

二十二碳六烯酸对房颤大鼠心房纤维化的影响

单 锋^{1,2}, 葛 敏¹, 唐 碧³, 侯秀杰^{3,4}, 高 琴⁵, 关宿东⁵

[摘要] **目的:**探讨二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)对大鼠心房颤动模型心房纤维化的影响,及其对细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)蛋白、磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2, p-ERK1/2)蛋白、I 型胶原 mRNA 和蛋白表达的影响。**方法:**将 80 只乙酰胆碱-氯化钙混合液敏感大鼠随机分为对照组(CTL 组)、对照 DHA 处理组(DHA 组)、房颤组(AF 组)和房颤 DHA 处理组(DHA + AF 组),各 20 只。观察各组大鼠房颤持续时间,采用 Masson 染色法观察大鼠心房组织胶原纤维增生情况,应用 Real-time PCR 法测定大鼠心房组织中 I 型胶原 mRNA 表达,Western blot 法测定大鼠心房组织中 I 型胶原、ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达。**结果:**实验第 10、17 天,DHA + AF 组大鼠房颤持续时间均明显短于 AF 组($P < 0.01$)。与 CTL 组比较,AF 组大鼠心房肌间质可见大量胶原纤维增生,心房纤维化程度高;DHA + AF 组大鼠心房肌间质可见少量胶原纤维增生,心房纤维化程度较 AF 组降低。与 CTL 组比较,AF 组大鼠 p-ERK1/2 与 ERK1/2 比值升高($P < 0.05$),DHA 组比值降低($P < 0.05$),而 CTL 组与 DHA + AF 组差异无统计学意义($P > 0.05$);与 AF 组比较,DHA 组和 DHA + AF 组与 p-ERK1/2 与 ERK1/2 比值均降低($P < 0.05$)。与 CTL 组比较,AF 组和 DHA + AF 组大鼠心房组织 I 型胶原 mRNA 和蛋白表达水平均升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$);与 AF 组比较,DHA + AF 组大鼠心房组织 I 型胶原 mRNA 和蛋白表达水平均降低($P < 0.05$)。**结论:**DHA 具有改善 SD 大鼠房颤模型心房纤维化的作用,此作用与其抑制心房组织 ERK1/2 通路的活性进而下调心房组织 I 型胶原 mRNA 和蛋白的表达有关。

[关键词] 心房颤动;二十二碳六烯酸;心房纤维化;细胞外信号调节激酶 1/2; I 型胶原

[中图分类号] R 541.75

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.04.007

Effect of docosahexaenoic acid on atrial fibrosis in atrial fibrillation rats

SHAN Feng^{1,2}, GE Min¹, TANG Bi³, HOU Xiu-jie^{3,4}, GAO Qin⁵, GUAN Su-dong⁵

(1. School of Pharmacy, 5. Department of Physiology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030;

2. Department of Pharmacy, The Forth People's Hospital of Hefei, Hefei Anhui 230000; 3. Department of Cardiovascular Medicine,

The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004; 4. Department of Cardiovascular Medicine,

The First People's Hospital of Fuyang, Fuyang Anhui 236000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of docosahexaenoic acid (DHA) on the atrial fibrosis in atrial fibrillation rats, and mRNA and protein levels of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2), phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (p-ERK1/2) and type I collagen. **Methods:** Eighty Sprague-Dawley (SD) rats sensitive to acetylcholine-calcium chloride mixture were randomly divided into the control group (CTL group), control treated with DHA group (DHA group), atrial fibrillation group (AF group) and atrial fibrillation treated with DHA group (DHA + AF group) (20 rats each group). The duration of atrial fibrillation in each group was measured. The atrial collagen fiber hyperplasia in rats were detected using Masson staining. The mRNA expression of type I collagen in atrial tissue was detected using the quantitative real-time PCR, and the protein levels of ERK1/2, p-ERK1/2 and type I collagen in atrial tissue were detected by Western blot. **Results:** At 10 and 17 days of experiment, the duration of atrial fibrillation in (DHA + AF) group was significantly shorter than that in AF group ($P < 0.01$). Compared with the CTL group, a lot of collagen fibers proliferation in atrial interstitium were found, and the interstitial fibrosis in atrial was higher in AF group. Compared with the AF group,

