·基础研究·

慢性缺氧大鼠心肌 HSP47 mRNA 的表达及其与PⅠCP和PⅢNP含量的相关性研究

林梦娇[1],田倪妮[2],魏 玲[1]*,朱向情[3],杨晓华[1],田 青[2],曹 帅[1],阮光萍[3],潘兴华[3]*
([1]昆明总医院地方干部病房,昆明 650032;[2]昆明市第一人民医院心内科,昆明 650011;[3]云南省干细胞工程实验室,昆明 650032)

【摘 要】 **目的** 探讨慢性缺氧大鼠心肌 HSP47 mRNA 表达与血清Ⅰ型前胶原C端原肽(PⅠCP)、Ⅲ型前胶原N端原肽(PⅢNP)含量及心肌纤维化的相关性。**方法** 模拟缺氧环境,建立慢性缺氧大鼠模型。将40只SD大鼠随机分为5组,每组8只。对照组不给于缺氧处理(A组),各慢性缺氧组大鼠分别缺氧7 d(B组)、14 d(C组)、21 d(D组)、28 d(E组)。采用实时荧光定量PCR(q-PCR)检测心肌中热休克蛋白(HSP47) mRNA的表达量;运用酶联免疫吸附测定(ELISA)方法检测血清及心肌中PⅠCP、PⅢNP的浓度;采用HE和MASSON染色法对对照组和慢性缺氧组大鼠进行组织切片染色。**结果** 与对照组比较,模型组的HSP47 mRNA表达量增多($P<0.01$),血清和心肌的PⅠCP、PⅢNP浓度升高($P<0.01$);心肌HSP47 mRNA的表达与血清和心肌的PⅠCP、PⅢNP含量呈正相关($P<0.05$);HE和MASSON染色显示慢性缺氧组心肌组织广泛纤维化。**结论** 在慢性缺氧条件下HSP47 mRNA的表达量与PⅠCP、PⅢNP浓度正相关,提示HSP47作为心肌胶原分子伴侣在慢性缺氧所致心肌纤维化中起一定作用。

【关键词】 慢性缺氧;心肌纤维化;热休克蛋白47;胶原
【中图分类号】 R541 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.04.067

Myocardial HSP47 mRNA expression and its correlation with serum PⅠCP and PⅢNP contents in rats under chronic hypoxic condition

LIN Meng-Jiao[1], TIAN Ni-Ni[2], WEI Ling[1]*, ZHU Xiang-Qing[3], YANG Xiao-Hua[1], TIAN Qing[2], CAO Shuai[1], RUAN Guang-Ping[3], PAN Xing-Hua[3]*
([1]Civilian Cadres' Ward of Kunming General Hospital, Kunming 650032, China; [2]Department of Cardiology, Kunming First People's Hospital, Kunming 650011, China; [3]Yunnan Provincial Laboratory of Stem Cell Engineering, Kunming 650032, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the mRNA level of heat shock protein 47 (HSP47) in the myocardium from the rats under chronic hypoxic condition, and explore its correlation with serum contents of procollagen Ⅰ C-propeptide (PⅠCP) and procollagen Ⅲ N-propeptide (PⅢNP) and myocardial fibrosis. **Methods** Hypoxic environment was simulated to establish rat model of chronic hypoxia. A total of 40 SD rats were randomly divided into 5 groups (8 animals in each group), that is, normal control group, and the 4 groups under chronic hypoxic condition for 7, 14, 21 and 28 d respectively. Real-time quantitative PCR (q-PCR) was used to detect the myocardial expression of HSP47 mRNA, and ELISA was adopted to measure the serum and myocardial contents of PⅠCP and PⅢNP. HE and MASSON staining were used to observe the histopathological changes in the control group and chronic hypoxia groups. **Results** Compared with the control group, the mRNA level of HSP47 was increased in the model groups ($P<0.01$), so were the serum and myocardial contents of PⅠCP and PⅢNP ($P<0.01$). The expression level was positively correlated with the serum contents of the 2 peptides ($P<0.01$). HE and MASSON staining indicated that extensive myocardial fibrosis was observed in the chronic hypoxic groups. **Conclusion** The expression of HSP47 mRNA is positively correlated with serum contents of PⅠCP and PⅢNP under chronic hypoxic condition. Our findings suggest that HSP47, as a chaperone myocardial collagen, is involved in the myocardial fibrosis induced by chronic hypoxia.

