

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2015.24.1299

·论著·

参松养心胶囊对心梗后心肌的保护作用及机制研究

刘自强,王晞,党松

(武汉大学人民医院心内科,湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 探讨参松养心胶囊(SSYX)对心肌梗死后心律失常发生和心功能不全的影响及其作用机制。**方法** 将40只新西兰大耳白兔行冠状动脉前降支结扎术后随机分为正常对照组(Control组)10只、心梗组(MI组)10只、心梗+胺碘酮组(MI+A组,0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹)10只、心梗+参松组(MI+S组,0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)10只。正常对照组开胸后在冠状动脉下穿线,但不结扎。术后,分别以普食、普食+胺碘酮粉末、普食+参松养心胶囊原粉喂食。8周后将家兔处死,在心梗周边区取材,检测各组白兔缝隙连接蛋白43(CX43)、钠钙交换体(NCX)和兰尼碱受体蛋白(RyR2)mRNA的相对表达量。**结果** 与Control组比较,MI组CX43、RyR2 mRNA相对表达量显著下降($P<0.05$),而NCX mRNA相对表达量虽然有所下降,但其差异无统计学意义($P>0.05$);与MI组比较,MI+A组CX43、RyR2 mRNA相对表达量显著升高($P<0.05$),MI+S组CX43、NCX、RyR2 mRNA的相对表达量也显著升高($P<0.05$);与MI+A组比较,MI+S组CX43、NCX mRNA的相对表达量均显著升高($P<0.05$)。**结论** 参松养心胶囊可以改善心肌梗死后心律失常以及心功能不全,其机制可能与调控各钙离子通道的开放,抑制钙超载有关。

【关键词】 参松养心胶囊;心肌梗死;钙通道;缝隙连接蛋白43;钠钙交换体;兰尼碱受体蛋白

【中图分类号】 R542.2² **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2015)24—3589—04

Myocardial protective effects of shensongyangxin capsule after myocardial infarction and the possible mechanisms. LIU Zi-qiang, WANG Xi, DANG Song. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, CHINA

[Abstract] **Objective** To explore the effect of shensongyangxin capsule (SSYX) on arrhythmia and cardiac insufficiency after myocardial infarction (MI) in rabbits. **Methods** Forty New Zealand White rabbits were randomly assigned into control group, MI group, MI+amiodarone group (MI+A group, with the dose of amiodarone at 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹) and MI+SSYX group (MI+S group, with the dose of SSYX at 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹) after successful establishment of model of MI, each with 10 rabbits. The control group applied stitches at coronary artery without ligation. The other three groups applied routine food, routine food+amiodarone, routine food+SSYX after surgery, respectively. After eight weeks, ryanodine receptor 2 (RyR2), Connexin43 (CX43), sodium-calcium exchanger (NCX) mRNA expression in peri-infarcted area were examined. **Results** Compared with control group, CX43, RyR2 mRNA relative expression significantly decreased in MI group ($P<0.05$), but NCX mRNA relative expression showed slight decrease without statistically significant difference ($P>0.05$). Compared with MI group, CX43, RyR2 mRNA relative expression significantly increased in MI+A group (both $P<0.05$), and CX43, NCX, RyR2 mRNA relative expression significantly increased in MI+S group (all $P<0.05$). Compared with MI+A group, CX43, NCX, mRNA relative expression significantly increased in MI+S group (all $P<0.05$). **Conclusion** SSYX can improve arrhythmia and cardiac dysfunction after myocardial infarction, which may be related to the open of calcium ion channels and the inhibition of calcium overload.

