

钙激活蛋白酶 I 在风湿性心脏病心房颤动中的作用

贾宝成, 李 莉*, 张宝仁, 徐志云, 郭素华, 李白翎, 赵 峰

(第二军医大学长海医院胸心外科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**阐明风湿性心脏病中钙激活蛋白酶 I (Calpain I) 与心房颤动(AF)关系及 Calpain I 在风湿性心脏病不同类型心房颤动时的变化特点。 **方法:**选择心脏手术患者 55 例, 共分为 4 组, A 组 (n=12): 非风湿性心脏病窦性心律组; B 组 (n=13): 风湿性心脏病窦性心律组; C 组 (n=14): 风湿性心脏病阵发性 AF 组; D 组 (n=16): 风湿性心脏病持续性 AF 组。在患者右房侧壁组织蛋白提取液不加钙离子或加钙离子 (10⁻³ mol/L) 的条件下, 采用比色法, 对非选择性蛋白酶抑制剂 E-64、Calpain I 抑制剂、Calpain II 抑制剂、溶酶体抑制剂 Lactocystin 作用于心房肌组织后的蛋白裂解活性进行检测比较。 **结果:** A 组、B 组在相同试验条件下蛋白裂解活性未见明显差异; 不给予蛋白酶抑制剂时, C 组、D 组的蛋白裂解活性明显高于 B 组 (P<0.01); 给予蛋白酶抑制剂, Calpain I 抑制剂可抑制 4 组患者心肌组织蛋白裂解活性, 而 Calpain II 抑制剂则不能充分抑制 4 组患者心肌组织蛋白裂解活性。 **结论:** 风湿性心脏病心房颤动患者心肌组织蛋白裂解活性是升高的, 其活性升高与 Calpain I 的作用有密切关系。

[关键词] 风湿性心脏病; 心房颤动; 钙激活蛋白酶 I; 蛋白裂解活性

[中图分类号] R 541.2; R 541.75 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)02-0134-02

Effects of Calpain I on atrial fibrillation patients with rheumatic heart disease

JIA Bao-cheng, LI Li*, ZHANG Bao-ren, XU Zhi-yun, GUO Su-hua, LI Bai-ling, ZHAO Feng (Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the relationship between Calpain I and atrial fibrillation in patients with rheumatic heart disease(RHD) and to study Calpain I changes in different type of atrial fibrillation. **Methods:** Fifty patients underwent heart surgery were divided into 4 group. Group A(n=12): Sinus rhythm group without rheumatic heart diseases; Group B(n=13): Sinus rhythm group with RHD; Group C(n=14): Paroxysmal AF with RHD; Group D(n=16): Persistent AF group with RHD. Atrial proteolytic activities in 4 groups were compared with and without Ca²⁺ by colorimetric method after atrial myocardial tissue was treated with E-64, Calpain I inhibitor, Calpain II inhibitor and Lactocystin. **Results:** No significant differences of proteolytic activities were found between group A and group B under the same condition. Proteolytic activities in group C and group D were significantly higher than those in group B (P<0.01). Calpain I inhibitor inhibited atrial proteolytic activities whereas Calpain II inhibitor did not. **Conclusion:** Proteolytic activity increases in atrial fibrillation patients with RHD and the increases has close relationship with Calpain I.

[KEY WORDS] rheumatic heart disease; atrial fibrillation; Calpain I; proteolytic activity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(2): 134-135]

钙超载是心房颤动(atrial fibrillation, AF)发病的主要分子机制之一^[1]。其中 AF 时钙激活蛋白酶 (Calpain) 的变化十分重要, Calpain I 是 calpain 家族系统中的一员, Calpain I 激活后能够部分降解收缩蛋白, 引起心肌收缩功能下降, 并影响心肌细胞结构和通道蛋白水平, 与 AF 心房电重构和结构重构密切相关^[2,3]。迄今为止 Calpain I 在风湿性心脏病 AF 发病中的意义还不甚明了。本实验通过对二尖瓣病变手术患者心肌蛋白裂解活性进行比较, 初步研究了 Calpain I 在风湿性心脏病心房颤动中变化规律。

1 材料和方法

1.1 研究对象 2002 年 8 月至 2003 年 7 月, 经患

者及家属知情同意, 选择长海医院胸心外科住院的患有二尖瓣病变的患者 55 例, 其中男 30 例, 女 25 例, 平均年龄 (42.9 ± 10.8) 岁, 心功能 NYHA 分级 II ~ III 级。按照疾病种类及 AF 类型分为 4 组: A 组 (n=12): 非风湿性心脏病窦性心律组; B 组 (n=13): 风湿性心脏病窦性心律组; C 组 (n=14): 风湿性心脏病阵发性 AF 组; D 组 (n=16): 风湿性心脏病持续性 AF 组。

1.2 研究方法 4 组患者均在二尖瓣置换术中体

[基金项目] 国家自然科学基金 (30070749)。

[作者简介] 贾宝成 (1973-), 男 (汉族), 博士生。

* Corresponding author. E-mail: lilihbs@online.sh.cn

外循环开始后立即取右房侧壁组织约 400 mg,以生理盐水冲洗后,迅速放入液氮保存。参照 Brundel 等^[1]检测心肌蛋白裂解活性方法,检测时称取液氮冰存组织块 100 mg,加入 TBS 缓冲液(每 100 mg 组织 0.3 ml TB 缓冲液)匀浆,4℃ 26 000×g 离心 30 min,取 25 μg 蛋白提取液加 20 μl AMC 试剂,25℃ 孵育 30 min,通过分光光度计测量心肌组织 Calpain 蛋白裂解活性值;或同时加入 E-64(10⁻⁴ mol/L)、Calpain I 抑制剂(10⁻⁴ mol/L)或 Calpain II 抑制剂(10⁻⁴ mol/L)、Lactacystin(10⁻⁴ mol/L)同上述方法检测受到抑制时的 Calpain 蛋白裂解活性值。所用 AMC 试剂、E-64、Calpain I 抑制剂、Calpain II 抑制剂均购于美国 Sigma 公司。

