

[文章编号] 1007-3949(2009)17-09-0719-04

• 实验研究 •

# 大鼠急性心肌梗死后梗死周边区 HCN 通道蛋白表达的动态变化

张 玉, 余 强

(重庆医科大学附属第二医院心血管内科, 重庆市 400010)

[关键词] 心肌梗死; 梗死周边区; HCN 通道

[摘要] 目的 了解急性心肌梗死后梗死周边区心肌组织中 HCN2 和 HCN4 的 mRNA 和蛋白表达的动态变化。

方法 通过结扎大鼠左冠状动脉前降支建立急性心肌梗死模型, 将成功建模的大鼠随机分为 24 h 组、1 周组、2 周组和 4 周组, 同时于各时间点均设立假手术组, 每组 5 只。于各时间点末取左心室梗死周边区心肌组织样本(假手术组取左心室相应部位的心肌组织), 用逆转录聚合酶链反应检测 HCN2 和 HCN4 mRNA 的表达, 用免疫组织化学和免疫印迹法检测 HCN2 和 HCN4 蛋白的表达。结果 假手术组左心室心肌组织中存在 HCN2 和 HCN4 通道蛋白的表达, 梗死周边区心肌组织中 HCN2 和 HCN4 的表达在梗死后 24 h 出现上升趋势, 于梗死后 1 周表达达到峰值, 之后逐渐下降, 梗死后 4 周 HCN2 mRNA 和蛋白的表达仍高于对照组, 而 HCN4 的表达已回落至假手术组水平。结论 急性心肌梗死后左心室梗死周边缺血区心肌组织 HCN2 和 HCN4 通道蛋白的表达呈动态变化趋势, 梗死后 1 周表达明显增高。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Dynamic Changes of the Expression of HCN Channels in Infarcted Border Zones of Post-AMI Rat Heart

ZHANG Yu and SHE Qiang

(Department of Cardiovascular, the Second Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Infarcted Border Zone; HCN Channel

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the dynamic changes of the expression of HCN2 and HCN4 mRNA and protein in infarcted border zones of post-AMI heart. **Methods** AMI model induced by the left anterior descending coronary artery (LAD) ligation in Sprague-Dawley rats were randomly divided into 24 hours group, 1-week group, 2-week group, 4-week group. Accordingly, the sham-operation group was established. Left ventricular infarcted border zone myocardial tissues were harvested at each time, meanwhile, corresponding myocardial tissues in sham-operated rats were harvested too.

HCN2 and HCN4 mRNA and protein expression were measured by RT-PCR, immunohistochemistry and Western blotting. **Results** The expression of HCN2 and HCN4 mRNA and protein were detected in sham-operated rats. The expression of HCN2 and HCN4 mRNA and protein underwent a dynamic change process. The expression of two of them exhibited an ascending tendency at 24 hours after AMI, reached peak value at 1 week after AMI, decreased gradually after that. But the expression of HCN2 channel was also increased compared with sham-operated group at 4 week after AMI while there was no significant difference in HCN4. **Conclusion** Expression of HCN2 and HCN4 mRNA and protein in infarcted border zone myocardial tissues underwent a dynamic change process and reached peak value at 1 week after AMI.

急性心肌梗死 (AMI) 后梗死周边区尚存活的心肌往往在梗死后室性心律失常的发生上起关键作用。AMI 后心肌细胞膜离子通道的异常活动形成电重构, 这可能是 AMI 后心律失常发生的重要机制。研究表明超极化激活环核苷酸门控 (HCN) 阳离子通道亚单位为编码心脏起搏电流的基因<sup>[1]</sup>, 包括 HCN1~4 共 4 个异构型。在成年动物心室肌细胞

中, HCN2 是最主要的异构型, 有少量 HCN4 的表达。HCN 亚单位的表达异常可导致心肌细胞的电不稳定性而诱发心律失常。本研究通过检测 AMI 后不同时间点左心室梗死周边缺血区心肌 HCN2 和 HCN4 mRNA 和蛋白的表达, 为进一步探讨心肌梗死后室性心律失常发生的离子机制提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

Sprague-Dawley 大鼠, 体重 200~250 g 购自重庆医科大学实验动物中心。小动物呼吸机 (TKR-

[收稿日期] 2009-04-16 [修回日期] 2009-09-02

[作者简介] 张玉, 主要从事心肌梗死后离子通道变化的研究, E-mail 为 zhangyu68733844@163.com。通讯作者余强, 教授, 博士生导师, 主要从事冠心病的基础与临床研究。