a little collagen fibers proliferation in atrial interstitium was found, and the interstitial fibrosis in atrial was lower in (DHA + AF) group. Compared with the CTL group, the ratio of p-ERK1/2 to ERK1/2 increased in AF group ($P < 0.05$), which in DHA group decreased ($P < 0.05$), and the difference of which between CTL group and (DHA + AF) group was not statistically significant ($P > 0.05$). Compared with the AF group, the ratio of p-ERK1/2 to ERK1/2 decreased in (DHA + AF) group ($P < 0.05$). Compared with the CTL group, the mRNA and protein levels of type I collagen in atrial tissue increased in AF group and (DHA + AF) group ($P < 0.05$ to $P < 0.01$). Compared

[收稿日期] 2016-10-10 [修回日期] 2017-08-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81170046);教育部留学回国人员科研启动基金(第46批);安徽省自然科学基金项目(10040606Q44)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 药学院, 5. 生理学教研室, 安徽蚌埠 233030; 2. 安徽省合肥市第四人民医院 药剂科, 230000; 3. 蚌埠医学院第一附属医院 心血管科, 安徽蚌埠 233004; 4. 安徽省阜阳市第一人民医院 心血管科, 236000

[作者简介] 单 锋(1991-), 男, 硕士, 主管药师。

[通信作者] 唐 碧, 博士, 副主任医师, 副教授. E-mail: bitang2000@163.com

with the AF group, the mRNA and protein levels of type I collagen in atrial tissue decreased in (DHA + AF) group ($P < 0.05$).

Conclusions: DHA can improve the atrial fibrosis in atrial fibrillation rats, the mechanism of which may be related to the mRNA and protein expressions of type I collagen down-regulating by inhibiting the ERK1/2 activation in atrial tissue.

[**Key words**] atrial fibrillation; docosahexaenoic acid; atrial fibrosis; extracellular signal-regulated kinase 1/2; type I collagen

心房颤动简称房颤,指规则有序的心房电活动丧失,代之以快速无序的颤动波,是临床上最常见的心律失常类型。其患病率呈逐年上升趋势,预计未来二三十年内房颤病人数量将增加 2~3 倍^[1]。房颤时,心房纤维化破坏了心房组织原有的结构和功能,干扰了心房局部兴奋或冲动的传导,易于形成折返,使得房颤更易发作和维持,为房颤的发生发展提供了病理基础^[2]。心房纤维化主要表现为心肌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重构, I 型胶原合成和分泌的异常增多是导致 ECM 重构的重要原因,其含量与心房纤维化程度密切相关。二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)是一种 ω -3 类长链多不饱和脂肪酸,是鱼油萃取物的主要成分。新近研究^[3]显示, DHA 具有改善心房纤维化的作用,但具体机制目前尚不清楚。研究^[4-5]表明,细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular signal-regulated kinase, ERK1/2) 信号通路在房颤时的心房纤维化过程中起到重要作用,而 DHA 可通过影响 ERK1/2 通路的活性而发挥相应的生物学效应。然而在房颤时 DHA 是否通过影响 ERK1/2 通路的活性而起到改善心房纤维化的作用目前尚不清楚。我们观察 DHA 对房颤大鼠心房纤维化的影响,并探讨该作用是否与影响 ERK1/2 信号通路介导的胶原蛋白表达有关。现作报道。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与试剂 SD 大鼠, 雄性, 体质量 250~300 g, 购自中国人民解放军南京军区医学动物实验中心[合格证号: SCXK(军)2007-012]。超纯 RNA 提取试剂盒、HiFi-MMLV cDNA 第一链合成试剂盒、UltraSYBR Mixture (With ROX)、DNase 1、5 × RNA Loading Buffer (康为世纪生物科技有限公司); PCR 引物(上海生工生物工程公司); 单克隆鼠抗 I 型胶原抗体, 单克隆鼠抗 ERK1/2 抗体, 单克隆鼠抗 p-ERK1/2 抗体, 单克隆鼠抗 GAPDH 抗体 (Santa Cruz 公司); 山羊抗鼠 IgG 多克隆二抗、兔抗山羊 IgG 多克隆二抗 (武汉博士德公司); Western blot 及 IP 细胞裂解液 (碧云天生物公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、预染蛋白 Marker (碧云

