

◇ 药学研究 ◇

辛伐他汀对快速起搏家兔心房重构的影响

陈 晨, 王联发

摘要 目的 建立家兔快速心房起搏模型,探讨辛伐他汀对快速心房起搏早期心电图心房有效不应期(AERP)变化及心房L型钙离子通道 $\alpha 1c$ 亚单位蛋白表达的影响。方法 42只家兔均分为对照组、心房快速起搏组、辛伐他汀干预组。辛伐他汀干预组每天5 mg/(kg·d)辛伐他汀灌胃2周,其余组以等量生理盐水灌胃2周,对照组不行起搏。心房快速起搏组和辛伐他汀干预组行快速心房起搏(800次/分)建立急性心房纤颤模型,分别测定各组在0、1、2、4、6、8 h(记为P0、P1、P2、P4、P6、P8)时的心房有效不应期(AERP150和AERP200)及AERP200-AERP150的频率适应性,用Western blot法检测急性起搏8 h后右房组织L型钙通道 $\alpha 1c$ 蛋白表达,同时检测各组血脂水平。结果 各组动物血脂水平差异无统计学意义。心房快速起搏组在不同基础刺激作用下AERP明显缩短,AERP200-AERP150的频率适应性明显下降($P < 0.05$),辛伐他汀干预组AERP缩短程度减轻,AERP200-AERP150频率适应性同对照组相比差异无统计学意义。心房快速起搏组起搏8 h后心房肌细胞L型钙通道的 $\alpha 1c$ 亚单位的蛋白表达水平较对照组明显下降($P < 0.01$),辛伐他汀干预组蛋白表达水平较对照组下降不明显。结论 快速心房起搏早期心房快速起搏组较对照组有效不应期明显缩短、频率适应性降低,辛伐他汀预处理可明显改善不应期缩短程度,快速起搏前后频率适应性基本维持。快速起搏8 h后L型钙通道的 $\alpha 1c$ 亚单位的蛋白表达水平下降,主要的机制可能是与快速起搏引起的钙超载导致离子通道转录水平的下降有关,辛伐他汀预处理可明显减轻蛋白表达水平下降的程度,而不依赖于降血脂效应,可能为辛伐他汀降低心律失常发生率的细胞学离子机制之一。

关键词 辛伐他汀;快速起搏;心房重构;L-钙离子通道

中图分类号 R 541.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)02-0198-04

辛伐他汀为羟甲基戊二酸单酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂,其阻滞胆固醇合成、治疗高胆

固醇血症的作用已被临床广泛应用。近年来,随着4S、CARE、WOSCOPS等一系列大规模随机临床试验,结果显示他汀类药物不仅能降低血脂水平,而且有独立于降脂作用之外的其他有益作用,称之为他汀的多效性^[1]。该研究通过建立快速起搏家兔心房模型,探讨辛伐他汀对于快速起搏家兔心房有效不应期(AERP)及心房肌细胞L型钙离子通道 $\alpha 1c$ 亚单位的影响,分析辛伐他汀抗心律失常的细胞学离子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 新西兰大耳白家兔42只,购自安徽医科大学实验动物中心,体质量2.0~2.5 kg,雌雄不拘。

1.2 建立快速心房起搏模型 42只家兔均分为对照组、心房快速起搏组、辛伐他汀干预组。辛伐他汀干预组每天5 mg/(kg·d)辛伐他汀灌胃2周,其余组以等量生理盐水灌胃2周,分别给予3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)经耳缘静脉注射麻醉,静脉推注肝素1 000 U,将兔仰卧固定于兔台,颈部正中切口,分离右侧颈内静脉并切开,近头端结扎,置入1根5F四极电极导管(电极间距5 mm)至右房,插入深度约6 cm,将远端电极对与心电图左、右上肢电极相连,记录家兔右心耳内膜心电图,示大A小V,表明电极位于右心房,固定好电极导管。经耳缘静脉注射阿托品(0.04 mg/kg)和美多心安(0.2 mg/kg)以阻断自主神经对心率的影响,心房快速起搏组和辛伐他汀干预组采用心脏电生理刺激仪连续单刺激模式进行8 h的快速心房起搏,起搏周长100 ms,脉宽0.5 ms,电压4 V,记录心内膜心电图变化。对照组植入起搏电极,但不行高位快速右房起搏刺激,记录家兔正常I、II、III导联心电图,定时观察家兔的反应状态。

