文章编号:1000-5404(2008)05-0431-04

论著

FKBP12.6基因转染对心衰犬心功能及心肌病理变化的影响

王 逵,杨成明,刘国通,王旭开,曾春雨,王红勇,方玉强,傅春江,石伟彬 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨白蛋白微泡介导的pcDNA3.1-FKBP12.6质粒转染对心衰犬心功能及心肌病理变化的影响。**方法** 28只快速起搏心衰犬分为2组。转染组以白蛋白微泡为载体,在超声破坏下将人工合成的pcDNA3.1-FKBP12.6质粒转染入心肌,以不含质粒的微泡作为对照组。两组又分为转染后4 d(转染Ⅰ组)和14 d(转染Ⅱ组)。分别在起搏器安置前、转染前、转染后,采用超声测量左室内径、心功能评价FKBP12.6基因对心衰的治疗效果。通过HE染色和透射电镜观察心肌病理变化。应用RT-PCR检测各组FKBP12.6基因的表达情况。**结果** 超声微泡介导的转染可以提高心肌FKBP12.6 mRNA的表达。心肌病理显示转染组病变轻于对照组,而且未转染组病变进一步恶化。转染组EF、FS在第4天可见明显好转,并在14 d时保持稳定,但一直低于正常水平。在第4天时转染组LVEDD与对照组无变化,而LVEDV下降($P=0.04$),在14 d时两指标与对照组比较均缩小(LVEDD和LVEDV的P值分别为0.012和0.005)。**结论** 通过超声微泡介导转染FKBP12.6基因可以改善心脏功能,逆转心肌重塑,减轻心肌病理变化。

关键词:心力衰竭;FKBP12.6;基因治疗;心功能;病理学
中图法分类号:R322.11;R394.3;R541.605 **文献标识码:**A

Effects of FKBP12.6 gene transfection on cardiac function and myocardium pathomorphology in canine with heart failure

WANG Kui, YANG Cheng-ming, LIU Guo-tong, WANG Xu-kai, ZENG Chun-yu, WANG Hong-yong, FANG Yu-qiang, FU Chun-jiang, SHI Wei-bin (Department of Cardiology, Daping Hospital, Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of gene transfection of FKBP12.6 on cardiac function and pathological changes of canine heart failure induced by rapid ventricular pacing. Methods Three weeks after onset of rapid ventricular pacing (250 beats/min), 28 canines were divided into 4 groups. Either pcDNA3.1-FKBP12.6 plasmid encoding human FKBP12.6 gene (transfection group Ⅰ, Ⅱ; observed at the 4th or 14th day respectively after trasnfection) or empty vector (control Ⅰ, Ⅱ) was transferred into myocardium under ultrasonic microbubble destruction. After the transfection, maintenance pacing at a reduced rate (190 beats/min) was continued until end-point of experiment. Echocadiographic data were collected three times (before pacing, before transfection and endpoint). The pathological change of myocardium is assessed by HE staining and electron microscope. Semiquantative RT-PCR identified FKBP12.6 expression in myocardium. Results Gene transfection of FKBP12.6 elevated expression of FKBP12.6 mRNA 3.4 folds at day 4, and 1.7 folds at day 14 respectively, compared with control group. The pathology indicated relative severe changes were observed in control groups and it further aggravated in group control Ⅱ. Cardiac function was significantly improved in transfection group Ⅰ and this effect was stable at least 2 weeks. Eject fraction (EF), fractionar shorting (FS) are still lower than pre-pacing although they increase in transfection groups. Left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) and left ventricular end-diastolic volume (LVEDV) decreased at day 14 but LVEDD remained unchanged at day 4 compared with pre-transfection. Conclusion Gene transfection of FKBP12.6 improves cardiac function in the failing heart, reverses myocyte remodeling and promotes recovery from pathological changes. Thereby it is a novel gene therapy for human heart failure.

