

一次性力竭运动后大鼠心脏传导系统ADAMTS-1的变化及其在运动性心律失常发生中的作用

杨红霞, 常 芸

摘要: 目的: 探讨力竭运动后不同时相心脏窦房结、房室结和浦肯野氏纤维细胞炎症因子金属蛋白酶-1基因和蛋白水平的表达特点, 为运动性心律失常发生机制的阐明提供实验依据。方法: 100只健康成年雄性SD大鼠随机分为一次力竭运动、反复力竭组及相应的其对照组, 每组10只。分别于力竭运动后0 h、4 h、12 h及24 h取材, 进行心电图、免疫荧光组化及实时荧光定量PCR分析。应用激光显微切割技术定位并收集房室结和浦肯野氏纤维细胞研究细胞炎症因子ADAMTS-1的mRNA和蛋白表达的变化。结果: 一次力竭运动后房室结和浦肯野氏纤维炎症反应相关因子ADAMTS-1mRNA和蛋白即刻显著高于对照组 ($P < 0.05$)。运动后即刻窦房结、房室结、浦肯野氏纤维ADAMTS-1基因与蛋白表达明显上升, 之后开始下降, 4 h接近低谷, 一直持续到24 h ($P < 0.05$), 以浦肯野氏纤维的蛋白改变更为显著 ($P < 0.01$)。结论: 一次力竭运动后心脏传导系统各部位炎症因子ADAMTS-1在mRNA和蛋白水平大量表达, 引起传导系统炎症细胞浸润, 细胞间质增殖乃至纤维化, 是运动性心律失常的诱发因素之一。一次力竭运动后心脏传导系统ADAMTS-1蛋白的表达以浦肯野氏纤维的改变更为明显, 易影响正常心律的室内传导, 构成运动性室性心律失常的发生基础。

关键词: 力竭运动; 金属蛋白酶-1; 心脏传导系统

中图分类号: G804.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-1207(2012)04-0017-04

Changes of Rat Heart Conduction System ADAMTS-1 and It's Function in the Occurrence of Athletic Arrhythmia after One-time Exhaustive Exercise

YANG Hong-xia, CHANG Yun

(China Institute of Sport Science, Beijing 100061, China)

Abstract: Objective To explore the expression characteristics of sinoatrial node, atrioventricular node, Purkinje's fibre cell inflammatory factor MMP-1 gene and protein levels after exhaustive exercise so as to provide experimental reference to the occurrence mechanism of athletic arrhythmia. Method 100 healthy adult male SD rats were divided randomly into groups of one-time exhaustive exercise groups, repeated exhaustive groups and relative control groups. Each group has 10 rats. Samples were collected immediately, 4 hours, 12 hours and 24 hours after the exhaustive exercise. Electrocardiogram, immunofluorescence and real-time fluorescent quantitative PCR analysis were adopted. Using fibre laser cutting technology to position and collect the changes of mRNA and protein expression of atrioventricular node and Purkinje's fibre cell inflammatory factor ADAMTS-1. Result The immediate samples of mRNA and protein of atrioventricular node and Purkinje's fibre inflammatory factor ADAMTS-1 after one-time exhaustive exercise are significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$). Sinoatrial node, atrioventricular node and Purkinje's fibre ADAMTS-1 gene and protein expression rose distinctly immediately after the exercise, and then starts decreasing. After 4 hours, the indicators drop nearly to the bottom and continue until 24 hours ($P < 0.05$). The changes of Purkinje's fibre protein are quite obvious ($P < 0.01$). Conclusion Large quantity of mRNA and protein expression of the different parts inflammatory factor ADAMTS-1 of heart conduction system after one-time exhaustive exercise causes infiltration of the inflammatory cell of the conduction system, proliferation of intercellular substances and fibrosis. This is one of the risk factors for athletic arrhythmia. After one-time exhaustive exercise, clear changes of Purkinje's fibre protein can be seen in the protein expression of heart conduction system ADAMTS-1. This may affect intraventricular conduction of normal heart rhythm and form a base for athletic arrhythmia.

