

## 水蛭素对大鼠急性心肌梗死后室性心律失常的影响

刘 君, 唐利龙, 廖新学, 唐安丽\*, 冯 冲  
(中山大学附属第一医院心内科, 广东 广州 510080)

**摘要:**【目的】探讨凝血酶的直接抑制剂重组双功能水蛭素对大鼠急性心肌梗死后室性心律失常的影响及相关机制。【方法】将70只雄性SD大鼠随机分为10组:水蛭素(HIR)结扎前(HIR 0 min)组,HIR结扎后5 min(HIR 5 min)组,HIR结扎后10 min(HIR 10 min)组,HIR结扎后20 min(HIR 20 min)组,HIR结扎后30 min(HIR 30 min)组,和生理盐水(NS)对应的各时间组,即NS 0 min,NS 5 min,NS 10 min,NS 20 min,NS 30 min,最终每组7只。观察各组室性心律失常的发生情况,Evans法计量各组心梗面积及采用逆转录聚合酶链反应对各组缺血心肌组织的IP3R家族的三种亚型进行测定。【结果】水蛭素组发生室性心律失常的持续时间及心律失常评分较生理盐水组在结扎后5~20 min均减少( $P < 0.05$ );IP3R家族的三种亚型均与心梗后室性心律失常持续时间呈正相关性;但IP3R2 mRNA在结扎后10 min及IP3R3 mRNA在结扎后10 min和20 min,HIR组较NS组下调( $P < 0.05$ )。【结论】水蛭素有抗心梗后室性心律失常的发生作用,其机制可能为通过IP3R2和IP3R3实现的,而并非IP3R1。

**关键词:** 水蛭素; 凝血酶; 重组双功能水蛭素; 三磷酸肌醇受体; 急性心肌梗死; 室性心律失常  
**中图分类号:** R54      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2010)01-0050-05

### Effects of Hirudin on Ventricular Arrhythmia after Acute Myocardial Infarction in Rats

LIU Jun, TANG Li-long, LIAO Xin-xue, TANG An-li\*, FENG Chong

(Division of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 To determine the effects and possible mechanism of the thrombin antagonist r-RGD-Hirudin(HIR) on ventricular arrhythmia(VA) after acute myocardial infarction(AMI). 【Methods】 Seventy adult male Sprague-Dawley rats were randomly subjected to the 10 groups according to duration of left coronary occlusion: HIR 0 min, HIR 5 min, HIR 10 min, HIR 20 min, HIR 30 min, and normal saline(NS) 0 min, NS 5 min, NS 10 min, NS 20 min, NS 30 min; and the average of every group is 7 rats. Acute myocardial infarction was produced by the occlusion of the left anterior descending coronary artery, then the measurements of arrhythmia and infarction sizing by Evans blue were assessed as well as the expression of three isoforms of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP3Rs) mRNA in ischemic myocardium by reverse transcriptase polymerase chain reactions (RT-PCR). 【Results】 Compared with NS groups, the measurements of VA in HIR were reduced significantly in 5 to 20 minutes after AMI ( $P < 0.05$ ). The incidence of VA was all positive related to the expression of three isoforms of IP3Rs mRNA ( $P < 0.01$ ). Compared with NS groups, the expression of type2, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R2) mRNA at 10 min and type3, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor mRNA (IP3R3) at 10 min and 20 min after AMI were significant decreased ( $P < 0.05$ ) in HIR groups. 【Conclusion】 The thrombin antagonist r-RGD-Hirudin exerts its myocardial protection against ventricular arrhythmia after acute myocardial infarction possible through IP3R2 and IP3R3 and not type1, inositol 1,4,5-trisphosphate receptor (IP3R1).

