

· 基础研究 ·

急性心肌梗死后快速延迟整流 K⁺ 通道基因表达的变化

李秀娟¹, 黄从新², 丁家望¹, 杨俊¹, 吴辉¹, 李莉¹, 李松¹, 李稳慧¹, 姜玉蓉¹

(1. 三峡大学第一临床学院/宜昌市中心人民医院心内科, 湖北宜昌 443003;

2. 武汉大学人民医院心内科, 武汉 430000)

摘要:目的 探讨猪心肌梗死(MI)后梗死边缘区快速延迟整流 K⁺ 通道 KCNH2 和 KCNE2 基因表达水平的改变及意义。

方法 通过结扎猪左前降支远端 1/3~1/2 处 2 h 建立急性心肌梗死(AMI)模型, 手术后存活猪进入 MI 组, 术后 24 h 取左心室梗死边缘区内层(Endo)、中层(Mid)和外层(Epi)心肌, 应用半定量 RT-PCR 方法检测 KCNH2 和 KCNE2 mRNA 含量。同时, 设立相应的假手术组(SH 组), SH 组取与 MI 组对应区域的心肌组织。**结果** KCNH2 和 KCNE2 基因的表达在 SH 组左心室 Endo、Mid 和 Epi 心肌间没有差异, 与 SH 组比较, AMI 后梗死边缘区 3 层心肌 KCNH2 mRNA 表达均明显下降($P < 0.05$), 而且 3 层心肌间的基因表达呈不均一性($P < 0.05$), KCNE2 mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** AMI 后梗死边缘区 3 层心肌 KCNH2 基因表达的不均一性下调, 可能在 MI 后早期室性心律失常的发生中起重要作用。

关键词: 钾通道; 心肌梗死; 基因表达; 猪

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.20.022

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)20-2062-02

Alteration in gene expression of the rapid-delayed rectifier potassium channel after acute myocardial infarction

Li Xiujuan¹, Huang Congxin², Ding Jiawang¹, Yang Jun¹, Wu Hui¹, Li Li¹, Li Song¹, Li Wenhui¹, Jiang Yurong¹

(1. Department of Cardiology, Yichang Central People's Hospital, the First Clinical Medical College of Three Gorges University, Yichang, Hubei 443003, China; 2. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430000, China)

Abstract: Objective To investigate the changes and significance of the expression of the rapid-delayed rectifier potassium channel KCNH2 and KCNE2 mRNA in infarcted marginal zone after myocardial infarction (MI) in pigs. **Methods** The pig model of AMI was established by ligating left anterior descending coronary artery for 2 h, and the survival porcine were enrolled into post-MI group. 24 h after surgery, using semi-quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), KCNH2 and KCNE2 mRNA were measured respectively in endocardium (Endo), midcardium (Mid) and epicardium (Epi) of border zone. Besides, the sham-operation group (sham-group) was established. **Results** The mRNA of KCNH2 and KCNE2 were similar in endocardium (Endo), midcardium (Mid) and epicardium (Epi) in sham group. Compared with the sham-group, KCNH2 mRNA in all the three layers of border zone in AMI group remarkably reduced respectively ($P < 0.05$), and there were significant differences among three layers ($P < 0.05$), while the mRNA of KCNE2 was similar among three layers ($P > 0.05$). **Conclusion** The heterogeneous downregulation of KCNH2 mRNA expression may be one of the molecular mechanisms that are able to cause ventricular arrhythmias after acute myocardial infarction.

