

慢性心房颤动降低 Junctophilin-2 在心房中的表达研究*

李妙龄, 欧贤红, 李涛, 毛亮, 杨艳, 曾晓荣[△]
(西南医科大学心血管医学研究所, 四川泸州 646000)

[摘要] 目的 明确在慢性心房颤动(AF)中 Junctophilin-2(JPH2)表达变化及意义。方法 从心脏外科体外循环手术中获取 21 例窦性心律(SR)患者和 30 例慢性 AF 患者右心房肌组织,采用免疫组织化学方法测定心房肌组织 JPH2 蛋白的分布;实时荧光定量 PCR 法检测心房肌 JPH2 mRNA 水平;Western blot 测定人心房肌 JPH2 蛋白水平。结果 免疫组织化学实验发现 SR 组与 AF 组心房肌组织上均存在 JPH2 蛋白表达,SR 组着色更明显;AF 组心房肌 JPH2 mRNA 水平和蛋白水平均明显低于 SR 组($P < 0.01$)。结论 慢性 AF 患者心房肌 JPH2 的表达下调可能与心房肌细胞内钙紊乱密切相关。

[关键词] 心房颤动;心房;钙;Junctophilin-2

[中图分类号] R541.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)22-3046-03

Down-regulation of Junctophilin-2 in human atrial from patients with chronic atrial fibrillation*

Li Miaoling, Ou Xianhong, Li Tao, Mao Liang, Yang Yan, Zeng Xiaorong[△]

(Institute of Cardiovascular Research, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the change and significance of Junctophilin-2(JPH2) expression in chronic atrial fibrillation (CAF). **Methods** Right atrial muscle tissue of 21 patients with sinus rhythm (SR) and 30 patients with chronic atrial fibrillation (AF) were obtained from cardiopulmonary bypass surgery. The distribution of JPH2 in human atrial was assayed by immunohistochemistry technique; mRNA expression level was measured by the qRT-PCR, and the protein expression level of JPH2 was determined using Western blot analysis. **Results** Immunohistochemistry experiments found that the expression of JPH2 protein was found in right atrial muscle tissue of SR group and AF group, SR group staining was more obvious; JPH2 mRNA levels and protein levels were significantly lower in group AF than in SR group ($P < 0.01$). **Conclusion** JPH2 is widely distributed in atrial muscle cells of SR group and AF group, the expression of JPH2 in patients with CAF may be closely related to the atrial myocytes calcium disorder.

[Key words] atrial fibrillation; heart atria; calcium; Junctophilin-2

心房颤动(atrial fibrillation, AF)是临床最为常见的持续性心律失常,有较高的发病率和致死率,临床治疗效果欠佳,药物治疗还可增加室性心律失常的发生率^[1]。细胞内钙处理异常被认为是心房功能紊乱的最主要原因^[2]。Junctophilins (JPHs)是新近发现存在细胞膜 L 型钙通道(LTCC)与肌浆网 RyR2 间的膜耦联复合物,是可兴奋细胞参与细胞内钙信号传导的重要亚细胞结构^[3]。JPHs 包括 4 种亚型 JPH1、JPH2、JPH3 和 JPH4,心肌上主要表达 JPH2。有研究发现小鼠心脏 JPH2 基因沉默可导致肌浆网钙泄漏而致心力衰竭^[4],而在 AF 心肌中 JPH2 会发生怎样的改变,目前还不清楚。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所取标本来源于 2013 年 3~11 月本院胸心外科体外循环手术患者右心房肌组织,包括窦性心律(SR)21 例和慢性 AF 患者 30 例,术前所有患者均签署了知情同意书,并获得医院伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 取 SR 组 5 例和 AF 组 5 例患者右心房组织用于免疫组织化学染色。标本从术中取回后经 10% 福尔马林固定后制作蜡块后切片,给予 JPH2 一抗(Abcam 公司, 1:200)孵育过夜,二抗(HRP 1:2000)孵育 30 min。应用二