Key words: heart failure; FKBP12.6; gene therapy; cardiac function; pathology

基金项目:国家自然科学基金(30371363)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30371363)
作者简介:王 逵,男,湖北省监利县人,硕士研究生,医师,主要从事心力衰竭及冠心病方面的研究。电话:(023)68757810,E-mail:kuikings@163.com
通信作者:杨成明,电话:(023)68757801,E-mail:yangchmi@163.com
收稿日期:2007-11-30 **修回日期:**2008-01-04

FK506 结合蛋白 12.6（FK506 binding protein 12.6，FKBP12.6）是心肌肌浆网（sarcoplasmic reticulum，SR）上 Ca^{2+} 释放通道——雷尼丁受体（ryanodine receptor type 2，RyR2）的一种调节蛋白。RyR2 在心肌兴奋-收缩耦联中发挥关键作用。当电信号传导至心肌时，心肌膜去极化激活电压门控 L 型 Ca^{2+} 通道，内流的 Ca^{2+} 通过 Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放机制（Ca^{2+}-induced Ca^{2+} release，CICR）[1] 诱导肌浆网上 RyR2 开放，大量 Ca^{2+} 从肌浆网释放，引起心肌纤维收缩。心衰时 RyR2 通道缺陷造成心肌舒缩功能障碍及心律失常等问题[2]，而 FKBP12.6 的蛋白水平及其与 RyR2 受体的亲和力下降是 RyR2 通道缺陷的一个重要原因[3,4]。体外研究表明[5-7]，FKBP12.6 过表达可以减少 Ca^{2+} 外漏，增加 Ca^{2+} 瞬变，提高细胞质 Ca^{2+} 浓度，增强心肌收缩。本实验拟通过在体转染 FKBP12.6 基因探讨其对心衰犬心功能及心肌病理的影响。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

永久心脏起搏器[重庆华伟工业有限公司，VOO，脉冲频率（250±3）次/min，（190±3）次/min，磁铁体外控制开关]；X 线数字减影血管造影机（美国 GE 公司，LCV/DLX1250 mA）；多普勒彩超仪（HP SONOS 5500）；低温高速离心机（德国 Heraous 公司）；核酸蛋白分析仪（DU-800，美国 Beckman 公司）；PCR 反应仪（Bio-Rad 公司）；凝胶成像分析仪（Universal Hood Ⅱ，Bio-Rad 公司）。pcDNA3.1-FKBP12.6 质粒由本实验室构建并保存（约 6 mg/ml）[8]；全氟丙烷白蛋白微泡由第三军医大学新桥医院超声科提供（微泡直径 2～4 μm，浓度：$>1.5\times10^8$/ml）；Tripure RNA 提取液（Roche Diagnostics）；RT-PCR 试剂盒（大连宝生物工程有限公司）；PCR 引物由 Invitrogen 公司合成。

1.2 实验对象

成年健康杂种犬，28 只，雌雄不限，体质量 9.5～15 kg（本院实验动物中心提供）。分为 4 组，每组 7 只。实验组转染 pcDNA3.1-FKBP12.6 质粒后分别观察 4 d（转染Ⅰ组）或 14 d（转染Ⅱ组）；而对应的对照组（对照Ⅰ组，对照Ⅱ组），只输入微泡，不输入质粒，余条件相同。

1.3 心衰模型建立

采用 Takagaki 等[9] 高频起搏诱发心衰，用低频维持心衰的方法建立充血性心力衰竭模型。3% 戊巴比妥钠按 1 ml/kg 从后肢静脉推入将犬麻醉。在 X 线指导下通过右颈外静脉植入电极至右室尖部，经皮下隧道与起搏器相连，起搏器（250 次/min）埋在背部肩胛之间的皮下。术后 2～3 d 心电监护下磁铁打开起搏器开关实行起搏心律。约 3 周后，犬出现不同程度的食欲下降、活动减少、呼吸加快等心衰症状。犬在起搏器关闭和麻醉状态下，完成转染及形态功能测量后更换起搏器，以 190 次/min 起搏频率维持心衰至观察终点。

1.4 基因转染

1.4.1 载基因微泡制备 按 500 μg/kg 抽取质粒溶液，将其按 1∶3 与白蛋白微泡混合，用手轻搓 10 min 混匀后置 4 ℃ 冰箱 4 h 备用。

1.4.2 微泡基因转染 通过导管缓慢输入载基因微泡至右心室，用生理盐水 20 ml 冲管，同时超声探头（S_3）固定于心前区，照射至心室高密度影消失（频率 1.3/2.6 mHz，采用 R 波同步触发，每 4～6 个心动周期触发 1 次，机械指数 1.6）。