天生物公司); PVDF 膜、ECL 化学发光试剂盒 (Millipore 公司); 乙醇胆碱、DHA (Sigma 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 大鼠初筛 健康雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 参照文献^[6]方法, 筛选出对 66 μ g/mL 乙酰胆碱 + 50 mg/mL 氯化钙混合液敏感的大鼠 80 只。具体操作: 称体质量, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (30 mg/100 g) 麻醉, MedLab-U/4C501H 生物信号采集处理系统描记大鼠心电图(记录标准 II 导联), 尾静脉注射乙酰胆碱 - 氯化钙混合液 (0.1 mL/100 g)。以尾静脉注射乙酰胆碱 - 氯化钙混合液后, 心电图显示出 P 波消失、出现 f 波、R-R 间期绝对不等的典型房颤心电图为对乙酰胆碱 - 氯化钙混合液敏感的大鼠。

1.2.2 大鼠房颤模型制备 将筛选出对乙酰胆碱 - 氯化钙混合液敏感的 80 只大鼠, 随机分为对照组 (CTL 组)、对照 DHA 处理组 (DHA 组)、房颤组 (AF 组) 和房颤 DHA 处理组 (DHA + AF 组), 各 20 只。称大鼠体质量, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (30 mg/100 g) 麻醉, MedLab-U/4C501H 生物信号采集处理系统描记大鼠心电图(记录标准 II 导联)。AF 组和 DHA + AF 组大鼠尾静脉注射 66 μ g/mL 乙酰胆碱 + 50 mg/mL 氯化钙混合液, CTL 组和 DHA 组大鼠尾静脉注射 0.9% 氯化钠注射液, 给药体积均为 0.1 mL/100 g, 每天给药 1 次, 连续 3 d^[6]。第 3 天实验结束后, 分析实验 1~3 d 所得心电图, 以 AF 组和 DHA + AF 组大鼠每天尾静脉注射乙酰胆碱 - 氯化钙混合液后均可诱发典型房颤心电图确定为大鼠房颤模型制备成功。

1.2.3 分组给药 大鼠房颤模型制备成功后, 实验第 4 天开始分组给药。AF 组给予 0.9% 氯化钠注射液, 1 h 后再给予 66 μ g/mL 乙酰胆碱 + 50 mg/mL 氯化钙混合液; DHA + AF 组给予 10 mg/mL DHA 溶液, 1 h 后再给予 66 μ g/mL 乙酰胆碱 + 50 mg/mL 氯化钙混合液; CTL 组给予 0.9% 氯化钠注射液, 1 h 后再给予 0.9% 氯化钠注射液; DHA 组给予 10 mg/mL DHA 溶液, 1 h 后再给予 0.9% 氯化钠注射液。各组给药方式均为尾静脉注射, 给药体积均为 0.1 mL/100 g, 每天给药 1 次, 连续 14 d。实验第 4、10、

17 天,记录尾静脉注射乙酰胆碱 - 氯化钙混合液前后大鼠心电图。

1.3 观察指标

1.3.1 房颤持续时间测定 实验第 3、4、10、17 天,记录大鼠尾静脉注射乙酰胆碱 - 氯化钙混合液前后标准 II 导联心电图,以给药后心电图显示 P 波消失、出现 f 波的典型房颤心电图作为房颤发生标志,以恢复窦性心律、P 波出现、f 波消失作为房颤终止标志,房颤发生至终止所持续的时间即为房颤持续时间。

1.3.2 心房组织 Masson 染色 实验第 18 天,称大鼠体质量,腹腔注射 10% 水合氯醛 (30 mg/100 g) 麻醉,开胸迅速取出心脏,并置于盛有预冷的 0.9% 氯化钠注射液的培养皿中洗净血液,剪取心房组织,滤纸吸干,立即用 4% 多聚甲醛固定,送至蚌埠医学院第一附属医院病理科行 Masson 胶原纤维特异性染色。

