论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1224-02

慢性房颤患者心房肌L型钙通道α1c亚基mRNA表达的观察

曾祥君,肖颖彬,钟前进,陈 林,王学锋 (第三军医大学新桥医院心血管外科,重庆 400037)

提 要:目的 比较慢性房颤与窦性心律心房肌L型钙通道α1c亚基mRNA的表达改变,探讨房颤心房肌L型钙通道的离子重构特点。**方法** 选择43例接受心脏瓣膜置换的风心病患者,慢性房颤者24例,窦性心律者19例,于体外循环建立初采集右心房游离壁组织,应用半定量RT-PCR测定α1c亚基Ⅰ-Ⅱ跨膜区连接对应的mRNA片段表达。**结果** 慢性房颤心房肌L型钙通道α1c亚基mRNA的表达较窦性心律心房肌无明显差异。**结论** 房颤心房肌L型钙通道的离子重构可能与α1c亚基的亚型表达改变有关。

关键词:房颤;L型钙通道;重构

中图法分类号:R322.11;R394.2;R541.750.2 **文献标识码**:A

L-type Ca^{2+}-channel alpha 1c subunit mRNAs in atrial tissue of chronic AF patients

ZENG Xiang-jun, XIAO Ying-bin, ZHONG Qian-jin, CHEN Lin, WANG Xue-feng (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To detect the mRNA expression of L-type Ca^{2+}-channel α1c subunits in atrial myocardium and to further investigate the molecular mechanisms of electrical remodeling of chronic atrial fibrillation (AF). **Methods** Right atrial tissue was obtained from 24 patients with chronic AF and 19 controls of sinus rhythm. All patients underwent valve replacement. Total RNA was isolated and reversely transcribed into cDNA. The cDNA of interest and of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase were amplified by semi-quantitative PCR and separated by ethidium bromide-stained gel electrophoresis. **Results** The mRNA expression of L-type Ca^{2+}-channel α1c subunits in chronic AF patients was of no significant difference with that of controls. **Conclusion** The gene expression of the L-type Ca^{2+}-channel subunits a1c is not reduced in atrial myocardium of AF patients. Therefore, the reduced $I_{Ca.L}$ might be due to down-regulation of the splice isoforms of α1c subunits or other accessory subunits.

Key words: atrial fibrillation; L-type Ca^{2+}-channel; remodeling

近年的研究证实,房颤心房肌L型钙通道电流(L-type Ca^{2+} current intensity, $I_{Ca.L}$)降低是房颤发生并持续存在的机制。本实验应用半定量RT-PCR测定慢性房颤患者心房肌L型钙通道α1c亚基mRNA表达,进一步探讨房颤心房肌$I_{ca.L}$降低的分子基础。

1 材料与方法

1.1 取材与分组

研究对象为2005年3月至2005年6月入住我科接受心脏瓣膜置换术的风心病患者43例。其中慢性房颤者24例,窦性心律者19例(表1)。于心脏瓣膜术建立体外循环时切取少许右心房游离壁组织,立即置于液氮中保存备用。

表1 房颤及窦性心律手术患者的临床资料($\bar{x}\pm s$)

组别	病例	性别 男	性别 女	年龄(岁)	手术方式 MVR	手术方式 AVR	手术方式 DVR	左房内径(mm)
慢性心律	24	10	14	46.96±12.77	16	1	7	56.99±9.12[a]
窦性心律	19	6	13	43.00±14.19	6	5	8	46.73±4.45

MVR:二尖瓣置换;AVR:主动脉瓣置换;DVR:双瓣膜置换;a:$P<0.01$,与窦性心律组比较

1.2 实验方法

1.2.1 心房肌组织总RNA提取 分别取心房肌组织50~100 mg,研磨匀浆,采用华舜Trizol分离试剂提取总RNA,提取物以DEPC水溶解,紫外分光光度仪测定浓度及$D(260)/D(280)$比值,1%琼脂糖凝胶电泳。$D(260)/D(280)$比值1.6~2.0,RNA凝胶电泳图示RNA无明显降解。

