

• 基础论著 •

肌浆网钙 ATP 酶过表达对心房颤动兔心房心电生理的影响

王红丽 李志强 周贤惠 周祁娜 汤宝鹏

【摘要】 目的 探讨肌浆网钙ATP酶2a (SERCA2a) 过表达对急性心房颤动 (AF) 兔心房肌电重构及结构重构的影响。方法 36只成年新西兰大白兔, 随机分为假手术组作为对照组 (Control组, $n=12$)、腺病毒/绿色荧光蛋白+AF组 (rAd/GFP+AF组, $n=12$)、腺病毒/SERCA2a+绿色荧光蛋白+AF组 (rAd/SERCA2a/GFP+AF组, $n=12$)。采用快速心房起搏 (频率600次/min) 制作急性AF模型。观察各组起搏0、4、8、12、24 h心房有效不应期的变化; 应用超声测量左右心房内径、左心室射血分数; 荧光显微镜下观察心肌组织绿色荧光表达情况。结果 rAd/SERCA2a/GFP+AF组自起搏12 h后AERP较rAd/GFP+AF组延长 ($P<0.05$)。rAd/SERCA2a/GFP+AF组与rAd/GFP+AF组相比较, 兔左右心房直径增大, 但增加不显著 ($P>0.05$); EF值升高, 两组有统计学差异 ($P<0.05$)。rAd/SERCA2a/GFP+AF组兔心肌冰冻切片在荧光显微镜下可见弥漫绿色荧光。结论 以rAd为载体介导SERCA2a基因转导在心房肌组织中过表达可以抗快速起搏引起的AERP缩短, 可有效逆转快速心房起搏兔心房肌的电重构及结构重构, 有望成为一种潜在的治疗AF的方法。

【关键词】 钙转运ATP酶类; 心房颤动; 电重构; 结构重构

Effect of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase2a overexpression on cardiac electrophysiology in rabbit with atrial fibrillation Wang Hongli*, Li Zhiqiang, Zhou Xianhui, Zhou Qina, Tang Baopeng.

*Clinical Medical Research Institute, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: Tang Baopeng, Email: tangbaopeng@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effects of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase2a (SERCA2a) gene on atrial electrical remodeling and structure remodeling in atrial fibrillation (AF) rabbits by 24 h rapid atrial pacing. **Methods** Thirty-six New Zealand rabbits were randomized into three groups ($n=12$), including control group, rAd/GFP+AF group and rAd/SERCA2a/GFP+AF group, AF was induced by rapid atrial pacing (600 beats/min) for 24 hours in each animal of rAd/GFP+AF group and rAd/SERCA2a/GFP+AF group, each animal of control group was not paced. The changes of atrial effective refractory period (AERP) were observed 0, 4, 8, 12, 16 and 24 hours after pacing. Left and right atrial diameter and left ven-tricular ejection fraction (EF) were examined by cardiac ultrasonography. Animals were scarified to observe expression of the green fluorescent protein in the myocardial frozen section of rabbits in rAd/SERCA2a/GFP+AF group under the inverted fluorescence microscope. **Results** AERP was markedly prolonged in rAd/SERCA2a/GFP+AF group compared with rAd/GFP+AF group after pacing for 12 hours ($P<0.05$). Compared with rAd/GFP+AF group, the left and right atrial volume of rabbits in rAd/SERCA2a/GFP+AF group were enlarged but the increase was not significant ($P>0.05$), left ven-tricular ejection fraction (EF) was increased significantly ($P<0.05$); Under the fluorescence microscope, widespread green fluorescence was observed in the myocardial frozen section of rabbits in

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.16.016

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (2014211C066)

作者单位: 830054 乌鲁木齐, 新疆医科大学第一附属医院临床医学研究院 (王红丽、李志强), 心脏起搏电生理科 (周贤惠、周祁娜、汤宝鹏)

通讯作者: 汤宝鹏, Email: tangbaopeng@hotmail.com

rAd/SERCA2a/GFP+AF group. **Conclusion** These results support the hypothesis that overexpression of SERCA2a is able to reverse the atrial electrophysiologic remodeling and structure remodeling in AF rabbits induced by rapid atrial pacing. It is expected to become a potential method for the treatment of AF.