1.3.3 Real-time PCR 法检测心房组织 I 型胶原 mRNA 表达 实验第 18 天,取 50 ~ 100 mg 大鼠心房组织,应用超纯 RNA 提取试剂盒,按产品说明书提取组织样本中总 RNA,根据 A_{260}/A_{280} 比值分析 RNA 纯度, A_{260}/A_{280} 比值在 1.9 ~ 2.1 之间表明 RNA 纯度较高,符合实验要求。应用 DNase 1 试剂盒,按产品说明书对 RNA 中残留的基因组 DNA 进行消化处理。I 型胶原及内参基因 GAPDH 引物设计通过检索基因文库,按照引物设计原则,由上海生工生物工程公司合成,引物序列见表 1。应用 UltraSYBR Mixture (With ROX),按产品说明书进行扩增,扩增程序为:95 °C 10 min, (95 °C 15 s, 60 °C 60 s) × 45 个循环,每个待测基因设置 3 个重复。实验数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析,计算各样品目的基因相对定量结果。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp
I 型胶原-F	GAT CTG TAT CTG CCA CAA TG	108
I 型胶原-R	CAG AAA GCA CAG CAC TCG CC	
GAPDH-F	TGG AGT CTA CTG CCG TCT T	138
GAPDH-R	TGT CAT ATT TCT CGT GGT TCA	

1.3.4 Western blot 法检测蛋白表达 实验第 18 天,取 50 ~ 100 mg 大鼠心房组织提取总蛋白,BCA 法蛋白定量后进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,蛋白转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭液 4 °C 封闭过

夜。根据抗体说明书,用抗体稀释液将一抗稀释为合适浓度的工作液,37 °C 孵育 30 min 后,4 °C 孵育过夜,再将 PVDF 膜放入稀释为合适浓度的二抗工作液中室温孵育 2 h, ECL 显色曝光。采用 Bio-Rad quantity one 半定量分析目的条带的积分光密度值,相对蛋白含量用积分光密度值表示。

1.4 统计学方法 采用方差分析、*q* 检验和 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠房颤心电图 大鼠尾静脉注射乙酰胆碱 - 氯化钙混合液 1 ~ 2 s 后即出现典型的房颤心电图。由实验第 1 ~ 3 天所得心电图可知, AF 组与 DHA + AF 组大鼠尾静脉注射乙酰胆碱 - 氯化钙混合液后均出现典型的房颤心电图 (见图 1), CTL 组与 DHA 组大鼠尾静脉注射 0.9% 氯化钠注射液前后心电图无明显变化 (见图 2)。



图 1 大鼠尾静脉注射乙酰胆碱-氯化钙混合液前后标准 II 导联房颤心电图

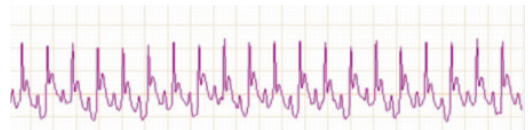


图 2 大鼠尾静脉注射 0.9% 氯化钠注射液前后标准 II 导联心电图

2.2 DHA 对大鼠房颤持续时间的影响 实验第 10、17 天, AF 组和 DHA + AF 组大鼠房颤持续时间均明显高于第 3、4 天 ($P < 0.01$), AF 组第 17 天房颤持续时间亦明显高于第 10 天 ($P < 0.01$)。与 AF 组比较, DHA + AF 组大鼠实验第 10、17 天房颤持续时间均明显缩短 ($P < 0.01$) (见表 2)。

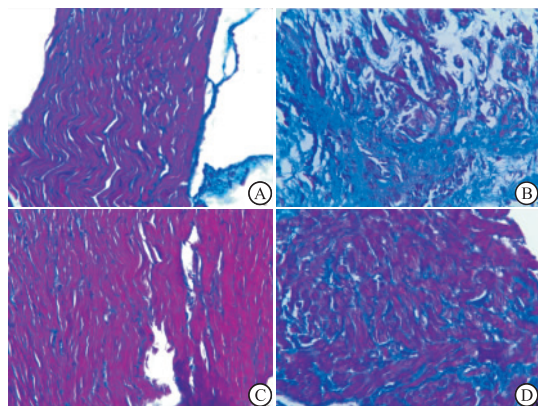
2.3 DHA 对大鼠心房纤维化的影响 经 Masson 染色后,大鼠心房肌间质胶原纤维和血管周围被染成蓝色,心房肌被染成红色。结果显示, CTL 组与 DHA 组大鼠心房肌间质可见正常量的胶原纤维,细胞质、肌纤维呈暗红色,未见点状、片状坏死灶; AF 组大鼠心房肌间质可见大片融合状坏死灶内胶原纤维,提示胶原纤维异常增生,心房纤维化程度高; DHA + AF 组大鼠心房肌间质可见点、片状染成蓝色的胶原纤维,但心房纤维化程度较 AF 组降低 (见图 3)。