【**Key words**】 chronic hypoxia; myocardial fibrosis; heat shock protein 47; collagen

收稿日期:2016-09-26;**修回日期**:2016-11-26
基金项目:973计划项目(2012CB518100);成都军区十二五课题 B12022
田倪妮,为共同第一作者
通信作者:魏 玲, E-mail: weiling43@163.com;潘兴华, E-mail: xinghuapan@aliyun.com

This work was supported by the National Basic Research Program of China (973 Program, 2012CB518100) and the "Twelfth Five-Year" Project of Chengdu Military Command (B12022).

Corresponding author: WEI Ling, E-mail: weiling43@163.com; PAN Xing-Hua, E-mail: xinghuapan@aliyun.com

慢性缺氧是多种心血管疾病及心室重的诱因，是发病的重要环节，尤其对于老年患者，慢性缺氧可致多种心血管疾病[1,2]。热休克蛋白47(heat shock protein 47, HSP47)是一种高度保守的分子蛋白，既往研究表明其是胶原的特异性分子伴侣，在胶原分泌、合成及其所致纤维化中起重要作用。慢性缺氧可引起明显的肺动脉高压以及右心室重构，甚至最终发展为心力衰竭[3,4]。本研究通过建立慢性缺氧SD大鼠模型，测定HSP47 mRNA表达量及Ⅰ型前胶原C端原肽(procollagen Ⅰ C-propeptide, PⅠCP)及Ⅲ型前胶原N端原肽(procollagen Ⅲ N-propeptide, PⅢNP)的含量，探讨其与心肌纤维化的相关性。

1 材料与方法

1.1 低氧环境的建立和依据

参考Bonnet等实验[3-5]改良缺氧箱。缺氧箱箱体系统主要由动物饲养箱体和箱内气路组成。氧气浓度控制系统由高压氮气气瓶、电磁阀、氧浓度控制器、气体流量控制器组成，置于箱体的上部。设置箱体内的氧浓度后，整个系统由氧气浓度控制系统自动控制。智能控氧仪位于箱体上部，实时检测箱体内氧含量，并显示在智能控氧仪屏幕上，当箱体内氧浓度高于设置值时，电磁阀开启，充氮气进入箱体，充气速度由气体流量计控制，当氧浓度低于设定值时电子阀自动关闭，停止氮气输入。使箱体内氧气浓度保持在一定范围内。

1.2 实验动物分组

40只SPF级的雄性SD大鼠适应性正常饲养1周，按随机数字表完全随机分为5组，每组8只。对照组不给于缺氧处理(A组)。各慢性缺氧组大鼠放入缺氧箱中，向箱中快速通入氮气，控制气流流量(0.09~0.1)m^3/h，箱内氧气浓度从20.95%开始下降，控制氧浓度为10% ±0.5%，分别缺氧7 d(B组)、14 d(C组)、21 d(D组)、28 d(E组)。每天早上8:00~8:30开箱放气，清理粪便，补给食物和水，其他时间模型组大鼠均饲养于缺氧箱中。

1.3 实验方法

1.3.1 心肌组织总RNA的提取 从-80℃冰箱中取出心肌组织，移到液氮预先冷却的研钵中，边加液氮边研磨至样品成白色粉末。待液氮挥发完后，加入2 ml Trizol(Takara, 9109)。将变成固体的Trizol研磨成粉末。继续研磨至Trizol恢复成液体。将所得液体转移入离心管。按Trizol说明书提取总RNA。将所得样本的RNA分别移放置入RNase free离心管中，将离心管标记后放入-80℃冰箱中冻存。

