论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1346-03

大鼠心肌梗死后HCN表达的变化及普伐他汀的干预

刘廷容[1],佘 强[1],吴雪晖[2] ([1]重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010;[2]第三军医大学西南医院骨科,全军矫形外科中心,重庆 400038)

摘 要:目的 了解急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后心室肌HCN2、HCN4的mRNA和蛋白质表达的变化趋势,探讨普伐他汀对AMI后心室肌HCN2、HCN4变化的影响。**方法** 通过结扎大鼠左冠状动脉前降支建立AMI模型,将存活的20只大鼠按随机数字表法分为24 h组、1周组、4周组和普伐他汀组,每组5只,同时于各时间点均设立假手术组,每组5只。取右室心肌组织样本,用Real-time PCR检测HCN2、HCN4 mRNA的表达,用Western blot检测HCN2、HCN4蛋白质表达。**结果** 4周组和普伐他汀组HCN2 mRNA及蛋白质表达,HCN4 mRNA表达均高于假手术组($P<0.05$);普伐他汀组HCN2 mRNA及蛋白质表达明显低于4周组($P<0.05$)。各组均未检测到HCN4蛋白质表达。**结论** AMI后4周心室肌HCN2、HCN4表达增高;普伐他汀能抑制AMI后HCN2表达的上调,而对HCN4无明显影响。

关键词: 心肌梗死;普伐他汀;起搏电流

中图法分类号: R394.2;R542.22;R972 **文献标识码:** A

Effect of pravastatin on expression of HCN channel in post-myocardial infarction rats

LIU Ting-rong[1], SHE Qiang[1], WU Xue-hui[2] ([1]Department of Cardiology, The Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, [2]Department of Orthopaedics, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of pravastatin on the expressions of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel subunits, HCN2 and HCN4 of right ventricular after myocardial infarction (MI) in rats. **Methods** Sprague-Dawley rats MI model was induced by ligating the left anterior descending coronary artery, and then 20 MI rats were randomly and equally divided into 24-hour group, 1-week group, 4-week group and pravastatin group (20 mg·kg^{-1}·d^{-1} for 4 weeks by gavage). Another 5 rats served as sham-operation group. Real-time PCR and Western blotting were used to measure the mRNA and protein expressions of HCN2 and HCN4 in the heart tissues of each group. **Results** The mRNA and protein expressions of HCN2, and mRNA expression of HCN4 were up-regulated in 4-week group and pravastatin group compared with sham-operation group. The expression of HCN2 in pravastatin group were markedly attenuated compared with 4-week group. The protein expression of HCN4 was not detected in all groups. **Conclusion** The expression of HCN2 and HCN4 were up-regulated in myocardial infarction rats. Pravastatin may reverse the up-regulated expressions of HCN2 at mRNA and protein levels.

Key words: myocardial infarction; pravastatin; pacemaker current

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, 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。心肌细胞离子通道分子结构研究表明超极化激活环核苷酸门控(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated, HCN)阳离子通道亚单位为编码心脏起搏电流(funny current, If)的基因,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。HCN亚单位的表达异常也可能导致心肌细胞的电不稳定性而诱发心律失常。近来研究报道他汀类药物具有抗心律失常的作用,但其具体机制尚不明确。本研究通过检测AMI后右室心肌HCN2、HCN4的mRNA和蛋白质

作者简介:刘廷容,女,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事冠心病方面的研究。E-mail:rrliu009@sina.com

通信作者:佘 强, E-mail:qshe98@hotmail.com

收稿日期:2007-10-30;修回日期:2008-01-22

表达的变化趋势,以及普伐他汀对 HCN2、HCN4 表达的影响来探讨其抗心律失常的可能机制。

1　材料与方法

1.1　主要材料

小动物呼吸机(TKR-20 ℃)购自湖北省特力麻醉呼吸设备有限公司,普伐他汀(商品名:美百乐镇)购自上海三共制药有限公司,ShineSYBR Real Time qPCR Mastermix 试剂盒购自上海闪晶生物公司,RIPA 全蛋白提取液购自上海申能博彩公司,兔抗大鼠 HCN2、HCN4 一抗及辣根过氧化酶标记的羊抗兔二抗(1∶1 000) 购自 CHEMICON 公司。

1.2　动物模型的制备、分组及取材

健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体质量 200 ~ 250 g,购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心。大鼠称质量后用 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 I、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。术后存活的 20 只大鼠按照随机数字表法分为 AMI 24 h 组、1 周组、4 周组和普伐他汀组(20 mg · kg^{-1} · d^{-1},灌胃给药 4 周),每组 5 只。假手术组大鼠共 15 只为左冠状动脉前降支只穿线不打结,术后随机分到前述 3 个时间点,每个时间点 5 只。术后单笼饲养,并给予青霉素(30 万 U/d × 3 d)腹腔注射预防感染。除普伐他汀组外其余各组均以等量生理盐水灌胃。于各时间点以 10% 水合氯醛麻醉大鼠后迅速开胸取出心脏。剪取右心室于预冷的生理盐水冲洗后 DEPC 水漂洗,然后均分为 2 份,装于冻存管置液氮中保存备用。