2.4 DHA 对大鼠心房组织 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达的影响 各组 ERK1/2 蛋白表达差异不明

表 2 AF 组与 DHA + AF 组大鼠房颤持续时间比较 ($\bar{x} \pm s; s$)

分组	n	第3天	第4天	第10天	第17天	F	P	MS _{组内}
AF 组	15	7.4 ± 2.7	9.9 ± 3.6	29.8 ± 4.2 * * * #	37.3 ± 5.6 * * * # Δ Δ	188.09	<0.01	17.313
DHA + AF 组	15	8.0 ± 2.2	10.6 ± 3.2	18.7 ± 4.3 * * * #	20.7 ± 5.0 * * * #	38.77	<0.01	14.643
t	—	0.67	0.56	7.15	8.56	—	—	—
P	—	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	—	—	—

q 检验:与第3天比较 * * P < 0.01;与第4天比较 # P < 0.01;与第10天比较 Δ P < 0.01



A: CTL组; B: AF组; C: DHA组; D: DHA+AF组
图3 DHA对大鼠心房纤维化的影响

显,而 p-ERK1/2 蛋白表达发生变化(见图4)。与 CTL 组比较,AF 组大鼠 p-ERK1/2 与 ERK1/2 比值升高($P < 0.05$),DHA 组大鼠 p-ERK1/2 与 ERK1/2 比值降低($P < 0.05$),而 CTL 组与 DHA + AF 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 AF 组比较,DHA 组和 DHA + AF 组大鼠 p-ERK1/2 与 ERK1/2 比值均降低($P < 0.05$)。与 DHA 组比较,DHA + AF 组大鼠 p-ERK1/2 与 ERK1/2 比值升高($P < 0.05$)(见表3)。

表 3 DHA 对大鼠心房组织 ERK1/2 通路活性的影响 ($\bar{x} \pm s; n_i = 3$)

分组	(p-ERK1/2)/(ERK1/2)	F	P	MS _{组内}
CTL 组	0.395 ± 0.059			
AF 组	0.657 ± 0.065 *	25.67	<0.01	0.003
DHA 组	0.265 ± 0.045 * #			
DHA + AF 组	0.449 ± 0.052 # Δ			

q 检验:与 CTL 组比较 * P < 0.05;与 AF 组比较 # P < 0.05;与 DHA 组比较 Δ P < 0.05

2.5 DHA 对大鼠心房组织 I 型胶原 mRNA 和蛋白表达的影响 与 CTL 组比较,AF 组和 DHA + AF 组大鼠心房组织 I 型胶原 mRNA 表达水平平均升高($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),而 CTL 组与 DHA 组差异无统计学意义($P > 0.05$);与 AF 组比较,DHA + AF 组 I 型胶原 mRNA 表达水平降低($P < 0.05$)(见表4)。

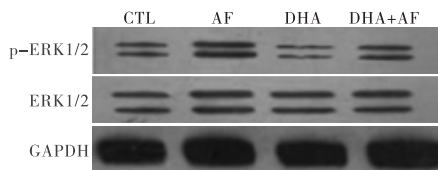


图4 Western blot法检测p-ERK1/2、ERK1/2蛋白表达

与 CTL 组比较,AF 组和 DHA + AF 组大鼠心房组织 I 型胶原蛋白表达水平平均升高($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$),而 CTL 组与 DHA 组差异无统计学意义($P > 0.05$);与 AF 组比较,DHA 组 I 型胶原蛋白表达水平降低($P < 0.01$)。DHA + AF 组 I 型胶原蛋白表达水平降低($P < 0.01$)。与 DHA 组比较,DHA + AF 组 I 型胶原蛋白表达水平升高($P < 0.05$)(见图5、表5)。