【Key words】 Calcium-transporting ATPases; Atrial fibrillation; Electrical remodeling; Structure remodeling

心房颤动 (atrial fibrillation, AF) 是临床常见的一种室上性心律失常。AF 在一般人群中的患病率为 0.4%~1.0%^[1-2]。AF 除了引起心悸症状之外, 还可并发血栓栓塞、诱发或加重心功能损害。目前, AF 的治疗方法主要包括药物治疗、外科手术治疗、导管射频消融、电子起搏器植入等, 虽然近年 AF 治疗在介入射频消融方面取得了进步, 但 AF 治疗的总体效果仍不理想。主要原因在于 AF 发病机制研究尚不完全清楚, 因此对其发生和维持机制需要进一步深入研究。心房电重构是 AF 发生和维持的关键环节; 其主要电生理特征是指快速心房搏动引起心房肌动作电位时程 (action potential duration, APD) 及心房有效不应期 (atrial effective refractory period, AERP) 缩短、AERP 的频率适应性下降等。心房电重构的基础是离子通道重构, 心房肌细胞膜上的 L 型钙离子电流的降低从而引起离子通道重构^[3]。钙超载是心房重构的主要原因^[4], 有关钙超载在 AF 心肌细胞电重构和结构重构中的作用的研究成为近年来的热点。肌浆网钙 ATP 酶 2a (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA2a) 是参与钙循环的主要调节蛋白, 在基础和临床 AF 患者中, SERCA2a 的表达显著降低导致细胞内外钙离子异常和心肌收缩力减弱^[5], SERCA2a 作为靶基因的转基因治疗是 AF 基因治疗的热点。

本研究通过经心包腔注射的方式将重组腺病毒 (adenovirus, rAd) 载体携带的 SERCA2a 基因转导至心房的心肌细胞。荧光观察外源基因在心肌细胞内的表达情况, 并评价其对快速右心房起搏致急性 AF 兔心房 AERP、心房形态、心功能改变的作用, 探讨 SERCA2a 基因在心房肌中过表达对心房电重构的影响。

材料与方法

1. 材料与器械: 健康成年新西兰大白兔 36 只, 雌雄不限, 体重为 (3.0±0.5) kg, 由新疆医科大学实验动物中心提供, 动物使用及实验设计均通过新疆医科大学第一附属医院动物使用管理伦理委员会认证许可。随机分为 3 组: rAd/GFP+AF 组、

rAd/SERCA2a/GFP+AF 组和对照组 (植入起搏电极但不起搏), 每组各 12 只。

戊巴比妥钠, 肝素钠注射液, 携带 SERCA2a 和 GFP 的腺病毒 (rAd/SERCA2a/GFP) 均购自深圳市百恩维生物科技有限公司, 滴度为 1×10^{12} vg/ml。小型开胸器、剪刀止血钳、DF-5A 型心脏电生理刺激仪 (苏州中国东方电子仪器厂), Lead-7000 多道电生理记录仪 (四川锦江电子科技有限公司)。

2. 基因转导: 参照我实验室已建立转导方法^[6]。

3. 快速起搏右心房急性 AF 模型制作: 在实验前, 用 3% 戊巴比妥钠按 30 mg/kg 经兔耳缘静脉注射麻醉药后, 并静脉推注肝素 1 000 U 抗凝以免术中血栓形成, 建立静脉通道, 手术过程中根据情况追加戊巴比妥钠 10 mg/kg 及肝素。将兔麻醉后常规仰卧位固定于动物手术台, 兔颈部备皮, 常规消毒后, 局部用 2% 利多卡因浸润麻醉。颈部正中切口, 分离出右侧颈内静脉, 送入 0.05 间距的 4 F 电极于右心房, 调整电极位置, 使电极导管记录到的心房信号 A 波和小的心室信号 V 波, 表明电极置入成功, 然后固定好电极导管。首先测定起搏阈值, 然后以起搏阈值 2 倍为输出电压, 以 600 次/min 的固定频率进行连续单刺激模式刺激右心房, 进行快速心房起搏并记录起搏诱发的 AF 心电图, 检测模型制作情况。

4. 右心房有效不应期的测量: 测定右心房起搏阈值, 以高出窦性心律 10%~20% 的频率快速起搏, 脉宽为 0.5 ms。以 2 倍起搏阈值刺激电压为输出电压, 测定 S1S2 为 150 ms 时的 AERP (AERP 150 ms)。具体测量步骤: 用 8:1 的 S1S2 (步长为 5 ms) 程序进行反扫, 当出现最长的 S1S2 间期不能下传心房为有效不应期 (AERP)。以周长 150 ms 的固定频率进行连续快速心房起搏, 分别于起搏 4 h、8 h、12 h、16 h 和 24 h 时测定 AERP。AERP 150 ms 取重复测量 3 次的平均值。

