

丹参酮 II_A 对房颤大鼠心房肌组织 LTCC α 1c mRNA 表达的干预研究

刘维琴^{1*}, 马清华², 牟霞³

(1. 贵阳中医学院第二附属医院, 贵阳 550001; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550002;
3. 贵州省武警总队医院, 贵阳 550005)

[摘要] 目的:探讨丹参酮 II_A (Tan II_A)对房颤(AF)大鼠心房肌细胞 L 型钙通道 α 1c 亚单位(LTCC α 1c 或 CaL α 1c) mRNA 表达的影响,揭示活血祛瘀中药预防和治疗房颤的作用机制。方法:采用乙酰胆碱-氯化钙(Ach-CaCl₂)药物经尾静脉注射法复制 AF 大鼠模型,随机分成3组:模型组、丹参酮治疗组、维拉帕米干预组,并设正常对照组。2周后,应用免疫组化方法和 RT-PCR 法检测心房肌细胞 CaL α 1c mRNA 及蛋白表达变化。结果:与正常对照组相比,模型组 CaL α 1c 亚单位 mRNA 表达水平降低,L 型钙通道(LTCC)蛋白表达水平减低,两组比较具有差异性($P < 0.05$);与模型组比较,丹参酮治疗组、维拉帕米干预组均明显改善房颤大鼠心房肌组织 CaL α 1c 亚单位 mRNA 表达和蛋白表达水平减低状态($P < 0.05$)。结论:丹参酮 II_A 能够改善房颤大鼠心房肌细胞重构过程的损伤程度,可能是其干预治疗房颤的靶点之一。

[关键词] 丹参酮 II_A; L 型钙通道 α 1c 亚单位; 房颤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0199-04

Effects of Tanshinone II_A on Protein Expression of L-type Calcium Channel α 1c in Rat Atrial Fibrillation Model

LIU Wei-qin^{1*}, MA Qing-hua², MOU Xia³

(1. Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China;
2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;
3. Armed Police Force Hospital of Guizhou, Guiyang 550005, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the possible mechanism and effect of tanshinone II_A on the protein

[收稿日期] 20121011(012)

[基金项目] 贵州省卫生厅项目;贵州省科技厅、贵阳中医学院联合基金项目[黔科合中药字(2010)LKZ7012]

[第一作者] *刘维琴,硕士,副教授,硕士研究生导师,从事中西医结合心血管疾病的临床和实验研究, Tel:0551-2836351, E-mail: sygood8002@163.com

[3] 李培源,霍丽妮,苏炜,等.总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS)法测定江南星蕨的抗氧化活性[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(1):162.

[4] 安瑞华,冯陶,郭应禄,等.香豆素对实验性大鼠草酸钙结石形成的影响[J].中华泌尿外科杂志,1994,15(3):209

[5] 田代华.实用中医对药方[M].北京:人民卫生出版社,2002:213.

[6] 王萍,沈玉华,谢应健,等.金钱草提取液对尿液中草酸钙结晶生长的影响[J].安徽大学学报:自然科学版,2006,30(1):80

[7] 霍丽妮,廖艳芳,陈睿,等.狐狸尾不同极性溶剂提取物体外抗氧化活性研究[J].中国实验方剂学杂志,2011,23(17):155.

[8] Ouyang J M, Yao X Q, Tan J, et al. Renal epithelial cell injury and its promoting role in formation of calcium oxalate monohydrate[J]. J Biol Inorg Chem, 2011, 16(3):405.

[9] 邹志辉,崔维奇.广金钱草黄酮类化合物对草酸钙结石防治机制探讨[J].国际泌尿系统杂志,2008,28(4):502.

[责任编辑] 李玉洁

expression of *L*-type calcium channel $\alpha 1c$ in the rat atrial fibrillation model to reveal the mechanism of AF. **Method:** Rats were randomly divided into four groups, normal control group, model group, tanshinone II_A group and Verapamidronate group. The rat atrial fibrillation model was established by the tail vein injection of acetylcholine a calcium chloride (Ach-CaCl₂) drug. The change of LTCC $\alpha 1c$ expression was detected with immunohistochemistry after two weeks. **Result:** Compared with normal control group, in model group CaL $\alpha 1c$ subunit mRNA expression level was reduced, *L* calcium channel (LTCC) protein expression level was reduced, there was a difference between two groups ($P < 0.05$); compared with model group, in tanshinone treatment group and verapamil intervention group atrial fibrillation rats and atrial organization were significantly improved. CaL $\alpha 1c$ subunit mRNA expression and protein expression level were reduced ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tanshinone II_A could improve the decreasing status in AF rats and atrial muscle cell reconstruction process of the damage degree, which may be related with. CaL $\alpha 1c$ subunit mRNA expression and protein expression.

