文章编号:1000-5404(2007)22-2139-03

论著

HCN4基因修饰大鼠MSCs体外诱导获得的心脏起搏样细胞动作电位检测

王泽文,宋治远,姚 青 (第三军医大学西南医院心血管内科,重庆市介入心脏病学研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨超极化激活及环化核苷酸调控的阳离子通道亚型4(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4,HCN4)基因修饰大鼠MSCs体外诱导分化的心脏起搏样细胞的动作电位特性。**方法** 以HCN4基因修饰大鼠MSCs体外诱导获得的具有自发搏动的心脏起搏样细胞为实验组,同期培养的原代乳鼠窦房结细胞为对照组,采用全细胞膜片钳技术对两组细胞的动作电位进行检测。**结果** 心脏起搏样细胞及原代培养乳鼠窦房结细胞均可记录到具有舒张期自动去极化的动作电位,心脏起搏样细胞的动作电位特性与原代培养的乳鼠窦房结细胞相比,其静息电位、动作电位幅度及动作电位周期均无显著性差异($P>0.05$),但阈电位较原代培养的乳窦鼠房结细胞显著降低($P<0.01$)。**结论** 从电生理角度证实,心脏起搏样细胞的特性与原代培养的乳鼠窦房结细胞相似。

关键词: 心脏起搏样细胞;动作电位;全细胞膜片钳
中图法分类号: R322.11;R329.27;R337.5 **文献标识码:** A

Action potential of cardiac pacemaker cells differentiated from mouse mesenchymal stem cells after HCN4 gene modification

WANG Ze-wen, SONG Zhi-yuan, YAO Qing (Department of Cardiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the potassium currents of the cardiac pacemaking cells induced and differentiated from rat mesenchymal stem cells (MSCs) modified by HCN4 gene. Methods Identified cardiac pacemaking cells were adopted as the experiment group, and the sinoatrial node cells of original infant rat cultured in the same period were regarded as the control group. Whole cell patch was used to measure the action potential of the pacemaking cells and sinoatrial node cells. Results Action potential of automatic depolarization at dilatation was recorded in both the differentiated cardiac pacemaking cells and sinoatrial node cells. There was no significant difference on amplitudes of resting potential, amplitudes and cycle of action potential [(-50 ± 2.8) *vs* (-55 ± 5.5), (-60 ± 2.5) *vs* (-65 ± 2.5), (240 ± 57) ms *vs* (250 ± 60) ms], but the field potential was much lower in cardiac pacemaking cells than the control group[(-30 ± 2.5) *vs* (-55 ± 5.5), $P<0.01$]. Conclusion Whole cell patch technology can record the action potential of automatic depolarization at dilatation in the cardiac pacemaking cells, with the similar characteristics of the sinoatrial node cells of infant rat cultured originally.

Key words: cardiac pacemaker cells; action potential; whole cell patch

近年来,随着对心脏起搏细胞起搏离子流研究的不断深入,有关起搏离子流(funny current, I_f)产生的分子基础亦逐渐明了,一类被命名为超极化激活及环化核苷酸调控的阳离子通道及亚单位在起搏离子流形成中的作用日益受到人们的重视。最近,我们利用基因转染技术及体外诱导培养法获得了稳定表达超极化激活及环化核苷酸调控的阳离子通道亚型4(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4,HCN4)及具有自主搏动特性的心脏起搏样细胞[1],但获得的心脏起搏样细胞是否具有类似窦房结细胞的动作电位,目前尚不清楚。本实验利用全细胞膜片钳技术,对HCN4基因修饰大鼠骨髓间充质干细胞(mes-

基金项目:国家自然科学基金(30370585)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30370585)
作者简介:王泽文(1979-),男,重庆市潼南县人,博士,实习研究员,主要从事窦房结细胞电生理方面的研究。电话:(023)66993024
通讯作者:宋治远,电话:(023)68765168
收稿日期:2007-09-04;修回日期:2007-10-31

enchymal stem cells, MSCs)心脏起搏样细胞的动作电位进行检测,探讨大鼠心脏起搏样细胞是否具有类似窦房结细胞的动作电位,旨在为今后进一步开展"生物起搏"的相关研究提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与器材

D-Hanks 液(HyClone 公司)、DMEM 培养液(Gibco 公司)、优等胎牛血清(TBD 公司)、5-氮杂胞苷(Sigma 公司)、5-溴脱氧尿核苷(Sigma 公司)、Ⅱ型胶原酶(Sigma 公司)、胰蛋白酶(Gibco 公司)。Axonpatch 200B 膜片钳放大器、Digidata1200AD/DA 转换器、Clamfit 9.0 软件、Pclamp 6.0.4 软件(Axon 公司)、电极拉制仪(Narishge, PC10)、玻璃电极(南京六合泉水教学实验器材公司)。