1.3.2 逆转录获取cDNA 在200 μl薄壁聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)管中配制RT混合反应液，反应体系20 μl。在PCR仪上按照下面条件进行逆转录(reverse transcription, RT)：25℃ 5 min，42℃ 60 min，70℃ 5 min，4℃孵化，最终可得到cDNA，并放入-20℃冰箱冻存。

1.3.3 引物的设计与合成 根据NCBI(美国国立生物技术信息中心)Genebank中大鼠HSP 47的基因序列以及beta-actin内参序列，用Primer premier 5.0引物设计软件设计出特异性高的引物序列。该引物的合成由昆明贝尔吉有限公司合成。引物片段约115 bp。

表1 目的基因及内参引物

Table 1 The primers of target gene and beta-actin

Gene	Primer sequence (5'→3')	Primer size
HSP47mRNA	F 5'-TGCTGACCAAGGAGCAACTAA-3'	115 bp
	R 5'-TATCCTCTGGTCCTCACCTGC-3'	
Beta-actin	F 5'-CTCTGTGTGGATTGGTGGCT-3'	135 bp
	R 5'-CGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'	

1.3.4 实时荧光定量PCR反应 目的基因HSP47的扩增条件：20 μl反应体系，行实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, q-PCR)反应，50℃ 2 min起始模板变性，95℃ 3 min模板变性(循环数1)；95℃ 10 s退火，55℃ 1 min延伸(循环数38)；72℃ 5 min延伸(循环数1)；65℃ to 95℃制作溶解曲线。收集数据，测定样品各管的Ct值，设定无cDNA样品作为对照管。

1.3.5 患者血清中PⅠCP浓度的测定 采用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)方法检测本组40只SD大鼠血清中PⅠCP、PⅢNP浓度。将特异性抗体与固相载体联结，形成固相抗体，先后加入受检标本、酶标抗体，最后加底物显色。用酶标仪检测。

1.3.6 HE和MASSON组织切片染色 用HE和MASSON染色法对对照组及慢性缺氧组大鼠心肌组

织进行切片染色,观察镜下改变。

1.3.7 HSP47 mRNA 相对表达量的计算方法 本实验采用定量 PCR 中的公式法进行相对定量,实时连续测定基因扩增过程中产生的荧光,以达到指数扩增时的循环周数(Ct)值进行校正。方法如下:用下列公式计算各组大鼠的 HSP47 mRNA 相对表达量,以 beta-actin 作为对照,A 组作为基准,其余各组作为目的基因,目的基因 mRNA 的表达量均表达成基准的 N 倍($N=2^{-\triangle\triangle Ct}$),其中 △Ct = Ct(目的基因) - Ct(beta-actin),△△Ct = △Ct 样品 - △Ct 基准。各组△Ct 的比较间接反映出各组真实拷贝数间的关系,各样本 Ct 值越大,说明目的基因拷贝数越少。重复 3 次取 Ct 平均值。本实验中,Bio-rad CFX96 自带程序计算方法同上,获得目的基因的相对表达量。

1.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料采用均数 ± 标准差表示。多组间比较采用单因素方差分析或 Tamhane 方差分析。两组间比较采用 t 检验,相关性分析采用 Pearson 直线相关分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 目的基因荧光定量 PCR 产物鉴定

目的基因HSP47 mRNA引物片段长度为 115 bp,beta-actin 引物片段长度为 135 bp 左右。基因条带无引物二聚体且清晰无杂带(图 1),因此引物的设计合理,PCR 引物及扩增产物特异性高。