**Key words:** hirudin; thrombin; r-RGD-Hirudin; inositol 1,4,5-trisphosphate receptors; acute myocardial infarction; ventricular arrhythmia

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2010,31(1):50-54;78]

心梗后室性心律失常的发生机制尚未明确。 近年来研究表明,凝血酶受体的激活参与了心梗

收稿日期: 2009-09-03

基金项目: 国家自然科学基金(30770897/C03030201);广东省科技攻关项目(2006B36007004);中山大学5010计划项目(2007011)

作者简介: 刘君, 硕士, E-mail: liujunarmy@yahoo.com.cn; \* 通信作者: 唐安丽, 主任医师, 硕士生导师, E-mail: tangal\_mail@yahoo.com.cn

后室性心律失常的发生机制,其发生机制可能为 1,4,5-三磷酸肌醇受体途径介导的<sup>[1]</sup>。目前发现 1,4,5-三磷酸肌醇受体在心肌中有三种亚型表达<sup>[2]</sup>,但具体是通过那种受体参与其发生机制国内外未见相关报道。本研究旨在观察凝血酶的直接抑制剂重组双功能水蛭素对大鼠急性心肌梗死后心律失常及 1,4,5-三磷酸肌醇三种受体 mRNA 的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物与分组

选择三月龄、体质量 220 ~ 250 g 雄性健康 SD 大鼠 70 只(中山大学实验动物中心提供)按体质量从小到大编号,查随机数字表随机分为下列 10 组,水蛭素(HIR)结扎前(HIR 0 min)组,HIR 结扎后 5 min(HIR 5 min)组,HIR 结扎后 10 min(HIR 10 min)组,HIR 结扎后 20 min(HIR 20 min)组,HIR 结扎后 30 min(HIR 30 min)组,和生理盐水(NS)对应的各时间组,即 NS 0 min,NS 5 min,NS 10 min,NS 20 min,NS 30 min,最终每组 7 只。

### 1.2 主要化学试剂

重组双功能水蛭素购自复旦大学上海医学院;Trizol™ 购自 Invitrogen 公司;半定量逆转录-聚合酶链反应试剂盒购自 TaKaRa 公司;大鼠 IP3R1,IP3R2,IP3R3,beta-actin 的引物由 Invitrogen 公司合成。

### 1.3 大鼠心肌梗死模型制备

SD 大鼠腹腔注射 3%戊巴比妥钠 5 mL·kg<sup>-1</sup>,行气管切开后动物呼吸机(HX-200,成都泰盟科技有限公司)机械通气,呼吸频率 70 次/min,潮气量 4 ~ 6 mL;连接多导生理记录仪心电监护;胸正中偏左切口开胸,暴露心脏,眼科镊钝性分离心包,7.0 的眼科无创缝合线带针于左心耳与肺动脉圆锥下缘穿线结扎冠状动脉左支,并于结扎线根部两侧埋置结扎松解线,以收紧结扎线后心电图 II ST-T 抬高,放松后抬高的 ST-T 下降 1/2 以上为模型制备成功。结扎前组即结扎 0 min 组;动物模型制备方法同上,但只埋线不结扎冠状动脉。

### 1.4 心律失常的分析

生理盐水(0.1 mL),重组双功能水蛭素(0.1 mL,100 U/kg)<sup>[3]</sup>分别于结扎前 5 min 于对应各组

的大鼠尾静脉注射(结扎前组仅引线不结扎),心电图在实验中持续监测,以 3 个不锈钢电极分别接大鼠的左前肢,右前肢及右下肢,心电图信号通过计算机即时 Linux 系统分析。室性心律失常定义为以下几种:心律失常的评分参照 Curtis 和 Walker 方法<sup>[4-5]</sup>,对心律失常严重程度进行量化分析。心律失常的判断标准为:室性心动过速(VT)指连续 4 个以上的室性早搏;室性纤维颤动(VF)指单个 QRS 波群无法辨认的紊乱波形。偶发的室性早搏(occasional premature ventricular contraction, PVC):1 分;频发室性早搏(frequent PVC):2 分;室性心动过速(ventricular tachycardia, VT),1 ~ 2 次发作:3 分;VT, > 3 次发作或者室颤(ventricular fibrillation, VF):4 分。分别记录各组 PVC,VT,VF 事件发生的时间及持续时间,因为缺血面积与缺血性心律失常有必然的联系,而且每只大鼠的缺血面积不同,所以我们用室性心律失常发作持续时间/心梗面积比例来评价心梗后室性心律失常持续时间。

### 1.5 心肌梗死面积的测定

每只大鼠处死前 1 ~ 2 min 尾静脉注射 1% Evans 1 mL,心脏取出后迅速分离心室并用生理盐水冲洗后放入-70 冰箱冷冻 5 min,之后取出从心尖向心底部依次切成 8 ~ 10 片。分别称取非 Evans 染色组织即缺血组织及其总质量,以非染色组织质量/总质量为心室心梗面积。