1.2 实验分组

按本课题组已报道的方法[1-3],用 HCN4 基因对大鼠 MSCs 进行修饰,获得稳定高效表达 HCN4 基因的大鼠 MSCs,在转染后 20 d 左右观察到自主搏动的细胞,且传代培养后仍可分化为自主搏动的细胞,获得的具有自主搏动的细胞即为心脏起搏样细胞,以其作为实验组。

按本课题组已报道的方法[4],进行乳鼠窦房结细胞原代培养,取培养获得的乳鼠窦房结细胞作为对照组。

1.3 细胞动作电位检测

参照文献[5,6],以全细胞膜片钳技术分别记录心脏起搏样细胞和原代培养乳鼠窦房结细胞的动作电位。在倒置显微镜下选取细胞膜光滑、细胞体饱满的梭形细胞进行检测。采用软质中性无芯玻璃管(直径 1.5 mm,长 8 cm)于拉制仪上拉制成尖端直径为 1 ~ 2 μm 的微电极。充灌电极内液后阻抗为 6 ~ 8 MΩ。实验采用 Axonpatch 200B 膜片钳放大器,Digidata1200AD/DA 转换器和 Pclamp 6.0.4 记录和分析软件。全细胞电流记录,应用 Clampex 程序采样,采样频率 10 kHz,滤波频率 5 kHz。细胞外液(mmol/L):NaCl 140, $CaCl_2$ 1.8, KCl 5.4, $MgCl_2$ 1.0, HEPES 10, 葡萄糖 10, pH 7.3;电极内液(mmol/L):CsCl 100, $MgCl_2$ 3, EGTA 10, HEPES 5, Na_2ATP 5, pH 7.3。记录方法:调节三维操纵仪,进行封接,使封接阻抗达 1 GΩ 以上,吸破细胞形成全细胞记录模式,然后调用预先设计的刺激参数,以 Fetchex 程序记录细胞的动作电位。所有记录数据应用 Clampfit 9.0 软件进行后台分析处理,得出细胞的静息电位、阈电位、动作电位幅度和动作电位周期(两个相邻动作电位波峰间的距离)。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件行 t 检验。

2 结果

2.1 心脏起搏样细胞的动作电位检测

用全细胞膜片钳技术对心脏起搏样细胞进行检测,当细胞封接破膜成功后,保持静息电位水平,用电流钳方式记录,所测 10 个心脏起搏样细胞均可记录到具有舒张期自动除极化的动作电位(图 1)。



图 1 典型心脏起搏样细胞动作电位

2.2 原代培养乳鼠窦房结细胞的动作电位检测

用全细胞膜片钳技术对乳鼠窦房结细胞的动作电位进行检测,当细胞封接破膜成功后,保持静息电位水平,用电流钳方式记录,所测 11 个乳鼠窦房结细胞均可记录到具有舒张期自动去极化的动作电位(图 2)。

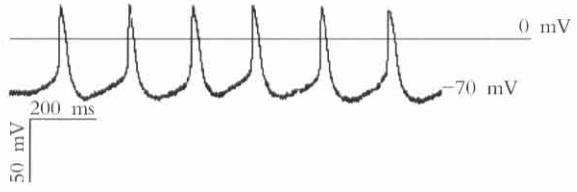


图 2 典型乳鼠窦房结细胞动作电位

2.3 两组细胞动作电位特性比较

用全细胞膜片钳技术共对 10 个心脏起搏样细胞及 11 个原代培养的乳鼠窦房结细胞进行动作电位检测,所有细胞均记录到具有舒张期自动去极化的动作电位。通过对两组细胞动作电位特性进行分析,结果显示,实验组的细胞静息电位、阈电位、动作电位幅度和动作电位周期均较对照组低,但仅有阈电位存在统计学差异($P<0.01$),见表 1。

表 1 两组细胞动作电位特性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	静息电位(mV)	阈电位(mV)	动作电位幅度(mV)	动作电位周期(ms)
实验组	10	-50.0 ± 2.8	-30.0 ± 2.5[a]	60.0 ± 2.5	240.0 ± 57.0
对照组	11	-55.0 ± 5.5	-40.0 ± 2.5	65.0 ± 5.5	250.0 ± 60.0

a: $P<0.01$,与对照组比较

3 讨论

既往的研究证实,心脏窦房结细胞动作电位的特点是在舒张期发生自动去极化,其舒张期去极化的产生与起搏离子流 I_f 密切相关,而起搏离子流的分子基础是超极化激活环核苷酸门控阳离子通道基因(hyperpolarization-activated cyclic nudeati-de-gated, HCN)。对该通道分子基础的研究已经明确了 4 种 HCN 通道基因的亚型,分别为 HCN1 ~ HCN4。心脏中主要表达

