μ g·kg⁻¹ 剂量尾静脉注射乌头碱生理盐水溶液,正常组尾静脉注射等体积生理盐水。注射完立即采用生物机能实验系统连续描记心电图 30 min。

2.4 观测指标

2.4.1 心电图观察 观察记录各实验组 30 min 内出现的心电图,判断心律失常类型和特点。

2.4.2 心律关键参数 记录各实验组大鼠早搏(VPB)出现的次数和首次出现的时间;室速(VT),室颤(VF)出现的次数和持续的时间。

2.4.3 心肌梗死率 上述实验后,于左心室注入 3% 伊文思蓝 1 mL 后取下心脏。确定未缺血与缺血心肌(未缺血心肌呈蓝色,缺血心肌呈白色)。生理盐水冲洗后,置于 -20 °C 冰箱。自冠状动脉开口起始,从心尖起平行切成等厚 5 片,厚度均为 5 μ m。置入 1% 氯化三苯基四氮唑磷酸缓冲液(pH 7.4)中 37 °C 水浴 15 min。出现 3 个分区:未梗死区(红染)、梗死区(未红染,为白色)、危险区(蓝染),缺血区为非危险区(红染 + 白色)。用 Image ProPlus 6.0 软件测定梗死面积。计算心肌梗死率^[5-6]。

$$\text{心肌梗死率} = \frac{\text{梗死区}(\text{cm}^2)}{\text{缺血区}(\text{cm}^2)} \times 100\%$$

2.5 miRNA-1 mRNA 表达的检测 取各实验组大鼠心肌组织,Trizol 法提取细胞总 RNA,采用一步法 PCR 反应,反应条件:95 °C 预变性 10 min,95 °C 预变性 30 s,95 °C 变性 5 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,共 40 个循环,得到每个样品的 Ct 值,以 β -actin 作为内参照基因进行校准,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算目的基因的表达量, $\Delta\Delta$ Ct = (Ct 目的基因 - Ct 内参)实验组 - (Ct 目的基因 - Ct 内参)对照组,miRNA-1 和 β -actin 基因引物信息见表 1。

表 1 miRNA-1 和 β -action 引物

Table 1 Primers of miRNA-1 and β -action

基因名称	引物	扩增产物 /bp
miRNA-1	上游引物 5'-AGTTGAGGGGACTTTCCACGGC-3'	156
	下游引物 5'-GAATCCACGAGCAGAGCAACG-3'	
β -action	上游引物 5'-TCAGGATGCCTCTATCATCAAGC-3'	133
	下游引物 5'-GCCATCCGATGTGAATGGGCTCT-3'	

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析,方差齐者组间进行 LSD 检验,方差不齐者进行 Tamhane's T2 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对缺血性心律失常大鼠心律的影响 与正常组大鼠心电图比较,模型组大鼠给药后心电图发生明显

异常,主要表现在心率(HR)明显加快,T波值增大,阵发性室性心早搏,QRS波群宽大畸形,QT间期明显延长,QTc明显延长,PR间期明显缩短。丹皮酚各剂量组大鼠在观察时间范围内未出现明显异常。