Key words: exhaustive exercise; MMP-1; heart conduction system

收稿日期: 2012-06-27

基金项目: 国家体育总局体育科学研究所基本科研业务经费 (10-01)

第一作者简介: 杨红霞, 女, 研究生。主要研究方向: 运动心脏病理与医学监督。

作者单位: 国家体育总局体育科学研究所, 北京体育馆路11号, 北京100061



随着竞技体育比赛的日益激烈, 运动性心律失常的发生也日渐显著, 成为运动医学领域十分关注的医学问题。早年运动医学界曾对此进行了广泛的临床观察与调研^[1]。但由于其病理过程与发生机制是一个极其复杂的过程, 涉及众多因子, 因此, 成为该研究领域的难点与热点。常芸研究团队针对运动性心律失常的病理与发生机制进行了大量实验性研究^[2-3]。鉴于以往实验性研究方法的限制, 多数集中在心肌组织, 很难概括心律失常发生的病理机制, 因而目前运动性心律失常发生的病理过程与机制仍未完全明了。心脏传导系统作为心电活动的控制中心和冲动传导的重要部位, 其特殊的组织结构和细胞类型决定其具有不同于普通心肌的心电起搏和传导功能, 与各种类型心律失常的发生和发展有密切关系, 因此有必要展开心脏传导系统的研究。

金属蛋白酶 (ADAMTS) 是新近发现的具有蛋白质水解功能的金属蛋白酶家族, 属于分泌型蛋白, 可由巨噬细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等多种细胞合成和分泌^[8], 分泌后大多通过 C 末端 3 个 TSP 重复序列和间隔区锚定在细胞外基质 (ECM) 中, 并与其结合从而参与 ECM 蛋白的调节^[9、10]。有研究表明, ADAMTS-1 参与动脉粥样硬化的病理过程与 ECM 重构关系密切, 具有降解 I 型胶原的作用^[11]。ADAMTS-1 可能通过调节胶原代谢而参与心肌纤维化的发生发展过程, ADAMTS-1 与 CVB3 感染所致病毒性心脏病心肌纤维化关系密切^[13]。TNF- α 可以诱导内皮细胞表达 ADAMTS-1, 从而分泌到细胞外基质并与其结合, 参与细胞外基质蛋白的调节, 降解蛋白多糖, 聚集蛋白聚糖、多能聚糖以及胶原蛋白^[16], 引起心肌组织局部肌肉间隙增宽, 导致心肌组织结构改变, 最终影响心功能。在运动条件下心肌细胞中 ADAMTS-1 的改变还未见研究报道。

为此, 本研究对力竭运动后心脏传导系统的 ADAMTS-1 表达变化进行研究, 试图为运动性心律失常发生机制的阐释提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验对象

健康雄性成年 SD 大鼠 100 只, 8 周龄, 体重 (22.0 \pm 8) g。国家标准啮齿动物饲料喂养, 自由饮食。饲养环境为室温 (20 \pm 2) $^{\circ}$ C, 光照时间 12 h, 相对湿度 40%~55%。

1.2 运动负荷

将 100 只实验大鼠随机分为 10 组, 每组 10 只。其中一次性力竭和 2 周反复力竭游泳运动^[5]各 4 组, 相应安静对照 2 组。安静对照组不运动, 力竭运动各组大鼠尾部负重为体重的 3%, 每周运动 6 天, 每天 1 次。力竭标准参照 Thomas 的报道^[6]即: “经过 10 s 后动物仍不能返回水面, 并且捞出后置于平面不能完成翻正反射。”

1.3 取材

最后一次力竭运动后即刻、4 h、12 h 及 24 h 等不同时相取材, 迅速取出心脏, 沿心脏矢状面的方向将整个心脏用 OCT 包埋, 液氮骤冷, 作全心连续冰冻切片, 光镜定位心脏传导系统, 运用激光显微切割仪切割分别收集窦房结细胞或细胞团^[7]。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测