HCN2 和 HCN4，主要分布于心脏的特殊传导系统，以窦房结的 HCN 表达水平最高，其中 HCN4 占 80%[7]。Moosmang 等[8]用原位杂交法研究发现 HCN1 ~ HCN4 主要在鼠类窦房结、视网膜及背根神经节内转录，在窦房结最主要表达的是 HCN4，其在形成窦房结起搏离子流中有着核心的特异性作用。在目前进行的以基因治疗和细胞移植技术为平台构建心脏生物起搏器治疗缓慢性心律失常性疾病的研究中，HCN 通道基因已成为备受重视的备选基因[9,10]。鉴于 HCN 通道在心脏起搏活动中的重要意义，同时它可能作为目的基因，在某些心脏传导系统疾病，如病窦综合征和高度房室传导阻滞的基因治疗方面具有潜在价值，因此，我们有必要对该通道的动力学特征和生理学功能进行更深入的研究。

与软骨细胞、骨髓基质细胞、基因修饰细胞、胚胎干细胞等种子细胞相比，MSCs 具有如下优点：具有强大的增殖能力；具有较强的多向分化潜能；可根据需要在适宜的体内或体外条件下分化为骨细胞、软骨细胞、脂肪细胞、神经细胞、心肌细胞等；取材方便、损伤小且便于自体移植，便于外源基因的转染和表达调控。因此，我们选用 MSCs 进行基因转染和体外诱导分化。

我们以构建好的携带 HCN4 基因病毒载体感染大鼠 MSCs，经体外加压筛选，诱导分化为具有自主搏动功能的细胞，证实为心脏起搏样细胞[1]。我们在前期实验中对大鼠 MSCs 及其经 5-aza 诱导分化而形成的心肌样细胞膜电生理的特性进行了研究。结果显示，MSCs 仅存在多种外向性钾电流，无内向电流，心肌样细胞虽存在内向钠、钙电流，但与心肌细胞比较，其最大内向电流、最大激活电位与反转电位有明显的差异性，MSCs 及心肌样细胞均未检测到舒张期自动去极化的动作电位，考虑可能与 MSCs 及其诱导分化细胞膜上无 HCN 通道表达有关[9]。本研究采用全细胞膜片钳技术对经 HCN4 基因转染体外诱导分化而获得的心脏起搏样细胞动作电位进行检测，结果显示，心脏起搏样细胞可以记录到舒张期自动缓慢去极的动作电位，表明心脏起搏样细胞为可兴奋性细胞，从而推测 HCN4 基因转染可能是大鼠 MSCs 定向分化的重要诱导因素。同时与同期培养的乳鼠窦房结细胞相比，二者动作电位图像具有相似性，虽心脏起搏样细胞的静息电位、阈电位及动作电位幅度均降低，但仅有阈电位存在统计学差异（$P < 0.01$），考虑与同期培养的乳鼠窦房结细胞离子通道形成时间短，功能还不完善，其细胞发育成熟度不如心脏起搏样细胞有关，提示心脏起搏样细胞具有类似窦房结细胞的动作电位。

本实验中探讨了 HCN4 基因修饰大鼠 MSCs 诱导分化为心脏起搏样细胞的动作电位特性，证明了经 HCN4 基因修饰大鼠 MSCs 诱导分化而成的心脏起搏样细胞具有与原代培养乳鼠窦房结细胞类似的动作电位，从电生理角度表明心脏起搏样细胞可能具有窦房结细胞类似的电生理功能，为今后进一步开展“生物起搏”的在体实验研究提供理论与实验依据。

参考文献：

[1] 姚　青，宋治远，仝识非，等. 大鼠骨髓间充质干细胞体外诱导分化为心脏起搏样细胞的研究[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2007，21(1)：55 - 58.

[2] 仝识非，宋治远，姚　青，等. mHCN4 基因修饰小鼠骨髓间充质干细胞重建起搏离子流通道[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志，2007，21(1)：51 - 54.

[3] 仝识非，宋治远，姚　青，等. 小鼠骨髓间充质干细胞的分离与纯化培养的实验研究[J]. 第三军医大学学报，2007，29(10)：907 - 910.

[4] 宋治远，钟　理，仝识非，等. 乳鼠窦房结细胞的原代培养与鉴定[J]. 临床心血管病杂志，2002，18(9)：447 - 449.

[5] Hamill O P, Marty A, Neher E, *et al*. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches[J]. Pflugers Arch, 1981, 391(2): 85 - 100.

[6] Magistretti, J, Mantegazza, M, Guatteo, E, *et al*. Action potentials recorded with patch-clamp amplifiers: are they genuine? [J]. Trends Neurosci, 1996, 19(12): 530 - 534.

[7] Shi W, Wymore R, Yu H, *et al*. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues[J]. Circ Res, 1999, 85(1): e1 - e6.

[8] Moosmang S, Stieber J, Zong X, *et al*. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues[J]. Eur J Biochem, 2001, 268(6): 1646 - 1652.

[9] Rosen M R, Brink P R, Cohen I S, *et al*. Genes, stem cells and biological pacemakers[J]. Cardiovasc Res, 2004, 64(1): 12 - 23.

[10] 仝识非，宋治远，姚　青. 大鼠骨髓间充质干细胞诱导分化为心肌样细胞内向钠电流的研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(5)：435 - 437.

（编辑　陈聪连）