基础研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1779-03

盐酸曲美他嗪对大鼠缺血心室肌 Ito 通道 α 亚单位表达影响的研究

向玉鸾,何 莉,佘 强
(重庆医科大学附属第二医院心血管内科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究盐酸曲美他嗪(Trimetazidine,TMZ)对急性心肌梗死大鼠血浆游离脂肪酸(Free fatty acid,FFA)浓度和左心室梗死周边区心室肌瞬时外向钾电流(Transient outward current,Ito)通道 α 亚单位(Kv4.2、Kv4.3 和 Kv1.4)表达变化的影响。方法:通过结扎大鼠左冠状动脉前降支建立心梗模型,将存活的 26 只大鼠按随机数字表分为急性心梗组和 TMZ 组,每组 13 只,同时设立假手术组,10 只。4 周后取左室梗死周边区心肌组织,分别用 Real-time PCR 和 Western blot 检测 Kv4.2、Kv4.3、Kv1.4 mRNA 和 Kv4.2、Kv4.3、Kv1.4 蛋白质表达,同时取全血用比色法测血浆 FFA 浓度。结果:急性心梗组血浆 FFA 浓度和 Kv1.4 基因表达水平高于假手术组($P<0.05$),而 Kv4.2、Kv4.3 基因表达较假手术组降低($P<0.05$);TMZ 组血浆 FFA 浓度和 Kv1.4 基因表达与心梗组相比降低($P<0.05$),而 Kv4.2、Kv4.3 基因表达水平较心梗组升高($P<0.05$),接近于假手术组。结论:急性心梗后 4 周梗死周边区心肌 Kv4.2、Kv4.3 基因表达降低,Kv1.4 基因表达和血浆 FFA 浓度增高,TMZ 可能通过降低心梗后血浆 FFA 浓度,逆转其 Ito 通道 α 亚单位表达的改变。

【关键词】急性心肌梗死;瞬时外向钾电流;盐酸曲美他嗪
【中国图书分类法分类号】R394.2;R542.22;R972.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-07-02

Effect of trimetazidine on expression of Ito channel a subunit in ischemic myocardium of rat

XIANG Yu-luan, et al
(*Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of trimetazidine on serum FFA and the expressions of transient outward current (Ito) channel a subunits-Kv1.4, Kv4.2 and Kv4.3 of right ventricule after acute myocardial infarction (AMI) in rats. *Methods*: Sprague-Dawley rats AMI model was induced by ligating the left anterior descending coronary artery, and then 26 AMI rats were randomly and equally divided into AMI group and trimetazidine group (60 mg/(kg·d) for 4 weeks by gavage). Another 10 rats served as sham operation group. Colorimetry was used to measure the serum FFA. Real-time PCR and Western blotting were used to measure the mRNA and protein expressions of Kv1.4, Kv4.2 and Kv4.3 in the heart muscles of each group. *Results*: The mRNA and protein expressions of Kv1.4, and the content of FFA were up-regulated in AMI group compared with sham operation group. The mRNA and protein expressions of Kv4.2 and Kv4.3 were down-regulated in AMI group compared with sham operation group .The expression of Kv1.4 and the content of FFA in trimetazidine group were decreased compared with AMI group. The mRNA and bprotein expressions of Kv4.2 and Kv4.3 were increased compared with AMI group. *Conclusion*: The expression of Kv1.4 and the content of FFA were up-regulated, and Kv4.2, Kv4.3 were down-regulated in myocardial infarction rats. Trimetazidine may reverse the changes of expression of Ito channel a subunit.

【Key words】Myocardial infarction; Transient outward current; Trimetazidine

致命性室性心律失常是急性心肌梗死(Acute myocardial infarction,AMI)早期最严重的并发症之一,也是心源性猝死的主要原因。AMI 后梗死周边区心肌离子通道的改变对心律失常的发生具有关键作用。

作者介绍:向玉鸾(1981-),女,硕士,
研究方向:临床及心脏电生理研究。
通讯作者:佘 强,男,教授,E-mail:qshe98@hotmail.com。
基金项目:国家自然科学基金(编号:30971213);重庆市卫生局重点项目(编号:2009-1-13);重庆医科大学校级重点科研课题(编号:XBZD201010)。

大鼠心室肌中瞬时外向钾电流(Transient outward current,Ito)通道 α 亚单位主要由 Kv1.4、Kv4.2 及 Kv4.3 蛋白构成。Ito 在心肌动作电位的快速复极中起重要作用,其亚单位基因表达改变可诱导心律失常的发生。近年来发现,AMI 时心肌处于缺血缺氧环境,血浆游离脂肪酸(Free fatty acid,FFA)浓度和其中间代谢产物长链脂肪酸氧化增加,尤其是棕榈酰肉碱和棕榈酰辅酶 A 积聚,它们直接抑制 Ito 电流和影响其 α 亚单位的表达[1]。盐酸曲美他嗪(Trimetazidine,TMZ)是临床上常用的抗心肌缺血药物,已有研究证实 TMZ 能抑制棕榈酰肉碱氧化从而抑制长链脂肪酸氧化[2],但 TMZ 对心脏离