氨基联苯胺显色,并在显微镜下观察,显色后 5 min,复染再脱水,用中性树脂封片。细胞膜和胞质呈现二氨基联苯胺棕黄色着色为表达阳性。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法测定人心房 JPH2 mRNA 表达水平 JPH2: 上游引物 5'-CTT TGA GGT GGC AGG TGT CTA-3', 下游引物 5'-ATT CCG TAG CGT CCC TTG A-3'; β -actin: 上游引物 5'-ACA CTG TGC CCA TCT ACG-3', 下游引物 5'-TGT CAC GCA CGA TTT CC-3'。Trizol 法提取心房肌总 RNA,采用 ReverTra-Plus 扩增试剂盒从 1 μ g 总 RNA 中逆转录合成 cDNA,所得 cDNA 以 SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix(TOYOBO)进行扩增,以 β -actin 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.2.3 Western blot 检测 JPH2 蛋白水平 将心脏手术中取回的心房肌标本于 PBS 液中去血液,剪去结缔组织及脂肪组织后,放入预先标记好的 EP 管中于 -80 $^{\circ}$ C 冻存备用。收集齐标本后(SR 组 16 例,AF 组 25 例)于冰上冻融并剪成小块(1 mm \times 1 mm \times 1 mm),加入裂解液 20 mg/100 μ L 间断匀浆 2 min,至无明显颗粒后,在超声波下处理 3 次,每次 10 s。随后于冰上裂解 30 min,再以 10 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min 取上清液。取少量上清液用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒按

使用说明测定蛋白质浓度。以每孔 25 μg 蛋白量进行 SDS-PAGE 电泳,先以 80 V 电容 40 min,再以 100 V 电泳 120 min,电泳完成后再转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,经 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,用 JPH2 一抗(Abcam 1:500)和 GAPDH 一抗(1:2000)孵育过夜,隔日用辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10000)孵育,采用化学荧光(罗氏)显影。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用非配对 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料特征 持续性 AF 患者持续时间均大于 6 个月。AF 组左房直径明显大于 SR 组,心功能 IV 级患者多于 SR 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 免疫组织化学法测定 JPH2 在人心房中的分布 SR 组心肌排列明显比 AF 组有规律,呈条索状排列;从组织着色可以看出 SR 组和 AF 组心房肌上均存在 JPH2 的表达,且 SR 组患者的棕黄色颗粒明显多于 AF 组。见图 1。

2.3 两组心房肌 JPH2 mRNA 水平 根据图像成像扫描,在 196 bp 和 142 bp 处分别观察到 JPH2 和 β-actin 扩增引物,以 SR 组与 AF 组心房肌 JPH2/β-actin 的比值为 1.00 ± 0.21 vs. 0.38 ± 0.04 ($P < 0.01$),经统计分析表明 AF 组心房肌 JPH2 mRNA 表达水平比 SR 组明显降低了(61.9 ± 3.6)%。

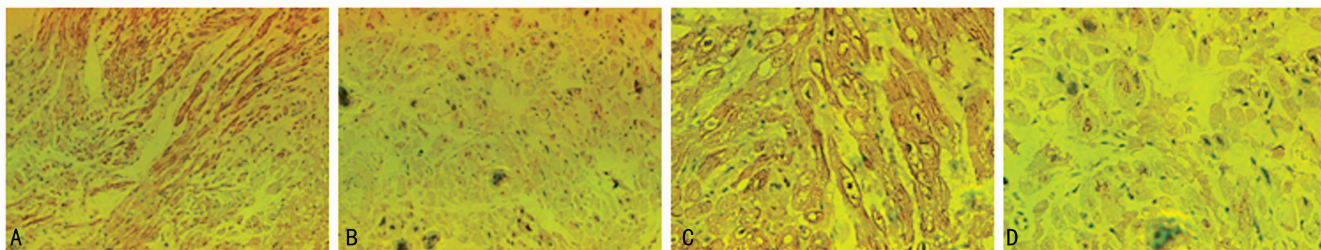
2.4 两组心房肌 JPH2 蛋白水平 根据显影灰度值定量分析

JPH2 与 GAPDH 比值,经统计 SR 组与 AF 组的比值为 1.35 ± 0.38 vs. 0.62 ± 0.21 ($P < 0.01$)。结果显示与 SR 组相比,AF 组 JPH2 降低了(54.2 ± 4.61)%。见图 2。

表 1 患者资料

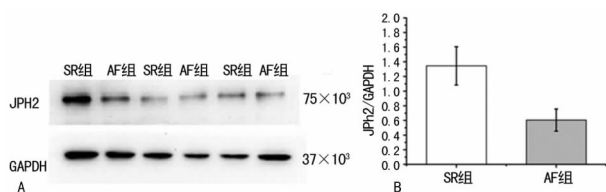
项目	SR 组(n=21)	AF 组(n=30)
男/女(n/n)	8/13	14/16
年龄($\bar{x} \pm s$,岁)	42.5 ± 5.2	48.2 ± 7.5
二尖瓣病变(n)	9	14
主动脉瓣病变(n)	5	9
瓣膜联合病变(n)	7	7
心功能分级(n)		
II	5	3
III	16	14
IV	0	3 [△]
左室射血分数($\bar{x} \pm s$,%)	53.7 ± 2.3	56.5 ± 3.6*
左房直径($\bar{x} \pm s$,mm)	41.4 ± 2.8	55.6 ± 3.6*
室间隔厚度($\bar{x} \pm s$,mm)	10.5 ± 0.6	11.2 ± 0.3
左室后壁厚度($\bar{x} \pm s$,mm)	9.5 ± 0.9	10.2 ± 0.4