5. 心房大小及心功能测定: 麻醉固定好兔后, 实验开始前先用惠普 Sonos5500 型彩色多普勒超声显像仪, 测定基础时的心房大小及心功能, 当行快速右心房起搏后 4 h、8 h、12 h、16 h 和 24 h 时,

表1 各组实验兔不同时间点 AERP150 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	24 h
对照组	12	88.92±5.94	90.25±5.50	90.26±4.85	89.47±4.97	90.56±4.82	90.65±5.05
rAd/GFP+AF 组	12	90.74±5.83	85.14±4.17 ^a	84.09±3.63 ^a	78.98±3.80 ^a	74.17±4.23 ^a	69.79±4.16 ^a
rAd/SERCA2a/GFP+AF 组	12	90.71±5.39	90.83±4.19	88.17±5.12	83.56±5.78 ^{ab}	81.33±6.79 ^{ab}	80.33±6.04 ^{ab}
F 值		7.527	66.21	60.72	31.26	45.21	62.35
P 值		0.773	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与 rAd/GFP+AF 组比较, ^b $P<0.05$

表2 各组实验兔左右心房直径及 EF 值变化的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	LAD(mm)	RAD(mm)	EF(%)
对照组	12	9.09±2.76	7.38±2.23	64.03±5.42
rAd/GFP+AF 组	12	10.89±2.93	8.87±1.72	43.13±6.92 ^a
rAd/SERCA2a/GFP+AF 组	12	9.16±2.81	7.44±2.29	63.97±5.36 ^b

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与 rAd/GFP+AF 组比较, ^b $P<0.05$

先行关闭刺激仪, 等待 5 min 后, 待其恢复窦性心律, 若 AF 发作时间超过 5 min 不能自行终止, 即实施电转复。行经胸超声心动图检查, 测量心脏标准四腔切面收缩末期的左、右心房横径 (LAD、RAD), 左心室射血分数 (EF) 是通过左心室长轴切面 M 型超声心动图测量。所有指标均由同一个人测量, 均取 5 个连续心动周期的平均值。

6. 统计学分析: 所有数据应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计数资料以百分比表示, 组间比较采用方差分析, 组内不同时间点间的比较采用重复测量资料的方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、动物模型的制备情况

整个实验过程中, 1只新西兰大白兔因麻醉过浅致电极进入右心室导致心室颤动而死, 1只兔因电极位置过深穿透心脏而死, 其余实验动物均在实验时间完成实验; 各组死亡动物均补充同质量及同数量动物, 36只新西兰大白兔按照实验要求完成实验。心内电生理图形显示对照组心内电生理图和体表心电图 (图1) 显示为正常心电图, AF兔的心内电生理图及体表心电图 (图2) 显示体表 II 导心电图无典型的P波, 出现f波, R-R间期绝对不规则, 快速、不规则、形态多变的心房激动证明AF模型制作成功。

二、快速右心房起搏 AERP 的变化

在同一基础刺激周长作用下, rAd/GFP+AF 组在起搏 4 h 后与起搏前及对照组比较, AERP150 明

显缩短 ($P<0.05$); rAd/GFP/SERCA2a+AF 组起搏 12 h 后 AERP150 较对照组缩短 ($P<0.05$), 起搏 12 h 后 AERP150 较 rAd/GFP+AF 组升高 ($P<0.05$), 见表 1。

三、左右心房及心功能的比较

rAd/GFP+AF 组和 rAd/SERCA2a/GFP+AF 组与对照组比较左右心房直径有所改变, 但改变不显著 ($P>0.05$)。EF 值明显降低, 两组较对照组差异有统计学意义 ($P<0.05$); rAd/GFP+AF 组与对照组相比并未显著改善 ($P>0.05$), rAd/SERCA2a/GFP+AF 组与 rAd/GFP+AF 组比较差异显著 ($P<0.05$)。见表 2。

四、携带绿色荧光蛋白重组腺病毒在心肌组织中的表达

倒置荧光显微镜观察 rAd/GFP/SERCA2a+AF 兔右心房肌组织的冰冻切片, 可见心房肌组织内存在较强的绿色荧光 (图 3), 而对照组在荧光显微镜下心脏标本切片均未发现荧光。绿色荧光蛋白 (GFP) 在心肌细胞中呈小片状分布或散在分布, 说明以重组腺病毒为载体携带的 SERCA2a 基因已成功转入心肌组织中。

