

· 基础研究 ·

犬肺静脉的组织学与 HCN 通道的表达研究

胡明艳¹, 陈尚超², 陈曼华¹

(1. 湖北省武汉市中心医院心内科 430014; 2. 湖北省武钢二医院神经内科 430085)

摘要:目的 观察犬肺静脉的纤维走行方向及起搏细胞的存在, 研究犬急性心房颤动模型时肺静脉及左心房中起搏电流(funny current, If)通道亚单位超极化激活的环核苷酸门控通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel, HCN)1、2、4 的表达变化。方法 14 只健康杂种犬随机分为房颤组与对照组, 快速心房起搏建立犬急性房颤模型, 取对照组的肺静脉肌袖组织做苏木素-伊红(HE)及高碘酸-希夫反应(PAS)染色; 取两组的肺静脉、左心房组织, 用逆转录-PCR(RT-PCR)方法测定 HCN1、HCN2、HCN4 3 种通道的 mRNA 表达水平。结果 肺静脉尤其是肺静脉左心房交界处肌纤维排列紊乱; 肺静脉肌袖的内膜面可以见到传导细胞; 两组犬的肺静脉及左心房中均有 HCN2、HCN4 的 mRNA 表达, 而无 HCN1 的表达。HCN4 的 mRNA 表达水平从高到低依次为: 房颤组肺静脉、房颤组左心房、对照组肺静脉、对照组左心房, 组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$)。HCN2 的 mRNA 表达水平从高到低依次为: 房颤组肺静脉、房颤组左心房、对照组, 组间比较差异具有统计学意义($P < 0.05$), 对照组的肺静脉与对照组左心房中 HCN2 的 mRNA 表达水平无明显差异。结论 犬肺静脉肌袖存在纤维各向异性及传导细胞, 急性房颤时肺静脉及左心房 HCN2、HCN4 的表达上调, 可能参与房颤的发生与维持。

关键词:心房颤动; 肺静脉; 起搏细胞; 心肌; HCN 通道

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.30.023

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)30-3650-03

Histology of canine pulmonary veins and expression of HCN channelHu Mingyan¹, Chen Shangchao², Chen Manhua¹

(1. Department of Cardiology, Wuhan Central Hospital, Wuhan, Hubei, 430014, China;

2. Department of Neurology, Number Two Hospital of WISCO, Wuhan, Hubei, 430085, China)

Abstract: Objective To observe the anisotropy of myocardial fiber orientation and conduction cells in canine pulmonary vein, and to investigate the expression of funny current(If) channel subunit HCN1, HCN2, HCN4 mRNA in cardiocytes of pulmonary veins and left atrial in acute atrial fibrillation(AF) model of canine. **Methods** Fourteen adult mongrel canines were randomly divided into atrial fibrillation group($n=7$) and control group($n=7$). A model of acute AF has been developed in rapid atrial pacing(RAP). The cardiocytes in control group were detected using hematoxylin and eosin(HE) and Periodic acid-Schiff(PAS) stain in the pulmonary vein. The mRNA expressions of HCN1, HCN2, HCN4 in two groups were quantified by semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** There were complex myocardial fiber orientation in pulmonary veins especially in PV-LA junction, PAS-positive cells could be seen in the endomembrane of pulmonary veins muscle sleeve. There were mRNA expression of HCN2 and HCN4 in pulmonary veins and left atrial in two groups, but there was no mRNA expression of HCN1. The mRNA levels of HCN4 from high to low were: pulmonary veins of atrial fibrillation group, left atrial of atrial fibrillation group, pulmonary veins of control group, left atrial of control group($P < 0.05$). HCN2 mRNA levels from high to low were: pulmonary veins of atrial fibrillation group, left atrial of atrial fibrillation group, control group($P < 0.05$). There were no difference in the HCN2 mRNA level in pulmonary veins and left atrial in control group($P > 0.05$). **Conclusion** There are anisotropy, conduction cells in pulmonary veins. Up-regulation of pulmonary veins and left atrial HCN2, HCN4 mRNA in atrial fibrillation canine, may be correlated with the atrial fibrillation and maintenance.