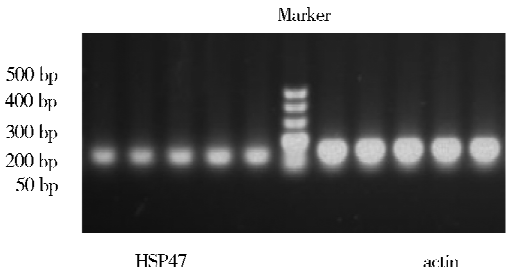


图 1 热休克蛋白 47mRNA 扩增产物

Figure 1 Heat shock protein 47 mRNA amplification product

2.2 HSP47 mRNA 在不同实验分组心肌中的相对表达量

与对照组比较,模型 C 组、D 组、E 组的 HSP47 mRNA表达量明显增多($P<0.01$),模型 B 组 HSP47 mRNA 表达量无明显差异($P>0.05$)。亚组间两两比较:与 B 组比较,C 组、D 组、E 组的 HSP47 mRNA表达量明显增多($P<0.01$);与 C 组比较,D 组、E 组的 HSP47 mRNA 表达量明显增多($P<0.01$);与 D 组比较,E 组的 HSP47 mRNA 表达量明显增多($P<0.01$)。

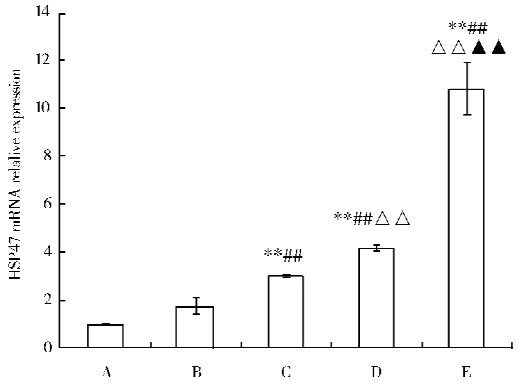


图 2 热休克蛋白 47 mRNA 在不同缺氧组心肌中的相对表达量

Figure 2 Relative expression of heat shock protein 47 mRNA in different hypoxia groups

A: control group; B: chronic hypoxia for 7 d; C: chronic hypoxia for 14 d; D: chronic hypoxia for 21 d; E: chronic hypoxia for 28 d. Compared with group A, $^{**}P<0.01$; compared with group B, $^{\#\#}P<0.01$; compared with group C, $^{\triangle\triangle}P<0.01$; compared with group D, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$

2.3 ELISA 法检测血清及心肌中的 PICP 和 PⅢNP 浓度

与对照组比较,模型 B 组、C 组、D 组、E 组的血清、心肌组织 PICP、PⅢNP 含量明显增多($P<0.01$)。亚组间两两比较:与 B 组比较,C 组、D 组、E 组的血清、心肌组织 PICP、PⅢNP 含量明显增多($P<0.01$);与 C 组比较,D 组、E 组的血清、心肌组织 PⅠCP、PⅢNP含量明显增多($P<0.01$);与 D 组比较,E 组的血清、心肌组织 PⅠCP、PⅢNP 含量明显增多($P<0.01$;表 2)。

2.4 心肌 HSP47mRNA 与血清、心肌的 PⅠCP 和 PⅢNP 相关性分析

心肌 HSP47mRNA 与血清和心肌的 PⅠCP、PⅢNP呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$;表 3)。

2.5 心肌组织 HE 染色和 MASSON 染色

正常心肌细胞在 HE 染色和 MASSON 染色下(图 3A,3B)呈短柱状,细胞核呈椭圆形、深染、染色质均匀。慢性缺氧大鼠 HE 染色下(图 3C,3D)心肌细胞弥漫空泡变,心肌间质广泛纤维化。MASSON 染色下胶原纤维呈蓝色,肌纤维呈红色。

表2 各组大鼠血清和心肌的PⅠCP和PⅢNP浓度的比较

Table 2 Comparison of PⅠCP和PⅢNP concentrations in serum and myocardium of rats between different groups