讨 论

AF 已经成为心血管领域中的一大流行疾病, 其发生机制仍未完全阐明。AF 的发生和维持必要条件是 AF 基质, AF 基质的主要特征是心脏的电重构和结构重构。目前, 钙离子是心肌舒缩的关键因素, 所以心房内 Ca^{2+} 的分布、功能是近年来 AF 发生及防治研究的热点。基因治疗是防治心血管疾病的一种潜在的新的手段, 并显示出广阔的应用前

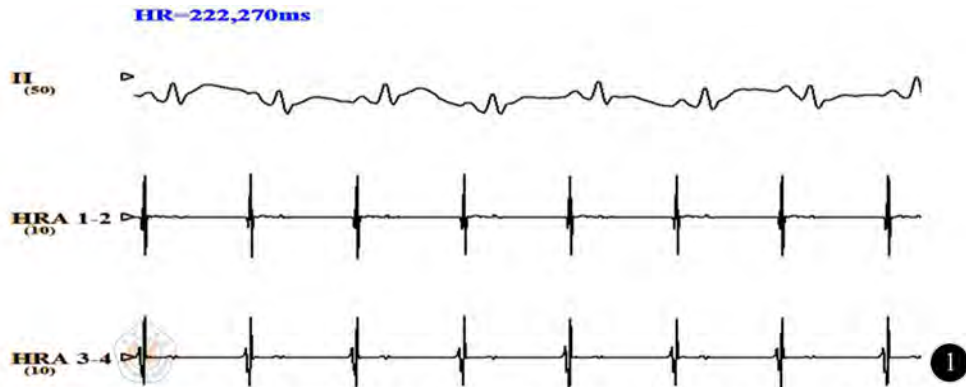


图1 正常兔的心内电生理图及体表心电图。体表II导心电图示：P波直立，R-R间期相等，心房、心室波形态规则，起搏前正常心电图

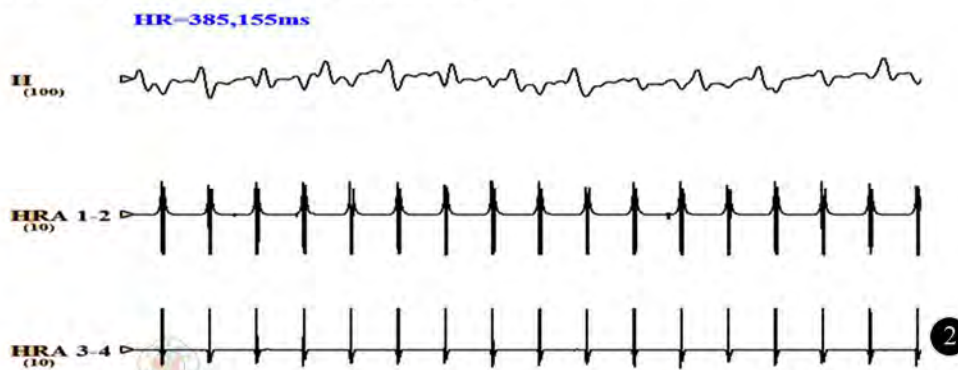


图2 AF兔的心内电生理图及体表心电图。体表II导心电图无典型的P波，出现f波，R-R间期绝对不规则，快速、不规则、形态多变的心房激动证明AF模型制作成功

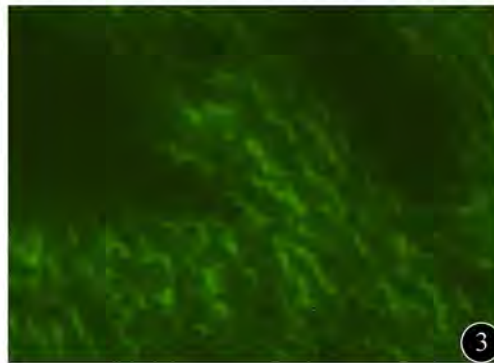


图3 心肌组织携带SERCA2a荧光表达 (×100)

景^[7]。本研究采用心包腔注射法转染外源基因，2周后通过荧光显微镜观察心房肌内绿色荧光表达表明 SERCA2a 基因转染到心房肌。

1989年Kopecky等^[8]首次提出快速起搏心房建立兔AF模型并进行AF电生理的研究。本实验以600次/min的频率持续刺激新西兰大白兔的右心房24 h，兔的心内电生理图及体表心电图显示II导心电图无典型的P波，出现f波，R-R间期绝对不规则，快速、不规则、形态多变的心房激动说明AF模型制作成功。

