

丹参酮 II_A 对房颤大鼠外周血金属基质蛋白酶和心房肌组织 L 型钙通道 a1c 亚单位作用的影响

刘维琴^{1*}, 马清华²

(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)

[摘要] **目的:** 探讨丹参酮 II_A 对心房颤动大鼠外周血金属基质蛋白酶(MMP-2/TIMP-2)和心房肌组织 L 型钙通道 a1c 亚单位(LTCCa1c)作用的影响,揭示直接的分子机制,为临床应用提供理论依据。**方法:** 大鼠随机分成 4 组:正常对照组、模型组、丹参酮 II_A 治疗组和维拉帕米干预组。采用乙酰胆碱-氯化钙药物经尾静脉注射法构建房颤大鼠模型;用酶联免疫吸附试验检测大鼠血清 MMP-2/TIMP-2 表达变化;用免疫印迹法检测心房肌组织 LTCCa1c 蛋白表达变化。**结果:** 与正常对照组相比,模型组外周血 MMP-2 水平明显增高、TIMP-2 水平明显下降,LTCCa1c 蛋白表达水平减低,两组比较具有差异性($P < 0.05$);与模型组相比,丹参酮 II_A 治疗组及维拉帕米干预组均降低 MMP-2 水平,升高 TIMP-2 水平,明显改善房颤大鼠心房肌组织 LTCC 蛋白表达水平减低状态($P < 0.05$)。**结论:** 丹参酮 II_A 能够明显干预 MMP-2/TIMP-2 及 LTCCa1c 蛋白表达,显示可能通过多靶点作用,改善房颤大鼠心房肌组织重构过程的损伤程度,从而治疗房颤。

[关键词] 丹参酮 II_A; 金属基质蛋白酶; L 型钙通道 a1c 亚单位; 心房颤动

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0154-04

Effects of Tanshinone II_A on Peripheral Blood of Matrix Metalloproteinase and Atrial Muscle Tissue A1c Subunit Role of L-type Calcium Channel in Rats with Atrial Fibrillation

LIU Wei-qin^{1*}, MA Qing-hua²

(1. Second Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China;
2. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of tanshinone II_A on peripheral blood of matrix metalloproteinase (MMP-2/TIMP-2) and atrial muscle tissue of L-type calcium channel a1c subunit (LTCCa1c) effect, revealing the direct molecular mechanism in rats with atrial fibrillation. **Method:** The rats were randomly divided into four groups: normal control group, model group, tanshinone II_A treatment group and verapamil intervention group. The rat model with atrial fibrillation was tail vein injected with acetylcholine a calcium chloride (Ach-CaCl₂) drug; the expressions of MMP-2 and TIMP-2 in serum were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method; by western blotting in detection of atrial muscle LTCCa1c protein expression. **Result:** Compared with the normal control group, the model group showed higher levels of MMP-2 and reduced of TIMP-2 in the peripheral blood, while LTCCa1c of atrial muscle tissue are reduced in the protein expression levels ($P < 0.05$). Compared with the model group, treatment group of tanshinone II_A and verapamil intervention group were decreased the level of MMP-2, increased TIMP-2 level, improve atrial fibrillation rats in atrial muscle tissue LTCC protein expression levels reduce state ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tanshinone II_A can significantly interfere with the MMP-2/TIMP-2 and LTCCa1c-protein expression, the display may through the

[收稿日期] 20120905(007)

[基金项目] 贵州省卫生厅科研立项项目;贵州省科技厅、贵阳中医学院联合基金[黔科合中医药(2010)LKZ7012]

[通讯作者] *刘维琴,副教授,从事中西医结合心血管疾病临床、教学及科研工作, Tel:18672353379, E-mail: sygood8002@163.com

multiple target effect, improve the degree of injury of atrial fibrillation rats atrial muscle tissue remodeling process, thereby treating atrial fibrillation.