[Key words] Shensongyangxin (SSYX); Myocardial infarction (MI); Calcium ion channel; Connexin43 (CX43); Sodium-calcium exchanger (NCX); Ryanodine receptor 2 (RyR2)

心肌梗死是在冠脉病变的基础上发生冠脉血供急剧减少或中断,使相应心肌严重而持久地急性缺血,导致心肌坏死。75%~95%的患者伴有心律失常,严重者甚至发生室颤,导致猝死。现在临幊上常用的许多抗心律失常西药虽然能控制心律失常的发生,改善心律失常的症状,但是往往导致病死率以及死亡率的升高^[1],因此,如何在控制心律失常的同时又减少病死率,改善患者的预后,成为临幊上治疗心律失常的一个难题。参松养心胶囊由五味子、麦冬、丹参、黄

连等多种中药组成的复方剂,在体动物模型已证实,参松养心胶囊可以通过抑制多种离子通道来预防因化学毒物或缺血再灌注引起的心律失常,并且可以通过调控各种离子通道蛋白来改善心功能,减少病死率及死亡率,并且不会出现致心律失常的副作用^[2-3],但是具体是哪些离子通道影响的且作用机制如何,尚未可知。目前研究表明钙离子通道可能在预防心梗后的心律失常中发挥了重要作用,为此,笔者通过建立心梗模型研究参松养心胶囊对缝隙连接蛋白43

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(编号:2012CB518604)

通讯作者:王晞。E-mail:xiwangwhu@163.com

(CX43)、钠钙交换体(NCX)、兰尼碱受体蛋白(RyR2) mRNA 水平的影响并探讨这些离子通道改善心律失常的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 新西兰大耳白兔(武汉生物研究所提供,体重 2.2~2.5 kg);离心机(Heal Force)型号:台式高速冷冻离心机 Neofuge 15R;PCR 仪(Hangzhou Bioer Teechnology Co, LTD)型号:Life express Thermal Cycler;SLAN 荧光定量 PCR 检测系统(上海宏石医疗科技有限公司);超净工作台(苏净安泰)型号:SW-CJ-1FD;Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies) 目录号:15596-026;ReverTra Ace- α -目录号:K-1622;TOYOB0 THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 目录号:QPS-201;离心管、TIP 头(Axygen Biosciences);青霉素(华北制药股份有限公司生产)、三氯甲烷国药集团(化学试剂有限公司)、异丙醇(国药集团化学试剂有限公司)、无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司);参松养心原粉(石家庄以岭药业股份有限公司);引物(Invitrogen Biotechnology Co, LTD)。

1.2 动物模型的制作及分组 取 40 只新西兰大耳白兔,随机分为正常对照(Control)组、MI 组、MI+A 组及 MI+S 组,每组 10 只。动物称重后以戊巴比妥(40 mg/kg)耳缘静脉麻醉,并经前胸暴露心

脏,结扎冠状动脉左前降支。以心电监护显示 I、II、aVL 导联 ST 段抬高 0.2 mV 为手术成功的标准,术后注射 40 万 U 青霉素。分别以普食(Control 组、MI 组)、普食+胺碘酮粉(MI+A 组,胺碘酮粉剂量 0.4 g·kg⁻¹·d⁻¹)及普食+参松养心原粉(MI+S 组,参松养心原粉剂量 0.5 g·kg⁻¹·d⁻¹)喂养 8 周。

1.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

1.3.1 总 RNA 的提取 取 100 mg 左室心肌梗死周边区组织置匀浆器中,加入 1 ml 的 Trizol,冰上匀浆,使核蛋白充分解离;并经氯仿分离,异丙醇沉淀,乙醇洗涤后,离心,弃上清,最终加入双蒸水溶解,并用紫外分光光度法分析 RNA 的纯度与浓度。

1.3.2 反转录 根据总 RNA 的含量,以其中的 mRNA 为模板,利用逆转录酶反转录合成 cDNA。再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。

1.3.3 实时荧光定量 PCR 按照合成说明,在引物中加入 ddH₂O,制成 2.5 μmol/L 溶液,引物序列见附表 1。在 cDNA 中加入相关引物,并按照 RT-PCR 试剂盒(TOYOB0)说明,以 95℃ 预变性 1 min 后进入 PCR 循环,95℃ 变性 15 s,58℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 20 s,循环 40 次。反应完成后计算机自动计算 CT 值,CT 值定义为:每个反映管内的荧光信号达到设定的阈值所经历的循环次数,即从基线到指数增长所经历的循环次数。