3.2 对 VPB,VT,VF 频数和时间的影 响 与正常组比较,模型组大鼠 VPB,VT 和 VF 频数均有明显

增大($P < 0.05$),VPB 首发时间有明显提前($P < 0.05$),VT 和 VF 持续时间均有明显延长($P < 0.05$);与模型组比较,丹皮酚各剂量组大鼠 VPB,VT 和 VF 频数均有明显减少($P < 0.05$),VPB 首发时间均有明显推迟($P < 0.05$),VT 和 VF 持续时间均有明显缩短($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 丹皮酚对大鼠 VFB,VT 和 VF 频数和时间的影 响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effects of paeonol on rats' frequency and time of VFB,VT and VF($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	VPB		VT		VF	
		频数/次	首次时间/min	频数/次	持续时间/min	频数/次	持续时间/min
正常	-	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	-	18.2 ± 1.69 ¹⁾	4.22 ± 0.77 ¹⁾	20.35 ± 2.64 ²⁾	16.43 ± 3.51 ²⁾	6.68 ± 1.17 ¹⁾	3.44 ± 0.86 ¹⁾
普萘洛尔	2	4.78 ± 0.35 ³⁾	7.32 ± 0.81 ³⁾	0.00 ± 0.00 ⁴⁾	0.00 ± 0.00 ⁴⁾	0.00 ± 0.00 ³⁾	0.00 ± 0.00 ³⁾
丹皮酚	6	5.64 ± 0.76 ³⁾	6.64 ± 0.76 ³⁾	0.00 ± 0.00 ⁴⁾	0.00 ± 0.00 ⁴⁾	0.00 ± 0.00 ³⁾	0.00 ± 0.00 ³⁾
	3	6.27 ± 0.52 ³⁾	7.27 ± 0.52 ³⁾	0.00 ± 0.00 ⁴⁾	0.00 ± 0.00 ⁴⁾	0.00 ± 0.00 ³⁾	0.00 ± 0.00 ³⁾
	1	6.96 ± 0.61 ³⁾	5.96 ± 0.61 ³⁾	0.00 ± 0.00 ⁴⁾	0.00 ± 0.00 ⁴⁾	0.00 ± 0.00 ³⁾	0.00 ± 0.00 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3~4 同)。

3.3 对心肌梗死面积的影响 与正常组比较,模型组大鼠心肌梗死率有明显增大($P < 0.05$);与模型组比较,丹皮酚高、中、低剂量组大鼠心肌梗死面积均有明显减小($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 丹皮酚对大鼠心肌梗死率的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effects of paeonol on myocardial infarction rate of rats

($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	心肌梗死率/%
正常	-	0.00 ± 0.00
模型	-	45.32 ± 3.19 ²⁾
普萘洛尔	2	21.87 ± 2.56 ³⁾
丹皮酚	6	22.75 ± 0.13 ⁴⁾
	3	27.89 ± 0.19 ³⁾
	1	30.96 ± 0.14 ³⁾

3.4 对 miRNA-1 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠心肌细胞 miRNA-1 表达有明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,丹皮酚高剂量组大鼠心肌细胞 miRNA-1 表达有明显降低($P < 0.01$),中、低剂量组有明显降低($P < 0.05$)。见表 4。

表 4 丹皮酚对大鼠心肌细胞 miRNA-1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 4 Effects of paeonol on miRNA-1 mRNA expression in rats' myocardial cells($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	miRNA-1/2 ^{-ΔΔCt}
正常	-	0.16 ± 0.12
模型	-	1.32 ± 0.19 ²⁾
普萘洛尔	2	0.87 ± 0.16 ³⁾
丹皮酚	6	0.75 ± 0.13 ⁴⁾
	3	0.89 ± 0.19 ³⁾
	1	0.96 ± 0.14 ³⁾

4 讨论

心律失常是急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)的最常见并发症之一。各种类型的心律失常可能出现在 AMI 的各个病变阶段,其中 AMI 早期以室性心律失常(如 VPB,VT 等)最多见,严重者可导致猝死,这主要由于 AMI 早期心肌缺血、坏死和炎症水肿等病理表现最为明显^[7]。AMI 后约 1/5 的患者发生室性心律失常,AMI 后 48 h 内 90% 的患者出现 VPB,非持续性室性心动过速(non-sustained ventricular tachycardia, NSuVT)发生率在 6%~40% 之间,病死率高^[8]。AMI 后 VT 和 VF 是急性心肌缺血猝死的主要原因。左室梗死面积愈大(>40%),所并发的快速室性心律失常,如频发的 VPB,VT 等愈严重^[9-11],因此,急性心肌缺血后快速室性心律失常的防治一直是临床工作的重点与难点,也是基础和临床工作者一直研究的课题。