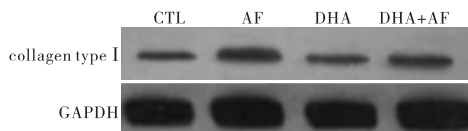


图5 Western blot法检测 I 型胶原蛋白表达

表 4 DHA 对大鼠心房组织 I 型胶原 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s; n_i = 3$)

分组	I 型胶原 mRNA	F	P	MS _{组内}
CTL 组	1.002 ± 0.109			
AF 组	2.766 ± 0.289 * *	46.18	<0.01	0.044
DHA 组	1.068 ± 0.151 #			
DHA + AF 组	1.745 ± 0.237 * #			

q 检验:与 CTL 组比较 * P < 0.05, * * P < 0.01;与 AF 组比较 # P < 0.05

表 5 DHA 对大鼠心房组织 I 型胶原蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s; n_i = 3$)

分组	I 型胶原蛋白	F	P	MS _{组内}
CTL 组	0.259 ± 0.041			
AF 组	0.504 ± 0.052 * *	20.59	<0.01	0.002
DHA 组	0.251 ± 0.041 #			
DHA + AF 组	0.386 ± 0.048 * # Δ			

q 检验:与 CTL 组比较 * P < 0.05, * * P < 0.01;与 AF 组比较 # P < 0.05, # # P < 0.01;与 DHA 组比较 Δ P < 0.05

3 讨论

房颤作为临床上最常见的心律失常类型,其患病率与年龄有密切关系,40~50岁人群的房颤患病率约为0.5%,而80岁人群的患病率可高达10%^[7]。房颤可导致脑卒中和心力衰竭等致残、致死性并发症^[8],严重影响病人的生活质量和生命健康。研究^[9-10]发现,心房结构重构在房颤的发生发展过程中起重要作用,抑制心房结构重构在房颤治疗中能够起到有益作用,目前已成为治疗房颤的研究热点。

心房结构重构主要表现为心房扩大、心房肌细胞超微结构改变和心房纤维化,而心房纤维化是房颤病人心房结构重构中最突出的表现,是房颤发生发展的结构基础。在过度表达TGF- β 1的心肌细胞特异转基因小鼠模型的研究^[9]中,心房纤维化在房颤发生、发展过程中所起的重要作用得到证实。心房纤维化破坏了心房组织原有的结构和功能,导致心房内传导的不均一性,从而易于形成折返,使得房颤更易发作和维持,为房颤的发生发展提供了病理基础^[2]。研究^[10]发现,抑制心房纤维化可以减少房颤的发生和房颤持续时间,表明抗心房纤维化的治疗能够对房颤的发生发展起到抑制作用。

胶原蛋白是构成心房组织ECM的主要成分,当心肌成纤维细胞受到异常刺激后,合成和分泌胶原增多,胶原合成与降解失衡,导致ECM中胶原含量升高、胶原过量积聚以及各型胶原比例失调和排列紊乱,引起心房纤维化^[11]。心房纤维化时I型胶原合成和分泌的异常增多,是导致ECM中胶原含量升高、胶原过量积聚以及各型胶原比例失调和排列紊乱的主要原因,其含量与心房纤维化程度密切相关。研究^[12-13]表明,房颤病人的房颤持续时间及复发率与心房组织中I型胶原的含量呈正相关关系。在犬心衰模型的研究^[14]中也得到了类似的结论。因此,降低ECM中I型胶原的含量、抑制其过量积聚对改善心房纤维化具有重要意义。

ERK1/2属于丝裂原活化蛋白激酶家族的一员,是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是传递丝裂原信号的信号转导蛋白,其基本的信号传递途径是Ras-Raf-MEK-ERK通路。在心房组织中,ERK1/2信号通路参与调控成纤维细胞增殖以及成纤维细胞合成和分泌胶原。既往研究^[15]表明,ERK1/2通路在肾素-血管紧张素系统(RAS)介导的心房纤维化中起到重要作用。房颤时RAS的异