表 1 各目的基因及引物的相关信息表

目的基因	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增长度(bp)
GAPDH	兔-GAPDH-S	CGCCTGGAGAAAGCTGCTA	104
	兔-GAPDH-A	ACGACCTGGTCCTCGGTGTA	
CX43	兔-CX43-S	AAGAGACCCCTGCCACAT	99
	兔-CX43-A	AGAGACACCAACGACACCACC	
NCX	兔-ERBB2-S	ACCAGAGTGATGTGGAGCTACGGG	194
	兔-ERBB2-A	GCATTCCGAGTCAATCATCCAACATT	
RYR2	兔-RYR-2-S	CGGAAACAGTATGAAGACCAGC	149
	兔-RYR-2-A	CACACAATGCCTCCACTTAGG	

1.4 统计学方法 应用 SPSS21.0 统计软件进行数据分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD-t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

心梗模型制备过程中,3 只新西兰大耳白兔由于意外情况出现猝死(2 只死于室颤,1 只原因未明),剩余 37 只(Control 组 10 只,MI 组 9 只,MI+A 组 9 只,MI+S 组 9 只)均制备心梗模型成功,且顺利完成各指标的检测。检测结果如下:与 Control 组比较,MI 组 CX43、RYR2 mRNA 相对表达量显著下降($P < 0.05$),而 NCX mRNA 相对表达量虽然有所下降,但其差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 MI 组比较,MI+A 组 CX43、RYR2 mRNA 相对表达量显著升高($P < 0.05$),

NCX mRNA 的相对表达量也有所升高,但其差异无统计学意义($P > 0.05$);MI+S 组 CX43、NCX、RYR2 mRNA 的相对表达量皆显著升高($P < 0.05$)。与 MI+A 组比较,MI+S 组 CX43、NCX mRNA 的相对表达量显著升高($P < 0.05$),RYR2 mRNA 的相对表达量也有所升高,但其差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 2。

表 2 药物干预 8 周后 CX43、NCX、RYR2 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	CX43	NCX	RYR2
Control 组	10	2.4090±0.3643	2.6311±0.5136	2.5670±0.5124
MI 组	9	2.0419±0.1485 ^a	2.2698±0.1781	2.1587±0.1846 ^a
MI+A 组	9	2.1508±0.1796 ^b	2.4448±0.0949	2.5403±0.1462 ^b
MI+S 组	9	2.4914±0.0971 ^{bc}	2.8254±0.1526 ^{bc}	2.7542±0.1334 ^b

注:与 Control 组比较,^a $P < 0.05$;与 MI 组比较,^b $P < 0.05$;与 MI+A 组比较,^{bc} $P < 0.05$ 。

3 讨 论

心梗后心律失常是心源性死亡的主要原因之一,而钙超载是心梗后心律失常发生和维持的重要原因。钙超载可以使心肌部分去极化,缩短动作电位时程,诱发短暂后除极,引起缺血性心律失常,而且 Ca^{2+} 电流任何微小的变化即可导致其他离子电流改变,造成心肌电活动异常,抑制钙超载可以明显减小心梗后心律失常的发生率^[4-5],CX43、NCX、RYR2 mRNA 可编码钙循环相关的通道蛋白,调控细胞内外钙离子的转运,钙离子转运的异常是钙超载发生的主要病理生理机制,故 CX43、NCX、RYR2 mRNA 的表达水平可以一定程度反应钙超载的状态。参松养心胶囊是近年来新发现的中成药,可以明显减弱心梗后心律失常的发生,并改善心功能^[3,6],究其机制仍不明确,而本文发现,参松养心胶囊可明显增加 CX43、NCX、RYR2 mRNA 的表达水平,提示参松养心胶囊的心肌保护作用可能与抑制钙超载有关。