1.3 血脂测定 进行动物模型手术前,各组动物抽血进行三酰甘油、总胆固醇测定(全自动生化分析仪)。

1.4 AERP的测定 应用东方DF-5A心脏生理刺

2013-08-04 接收

基金项目:南京军区联勤部资助课题(编号:11YG04)

作者单位:安徽医科大学解放军临床学院心血管内科,合肥 230031

作者简介:陈 晨,女,硕士研究生;

王联发,男,硕士,副主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: wanglianfa1@126.com

激仪,采用 S1S2 程序递减刺激法,以基础周长分别为 150、200 ms 两个不同的基础周长进行 S1S2 递减扫描,S1S2 呈 10:1, S1S2 间期递减扫描,步长为 5 ms,以 S2 后不能引起心房激动的最长 S1S2 间期为 AERP,心房快速起搏组及辛伐他汀干预组分别于起搏开始前、起搏开始后 1、2、4、6、8 h(记为 P0、P1、P2、P4、P6、P8) 测量 AERP。对照组仅在相应时段测量 AERP 不行快速起搏。

1.5 标本的采集与蛋白质提取 3 组分别在起搏 8 h 结束后,将家兔麻醉,无菌技术开胸,迅速取出心脏,在无菌生理盐水中漂洗心脏,剪下右心房组织,用干净的剪刀将组织尽量剪碎,按 50~100 mg 组织加入 1 ml 组织裂解液,于冰上进行匀浆,裂解 30 min 后,用移液器将裂解液移至 1.5 ml 离心管中,然后在 4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清液分装于 0.5 ml 离心管中并置于 -20℃ 保存。

1.6 Western blot 法检测心房肌蛋白表达 取上清液,按 BCA 蛋白定量法测定抽提蛋白的浓度。稀释后 100℃ 变性 5 min, 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 分离蛋白质,湿式电转 120 min, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。分别加 L-型钙通道 $\alpha 1c$ 多克隆抗体(美国 Chemicon 公司)和膜内参抗体 β -actin, 4℃ 过夜, TBST 洗 3 次,加入辣根过氧化物酶标记 II 抗室温孵育 1 h 后, TBST 洗膜 3 次,化学增强发光剂 DAB 显影,凝胶成像仪分析系统扫描,观察各样本目的条带与 β -actin 的相对灰度值作为各蛋白表达的相对含量。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 血脂的变化 对照组、心房快速起搏组、辛伐他汀干预组中三酰甘油 [1.10 ± 0.18] mmol/L vs [1.08 ± 0.21] mmol/L vs [1.08 ± 0.17] mmol/L]、总胆固醇 [1.16 ± 0.18] mmol/L vs [1.18 ± 0.22] mmol/L vs [1.14 ± 0.20] mmol/L] 比较差异无统计学意义。

2.2 AERP 的变化 3 组于快速心房起搏前 AERP150、AERP200 无明显差异,快速心房起搏后心房快速起搏组较对照组及辛伐他汀干预组 AERP 明显缩短,且随起搏周长及起搏时间的延长, AERP 缩短更明显,在快速心房起搏 8 h 后 AERP200、

AERP150 分别缩短 15.6 ms 及 9.8 ms ($P < 0.05$)。辛伐他汀干预组的缩短程度较心房快速起搏组明显减轻,于起搏 8 h 后 AERP200、AERP150 分别缩短 6.1 ms 及 3.6 ms ($P < 0.05$)。对照组于相应时段 AERP 无明显变化。见表 1。