200C)购自湖北省特力麻醉呼吸设备有限公司, RNA iso Plus, RT-PCR 试剂盒购自大连 TaKaRa 公司, 免疫组织化学试剂盒 (SABC 法) 购自武汉博士德公司, 全蛋白提取试剂盒购自南京凯基生物有限公司, 兔抗大鼠 HCN2 和 HCN4 一抗购自 Chemicon 公司, 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物公司。

## 1.2 动物模型的制备、分组及取材

健康 Sprague-Dawley 大鼠称重后用 10% 水合氯醛 (35 mg/kg) 腹腔注射麻醉。行气管切开术, 以小动物呼吸机维持呼吸, 同时连接心电图机, 术前术后均记录心电图。结扎左冠状动脉前降支近端 (左心耳和肺动脉圆锥之间, 距主动脉根部 2~3 mm) 制成心肌梗死模型, 根据体表心电图 iv、aVL 导联 ST 段弓背向上抬高, 并持续 30 min 以上, 判断心肌梗死模型的制备是否成功。术后成功建模的 20 只大鼠按照随机数字表法分为 AMI 后 24 h 组、1 周组、2 周组、4 周组, 每组 5 只。假手术组大鼠共 20 只, 为左冠状动脉前降支只穿线不打结, 术后随机分成前述 4 个时间点, 每个时间点 5 只。术后单笼饲养, 并给予青霉素腹腔注射预防感染。于各时间点以 10% 水合氯醛麻醉大鼠后迅速开胸取出心脏。剪取左心室梗死周边区心肌组织以预冷的生理盐水冲洗后 DEPC 水漂洗, 然后均分为 3 份, 装于冻存管置液氮中保存备用。

## 1.3 逆转录聚合酶链反应检测 HCN2 和 HCN4 mRNA 的表达

取冻存心肌 50~100 mg 用 RNA iso Plus 试剂提取总 RNA。取 2  $\mu$ L 总 RNA 逆转录成 20  $\mu$ L cDNA (反应条件: 37°C 15 min, 85°C 5 s)。以 cDNA 作为 PCR 反应的模板扩增目的基因和内参基因, 引物序列、目的片段长度、反应温度见表 1。反应条件为 94°C 预变性 3 min, 94°C 变性 30 s, 退火 30 s, 72°C 延伸 50 s, 35 个循环, 然后 72°C 延伸 7 min, 各自内参反应体系和条件与所测指标相同。取 PCR 产物 5 mL 和 1 mL 上样缓冲液, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 全自动凝胶成像分析系统对凝胶成像, Quantity One 4.4.0 软件分析后分别计算 HCN2 和 HCN4 与 GAPDH 吸光度比值代表其相对表达量。

## 1.4 免疫组织化学法检测 HCN2 和 HCN4 通道蛋白的表达

取各时间点组织块经石蜡包埋切片后, 用 SABC 法检测 HCN2 和 HCN4 通道蛋白。兔抗大鼠 HCN2 和 HCN4 一抗的工作浓度均为 1:50。用 PBS 缓冲液代替一抗做阴性对照。

表 1 PCR 反应中 HCN2、HCN4 及 GAPDH 的引物序列及反应条件

基因	引物序列	产物大小 (bp)	温度
HCN2	上游引物 5'-GGACCATCGGGAAGAAGATGTA-3'	314	56°C
	下游引物 5'-GCTGAGATCATGCTGAACCTTG-3'		
HCN4	上游引物 5'-CTCTTGCCCTCCTCTAGCTCTT-3'	369	58°C
	下游引物 5'-GGGTGTCTCTGCTGTAAGTCTGT-3'		
GAPDH	上游引物 5'-GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTCT-3'	610	—
	下游引物 5'-GTGGAAGAATGGGAGTTGCTGT-3'		