子通道影响的相关研究尚未见报到。本实验通过检测 TMZ 干预 AMI 后，心肌梗死周边区心肌 Ito 通道 α 亚单位 Kv1.4、Kv4.2 及 Kv4.3 基因表达以及 FFA 浓度，探讨 TMZ 对缺血心肌 Ito 通道 α 亚单位基因表达的影响以及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

清洁级健康 Sprague-Dawley(SD)大鼠，8 周龄，质量 200～250 g，购自重庆医科大学实验动物中心，小动物呼吸机(TKR-200C)购自湖北省特力麻醉呼吸设备有限公司，盐酸曲美他嗪片(规格：20 mg；批号：H20055465，天津施维雅制药有限公司)，RNAiso Plus、RT 及 PCR 试剂盒购自 Biomed 公司，RIPA 全蛋白提取液购自碧云天生物技术研究所，兔抗大鼠 Kv1.4、Kv4.2、Kv4.3，0.8 mg/ml 购自 Millipore 公司，辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:1 000)购自北京中杉金桥生物公司。引物设计：Kv1.4，上游引物：5'-GCAGTCAGTTGCCCATACC-3'，下游引物：5-TCCCTTTCCCTGACACTTC-3'，长度 152 bp；Kv4.2，上游引物：5-CTCTCTGAGCGGAGTCTTGG-3'，下游引物：5-TCGTTTGTCCGCTCGTTG-3'，长度 97 bp；Kv4.3，上游引物：5'-CGTCTTTGCCACTGTGATGT-3'，下游引物：5'-TCGGCACCATGTCTCCATAC-3'，长度 128 bp。GAPDH 上游引物：5-AGTCCACTGGCGTCTTCA-3'，下游引物：5'-CGGACTTCTCATGGTTCACAC-3'，长度 132 bp；由上海生物工程公司合成。

1.2 动物模型的制备、分组及取材

1.2.1 急性心肌梗死大鼠模型的建立、分组 大鼠称质量后，用 10%水合氯醛(30 mg/kg)腹腔注射麻醉，成功麻醉后建立心电图监测，气管插管呼吸机控制呼吸。以第 3、4 肋为中心沿左侧胸骨旁纵行切口，依次切开皮肤、皮下组织，钝性分离胸大肌和前锯肌，近胸骨缘处剪断第 3 肋软骨，钝性分离肋间肌进胸，显露心脏，剪开心包。在左心耳下缘与肺动脉圆锥间距主动脉根部约 2～3 mm 处，以左冠状静脉为标志，用 7-0 眼科无创缝合针穿过前降支深部，结扎左前降支。心梗模型复制成功标志为部分左心室前壁及心尖部颜色变苍白、搏动减弱以及心电图肢导联 ST 段弓背向上抬高持续 0.5 h 以上作为梗塞模型复制成功的标志。检查心脏无出血后逐层关胸，待大鼠自主呼吸恢复后拔除气管插管。术毕腹腔内注射青霉素(30 万 U/d×3 d)预防感染，室温下苏醒[3]。术后存活的 26 只 AMI 大鼠按照随机数字表法分为 AMI 组和 AMI+TMZ 组，每组 13 只，假手术组(sham 组)大鼠 10 只，为左冠状动脉前降支只穿线不结扎。AMI+TMZ 组术后立即予 TMZ 10 mg/(kg·d)灌胃，假手术组和急性心梗组给予相同体积的生理盐水灌胃。饲养 4 周后取材，3 组均为单笼饲养。

1.2.2 取材 AMI 成模 4 周后，10%水合氯醛(30 mg/kg)腹腔注射麻醉各组大鼠后迅速开胸取出心脏，AMI 组和 AMI+TMZ 组取左心室梗死周边区心肌组织于预冷的生理盐水冲洗后，二乙基焦碳酸脂(Diethypyrocarbonate，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 Kv1.4、Kv4.2、Kv4.3 mRNA 的相对表达量测定