采用 Trizol 法提取总 RNA, 并逆转录 cDNA, 存于 -20° C 备用。通过互联网搜索 Genbank 查找目标因子结蛋白和内参照 β -actin 的引物基因序列, 应用 Primer 5 软件进行引物设计, 引物扩增目标基因片断长度均小于 150 bp, 其 PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测验证引物可用后, 再进行荧光定量 PCR, 取定量 PCR 用 96 孔板, 加入 cDNA 和引物配置 25 μ L 反应体系。实时定量 RT-PCR 主要过程: 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s, PCR 反应 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。检测 CT 值 (见表 1)。设计的引物由上海生工生物技术有限公司合成。

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR Primer Sequence

引物种类	序列	长度
β -actin 上游引物	5, -CATTGCTGACAGGATGCAGAAG-3,	105bp
下游引物	5, -GAGCCACCAATCCACACAGAGT-3,	
ADAMTS-1 上游引物	5, -TCCGCTACAGGTCCTGTAACATT-3,	100bp
下游引物	5, -GGAAGCTTTGGAAACTCATTGTG-3	

1.5 免疫荧光检测

心脏传导系统冰冻切片进行免疫荧光组织化学染色, 采用 Leica AD MDW 活细胞多维图成像工作站和 Leica Qwin 图像分析系统对目标因子蛋白荧光强度进行定量, 荧光强度用积分灰度表示 (IOD), 参考阴性对照标本中荧光强度, 灰度值在 40~130 之间为蛋白阳性表达。

1.6 统计学分析

利用 SDS2.2 软件对实时定量 PCR 数据进行分析处理, 并导出文件及图像。利用管家基因对目的基因的表达进行校正, 得到相对定量结果 (相对数值)。结果用平均数 \pm 标准差表示, 组间比较采用多因素方差分析, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 心脏传导系统一般指标

一次性力竭运动后部分大鼠出现心律失常, 心脏肉眼观察有不同程度的充血, 且反复力竭游泳运动后各时相组心脏重量指数均显著高于对照组心脏重量指数 ($P < 0.05$)^[17]。

2.2 心脏传导系统 ADAMTS-1 mRNA 表达结果

如表 2 所示, 经一次性力竭游泳运动后即刻心脏传导系统各部位 ADAMTS-1 基因 mRNA 表有所增高, 随后, 4 h、12 h、24 h 心脏传导系统窦房结 ADAMTS-1 mRNA 表达均显著低于对照组 ($P < 0.05$) 和即刻 ($P < 0.05$)。

一次性力竭游泳运动后即刻房室结 ADAMTS-1 mRNA 表达显著高于对照组 ($P < 0.01$), 4 h、12 h、24 h 均显著低于对照组和即刻 ($P < 0.01$)。

一次性力竭游泳运动后 12 h 浦肯野氏纤维显著低于对照组和 4 h ($P < 0.05$)。各时相心脏传导系统部位之间差异不明显 ($P > 0.05$)。

一次性力竭运动后心脏传导系统各部位 ADAMTS-1 基因 mRNA 表达呈时相性规律, 一次性力竭运动后即刻窦房结、房室结、浦肯野氏纤维 ADAMTS-1 基因 mRNA 表达明显上



表2 一次力竭运动后大鼠ADAMTS-1mRNA 相对表达量
Table II Relative Expression Quantity of Rat ADAMTS-1mRNA after One-time Exhaustive Exercise

组别	窦房结	房室结	浦肯野氏纤维
对照	0.01731258 ± 0.003883247	0.013741898 ± 0.002225576	0.017916809 ± 0.005625736
即刻组	0.030917898 ± 0.009905104	0.034191309 ± 0.007841319 ^{d+}	0.041226525 ± 0.014962499
4h组	0.005670127 ± 0.001963645 ^{d a}	0.003559339 ± 0.002300933 ^{d+ a+}	0.00443432 ± 0.001112407 ^d
12h组	0.005595537 ± 0.00179048 ^{d a}	0.002505854 ± 0.001425231 ^{d+ a+}	0.001111903 ± 0.00085965 ^d
24h组	0.005797476 ± 0.000319971 ^{d a}	0.001885762 ± 0.000981828 ^{d+ a+}	0.005529214 ± 0.002225476