Key words: atrial fibrillation; pulmonary vein; pacing cells; cardiocytes; HCN channel

近年来,许多研究证实来源于肺静脉的快速局灶性冲动在心动房颤(以下简称房颤)的诱发及维持上起着重要的作用^[1-2]。超搏电流(funny current, If)离子流是心脏起搏电流的重要组成部分,其活动增加,会导致自律性增加,容易引起快速心律失常。亚单位超极化激活的环核苷酸门控通道(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel, HCN)是可以产生类似心脏 If 或神经元 Ih 电流的一类通道基因家族,每一亚单位形成的离子通道均具有内在 If 的主要特征^[3-4],肺静脉存在自发活动,就很可能有该通道的存在。本实验观察了犬肺静脉肌袖的基本组织结构,采用组织化学染色及分子生物学技术,从多个角度证实肺静脉中有传导细胞的存在,并探讨犬快速心房起搏后急性房颤时 HCN 的变化,为揭示肺静脉引发房颤的机制提供客观的依据。

1 材料与与方法**1.1 动物模型建立及分组** 14 只健康成年犬,雌雄不限,体

质量 10~20 kg, 7 只快速心房起搏作房颤组,其余 7 只未经快速心房起搏处理为对照组。3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 静脉麻醉,气管插管,必要时呼吸机辅助呼吸。沿胸骨正中切口,逐层开胸,切开心包暴露心脏。用心脏电生理刺激仪(SEN-7103 型,日本产)经右心房电极给予 600 次/分、脉宽 2 ms、4 倍阈值的高速心房起搏脉冲直至诱发房颤;动态记录犬肢体 6 导联心电图。一旦房颤自行终止则继续心房起搏诱发房颤。维持高速心房起搏/房颤 8 h。7 只犬均诱发出房颤。处死动物,留取部分肺静脉及左心房组织,置入液氮速冻后, -80℃ 存放。

1.2 苏木素-伊红(HE)及高碘酸-希夫反应(PAS)染色 将对照组犬麻醉后迅速开胸,剪取左心房与肺静脉交界处向上延伸约 1 cm 的肺静脉肌袖组织,剪去肺静脉肌袖内外膜,将组织块固定于 10%中性甲醛溶液中 24 h 后,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,沿血管走行作纵向连续切片,厚 5 μm,每隔 5 张取 1 张做 HE 染色,其间隔的 5 张做 PAS 染色。

表 1 引物序列与反应条件

基因	序列	产物大小(bp)	退火温度(°C)
HCN1	上游 5-TGG TGG CTA CAA TGC CTT TA 3'	320	58
	下游 5- TTC CTC CGG GAC CTC GTT 3'		
HCN2	上游 5- CGT TAC CAG GGC AAG ATG TTT 3'	393	48
	下游 5- GTT GTC CAC GCT CAG CGA AT 3'		
HCN4	上游 5- GTA CTC CTA CGC GCT CTT CA 3'	313	62
	下游 5- GCT CTC CTC GTC GAA CAT CT 3'		
β-actin	上游 5- CCA AGG CCA ACC GCG AGA AGA TGA C 3'	392	55
	下游 5- AGG GTA CAT GGT GGT GCC GCC AGA C 3'		