目前抗心律失常药物的基本生理作用是影响心肌细胞膜的离子通道,通过改变离子流而影响细胞的电生理特性,改变传导速度、消除折返、抑制自律性和触发活动,从而抑制心律失常的发生。本实验研究表明,大鼠尾静脉注射丹皮酚生理盐水溶液可明显改善心律失常和心肌缺血,主要表现在丹皮酚可显著改善大鼠心肌梗死面积,明显推迟 VPB 首发时间,减少 VPB 次数,同时可明显缩短 VT 和 VF 持续时间,减少 VT 和 VF 次数。这可能与丹皮酚抑制心肌细胞自律性、延迟后去极性及触发活动,阻断钙离子通道电流等机制有关,但丹皮酚发挥效果的深层次机制或其他作用途径、靶点有待进一步研究。

在大鼠心肌梗死和临床心肌梗死患者的心室中都发现 miRNA-1 表达升高,外源性给予 miRNA-1 可诱发大鼠缺血性心律失常的发生^[12-13]。可见缺血性心律失常的发生与 miRNA-1 的过表达呈正相关。本实验研究显示,丹皮酚可显著下调缺血性心律失常大鼠 miRNA-1 的表达,表明丹皮酚可通过抑制 miRNA-1 的过表达而对抗心律失常,保护缺血心脏。

缺血性心律失常的治疗不仅要抗心律失常,更重要的是要改善心肌的缺血缺氧状态保证心肌细胞得到充足的氧供、血供,以消除心律失常发生的诱因。本实验从改善心肌缺血和抗心律失常两方面证明了丹皮酚具有良好的对抗乌头碱所致大鼠心律失常兼具改善心肌缺血的功能,是一种比较理想的抗缺血性心律失常的天然药物,课题组将会在现有的基础上对其作用机制做进一步探讨。

[参考文献]

[1] 张莹茜,冯志强. 缺血性心律失常发生机制的研究进展[J]. 医学综述,2011,21(8):3210-3213.
[2] 段晓颖,高卫芳,周淑娟,等. 牡丹皮中丹皮酚的提取工艺研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2009,7(2):41-42.
[3] 杨正生,彭振辉,姚青海,等. 丹皮酚的药理作用研究进展[J]. 中国药物与临床,2011,5(12):545-547.
[4] 付敏. 乌头碱致心律失常的细胞分子机制的实验研究[D]. 北京:北京中医药大学,2007.
[5] 何秀权,栾海蓉,刘清梅,等. 槲寄生提取物抗缺血性心律失常作用的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报,2010,6(3):519-523.
[6] 巩红岩,秦元旭,王更富,等. 葛根素对大鼠体外循环

后心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,1(7):165-168.

[7] Jie X, Gurev V, Trayanova N. Mechanisms of mechanically induced spontaneous arrhythmias in acute regional ischemia[J]. *Cir Res*,2010,106(1):185-192.
[8] Murakawa Y. Role of purkinje fibers in the maintenance of ventricular fibrillation [J]. *Cir J*, 2009, 73 (10): 1793-1797.
[9] Masse S, Farid T, Dorian P, et al. Effect of global ischemia and reperfusion during ventricular fibrillation in myopathic human heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*,2009,297(6):1984-1988.
[10] Castella M, Gerald D, Saleh S, et al. Diastolic dysfunction in stunned myocardium: a state of abnormal excitation-contraction coupling that is limited by Na⁺-H⁺ exchange inhibition [J]. *Eur J Cardiothoracic Surg*, 2006,295(5):107-112.
[11] Tsai C F, Ueng K C, Wu D J, et al. Remolded left ventricular myocardium remote to infarction sites is the arrhythmogenic substrate for the sudden cardiac death [J]. *Med Hypotheses*,2010,75(4):368-374.
[12] Lu Y, Zhang Y, Shan H, et al. MicroRNA-1 downregulation bypropranolol in a rat model of myocardial infarction: a new mechanism for ischemic cardioprotection [J]. *Cardiovasc Res*,2009,84(3):434-438.
[13] Shan H, Li X, Pan Z, et al. Tanshinone II_A protects against sudden cardiac death induced by lethal arrhythmia via repression of microRNA-1 [J]. *Br J Pharmacol*,2009,158(5):1227-1235.

[责任编辑 周冰冰]