

本文引用:刘志云,范金茹,周斐然,陈彤,王建湘,欧阳过,廖建萍,谢荣苑.心痛方对急性心肌梗死大鼠心肌组织内游离钙离子浓度及 RYR2、PLB mRNA 表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(5):504-507.

心痛方对急性心肌梗死大鼠心肌组织内游离钙离子浓度及 RYR2、PLB mRNA 表达的影响

刘志云¹,范金茹^{2*},周斐然²,陈彤²,王建湘²,欧阳过¹,廖建萍²,谢荣苑¹

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 观察心痛方对急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)大鼠心肌组织内游离钙离子浓度(Ca^{2+})及 RYR2、PLB mRNA 表达的影响,探讨钙稳态调节在 AMI 中的意义及心痛方的疗效机制。**方法** 50 只 SD 大鼠分为假手术组、模型组、心痛方高剂量组、心痛方低剂量组、硫氮卓酮组。采用改进的冠脉结扎法制备 AMI 模型,运用激光扫描共聚焦显微镜法检测心肌组织内 Ca^{2+} ,HE 染色法测定心肌梗死面积,RT-PCR 法测定心肌组织内 RYR2、PLBmRNA 表达。**结果** 各药物干预组、模型组与假手术组比较, Ca^{2+} 均增高,RYR2、PLBmRNA 表达均降低,差异均具有统计学意义($P<0.01$);各药物干预组与模型组比较 Ca^{2+} 均降低,心梗面积均缩小,RYR2、PLBmRNA 表达均增高($P<0.01$);两组中药组与硫氮卓酮组比较, Ca^{2+} 均降低,心梗面积均缩小,RYR2、PLBmRNA 表达均增高($P<0.01$ 或 $P<0.05$);中药高剂量组与中药低剂量组比较, Ca^{2+} 降低,心梗面积缩小,RYR2、PLBmRNA 表达增高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论** 心痛方能缩小 AMI 大鼠心梗面积,且较硫氮卓酮组更有优势;心痛方可降低 Ca^{2+} 并提高 RYR2、PLB mRNA 的表达,调节钙稳态,其对 AMI 大鼠的保护作用可能与减少钙超载对心肌细胞的损害,增强心肌收缩力有关。

[关键词] 急性心肌梗死;心痛方; Ca^{2+} ;RYR2;PLB mRNA;钙稳态

[中图分类号]R285.5;R542.2*2 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2018.05.004

Effect of Xintong Fang on the Free Calcium Concentration and Expression of RYR2 and PLB mRNA in Cardiac Muscular Tissue of Rats with Acute Myocardial Infarction

LIU Zhiyun¹, FAN Jinru^{2*}, ZHOU Feiran², CHEN Tong², WANG Jianxiang², OUYANG Guo¹, LIAO Jianping², XIE Rongyuan¹

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Xintong Fang on intracellular free calcium concentration (Ca^{2+}), and RYR2 and PLB mRNA expression in cardiomyocytes of acute myocardial infarction (AMI) rats, and to explore the significance of calcium homeostasis in AMI and the therapeutic mechanism of Xintong Fang. **Methods** Fifty SD rats were divided into the sham operation group, model group, high dose of Xintong Fang group, low dose of Xintong Fang group, diltiazem group. The AMI model was made by improved coronary ligation, and the Ca^{2+} in myocardium was detected by laser scanning copolymerization microscope, and the infarct size was measured by HE staining, and the expression of RYR2 and PLB mRNA in myocardium was measured by RT-PCR. **Results** Compared with the sham operation group, Ca^{2+} in the drug intervention groups and model group increased, the expression of RYR2 and PLB mRNA decreased, the difference was statistically significant ($P<$