## 1.5 免疫印迹法检测 HCN2 和 HCN4 通道蛋白的表达

取心肌组织约 100 mg 碾碎, 按 100 g/L 加入全蛋白提取液匀浆 15 min, 4°C、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清 20  $\mu$ L BCA 测定蛋白浓度, 酶标仪测定波长, 根据标准曲线计算出蛋白浓度, 其余上清中按照 1:4 加入上样缓冲液, 100°C 加热 5 min。以 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离 HCN2 (HCN4 用 6% SDS-PAGE) 蛋白, 电转移蛋白至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭, 室温孵育 1 h 后弃去封闭液, 加入一抗, 封闭袋中 4°C 过夜, 弃去一抗, 用 TBS 洗涤 10 min  $\times$  3 次。弃去 TBS, 加入二抗, 37°C 孵育 1 h 弃去二抗, 用 TBS 洗涤 10 min  $\times$  3 次。增强化学发光 (ECL) 显影, 置于凝胶图像分析系统分析条带灰度。

## 1.6 统计学方法

计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 各组间 mRNA 及蛋白表达量均数比较采用单因素方差分析, 两两间多重比较采用  $q$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 假手术组各时间点 HCN2 和 HCN4 表达水平的变化

假手术 24 h 组、1 周组、2 周组及 4 周组大鼠左心室相应部位心肌 HCN2 和 HCN4 mRNA 及蛋白均有表达, 但各组间差异没有统计学意义, 故以 4 周时间点的假手术组用于比较分析。

### 2.2 HCN2 mRNA 及蛋白表达的动态变化

心肌梗死后 24 h, HCN2 mRNA 及蛋白的表达开始升高, 其中 mRNA 的表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 1 周时二者的表达均达峰值; 2 周时开始下降, 但二者表达水平均高于 24 h 组 ( $P < 0.05$ ); 4 周时 mRNA 表达下降至 24 h 组水平, 二者间比较差异无统计学意义; 蛋白表达也下降, 但与 2 周组水平比

较差异无统计学意义(表 2和图 1~ 3)。

表 2 心肌梗死后缺血心肌中 HCN2 mRNA 及蛋白的表达变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

分 组	mRNA	蛋白
假手术组	0.91 ± 0.02	0.33 ± 0.02
24 h 组	0.95 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.02
1 周组	1.18 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.03 <sup>a</sup>
2 周组	0.99 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.56 ± 0.02 <sup>ab</sup>
4 周组	0.95 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>b</sup>

a为  $P < 0.05$  与前一组比较; b为  $P < 0.05$  与 24 h 组比较。

### 2.3 HCN4 mRNA 及蛋白表达的动态变化

心肌梗死后 24 h HCN4 mRNA 及蛋白的表达缓慢升高,二者与假手术组比较差异无统计学意义;1周时二者表达达到峰值,与 24 h 组比较明显升高 ( $P < 0.05$ );2周时二者表达逐渐下降, mRNA 的表达量仍高于 24 h 组 ( $P < 0.05$ ),而蛋白表达量回落至 24 h 组水平;4周时二者的表达继续下降, mRNA 的表达水平回落至 24 h 组水平;而蛋白表达水平与 2 周组时比较差异无统计学意义(表 3和图 2~ 4)。

表 3 心肌梗死后缺血心肌中 HCN4 mRNA 及蛋白的表达变化 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

分 组	mRNA	蛋白
假手术组	0.22 ± 0.02	0.17 ± 0.01
24 h 组	0.24 ± 0.02	0.19 ± 0.02
1 周组	0.32 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.21 ± 0.01 <sup>a</sup>
2 周组	0.27 ± 0.02 <sup>ab</sup>	0.19 ± 0.02 <sup>a</sup>
4 周组	0.24 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.01

a为  $P < 0.05$  与前一组比较; b为  $P < 0.05$  与 24 h 组比较。

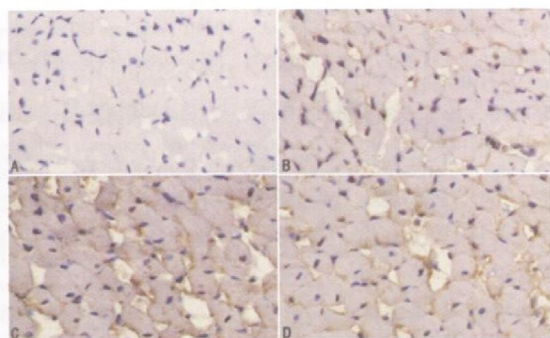


图 1 免疫组织化学法检测 HCN2 蛋白的表达 (SABC × 100)