注: a, a+:与即刻组相比 P < 0.05, P < 0.01; b, b+:与4 h组相比 P < 0.05, P < 0.01; d, d+:与对照组相比 P < 0.05, P < 0.01。

升,之后开始下降,到力竭后4 h下降接近低谷,一直持续到24 h,其中浦肯野氏纤维的改变更为明显(见图1)。

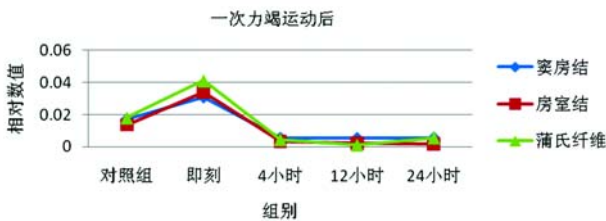


图1 一次力竭运动后大鼠ADAMTS-1mRNA 相对表达量
Figure 1 Relative Expression Quantity of Rat ADAMTS-1mRNA after One time Exhaustive Exercise

表3 反复力竭运动后大鼠ADAMTS-1 蛋白表达总灰度值变化情况
Table III Changes of Total Gray Value of Rat ADAMTS-1 Protein Expression after One-time Exhaustive Exercise

组别	窦房结	房室结	浦肯野氏纤维
对照	4697074.7 ± 417312	5046291.6 ± 426552.2	4728891.7 ± 340165.9
即刻组	8189088.1 ± 583387.1 ^{d+}	7515883.5 ± 481622.9 ^{d+ e+}	9409545.5 ± 620926.4 ^{d+ e+ f+}
4h组	2160550.1 ± 487953.3 ^{d+ a+}	1652671.9 ± 406714.1 ^{d+ a+ e+}	1682234 ± 786014.3 ^{d+ a+ e+}
12h组	2004902.1 ± 360540.4 ^{d+ a+}	1890310.5 ± 395174.3 ^{d+ a+}	1552899.5 ± 211159.3 ^{d+ a+ e+ f+}
24h组	2155788.2 ± 725941.7 ^{d+ a+}	1710966.6 ± 391617.1 ^{d+ a+}	1948586.2 ± 184494.4 ^{d+ a+}

注: a+:与即刻组相比 P < 0.01; b+:与4 h组相比 P < 0.01; c+:与12 h组相比 P < 0.01; d+:与对照组相比 P < 0.01; e+:与窦房结相比 P < 0.01; f+:与房室结相比 P < 0.01。

一次力竭运动后心脏传导系统各部位ADAMTS-1基因蛋白表达呈时相性规律,一次力竭运动后即刻窦房结、房室结、浦肯野氏纤维ADAMTS-1基因蛋白表达明显上升,之后开始下降,到力竭后4 h下降接近低谷,一直持续到24 h,其中,浦肯野氏纤维的改变更为明显(见图2)。

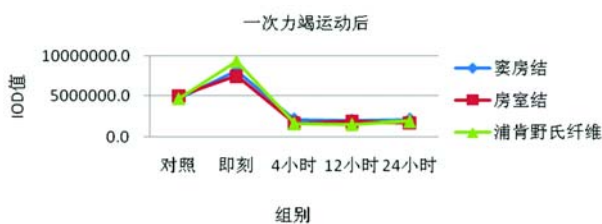


图2 一次力竭运动后大鼠ADAMTS-1 蛋白表达总灰度值变化
Figure 2 Changes of Total Gray Value of Rat ADAMTS-1 Protein Expression after One-time Exhaustive Exercise

2.3 心脏传导系统ADAMTS-1蛋白表达结果

如表3所示,经一次力竭游泳运动后,心脏传导系统窦房结、房室结、浦肯野氏纤维ADAMTS-1蛋白表达即刻显著高于对照组(P < 0.01),4 h、12 h、24 h又均显著低于对照组和即刻(P < 0.01)。