Ausma 等^[4]提出形态学的重构可能是由于 Ca^{2+}

超载激活蛋白溶解通道的结果。细胞内钙超载是心房电重构和结构重构的始动因素和关键环节。AF开始时心房快速激动引起过多的 Ca^{2+} 内流，导致细胞内 Ca^{2+} 超载，心房收缩功能降低，收缩功能降低导致心房肌被动延展，心房被动扩张反过来又促进AF发生，这样形成一个恶性循环，使AF得以稳定。SERCA2a 过表达可以增加肌质网 (sarcoplasmic reticulum, SR) 摄取和 Ca^{2+} 的释放及通过调节肌质网膜减少 Ca^{2+} 内流，从而降低胞内 Ca^{2+} 浓度，保持心肌细胞内钙的稳态。本研究通过腺病毒介导SERCA2a 基因转染到心房心肌细胞肌浆网，增加

SERCA2a 蛋白的数量和活性从而纠正 AF 中 Ca^{2+} 调节紊乱。快速心房起搏 24 h 后发现 AERP 缩短, 引起心房电重构, 快速起搏转染 rAd/SERCA2a/GFP 的新西兰大白兔与 AF 组比较, 发现 AERP 明显延长。因此我们推测 SERCA2a 基因的过表达对调节 AF 的心肌细胞中 Ca^{2+} 浓度起着关键作用, 可以防止 AF 的发生, SERCA2a 基因治疗 AF 有望成为治疗 AF 的新策略。

Schoonderwoerd 等^[9]研究表明, 在急性犬模型造模 48 h 内心房内径增大, 但增大与实验前无统计学差异, AF 射血分数显著降低。研究表明心房容积越大 AF 就越稳定, 反之, 心房容积越小 AF 就越不稳定, 因此两者呈显著正相关, 一旦由于心脏其他疾病或者 AF 造成心房扩大更容易导致复律后 AF 复发。本实验结果表明随着起搏时间的延长, 左右心房内径逐渐增大与对照组比较无差异, 心功能 EF 值下降与对照组有明显差异; SERCA2a 基因干预后, 左右心房内径轻微增大, EF 值轻微下降与对照组无差异, 但与 rAd/GFP+AF 组比较, 左右心房内径变小无明显差异, EF 值上升有明显差异。

参 考 文 献

- [1] Go AS, Hylek EM, Phillips KA, et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the Anticoagulation and Risk Factors in Atrial Fibrillation(ATRIA) Study[J]. JAMA, 2001, 285(18): 2370-2375.
- [2] Feinberg WM, Blaekshear JJJ, Laupacis A, et al. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications[J]. Arch Intern Med, 1995, 155(5): 469-473.
- [3] Yue L, Melnyk P, Gaspo R, et al. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in a dog model of atrial fibrillation[J]. Circ Res, 1999, 84(7): 776-784.
- [4] Ausma I, Dispersyn GD, Duimel H, et al. Changes in ultrastructural calcium distribution in goat atria during atrial fibrillation[J]. J mol Cell Cardiol, 2000, 32(3): 355-364.
- [5] Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, et al. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase as a therapeutic target for heart failure[J]. Expert Opin Biol Ther, 2010, 10(1): 29-41.
- [6] 徐晓霞, 周祁娜, 姜涛, 等. 同一滴度不同方法转染 AAV9-SERCA2a 基因对大鼠的有效性和毒副作用评价[J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(3): 1-6.
- [7] Levonen AL, Vahakangas E, Koponen JK, et al. Antioxidant gene therapy for cardiovascular disease: current status and future perspectives[J]. Circulation, 2008, 117(16): 2142-2150.
- [8] Kopecky SL, Gersh BJ, McGoon MD, et al. The natural history of lone atrial fibrillation. A population-based study over three decades[J]. N Engl J Med, 1987, 317(11): 669-674.
- [9] Schoonderwoerd BA, Ausma J, Crijns HJ, et al. Atrial ultrastructural changes during experimental atrial tachycardia depend on high ventricular rate[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2004, 15(10): 1167-1174.

(收稿日期: 2014-06-24)

(本文编辑: 张岚)

[1] Go AS, Hylek EM, Phillips KA, et al. Prevalence of diagnosed atrial fibrillation in adults: national implications for rhythm management and stroke prevention: the Anticoagulation and Risk Factors in Atrial

王红丽, 李志强, 周贤惠, 等. 肌浆网钙 ATP 酶过表达对心房颤动兔心房心电生理的影响[J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2014, 8(16): 2997-3001.

中华医学会