### 1.6 RT-PCR 检测缺血心肌组织的 IP3R 三种亚型表达

根据 GenBank 中登录的大鼠 IP3Rs 各亚型的 cDNA 序列,利用美国 Whitehead 生物医学研究所基因组研究中心提供的 Primer5 软件在线设计引物(表 1),引物由 Invitrogen 公司合成。Trizol 法提取细胞总 RNA,以提取的总 RNA 为模板,Oligo(dT) 为引物,合成 cDNA 后,立即用于 PCR 反应。反应体系为:逆转录产物(cDNA) 1 μL,上、下游引物各 0.2 μL(终浓度为 0.2 μmol/L),10 × PCR 缓冲液 2 μL,10 mmol/L dNTP 0.8 μL,5 U/μL 的 Taq 酶 0.2 μL 即 1 U,加无菌水补足体积 20 μL,分管扩增反应条件为 95 °C,预变性 5 min;变性、退火及延伸条件分别是 94 °C、30 s,56 °C(IP3R1 为 56 °C;IP3R2 为 58 °C,IP3R3 为 60 °C)、30 s,72 °C、1 min,此循环进行 31 次。最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物经 2%琼脂糖凝胶电泳鉴定

(溴化乙锭染色),凝胶成像系统扫描。

表 1 三磷酸肌醇受体家族和内参  $\beta$ -actin 的引物序列  
Table 1 Primer of IP3Rs and  $\beta$ -actin for PCR

Gene	Primer sequence	Length (bp)
IP3R1	sence 5' -CGGAGTAGGAGATGTGCTCAG-3'	316
	antsence 5' -CATCTCTGCCACGTAGCTCTC-3'	
IP3R2	sence 5' -CTCTCTGGCCTCCAGATTCTT-3'	227
	antsence 5' -GGTCCTAGTGTGTGCAGCATT-3'	
IP3R3	sence 5' -AGCACTACATTGTGGCTGTCC-3'	155
	antsence 5' -AGAGAAAGTC2CTGGGAGCAAG-3'	
$\beta$ -actin	sence 5' -CACGGCATTGTCACCAACTG-3'	446
	antsence 5' -AGGGCAACATAGCACAGCTT-3'	

### 1.7 RT-PCR 产物测序

扩增的三种目的 PCR 产物及其三种目的上下游引物(10  $\mu$ mol)送 Invitrogen 公司广州测序部测序。

### 1.8 统计学分析

使用 ImageJ 程序软件对 PCR 产物电泳图进行光密度分析,以目的条带与内参条带  $\beta$ -actin 信号强度的比值代表组织中的 mRNA 的表达水平,

分析计算各条带的灰度值。采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示;计数资料用百分率表示,采用 SPSS 13.0 软件对两处理组间对应相同时间的 IP3Rs 值进行单因素方差分析;不同时间点室性心律失常的持续时间百分率与对应时间的 IP3Rs mRNA 表达值之间进行相关性分析; $P < 0.05$  为差异有统计学差异。

## 2 结 果

### 2.1 重组双功能水蛭素对急性心肌梗死早期心律失常的影响

2.1.1 心律失常评分 生理盐水对照组较重组双功能水蛭素组恶性心律失常程度高,如持续性室性心动过速及室颤,两组在 5 ~ 10 min 和 10 ~ 20 min 中有统计学差异( $P < 0.05$ ,表 2)

2.1.2 重组双功能水蛭素对急性心肌梗死室性心律失常发作持续时间的影响 重组双功能水蛭素组发生室性心律失常的持续时间在结扎左冠状动脉后 5 ~ 10 min 和 10 ~ 20 min 较对应相同时间的生理盐水组均明显减少,有统计学差异( $P < 0.05$ ,表 2)

表 2 重组双功能水蛭素对大鼠左冠状动脉结扎后心律失常的评分及室性心律失常持续时间影响

Table 2 Effects of r-RGD-Hirudin on arrhythmia scores and duration of ventricular arrhythmia in rats after left coronary occlusion