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

心房颤动(AF)是临床比较常见的心律失常,具有较高致残、致死率。研究显示,AF主要发病机制是心房电重构、结构重构^[1-2],治疗重点是抑制房颤心房肌的电重构和结构重构,维持心脏大小和形态、结构,提高患者生存质量。本实验通过建立SD房颤大鼠动物模型,观察丹参酮Ⅱ_A对房颤大鼠心房肌细胞重构过程L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚单位(LTCC $\alpha 1c$)、外周血金属基质蛋白酶(MMP-2, TIMP-2)作用的影响,深入探讨其治疗房颤的靶向干预作用,为临床应用提供可靠的理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物模型的建立及分组 清洁级SD大鼠40只,雄性,体重200~250g,购自贵阳医学院动物实验中心(合格证号SCXK(贵)2002/0001)。随机分为正常对照组(10只)及造模组(30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。待大鼠麻醉后,先描记大鼠正常Ⅱ导心电图,于其尾静脉内注射乙酰胆碱-氯化钙1 mL·kg⁻¹(每1 mL含Ach 66 mg·L⁻¹, CaCl₂ 10 g·L⁻¹,新鲜配制),同时连接ASB280U生物医学信号采集分析系统,描记此时Ⅱ导心电图。连续给药4周后,停药做Ⅱ导心电图。心电图有典型房颤改变为房颤成功模型,随机选24只大鼠列为实验对象。从图1~3,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。

造模成功大鼠,随机分为模型组、丹参酮Ⅱ_A治疗组、维拉帕米干预组,平均每组8只,同时设立正常对照组10只,共4组。丹参酮Ⅱ_A治疗组给予丹参酮Ⅱ_A 32 mg·kg⁻¹·d⁻¹灌胃;对照组灌服维拉帕米20 mg·kg⁻¹·d⁻¹。正常组、模型组灌服同等容积的生理盐水,每天1次,连续4周。

1.2 血清MMP-2/TIMP-2的测定 给药结束后,大鼠眼眶后静脉采血,3 500 r·min⁻¹离心20 min,吸取上清液,-70℃冰冻备用。严格按照RD公司大鼠金属基质蛋白酶-2(MMP-2)、大鼠金属基质蛋白酶抑制因子2(TIM P-2)酶联免疫分析试剂盒实验操作说明书进行操作。

1.3 心肌组织LTCC $\alpha 1c$ 蛋白定量检测 开胸后,取出心脏心房肌组织100 mg制成匀浆,4℃下12 000 r·min⁻¹离心40 min,用蛋白质分析试剂盒(美国Sigma公司)测定上清液蛋白质含量,煮沸8 min,样品加入5%~10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白质从SDS-聚丙烯酰胺凝胶转移至硝酸纤维素滤膜上,用10%脱脂奶粉封闭过夜后加入1:500稀释的Anti-Calcium Channel, Voltage Gated $\alpha 1c$ 抗体(Millipore公司),4℃孵育过夜,洗膜后加入HRP标记的羊抗小鼠IgG(1:5 000)孵育1 h,加入辣根过氧化物酶标记一抗孵育1 h,用化学发光法在暗室中曝光,经显影、定影,用吸光度仪扫描进行测定, β -

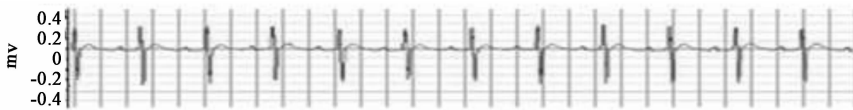


图1 给药前大鼠正常心电图



图2 给药后大鼠典型房颤心电图



图3 大鼠造模后入组房颤心电图

action 为内参,蛋白表达量用“目的蛋白/ β -actin”的吸光度 (A) 表示,计算 LTCC α 1c 蛋白表达的相对量。

1.4 数据处理 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS 16.0 进行数据处理,用单因素的方差分析及 LSD-q 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