心脏传导系统不同部位在一次力竭游泳运动后存有差异。其中即刻,房室结ADAMTS-1蛋白表达显著低于窦房结和浦肯野氏纤维(P < 0.01),窦房结又显著低于浦肯野氏纤维(P < 0.01)。4 h,窦房结显著高于房室结和浦肯野氏纤维(P < 0.01)。12 h,浦肯野氏纤维显著低于窦房结和房室结(P < 0.01)。

3 讨论

ADAMTS是新近发现的具有蛋白质水解功能的金属蛋白酶家族,I型血小板结合蛋白基序(TSP)的解聚蛋白样金属蛋白酶(ADAMTS-1)是ADAMTS家族成员,属于分泌型蛋白,可由巨噬细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞等多种细胞合成和分泌^[8],分泌后大多通过C末端3个TSP重复序列和间隔区锚定在细胞外基质(ECM)中,并与之结合从而参与ECM蛋白的调节^[9、10]。有研究表明,ADAMTS-1参与动脉粥样硬化的病理过程与ECM重构关系密切,具有降解I型胶原的作用^[11]。申锴,陈瑞珍等^[12]研究表明ADAMTS-1可能通过调节胶原代谢而参与心肌纤维化的发生发展过程。也有学者观察柯萨奇病毒B组病毒感染小鼠引起急、慢性病毒心肌炎心肌ADAMTS-1表达发现,ADAMTS-1与CVB3感染所致病毒性心脏病心肌纤维化关系密切^[13]。在运动条件下心肌ADAMTS-1的变化还未见报道。

研究大鼠急性心肌梗死(AMI)ADAMTS-1的表达发现,结扎后6 h,ADAMTS-1mRNA的表达达到高峰,在



ADAMTS-1 表达高的区域出现心肌梗死,提示 ADAMTS-1 表达高的区域,心肌损害程度越严重。本研究发现,一次力竭运动后即刻房室结 ADAMTS-1 mRNA 表达呈现先升高后下降的趋势。即刻显著高于对照组和其它各运动组,之后各时相出现下降,且 4 h、12 h、24 h 组又均显著低于对照组和即刻。由于 ADAMTS-1 具有降解细胞外基质的功能,能破坏细胞结构,使酶活性丧失,糖蛋白分解,细胞功能的损坏,导致心肌细胞的凋亡或坏死,一次力竭运动后 ADAMTS-1 表达的升高,可以导致细胞坏死,尤其一次力竭运动对房室结细胞炎性刺激较为严重,细胞损害程度更大,更易诱发运动性心律失常的发生。

研究发现^[15], TNF- α 可以诱导内皮细胞表达 ADAMTS-1,从而分泌到细胞外基质并与其结合,参与细胞外基质蛋白的调节,降解蛋白多糖,聚集蛋白聚糖、多能聚糖以及胶原蛋白^[16],引起心肌组织局部肌肉间隙增宽,导致心肌组织结构改变,最终影响心功能。本研究发现,一次力竭运动后浦肯野氏纤维 ADAMTS-1 mRNA 和表达呈现先上升后下降的趋势,且运动后 12 h 显著低于对照组和 4 h。一次力竭运动后浦肯野氏纤维 ADAMTS-1 表达的升高,可降解细胞外基质的功能,破坏细胞结构,使酶活性丧失,糖蛋白分解,细胞功能的损坏,导致细胞的凋亡或坏死,从而进一步引发心律失常。综上,一次力竭运动后,心脏浦肯野氏纤维 ADAMTS-1 mRNA 和蛋白表达均出现不同程度升高,引起浦肯野氏纤维出现炎症反应,使浦肯野氏纤维结构和功能受损,影响正常心律的室内传导,构成运动性室性心律失常的发生基础。