1.3 逆转录-PCR(RT-PCR)测两组犬肺静脉及左心房心肌 HCN1、2、4 的 mRNA 表达 取 100 mg 冷冻组织,用 Trizol 试剂一步法提取肺静脉及左心房心肌细胞的总 RNA。在紫外分光光度计上测定总 RNA 的浓度及纯度,采用 TaKaRa 一步法 RT-PCR 试剂盒(购至大连宝生物工程有限公司),进行逆转录和 PCR。总反应体系为 25 μL,分别依次加入总 RNA 1 μL(≤ 1 μg),10×缓冲液 2.5 μL,dNTP 2.5 μL,MgCl₂ (25 mmol/L) 5 μL,RNA 酶抑制剂(40 μ/μL) 0.5 μL,AVM 逆转录酶(5 μ/μL) 0.5 μL,Taq 酶(5 μ/μL) 0.5 μL,上下游特异性引物(由上海生物工程有限公司合成)各 0.5 μL,加无 RNA 酶水至 25 μL。50 °C 30 min 逆转录,94 °C 2 min 预变性,开始循环:94 °C 变性 30 s,退火(温度见表 1)30 s,40 个循环后延伸于 72 °C,45 s;最后 4 °C 保存 10 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,并采用凝胶图像分析系统,对电泳条带进行灰度计算,以 β-actin 为参照,求出其相对值。

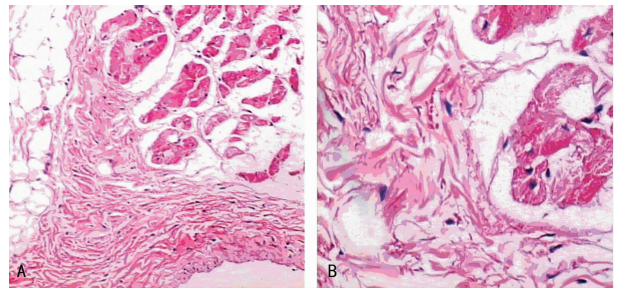
1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,不同组间的参数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色检测肺静脉纤维的走行方向 肺静脉肌袖组织

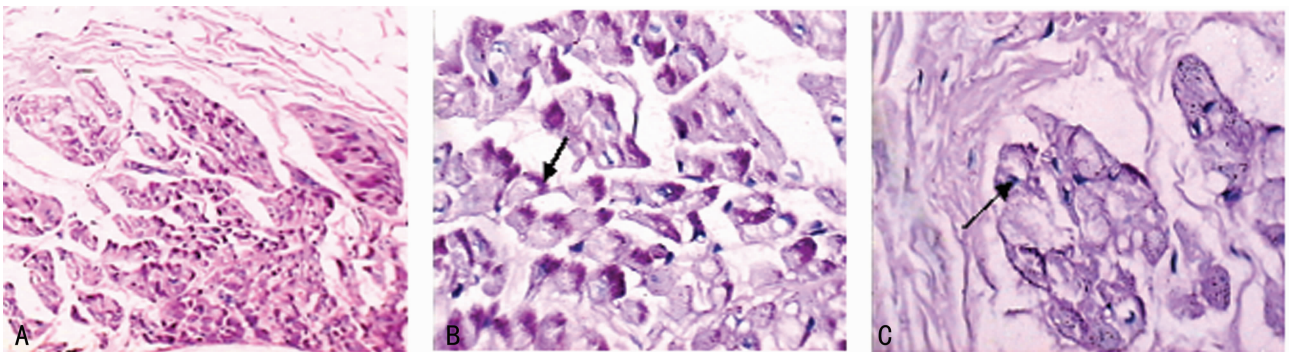
分为内膜层、中层和外膜层,中层较厚,心肌细胞集成束,呈纵行、环形和斜行排列。肺静脉、尤其是肺静脉左心房交界处肌纤维的排列方向复杂,走向紊乱(图 1A、B)。

