

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.09.001

决奈达隆对新生大鼠心室肌细胞 HCN 通道 mRNA 和蛋白表达的影响^{*}

陈琳琳,范新荣,李 涛,李 光,李妙龄,欧贤红,兰 欢,黄梦颖,曾晓荣[△]

(西南医科大学医学电生理学省部教育部重点实验室/四川省心血管疾病防治协同创新中心,四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 通过检测新生大鼠心室肌细胞在给予药物决奈达隆前后超极化激活环核苷酸门控阳离子通道(HCN 通道)mRNA 和蛋白水平的变化,探讨决奈达隆对 HCN 通道表达的影响。**方法** 分离新生 SD 大鼠心室肌,Ⅱ型胶原酶消化,通过差速贴壁分离法收集获得单一的心室肌细胞。并根据浓度(0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 μmol/L 的决奈达隆对细胞进行处理 48 h)和时间(浓度为 10 μmol/L 的决奈达隆对细胞进行 1、6、12、24、48 h 的处理)梯度分组。采用实时荧光定量 PCR 法和 Western blot 检测 HCN2、HCN4 通道 mRNA 水平和蛋白水平。**结果** 浓度梯度组和时间梯度组的 HCN2 mRNA 和 HCN4 mRNA 表达水平均低于对照组($P<0.05$);与对照组比较,10 μmol/L 决奈达隆处理后 12 h 组的蛋白水平明显下调($P<0.01$)。**结论** 决奈达隆可抑制 HCN2、HCN4 通道 mRNA 和蛋白的表达,且作用呈浓度依赖性,在给药后 12 h 达到最大作用。

[关键词] 决奈达隆;超极化激活环核苷酸门控阳离子通道;RNA,信使;蛋白质类

[中图分类号] R319 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)09-1153-03

Effect of dronedarone on HCN channel mRNA and protein expression in neonatal rat ventricular myocytes^{*}

Chen Linlin, Fan Xinrong, Li Tao, Li Guang, Li Miaoling, Ou Xianhong, Lan Huan, Huang Mengying, Zeng Xiaorong[△]

(Key Laboratory of Medical Electrophysiology of Ministry of Education, Collaborative Innovation Center for Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease/Institute of Cardiovascular Research, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of dronedarone on hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated (HCN) channel expression by detecting the change of HCN channel mRNA and protein level before and after giving dronedarone in neonatal rat ventricular myocytes. **Methods** Neonatal rat ventricular myocytes were separated and digested by type Ⅱ collagenase, and then single ventricular myocytes were collected through differential sticking wall separation method. According to the concentrations (0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0 μmol/L of dronedarone for treating myocytes for 48 h) and time (10 μmol/L of dronedarone for treating myocytes for 1, 6, 12, 24, 48 h) the gradient grouping was conducted. The levels of HCN2 and HCN4 channel mRNA and protein level were determined by real-time PCR and Western blot. **Results** The HCN2 mRNA and HCN4 mRNA expression levels in concentration gradient group and time gradient group were lower than those in the control group ($P<0.05$); compared with the control group, the protein level in the 10 μmol/L dronedarone treatment for 12 h group was significantly down-regulated ($P<0.01$). **Conclusion** Dronedarone could inhibit the expression of HCN2/HCN4 channel mRNA and protein, moreover its action shows the concentration dependency and reaches the maximum at 12 h after medication.

[Key words] dronedarone; hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated; RNA, messenger; proteins

超极化激活环核苷酸门控阳离子通道(hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-gated, HCN)是心肌电重构中的重要离子通道^[1],现有多个研究已表明 HCN 通道表达上的变化在心律失常的发生和维持中起着重要的作用^[2-6]。决奈达隆(Dronedarone),即 N-[2-丁基-3-[4-(3-二丁氨基丙醇)苯甲酰]-5-苯并呋喃基]甲基磺酰胺(IUPAC)(SR33589),是一类苯并呋喃的衍生物,与胺碘酮在结构上很相似,临床药理证实决奈达隆对机体甲状腺没有毒性损害,被认为是较为理想的抗心律失常药物。本文通过检测 HCN 通道的 mRNA 和蛋白表达的变化,探讨决奈达隆对 HCN 通道表达的影响,为心律失常寻求更有效的防治方法奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)动物:1~3 d 新生健康清洁级 SD 大鼠,雌雄不限(共 10 批,每批 8 只),购自西南医科大学实验动物中心[SCXK(川)2013-17]。(2)试剂:盐酸决奈达隆购自 selleckchem 公司,超纯 RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购自康为世