*: $P < 0.05$,[△]: $P < 0.01$,与 SR 组比较。



A:SR 组(×200);B:AF 组(×200);C:SR 组(×400);D:AF 组(×400)。

图 1 人心房肌 JPH2 免疫组织化学染色结果



A:JPH2 蛋白印迹原始图;B:标准化的 JPH2 蛋白的表达水平。

图 2 两组心房肌 JPH2 蛋白水平

3 讨论

本实验结果表明, JPH2 均广泛分布于 SR 和慢性 AF 患者心房肌组织中。与 SR 患者相比,从组织水平、基因和蛋白水平均证明了慢性 AF 患者心房肌 JPH2 表达明显下调,表明 AF 改变了 JPH2 的正常功能,可能参与了 AF 的发生和维持。

JPHs 是新近发现存在于可兴奋细胞膜与肌浆网之间的膜耦联蛋白,使二者保持在一个较近的距离^[4],有利于细胞膜与肌质膜之间的信号转导,在兴奋-收缩耦联过程中发挥重要作用。JPHs 在哺乳动物中有多种亚型分布, JPH2 主要分布在心肌上, JPH2 位于细胞膜 L 型钙通道与肌浆网 RyR 间的连接蛋白,对细胞内钙稳态调控中发挥重要作用^[5-6]。在生理状态

下, JPH2 在心肌超微结构形成和对心脏负荷的反应中起到重要保障作用。JPH2 功能调节异常与多种心血管疾病相关,目前对于 JPH2 功能异常对心脏的损害主要集中在心肌肥大及与心力衰竭的相关性研究。研究发现心肌肥大可引起 JPH2 表达下调,同样心肌 JPH2 基因沉默可降低心肌兴奋-收缩耦联和细胞内钙稳态^[7]。JPH2 过表达不能增强其基本功能,但能缓解向心力衰竭的发展^[8]。在心力衰竭心肌细胞上^[9],心脏负荷可导致 JPH2 的转运异常, JPH2 失去在 T 管/Z 线区域的正常定位,导致其在细胞膜上的重新分布。

不正常的细胞内钙处理在心房颤动的发生与维持中发挥重要作用。本研究中发现 JPH2 在 AF 时明显下调,这表明 AF 使 JPH2 功能下调,心房肌兴奋-收缩耦联,兴奋收缩耦联效率降低,细胞内钙调节紊乱,进而影响心房肌的收缩功能。有研究发现^[10], JPH2 突变 E169K 可导致阵发性 AF 或室上性心动过速的发生,可能与其损害细胞内钙调节相关。进一步研究发现在 HL-1 细胞上^[11], JPH2 突变 S101R, Y141H 或 S165F 使细胞自发性钙释放的幅度和频率均明显降低。舒张期肌浆网钙泄漏是 AF 的重要病理机制之一。研究发现^[10],降低 JPH2 表达可通过直接增加 RyR2 开放概率和间接降低

钠钙交换体活性,进而增加肌浆网钙泄漏,促进心力衰竭的发展。这也间接表明 AF 时 JPH2 表达下调可能通过增加钙泄漏而促进 AF 的发展。

最新研究发现^[10],JPH2 错义突变降低了 JPH2 与 RyR2 间的结合比率,使 RyR2 功能受损导致舒张期肌浆网钙泄漏和房性心律失常,这表明了 JPH2 可能是治疗 AF 的潜在靶点。与此同时在同一期杂志上另有课题组也证明 JPH2 在稳定 RyR2 功能中发挥重大作用,也同时证明了 JPH2 功能异常参与了 AF 钙泄漏过程。本结果也支持了 JPH2 表达下调参与了 AF 病理生理机制的调节,为探索 AF 的潜在治疗靶点提供理论依据。