4 小结

4.1 一次力竭运动后窦房结、房室结和浦肯野氏纤维炎性反应相关因子 ADAMTS-1 mRNA 和蛋白即刻显著增高,可诱导炎性因子大量表达,引起传导系统炎性细胞浸润,细胞间质增殖乃至纤维化,构成运动性心律失常的诱发因素之一。

4.2 一次力竭运动后心脏传导系统各部位 ADAMTS-1 基因与蛋白表达呈时相性规律,运动后即刻窦房结、房室结、浦肯野氏纤维 ADAMTS-1 基因与蛋白表达明显上升,之后开始下降,4 h 接近低谷一直持续到 24 h。

4.3 一次力竭运动后心脏传导系统 ADAMTS-1 蛋白的表达以浦肯野氏纤维的改变更为明显,易影响正常心律的室内传导,构成运动性室性心律失常的发生基础。

参考文献:

[1] 曲绵域. 实用运动医学[M]. 北京:北京科学技术出版社,1996:311-318.
 [2] 常芸. 运动心脏的实验研究[M]. 北京:人民体育出版社,1998.
 [3] 常芸. 运动心脏理论与实践[M]. 北京:人民体育出版社,2008.

106-132.
 [4] 常芸. 运动员心脏的医务监督[M]. 北京:北京体育大学出版社,2009. 203-207.
 [5] Kramer K, Dijkstra H, Bast A. (1993). Control of physical exercise of rats in a swimming basin. *Physiol Behav*, 53(2): 271-276.
 [6] Thomas D P, Marshall KI. (1988). Effect of repeated exhaustive exercise on myocardial subcellular membrane structures. *Int J Sports Med*. 9(4): 257-60.
 [7] Splawski I, Shen J, Timothy KW, et al.(1998). Gramme structure of three long QT syndrome genes: KVLQTI, BERG, and KCNE1. *Genes*, 51(1): 86
 [8] 王利, 王宪, 孔炜. 新型金属蛋白酶 ADAMTS 家族的研究进展[J]. 生理科学进展, 2008, 39 (1): 49-52
 [9] Kuno K, Kanada N, Nakashima E, et al.(1997). Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thmbospondin motifs as an inflammation associated gene[J]. *J Biol Chem*, 272(1):556-562.
 [10] Mittaz L, Ricardo S, Martinez G, et al. (2005). Neonatal calyceal dilation and renal fibrosis resulting from loss of Adamts-1 in mouse kidney is due to a developmental dysgenesis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 20(2): 419-423.
 [11] Jonsson-Rylander AC, Nilsson T, Fritsche-Danielson R et al. (2005). Role of ADAMTS-1 in atherosclerosis: remodeling of carotid artery, immunohistochemistry, and Proteolysis of versican. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25(1):180-185.
 [12] 申锴, 陈瑞珍, 杨英珍. ADAMTS-1 与小鼠急、慢性病毒性心肌炎心肌纤维化相关性的初步研究[J]. 中华心血管病杂志, 2007, 35(9):854-858.
 [13] 申锴. CvB3 致小鼠病毒性心脏心肌纤维化的发生机制及其药物治疗研究[D]. 复旦大学博士学位论文, 2007, 42.
 [14] 冯小兰, 冯震博等实验性大鼠急性心肌梗死 ADAMTS1 表达的研究[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25 (3): 373-375
 [15] Kuno K, Kanada N, Nakashima E, et al. (1997). Molecular cloning of a gene encoding a new type of metalloproteinase-disintegrin family protein with thmbospondin motifs as an inflammation associated gene[J]. *J Biol Chem*, 272(1):556-562
 [16] Mittaz L, Ricardo S, Martinez G, et al.(2005). Neonatal calyceal dilation and renal fibrosis resulting from loss of Adamts-1 in mouse kidney is due to a developmental dysgenesis [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 20(2):419-423.
 常芸, 杨红霞. 不同力竭运动后大鼠心脏传导系统结蛋白 mRNA 和蛋白表达的变化及其在运动性心律失常发生中的作用[J]. 中国运动医学杂志, 2012, 31 (04): 34-321

(责任编辑: 何聪)