($n=8$, ng/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	Serum		Myocardium	
	PⅠCP	PⅢNP	PⅠCP	PⅢNP
A	69.25±8.17	1.16±0.01	153.66±7.61	3.85±0.02
B	78.32±10.00	1.17±0.01	160.41±1.74	3.85±0.01
C	95.10±9.59$^{**\#\#}$	1.51±0.02$^{**\#\#}$	181.50±10.84$^{**\#\#}$	4.10±0.01$^{**\#\#}$
D	115.85±9.16$^{**\#\#\triangle\triangle}$	1.83±0.01$^{**\#\#\triangle\triangle}$	216.15±11.50$^{**\#\#\triangle\triangle}$	4.24±0.01$^{**\#\#\triangle\triangle}$
E	235.64±10.43$^{**\#\#\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$	2.48±0.02$^{**\#\#\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$	279.78±6.54$^{**\#\#\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$	5.05±0.02$^{**\#\#\triangle\triangle\blacktriangle\blacktriangle}$

PⅠCP: procollagen Ⅰ C-propeptide; PⅢNP: procollagen Ⅲ N-propeptide. Compared with group A, $^{**}P<0.01$; compared with group B, $^{\#\#}P<0.01$; compared with group C, $^{\triangle\triangle}P<0.01$; compared with group D, $^{\blacktriangle\blacktriangle}P<0.01$

表3 心肌HSP47 mRNA与血清和心肌的PⅠCP和PⅢNP相关性分析

Table 3 Correlation analysis of cardiac HSP47 mRNA and PⅠCP and PⅢNP in serum or myocardium

PⅠCP or PⅢNP	HSP47 mRNA	
	r	P
Serum PⅠCP	0.757	0.02
Myocardium PⅠCP	0.946	0.00
Serum PⅢNP	0.851	0.01
Myocardium PⅢNP	0.776	0.02

PⅠCP: procollagen Ⅰ C-propeptide; PⅢNP: procollagen Ⅲ N-propeptide; HSP47: heat shock protein 47

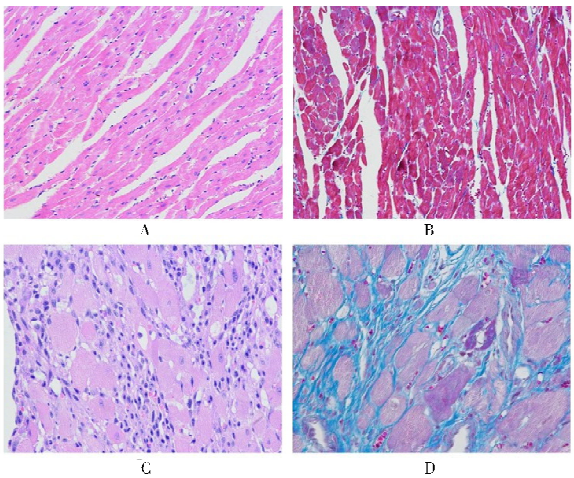


图3 大鼠心肌组织HE和MASSON染色

Figure 3 HE staining and MASSON staining of myocardial tissue

A: control group(HE ×200); B: control group(MASSON ×200); C: chronic hypoxia group(HE ×400); D: chronic hypoxia group (MASSON ×400)