1.3 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SAS

统计软件进行方差分析(SNK 法)。

2 结果

2.1 未加钙离子前各组蛋白裂解活性比较 不加任何蛋白酶抑制剂时(表 1),A 组、B 组两组间未见明显差异,C 组、D 组蛋白裂解活性较 B 组明显增加($P < 0.01$);给予 10⁻⁴ mol/L 溶酶体抑制剂 Lactacystin 时,蛋白裂解活性与不加任何蛋白酶抑制剂比较,结果是相似的;而给予非选择性 calpain 抑制剂 E-64 或 Calpain I 抑制剂时,4 组蛋白裂解活性均受到抑制,但组间未见明显差异($P > 0.05$);给予 Calpain II 抑制剂时,虽然 4 组蛋白裂解活性均受到不同程度的抑制,但 D 组蛋白裂解活性较其他 3 组增加,明显高于 B 组($P < 0.05$)。

表 1 给予 1 mmol/L 钙前后 4 组心房组织蛋白裂解活性

Tab 1 Proteolytic activity in atrial myocardial tissue before and after 1 mmol/L Ca²⁺ was added

[$\bar{x} \pm s, z/\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot (30 \text{ min})^{-1}$]

Group	n	Basic level	E-64 (10 ⁻⁴ mol/L)	Calpain I inhibitor (10 ⁻⁴ mol/L)	Calpain II inhibitor (10 ⁻⁴ mol/L)	Lactacystin (10 ⁻⁴ mol/L)
A	12	28±9(42±14)	18±4(21±6)	23±3(24±4)	21±5(23±5)	34±12(32±11)
B	13	31±10(41±12)	19±5(20±5)	22±4(24±3)	20±3(24±6)	36±11(34±13)
C	14	54±15** (73±18**)	22±3(23±7)	24±5(26±4)	28±6(36±8')	48±16* (61±17**)
D	16	59±17** (83±20**)	24±6(25±6)	25±4(27±5)	34±4* (39±11**)	68±16** (73±19**)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group B; Data in brackets were proteolytic activity after 1 mmol/L Ca²⁺ was added

2.2 加钙离子后各组蛋白裂解活性比较 在蛋白提取液给予 1 mmol/L 钙离子后(表 1),C 组和 D 组蛋白裂解活性在不加任何蛋白酶抑制剂时或加 Lactacystin 时均较 B 组增加($P < 0.01$);给予 E-64 或 Calpain I 抑制剂时各组蛋白裂解活性均下降,但各組间无明显差异($P > 0.05$);给予 Calpain II 抑制剂时,4 组蛋白裂解活性均下降,但 C 组、D 组蛋白裂解活性仍明显高于 B 组($P < 0.05, P < 0.01$)。

3 讨论

本研究中观测到,在非风湿性心脏病窦性心律与风湿性心脏病窦性心律患者的心房组织中蛋白裂解活性是相似的,而在风湿性心脏病 AF 患者中均存在蛋白裂解活性的增加,这与 Brundel 等^[4]的研究结果相同,并且蛋白裂解活性的增加与 Calpain I 密切相关。

从本研究可以推断出,在人风湿性心脏病 AF 的发生中,可能存在着 Calpain I 的大量激活,并且通过 Calpain I 的激活作用介导一系列复杂的细胞电生理及细胞生物化学变化。AF 时蛋白裂解活性的增加是由于激活了 Calpain I 的作用,而不是出于 Calpain II 的原因。另外,对风湿性心脏病 AF 时 Calpain I 作用机制

的阐明,可以为将来采用药物干预治疗提供可行性依据^[5,6]。

[参考文献]

- [1] Goette A, Honeycutt C, Langberg JJ. Electrical remodeling in atrial fibrillation: time course and mechanisms [J]. *Circulation*, 1996, 94(11): 2968-2974.
- [2] Gao WD, Atar D, Liu Y, et al. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium [J]. *Circ Res*, 1997, 80(3): 393-399.
- [3] Urthaler F, Wolkowicz P, Dignerness S, et al. MDL-28170, a membrane-permeant calpain inhibitor, attenuates stunning and PKC epsilon proteolysis in reperfused ferret hearts [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 35(1): 60-67.
- [4] Brundel BJJM, Ausma J, van Gelder IC, et al. Activation of proteolysis by calpains and structural changes in human paroxysmal and persistent atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 54(2): 380-389.
- [5] Brundel BJJM, Henning RH, Kampinga HH, et al. Molecular mechanisms of remodeling in human atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 54(2): 315-324.
- [6] Brundel BJJM, Kampinga HH, Henning RH. Calpain I inhibition prevents pacing-induced cellular remodeling in a HL-1 myocyte model for atrial fibrillation [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(3): 521-528.

[收稿日期] 2004-08-30

[修回日期] 2004-12-08

[本文编辑] 尹 茶