文章编号:1000-5404(2008)12-1129-03

论著

MiRP1对异源转染的CHO细胞上HCN1和HCN2通道电生理特性的调节

佘 强[1],邓松柏[1],Uta C. Hoppe[2] ([1]重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010;[2]德国科隆大学医院心血管内科,德国科隆 50924)

摘 要:目的 评价Mink相关肽1(MiRP1)对异源转染的CHO细胞上的HCN1、HCN2通道电生理特性的影响。**方法** 将MiRP1质粒DNA分别和HCN1、HCN2质粒DNA共转染CHO-K1细胞,用全细胞膜片钳记录细胞膜上的HCN通道电流。**结果** MiRP1显著增加HCN2[(37.8±4.8) pA/pF(n=11) *vs* (25.9±1.7) pA/pF(n=10); −140 mV, P<0.05]的电流密度,但是对HCN1的电流大小没有影响[(41.3±10.9) pA/pF(n=13) *vs* (34.9±7.8) pA/pF(n=11); P>0.05];MiRP1可加快HCN1[时间常数:(180.9±8.6) ms *vs* (306.1±45.6) ms; −80 mV, P<0.05]和HCN2[时间常数:(391.8±33.6) ms *vs* (763.5±106.1) ms; −80 mV, P<0.05]激活动力学;MiRP1对HCN1及HCN2通道激活的电压依赖性没有影响。**结论** MiRP1可加快HCN1和HCN2通道激活,且增加HCN2的电流表达。

关键词: HCN1通道;HCN2通道;膜片钳;Mink相关肽1
中图法分类号: R322.11;R329.25;R331.38 **文献标识码:** A

MiRP1 regulates electrophysiological properties of HCN1 and HCN2 in CHO cells *in vitro*

SHE Qiang[1], DENG Song-bai[1], Uta C. Hoppe[2] ([1]Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; [2]Department of Cardiology, Cologne University, Cologne 50924, Germany)

Abstract: Objective To investigate the modulation of electrophysiological properties of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN) HCN1 and HCN2 by transfecting MinK-related peptide 1 (MiRP1) in Chinese hamster ovarian (CHO) cells. **Methods** CHO cells were co-transfected with plasmid DNA encoding either of the cardiac HCN isoforms (HCN1, HCN2) with MiRP1 to observe the effect of MiRP1 on HCN whole-cell currents. Whole-cell patch clamp technique was used to record the 2 channel currents of the transfected cells. **Results** MiRP1 significantly increased whole-cell current density of HCN2 [(37.8±4.8) pA/pF(n=11) *vs* control (25.9±1.7) pA/pF(n=10); at −140 mV, P<0.05], while not affecting HCN1 current density [(41.3±10.9) pA/pF(n=13) *vs* control (34.9±7.8) pA/pF(n=11); P>0.05]. Moreover, MiRP1 accelerated the activation kinetic of HCN1 [tau (180.9±8.6) ms *vs* control (306.1±45.6) ms; at −80 mV, P<0.05] and HCN2 [tau (391.8±33.6) ms *vs* control (763.5±106.1) ms; at −80 mV, P<0.05]. But MiRP1 did not affect voltage dependence of HCN1 and HCN2 channel activation. **Conclusion** MiRP accelerates HCN1 or HCN2 channel activation kinetics, and leads to increase of HCN2 current density.

Key words: hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels 1; hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels 2; patch clamp; MinK-related peptide 1

在通过窦房结细胞中存在超极化激活的环核苷酸门控的阳离子通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels, HCN)的3种亚型HCN1、HCN2和HCN4,这些离子通道的功能对心率的调节至关重要[1]。MiRP1(MinK-Related Peptide 1)作为单个跨膜螺旋蛋白家族的成员之一,有调控多种电压门控的钾离子通道如HERG, KCNQ1/2, 及Kv4等的电生理特性[2]。近来报道,MiRP1对HCN通道也有调节作用,可是有的作者认为MiRP1可增加HCN通道的电流幅度,并加快其激活动力学;而有的研究结果却相

作者简介:佘 强,男,重庆市人,教授,主要从事基础及临床电生理方面的研究。电话:13508393602, E-mail: qshe98@hotmail.com, 注:课题实验部分在德国科隆大学心电生理室完成