Cx43 是缝隙连接蛋白,主要存在于心房和心室中,参与心肌细胞间信号传导。有研究发现,心肌梗死 CX43 蛋白表达减少或降解增多,导致缝隙连接减少,电传导减慢,异向性增加,动作电位离散幅度增加,且心梗后 Cx43 蛋白各部位重排程度不一,心肌电冲动经过这些部位时传导速度会出现不均一性增高,这些都是形成折返和传导阻滞的基础,进一步诱发心律失常^[4,7]。此外,Cx43 蛋白的磷酸化、去磷酸化以及分布均可影响缝隙连接的导电性,诱发心律失常^[8]。研究显示,心肌缺血可导致 Cx43 脱磷酸化,缝隙连接通道的开放,进而 Ca^{2+} 内流增加,引起钙超载,加重心律失常和心肌细胞坏死^[10]。同时有研究证实,Cx43 可以通过调节活性氧(ROS)生成,稳定线粒体膜,抑制钙超载,减轻缺血心肌细胞的凋亡和坏死,改善心功能^[11-12]。本研究发现,参松养心胶囊可上调 CX43 表达,抑制钙超载发生,进而抑制心律失常保护心肌。

NCX 是维持细胞内 Ca^{2+} 浓度稳定的主要通路之一正常生理状态下,NCX 主要在心肌细胞复极化后期,介导前向模式,与钙泵一起,将胞质内的钙离子转到细胞外或肌质网内,从而降低胞浆内 Ca^{2+} 浓度,促使细胞舒张^[13-14];膜去极化或胞质中 Na^{+} 浓度较高时,NCX 可以介导反向模式,调节细胞的生理功能^[15]。而在缺血、缺氧等病理条件下 NCX 也能够介导反向模式的 Ca^{2+} 内流,引起胞内钙超载,诱发细胞凋亡与坏死^[17]。本研究发现,与 MI 组比较,参松养心胶囊可明显增加心梗周边区 NCX mRNA 水平,胺碘酮组也表现了增高趋势但未达统计学意义,故笔者推测参松养心胶囊可能是介导了 NCX 的前向模式抑制了钙超载,从而抑制心律失常发生保护心功能,但其机制及

正确性仍需进一步研究证实。

RYR2 是心肌肌浆网中的钙释放通道,其表达下调和功能异常造成的 Ca^{2+} 渗漏是许多心律失常疾病以及心力衰竭疾病的发病基础。生理状态下,FK-BP12.6 与 RyR2 相结合,阻止 Ca^{2+} 通道的开放,减少钙渗漏。心梗后钙渗漏增多,可能与高肾上腺素水平激活 PKA, RyR2 被过度磷酸化,导致 FKBP12.6 解离,舒张期通道开放频率增加,肌浆网中 Ca^{2+} 泄漏增多^[18],进而引起延迟后除极(DAD)有关,而 FKBP12.6 缺失小鼠的心房肌细胞中 Ca^{2+} 的泄漏及房颤发生的倾向性增加则支持该观点^[19]。也可能与 CaMK II 被激活及 RyR2 Ser2815 磷酸化增多有关,而 RyR2-S2814A 基因工程小鼠对房颤的保护作用也支持该观点^[21]。心梗患者 RYR2 mRNA 的表达量降低,RYR2 功能抑制和数量减少使肌浆网钙释放不足,心肌收缩力下降^[6],同时, Ca^{2+} 泄露使肌浆网中钙储存下降,不能释放足够的 Ca^{2+} ,心脏收缩功能下降。研究表明,参松养心胶囊可以提高 RYR2 的表达水平,减少钙渗漏,抑制钙超载,从而减少心律失常的发生和改善心功能。