[收稿日期]2017-08-25

[基金项目]湖南省教育厅科学研究项目(16A159)。

[作者简介]刘志云,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治心血管疾病。

[通讯作者]* 范金茹,女,博士,主任医师,教授,E-mail:fanjr218@sina.com。

0.01)。Compared with the model group, myocardial infarction area and Ca^{2+} in each drug intervention groups decreased, the expression of RYR2 and PLB mRNA expression increased ($P<0.01$)。Compared with the diltiazem group, the myocardial infarction area and Ca^{2+} in Xintong Fang groups reduced, RYR2 and PLB mRNA expression increased ($P<0.01$ or $P<0.05$)。Compared with the low-dose of Xintong Fang group, the myocardial infarction area and Ca^{2+} in the high-dose of Xintong Fang group reduced, the expression of RYR2 and PLB mRNA increased ($P<0.01$ or $P<0.05$)。Conclusion Xintong Fang can reduce myocardial infarction area in rats with acute myocardial infarction, and has more advantages than sulfiazem group. Xintong Fang could decrease the concentration of Ca^{2+} , increase the expression of RYR2 and PLB mRNA, and regulate calcium homeostasis. Its protective effect on AMI rats may be related to reduced myocardial damage of calcium overload and enhanced.

[**Keywords**] acute myocardial infarction; Xintong Fang; Ca^{2+} ; RYR2; PLB mRNA; calcium homeostasis

大量研究表明钙稳态失调是诱发急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)的重要因素,心肌细胞内游离的 Ca^{2+} 决定了心肌细胞的兴奋程度,进而调节心肌收缩力,RYR2能通过调节心肌细胞内的游离 Ca^{2+} 来控制心肌的舒缩,而磷酸化的 PLB可增加肌浆网中 Ca^{2+} 摄取的速度,减轻细胞内钙超载,发挥心肌保护作用^[1-3]。本研究通过观察心痛方对 AMI大鼠心肌组织内游离 Ca^{2+} 及 RYR2、PLB mRNA 表达的影响,探讨钙稳态调节在 AMI 中的意义及心痛方的疗效机制。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级SD雄性大鼠,体质量(200±20)g,鼠龄8~10周,由长沙市天勤生物技术有限公司提供,动物合格证号:SCXK(湘)2014-0011。

1.2 主要仪器和试剂

流式细胞仪(厂家BD,FACS Calibur);荧光定量PCR仪(ABI公司,7900 HT system);凝胶成像分析系统(Bio-Rad公司,Gel Doc1000);RNA提取试剂Trizol(SIGMA公司);PCR试剂盒、PCR引物(上海生物工程股份有限公司提供)。

1.3 实验药物

心痛方(组成:柴胡10g,瓜蒌10g,郁金10g,桃仁10g,蒲黄10g,川芎10g,九香虫5g,白芥子10g,甘草5g),购于湖南中医药大学第一附属医院中药房,由湖南中医药大学心血管实验室统一煎制成浓缩汤剂(含生药0.8g/mL);氯化钠注射液(湖南康源制药有限公司,批号:B17032102d);硫氮卓酮(天津田边制药有限公司,批号:1701091)。

2 方法

2.1 分组

大鼠先按体质量分层,再按随机数表随机分为

以下5组:假手术组(A组)、模型组(B组)、心痛方高剂量组(C组)、心痛方低剂量组(D组)、硫氮卓酮组(E组),每组各10只。

2.2 造模

采用改进的冠脉结扎法^[4],对B、C、D、E组大鼠进行造模。以左心室前壁颜色变白和运动减弱且心电图显示II导联ST段弓背向上抬高 ≥ 0.1 mV或出现病理性Q波为结扎成功的标志(S-T段无改变者淘汰)。A组大鼠仅开胸,不结扎。

2.3 干预

以60kg人临床用药用量为标准,参照剂量-体表面积换算方法计算大鼠给药量,均采用灌胃法给药,药物浓度按大鼠1mL/100g灌胃容量配制。C组的给药剂量为8g/kg,D组的给药剂量为4g/kg,E组的给药剂量为2.61mg/kg,A组和B组均给予等容量生理盐水。造模(或假手术)后2h开始给药,每天1次,连续7d,于第7天灌胃30min后处死大鼠。