2.2 PAS 染色观察传导细胞 肺静脉肌袖的心内膜面可见大量 PAS 染色阳性的细胞(即传导细胞)。左心房与肺静脉交界处也可见 PAS 染色阳性的细胞,这些细胞的胞浆染色较淡,且一般比周围 PAS 染色阴性的细胞大(图 2A~C)。



A: HE×100; B: HE×400。

图 1 HE 染色犬肺静脉纵切面

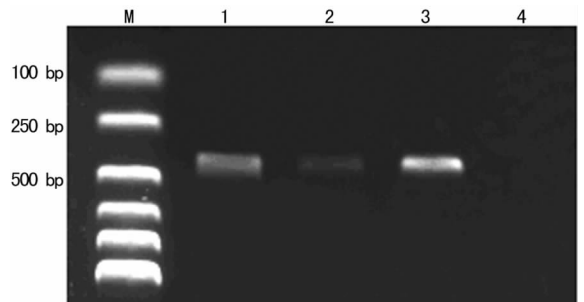


A: 犬肺静脉纵切面(PAS×100); B: 犬肺静脉 P 细胞样细胞(PAS×400); C: 犬肺静脉与左心房交界处 P 细胞样细胞(PAS×400)。

图 2 PAS 染色观察传导细胞

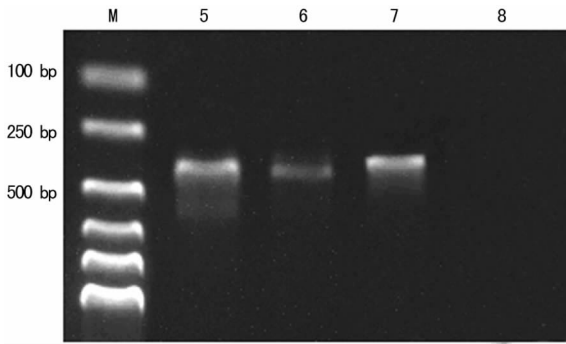
2.3 RT-PCR 扩增结果 以 100 bp DNA Ladder 的分子标记物为标志,两组犬的肺静脉与左心房组织中分别于 393、313、392 bp 处可见扩增产物,320 bp 处无扩增产物,电泳带的位置分别与 HCN2、HCN4、β-actin 理论值相符(图 3~6)。

2.4 两组犬肺静脉及左心房中 HCN1、2、4 mRNA 表达变化 两组犬肺静脉的 HCN4 mRNA 表达水平均明显高于左心房 ($P < 0.05$),房颤组肺静脉与左心房的 HCN2、HCN4 mRNA 表达水平较对照组均明显升高 ($P < 0.05$),且房颤组肺静脉中 HCN2 的 mRNA 表达水平明显高于房颤组左心房,但对照组肺静脉与左心房的 HCN2 mRNA 表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。



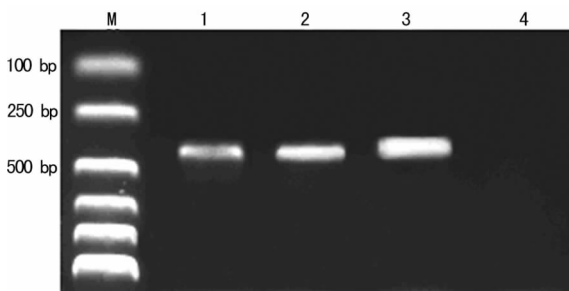
M: 分子标记物; 1: β-actin; 2: HCN2; 3: HCN4; 4: HCN1。

图 3 对照组肺静脉各目的基因及内参的 RT-PCR 电泳图



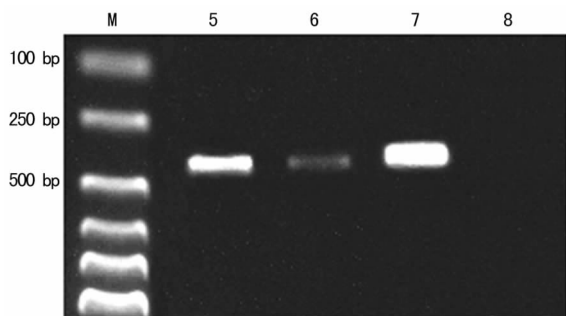
M: 分子标记物; 5: β -actin; 6: HCN2; 7: HCN4; 8: HCN1.

