

· 临床研究 ·

ELISA 方法检测慢性心房颤动患者心房肌中 SK2 蛋白的表达*

李 涛,毛 亮,谭晓秋,李妙龄,杨 艳,刘智飞,曾晓荣[△]

(泸州医学院心血管医学研究所,四川泸州 646000)

摘要:目的 探讨慢性心房颤动患者与窦性心律患者心房组织 SK2 蛋白表达水平的差异。方法 将 22 例接受体外循环手术患者常规切除的右心耳组织作为研究对象,根据心房颤动的定义将标本分为 2 组:窦性心律组($n=12$)、心房颤动心律组($n=10$),提取患者心房组织的总蛋白,采用二辛可宁酸(BCA)方法检测总蛋白浓度,应用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测心房组织 SK2 蛋白水平。结果 每孔上样量总蛋白为 0.1 mg 的条件下,窦性心律组患者心房组织 SK2 蛋白浓度为 (1.13 ± 0.12) ng/mL,心房颤动心律组患者心房组织 SK2 蛋白浓度为 (3.98 ± 0.48) ng/mL,两组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 慢性心房颤动患者心房肌组织 SK2 蛋白的表达水平明显高于窦性心律患者。

关键词:钾通道,钙激活;心房颤动;酶联免疫吸附测定

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.08.011

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)08-0756-03

Detection of SK2 protein expression in atrial muscle of patients with chronic atrial fibrillation using ELISA*

Li Tao, Mao Liang, Tan Xiaoli, Li Miaoling, Yang Yan, Liu Zhifei, Zeng Xiaorong[△]

(Institute of Cardiovascular Medicine, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To explore the difference of SK2 protein expression level in atrial tissue of patients with chronic atrial fibrillation and patients with sinus rhythm. **Methods** Right atrial appendage tissue obtained from 22 patients accepted cardiopulmonary bypass surgery served as the research object which were divided into 2 groups: sinus rhythm group ($n=12$) and atrial fibrillation group ($n=10$) according to definition of atrial fibrillation. Total protein were extracted from atrial tissue of patients. Bicinchoninic acid(BCA) method was employed to detect the total protein concentration and enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was adopted to measure the SK2 protein level of atrial tissue. **Results** Under the condition of 0.1 mg of total protein per well, concentration of SK2 protein in atrial tissue of patients in sinus rhythm group was (1.13 ± 0.12) ng/mL, and that was (3.98 ± 0.48) ng/mL in atrial fibrillation group, which demonstrated statistical difference when they were compared ($P < 0.05$). **Conclusion** Expression level of SK2 protein in atrial muscle tissue of patients with chronic atrial fibrillation is significantly higher than that in patients with sinus rhythm.

Key words: potassium channels, calcium-activated; atrial fibrillation; enzyme-linked immunosorbent assay

小电导钙激活钾通道(small conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels, SK)在不同的组织广泛表达,包括脑、神经系统、骨骼肌以及平滑肌等^[1-2]。SK 蛋白参与调节神经的兴奋,激素的分泌以及神经元动作电位缓慢后超极化等功能。到目前为止,SK 有 3 个基因编码:SK1、SK2、SK3(KCNN1、KCNN2 和 KCNN3),其中 SK2 蛋白对 apamin 最敏感,其半阻断浓度为 60 pmol/L^[3]。

近几年来,心房组织 SK2 蛋白的研究成为热点,在人和小鼠的心房组织中,SK2 蛋白在肌细胞复极化的过程中,特别是动作电位的末期起到非常重要的作用,并且 SK2 蛋白在心房和心室组织的表达量不同,在心房组织的表达明显高于心室^[4]。本试验主要研究慢性心房颤动患者心房组织 SK2 蛋白

的变化情况。应用酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)技术检测人心肌细胞 SK2 蛋白在窦性心律和心房颤动心律表达的差异。

1 资料与方法

1.1 一般资料 22 例接受体外循环手术的患者均为泸州医学院附属医院心胸外科的住院患者,取其常规切除的右心耳组织标本作为研究对象。本实验得到泸州医学院伦理委员会的批准,所有试验程序遵照国内的相关法规和政策。根据心房颤动的定义标准将标本分为 2 组:窦性心律组 12 例、心房颤动心律组 10 例,患者临床资料见表 1,其性别、年龄、心率、心功能和超声心动图指标的差异均无统计学意义。