收稿日期:2007-11-30;修回日期:2008-03-18

反[3,4]。本研究将 MiRP1 分别和 HCN1,HCN2 共转染到 CHO 细胞中,以进一步评价 MiRP1 对 HCN1 及 HCN2 通道电生理特性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pAdCGI-HCN1、pAdCGI-HCN2、pAdCRI-KCNE2 和 CHO-K1 细胞由德国科隆大学细胞电生理室提供。Lipofectamine Plus 为 Invitrogen 公司产品;DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶等购自美国 Gibco 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞转染 转染前 24 h,把 CHO-K1 细胞以 2.0×10^5/35 mm^2 的密度种植。按厂商提供的 Lipofectamine Plus 技术用 0.25 μg/孔的 HCN 通道质粒 DNA(pAdCGI-HCN1 或 pAdCGI-HCN2)分别转染 CHO-K1 细胞,同时将 pAdCGI-HCN1,pAdCGI-HCN2 分别和 0.5 μg/孔的 pAdCRI-KCNE2 质粒 DNA 对细胞进行共转染。4 h 后,正常介质取代转染介质[5]。

1.2.2 全细胞膜片钳记录 用标准微电极全细胞膜片钳技术在温室(21~23 ℃)条件下进行实验。用 Axopatch 200B 放大器和计算机 Digidata 1200 界面(Axon instruments, Foster City, CA, USA)对电流进行记录和数字化转模,同时以 10 kHz 选样及 2 kHz 过滤。记录用的细胞外液:KCl 5 mmol/L, NaCl 135 mmol/L, $CaCl_2$ 2 mmol/L,Glucose 10 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L 组成,其 pH 用 NaOH 调定至 7.4。电极内液:K-glutamate 130 mmol/L, KCl 15 mmol/L, NaCl 5 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, Mg-ATP 5 mmol/L 组成,其 pH 用 KOH 调定至 7.3。当硼硅玻璃微电极充满内部记录液时,其尖端电阻为 2~4 MΩ。

保持电位为 -40 mV,超极化电压从 -30 mV 到 -150 mV,阶跃为 -10 mV,持续时间为 3 s。超极化起始的电流与超极化终末的电流之差作为超极化激活的电流幅度。电流幅度除与电容为电流密度(Id), 其电导:$g = I/(V_m - V_{rev})$。其中,I 是电流幅度,V_m是膜电位,V_{rev}是反转电位。用 g/g_{max}将电流标准化(g_{max}是最大电导值),即得到电流的稳态激活曲线,此曲线可用 Bolt-zmann 方程进行拟合:$g/g_{max} = 1/\{1+\exp[(V_{1/2} - V_M)/S]\}$。$V_M$是膜电位,$V_{1/2}$是膜达到 1/2 最大激活时的电位,S 是倾斜因子。电流的激活动力学曲线由对电流进行单指数拟合而得到。

1.2.3 统计学处理 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据的统计分析及曲线的拟合均在统计软件 Origin 7.0 上完成。

2 结果

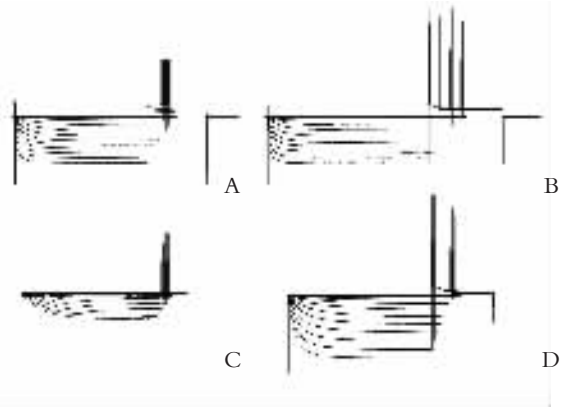
2.1 MiRP1 对 HCN1 和 HCN2 电流大小的影响

无论是在单独转染 HCN1,还是 HCN1 和 MiRP1 共转染的 CHO 细胞中,均能检测到电流的表达,但其电流密度没有明显差异($P>0.05$)。而 HCN2 和 MiRP1 共转染的细胞中,所检测到的电流密度,显著大于单独的 HCN2 转染细胞中的电流密度($P<0.05$)(表 1,图 1)。