图 4 对照组左心房心肌各目的基因及内参的 RT-PCR 电泳图



M: 分子标记物; 1: β -actin; 2: HCN2; 3: HCN4; 4: HCN1.

图 5 房颤组肺静脉各目的基因及内参的 RT-PCR 电泳图



M: 分子标记物; 5: β -actin; 6: HCN2; 7: HCN4; 8: HCN1.

图 6 房颤组左心房心肌各目的基因及内参的 RT-PCR 电泳图

表 2 两组犬肺静脉与左心房心肌 HCN1、HCN2、HCN4 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	部位	HCN1	HCN2	HCN4
对照组	左心房	—	0.646 ± 0.082	1.066 ± 0.404
	肺静脉	—	0.562 ± 0.081	1.567 ± 0.042 ^a
房颤组	左心房	—	0.850 ± 0.107 ^b	1.795 ± 0.032 ^b
	肺静脉	—	1.230 ± 0.088 ^{ab}	2.113 ± 0.151 ^{ab}

—: 未测到 mRNA 表达量; ^a: $P < 0.05$, 与同组左心房比较; ^b: $P < 0.05$, 与对照组相同部位比较。

3 讨论

肺静脉的解剖结构与阵发性房颤的关系密切,既往有研究发现肺静脉中存在由左心房延伸到肺静脉的心肌袖,并且具有电活动^[5-6]。本研究采用 HE 染色观察到犬肺静脉肌袖心肌纤维呈各种方向排列,但多数呈交错缠绕的非均一性排列,心肌纤维集成束,呈环形、纵形和斜形排列。有学者认为肺静脉肌袖的心肌细胞排列混乱,可能是导致该部位电活性不均一的基础,进而易于诱发折返^[7],导致房颤的发生。

起搏细胞是心脏产生起搏的基础,有研究发现,在传导组织以外的不同部位还散在、无规律地分布着单个 P 细胞或 P 细胞团^[8-9]。大量动物研究已证实^[10-11],肺静脉肌袖组织中存在单个或聚集分布的 P 样细胞,神经内分泌机制可以调节其电活动,使其易于产生自律性增高的电活动,成为异位兴奋灶,导致局灶性房颤的发生。当窦房结和心房的功能正常时,P 样细胞的起搏功能被心脏正常节律所抑制。当机体神经内分泌等因素发生变化时,肺静脉肌袖组织中的 P 样细胞以触发或驱动机制导致房颤的发生。而肺静脉肌袖肌纤维的环形、斜行和纵行分布,使 P 样细胞产生的激动在肺静脉内传导方向和速度不同,产生传导延迟或阻滞,为微折返环形成创造条件,这些因素均可协同促进房颤的发生与维持。PAS 染色常用于检测蒲肯野纤维及其他心肌传导细胞中的糖原^[12],本实验就采用此方法在肺静脉中发现了染色阳性的细胞,初步说明肺静脉中有传导细胞的存在。这些细胞可以产生自律性的电活动,从而构成了肺静脉源性房颤的组织细胞学基础。

HCN 通道有 4 种亚型,在哺乳动物心脏中目前发现只有 HCN1、HCN2 及 HCN4 3 种亚型表达^[3],它们所产生的电流均具有典型的 If 电流特征,然而其在肺静脉的表达及该电流在房颤中所起的作用还不是很清楚。本实验对犬肺静脉中 HCN 通道的 mRNA 表达水平进行了研究,证实了肺静脉中有该通道的存在。HCN4 是产生起搏电流的主要离子通道,与传导组织的自律性细胞密切相关^[13],是正常起搏电流产生的重要因素,这与本实验的结果是一致的,两组的肺静脉与左心房中都是以 HCN4 为主,肺静脉更高,这可能也是其 If 电流增高的原因之一。以往的研究表明在病理情况下 If 的表达是增加的。If 通道 mRNA 在充血性心力衰竭左心房充盈压升高时表达增加,而房颤患者升高更明显,提示房颤的发生可能与 If 过度活动有关^[14]。本实验发现房颤组肺静脉与左心房的 HCN4、HCN2 的 mRNA 表达水平均明显高于对照组,并且两组肺静脉中 HCN4 的 mRNA 表达均明显高于左心房,这种差异性可能是其离子流差异的分子基础,从而导致复极异质性,利与房颤的发生。