Key words: potassium channels; myocardial infarction; gene expression; porcine

K⁺ 通道对心肌细胞的电生理稳定性调控起着非常重要的作用^[1-2]。人类 ether-Å-go-go 相关基因 HERG 基因编码心脏快速延迟整流 K⁺ 电流 I_{kr}, I_{kr} 是心肌细胞动作电位 3 期快速复极的主要电流, 在心脏动作电位复极化过程中发挥重要作用。HERG/KCNH2 及其调节亚基 KCNE2 基因突变可引起 LQTS 综合征^[3-4], 心肌梗死(MI)并发的心律失常是导致病情恶化和死亡的主要原因之一。MI 后心室肌膜多种 K⁺ 通道基因表达的变化已成为近年研究热点, 但是关于 MI 后 HERG/K⁺ 通道基因表达变化的研究有限, 尤其是对大型动物如猪的研究尚属少见。本研究以开胸冠状动脉(冠脉)结扎法制备猪急性心肌缺血模型, 用 RT-PCR 方法观察 MI 后左心室梗死边缘区 3 层心肌快速延迟整流 K⁺ 通道基因 HERG/KCNH2 及其调节亚基 KCNE2 基因的 mRNA 表达改变及其意义, 旨在探讨急性心肌梗死(AMI)后早期室性心律失常发生的分子机制。

1 材料与方

1.1 材料 普通级小型猪, 3~5 月龄, 体质量 10~15 kg (华

中农业大学动物中心提供), 雌雄不限。术前常规检查心电图, 心电图异常者剔除, 随机分为假手术组(SH 组)和模型组(MI 组), 共 16 只动物。

1.2 MI 动物模型的建立 所有的实验动物均术前禁食、禁饮 12 h。术前称质量, 予以 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后, 在口腔明视下行气管插管, 以呼吸机机械通气, 潮气量 10~15 mL/kg, 给氧 3~5 L/min, 频率 20~25 次/分钟。常规消毒铺巾, 于胸骨正中打开胸腔, 纵行切开心包膜, 充分暴露心脏, 并将心包膜缝合于胸壁呈吊篮状。仔细分离冠状动脉, 于冠状动脉左前降支(LAD)远端 1/3~1/2 处穿入 4 号缝合线, AMI 组结扎 2 h, 再松解恢复前降支血流, 建立 AMI 模型, 其成功标志为: 心电图 ST 段弓背向上抬高, 直视下可见被结扎血管供血区心肌变为苍白色。SH 组也重复上述步骤, 但冠状动脉下只穿线, 不结扎。逐层缝合心包、胸壁, 并放置引流管。术后精心喂养动物至实验终点。取结扎后存活的猪, 分入 MI 组, 建立 SH 组, 所有猪均接受相同的饲养条件。

1.3 标本的采集与保存 MI 组和 SH 组的每只猪于术后 24 h, 用 3% 的戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔注射麻醉后, 迅速取出心脏置于 4 °C 生理盐水漂洗除去血液, 依照 Gao 等^[5] 的方法留取左心室梗死边缘区 3 层心肌 (SH 组取对应位置心肌), 迅速置 -70 °C 低温冰箱保存待测。

1.4 心肌总 RNA 的提取和 KCNH2 及 KCNE2 mRNA 检测
取 50~100 mg 猪心肌, 按照 Trizol (Invitrogen 公司) RNA 抽提试剂盒说明书的步骤进行, 提取组织总 RNA, 紫外光检测样品吸光度, A_{260}/A_{280} 为 1.95~2.10。应用 RT-PCR 法 (试剂盒购于大连宝生物工程有限公司) 检测 mRNA 的表达, 50 °C 30 min, 94 °C 预变性 2 min, PCR 扩增 29 个循环 (94 °C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 °C 延伸 4 min)。KCNH2 引物 (257 bp): 上游 5'-TGA AGG AGA CGG AGG AG-3', 下游 5'-CAG AGC CGA AGA TGA GC-3', (退火温度 57.2 °C); KCNE2 引物 (157 bp): 上游 5'-TAC TAC GTC ATC CTG TAC C-3', 下游 5'-TGA CTC TTG TAT TTC CCT TGC -3', (退火温度 56.0 °C); β -actin 引物 (498 bp): 上游 5'-GGC TAC AGC TTC ACC ACC AC-3', 下游 5'-TACT CCT GCT TGC TGA TCC AC-3' (退火温度 60 °C); 1.5% 琼脂糖电泳分析 PCR 产物, 应用凝胶成像系统观察记录结果, 用光密度扫描计算 KCNH2 电泳条带灰度积分/ β -actin 电泳条带灰度积分和 KCNE2 电泳条带灰度积分/ β -actin 电泳条带灰度积分, 进行半定量分析。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件, 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 组内两两比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物存活情况 AMI 组中 9 只存活 6 只, 另外 3 只于术中发生室颤, 经心内除颤无效死亡; SH 组中 7 只, 1 只因麻醉意外死亡, 其余 6 只存活。