综上所述,参松养心胶囊对各钙离子通道的综合作用是抑制钙超载,降低心肌细胞的除极幅度,延长动作电位时程和有效不应期,这可能是其抗心律失常作用的主要机制之一。同时减轻钙超载对心肌细胞的损害,增强心肌收缩力,从而改善了心功能。简言之,参松养心胶囊可以抑制钙超载,对抗心律失常,增强心肌收缩力,起到保护心肌的作用。

参 考 文 献

- [1] Preliminary report: effect of encainide and flecainide on mortality in a randomized trial of arrhythmic suppression after myocardial infarction [J]. N Engl J Med, 1989, 321(6): 406-412.
- [2] 蒋小波, 黄从新, 黄鹤, 等. 参松养心胶囊对兔心肌梗死后神经重构的影响[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志 2014, 28(1): 59-62.
- [3] 柴松波, 王硕仁, 姚立芳, 等. 参松养心胶囊对大鼠心梗后心室重构及其离体心脏动作电位影响的研究[J]. 北京中医药, 2009, 28(12): 967-971.
- [4] 秦联萍. 细胞内钙一缝隙连接因子在针刺预治疗改善缺血性心律失常中的作用[D]. 北京: 中国中医科学院, 2005.
- [5] 安瑞海, 傅绍萱, 李蕴山. 钙离子, 钙拮抗剂与缺血性心律失常[J]. 生理科学进展, 1989, 20(3): 219-223.
- [6] 姜浩, 农一兵, 林谦, 等. 益气活血药对心梗后心功能不全大鼠心肌细胞 RYR2、SERCA2a 及 PLB mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药杂志(原中国医药学报), 2011, 26(9): 1957-1960.
- [7] 梁庆, 林吉进, 李玉光. 缝隙连接、蛋白43及其与心律失常的关系[J]. 中国心血管杂志, 2006, 11(1): 59-62.
- [8] 窦光华, 何维来. Cx43 连接蛋白与心脏发育[J]. 心脏杂志, 2011, 23(2): 260-262.
- [9] Miura T, Ohnuma Y, Kuno A, et al. Protective of gap junctions in preconditioning against myocardial infarction [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(1): H214-221.

doi:10.3969/j.issn.1003-6350.2015.24.1300

•论著•

microRNA-215

对人视网膜母细胞瘤细胞生长及抑癌基因 Rb1 表达的调控作用

杨林声, 王理论, 杜青卫

(延安大学附属医院眼科, 陕西 延安 716000)

【摘要】目的 研究 microRNA-215 (miR-215) 在视网膜母细胞瘤(RB)组织中的表达及其临床意义, 并探讨其对 RB 细胞活力、增殖及凋亡的影响。**方法** 采用 qRT-PCR 检测 51 例 RB 患者及相应癌旁组织中 miR-215 的表达并分析其与患者临床病理特征的相关性。在 RB 细胞中转染 miR-215 类似物或 miR-215 抑制物, 采用噻唑蓝比色法(MTT)、溴脱氧尿苷(BrdU)细胞增殖分析、Caspase3 活性检测及流式细胞仪检测细胞活力、增殖及凋亡的影响。Western blot 检测视网膜母细胞瘤蛋白 1 (Rb1) 表达变化。结果 miR-215 在 RB 组织中的表达水平显著高于对应的癌旁组织($P<0.01$); miR-215 表达与视神经浸润($P=0.002$)及分化程度($P=0.041$)有关; miR-215 在 RB 细胞系 Y79 及 HXO-Rb44 中的表达水平显著高于其在正常视网膜血管内皮细胞 ACBRI-181 中的表达水平($P<0.01$); miR-215 抑制物显著降低 HXO-Rb44 细胞中 miR-215 的表达水平并导致细胞活力降低、增殖能力下降、胞内 Caspase3 活性增加及凋亡细胞百分比增加; miR-215 类似物显著升高 Y79 细胞中 miR-215 的表达水平并导致细胞活力升高、增殖能力增强及凋亡细胞百分比降低。同时, 下调 HXO-Rb44 细胞中 miR-215 水平显著升高细胞内 Rb1 蛋白表达水平, 过表达 Y79 细胞中 miR-215 水平显著降低细胞内 Rb1 蛋白表达水平。**结论** miR-215 在视网膜母细胞瘤组织中表达升高且与恶性临床病理特征相关。miR-215 可增强视网膜母细胞瘤细胞活力、增殖能力并减少细胞凋亡, 并可降低细胞内 Rb1 蛋白表达, 提示 miR-215 在视网膜细胞瘤的发生发展中发挥重要作用。