表 1 基础起搏周长为 150 ms、200 ms 时 AERP 的比较 ($n=14, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	心房快速起搏组	辛伐他汀干预组
150 ms 时 AERP(ms)			
P0	115.0 $\pm$ 7.8	115.0 $\pm$ 8.0	115.0 $\pm$ 7.4
P1	114.9 $\pm$ 6.4	112.1 $\pm$ 8.4*	113.9 $\pm$ 8.5#
P2	115.1 $\pm$ 7.2	110.4 $\pm$ 8.6*	112.8 $\pm$ 9.0#
P4	115.4 $\pm$ 8.0	107.5 $\pm$ 9.2*	111.7 $\pm$ 9.2#
P6	114.8 $\pm$ 7.4	107.2 $\pm$ 9.5*	111.4 $\pm$ 8.7#
P8	114.9 $\pm$ 7.1	105.2 $\pm$ 9.8*	111.4 $\pm$ 9.2#
200 ms 时 AERP(ms)			
P0	126.4 $\pm$ 9.0	126.4 $\pm$ 9.5	126.4 $\pm$ 9.3
P1	125.9 $\pm$ 8.5	123.2 $\pm$ 10.0*	123.1 $\pm$ 10.4#
P2	126.3 $\pm$ 8.7	120.3 $\pm$ 11.2*	122.9 $\pm$ 11.7#
P4	126.4 $\pm$ 8.9	115.6 $\pm$ 10.5*	122.3 $\pm$ 11.5#
P6	126.2 $\pm$ 7.0	114.3 $\pm$ 11.2*	121.8 $\pm$ 11.9#
P8	126.3 $\pm$ 8.4	110.8 $\pm$ 10.7*	120.3 $\pm$ 11.2#

与对照组相应时点比较: * $P < 0.05$; 与心房快速起搏组相应时点比较: # $P < 0.05$

2.3 各组在不同基础刺激周长作用下 AERP 频率适应性的变化 对照组频率适应性无明显变化, S1S2 周长越短, AERP 越短,即 AERP 频率适应性正常。心房快速起搏组在快速起搏前 AERP 频率适应性正常,随着起搏时间的延长, AERP200-AERP150 缩短程度明显减小 ($P < 0.05$),可见心房快速起搏组频率适应性下降。辛伐他汀干预组随起搏时间的延长, AERP200-AERP150 缩短程度同对照组比较差异无统计学意义,频率适应性基本维持,见图 1。

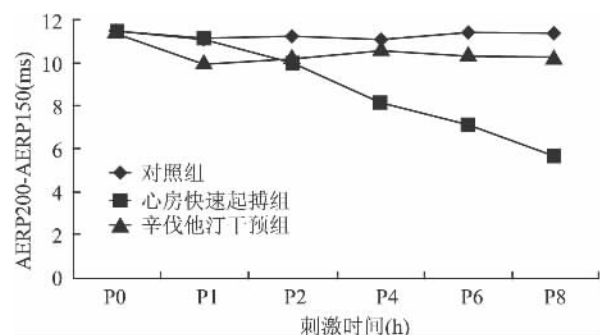


图 1 AERP 频率适应性变化的折线图

2.4 L-型钙通道 $\alpha 1c$ 蛋白的表达变化 L-型钙通

道 $\alpha 1c$ 目的蛋白和内参 β -actin 条带位置和理论值相符。心房快速起搏组较对照组于快速起搏 8 h 后 L -型钙通道 $\alpha 1c$ 蛋白表达明显下降, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 辛伐他汀干预组蛋白表达也有所下降, 但变化幅度明显小于心房快速起搏组, 与心房快速起搏组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明辛伐他汀对快速心房起搏导致的 L -型钙通道 $\alpha 1c$ 亚单位的表达有一定保护作用, 见图 2。

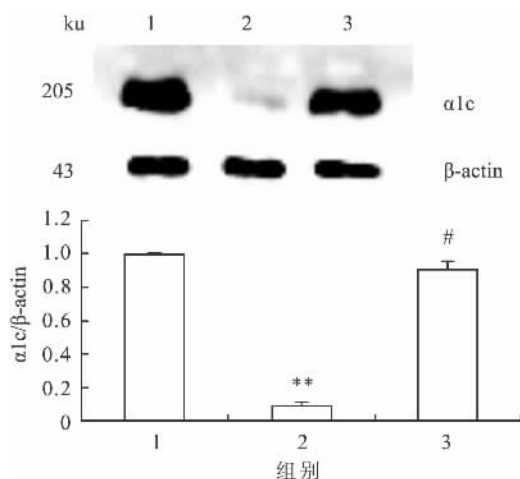


图2 Western blot L -型钙通道 $\alpha 1c$ 亚单位的蛋白表达

1: 对照组; 2: 心房快速起搏组; 3: 辛伐他汀干预组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与心房快速起搏组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