1.5 心脏形态及功能测定

起搏器安置前、转染前、转染后 4 d 或 14 d，起搏器关闭状态下多普勒超声测量左室舒张末期内径（LVEDD）、射血分数（EF）、短轴缩短率（FS），计算左室舒张末期容积（LVEDV）。

1.6 心肌病理检查

采用静脉注射空气法处死动物，分别留取左室前壁心肌标本，用 4% 多聚甲醛固定，24 h 后脱水包埋切片，HE 染色后行光镜检查。电镜标本取左室前壁中层心肌用 2% 戊二醛固定，每组随机抽取 2 个标本，由学校电镜室制作标本行电镜检查。

1.7 目的基因表达检测

用内参照半定量 RT-PCR 检测目的基因表达情况。引物设计由软件 Primer Premier 5.0 完成，FKBP12.6 上游引物 P1：5′-TAGAATTCATGGGCGTGGAGATCGAGAAC-3′，下游引物 P2：5′-ATGGATCCCACTCTAAGTTGAGCAGCTC-3′，目的条带 338 bp。β-actin，P1：5′-CCTCTGGCCGCACCACTGGTATT-3′，P2：5′-CCTTGATGTCACGCACGATCTCCC-3′，目的条带 210 bp。最后一次测量心脏超声后空气注射法处死犬，留取左室前壁中层心肌置 -70 ℃ 冰箱（SANYO）保存。按 Tripure 使用说明提取总 RNA，用 DU-800 测定总 RNA 浓度，所有用于反转录的 RNA 的 $D(260)/D(280)$ 比值为 1.9～2.1。根据测定浓度取 2 μg RNA 用于反转录，按 RT-PCR 试剂盒说明配制 RT 及 PCR 反应体系。FKBP12.6 与 β-actin 的 PCR 反应条件相同：94 ℃ 2 min，（94 ℃ 30 s，60 ℃ 30 s，72 ℃ 30 s）×35 循环，72 ℃ 10 min。取 FKBP12.6 及 β-actin 反应产物各 5 μl 用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳。用凝胶成像分析仪分析各组 DNA 条带灰度值，计算各组 FKBP12.6 与 β-actin 灰度比值，作为 FKBP12.6 表达强度。

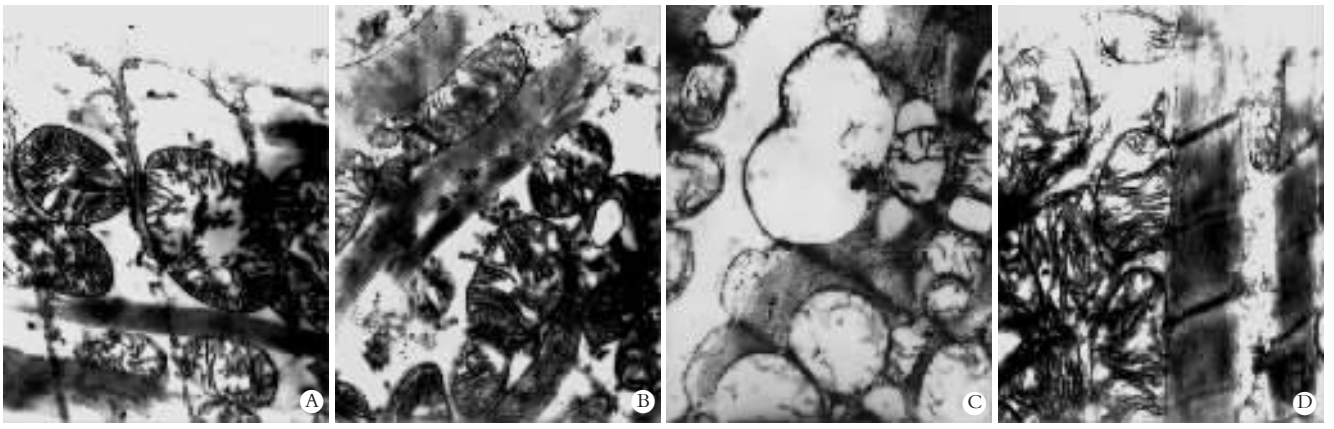
1.8 统计学处理

数据统计分析由 SPSS 13.0 完成，计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组内前后测量数据用重复测量方差分析，两两比较用 LSD 法，方差不齐两两比较用 T2 方法，组间数据用两样本 t 检验。PCR 灰度比值采用单因素方差分析，两两比较用 LSD 法。