表 1 不同 HCN 通道电流的各参数比较($\bar{x}\pm s$)

HCN 通道	n	Id (pA/pF) at -140 mV	Tau(ms) at -80 mV	$V_{1/2}$ (mV)	S
HCN1	11	34.9±7.8	306.1±45.6	-103.2±3.3	23.5±1.9
HCN1+MiRP	13	41.3±10.9	180.9±8.6[a]	-102.3±4.3	24.1±1.4
HCN2	10	25.9±1.7	763.5±106.1	-111.2±2.2	13.4±0.8
HCN2+MiRP	11	37.8±4.8[b]	391.8±33.6[b]	-116.1±2.9	13.2±0.5

a: $P<0.05$, 与 HCN1 组比较; b: $P<0.05$, 与 HCN2 组比较



A: 单独转染 HCN1; B: 共转染 HCN1 及 MiRP1; C: 单独转染 HCN2; D:共转染 HCN2 及 MiRP1

图 1 转染 HCN 及 MiRP1 基因后 CHO 细胞膜上电流曲线

2.2 MiRP1 对 HCN1 和 HCN2 激活动力学的影响

无论是 MiRP1 和 HCN1 还是 MiRP1 和 HCN2 共转染后,其代表通道激活动力学的指标:激活时间常数(Tau)均较单独转染时明显减小($P<0.05$,表 1)。

2.3 MiRP1 对 HCN1 和 HCN2 通道激活的电压依赖性的影响

从稳态激活曲线中发现,无论是半时激活电压($V_{1/2}$)还是倾斜因子(S),在 HCN1 与 HCN1+MiRP 两组之间,以及在 HCN2 与 HCN2+MiRP 两组之间均无显著差异($P>0.05$)(表 1,图 2,3)。

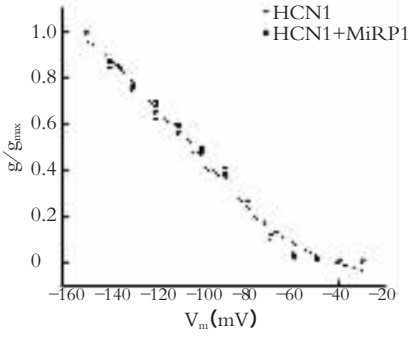


图 2 HCN1 激活曲线

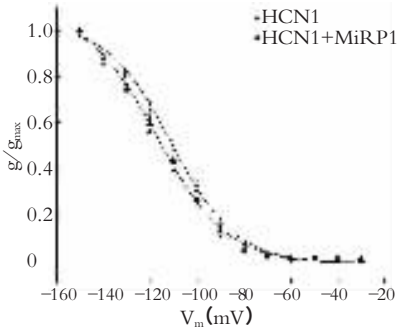


图 3　HCN2 激活曲线

3　讨论

超极化激活环核苷酸门控阳离子通道(HCN)是起搏电流(If)的分子成分,最先发现于心脏窦房结,后广泛发现于心脏和神经组织,至今已克隆出 4 种不同的 HCN 通道亚型:HCN1-HCN4。HCN 在细胞膜超激化时激活,呈电压依赖性,对 Na^+ 和 K^+ 均具有通透性,受 CAMP 调控, 是许多心、脑细胞自律性的形成和调节重要的离子通道[6]。许多研究表明 HCN 通道异源表达不能完全复制许多细胞中天然的 If,提出可能存在调节性的辅助亚单位。KCEN 基因家族是电压门控的阳离子通道的 β 亚单位,和相应的 α 压单位结合而调控通道的特性。MiRP1(KCEN2)是 KCEN 家族的主要成员,作为辅助亚单位调节多种钾离子通道电流,如 Ikr、Iks、I_{to} 等,已经证实 MiRP1 的变异和先天性的长 QT 综合征密切相关[7,8]。近来研究表明 MiRP1 在窦房结组织中高度表达,促使人们去探寻是否 KCNE2 能调控 HCN 的功能,进而调控心脏节律。Yu 等[9]报道当 MiRP1 和 HCN1、HCN2 共同注射到 oocytes 中可提高 HCN1、HCN2 表达水平及其激活动力学。可是,Proenza 等[10]却研究发现 MiRP1 和 HCN2 共转染到 CHO 细胞中,减小而不是增加 HCN2 的电流密度。我们的研究发现,MiRP1 有增加 HCN1 电流密度的趋势,但没有统计学差异($P > 0.05$);MiRP1 却显著增加了 HCN2 的电流密度($P < 0.05$)。