1.3　采用 SYBR Green Ⅰ荧光定量 PCR 检测 HCN2、HCN4 mRNA 的表达

1.3.1　引物设计　　使用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物,HCN2 上游引物:5′-CTGGACCCCGAAAAGATAAAG-3′,下游引物:5′-TTGGTGAAACGCACGATGC-3′,长度 161 bp;HCN4 上游引物:5′-CGACTACTACGAACACCGCTACC-3′,下游引物:5′-GGCTGAAAGACCTCAAAACGC-3′,长度 198 bp;β-actin 上游引物:5′-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3′,下游引物:5′-TTTA-ATGTCACGCACGATTTC-3′,长度 150 bp。

1.3.2　HCN2、HCN4 的 mRNA 相对表达量测定　　取冻存心肌 50 mg,用 Trizol 试剂提取总 RNA(具体步骤参见试剂说明书)。取 5 μl 总 RNA 逆转录成 30 μl cDNA(反应条件:25 ℃ 10 min,40 ℃ 60 min,70 ℃ 10 min)。扩增目的基因和管家基因(反应参数:93 ℃ 2 min,93 ℃ 5 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s,共 40 个循环),其产物进行梯度稀释,用于标准曲线绘制。按照 ShineSYBR Real-time PCR Mastermix 试剂盒说明书进行荧光定量扩增目的基因和管家基因(扩增条件:94 ℃ 4 min,94 ℃ 15 s,60 ℃ 25 s,72 ℃ 25 s,共 40 个循环)。根据 Ct 值读出起始模板量后计算出目的基因的相对拷贝数。

1.4　免疫印迹法测定 HCN2、HCN4 蛋白质表达量

取心肌组织约 100 mg 碾碎,按 100 mg/ml 加入 RIPA 全蛋白提取液,加入 10 μl PMSF 冰上匀浆 30 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min,取上清 20 μl 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,其余上清加入等量上样缓冲液 70 ℃加热 10 min。以 10% 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 2 h 后弃去封闭液,加入一抗,封闭袋中 37 ℃,60 r/min 摇动 90 min,弃去一抗,用 TBS 洗涤 10 min × 3 次。弃去 TBS,加入二抗 37 ℃ 孵育 1 h,弃去二抗,用 TBS 洗涤 10 min × 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。

1.5　统计学处理

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 及蛋白质表达量均数比较采用方差分析,用 q 检验进行组间两两多重比较。

2　结果

2.1　HCN2、HCN4 mRNA 表达水平的变化

经比较发现假手术 24 h 组、1 周组及 4 周组大鼠右室心肌 HCN2、HCN4 mRNA 表达差异没有统计学意义($P > 0.05$),故以 4 周时间点的假手术组用于比较分析。24 h 组和 1 周组 HCN2、HCN4 mRNA 表达水平较假手术组无明显变化($P > 0.05$),4 周组和普伐他汀组 HCN2、HCN4 mRNA 水平明显高于假手术组($P < 0.01$),普伐他汀组 HCN2 mRNA 较心肌梗死 4 周组显著降低($P < 0.05$,表 1)。

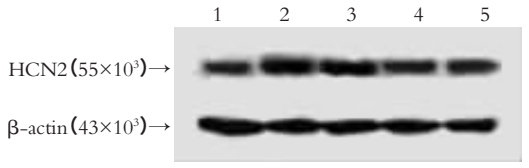
表 1　不同时间点 HCN2、HCN4 mRNA 的表达

组别	HCN2	HCN4
假手术组	1.19 ± 0.22	0.20 ± 0.03
24 h 组	1.66 ± 0.35	0.21 ± 0.03
1 周组	1.75 ± 0.28	0.22 ± 0.02
4 周组	4.18 ± 0.45[a]	0.27 ± 0.03[a]
普伐他汀组	3.65 ± 0.40[ab]	0.26 ± 0.01[a]

a:$P < 0.01$,与假手术组比较;b:$P < 0.05$,与 4 周组比较

2.2　HCN2、HCN4 蛋白质表达水平的变化

假手术各时间点 HCN2 蛋白质表达无统计学差异($P > 0.05$),仍用 4 周时间点进行比较分析。HCN2 蛋白质表达 24 h 组(0.74 ± 0.15)、1 周组(0.82 ± 0.09)与假手术组(0.59 ± 0.21)相比无明显变化($P > 0.05$),4 周组(1.39 ± 0.15)和普伐他汀组(1.07 ± 0.08)均明显高于假手术组($P < 0.01$),但普伐他汀组较 4 周组明显降低($P < 0.05$)。各组均未检测到 HCN4 蛋白质表达(图 1)。