2.4 激光扫描共聚焦显微镜法测心肌组织内游离 Ca^{2+}

将AMI大鼠心脏组织剪成小块,经研磨过滤、洗涤、离心、培养、再离心、再洗涤、再过滤后,用流式细胞仪进行检测:激发波长为488nm,发射波长525~530nm,其荧光值与心肌组织内游离 Ca^{2+} 正相关,即以平均荧光强度(mean fluorescence intensity, MFI)代表心肌组织内游离 Ca^{2+} ,最后用CellQuest软件进行数据采集、分析。

2.5 HE染色法测心肌梗死面积

灌胃给药第7天处死大鼠后,摘取心脏,在左冠状动脉结扎点以下取垂直于左室长轴横断片段切片,切片厚度4 μm ,行HE染色,梗死面积(%)=[(左室梗死部位心内膜长/总心内膜周长)/2+(左室梗死部位心外膜长/总心外膜周长)/2]×100%,应用专业图像分析软件计算。

2.6 RT-PCR 法测 RYR2、PLB mRNA 表达

取 AMI 大鼠左心室心肌 (结扎缺血及坏死区域) 100 mg, 用 Trizol 试剂 1 mL, 提取总 RNA, 然后用紫外分光光度计测定 RNA 的浓度和纯度, 再进行 cDNA 的合成, 操作步骤均按试剂盒说明书进行, 引物序列由上海生物工程股份有限公司提供, 根据 Gene Bank 中检索出大鼠 RYR2、PLB mRNA 及和内参基因 GAPDH 的引物序列, 用 Primer5 软件设计并合成适合实时定量 PCR 反应的特异性引物: GAPDH -F: 5' -AGTGCCAGCCTCGTCTCATA -3', GAPDH -R: 5' -GACTGTGCCGTTGAACCTTGC -3', 扩增片段长度 200 bp; RYR2 -F: 5' -CTGGCAGAGAGTGTC CTCAACTA -3', RYR2 -R: 5' -CATC-GAATATGAACTGCCTCTTG-3', 扩增片段长度 180 bp; PLB -F: 5' -CTCAAGGCATTCTACCAACACAG -3', PLB -R: 5' -ACTCCTTTGTGGGCTACTCTTTG -3', 扩增片段长度 180 bp。RT-PCR 反应体系: SYBR Green 1 染料 5 μ L, 上游引物 10 mM 0.2 μ L, 下游引物 10 mM 0.2 μ L, cDNA 1 μ L, ddH₂O 5 μ L, 总体系 10 μ L。反应条件为: 93 $^{\circ}$ C 2 min 预变性, 然后按 93 $^{\circ}$ C 1 min 变性, 60 $^{\circ}$ C 1 min 退火/延伸, 共 40 个循环。取 PCR 产物 5 μ L 于 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳, 然后在凝胶成像分析系统上实行吸光度扫描来观察条带的灰度强弱, RYR2、PLB mRNA 吸光度值同 GAPDH 吸光度的比值来表示结果。

2.7 统计学方法

统计分析采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 实验数据均以 " $\bar{x} \pm s$ " 表示, 多组间均数比较选用单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 造模结果

50 只大鼠, 造模后用药前 B 组、C 组、E 组因术后严重心律失常各死亡 1 只。造模用药后 A 组死亡 1 只, B 组死亡 3 只, C 组死亡 1 只, D 组死亡 2 只, E 组死亡 3 只。

3.2 心痛方对 AMI 大鼠心肌组织内游离 Ca²⁺ 及心梗面积的影响

各组与假手术组比较, MFI 均增高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 各药物干预组与模型组比较, MFI 均降低 ($P < 0.01$), 心梗面积均缩小 ($P < 0.01$); 两组中药组与硫氮卓酮组比较, MFI 均降低 (C 组 $P < 0.01$, D 组 $P < 0.05$), 心梗面积均缩小 ($P < 0.01$); 中药高剂量组与中药低剂量组比较, MFI 降低 ($P < 0.01$), 心梗面积