A、B、C 和 D 分别为阴性对照组、假手术组、AMI 后 1 周组、AMI 后 4 周组。

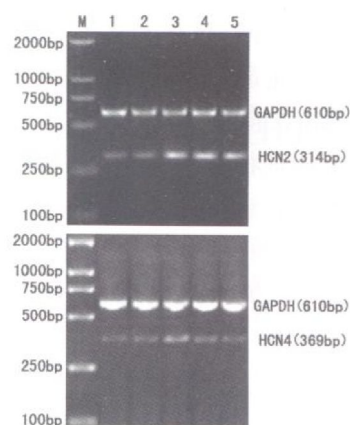


图 2. RT-PCR 检测 HCN2 和 HCN4 mRNA 的表达 M 为 Marker, 1 为假手术组, 2 为 24 h 组, 3 为 1 周组, 4 为 2 周组, 5 为 4 周组。

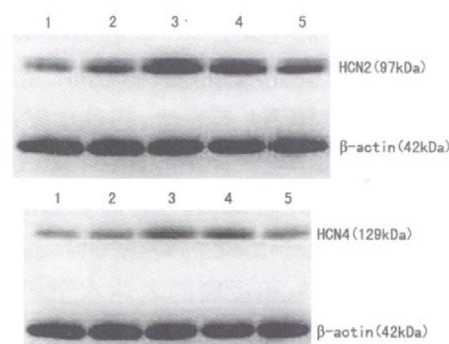


图 3. Western blotting 检测 HCN2 和 HCN4 蛋白的表达 1 为假手术组, 2 为 24 h 组, 3 为 1 周组, 4 为 2 周组, 5 为 4 周组。

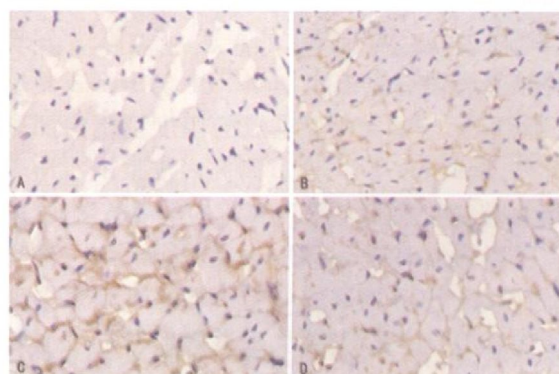


图 4. 免疫组织化学法检测 HCN4 蛋白的表达 (SABC × 100)

A、B、C 和 D 分别为阴性对照组、假手术组、AMI 后 1 周组、AMI 后 4 周组。

### 3 讨论

心脏起搏电流是动作电位舒张期去极化的离子基础,编码它的 HCN 通道主要存在于起搏细胞膜上,有少量分布于工作心肌细胞膜上,其各亚型分布随物种和不同组织而异。在成年大鼠心室肌中以 HCN2 为主,有少量的 HCN4 表达。HCN2 亚型的生

理功能在于稳定静息状态下起搏细胞的舒张期膜电位,从而起到稳定起搏节律的作用<sup>[2]</sup>; HCN4亚型是正常起搏电流产生的重要因素,决定基本心率。在心衰、房颤等病理状态下 HCN 通道表达有明显的变化,如犬充血性心衰时窦房结 HCN 通道表达下调而右房 HCN4表达明显升高,这可能是导致房性心律失常的原因<sup>[3]</sup>;在肥大的心肌中<sup>[4,5]</sup>,细胞膜上 HCN2和 HCN4的 mRNA 表达增加,心室肌起搏电流的激活阈值上升,起搏电流激活加快;心衰时心室肌的起搏电流表达增高, Lai等<sup>[6]</sup>认为这种起搏电流的过表达可能与室性心律失常的发生有关。

我们的前期研究发现,大鼠 AM I后 24 h 1周及 4周右心室心肌组织 HCN2和 HCN4 mRNA 和蛋白表达均上调,4周时最明显<sup>[7]</sup>。目前有关 AM I后梗死周边缺血区心肌组织中 HCN2和 HCN4表达变化的研究尚未见报道,本研究发现假手术组左心室心肌中有 HCN2和 HCN4的表达,并首次发现 AM I后梗死周边区心肌组织中 HCN2、HCN4的表达呈动态变化的过程,即梗死后 24 h 二者的表达出现上升趋势,在 1周时达到峰值,之后逐渐下降,但 AM I后 4周时,HCN2 mRNA 和蛋白的表达水平仍高于假手术组,而 HCN4的表达已回落至假手术组水平。