参考文献

- [1] European Heart Rhythm A, European Association for Cardio-Thoracic S, Camm AJ, et al. Guidelines for the management of atrial fibrillation; The task force for the management of atrial fibrillation of the european society of cardiology(esc)[J]. *Eur Heart J*, 2010, 31(19): 2369-2429.
- [2] Wakili R, Yeh YH, Yan Qi, et al. Multiple potential molecular contributors to atrial hypocontractility caused by atrial tachycardia remodeling in dogs[J]. *Cir Arrh Electrophysiol*, 2010, 3(6): 530-541.
- [3] Nishi M, Mizushima A, Nakagawara K, et al. Characterization of human junctophilin subtype genes[J]. *Bioc Biophysical Res Commu*, 2000, 273(10): 920-927.
- [4] Jayasinghe ID, Baddeley D, Kong CH, et al. Nanoscale organization of junctophilin-2 and ryanodine receptors within peripheral couplings of rat ventricular cardiomyocytes [J]. *Biophysical J*, 2012, 102(1): 19-21.
- [5] Golini L, Chouabe C, Berthier C, et al. Junctophilin 1 and

2 proteins interact with the l-type Ca^{2+} channel dihydropyridine receptors (dhprs) in skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(30): 43717-43725.

- [6] van Oort RJ, Garbino A, Wang W, et al. Disrupted junctional membrane complexes and hyperactive ryanodine receptors after acute junctophilin knockdown in mice[J]. *Circulation*, 2011, 123(10): 979-988.
- [7] Landstrom AP, Kellen CA, Dixit SS, et al. Junctophilin-2 expression silencing causes cardiocyte hypertrophy and abnormal intracellular calcium-handling [J]. *Circ Heart Fail*, 2011, 4(3): 214-223.
- [8] Guo A, Zhang X, Iyer VR, et al. Overexpression of junctophilin-2 does not enhance baseline function but attenuates heart failure development after cardiac stress [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(20): 12240-12245.
- [9] Zhang C, Chen B, Guo A, et al. Microtubule-mediated defects in junctophilin-2 trafficking contribute to myocyte transverse-tubule remodeling and Ca^{2+} handling dysfunction in heart failure[J]. *Circulation*, 2014, 129(20): 1742-1750.
- [10] Beavers DL, Wang W, Ather S, et al. Mutation e169k in junctophilin-2 causes atrial fibrillation due to impaired RyR2 stabilization[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 62(30): 2010-2019.
- [11] Landstrom AP, Weisleder N, Batalden KB, et al. Mutations in jph2-encoded junctophilin-2 associated with hypertrophic cardiomyopathy in humans[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(11): 1026-1035.

(收稿日期:2016-03-15 修回日期:2016-04-18)

(上接第 3045 页)

- a and myostatin in cancer cachexia[J]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2013, 74(2): 79-81.
- [8] Hoda MA, Münzker J, Ghanim B, et al. Suppression of activin A signals inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells[J]. *Br J Cancer*, 2012, 107(12): 1978-1986.
- [9] Hofland J, Van Weerden WM, Steenbergen J, et al. Activin a stimulates AKR1C3 expression and growth in human prostate cancer [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(12): 5726-5734.
- [10] Maeshima A, Miya M, Mishima K, et al. Activin a: autocrine regulator of kidney development and repair[J]. *Endocr J*, 2008, 55(1): 1-9.
- [11] Xu J, Oakley J, Mcgee EA. Stage-specific expression of Smad2 and Smad3 during folliculogenesis [J]. *Biol Reprod*, 2002, 66(6): 1571-1578.
- [12] Zalzman M, Anker-Kitai L, Efrat S. Differentiation of human liver-derived, insulin-producing cells toward the beta-cell phenotype[J]. *Diabetes*, 2005, 54(9): 2568-2575.
- [13] Ferreira MC, Witz CA, Hammes LS, et al. Activin a in-

creases invasiveness of endometrial cells in an in vitro model of human peritoneum[J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(5): 301-307.

- [14] Kim YI, Kim BH, Khang I, et al. Cell growth regulation through apoptosis by activin in human gastric cancer SNU-16 cell lines[J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(2): 491-497.
- [15] Gold E, Risbridger G. Activins and activin antagonists in the prostate and prostate cancer[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2012, 359(1/2): 107-112.
- [16] Zhang Y, Bao YL, Yang MT, et al. Activin a induces SLC5A8 expression through the Smad3 signaling pathway in human colon cancer RKO cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(12): 1964-1972.
- [17] Liu SG, Li HC, Zhao BS, et al. Expression of activin A in tissue and serum of patients with esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2013, 35(11): 843-847.

(收稿日期:2016-02-19 修回日期:2016-03-26)