取冻存心肌 100 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：65℃ 5 min，42℃ 60 min，95℃ 10 min)。扩增 Kv1.4、Kv4.2 基因和管家基因(反应参数：预变性 94℃ 2 min，变性 94℃ 15 s，退火 60℃ 20 s，延伸 72℃ 30 s，共 40 个循环)，扩增 Kv4.3(反应参数：预变性 94℃ 2 min，变性 94℃15 s，退火 64℃ 20 s，延伸 72℃ 30 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 fermentas 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 Western blot 法检测 Kv1.4、Kv4.2、Kv4.3 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 苯甲基磺酰(Phenylmethanesulfonyl fluoride，PMSF)冰上匀浆 30 min，4℃ 12 000 r/min 离心 30 min，取上清 20 μl 用二喹啉甲酸(Bicinchoninic acid，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，其余上清加入适量上样缓冲液 70℃加热 10 min。以 8% 十二烷基硫酸钠－聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 Kv1.4、Kv4.2、Kv4.3 蛋白，电转移蛋白至聚偏氟乙烯膜上，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，用叔丁基二甲基硅烷(t-butyldimethylsilyl，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(Enhanced chemiluminescence，ECL)显影，置于凝胶图像仪分析条带灰度。

1.5 血浆 FFA 的测定

取心脏前，从眼内眦静脉获取全血低温离心后取血浆，使用南京建成生物工程研究所试剂盒和采用 721 分光光度计测定。

1.6 统计学处理

所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析，各组间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 各组 Kv1.4、Kv4.2、Kv4.3 mRNA 表达水平的变化

Kv1.4 mRNA 表达在 AMI 组增加($P<0.05$)，TMZ 干预后表达明显降低($P<0.05$)，接近 Sham 组水平；Kv4.2、Kv4.3 mRNA 表达在 AMI 组降低($P<0.05$)，TMZ 干预后表达增加($P<0.05$)，接近于 Sham 组水平(见表 1)。

2.2 各组 Kv1.4、Kv4.2、Kv4.3 蛋白质表达水平的变化

Kv1.4 蛋白质表达在 AMI 组增加($P<0.05$)，TMZ 组与 AMI 组比较 Kv1.4 蛋白质表达降低($P<0.05$)，接近 Sham 组水平；Kv4.2、Kv4.3 蛋白质表达在 AMI 组降低($P<0.05$)，TMZ 干预后表达增加($P<0.05$)(见表 2，图 1)。

2.3 各组血浆 FFA 浓度的变化

血浆 FFA 浓度在 Sham 组为(268.44±40.68) μmol/L；在 AMI 组为(365.15±49.03) μmol/L，高于 Sham 组($P<0.05$)；TMZ 干预后浓度为(311.75±37.44) μmol/L，低于 AMI 组($P<0.05$)。

表 1 各组 Kv1.4、Kv4.2、Kv4.3 mRNA 的表达($\bar{x}\pm s$)

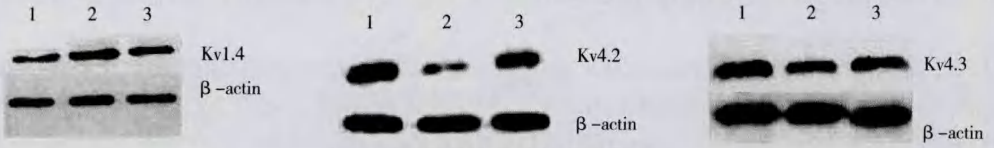
组别	Sham 组(n=10)	AMI(n=10)	AMI+TMZ(n=10)
Kv1.4 mRNA	0.96 ± 0.05	1.92 ± 0.04[a]	0.95 ± 0.07[b]
Kv4.2 mRNA	6.20 ± 0.06	3.47 ± 0.05[a]	4.16 ± 0.06[b]
Kv4.3 mRNA	5.33 ± 0.07	2.61 ± 0.07[a]	4.07 ± 0.05[b]

[a]:P<0.05,与假手术组比较;[b]:P<0.05,与 AMI 组比较

表 2 各组 Kv1.4、Kv 4.2、Kv 4.3 蛋白质的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	Sham 组(n=10)	AMI(n=10)	AMI+TMZ(n=10)
Kv1.4 蛋白	0.75 ± 0.03	1.07 ± 0.03[a]	0.85 ± 0.03[b]
Kv4.2 蛋白	0.94 ± 0.03	0.26 ± 0.04[a]	0.55 ± 0.04[b]
Kv4.3 蛋白	0.86 ± 0.02	0.45 ± 0.03[a]	0.76 ± 0.02[b]