1:假手术组; 2:普伐他汀组; 3:4 周组; 4:1 周组; 5:24 h 组

图 1 Western blot 检验 HCN2 蛋白质的表达

3 讨论

If 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,也有少量的 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[1]。近年研究表明在心衰、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 通道表达下调而右心房 HCN4 表达明显升高,这可能是导致房性心律失常的原因[2];心衰时心室肌的 If 表达增高,Lai 等[3]认为这种 If 电流的过表达可能与室性心律失常的发生有关。

目前对于 AMI 的研究大多数都在关注左心室的改变,而在左心室梗死后右心室的代偿功能也发挥了重要的作用,同样它也存在着基因表达的变化,右心室的改变对心脏疾病的预后判断起着同样重要的作用[4]。既往研究[5,6]表明 AMI 后左心输出量下降激活神经内分泌系统、增高肺循环压力均能导致右心室肥厚,肥厚的心肌细胞 HCN 通道密度是增加的。本研究结果提示 AMI 后右心室心肌细胞 HCN2、HCN4 的表达是增加的。导致 HCN 通道表达增加的可能机制是:①AMI 后肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活,血浆血管紧张素Ⅱ、醛固酮分泌增加,醛固酮可以通过盐皮质激素受体上调 HCN 基因的表达[7]。②AMI 后由于右心功能代偿引起长期充盈压增高可导致 HCN mRNA 表达增加。③AMI 后心肌肥厚引起 HCN 通道密度增加。HCN 通道的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。

近年来 3-羟-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶抑制剂即他汀类药物由于其具有调脂以外的多种作用受到了广泛的关注。研究表明[8-11]他汀类药物有抗交感神经活性、下调血管紧张素Ⅱ水平的作用。本研究运用普伐他汀后 HCN2 的表达降低,其机制是否与他汀降低血浆血管紧张素Ⅱ、醛固酮水平而削弱了盐皮质激素受体对 HCN2 的上调作用有关,有待进一步研究。普伐他汀的抗心律失常作用可能与逆转 HCN2 的上调,从而稳定心肌细胞的自律性有关。本研究各组均未检测到 HCN4 蛋白质表达,可能原因是其在心室肌中的表达太低(仅占总 HCN 的 7%),因此,他汀对它的作用也不明显。

本研究探讨了 AMI 后右心室 HCN 表达的变化趋势及普伐他汀对 HCN 通道的影响,这对进一步研究他汀类药物抗心律失常的机制有一定的意义。不足之处在于未能从电生理角度观察 HCN 通道编码的 If 电流的变化,未能对其变化进行更长时间的随访。

参考文献:

[1] 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.

[2] Zicha S, Fernandez-Velasco M, Lonardo 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.

[3] Lai L P, Su M J, Lin J L, *et al*. Measurement of funny current (If) channel mRNA in human atrial tissue: correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation[J]. J Cardiovasc Electrophysiol, 1999, 10(7): 947-953.

[4] Yu C M, Sanderson J E, Chan S, *et al*. Right ventricular diastolic dysfunction in heart failure[J]. Circulation, 1996, 93(8): 1509-1514.

[5] Stilli D, Sgoifo A, Macchi E, *et al*. Myocardial remodeling and arrhythmogenesis in moderate cardiac hypertrophy in rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(1): H142-H150.

[6] Fernandez-Velasco M, Goren N, Benito G, *et al*. Regional distribution of hyperpolarization-activated current (If) and hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel mRNA expression in ventricular cells from control and hypertrophied rat hearts[J]. J Physiol, 2003, 553(Pt 2): 395-405.

[7] Muto T, Ueda N, Opthof T, *et al*. Aldosterone modulates I(f) current through gene expression in cultured neonatal rat ventricular myocytes [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(5): H2710-H2718.

[8] Lee T M, Lin M S, Chou T F, *et al*. Effect of pravastatin on development of left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289(1): H220-H227.

[9] Lee T M, Lin M S, Tsai C H, *et al*. Effect of pravastatin on left ventricular mass in the two-kidney, one-clip hypertensive rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(6): H2705-H2713.

[10] Morikawa-Futamatsu K, Adachi S, Maejima Y, *et al*. HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin prevents angiotensin II-induced cardiac hypertrophy *via* Rho kinase and inhibition of cyclin D1[J]. Life Sci, 2006, 79(14): 1380-1390.

[11] 叶 强, 覃 数, 雷 寒, 等. 辛伐他汀抑制心肌梗死后心肌细胞凋亡及改善心功能的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(4): 407-409.

(编辑 张 维)