表 1 两组不同部位 KCNH2 及 KCNE2 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

部位	SH 组 (n=6)		MI 组 (n=6)	
	KCNH2	KCNE2	KCNH2	KCNE2
Endo	0.431±0.016	0.437±0.024	0.201±0.020 ^{#□▽}	0.430±0.021
Mid	0.428±0.013	0.448±0.030	0.273±0.022 ^{#△▽}	0.432±0.032
Epi	0.422±0.021	0.440±0.030	0.302±0.025 ^{#△□}	0.438±0.024

[#]: $P < 0.05$, 与 SH 组比较; [△]: $P < 0.05$, 与 MI 组 Endo 比较; [□]: $P < 0.05$, 与 MI 组 Mid 比较; [▽]: $P < 0.05$, 与 MI 组 Epi 比较。

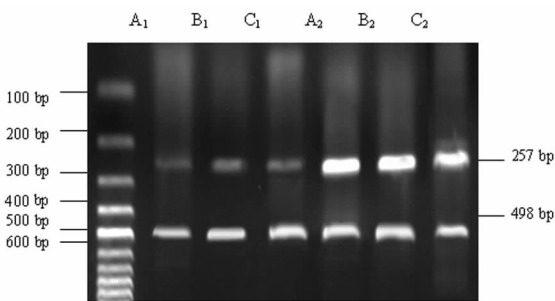
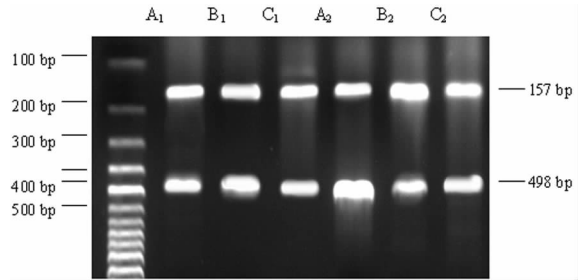


图 1 MI 组和 SH 组梗死边缘区 3 层心肌的 KCNH2 mRNA (257 bp) 与 β -actin (498 bp) RT-PCR 电泳图

2.2 两组猪心肌 KCNH2 和 KCNE2 基因 mRNA 表达的变化 KCNH2 和 KCNE2 基因表达在 SH 组左室内层 (Endo)、中层 (Mid) 和外层 (Epi) 心肌间没有差异, 与 SH 组比较, AMI 后梗死边缘区 3 层心肌 KCNH2 mRNA 表达均明显下降 ($P < 0.05$), 而且 3 层心肌间的基因表达呈不均一性 ($P < 0.05$), KCNE2 mRNA 表达量无显著性差异, 结果见表 1, 图 1、2。



MI 组, A1: Endo; B1: Mid; C1: Epi. SH 组, A2: Endo; B2: Mid; C2: Epi。

图 2 MI 组和 SH 组梗死边缘区 3 层心肌的 KCNE2 mRNA (157 bp) 与 β -actin (498 bp) RT-PCR 电泳图

3 讨 论

IKr 是 HERG/KCNH2 和 KCNE2 表达的两种蛋白质共同形成功能性 K^+ 通道, KCNH2 本身单独可产生一种小的快速激活外向 K^+ 电流, KCNE2 本身并不能产生任何离子电流, 但它的存在主要影响通道的门控性和药理学性质。目前, 关于 HERG 及其调节亚基 KCNE2 基因突变可引起 LQTS 综合征的研究较多, 但在 MI 后 HERG 及其调节亚基 KCNE2 基因的表达有何改变, 这些改变在心律失常中所起的确切作用尚不是很清楚。