缩小 ($P < 0.05$), 详见表 1。

表 1 心痛方对 AMI 大鼠心肌组织内游离 Ca²⁺ 及心梗面积的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MFI	心梗面积/%
假手术组	9	12.13 \pm 0.19	-
模型组	6	13.72 \pm 0.07 Δ	36.31 \pm 2.27
心痛方高剂量组	8	12.54 \pm 0.26 $\Delta^{***\#}$	23.04 \pm 1.69 $^{**\#}$
心痛方低剂量组	8	12.83 \pm 0.13 Δ^{**}	25.60 \pm 1.64 **
硫氮卓酮组	6	13.07 \pm 0.20 Δ^*	28.26 \pm 1.48 *
<i>F</i>		73.203	57.357
<i>P</i>		0.000	0.000

注: 与假手术组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $\star P < 0.01$; 与中药低剂量组比较, $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与硫氮卓酮组比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$ 。

3.3 心痛方对 AMI 大鼠心肌组织内 RYR2、PLB mRNA 表达的影响

各组与假手术组比较, RYR2、PLB mRNA 表达均降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 各药物干预组与模型组比较, RYR2、PLB mRNA 表达均增高 ($P < 0.01$); 两组中药组与硫氮卓酮组比较, RYR2、PLB mRNA 表达均增高 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 中药高剂量组与中药低剂量组比较, RYR2、PLB mRNA 表达增高 ($P < 0.01$), 详见表 2。

表 2 心痛方对 AMI 大鼠 RYR2、PLB mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	RYR2 mRNA	PLB mRNA
假手术组	9	1.73 \pm 0.04	1.51 \pm 0.03
模型组	6	1.05 \pm 0.04 Δ	0.97 \pm 0.04 Δ
心痛方高剂量组	8	1.31 \pm 0.01 $\Delta^{***\#}$	1.24 \pm 0.05 $\Delta^{**\#}$
心痛方低剂量组	8	1.24 \pm 0.05 $\Delta^{**\#}$	1.16 \pm 0.04 Δ^{**}
硫氮卓酮组	6	1.15 \pm 0.02 Δ^*	1.11 \pm 0.04 Δ^*
<i>F</i>		579.078	203.799
<i>P</i>		0.000	0.000

注: 与假手术组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $\star P < 0.01$; 与中药低剂量组比较, $^* P < 0.01$; 与硫氮卓酮组比较, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$ 。

4 讨论

大量研究表明钙稳态失调会导致细胞功能障碍和代谢紊乱, 是诱发心血管疾病的重要因素^[5-6]。其中 AMI 发生的电生理基础主要是心肌细胞严重 Ca²⁺ 超载诱发心肌细胞后除极进而导致其不能有效舒张, 收缩张力降低^[7]。心肌细胞的钙循环主要包括肌浆网的钙释放、钙回摄及钙储存这 3 个主要过程^[8]。心肌细胞内游离的 Ca²⁺ 决定了心肌细胞的兴奋程

度,进而调节心肌收缩力^[9]。而肌浆中 Ca^{2+} 快速下降是心肌细胞舒张的决定因素^[10]。研究发现缺血缺氧造成心肌细胞损伤后,胞浆内 Ca^{2+} 会明显升高。本研究发现,各药物干预组与模型组比较, Ca^{2+} 均降低,心梗面积均缩小,提示心痛方及硫氮卓酮对 AMI 的治疗作用可能与降低 Ca^{2+} 有关。RYR2 是广泛存在于心肌细胞肌浆网上主要的 Ca^{2+} 释放通道,其功能状态对心肌细胞内钙稳态具有重大影响^[11]。其功能障碍造成的钙外流阈值改变导致钙异常释放是引起致死性心律失常和心力衰竭的病理基础^[1-2]。当 RYR2 表达增强时,钙异常释放减少,从而发挥心肌保护作用。磷酸化的受磷蛋白(PLB)可增加肌浆网中 Ca^{2+} 摄取的速度,减轻细胞内钙超载^[3]。研究显示^[12],通过增加磷酸化 PLB 蛋白表达和其功能,可增加肌浆网对 Ca^{2+} 摄取,从而纠正心力衰竭。本研究发现,各药物干预组与模型组比较,RYR2、PLBmRNA 表达均增高,提示心痛方及硫氮卓酮对钙稳态均有调节作用,其作用机制可能与减少钙超载对心肌细胞的损害,增强心肌收缩力有关。硫氮卓酮是临床上常用的非二氢吡啶类钙拮抗剂,可降低心肌胞浆 Ca^{2+} ,增加心肌供血供氧,缓解临床症状。但其也有一定的应用局限,有的甚至还可以导致病情的恶化^[13]。因此研究中医药防治 AMI 具有重要临床意义。心痛方在临床上治疗不稳定型心绞痛疗效确切^[14],前期动物实验不仅从炎症反应通路证实心痛方能缩小大鼠心肌梗死面积,还发现其可通过提高 SERCA2a 活性调节钙稳态,降低心肌梗死后心律失常发生,从而减少死亡^[15-16]。方中以柴胡、瓜蒌为君,郁金、桃仁、蒲黄、川芎共为臣,九香虫、白芥子为佐,甘草为使,共奏行气化痰、活血化瘀之功。