3 讨 论

心肌纤维化(myocardial fibrosis, MF)是指心肌正常组织结构中出现的以细胞增殖、细胞外基质过度沉积为主要表现的疾病[5,6]。心肌过量纤维化是心室重构的重要标志,心肌纤维化导致心脏僵硬度增加、心脏顺应性降低,心脏传导阻滞,心脏收缩及舒张功能障碍,最终导致心力衰竭发生[7,8]。细胞外基质(extracellular matrixc, ECM)是由Ⅰ型胶原、Ⅲ型胶原、Ⅳ型胶原、Ⅴ型胶原、Ⅵ型胶原构成,其中以Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原为主[9]。心肌胶原中含Ⅰ型胶原约80%,因其纤维比较粗、僵硬度很大以及抗牵拉功能较强,从而在维持室壁强度上起重要的作用。心肌胶原中含Ⅲ型胶原约11%,Ⅲ型胶原的纤维比较细,且其弹性和伸展性比较好。在维持心肌组织正常结构和心脏功能完整性方面,Ⅰ型胶原与Ⅲ型胶原的比例具有很重要的意义[6]。研究表明[10,11]。PⅠCP C基末端肽可作为Ⅰ型胶原蛋白合成的标志物,PⅢNP N基末端肽可作为Ⅲ型胶原蛋白合成的标志物,因此在实验中检测PⅠCP和PⅢNP浓度就可反映胶原含量以及胶原合成和降解的情况,故PⅠCP和PⅢNP可成为MF重要的指标。HSP47作为热休克蛋白家族中唯一的胶原特异性分子伴侣,与胶原前体的加工、折叠、合成、分泌等过程密切相关,特别是与Ⅰ型胶原的分泌有关。HSP47与胶原合成密切相关,两者表达有时间和空间上的一致性[12],这种一致性在培养细胞[13]、胚胎组织发育[14]和组织纤维化中均得到了证实。因此可通过观察HSP47 mRNA的表达量来间接反映心肌纤维化程度。所以通过检测血清、心肌的PⅠCP、PⅢNP的浓度、心肌HSP47 mRNA表达联合组织病理学(HE染色、Masson)检测可以反映出缺氧导致心肌纤维化的程度。

本研究应用ELISA法检测血清、心肌PⅠCP、PⅢNP的浓度,应用q-PCR技术检测各组大鼠HSP47 mRNA表达,结果发现:与对照组相比,模型组中的血清、心肌的PⅠCP、PⅢNP浓度和心肌HSP47 mRNA相对表达量均明显增多($P<0.01$);模型组内两两比较,血清、心肌的PⅠCP、PⅢNP的浓度和心肌HSP47 mRNA相对表达量均有明显的

统计学差异($P<0.01$),且随缺氧时间增加而增多。对正常组大鼠和慢性缺氧组大鼠心肌组织做组织切片同样证实:正常心肌细胞在HE染色和MASSON染色下呈短柱状,细胞核呈椭圆形、深染、染色质均匀。慢性缺氧大鼠HE染色下心肌细胞弥漫空泡变,心肌间质广泛纤维化。MASSON染色下胶原纤维呈蓝色,肌纤维呈红色,胶原纤维连接呈网状。大量研究证明HSP47在胶原蛋白分泌细胞的内质网内与胶原特异性结合,参与胶原的折叠、装配、修饰和转运,与胶原合成密切相关,两者表达有时间和空间上的一致性[12]。本研究中HSP47 mRNA相对表达量与血清和心肌中PⅠCP、PⅢNP浓度均随缺氧时间的增加而增多,并且相关性分析显示,心肌HSP47 mRNA与血清和心肌的PⅠCP、PⅢNP、CVF呈高度线性正相关($P<0.05$),说明了HSP47 mRNA相对表达量与胶原合成一致,与朱慧等[15]的结果一致。HSP47 mRNA的表达量与胶原合成密切相关,可以间接反映心肌纤维化程度,提示HSP47作为心肌胶原分子伴侣在慢性缺氧心脏重构、心肌纤维化中起重要作用,为治疗缺氧所导致的心力衰竭提供了新的方法。

【参考文献】

[1] Veit F, Pak O, Brandes RP. Hypoxia-dependent reactive oxygen species signaling in the pulmonary circulation: focus on ion channels[J]. Antioxid Redox Signaling, 2015, 22(6): 537-552. DOI: 10.1089/ars.2014.6234.

[2] Pugliese SC, Poth JM, Fini MA. The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(3): 229-252. DOI: 10.1152/ajplung.00238.2014.

[3] Bonnet P, Bonnet S, Boissière J. Chronic hypoxia induces non-reversible right ventricle dysfunction and dysplasia in rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(3): 1023-1028. DOI: 10.1152/ajpheart.00802.2003.