[**Key words**] tanshinone II_A; *L*-type calcium channel $\alpha 1c$ subunit (LTCC $\alpha 1c$); atrial fibrillation

房颤是临床常见复杂的心律失常,它的持续存在容易引起栓塞、心力衰竭等严重并发症,具有较高的致残、致死率。近年临床和实验室研究表明,病理状态下,心房电重构导致的折返激动在房颤的维持中起重要作用^[1-2],而通过心房肌 *L* 型钙通道的电流密度(Ica.L)降低是心房肌电重构的基础^[3-4]。*L* 型钙通道数量的降低又被认为是房颤心房肌 Ica.L 降低的分子基础^[5]。因此,作为心律失常一个潜在的治疗靶点。本实验通过建立房颤动物模型,以 *L* 型钙通道 $\alpha 1c$ 亚单位作为观察指标,观察房颤时丹参酮 II_A 对 *L* 型钙通道 $\alpha 1c$ 亚单位 mRNA 及蛋白表达的影响,旨在分子生物学水平探讨中药丹参干预房颤的离子基础。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立 清洁级 SD 大鼠 60 只,雄性,体重 200 ~ 250 g,购自贵阳医学院动物实验中心(合格证号 SCXK2002/0001)。随机分为正常对照组(10 只)及造模组(50 只)。采用乙酰胆碱-氯化钙(Ach-CaCl₂)混合液尾静脉注射法复制房颤动物模型^[6]。连续给药 4 周,心电图有典型房颤改变为造模成功。

可以明显看到大鼠造模后心电图的改变,P 波消失,代之以 f 波的房颤图形。说明大鼠房颤造模成功。

1.2 分组、给药方式及剂量 造模成功大鼠,随机分为 AF 模型组、丹参酮治疗组、维拉帕米干预组和正常对照组,共 4 组,平均每组 10 只。正常组、模型组每日灌服同等容积的生理盐水;丹参酮治疗组给予丹参酮 II_A 32 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃;西药对照组灌服维拉帕米 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹。每天 1 次,连续 2 周。

1.3 标本的采集及保存 心房肌组织,分别液氮冻

存备用和 4% 甲醛溶液固定石蜡包埋切片。实验中因麻醉过量、气胸、急性左心衰等疾病,SD 大鼠部分死亡,各组实际检测大鼠为 8 只。

1.4 免疫组化法检测 $\alpha 1c$ 蛋白表达

1.4.1 方法 组织制成 4 μ m 厚度切片,常规 HE 染色,观察 SD 大鼠心脏组织病理改变。Cav1.2 免疫组化二步法染色。设立已知 Cav1.2 阳性的平滑肌瘤组织为阳性对照,用 PBS 代替一抗为阴性对照。 $\alpha 1c$ 抗体稀释度为 1:500。二步法 PV-6001 试剂盒购自北京中衫金桥生物技术有限公司。 $\alpha 1c$ 抗体购自 millipore 公司。

1.4.2 结果判定

1.4.2.1 常规 HE 染色观察 观察心肌细胞萎缩及水肿,炎症细胞浸润,间质水肿,血管反应,心肌细胞坏死。上述病变占组织块的 30% 以下 1 分,占 30% ~ 50% 2 分,占 50% 以上 3 分,将所有评分累加即心房肌损伤的评分。

1.4.2.2 免疫组织化学染色结果判定 $\alpha 1c$ 免疫组化阳性表达呈现棕黄色颗粒,定位于心肌细胞胞质中。在 400 倍视野下随机选取 5 个视野,观察心肌细胞阳性反应,并应用 BioMias 2000 软件对每个视野中阳性细胞进行平均吸光度(A)的检测。

1.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)半定量检测 $\alpha 1c$ mRNA 表达 用 TRIZOL 一步法提取组织总 RNA。取 2 μ g 总 RNA 逆转录成 cDNA。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,设计见表 1。CaL $\alpha 1c$ 反应体系:RT 产物 5 μ L、CaL $\alpha 1c$ 和内参 β -actin 上游引物和下游引物各 0.2 μ mol·L⁻¹、dNTP 200 μ mol·L⁻¹、1 × PCR 缓冲液、MgCl₂ 2.5 mmol·L⁻¹、Taq DNA 聚合酶 2.5 U,总反应体积 100 μ L。反应程序为 94 °C 预变性 3 min,进入 PCR