参考文献:

- [1] PRIORI S G, CHEN S R. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} handling and arrhythmogenesis[J]. *Circ Res*, 2011, 108(7):871-883.
- [2] KUSHNIR A, MARKS A R. The ryanodine receptor in cardiac physiology and disease[J]. *Adv Pharmacol*, 2010,59(10):1-30.
- [3] 贺 熙,毕学苑,王 皓,等.心血管缺血再灌注损伤钙调控的研究进展[J].*生理学报*,2012,64(3):321-326.
- [4] 陈学娟,范金茹,廖建萍,等.冠脉结扎法大鼠心肌梗死模型的改进.中国中医急症,2014,23(10):1806-1807.
- [5] FISCHER T H, MAIER L S, SOSSALLA S. The ryanodine receptor leak: how a tattered receptor plunges the failing heart into crisis[J]. *Heart Fail Rev*, 2013,18(4):475-483.
- [6] KALOQERIS T, BAINES C P, KRENZ M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012,298:229-317.
- [7] 苏亚平,卜琳琳,李平平,等.丹参酮 II_A 注射液对急性心肌梗死大鼠钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 表达及心肌收缩力的影响[J].*中国中医急症*,2016,25(2):204-207.
- [8] 朱蔚琳,何并文.心肌细胞钙循环调节机制的研究进展[J].*医学综述*,2013,19(14),2530-2532.
- [9] 徐 曼,逯星竹,毕学苑,等.肌浆网/内质网钙调控在心血管疾病中的研究进展[J].*心脏杂志*,2014,27(2):216-220.
- [10] PERIASAMY M, KALYANASUNDARAM A. SERCA pump isoforms their role in calcium transport and disease[J]. *Muscle Nerve*, 2007,35(4):430-442.
- [11] 郝禄贵,沈月华.RyR2 基因与心脏性猝死的相关性研究[J].*解剖学研究*,2016,38(1):11-15.
- [12] 刘燕琴,冷建春.钙调控与心肌缺血再灌注损伤的中西医防治研究进展[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2016,9(14):2011-2013.
- [13] 赵 熠.钙拮抗剂在心血管病患者中的应用及不良反应分析[J].*临床和实验医学杂志*,2012,11(16):1329,1332.
- [14] 李金洋,范金茹.范金茹教授妙用心痛方加减辨治不稳定型心绞痛[J].*中西医结合心脑血管病杂志*,2014,12(3):366-367.
- [15] 熊 杜,范金茹,陈 彤,等.心痛方对急性心肌梗死大鼠血浆 I-CAM-1、VCAM-1 的影响[J].*中医药通报*,2015,14(6):66-68.
- [16] 欧阳过,范金茹,周斐然,等.心痛方对急性心肌梗死大鼠 SERCA2amRNA 表达及心律失常的影响[J].*中国中医急症*,2017,26(1):30-32.

(本文编辑 杨 瑛)

[1] PRIORI S G, CHEN S R. Inherited dysfunction of sarcoplasmic