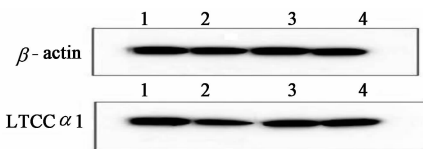
2.1 大鼠血清 MMP-2, TIMP-2 水平变化 与正常对照组相比,房颤模型组血清 MMP-2 水平增高、TIMP-2 水平下降,两组比较具有差异性 ($P < 0.05$);与房颤模型组比较,丹参酮 II_A 治疗组、维拉帕米干预组血清 MMP-2 水平降低,TIMP-2 水平升高,其中尤以丹参酮治疗组改善明显 ($P < 0.05$)。

表 1 丹参酮 II_A 对大鼠血清细胞因子 MMP-2, TIMP-2 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$) ng · L⁻¹

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹	MMP-2	TIMP-2
正常对照	-	229.83 ± 9.39	4 496.60 ± 337.84 ¹⁾
房颤模型	-	405.64 ± 10.62	3 877.37 ± 237.07
维拉帕米干预	20	277.54 ± 8.54	4 270.76 ± 195.38 ¹⁾
丹参酮 II _A	32	279.38 ± 10.54	4 366.24 ± 236.27 ²⁾

注:与房颤模型组比较¹⁾ $P < 0.05$;与维拉帕米干预组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

2.2 心肌组织 LTCC α 1c 蛋白定量检测 免疫印迹结果显示:L 型钙通道 α 1c 亚单位在房颤模型组的表达显著高于正常组、丹参酮组及维拉帕米组,而丹参酮及维拉帕米组之间则无显著差异。见图 4。



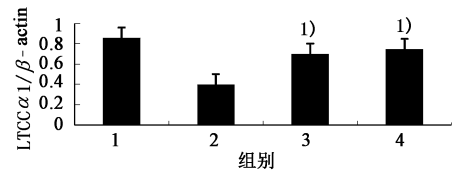
注:1. 正常组;2. 房颤模型组;3. 维拉帕米对照组;
4. 丹参酮治疗组(β -actin 为内参)

图 4 Western blot 检测心房肌 L 型钙通道 α 1 亚单位蛋白表达

经 synaptic gene tool 图像分析软件获取所得条带灰度值,计算目的条带与 β -actin 的比值 (A),求得平均 A 后,进行分析,结果见图 5。

3 讨论

AF 是目前心律失常领域的研究热点,但其发生机制仍亟待解决。研究显示,AF 是自我维持的心律失常,具有自身延续性,其复发和维持与心房电重构、结构重构有关,两个方面相互作用,构成了房颤发生和持续的病理生理基础。同时,房颤的临床发展过程经多研究证实,也是一个渐进的电重构和组



1. 正常组;2. 房颤模型组;3. 维拉帕米对照组;4. 丹参酮治疗组;
与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 5 Western blot 检测心房肌 L 型钙通道 α 1 亚单位蛋白表达统计分析 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

织重构过程,其发生和维持自始至终伴随着这两方面的变化^[3]。电重构可促进结构重构发生,而电重构的恢复同样可促进结构重构恢复。心房快速激动引起频率依赖性 L-型 Ca^{2+} 通道激活,钙超载,心房通过自身适应性调节,减低 Ica-L 密度,缩短心房动作电位时程及有效不应期,L 型钙通道 mRNA 表达水平下降,LTCC α 亚单位蛋白表达水平减低;同时,钙超载激活 Calpain-I,心房收缩功能降低,心肌纤维化增加,心房扩大。AF 发生后,其结构重构与电重构恢复时间不一致,一般房颤转复后 3 ~ 5 d 电重构恢复,而结构重构常常需要几个月,甚至不能恢复^[4]。