[a]:P<0.05,与假手术组比较,[b]:P<0.05,与 AMI 组比较



1. sham 组;2. AMI 组;3. AMI+TMZ 组

图 1 Western blot 检测 Kv1.4、Kv4.2、Kv4.3 蛋白质的表达

3 讨 论

Ito 是反应细胞电位复极化早期外向电流的重要成分,主要调节细胞动作电位,静息膜兴奋性和去极化速度。George 等[4]研究证实当下调动作电位时程(Action potential duration, APD)平台期外向电流时将加强内向电流,从而延长 APD,引起心肌细胞复极改变,是发生室性心动过速、心室颤动等心律失常的基础。大鼠心室肌细胞 Ito 通道 α 亚单位主要由Kv1.4、Kv4.2、Kv4.3 编码,大量研究显示大鼠 AMI 后 3 d 及 4 周死亡率较高,并且梗死周边区 Ito 下调显著,Kv4.2、Kv4.3 基因表达降低,Kv1.4 基因表达增高[1]。我们的研究也发现AMI 后 4 周梗死周边区心肌 Kv4.2、Kv4.3 基因表达与假手术组相比降低,而 Kv1.4 表达增高,与文献和我们先前的研究相符[5]。

目前关于 AMI 后 Ito 通道 α 亚单位表达改变的机制尚不清楚。近年对 AMI 后葡萄糖氧化,细胞糖酵解或血浆 FFA 的增加,β-氧化紊乱等方面的研究较为丰富[6,7]。研究认为:当心肌处于缺血缺氧时,如 AMI 或糖尿病,心肌过量摄取来自于儿茶酚胺产生的血浆 FFA,造成血浆 FFA 增多,高浓度 FFA 刺激脂肪组织分解的心肌代谢产物:棕榈酰肉碱和棕榈酰辅酶 A 浓度增多。XU 等[7,8]使用棕榈酰肉碱和棕榈酰辅酶 A 干预正常大鼠心室肌 Ito 后发现,Ito 密度分别减少 62%和 37%,证实这些代谢物可直接作用于 Ito 并使其电流抑制,导致广泛的心肌电生理学,生物化学和机械效应的损害,产生明显的电生理的改变。这些结果提示:AMI 后,血浆 FFA 增多导致的心肌代谢产物棕榈酰肉碱和棕榈酰基辅酶 A 的累积与 Ito 的改变可能存在关联。

TMZ 为长链 3-酮酰辅酶 A 硫解酶抑制剂,是临床上常用的抗心肌缺血类药物,具有直接的心肌细胞保护作用。近年研究证实,TMZ 可发挥改善心肌氧化和抑制 FFA 增加的作用,并能降低棕榈酰肉碱的浓度[9]。本实验使用 TMZ 干预后首次发现,TMZ 组与 AMI 组相比:Kv1.4 基因表达下降,Kv4.2、Kv4.3 基因表达增加。我们推测:TMZ 可能通过抑制 FFA 氧化,使其代谢产物相应减少,对 Ito 通道 α 亚单位表达的改变产生影响。我们进一步的研究发现 AMI 后 4 周,大鼠血浆 FFA 浓度高于 sham 组,而 TMZ 干预后血浆 FFA 浓度较 AMI 组降低。因此本实验结果支持:TMZ 通过降低 FFA 浓度干预 Ito 通道 α 亚单位的改变,从而发挥抗心律失常的作用。

本实验探讨了 TMZ 对 AMI 大鼠 Ito 通道 α 亚单位表达的改变的影响,对于临床相应治疗起到十分重要且积极的作用,但深入的机制尚待进一步研究。我们期待更多的研究结果出现,为 TMZ 类药物对心脏的保护作用增加一个新的亮点,为 AMI 后心肌膜通道改变的治疗提供新的方向。

参 考 文 献

[1] Csaba L, László V, Tamás B. Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart[J]. Cardiovascular Research, 2007, 73(3): 512-520.

[2] Paul F, Kantor, Arnaud L, et al. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-Ketoacyl coenzyme A Thiolase[J]. Circulation Research, 2000, 86(20): 580-588.

[3] 佘 强,刘廷容,吴雪晖,等.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.

[4] George J, Rozanski, Xu Z. Altered K1 current of ventricular myocytes in rats with chronic myocardial infarction[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1998, 274(43): 259-265.

[5] Shari G, Birnbaum, Andrew W. Structure and function of Kv4-family transient potassium channels[J]. Physiol Rev, 2004, 84(7): 803-833.

[6] Lin M, Li L H, Paul N, et al. Maternal diabetes increases a large conductance Ca^{2+}-activated K^+(BK) current of cardiac motoneurons in the nucleus ambiguus (NA) of neonatal mice[J]. FASEB J, 2008, 22(3): 950-956.

[7] Xu Z, George J, Rozanski J. K^+ current inhibition by amphiphilic fatty acid metabolites in rat ventricular myocytes [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 1998, 275(3): 1660-1667.

[8] McHowatt J, Yamada K A, Saffitz J E, et al. Subcellular distribution of endogenous long chain acylcarnitines during hypoxia in adult canine myocytes[J]. Cardiovasc. Res, 1993, 27(19): 1237-1243.

[9] Gary D, Lopaschuk, Rick B, et al. Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase[J]. Circulation Research, 2003, 93(17): e33- e37.

(责任编辑:张学颖)