HCN2 通道主要与非自律性的心肌相关,并与舒张期膜电位的维持有关^[15],本实验发现对照组肺静脉与左心房组织中 HCN2 的浓度无明显差异,说明其在肺静脉心肌自发活动中可能不起关键作用。肺静脉肌袖能够产生舒张期自动除极可能并不是由单一的 If 电流引起,而是由于多种离子流综合作用形成的微弱内向离子流所致。但房颤组肺静脉与左心房 HCN2 有明显差异,这说明肺静脉的潜在起搏活性,病理状态时 HCN2 可能起着重要作用。当然这与取材部位的不同可能也有一定关系。HCN1 通道并非心室肌和心房肌组织的主要通道亚型,其浓度很少,本实验对照组及房颤组肺静脉与左心房组织中均无 HCN1 的 mRNA 表达,这也可能是其表达量很少,本实验未能检测出。从此可以推断,房颤患者心房电重构或 If 增高可能不是源于 HCN1 转录水平的异常。本研究发现 HCN 通道在房颤的发生机制中可能起着重要的作用,从而为房颤的临床药物治疗提供了新靶点。

参考文献:

- [1] Haissaguerre M, Jaïs P, Shah DC, et al. Spontaneous initiation of atrial fibrillation by ectopic beats originating in the pulmonary veins[J]. N Engl J Med, 1998, 339(10): 659-666.
- [2] Barbuti A, Baruscotti M, DiFrancesco D. The pacemaker current; from basics to the clinics[J]. (下转第 3655 页)

于修复早期,ITF 的表达有上调的趋势。与病毒组相比,GCV 组结肠组织中 ITF 表达明显升高,提示 GCV 在 CMV 肠道感染中的治疗作用可能是通过上调 ITF 基因表达,促进受损区域上皮细胞的重建,可能是药物发挥黏膜修复重建作用的机制之一。

综上所述,ITF 在 CMV 感染肠道的发生、发展中起着重要作用,这也为 CMV 的发病机制研究及其临床治疗提供了一个新方向。引用外源性 ITF 或者提升 ITF 活性可能成为治疗 CMV 感染的新靶点。

参考文献:

- [1] Kim HC, Hwang EA, Park SB, et al. Historical comparison of prophylactic ganciclovir for gastrointestinal cytomegalovirus infection in kidney transplant recipients[J]. *Transplant Proc*, 2012, 44(3): 710-712.
- [2] Maher MM, Nassar MI. Acute cytomegalovirus infection is a risk factor in refractory and complicated inflammatory bowel disease[J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54(11): 2456-2462.
- [3] Torres-Madrizg T, Boucher HW. Immunocompromised hosts: perspectives in the treatment and prophylaxis of cytomegalovirus disease in solid-organ transplant recipients[J]. *Clin Infect Dis*, 2008, 47(5): 702-711.
- [4] Kjelle S. The trefoil factor family-small peptides with multiple functionalities[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66(8): 1350-1369.
- [5] 王焕, 吴修文, 万千雪, 等. 肠三叶因子和黏蛋白对烧伤血清所致肠上皮细胞增殖移行能力变化的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2011, 27(5): 347-352.
- [6] Neal MD, Richardson WM, Sodhi CP, et al. Intestinal stem cells and their roles during mucosal injury and re-

pair[J]. *J Surg Res*, 2010, 167(1): 1-8.