		<i>n</i>	0 min	0 ~ 5 min	5 ~ 10 min	10 ~ 20 min	20 ~ 30 min
Arrhythmia scores	NS	7	0	1.7 $\pm$ 0.9	1.7 $\pm$ 0.8 <sup>1)</sup>	2.4 $\pm$ 0.5 <sup>1)</sup>	1.4 $\pm$ 0.5
	HIR	7	0	2.3 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.7	3.7 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.5
Duration of arrhythmia	NS	7	0	88.2 $\pm$ 10.8	323.2 $\pm$ 102.1	231.4 $\pm$ 79.4	29.8 $\pm$ 5.7
	HIR	7	0	65.2 $\pm$ 31.4	68.0 $\pm$ 16.0 <sup>1)</sup>	95.7 $\pm$ 23.3 <sup>1)</sup>	22.0 $\pm$ 9.7

1) Compared with NS groups,  $P < 0.05$

### 2.2 IP3R 各亚型 mRNA 在各组缺血心肌组织中的表达

以来源于大鼠缺血心肌组织的总 RNA 为模板,分别采用 IP3R1、IP3R2、IP3R3 的特异性寡核苷酸引物,进行各自的 RT-PCR 扩增,发现在大鼠缺血心肌组织中 IP3Rs 3 种亚型均有表达,长度分别为 316 bp, 227 bp, 155 bp, 与设计引物的理论值一致。测序证实与 GenBank 中大鼠相应的受体序列一致。

### 2.3 IP3R 各亚型 mRNA 在各组缺血心肌组织中

的表达水平的变化

2.3.1 IP3R1 在各组缺血组织的 mRNA 表达水平在 NS 和 HIR 的各时间组中,缺血心肌组织的 IP3R1 的 mRNA 均随缺血时间的延长呈现出先增高后下降的现象,大约在结扎后 10 min IP3R1 mRNA 达高峰。NS 和 HIR 各对应相同时间组中,IP3R1 的表达两者均无统计学差异(图 1,  $P > 0.05$ )。

### 2.3.2 IP3R2 在各组缺血组织的 mRNA 表达水平

缺血心肌组织 IP3R2 mRNA 在 HIR 组中的结扎后 10 min 其表达均低于生理盐水,且有统计

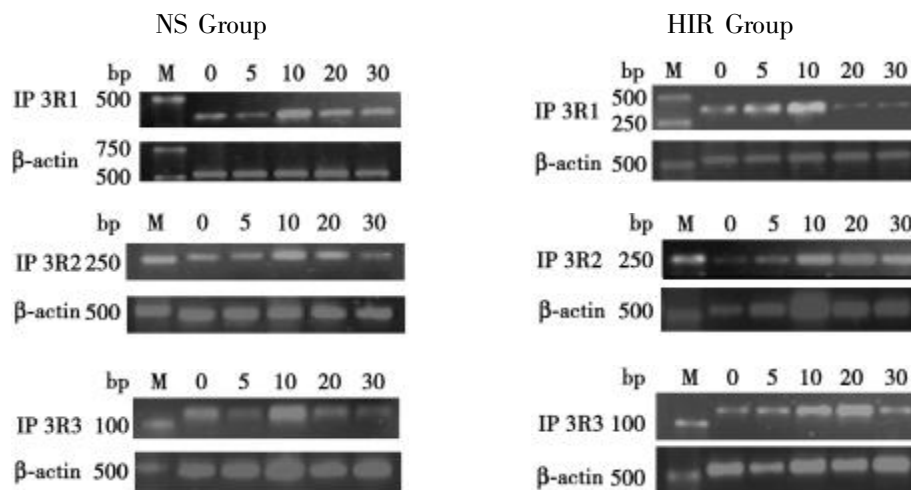


图 1 结扎左冠状动脉后不同时间缺血心肌组织 IP3R1、IP3R2 和 IP3R3 mRNA 在两组中的表达

Fig.1 Expression of IP3R1, IP3R2 and IP3R3 mRNA in ischemic myocardium after left coronary occlusion in different times

M: Marker; 0, 5, 10, 20, 30: 0 min, 5 min, 10 min, 20 min, 30 min after left coronary occlusion