常激活是导致心房纤维化的主要机制之一,ERK1/2特异性阻断剂可抑制RAS引起的心房纤维化,因此,对ERK1/2活性的抑制可能成为改善心房纤维化的重要环节。

近年来,DHA在防治房颤方面的作用日益受到关注。流行病学随访研究^[16]发现,鱼类膳食与房颤的低发病率密切相关,而冠状动脉搭桥手术期间补充给予 ω -3多不饱和脂肪酸可减少手术后房颤的发生并缩短病人的住院时间^[17]。犬的房颤模型研究^[3]显示,DHA可以降低房颤的易感性和心房纤维化的程度。另有研究^[4-5]表明,DHA可通过影响ERK1/2通路的活性而发挥相应的生物学效应。然而在房颤时DHA是否通过影响ERK1/2通路的活性而起到改善心房纤维化的作用目前尚不清楚。

本研究结果显示,实验第10、17天,DHA+AF组大鼠房颤持续时间均明显短于AF组,提示DHA可以缩短房颤大鼠的房颤持续时间;同时Masson染色结果显示,DHA可降低房颤大鼠心房组织ECM中的胶原含量、抑制胶原的过量积聚,具有改善心房纤维化的作用,这与RAMADEEN等^[3]研究结果类似。提示DHA缩短房颤持续时间的作用与改善心房纤维化有关。为进一步探讨DHA改善心房纤维化的机制,本研究分别检测大鼠心房组织中ERK1/2、p-ERK1/2和I型胶原mRNA及蛋白的表达。结果显示,与CTL组比较,AF组大鼠p-ERK1/2与ERK1/2比值升高,DHA组比值降低;与AF组比较,DHA+AF组p-ERK1/2与ERK1/2比值降低。AF组和DHA+AF组大鼠心房组织I型胶原mRNA和蛋白表达水平均较CTL组升高,而DHA+AF组大鼠心房组织I型胶原mRNA和蛋白表达水平均较AF组降低。提示DHA可以明显降低房颤大鼠p-ERK1/2的表达,并能同时降低房颤大鼠I型胶原mRNA和蛋白的表达,表明DHA可通过抑制房颤时心房组织ERK1/2的活性而影响I型胶原mRNA和蛋白的表达。

值得注意的是,虽然DHA抑制了ERK1/2的活性,但心房纤维化的程度只是被降低,并没有被逆转。事实上,心房纤维化的发生机制十分复杂,受多条信号转导通路的调控,除了主要受到ERK1/2通路介导的RAS途径影响外,尚有诸如TGF- β 1/Smad等信号通路介导的途径参与,这也解释了I型胶原mRNA和蛋白的表达只是部分被下调的原因,虽然ERK1/2通路的活性被DHA抑制,但可能尚有其他信号通路如TGF- β 1/Smad介导的I型胶原的

mRNA 和蛋白表达未受到影响。此外,有研究^[15]指出,c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路参与了心房纤维化的过程。另有研究^[18-19]指出,DHA 可通过影响 JNK 通路的活性而发挥相应的生物学效应,那么 DHA 除了通过影响 ERK1/2 通路的活性外是否可以通过调节 JNK 通路的活性而起到改善房颤时心房纤维化的作用,这值得我们进一步研究。还有值得注意的是,实验结果显示 DHA 可降低正常大鼠心房组织 ERK1/2 的活性,但对 I 型胶原的 mRNA 和蛋白的表达无显著影响,可能是由于 I 型胶原在维持正常的心房结构和功能方面起重要作用,DHA 抑制 ERK1/2 活性后,机体通过其他途径如 TGF- β 1/Smad 信号通路等调控 I 型胶原的合成来保持 I 型胶原在 ECM 中的正常含量,以维持心房正常的结构和功能,具体机制仍需进一步研究证实。

综上,DHA 能够缩短房颤大鼠的房颤持续时间,这与其改善房颤大鼠的心房纤维化有关;而 DHA 改善心房纤维化的作用,与其抑制心房组织 ERK1/2 通路的活性,进而下调 I 型胶原 mRNA 和蛋白的表达有关。该研究结果可为 DHA 治疗房颤提供实验依据。