引起 HCN 通道蛋白在细胞表达增高的原因很多, Muto等<sup>[8]</sup>发现,醛固酮可以通过激活盐皮质激素受体而上调 HCN2和 HCN4 mRNA 和蛋白的表达。Graf等<sup>[9]</sup>研究发现大鼠心肌组织中  $\beta$ 2肾上腺素活性增高可以上调 HCN4的表达。Qu等<sup>[10]</sup>发现在离体培养乳鼠心肌细胞中 MRP1 与 HCN2共表达时,MRP1可增加 HCN2电流的幅度及蛋白的表达。此外,Stillitano等<sup>[11]</sup>通过研究内皮素 1对培养的成年大鼠心室肌细胞 HCN 表达的作用时发现,内皮素 1可以增强 HCN2 mRNA 的表达。因此,推测 AM I后梗死区 HCN 增高的可能原因为:①心肌梗死后由于神经内分泌系统激活,血浆和心脏局部血管紧张素②水平增高,刺激醛固酮分泌增加,醛固酮通过盐皮质激素受体激活来上调 HCN2和 HCN4的表达;④梗死后交感神经兴奋增强,血中肾上腺素活性增高,上调 HCN4的表达;④心肌梗死后血管内皮受损,大量内皮素 1释放,血浆内皮素 1水平增高进而引起 HCN2表达增高;⑤梗死后的心肌出现代偿性

肥厚,肥厚的心肌细胞上 HCN2和 HCN4的表达均可增加。影响 HCN 通道表达的因素是多方面的,且各因素之间又有着错综复杂的联系,具体机制有待进一步研究。

本研究探讨了 AM I后左室梗死周边区心肌组织中 HCN 通道蛋白表达的动态变化趋势, HCN 通道在 AM I后过表达可能通过增加心肌细胞的异常自律性启动室性心律失常的发生。不足之处在于未能从电生理角度观察 HCN 通道编码的起搏电流的动态变化,未能进一步探讨 HCN 通道的动态变化与心肌梗死后心律失常的发生是否存在联系以及存在怎么的联系。

#### [参考文献]

- [1] Barbuti A, Baniuscotti M, Difrancesco D. The pacemaker current from basics to the clinics [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2007; **18**: 342-347.
- [2] Ludwig A, Budde T, Stieber J, et al. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2 [J]. *EMBO J*, 2003; **22** (2): 216-224.
- [3] Zicha S, Fernandez-Velasco M, Leonardo G, et al. Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel subunit remodeling in a canine heart failure model [J]. *Cardiovasc Res* 2005; **66** (3): 472-481.
- [4] Fernandez-Velasco M, Goren N, Benito G, et al. Regional distribution of hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA expression in ventricular cells from control and hypertrophied rat hearts [J]. *J Physiol* 2003; **553** (2): 395-405.
- [5] Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents from molecules to physiological function [J]. *Annu Rev Physiol* 2003; **65**: 453-480.
- [6] Lai LP, Su MJ, Lin JL, et al. Measurement of funny current mRNA in human atrial tissue: correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999; **10** (7): 947-953.
- [7] 刘廷容, 余强, 吴雪晖. 大鼠心肌梗死后 HCN 表达的变化及普伐他汀的干预 [J]. 第三军医大学学报, 2008; **30** (14): 1346-1348.
- [8] Muto T, Ueda N, Ophoff T, et al. Aldosterone modulates I<sub>h</sub> current through gene expression in cultured neonatal rat ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol* 2007; **293** (7): 1399-480.
- [9] Graf EM, Heubach JE, Ravens U. The hyperpolarization-activated current I<sub>h</sub> in ventricular myocytes of nontransgenic and  $\beta$ 2-adrenoceptor overexpressing mice [J]. *Pharmacol* 2001; **364**: 131-39.
- [10] Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, et al. MRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2004; **279** (42): 43497-502.
- [11] Stillitano F, Sartiani L, Depaoli P, et al. Expression of the hyperpolarization-activated current I<sub>h</sub> in cultured adult rat ventricular cardiomyocytes and its modulation by hypertrophic factors [J]. *Pharmacol Res* 2008; **57** (2): 100-109.

(此文编辑 文玉珊)