2 结果

2.1 心肌组织病理变化

2.1.1 HE 染色结果 对照Ⅰ组心肌切片可见细胞水肿，细胞质空泡，核周间隙增大，部分核浓缩，横纹不清，间质水肿，大量红细胞渗出，部分区域小灶性坏死及脂肪变，细胞排列稍紊乱，大小不一。转染Ⅰ组核周及细胞质空泡少，纵切面颗粒样改变，横纹不清，间质红细胞渗出少，水肿较轻，细胞排列尚规则。对照Ⅱ组与对照Ⅰ组比较，核周间隙更大，细胞质空泡更明显，可见细胞核浓缩，纵切面横纹不清，部分区域小灶性坏死，间质红细胞渗出，纤维间隙增大，细胞排列紊乱，脂肪变严重。转染Ⅱ组细胞及间质水肿较轻，核周空泡少，纵切面横纹



A 对照Ⅰ组 （×14 000）;B 转染组Ⅰ组 （×17 000）;C 对照Ⅱ组 （×14 000）;D 转染组Ⅱ组 （×17 000）

图 1　各组转染后犬心肌组织超微结构变化 （TEM）

不清,细胞排列尚可,红细胞渗出少,部分区域仍可见脂肪样变。病理改变说明随着心功能的改善,心肌病变有所减轻。而对照组随着起搏时间延长,病变进一步恶化。

2.1.2　**电镜结果(图 1)**　转染组线粒体及间质水肿较对照组轻,而对照组心肌病变进一步恶化。对照Ⅰ组可见肌丝溶解断裂,间隙水肿增宽,线粒体肿胀明显,嵴稀疏、断裂,空化多见,Z 带断裂溶解。转染Ⅰ组肌丝间隙较对照Ⅰ组缩窄,水肿减轻,肌纤维稍肿胀,Z 带断裂溶解,部分肌丝溶解断裂,线粒体水肿减轻,嵴紊乱、部分断裂,可见空泡化。对照Ⅱ组,肌丝溶解明显,排列不规则,间质水肿,线粒体水肿,嵴稀疏、断裂,部分线粒体嵴突完全消失,核周间隙增宽,核糖原消失,Z 带断裂。转染Ⅱ组肌丝排列基本正常,部分肌丝溶解断裂,线粒体轻度水肿,嵴稀疏、断裂,可见空泡。

2.2　心脏超声心动图变化

结果见表 1。经约 3 周起搏后,犬舒张末期左室扩张,容积增加,反映左室收缩功能的 EF 和 FS 明显下降(P 均 <0.01)。基因转染 4 d 时虽然 EF 和 FS 好转,但仍未恢复起搏前水平,EF、LVEDV 和 FS 相比对照组已有改善,而 LVEDD 无变化。基因转染 14 d 时,EF 和 FS 相对转染 4 d 者维持稳定,左室进一步缩小,而与对照Ⅱ组比较,各指标均已有改善。而未转染组 EF 和 FS 有恶化趋势,但无统计意义。

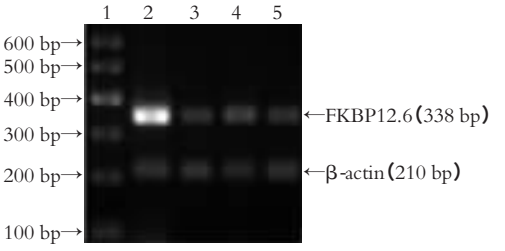
表 1　心脏超声检测各组不同时间犬心功能指标变化($n=7$, $\bar{x}\pm s$)

组别	时间	LVEDD(mm)	LVEDV(ml)	EF(%)	FS(%)
对照Ⅰ组	起搏前	28.3±2.6	43.9±7.1	61.3±5.8	32.5±4.2
	转染前	35.8±3.0[a]	75.5±6.8[a]	33.9±5.1[a]	15.4±3.4[a]
	转染后	35.4±3.8[a]	76.1±8.7[a]	33.3±4.0[a]	14.9±2.9[a]
转染Ⅰ组	起搏前	29.5±2.7	39.7±5.9	66.9±5.4	36.1±3.5
	转染前	37.1±3.4[a]	69.9±8.2[a]	36.4±6.5[a]	16.8±4.1[a]
	转染后	34.7±2.8[a]	65.9±7.3[ac]	56.1±7.3[abc]	29.1±4.3[abc]
对照Ⅱ组	起搏前	29.0±2.8	42.6±8.2	64.9±4.4	35.1±3.5
	转染前	36.4±3.4[a]	74.0±8.3[a]	35.5±5.4[a]	16.5±2.9[a]
	转染后	37.8±3.4[a]	74.4±7.1[a]	32.9±5.0[a]	15.0±3.4[a]
转染Ⅱ组	起搏前	27.4±2.2	40.1±6.1	65.4±6.7	35.3±4.7
	转染前	36.2±2.3[a]	71.3±8.8[a]	32.7±5.1[a]	14.7±3.4[a]
	转染后	33.1±2.6[abc]	60.1±8.4[abc]	54.3±7.2[abc]	28.3±4.9[abc]