- [7] Poulsen SS, Kissow H, Hare K, et al. Luminal and parental TFF2 and TFF3 dimer and monomer in two models of experimental colitis in the rat [J]. *Regul Pept*, 2005, 126(3): 163-171.
- [8] 徐翼, 方峰, 董永绥, 等. 小鼠巨细胞病毒全身播散型感染模型的建立[J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(6): 517-520.
- [9] Onyeagocha C, Hossain MS, Kumar A, et al. Latent cytomegalovirus infection exacerbates experimental colitis[J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(5): 2034-2042.
- [10] Suzuki H, Kato J, Kuriyama M, et al. Specific endoscopic features of ulcerative colitis complicated by cytomegalovirus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(10): 1245-1251.
- [11] Sasaki M, Ikeda H, Nakanuma Y. Expression profiles of MUC mucins and trefoil factor family (TFF) peptides in the intrahepatic biliary system; physiological distribution and pathological significance[J]. *Prog Histochem Cytochem*, 2007, 42(2): 61-110.
- [12] Vandembroucke K, Hans W, Van Huysse J, et al. Active delivery of trefoil factors by genetically modified *Lactococcus lactis* prevents and heals acute colitis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(2): 502-513.
- [13] Beck PL, Wong JF, Li Y, et al. Chemotherapy- and radiotherapy-induced intestinal damage is regulated by intestinal trefoil factor[J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(3): 796-808.

(收稿日期: 2013-06-02 修回日期: 2013-06-20)

(上接第 3652 页)

- J Cardiovasc Electrophysiol, 2007, 18(3): 342-347.
- [3] Ishii TM, Takano M, Xie LH, et al. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation Channel in rabbit heart sinoatrial node[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(18): 12835-12839.
- [4] Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents; from molecules to physiological function [J]. *Annu Rev Physiol*, 2003, 65: 453-480.
- [5] DeBakker JM, Ho SY, Hocini M. Basic and clinical electrophysiology of pulmonary vein ectopy[J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 54(2): 287-294.
- [6] Nakajima Y, Yoshimura K, Nomura M, et al. Expression of HNK1 epitope by the cardiomyocytes of the early embryonic chick; in situ and in vitro studies[J]. *Anat Rec*, 2001, 263(3): 326-333.
- [7] Hocini M, Ho SY, Kawara T, et al. Electrical conduction in canine pulmonary veins; electrophysiological and anatomic correlation [J]. *Circulation*, 2002, 105(20): 2442-2448.
- [8] Deruiter MC, Gittenberger-De Groot AC, Wenink AC, et al. In normal development pulmonary veins are connected to the sinus venosus segment in the left atrium[J]. *Anat Rec*, 1995, 243(1): 84-92.

- [9] Masani F. Node-like cells in the myocardial layer of the pulmonary vein of rats; an ultrastructural study [J]. *J Anat*, 1986, 145: 133-142.
- [10] Cheung DW. Electrical activity of the pulmonary vein and its interaction with the right atrium in the guinea-pig[J]. *J Physiol*, 1981, 314: 445-456.
- [11] Wang B, Du RY, Zheng QS, et al. P-like cells in myocardial sleeves of pulmonary veins in dogs[J]. *J Fourth Milit Med Univ*, 2001, 22(12): 12-15.
- [12] Block MI, Said JW, Siegel RJ, et al. Myocardial myoglobin following coronary artery occlusion. an immunohistochemical study[J]. *Am J Pathol*, 1983, 111(3): 374-379.
- [13] Ludwig A, Zong X, Hofmann F, et al. Structure and function of cardiac pacemaker channels[J]. *Cell Physiol and Biochem*, 1999, 9(4/5): 179-186.
- [14] Lai LP, Su MJ, Lin JL, et al. Measurement of funny current(I_f) Channel mRNA in human atrial tissue; correlation with left atrial filling pressure and atrial fibrillation [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 1999, 10(7): 947-953.
- [15] Qu J, Kryukova Y, Potapova IA, et al. MiRP1 modulates HCN2 Channel expression and gating in cardiac myocytes [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(42): 43497-43502.

(收稿日期: 2013-05-09 修回日期: 2013-06-17)