学差异( $P < 0.05$ )。而在 NS 和 HIR 其他对应相同时间组之间 IP3R2 mRNA 的表达无统计学差异( $P > 0.05$ )。

### 2.3.3 IP3R3 在各组缺血组织的 mRNA 表达水平

缺血心肌组织 IP3R3 mRNA 在重组双功能水蛭素组中的结扎后 10 min 及 20 min 其表达均低于生理盐水,且有统计学差异( $P < 0.05$ )。而在 NS 和 HIR 其他对应相同的时间组之间 IP3R2 mRNA 的表达无统计学差异( $P > 0.05$ )。

## 2.4 急性心肌梗死后心律失常持续时间的比例与 IP3Rs 三种亚型 mRNA 表达水平的关系

### 2.4.1 急性心肌梗死后室性心律失常持续时间的比例与 IP3R1 mRNA 表达水平的关系

急性心肌梗死后室性心律失常的持续时间的比例与 IP3R1 mRNA 表达水平呈正性相关( $r = 0.905$ ;  $P < 0.01$ ), 心梗后室性心律失常持续时间的比例随 IP3R1 mRNA 表达水平的增高而增高。

### 2.4.2 急性心肌梗死后室性心律失常持续时间的比例与 IP3R2 mRNA 表达水平的关系

急性心肌梗死后室性心律失常的持续时间的比例与 IP3R2 mRNA 表达水平呈正性线性相关( $r = 0.893$ ;  $P < 0.01$ ), 心梗后室性心律失常持续时间的比例随 IP3R2 mRNA 表达水平的增高而增高。

### 2.4.3 急性心肌梗死后室性心律失常持续时间的比例与 IP3R3 mRNA 表达水平的关系

急性心肌梗死后室性心律失常持续时间的比例与 IP3R3 mRNA 表达水平呈正性线性相关 ( $r =$

$0.844$ ;  $P < 0.01$ ), 心梗后室性心律失常持续时间的比例随 IP3R3 mRNA 表达水平的增高而增高。

## 3 讨 论

### 3.1 水蛭素、凝血酶与急性心肌梗死后室性心律失常

在传统的认识上,凝血酶是对止血起着关键作用的。急性心肌梗死的病理生理学机制为冠状动脉粥样斑块破裂或溃烂,诱发血栓形成进而引起冠脉血流完全中断或极度降低,而凝血酶在其中起关键作用。近来研究表明:凝血酶不仅是血栓形成的关键酶,而且具有许多生物学效应,如调节细胞的生长和发育,它通过蛋白水解酶的作用来激活凝血酶受体而调节生物学功能<sup>[6]</sup>。凝血酶通过激活其受体可加速冠状动脉粥样硬化和诱发急性心肌梗死,这些证据也表明凝血酶除作用于血管外还作用于心肌细胞<sup>[7]</sup>。在其他情况下,例如在离体灌注的心脏中,凝血酶激活其受体通过 IP3 可致心律失常<sup>[1]</sup>。最近有研究证实,在活体实验中,心梗后凝血酶受体表达的增加与心律失常持续时间呈正性相关,凝血酶受体的激活参与心梗后心律失常的发生,而凝血酶的直接抑制剂水蛭素可明显减少心梗后室性心律失常的发生<sup>[8]</sup>。

### 3.2 三磷酸肌醇受体家族与急性心肌梗死后室性心律失常

三磷酸肌醇受体是细胞内钙离子释放通道。

表 4 IP3R1、IP3R2、IP3R3 在各组缺血组织的 mRNA 表达水平

Table 4 Expression of IP3R1, IP3R2, and IP3R3 mRNA in ischemic myocardium after left coronary occlusion in different time in all groups

Group		n	Preligation	5 min Postligation	10 min Postligation	20 min Postligation	30 min Postligation
IP3R1	NS	7	0.42 ± 0.14	0.56 ± 0.17	1.09 ± 0.18	0.81 ± 0.22	0.44 ± 0.08
	HIR	7	0.52 ± 0.11	0.69 ± 0.18	1.07 ± 0.22	0.67 ± 0.20	0.51 ± 0.12
IP3R2	NS	7	0.41 ± 0.16	0.64 ± 0.25	1.15 ± 0.24	0.68 ± 0.21	0.52 ± 0.14
	HIR	7	0.31 ± 0.10	0.58 ± 0.14	0.68 ± 0.24 <sup>1)</sup>	0.64 ± 0.18	0.44 ± 0.14
IP3R3	NS	7	0.36 ± 0.08	0.95 ± 0.37	1.28 ± 0.23	1.20 ± 0.37	0.73 ± 0.11
	HIR	7	0.37 ± 0.09	0.58 ± 0.14	0.94 ± 0.13 <sup>1)</sup>	0.93 ± 0.11 <sup>1)</sup>	0.82 ± 0.13