【关键词】 MicroRNA-215; 视网膜母细胞瘤; 肿瘤生长; 临床意义

【中图分类号】 R739.7 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003—6350(2015)24—3592—06

Regulatory effect of MicroRNA-215 on the growth of human retinoblastoma cells and the expression of Rb1.

YANG Lin-sheng, WANG Li-lun, DU Qing-wei. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000, Shaanxi, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the clinical significance and functional role of microRNA-215 (miR-215) in retinoblastoma (RB) tissues and cells, and to analyze the effect of miR-215 on cell viability, proliferation and apoptosis. **Methods** We detected miR-215 expression in 51 samples of RB and the matched normal tumor-adjacent tissues using qRT-PCR. The expression level of miR-215 was altered by corresponding vectors (miR-215 inhibitor and miR-215 mimic) in RB cells. And then MTT, BrdU cell proliferation, Caspase3 activity and flow cytometry assay were performed to examine the viability, proliferation and apoptosis of RB cells. Western blot was used to detect the

基金项目: 陕西省科技厅项目(编号: 2013KJXX31)

通讯作者: 王理论。E-mail: yanglinsheng783@163.com

-
- [10] 季永, 张可璇, 毛洪雅, 等. 缝隙连接蛋白 Cx43 介导硫化氢后处理对大鼠心肌的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(7): 999-1003.
- [11] Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitivem mechanism [J]. Circ Res, 2001, 88(8): 802-809.
- [12] Aronsen JM, Swift F, Sejersted OM. Cardiac sodium transport and excitation-contraction coupling [J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 61: 11-19.
- [13] Ottolia M, Torres N, Bridge JH, et al. Na/Ca exchange and contraction of the heart [J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 61: 28-33.
- [14] Roome CJ, Power EM, Empson RM. Transient reversal of the sodium/calcium exchanger boosts presynaptic calcium and synaptic transmission at a cerebellar synapse [J]. J Neurophysiol, 2013, 109(6): 1669-1680.
- [15] Cuomo O, Gala R, Pignataro G, et al. A critical role for the potassium-dependent sodium-calcium exchanger NCKX2 in protection against focal ischemic brain damage [J]. J Neurosci, 2008, 28(9): 2053-2063.
- [16] Kitao T, Takuma K, Kawasaki T, et al. The $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-mediated Ca^{2+} influx triggers nitric oxide-induced cytotoxicity in cultured astrocytes [J]. Neurochem Int, 2010, 57(1): 58-66.
- [17] Neef S, Dybkova N, Sossalla S, et al. CaMKII-dependent diastolic SR Ca^{2+} leak and elevated diastolic Ca^{2+} levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation [J]. Circ Res, 2010, 106(6): 1134-1144.
- [18] Chelu MG, Sarma S, Sood S, et al. Calmodulin kinase II-mediated sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak promotes atrial fibrillation in mice [J]. J Clin Invest, 2009, 119(7): 1940-1951.
- [19] Neef S, Dybkova N, Sossalla S, et al. CaMKII-dependent diastolic SR Ca^{2+} leak and elevated diastolic Ca^{2+} levels in right atrial myocardium of patients with atrial fibrillation [J]. Circ Res, 2010, 106(6): 1134-1144.

(收稿日期: 2015-04-23)