表 1 窦性心律和心房颤动患者的临床资料

组别	n	性别(男/女)	年龄(岁)	心率(次/min)	左心房内径(mm)	右心房内径(mm)	心左室舒张末期径(mm)
窦性心律组	12	5/7	40.3±11.3	83.6±13.1	44.3±10.1	18.3±3.3	50.6±9.3
心房颤动心律组	10	4/6	44.2±11.9	87.3±11.5	50.1±9.3	20.1±3.6	57.3±15.6

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30870903)。

△ 通讯作者, Tel:(0830)3160619; E-mail:zxr8818@vip.sina.com。

1.2 膜蛋白的提取 组织剪碎加入 1 mL 蛋白提取液,液氮研磨,冰上孵育 30 min,4 °C,10 000 g 离心 5 min,取上清液。

1.3 蛋白浓度的检测 采用美国 Thermo 公司的二辛可宁酸 (bicinchoninic acid,BCA)蛋白检测试剂盒,将试剂 A 与试剂 B 按照 50 : 1 的体积比混合成工作液,每个微孔中加入 200 μ L 工作液,依次再加入 10 μ L 的标准品或待检测的蛋白样品,轻微震荡混匀,避免产生气泡,37 °C 孵育 30 min,冷却到室温后,用 Tecan Infinite M200 型多功能酶标仪在 562 nm 处检测光密度值。

1.4 ELISA 试验 采用美国 Uscn 公司人 KCNN2 ELISA 试剂盒 (Uscn E80050HU) 依次将标准品、待测样品 100 μ L 加入到酶标板中,盖上覆膜,防止样品蒸发,37 °C 温育 2 h,弃去液体,每孔加检测 A 工作液 100 μ L,酶标板加上覆膜,37 °C 温育 1 h,弃去孔内液体,每孔用 350 μ L 洗涤液洗涤,浸泡 1~2 min,弃去液体后,重复洗板 3 次,甩干孔内的洗涤液,然后每孔加入检测 B 工作液 100 μ L,酶标板加上覆膜,37 °C 温育 30 min;弃去孔内液体,洗板 5 次。每孔加底物溶液 90 μ L,酶标板加上覆膜,37 °C 避光显色 10~15 min。最后每孔加终止溶液 50 μ L 终止反应,此时溶液由蓝色立即转为黄色。终止液的加入顺序和底物溶液的加入顺序相同,在确保酶标板底无水滴及孔内无气泡后,立即用酶标仪在 450 nm 波长测定各孔的光密度值。

1.5 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

ELISA 方法可以检测到人心房肌细胞 SK2 蛋白的表达,人 KCNN2 ELISA 的标准曲线见图 1。每孔上样量总蛋白为 0.1 mg 的条件下,窦性心律组患者心房肌细胞 SK2 蛋白浓度为 (1.13 \pm 0.12) ng/mL,心房颤动心律组患者心房肌细胞 SK2 蛋白浓度为 (3.98 \pm 0.48) ng/mL,两组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

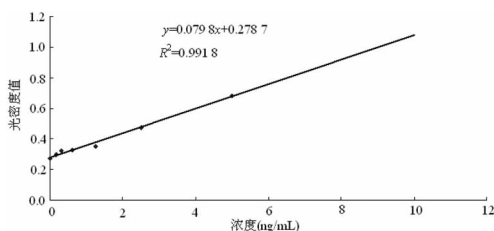


图 1 人 KCNN2 ELISA 的标准曲线

3 讨论

心房颤动是临床上最常见的持续性心律失常,是由不规则的、紊乱的心房电活动所引起,常见于风湿性心脏病和冠状动脉粥样硬化性心脏病。慢性心房颤动不但发病率高,持续时间长,且伴有严重的并发症,严重威胁人类的健康。

目前对心房颤动发生机制的研究主要有 3 种学说:折返机制学说、主导环学说及“心房颤动致心房颤动”学说。其中“心房颤动致心房颤动”指的是心房颤动的反复发作或者连续的电刺激会导致心房电重构 (atrial electrical remodeling, AER) 的改变,其后果使心房颤动趋于一种自我维持状态。AER 表现为心肌有效不应期 (effective refractory period, ERP) 进行性缩

短,离散度增加,频率适应性下降、消失或反向变化,这些改变对心房颤动的发生、维持和发展起着重要的作用。不管是慢性心房颤动患者,还是心房颤动的动物模型,心房肌细胞 L 型钙电流 (L type calcium current, I_{Ca-L})、瞬间外向钾电流 (transient outward potassium current, I_{to}) 明显下调,同时内向整流钾电流 (inward rectifier potassium current, I_{kr}) 上调,但乙酰胆碱敏感性钾电流 (acetylcholine sensitive potassium current, I_{kACh}) 在心房颤动时的变化报道不一致^[5-8],这也说明心房多通道电流参与了心肌细胞的 AER 过程^[9]。