LVEDD 为左室舒张末期内径,LVEDV 为左室舒张末期容积,EF 为射血分数,FS 为短轴缩短率。a:$P<0.05$,与起搏前比较;b:$P<0.05$,与转染前比较;c:$P<0.05$,与相应对照组比较

2.3　RT-PCR 结果(图 2)

转染 4 d 时,FKBP12.6 mRNA 表达明显升高,与 β-actin 比值(280±0.33)约为对照Ⅰ组的 3.4 倍,随着时间的延长,FKBP12.6 mRNA 表达降低,在 14 d 时与 β-actin 比值(1.30±0.20)不及 4 d 时的 1/2。而对照Ⅱ组较对照Ⅰ组 FKBP12.6 mRNA 表达略有下降,但无差异[分别为(0.75±0.17)、(0.83±0.19),$P>0.05$]。



1:标准;2:转染Ⅰ组;3:对照Ⅰ组;4:转染Ⅱ组;5:对照Ⅱ组

图 2　各组心肌 FKBP12.6 mRNA 表达情况

3　讨论

FKBP12.6 调控的 RyR2 通道异常在心衰病理生理过程中发挥重要作用。Marx 等[3] 发现,心衰时,虽然蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)表达并没有增加,但由于 PP1(protein phosphatase-1)和 PP2A 减少,致使 RyR2 过度磷酸化,FKBP12.6 从 RyR2 解离;此外,心衰时 FKBP12.6 表达下调[4],两个原因使与 RyR2 结合的 FKBP12.6 减少[4]。FKBP12.6 从 RyR2 解离增加了通道开放的概率[3,4],舒张期 Ca^{2+} 经 RyR2 漏出减少 SR Ca^{2+} 负荷,致使 Ca^{2+} 瞬变降低,心肌收缩乏力。而且 FKBP12.6 从 RyR2 解离还可以让 RyR2 通道收缩时开放和舒张时关闭协调性发生紊乱[10],进一步加重心肌舒缩障碍[3,4]。在体外实验中[5-7],过表达 FKBP12.6 可以修复 RyR2 的缺陷,从而减少 SR Ca^{2+} 外漏,自发性 Ca^{2+} 火花频率、幅度、持续时间、宽度等参数均下降,增加 SR Ca^{2+} 负荷,提高 RyR2 开闭的同步性,进而增加 Ca^{2+} 瞬变,提高细胞质 Ca^{2+} 浓度,

增强心肌收缩。在小鼠心梗心衰模型中，FKBP12.6过表达或增强FKBP12.6与磷酸化RyR2的结合力，可以减缓心脏功能的恶化[11,12]，抑制心脏扩大，而且还可以改善骨骼肌功能[12]。这些结果表明，通过FKBP12.6稳定RyR2，可以改善通道，加强通道耦联的程度，提高兴奋收缩耦联同步性，增强心肌收缩。在本实验，通过超声微泡介导将pcDNA3.1-FKBP12.6质粒转染心衰犬心肌，结果显示，转染可提高FKBP12.6的表达并可改善心功能，逆转心肌重塑，减轻心肌病理改变。

在本实验中，在转染后4 d反映心脏收缩功能指标如EF、FS即出现明显改善，但未恢复至正常水平，而左室大小无变化。转染14 d时LVEDD较对照组缩小，LVEDV减少，而EF、FS跟转染4 d时比较保持稳定。以上结果说明，通过转染可以改善心衰，最少在观察期间仍能从中获益，而心室大小及容积的恢复落后于心功能的恢复，在4 d时LVEDD与对照组无差异，表明心功能的恢复早于心室重塑。