有研究表明, 在心肌缺血初始的短时间内, 先出现 IK 的抑制, 此为细胞的代偿性保护性反应被激发的表现, 随缺血持续出现 IK 增大 (主要是 IKr) 则为损伤性反应的表现。心肌缺血时时间依赖性 K^+ 流 (包括 IK) 和 KATP 的开放又是造成细胞内 K^+ 丢失外流的主要途径^[6], 由此形成恶性循环, 持续缺血最终使细胞内外 K^+ 平衡完全失调。同时由于 IK 的增大, 可加快心肌细胞复极, 使动作电位时程及 ERP 缩短, 心肌细胞电生理特性发生改变。由此可见, MI 后 IKr 电流的电生理特性发生了改变, 这可能是心肌梗死后易发心律失常的机制之一。本研究发现, KCNH2 和 KCNE2 基因表达在 SH 组左心室 Endo、Mid 和 Epi 心肌间没有差异, 这与 Arun 等^[7] 及 Kaori 等^[8] 对快速延迟整流 K^+ 通道在左室心肌 3 层间表达的研究结果相一致。而 MI 24 h 后 KCNH2 mRNA 的表达量在边缘区降低, KCNH2 mRNA 表达水平的下调, 可以造成有功能的快速延迟整流 K^+ 通道的数目减少, 有助于 IKr 电流的减小, 可能是心肌细胞在恢复期的一种代偿性保护性反应, 使膜 K^+ 电流变小, K^+ 外流减少, 促进急性缺血所造成的细胞内外 K^+ 平衡失调的恢复。但是 IKr 电流的减小, 可使心室肌细胞 APD 延长, 心肌细胞电生理特性改变, 易于形成触发活动, 产生心律失常。同时 KCNH2 mRNA 的表达在左心室梗死边缘区 Endo、Mid 和 Epi 心肌之间产生了明显的差异, 使空间异质性增大, 可导致复极不均一, 复极离散度增大, 易于形成折返发生心律失常。

效果^[8];近年来青壮年外出打工,中老年人在家留守,从事生产劳动以及种菜接触感染的机会较多有关^[9]。因此,重庆市土源性线虫病防治的重点应以留守在家务农的老年人为主。

职业分布也发生了较大变化,2001 年以学龄前儿童感染最高,其次学生和农民;2010 年以农民、学生较高,但学龄前儿童感染率仍然较高,不容忽视。不同文化程度分布,2 次调查均以文盲组感染最高,文化程度越高感染率越低,提示文化程度较低的人,其健康意识较差,存在不良生活习惯的可能性较大^[10-12]。因此,重庆市土源性线虫病防治重点应放在农村,重点人群为文化程度较低农民以及学生。

目前,重庆市土源性线虫病感染率较 10 年前有一定程度的下降,但其感染率仍维持在较高水平,受威胁的人口较多。重庆市土源性线虫的防治工作仍任重道远,应引起各级政府部门的高度重视。根据卫生部制定的《土源性线虫防治技术方案》,按照因地制宜、分类指导的原则,加强对重点人群、重流行区的防治工作,对不同地区的重点人群,采取有针对性的健康教育方式^[13]。以传染源控制为主的综合防治策略^[14],采取改厕、改水、改造环境、改善行为、药物驱虫的具体防治措施,以控制重庆市土源性线虫的流行,保护人民群众的身体健康。

参考文献:

- [1] 蒋诗国,肖邦忠,吴成果,等.重庆市人体重要寄生虫病现状流行病学调查[J].热带病与寄生虫学,2004,2(2):95-99.
- [2] 周晓农.土源性寄生虫病[M].北京:人民卫生出版社,2011:21-22.
- [3] 李朝品.人体寄生虫学实验研究技术[M].北京:人民卫生出版社,2008:137.