1.2.2 引物合成 由北京赛百盛生物科技公司合成,引物序列如下:①L型钙通道α1c亚基基因(217 bp):正义链:5′-GCCCCGAAACATGAGCAT,反义链:5′-GAAAATCACCAGCCAGTAGAAGA;②GAPDH基因(452 bp):正义链:5′-ACCACAGTCCATGCCATCAC,反义链:5′-TCCACCACCCTGTTGCTGTA。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370583)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370583)
作者简介:曾祥君(1970-),男,四川省乐山市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事心血管疾病方面的研究。电话:(023)66313898
通讯作者:肖颖彬,电话:(023)68755607
收稿日期:2005-11-03;修回日期:2006-01-21

1.2.3　逆转录反应　　反应体系 20 μl，总 RNA 2 μg，随机引物 5 pmol，其他成分按 Promega 试剂盒操作说明书进行。25 ℃预热 10 min，37 ℃逆转录反应 60 min，95 ℃灭活 5 min。

1.2.4　PCR 反应　　反应体系 20 μl，东洋坊 r*Taq* 酶 2 U，10 × PCR buffer 2 μl，上下游引物各 10 pmol，200 μmol/ L dNTPs。反应条件：①L 型钙通道 α1c 基因：94 ℃变性 3 min ，94 ℃变性 45 s，55 ℃退火 45 s，72 ℃延伸 75 s，共 34 个循环，72 ℃延伸 10 min；②GAPDH 基因：94 ℃变性 3 min，94 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 45 s，共 28 个循环，72 ℃延伸 10 min。

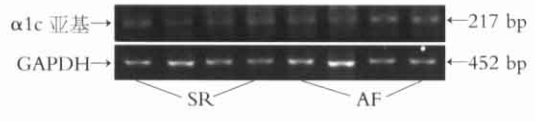
1.2.5　PCR 产物分析　　取 L 型钙通道 α1c 基因和 GAPDH 基因的扩增产物各 5 μl，1.2 % 琼脂糖凝胶上进行电泳（100 V，25 min）。凝胶成像仪照相。Quantityone 凝胶图像扫描分析软件进行密度扫描，测定 L 型钙通道 α1c 亚基基因和 GAPDH 基因扩增产物的灰度值，计算其比值，作为 α1c 亚基在各个样本的基因表达量。

1.3　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 Orignal 统计软件行方差分析。

2　结果

以 100 bp DNA Ladder 的标准为标志，L 型钙通道 α1c 亚基 mRNA 扩增片段为 217 bp，GAPDH 扩增片段为 452 bp（图 1）。以 GAPDH 为参照，用 L 型钙通道 α1c 亚基 mRNA 灰度值/GAPDH 灰度值来表示 α1c 亚基 mRNA 表达水平，结果经统计学分析显示慢性房颤者和窦性心律者无显著性差异（$P>0.05$），见表 2。



SR：窦性心律；AF：慢性房颤

图 1　心房肌 L 型钙通道 α1c 亚基的 mRNA 表达

表 2　房颤心房肌 L 型钙通道 α1c 亚基 mRNA 的表达（$\bar{x} \pm s$）

项目		慢性房颤	窦性心律
左房内径		0.919 ± 0.264 (n = 24)	0.993 ± 0.349 (n = 19)
性别因素	男性	0.955 ± 0.255 (n = 10)	0.950 ± 0.455 (n = 6)
	女性	0.893 ± 0.277 (n = 14)	1.013 ± 0.309 (n = 13)
手术方式	主动脉瓣置换	1.094 (n = 1)	0.761 ± 0.224 (n = 5)
	二尖瓣置换	0.924 ± 0.256 (n = 16)	1.103 ± 0.281 (n = 6)
	双瓣膜置换	0.882 ± 0.311 (n = 7)	1.055 ± 0.419 (n = 8)
年龄因素	50 岁以下	0.912 ± 0.276 (n = 15)	1.044 ± 0.388 (n = 12)
	50 岁及以上	0.920 ± 0.258 (n = 9)	0.905 ± 0.275 (n = 7)