我们进一步研究发现,尽管 MiRP1 未见明显增加 HCN1 电流密度,但却使该通道激活显著加快,同时没有影响其激活的电压依赖关系。而 MiRP1 除了增加 HCN2 的电流密度外,还加快通道的激活,但从稳态激活曲线分析,它也未改变通道激活的电压依赖性。我们的研究结果说明了 MiRP1 作为 β 亚单位,有调节 HCN1、HCN2 通道电生理特性的作用。其机制可能是 MiRP1 提高了 HCN 通道的膜蛋白水平[8]。本研究提示单纯的转染 HCN1 或 HCN2 不能完全复制天然的 If 电流,可能是因为在神经元或心肌组织中存在 MiRP1 蛋白成分;许多病理状态下 HCN1 和 HCN2 通道的激活动力学改变推测与细胞膜表面的 MiRP1 变化有关;预期可以通过抑制或阻断心肌细胞膜表面的 MiRP1 的作用来治疗因为 HCN2 导致的某些心律失常。本研究结果的另一重要意义是为窦房结的起搏机制的阐明提供了新的线索,MiRP1 可能是心脏起搏心律的重要调节剂。

本研究和国外有的作者的研究结果存在差异,推测有以下几方面原因:一是使用了不同的表达系统;二是共转染质粒的量的比例不一样, MiRP1 与 HCN1 或 HCN2 的比例本研究是采用 2∶1,有的研究使用 1∶1;三是应用膜片嵌测定电流时使用的细胞内液和细胞外液的 Cl^- 和 K^+ 浓度不一样,本研究使用的细胞外液是低浓度的 K^+,细胞内液是中等浓度的 Cl^-,而有作者使用的高 K^+ 浓度的细胞外液和低 Cl^- 浓度的细胞内液[10]。具体原因尚需进一步研究证实。

参考文献:

[1] DiFrancesco D, Borer J S. The funny current: cellular basis for the control of heart rate[J]. Drugs, 2007, (67 Suppl 2): 15 - 24.

[2] Um S Y, McDonald T V. Differential Association between HERG and KCNE1 or KCNE2 [J]. PLoS ONE, 2007, 2(9): e933.

[3] Craven K B, Zagotta W N. CNG and HCN channels: two peas, one pod[J]. Annu Rev Physiol, 2006, 68: 375 - 401.

[4] Pourrier M, Schram G, Nattel S. Properties, expression and potential roles of cardiac K^+ channel accessory subunits: MinK, MiRPs, KChIP, and KchAP[J]. J Membr Biol, 2003, 194(3): 141 - 152.

[5] Er F, Larbig R, Ludwig A, *et al*. Dominant-negative suppression of HCN channels markedly reduces the native pacemaker current I(f) and undermines spontaneous beating of neonatal cardiomyocytes[J]. Circulation, 2003, 107(3): 485 - 489.

[6] Barbuti A, Baruscotti M, DiFrancesco D. The pacemaker current: from basics to the clinics[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 2007, 18(3): 342 - 347.

[7] Qu J H, Kryukova Y, Potapova I A, *et al*. MiRP1 modulates HCN2 channel expression and gating in cardiac myocytes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(42): 43497 - 43502.

[8] Lewis A, McCrossan Z A, Abbott G W. MinK, MiRP1, and MiRP2 diversify Kv3. 1 and Kv3. 2 potassium channel gating[J]. J Biol Chem, 2004, 279(9): 7884 - 7892.

[9] Yu H, Wu J, Potapova I, *et al*. Mink-related peptide 1: A beta subunit for the HCN ion channel subunit family enhances expression and speeds activation[J]. Circ Res, 2001, 88(12): E84 - E87.

[10] Proenza C, Angoli D, Agranovich E, *et al*. Pacemaker channels produce an instantaneous current[J]. J Biol Chem, 2002, 277(7): 5101 - 5109.

(编辑　王　红)