- [4] 杜强,贾丽艳.SAS 统计分析标准教程[M].北京:人民邮电出版社,2010:187-205.
- [5] 李文,贺丽君,颜秋叶,等.社会经济因素对寄生虫感染的影响[J].中国寄生虫病防治杂志,2004,17(5):282-284.
- [6] 王隽德.全国人体重要寄生虫病现状调查[M].北京:人民卫生出版社,2008:1-29.
- [7] 林绍雄,王善青,胡锡敏,等.海南省土源性线虫病流行现状分析[J].中国热带医学,2010,10(8):939-941.
- [8] 余品红,陈建设,张华勋,等.湖北省土源性线虫感染现状调查[J].中国病原生物学杂志,2006,1(4):292-295.
- [9] 田洪春,谢红,刘常华,等.2005~2009 年四川省土源性线虫病流行趋势分析[J].预防医学情报杂志,2010,26(9):688-693.
- [10] 程由注,徐龙善,陈宝建,等.福建省人体主要寄生虫感染调查分析[J].中国寄生虫学与寄生虫病杂志,2005,23(5):283-287.
- [11] 姚立农,余可根,陈华良,等.浙江省肠道寄生虫感染现状调查[J].实用预防医学,2007,14(2):356-358.
- [12] 许隆琪.我国西部地区重大寄生虫病的危害及对防治工作的反思[J].中国寄生虫病防治杂志,2002,15(1):123.
- [13] 蒋诗国,吴成果,肖邦忠,等.重庆市人体肠道线虫感染现状调查与分析[J].中国病原生物学杂志,2007,2(4):287-290.
- [14] 王宇.推广示范区经验加强寄生虫病防治工作[J].中国血吸虫病防治杂志,2011,23(5):471-472.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-02-16)

(上接第 2063 页)

虽然本研究显示 KCNE2 mRNA 表达水平在两组间没有变化,而且 KCNE2 本身并不能产生任何离子电流,但它的存在影响通道的门控性和药理学性质,当 KCNH2 mRNA 的表达在左心室梗死边缘区 Endo、Mid 和 Epi 心肌之间产生了明显差异时,KCNE2 mRNA 表达水平没有产生相应的变化,使 IKr 在整体行为,对细胞外 K⁺ 及抗心律失常药物的敏感性和通道的失活速率等方面发生改变,也可使空间异质性增大,导致复极不均一,复极离散度增大,易于形成折返发生心律失常;同时也可增加了电流的不稳定性和发生心律失常的易感性。

因此,K⁺通道 KCNH2 mRNA 表达的下调和在不同部位改变的不均一可能在电生理不稳定的维持和(或)恶化方面起一定的作用,但这种变化确切意义和 KCNH2 和 KCNE2 基因两者之间的相互作用还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Olaf P. Ins and outs of cardiac voltage-gated potassium channels[J]. Current Opinion Pharmacology, 2009, (3): 311-315.
- [2] Shimizu W, Horie M. Phenotypic Manifestations of Mutations in Genes Encoding Subunits of Cardiac Potassium Channels[J]. Circ Res, 2011, 109(1):97-109.

- [3] Roden Dan M. Long-QT syndrome[J]. N Eng J Med, 2008, 358 (2):169-176.
- [4] Sanguinetti MC. ERG1 channelopathies[J]. Pflügers Archiv Eur J Physiol, 2010, 60(2):265-276.
- [5] Gao Z, Sun HY, Lau CP, et al. Evidence for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride current in swine ventricular myocytes[J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(1):98-105.
- [6] Rodriguez B, Ferrero JM Jr, Trénor B, et al. Mechanistic investigation of extracellular K⁺ accumulation during acute myocardial ischemia: a simulation study[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(2):H490-500.
- [7] Arun S, Yoshinori N, Terentyev D, et al. Repolarization abnormalities and afterdepolarizations in a canine model of sudden cardiac death[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 295(5):R1463-1472.
- [8] Soma K, Nagaoka K, Kuwahara M, et al. Abundant expression of KCNE1 in the left ventricle of the miniature pig[J]. Heart Vessels, 2011, 26(3):353-356.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-02-23)