心房颤动 (atrial fibrillation, AF) 是临床上最常见的心律失常之一, 在 AF 的发病机制中, 心房电重构起着重要作用, 电重构的主要表现为 AERP 缩短、AERP 频率适应性降低, 不应期离散率增大和传导速度减慢, 有利于 AF 的发生和维持。动物实验与临床研究证明^[4] 快速心房激动使 AERP 缩短。Gaspo et al^[5] 将犬分 3 组, 分别快速起搏心房 1、7 和 42 d, 结果显示随着心房起搏时间延长, AERP 缩短及 AERP 的频率适应性逐渐降低, 心房传导时间延长、AF 周长逐渐缩短, 心房内各点之间 AF 周长的差异也随之增大, 提示心房电活动的不一致性加大。本研究成功建立快速心房起搏模型, 测量快速起搏家兔不同时间点 AERP 的变化, 观察各组在不同基础刺激周长作用下 AERP 及频率适应性的变化, 发现心房快速起搏组在不同基础刺激作用下 AERP 明显缩短, AERP200-AERP150 的频率适应性明显下降,

辛伐他汀干预组预处理可以有效预防快速起搏家兔诱导的 AERP 的缩短, 维持 AERP200-AERP150 的频率适应性, 在一定程度上拮抗快速起搏所导致的心房电重构的改变。本研究的模型主要是快速起搏 8 h 内 AERP 的变化, 不能说明持续性房颤心肌 AERP 的变化及辛伐他汀的作用。

临床和实验研究^[6] 表明, 心房电生理重构对 AF 的发生和维持起着重要作用, 频率相关的心房肌细胞内 Ca^{2+} 超负荷被认为是房颤电重构的始动因素^[7]。细胞电生理研究^[8-9] 进一步表明, 动作电位时限或 AERP 缩短及频率适应性下降主要源于 L -型钙通道下降, 心房肌 L -型钙通道是影响心房兴奋性和不应期变化的最主要因素。心房快速激动引起细胞内钙超载, 可通过触发负反馈机制, 使得钙通道失活, 从而减少 L -型钙通道电流的电流密度, 改变心房电生理特性, 发生电重构和兴奋收缩耦联障碍。Brundel et al^[10] 证实了在快速起搏的几小时内, 离子通道和电流密度呈平行改变, 而且 L -型钙离子通道的缩短被证明是动作电位时程缩短和频率适应改变的主要原因。 L -型钙离子通道蛋白是一个由多种不同亚型构成的离子通道家族, 而 $\alpha 1$ 亚基为各种亚型钙离子通道的核心组成部分, 是决定钙通道电压依赖性和药物敏感性的重要部分, L -型钙通道的 α 亚单位基因的下调是心房快速激动诱发的心房电重构中最主要的改变。本研究通过 Western blot 法检测急性起搏 8 h 后右房组织 L -型钙通道 $\alpha 1c$ 蛋白表达, 说明快速起搏家兔心房组织 L -型钙通道 $\alpha 1c$ 蛋白表达明显下降, 预先服用辛伐他汀可以明显减轻蛋白表达水平下降的程度, 而不依赖于降血脂效应, 可能为辛伐他汀降低心律失常发生率的细胞学离子机制之一。同时心肌细胞内的钙调节是一个非常复杂的过程, 钙离子平衡取决于通过 L -型、 T -型钙通道进入细胞的钙离子以及心肌细胞本身肌浆网对钙离子的摄取、贮存和释放等因素, 以及钙调素和相关激酶对钙的调节^[11], 对此还有待进一步研究。

参考文献

- Young Xu Y, Jabbour S, Goldberg R, et al. Usefulness of statin drugs in protecting against atrial fibrillation in patients with coronary artery disease [J]. Am J Cardiol, 2003, 92 (12): 1379-83.
- Santini M, Pandozi C. Repolarization and refractoriness in patients with persistent atrial fibrillation [J]. Ann Ist Super Sanita, 2001, 37 (3): 435-41.
- Gaspo R, Bosch R F, Talajic M, et al. Functional mechanisms un-