循环,94℃变性30s,54℃退火30s,72℃延伸45s,循环35次后再延伸10min。

表1 引物的设计合成

基因	引物序列	产物大小/bp
CaL α 1c	5'-TCTGCTCTGCCTGACTCTGA-3'	186
	5'-AGATACTCCACCCGTTCCAG-3'	
β -actin	5'-TGTGCTGTCCCTGTACGCCTCT-3'	227
	5'-CCTTAATGTCCACGCACGATTTC-3'	

同一反应体系中 β -actin和目标基因共扩增产物琼脂糖凝胶上电泳,计算机扫描,对PCR产物的电泳带进行紫外A扫描定量,计算各基因条带的A,用两者的A值的比值代表目的基因的相对表达含量。

2 结果

2.1 HE观察心肌组织病理损伤 光镜下观察:正常对照组大鼠心肌组织无明显异常,偶可见心肌细胞水肿。房颤模型组大鼠心肌细胞明显水肿,部分萎缩及坏死;间质血管充血明显,可见间质水肿及少量炎症细胞浸润。丹参酮治疗组,维拉帕米干预组心肌细胞水肿、间质血管充血,间质水肿及炎症细胞浸润的改变对比房颤模型组明显减轻,且两组之间无统计学意义(图1)。各组病理损伤有显著性差异($P < 0.05$),其中模型组损伤明显高于其余各组。各组间病理损伤差异见表2。

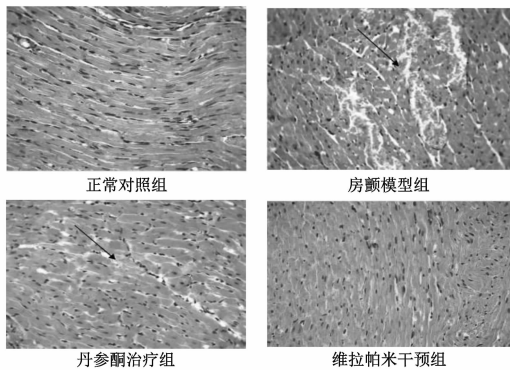


图1 丹参酮Ⅱ_A干预各组大鼠心房肌组织形态学变化(HE,×400)

表2 丹参酮Ⅱ_A对房颤大鼠心房肌组织病理损伤的影响

分组	均数	标准差	P
A(丹参酮)	4.00	0.39	<0.01 ¹⁾
B(维拉帕米)	2.33	0.38	<0.01 ²⁾
C(模型)	9.83	0.39	<0.01 ³⁾
D(正常)	0.50	0.39	

注:1)A与B比较;2)B与D比较;3)C与D比较(表3同)。

2.2 心房肌组织CaL α 1c蛋白表达观察 CaL α 1c免疫组织化学标记结果显示,正常对照组大鼠心肌细胞胞质呈现浅棕黄色细颗粒状。房颤模型组大鼠心肌细胞胞质中棕黄染色明显下降,平均A明显降低,丹参酮治疗组,维拉帕米干预组大鼠心肌细胞平均A较模型组有所上升,两组间对比无统计学意义。Cav1.2免疫组织化学标记显示各组有显著性($P < 0.05$),见表3和图2。

表3 丹参酮Ⅱ_A对房颤大鼠心房肌组织CaL α 1c阳性表达

分组	均数	标准差	P
A(丹参酮)	187.1133	0.67	<0.01 ¹⁾
B(维拉帕米)	171.5059	0.67	<0.01 ²⁾
C(模型)	165.6000	0.67	<0.01 ³⁾
D(正常)	212.2545	0.68	

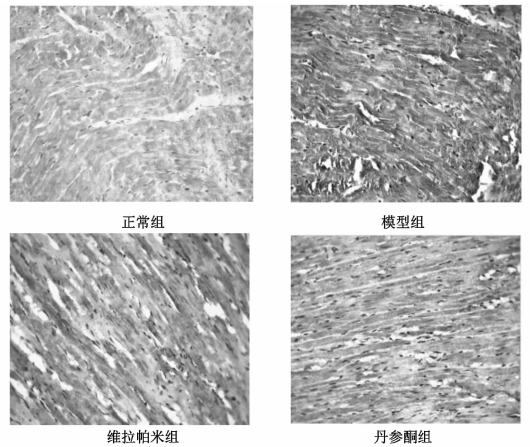
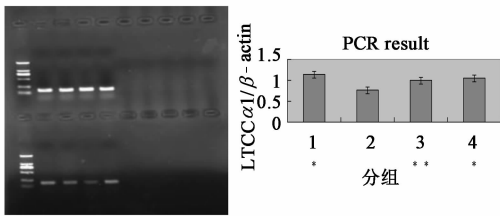


图2 各组大鼠心房肌组织CaL α 1c mRNA蛋白表达(HE,×400)