3　讨论

L 型钙通道电流（$I_{Ca \cdot L}$）是心肌动作电位平台期的主要成分，近年来的研究表明，以 $I_{Ca \cdot L}$ 降低为主的电重构易导致心房肌发生房颤[1]。目前房颤心房肌 $I_{Ca \cdot L}$ 降低的分子基础仍不清楚。

基于房颤与窦性心律心房肌中 L 型钙通道的电生理特性无明显不同，L 型钙通道表达降低被认为是房颤电重构的分子基础。心房肌 L 型钙通道由 α1c，α2δ1 和 β 3 个亚基组成。Brundel 等[2]报道心房肌 L 型钙通道 α1c 亚基表达降低，支持了这个假设。

编码 L 型钙通道 α1c 亚基的基因是 CACNA1C，它存在多种亚型。CACNA1C 不仅有多种外显子缺失、替换形成的剪接亚型，也存在 2 种以上的不同转录起始位点的亚型，甚至存在提前终止的亚型[3]。因此，房颤电重构可能与 L 型钙通道 α1c 亚基的亚型改变有关。通过文献检索发现：应用 PCR 技术检测房颤心房肌 α1c 亚基Ⅳ跨膜区对应的 mRNA 片段，几乎均报道表达降低。本实验拟检测 α1c 亚基Ⅰ-Ⅱ跨膜区连接对应的 mRNA 片段表达，进一步探讨房颤心房肌 $I_{Ca \cdot L}$ 降低的分子基础。

本实验选择接受心脏瓣膜置换的风心病患者 43 例，其中慢性房颤 24 例，窦性心律 19 例，于体外循环建立时采集右心房游离壁组织，提取总 RNA 并逆转录，应用半定量 RT-PCR 技术，以 GAPDH 基因为内参照，测定 α1c 亚基Ⅰ-Ⅱ跨膜区连接对应的 mRNA 片段表达。实验结果表明：半定量 RT-PCR 技术检测 α1c 亚基Ⅰ-Ⅱ跨膜区连接对应的 mRNA 表达，慢性房颤心房肌较窦性心律心房肌无明显差异，且不受年龄、性别、术式、左房内径等因素影响。这与 Christ 等[4]在此区域的检测报道类似。

本实验从基因表达水平上证实了房颤心房肌 L 型钙通道 α1c 亚基 mRNA 的表达较窦性心律心房肌无明显差异。表面上看与 L 型钙通道表达降低构成房颤电重构的分子基础的假设矛盾。但进一步分析本实验扩增的片段与报道 CACNA1C 表达降低实验扩增的片段在 α1c 亚基位置的不同，可以推测房颤心房肌 L 型钙通道的离子重构可能是 α1c 亚基的亚型表达改变所致。

参考文献：

[1] BOSCH R F, ZENG X, GRAMMER J B, *et al*. Ionic mechanisms of electrical remodeling in human atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 1999, 44(1): 121 - 131.

[2] BRUNDEL B J, VAN-GELDER I C, HENNING R H, *et al*. Gene expression of proteins influencing the calcium homeostasis in patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation[J]. Cardiovasc Res, 1999, 42(2): 443 - 454.

[3] BLUMENSTEIN Y, KANEVSKY N, SAHAR G, *et al*. A novel long N-terminal isoform of human L-type Ca^{2+} channel is up-regulated by protein kinase C[J]. J Biol Chem, 2002, 277(5): 3419 - 3423.

[4] CHRIST T, BOKNIK P, WOHRL S, *et al*. L-type Ca^{2+} current down-regulation in chronic human atrial fibrillation is associated with increased activity of protein phosphatases[J]. Circulation, 2004, 110(17): 2651 - 2657.

（编辑　周　芳）