有人应用逆转录聚合酶链反应 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)、Western blot 以及共聚焦荧光成像等实验方法证实了在小鼠和人的心房和心室肌细胞存在 SK2 蛋白。电生理实验研究发现,SK2 电流为外向电流,可以使心房肌细胞动作电位末期复极化时程缩短,相反,加入特异性的阻断剂 apamin 后,SK2 受到抑制,动作电位时程延长。这表明 SK2 电流可能参与心肌动作电位复极的过程。因此,SK2 蛋白的电生理学意义可能与维持心肌细胞正常的动作电位时程和形态有关。并且 SK2 电流密度在小鼠的心房肌细胞和心室肌细胞存在差异,即心房肌细胞 SK2 电流密度远远大于心室肌细胞。

目前关于心房颤动与 SK2 蛋白研究的报道不多,并且还局限于动物模型。Ozgen 等^[10]研究发现,兔肺静脉经过间歇、短阵的高速起搏后,肺静脉肌细胞 SK2 mRNA、蛋白以及电流水平都相应增加,动作电位复极时程缩短,而动作电位时程缩短又是引起心房颤动的原因之一。通过免疫荧光染色后观察到 SK2 蛋白从核周向细胞膜转移,这也说明 SK2 蛋白参与细胞电重构。这是第一次将 SK2 蛋白与心房颤动的关系进行研究,也为致心律失常因素的研究提供了基础。丹麦的 Diness 等^[11]用自发研制的 SK 阻滞剂 NS8593,观察其对大鼠心房颤动模型的影响,NS8593 作用机制是通过降低 SK 蛋白对钙离子敏感性,影响 SK 蛋白的活性。这种阻滞剂可以预防和终止离体和在大鼠心房颤动模型,并且 NS8593 还是心房特异性药物,不影响心室的电活动。研究发现持续性心房颤动患者的右心耳 SK2 电流明显增加,这表明心肌细胞 SK2 蛋白参与和介导了心房颤动的 AER 过程^[12]。但是在完全敲除 SK2 基因的小鼠模型上发现,心房肌细胞的动作电位时程明显延长,特别是动作电位的末期延长,而动作电位的末期对异常兴奋极其敏感,容易诱发早后除极,从而导致心房颤动的发生,这与经典的心肌动作电位时程缩短导致心房颤动的观点相违背^[13]。SK2 的电重构除了参与心房颤动的发生机制,还在心力衰竭的家兔诱发的室颤模型上发现,心室外膜肌细胞 SK2 蛋白及电流水平增加,导致细胞动作电位时程明显缩短,容易诱发室颤^[14]。

ELISA 是一种敏感性高、特异性强、重复性好的实验方法,其试剂稳定、易保存、操作简便、结果较客观,既适宜于大规模筛查试验又可以用于少量标本的检测,既可以定性试验也可以做定量分析等优点,目前已广泛应用于临床诊断和基础研究领域。虽然 ELISA 方法灵敏度及特异性相对较高,但只能检测到目的蛋白的 ng 水平,因此,如果提取标本的蛋白浓度较高,建议将其稀释后再进行 ELISA 实验。Western blot 和 ELISA 都是可以用于蛋白检测的实验方法,与 ELISA 方法相

比, Western blot 只能进行半定量检测, 但是可以加入内参与目的蛋白进行比较, 这点 ELISA 做不到。可以根据实验的需要, 选择适宜的蛋白检测方法。由于本实验标本含有血液, 红细胞破坏溶解时会释放有过氧化物酶活性的血红蛋白, 在以辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)为标记的 ELISA 检测过程中, 会导致非特异性显色, 干扰实验的检测结果^[15]。因此在进行标本研磨前, 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)冲洗组织, 以减少血凝块和红细胞对实验结果的影响。

综上所述, 在慢性心房颤动时人心房肌右心耳组织 SK2 蛋白表达量明显增加。基于 SK2 电流在心房组织和心室组织的表达不同, SK 蛋白的特异性阻滞剂提供了治疗心房颤动的可能, 这种药物直接针对心房肌细胞而不影响心室肌细胞的电活动, 这可以减少传统抗心律失常药物的不良反应, 也为临床新药的研发提供实验基础和理论依据。

参考文献:

- [1] Stocker M, Pedarzani P. Differential distribution of three Ca(2+)-activated K(+) channel subunits, SK1, SK2, and SK3, in the adult rat central nervous system[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2000, 15(5): 476-493.
- [2] Favero M, Jiang DJ, Chiamulera C, et al. Expression of small-conductance calcium-activated Potassium channels (SK3) in skeletal muscle: regulation by muscle activity [J]. *J Physiol*, 2008, 586(Pt 19): 4763-4774.
- [3] Xia XM, Fakler B, Rivard A, et al. Mechanism of Calcium gating in small-conductance calcium-activated Potassium channels[J]. *Nature*, 1998, 395(6701): 503-507.
- [4] Xu Y, Tuteja D, Zhang Z, et al. Molecular identification and functional roles of a Ca(2+)-activated K⁺ Channel in human and mouse hearts[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(49): 49085-49094.
- [5] 丁银元, 曾晓荣, 杨艳, 等. 血管紧张素 II 对心房颤动患者外向钾电流的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(7): 1422-1425.
- [6] 李妙龄, 曾晓荣, 杨艳, 等. 持续性心房颤动患者心房肌细胞 L 型钙通道电流变化的研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34(4): 308-311.
- [7] 张标, 曾晓荣, 杨艳, 等. 慢性房颤患者心房肌细胞乙酰胆碱敏感钾通道的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(4): 678-682.
- [8] 张瑜, 曾晓荣, 杨艳, 等. 持续性心房颤动患者 IK1 电流密度及其基因表达变化的研究[J]. *中华心血管病杂志*, 2006, 34(1): 33-37.
- [9] 王伟, 肖颖彬, 程伟. 快速电场起搏对心房肌细胞电生理特性的实验研究[J]. *重庆医学*, 2010, 39(14): 1792-1793.
- [10] Ozgen N, Dun W, Sosunov EA, et al. Early electrical remodeling in rabbit pulmonary vein results from trafficking of intracellular SK2 channels to membrane sites[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75(4): 758-769.
- [11] Diness JG, Sørensen US, Nissen JD, et al. Inhibition of small-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels terminates and protects against atrial fibrillation[J]. *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 2010, 3(4): 380-390.
- [12] 李妙龄, 李涛, 雷明, 等. 持续性心房颤动患者心房肌细胞小电导钙激活钾通道电流的增强[J]. *中华心血管病杂志*, 2011, 39(2): 147-151.
- [13] Li N, Timofeyev V, Tuteja D, et al. Ablation of a Ca²⁺-activated K⁺ Channel (SK2 Channel) results in action potential prolongation in atrial myocytes and atrial fibrillation[J]. *J Physiol*, 2009, 587(Pt 5): 1087-1100.
- [14] Chua SK, Chang PC, Maruyama M, et al. Small-conductance calcium-activated Potassium Channel and recurrent ventricular fibrillation in failing rabbit ventricles[J]. *Circ Res*, 2011, 108(8): 971-979.
- [15] 纪晓花. 标本因素对 ELISA 测定结果的影响[J]. *中国医学创新*, 2011, 8(7): 133-134.

(收稿日期: 2011-10-24 修回日期: 2012-01-28)

(上接第 755 页)

- [2] 时秀娟. 汉族儿童普通话元音习得的差异性: 济宁方言背景下[M]. 北京: 线装书局, 2008.
- [3] 刘巧云, 赵航, 陈丽, 等. 3~5 岁健听儿童音位对比识别习得过程研究[J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2011(2): 116-119.
- [4] 刘莎, 韩德明, 吴璇, 等. 听力正常学龄前儿童语音发育规律研究[J]. *临床耳鼻喉头颈外科杂志*, 2008, 22(7): 301-303.
- [5] 张凤华, 金星星, 章依文, 等. 舌尖音发音缺陷的临床特征和语音治疗[J]. *中华儿科杂志*, 2006, 44(3): 210-213.
- [6] 王南梅. 三岁至六岁学龄前儿童之构音发展[J]. *听语会刊*, 1984(1): 12-17.
- [7] 吴天敏, 许政援. 初生到三岁儿童言语发展记录的初步分析[J]. *心理学报*, 1979(2): 166-174.
- [8] So LKH, Zhou J. The acquisition of putonghua phonology. Proceedings of the fifth international conference on spoken language processing (ICSLP98) [M]. Sydney: Australian Speech Science and Technology Association, 1998, 1: 291.
- [9] Hua Z, Dodd B. The phonological acquisition of Putonghua (Modern Standard Chinese)[J]. *J Child Lang*, 2000, 27(1): 3-42.
- [10] 刘兆吉, 彭新鼎, 陈志君. 三~六岁儿童语音发展的调查研究[M]//朱智贤. 幼儿心理的发展. 北京: 北京师范大学出版社, 1982: 164.

(收稿日期: 2011-10-28 修回日期: 2011-01-18)