[4] 奚群英, 柳志红, 赵智慧, 等. 老年慢性血栓栓塞性肺动脉高压患者的心肺运动试验研究[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2015, 14(3): 169-173. DOI:10.11915/j.issn.1671-5403.2015.03.039.
Xi QY, Liu ZH, Zhao ZH, *et al*. Cardiopulmonary exercise testing for elderly with chronic thromboembolic pulmonary hypertension[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2015, 14(3): 169-173. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2015.03.039.

[5] Chowdhury D, Tangutur AD, Khatua TN. A proteomic view of isoproterenol induced cardiac hypertrophy: prohibitin identified as a potential biomarker in rats[J]. J Transl Med, 2013(11): 130. DOI: 10.1186/1479-5876-11-130.

[6] Backs J, Olson EN. Control of cardiac growth by histone acetylation deacetylation[J]. Circ Res, 2006, 98(1): 15-24. DOI: 10.1161/01.RES.0000197782.21444.8f.

[7] 张 斌, 汤建民, 杨 蕾. 瑞舒伐他汀联合厄贝沙坦对大鼠心肌肥厚性重构的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(3): 534-538, 543. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2016.03.024.
Zhang B, Tang JM, Yang L, *et al*. Effect of rosuvastatin combined with irbesartan on remodeling of myocardial hypertrophy in rats[J]. Chin J Pathophysiol, 2016, 32(3): 534-538, 543. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2016.03.024.

[8] 田倪妮, 魏 玲,李宏键, 等. 慢性心力衰竭患者心肌热休克蛋白47的表达及其与纤维化的相关性研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 6(23): 579-583.
Tian NN, Wei L, Li HJ, *et al*. Study of expression of heat shock protein 47 and its correlation to myocardial fibrosis in atrial tissues with chronic heart failure[J]. Chin J Arterioscler, 2015, 6(23): 579-583.

[9] Segura AM, Frazier OH, Buja LM. Fibrosis and heart failure[J]. Heart Failure Rev, 2014, 19(2): 173-185. DOI: 10.1007/s10741-012-9365-4.

[10] Tao H, Yang JJ, Shi KH. DNA methylation in cardiac fibrosis: new advances and perspectives[J]. Toxicology, 2014(323): 125-129. DOI: 10.1016/j.tox.2014.07.002.

[11] Lazzeroni D, Rimoldi O, Camici PG. From left ventricular hypertrophy to dysfunction and failure[J]. Circ J, 2016, 80(3): 555-564. DOI: 10.1253/circj.CJ-16-0062.

[12] Weber KT, Sun Y, Bhattacharya SK. Myofibroblast-mediated mechanisms of pathological remodelling of the heart[J]. Nat Rev Cardiol, 2013, 10(1): 15-26. DOI: 10.1038/nrcardio.2012.158.

[13] Nattel S, Harada M. Atrial remodeling and atrial fibrillation: recent advances and translational perspectives[J]. J Am Coll Cardiol, 2014, 63(22): 2335-2345. DOI: 10.1016/j.jacc.2014.02.555.

[14] Zhan CY, Tang JH, Zhou DX. Effects of tanshinone ⅡA on the transforming growth factor β1 / Smad signaling pathway in rat cardiac fibroblasts[J]. Indian J Pharmacol, 2014, 6(6): 633-638. DOI: 10.4103/0253-7613.144933.

[15] 朱 慧, 张 薇, 张 供. 慢性心房颤动患者心房肌血管紧张素转换酶和血管紧张素受体mRNA表达改变的研究[J]. 中华心律失常学杂志, 2005, 9(3): 175-178. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-6638.2005.03.004.
Zhu H, Zhang W, Zhang G, *et al*. Study of atrial tissue angiotensin converting enzyme and angiotensin Ⅱ receptors mRNA expression in chronic atrial fibrillation[J]. Chin J Cardiac Arrhyth, 2005, 9(3): 175-178. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-6638.2005.03.004.

(编辑:王雪萍)