在房颤心房肌组织纤维化过程中,MMPs, TIMPs 起着重要作用。MMPs 是降解细胞外基质 (ECM) 成分的最主要蛋白水解系统,其中明胶酶 MMP-2/TIMP-2 与多种心血管疾病密切相关^[5]。病理情况下 MMPs 表达增加或活性升高,使正常的 ECM 成分降解,同时合成不具有正常结构与功能的胶原蛋白和结缔组织,造成组织重塑。TIMPs 是 MMPs 的内源性抑制剂,与 MMPs 作用相反,可缓解对 ECM 成分的降解,两者平衡决定心脏基质合成与降解的平衡,在维持心脏结构和功能完整性方面起着重要作用^[6]。大量的基础和临床研究可以证实,MMPs 表达上调是心房扩大的机制之一。

同时,在房颤电重构过程中,频率相关性钙超载被认为是电重构的始动因素,ICa-L 是产生动作电位平台期的主要离子流,动作电位时程以及有效不应期的缩短有利于折返的形成和维持,使依赖于多重折返的房颤,更容易发生。目前对动物模型及房颤患者的研究已经证明: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^[7-8]。而 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^[9]。心房肌 L 型钙通道由 α 1, α 2 δ 1, β 3 个亚单位组成。 α 1 亚单位是由 4 个跨膜区构成的成孔亚单位,钙离子通过此通道进入细胞形成电流。目前研究已经证明:编码 L 型钙通道 α 1

亚单位第Ⅳ跨膜区的 mRNA 丰度,慢性房颤心房肌较窦性心律心房肌明显降低^[10]。故认为房颤心房肌L型钙通道的离子重构与 $\alpha 1c$ 亚单位的表达下调有关。

丹参酮Ⅱ_A从唇形科中药丹参中提取的有效精华成分,丹参酮Ⅱ_A磺酸钠注射液是从丹参中分离出的二萜醌类化合物丹参酮Ⅱ_A经磺化而得出的一种水溶性物质。研究表明,丹参酮Ⅱ_A磺酸钠具有类异搏停样作用,可用于心肌缺血一再灌注损伤和心律失常的防治^[11-12]。

本研究通过比较正常对照组,房颤模型组,丹参酮Ⅱ_A治疗组,维拉帕米干预组对体内MMP-2/TIMP-2的影响。提示房颤时MMP-2/TIMP-2的平衡失调,导致了房颤大鼠心房基质胶原降解和相应的结构重构,结论与文献报道一致。本研究也同时显示,丹参酮能明显降低AF大鼠心肌细胞血清中MMP-2,升高TIMP-2活性,逆转房颤心房结构重构的变化,并且疗效强于西药组。

同时,Western blot结果提示,AF大鼠心房肌细胞LTCC $\alpha 1c$ 蛋白表达下降,而丹参酮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L型钙通道 $\alpha 1$ 亚单位蛋白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,但两组间并无统计学意义,说明祖国医学在干预房颤方面可能通过多靶点起作用,具有疗效好、副作用少的优点,有较好的发展前景。

[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 pulmonar 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 ionchannel 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] Wijffels M C, Kirchhof C J, Dorland R, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: A study in a waken chronically instrumented goats[J]. Circulation, 1995, 92 (7):1954.
- [4] 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.
- [5] Xu J, Cui G, Esmailian F. Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation[J]. Circulation, 2004, 109 (3):363.
- [6] 单鸿波,李悦,李为民. 基质金属蛋白酶及其组织抑制因子与心房颤动心房结构重构的关系[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2007, 21(2):170.
- [7] 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.
- [8] BOSCH R F, ZENG X, GRAMMER J B, et al. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 1999, 44(1):121.
- [9] 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.
- [10] 曾祥君,肖颖彬,钟前进,等. 房颤心房肌L型钙通道 $\alpha 1c$ 亚单位 mRNA 的差表达改变及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2006, 12(16):23.
- [11] 于海波,徐长庆,单宏丽. 丹参酮-Ⅱ_A对大鼠心室肌细胞膜钾电流的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, 36(2):112.
- [12] 徐长庆,娄延平,杨保峰. 丹参酮Ⅱ_A抑制豚鼠单个心肌细胞L型钙电流和缩短动作电位时程效应的相关性分析[J]. 中国药理学通报, 1998, 14(5):428.

[责任编辑 邹晓翠]