[参 考 文 献]

- [1] HOBBS FD, FITZMAURICE DA, MANT J, *et al.* A randomised controlled trial and cost-effectiveness study of systematic screening (targeted and total population screening) versus routine practice for the detection of atrial fibrillation in people aged 65 and over. The SAFE study[J]. *Health Technol Assess*, 2005, 9(40):1.
- [2] 肖骅,雷寒. 心房颤动病人心房纤维化研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2007, 28(5):693.
- [3] RAMADEEN A, CONNELLY KA, LEONG-POI H, *et al.* Docosahexaenoic acid, but not eicosapentaenoic acid, supplementation reduces vulnerability to atrial fibrillation [J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2012, 5(5):978.
- [4] SUN H, HU Y, GU Z, *et al.* Omega-3 fatty acids induce apoptosis in human breast cancer cells and mouse mammary tissue through syndecan-1 inhibition of the MEK-Erk pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(10):1518.
- [5] PENG Y, ZHENG Y, ZHANG Y, *et al.* Different effects of ω -3 fatty acids on the cell cycle in C2C12 myoblast proliferation[J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 367(1/2):165.
- [6] 陈春林,巩甜甜,汤依群,等. SD 大鼠房颤模型的建立[J]. *实*

验动物科学, 2009, 26(3):1.

- [7] 郭继鸿. 心房颤动的新理念[J]. *临床心电学杂志*, 2010, 19(5):381.
- [8] 胡大一,杨进刚. 心房颤动的现代观点(1)我国心房颤动流行概况和危害[J]. *中国循环杂志*, 2004, 19(5):323.
- [9] VERHEULE S, SATO T, EVERETT T, *et al.* Increased vulnerability to atrial fibrillation in transgenic mice with selective atrial fibrosis caused by overexpression of TGF- β 1 [J]. *Circ Res*, 2004, 94(11):1458.
- [10] EHRlich JR, HOHNLOSER SH, NATTEL S. Role of angiotensin system and effects of its inhibition in atrial fibrillation: clinical and experimental evidence [J]. *Eur Heart J*, 2006, 27(5):512.
- [11] 张运,徐瑞. 心肌纤维化——心力衰竭治疗的新靶标[J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(17):1155.
- [12] 汪宇鹏,徐明,高炜. 心肌纤维化相关生物标志物研究进展[J]. *生理科学进展*, 2010, 41(6):461.
- [13] XU J, CUI G, ESMAILIAN F, *et al.* Atrial extracellular matrix remodeling and the maintenance of atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 2004, 109(3):363.
- [14] 林亚洲,陈林,许春萱,等. 心力衰竭犬心房组织 I 型胶原、基质金属蛋白酶-2 及组织抑制因子与心房纤维化和颤动的关系[J]. *中华老年医学杂志*, 2006, 25(2):141.
- [15] TSAI CF, YANG SF, CHU HJ, *et al.* Cross-talk between mineralocorticoid receptor/angiotensin II type I receptor and mitogen-activated protein kinase pathways underlies aldosterone-induced atrial fibrotic responses in HL-1 cardiomyocytes [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 169(1):17.
- [16] MOZAFFARIAN D, PSATY BM, RIMM EB, *et al.* Fish intake and risk of incident atrial fibrillation [J]. *Circulation*, 2004, 110(4):368.
- [17] CALO L, BIANCONI L, COLIVICCHI F, *et al.* N-3 Fatty acids for the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass surgery: a randomized, controlled trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 45(10):1723.
- [18] MA QL, YANG F, ROSARIO ER, *et al.* B-amyloid oligomers induce phosphorylation of tau and inactivation of insulin receptor substrate via c-Jun N-terminal kinase signaling: suppression by ω -3 fatty acids and curcumin [J]. *J Neurosci*, 2009, 29(28):9078.
- [19] LU CY, LI CC, LIU KL, *et al.* Docosahexaenoic acid downregulates phenobarbital-induced cytochrome P450 2B1 gene expression in rat primary hepatocytes via the c-Jun NH2-terminal kinase mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2009, 53(3):341.

(本文编辑 卢玉清)