2.3 RT-PCR检测心房肌CaL α 1c亚单位mRNA表达变化 与正常对照组相比,房颤模型组大鼠CaL α 1c亚单位mRNA表达水平降低,两组比较具有差异性($P < 0.05$)。与房颤模型组比较,丹参酮治疗组、维拉帕米干预组均明显改善了房颤大鼠心房肌中CaL α 1c亚单位mRNA表达水平降低的状态($P < 0.05$),与维拉帕米干预组比较,丹参酮治疗组疗效较弱(图3)。

3 讨论

房颤发生和持续过程贯穿了结构和功能的异常和调整。Bosch等^[7]的研究结果表明,房颤时有多种离子通道密度和分布以及通道基因表达的改变,这些变化是心房电重构、结构重构的主要分子基础,其中以L型钙通道在房颤所致心房重构的作用尤为重要,房颤时CaL α 1c亚单位mRNA表达下调,L型钙通道蛋白合成降低。本研究免疫组化及逆转录聚



RT-PCR 检测心房肌 CaLα1c 亚单位 mRNA 表达结果:

1. 正常对照组; 2. 房颤模型组; 3. 丹参酮治疗组;
4. 维拉帕米干预组与房颤模型组比较

¹⁾ $P < 0.05$; 与维拉帕米干预组比较 ²⁾ $P > 0.05$ 。

图 3 RT-PCR 检测心房肌 CaLα1c 亚单位 mRNA 表达

合酶链反应结果显示与正常对照组相比,模型组大鼠 CaLα1c 亚单位 mRNA、蛋白表达水平降低,两组比较具有差异性,为上述理论提供了直接证据,与文献报道一致。

同时,RT-PCR 结果也提示,Ach-CaCl₂ 引发的 AF 大鼠心肌细胞 CaLα1c 亚单位 mRNA 表达下降,导致和加速了 AER 的发生,在某种程度上,房颤引起的心房重构是可逆的,丹参酮 II_A 和维拉帕米均能通过改善钙超载,改善房颤时离子通道的变化,从而明显改善房颤大鼠心房肌中 CaLα1c 亚单位 mRNA 表达水平降低的状态,延缓 AER, ASR 的发生,阻止“AF 致 AF”,从而起到治疗作用。并且与维拉帕米组对比,丹参酮组疗效虽然较弱,但两组间并无统计学意义,在临床使用中可进一步观察疗效差异。

本实验结果说明,L 型钙通道在房颤的发生、发展过程中起着重要的作用,房颤的大多数致病基因正是通过降低 L-型钙通道基因的 mRNA 表达水平,从而启动和维持房颤,而丹参酮 II_A 能通过抑制心房肌细胞钙超载,抑制心房肌电重构和结构重构,保护心肌细胞,从而预防和治疗房颤。但较目前广泛运用的 IV 类抗心律失常药维拉帕米来说,作用稍

欠弱,说明了中药丹参酮 II_A 对房颤的预防与治疗有着广阔的前景,也提示了临床当中同时运用丹参酮 II_A 与维拉帕米治疗房颤的功效将远大于单味药物的运用,并较好的减轻了患者单纯运用维拉帕米治疗房颤所带来毒副作用。因此,在分子生物学新技术指导下,结合中医理论及临床经验,创新性应用丹参酮 II_A 治疗和预防 AF,在心血管领域具有广泛的应用前景。

[参考文献]

- [1] Chen Y J, Chen S A, Chen Y C, et al. Effects of atrial pacing on arrhythmogenic activity of single cardiomyocytes from pulmonary veins implication in initiation of atrial fibrillation[J]. Circulation, 2001, 104(23):2849.
- [2] Bosch R F, Scherer C R, Rub N, et al. Molecular mechanisms of early electrical remodeling: transcriptional downregulation of ion channel sub-units reduces I(Ca, L) and I(to) in rapid atrial pacing in rabbits[J]. J Am Coll Cardio, 2003, 41(5):858.
- [3] 邝丽,莫如绸,李小珠,等. 扩张型心肌病并发心律失常相关因素研究[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(13):1945.
- [4] Kuang L, Mo R C, Li X Z, et al. Study of relevant factors of dilated cardiomyopathy combined with arrhythmia[J]. China, 2005, 15(13):1945.
- [5] Brundel B J, Van Gelder I C, Henning R H, et al. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation[J]. Cardio-vasc Res, 1999, 42(2):443.
- [6] 戚文航. 心房颤动基础研究和临床治疗新观点[J]. 中华心血管病杂志, 2002, 30(10):B577.
- [7] Bosch R F, Zeng X Y, Gammer J B, et al. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation [J]. Cardiovasc Res, 1999, 44:121.

[责任编辑 邹晓翠]