1) Compared with NS groups,  $P < 0.05$

IP3 与 IP3Rs 结合后致  $Ca^{2+}$  通道开放, 钙库释放  $Ca^{2+}$ , 引起一系列的信号转导, 除了在兴奋收缩偶联过程中起关键作用外, 还参与细胞生长、增殖、分化、细胞周期调控、激素分泌、神经递质释放、信息加工等活动的调节<sup>[9]</sup>。尽管目前三磷酸肌醇受体在心脏的作用机制仍有争议, 但越来越多的研究表明其在心肌细胞的定频率, 致心律失常, 心肌收缩和心肌肥大方面均有密切联系<sup>[10-11]</sup>。我们的研究表明 IP3Rs 三种亚型的 mRNA 表达水平与心梗后心律失常持续时间的比例均呈正性线性相关, 说明三种亚型均参与心梗后心律失常的发生机制。而水蛭素可抑制心肌细胞 IP3R2 及 IP3R3 mRNA 的表达, 却没有抑制 IP3R1, 说明其抗心律失常机制可能通过 IP3R2 和 IP3R3, 而非 IP3R1, 其机制可能与 IP3Rs 三种亚基的分布及特性有关。IP3R1 主要分布于普肯耶细胞, 其心律失常发生机制主要与交感神经的过度激活有关。IP3R1 在普肯耶细胞和其他传导细胞内表达量高于心房和心室肌细胞, 它定位于心肌细胞的闰盘上, 这提示 IP3R1 可能通过交感神经释放肾上腺素参与细胞间信息传递, 参与钙内流, 进而发生心律失常等病理生理变化<sup>[12]</sup>。IP3R2 被认为在心房细胞和心室肌细胞内占统治地位, 其表达主要位于细胞核周区域<sup>[13]</sup>。已有研究表明其在心房细胞中不仅具有正性肌力作用还有致心律失常作用, 利用基因敲除的方法使其表达缺失则不能诱发出心律失常, 说明其在心律失常的发生机制中有重要作用<sup>[14]</sup>。IP3R3 的表达主要位于心肌细胞肌浆网, 它可能参与细胞内储备钙的释放。而且最近研究表明: 兔的心室细胞中表达 IP3R2 及 IP3R3, 利用外源 IP3 可诱发钙火花, 促发动作电位, 产生正性

肌力的作用, 而使用 IP3Rs 的抑制剂则可消除这种作用<sup>[15]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] Jacobsen AN, Du XJ, Lambert KA, et al. Arrhythmogenic action of thrombin during myocardial reperfusion via release of inositol 1,4,5-triphosphate [J]. *Circulation*, 1996, 93(1): 23-26.
- [2] Taylor CW, da Fonseca PC, Morris EP. IP3 receptors: the search for structure [J]. *Trends Biochem Sci*, 2004, 29(4): 210-219.
- [3] Jian-Ming Gu, Yasuhiro Katsuura, Gary L. Ferrell, et al. Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo [J]. *BLOOD*, 2000, 95(5): 1687-1693.
- [4] Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo mode of regional myocardial ischaemia [J]. *Cardiovasc Res*, 1988, 22(9): 656-665.
- [5] 马跃东, 廖新学, 唐安丽. PPAR $\gamma$  激动剂罗格列酮对大鼠心肌缺血-再灌注心律失常的影响 [J]. *中山大学学报: 医学版*, 2007, 28(4): 413-417.
- [6] Shah R. Protease-activated receptors in cardiovascular health and diseases [J]. *Am Heart J*, 2009, 157(2): 253-262.
- [7] Damiano BP, Cheung WM, Mitchell JA, et al. Cardiovascular actions of thrombin receptor activation in vivo [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, 279(3): 1365-1378.
- [8] Lilong Tang, Chunyu Deng, Ming Long, et al. Thrombin receptor and ventricular arrhythmias after acute myocardial infarction [J]. *Mol Med*, 2008, 14

(下转第 78 页 to page 78)