由于转染后心肌收缩力增强，心功能改善使心肌血运、氧供得到部分改善，从而促使其恢复因缺氧和营养物质缺乏所造成的结构和功能损伤。本实验的组织病理学显示 转染4 d时，心肌细胞及间质水肿明显减轻，红细胞渗出减少，超微结果显示线粒体水肿减轻；对照组心肌病理进一步恶化，14 d时较4 d时水肿更明显，并有细胞排列明显紊乱，线粒体出现空泡化，这些改变与心肌功能变化是一致的。这些结果表明，随着心功能的改善，已发生变性的肌纤维会发生逆转，所以我们可以看到，转染14 d时LVEDD缩小。

根据质粒体内表达规律，往往在48 h表达活性最强，本实验选择在蛋白有充分表达时间的第4天进行观察。转染第4天时mRNA表达水平明显提高，而在14 d时表达明显减弱，但较未转染组要高。但根据质粒在体内的衰减规律，在14 d时理应表达极弱[13]，而我们在14 d时仍可见到FKBP12.6高表达，考虑主要是自身表达，我们推测心功能的恢复可以促使心衰FKBP12.6表达上调，提示转染的治疗效果不仅仅限于转染本身。

（致谢：本研究在病理诊断上得到了第三军医大学西南医院病理学研究所阎晓初教授的帮助，在此表示衷心感谢！）

参考文献：

[1] Bers D M. Cardiac excitation-contraction coupling[J]. Nature, 2002, 415(6868):198-205.

[2] Hasenfuss G, Pieske B. Calcium cycling in congestive heart failure[J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(8):951-969.

[3] Marx S O, Reiken S, Hisamatsu Y, *et al*. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts[J]. Cell, 2000, 101(4):365-376.

[4] Yano M, Ono K, Ohkusa T, *et al*. Altered stoichiometry of FKBP12.6 versus ryanodine receptor as a cause of abnormal Ca^{2+} leak through ryanodine receptor in heart failure[J]. Circulation, 2000, 102(17):2131-2136.

[5] Loughrey C M, Seidler T, Miller S L, *et al*. Over-expression of FK506-binding protein FKBP12.6 alters excitation-contraction coupling in adult rabbit cardiomyocytes[J]. J Physiol, 2004, 556(Pt 3):919-934.

[6] Prestle J, Janssen P M, Janssen A P, *et al*. Overexpression of FK506-binding protein FKBP12.6 in cardiomyocytes reduces ryanodine receptor-mediated Ca^{2+} leak from the sarcoplasmic reticulum and increases contractility[J]. Circ Res, 2001, 88(2):188-194.

[7] Gomez A M, Schuster I, Fauconnier J, *et al*. FKBP12.6 overexpression decreases Ca^{2+} spark amplitude but enhances $[Ca^{2+}]$i transient in rat cardiac myocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(5):H1987-H1993.

[8] 刘国通，杨成明. pcDNA3.1-FKBP12.6基因表达载体的构建及扩增[J]. 华南国防医学杂志, 2006, 20(4):16-18,24.

[9] Takagaki M, McCarthy P M, Tabata T, *et al*. Induction and maintenance of an experimental model of severe cardiomyopathy with a novel protocol of rapid ventricular pacing[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 123(3):544-549.

[10] Marx S O, Gaburjakova J, Gaburjakova M, *et al*. Coupled gating between cardiac calcium release channels (ryanodine receptors)[J]. Circ Res, 2001, 88(11):1151-1158.

[11] Huang F, Shan J, Reiken S, *et al*. Analysis of calstabin2 (FKBP12.6)-ryanodine receptor interactions: rescue of heart failure by calstabin2 in mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(9):3456-3461.

[12] Wehrens X H, Lehnart S E, Reiken S, *et al*. Enhancing calstabin binding to ryanodine receptors improves cardiac and skeletal muscle function in heart failure[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(27):9607-9612.

[13] Bekeredjian R, Chen S, Frenkel P A, *et al*. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart[J]. Circulation, 2003, 108(8):1022-1026.

[14] Wehrens X H, Lehnart S E, Reiken S R, *et al*. Protection from cardiac arrhythmia through ryanodine receptor-stabilizing prtein calstabin2[J]. Science, 2004, 304(5668):292-296.

（编辑 邓强庭）