- derlying tachycardia-induced sustained atrial fibrillation in a chronic dog model [J]. *Circulation*, 1997, 96(11): 4027–35.
- [4] Yue L, Feng J, Gaspo R, et al. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation [J]. *Circ Res*, 1997, 81(4): 512–5.
- [5] 杨贵荣, 张薇, 黎莉. 应用单相动作电位研究房颤模型心房电重构的发生机制 [J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2010, 9(5): 445–8.
- [6] Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel B J, et al. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2005, 48(1): 9–28.
- [7] Kohlhaas M, Zhang T, Seidler T, et al. Increased sarcoplasmic reticulum calcium leak but unaltered contractility by acute CaMKII overexpression in isolated rabbit cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 2006, 98(2): 235–4.
- [8] Pandit S V, Berenfeld O, Anumonwo J M, et al. Ionic determinants of functional reentry in a 2-D model of human atrial cells during simulated chronic atrial fibrillation [J]. *Biophys J*, 2005, 88(6): 3806–21.
- [9] Brundel B J, Kampinga H H, Henning R H. Calpain inhibition prevents pacing-induced cellular remodeling in a HL-1 myocyte model for atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(3): 521–8.
- [10] 马瑞彦, 肖颖彬, 杨宗英. 快速心房起搏对家兔 *L* 型钙通道 $\alpha 1c$ 亚单位表达的影响及维拉帕米的保护作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2007, 32(9): 954–6.

Effects of simvastatin on the remodeling in rapid atrial pacing in rabbits

Chen Chen, Wang Lianfa

(*Dept of Cardiology, Liberation Army Clinical Institute, Anhui Medical University, Hefei 230031*)

Abstract Objective In this research we established rapid atrial pacing rabbit models, to investigate the effects of simvastatin on changes of early atrial effective refractory period (AERP) and protein expression of atrial $\alpha 1c$ subunit of *L*-type calcium channel on atrial remodeling. **Methods** 42 rabbits were randomly divided into 3 groups: control group, rapid pacing group and simvastatin group, simvastatin 5 mg/(kg · d) was given intragastrically daily for two weeks before electrophysiology study in simvastatin group, normal saline was given intragastrically in control and rapid pacing group instead. Control group with no pacing, in simvastatin group and rapid pacing group, right atrium was paced at 800 beats/min for 8 hours to establish acute atrial fibrillation models, right atrial effective refractory period (AERP) was measured at the basic cycle length of 200 ms and 150 ms before pacing and 1, 2, 4, 6, and 8 hours after the onset of the pacing, the changes of rate adaptation of AERP (AERP200–AERP150) were analyzed. Right atrium tissue was obtained for measurement of protein expression of atrial $\alpha 1c$ subunit of *L*-type calcium channel by Western blot. Simultaneously, lipid levels in each group was examined. **Results** No significant difference in lipid levels among three groups was observed. The AERP was shortened and the rate adaptation of AERP (AERP200–AERP150) disappeared during pacing compared with those before pacing ($P < 0.05$). The shortening of AERP was reversed and AERP200–AERP150 was maintained in simvastatin group. Compared with the control group, the protein expression levels of atrial $\alpha 1c$ subunit of *L*-type calcium channel decreased significantly after 8 hours pacing in rapid pacing group ($P < 0.01$). The protein expression levels of simvastatin group decreased insignificantly. **Conclusion** Atrial rapid pacing can induce the shortening of the AERP and the losing of adaptability to the frequency of AERP, pretreatment with simvastatin can improve the degree significantly and maintain the adaptability to frequency basically. The protein expression levels of atrial $\alpha 1c$ subunit of *L*-type calcium channel decreased significantly after 8 hours pacing, pretreatment with simvastatin can prevent this change without lowering the lipid levels, thus contributing to the ionic mechanism of simvastatin for antiarrhythmia.

Key words simvastatin; rapid atrial pacing; atrial electrical remodeling; *L*-type calcium channel