纪公司,SYBR Green 定量 PCR 反应试剂盒购自 QIAGEN 公司,DMEM 培养基、胎牛血清购自 Hyclone 公司,实验中涉及的生化试剂均为分析纯产品。(3)仪器:冷冻高速离心机购自 Thermo Fisher 公司,PCR 仪、实时定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司,紫外分光光度计购自 NanoDrop 公司,凝胶成像分析系统购自 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 新生大鼠心肌的制备与培养 取 1~3 d 新生健康清洁级 SD 大鼠,参考文献[7]分离原代乳鼠心肌细胞,通过差速贴壁分离法收集获得单一的心室肌细胞。上述所得细胞于 37℃、5%CO₂ 敷育箱中培养以备分子生物学实验用。

1.2.2 决奈达隆用药方法 决奈达隆不易溶于水,故选择二甲亚砜(DMSO)配置 10 mmol/L 的决奈达隆溶液,实验时根据所需浓度稀释到细胞外液中,为了不影响细胞膜离子通道功能,使 DMSO 浓度均低于 0.1%。

1.2.3 动物分组 将 75 只新生大鼠根据药物处理分为浓度

(0.1、0.5、1.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的决奈达隆对细胞进行处理 48 h)和时间(浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的决奈达隆对细胞进行 1、6、12、24、48 h 的处理)梯度分组,另设对照组和实验组,每组 5 只。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 实验方法 (1)总 RNA 提取:按照康为世纪公司的超纯 RNA 提取试剂盒操作,提取心肌细胞总 RNA,紫外分光光度计检测吸光度(OD)值, OD_{260}/OD_{280} 均为 1.8~2.0,记录总 RNA 浓度。(2)引物设计:根据 Gene Bank 中公布的 HCN2、HCN4 基因序列设计引物,选择 β -actin 基因作为内参基因,引物序列见表 1。(3)RT-PCR 扩增:①逆转录合成 cDNA。按照康为世纪逆转录试剂盒进行逆转录,取总 RNA 为 500 ng,逆转录的反应体系为 20 μL 。反应条件,42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 50 min,80 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却。合成后的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。②实时荧光定量 PCR 反应。按照 SYBR Green 定量 PCR 反应试剂盒(QIAGEN 公司)进行实验,取 cDNA 2 μL ,反应体系为 20 μL 。荧光定量 PCR 反应条件,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s,共 40 个循环。获取实验数据,比较各浓度组和各时间组与对照组之间 HCN2 mRNA 和 HCN4 mRNA 表达的差异。采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 分析各个浓度和时间决奈达隆对 HCN2 mRNA 和 HCN4 mRNA 表达的影响(将不做药物处理和时间处理的定义为对照组,对照组基因相对表达量为 1)。

表 1 HCN2、HCN4 及 β -actin 基因引物序列

名称	序列号	引物序列	产物长度(bp)
HCN2	C04200176	F:GAATCGACTCCGAGGTCTACAAG	82
	C04200177	R:AGCAACCGCAGCAGACTGA	
HCN4	C04200178	F:GCTGACCAAGTTGCGTTTTTG	97
	C04200179	R:CACGCCGTGCTGGATAAAGT	
β -actin	C04200180	F:AGGGAAATCGTGCGTGACAT	150
	C04200181	R:GAACCGCTCATTGCCGATAG	

1.2.5 Western blot 实验方法 实验各组与对照组细胞中 HCN2、HCN4 蛋白检测,依据细胞的密度加入相应量的 Lysis buffer 裂解液(含蛋白酶抑制剂),冰上裂解 30 min 后,细胞超声粉碎仪处理 1 min,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温离心机中 12 000 r/min 离心 15 min,取得上清液为提取的心肌细胞总蛋白,置于新的 EP 管中备用。同时取少量上清液,利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,按照使用说明测定蛋白质水平。制备分离胶、浓缩胶,上样,电泳。将电泳后凝胶上的蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜,ECL 显色曝光。采用 Quantity One 软件分析处理所得图像。目的蛋白相对表达量=目的蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值。Western blot 实验以 10 $\mu\text{mol/L}$ 的决奈达隆对细胞进行处理 12 h 为实验组。

1.3 统计学处理 用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用两样本均数比较的 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各浓度梯度组与对照组 HCN2 mRNA 和 HCN4 mRNA 水平比较 HCN2 mRNA 和 HCN4 mRNA 水平在各浓度药物处理之后表达均有下调,且存在剂量依赖性。各浓度梯度组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

2.2 各时间梯度组与对照组 HCN2 mRNA 和 HCN4 mRNA 水平比较 HCN2 mRNA 和 HCN4 mRNA 在各个时间经过

药物处理后,表达均有下调,且在 12 h 时药物作用发挥到最大,对 HCN 通道抑制作用最大。各时间梯度组与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。

表 2 各浓度组与对照组 HCN 通道基因相对表达量比较($\bar{x}\pm s,n=5$)

组别	HCN2 基因相对表达量	HCN4 基因相对表达量
对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.75 \pm 0.06 ^a	0.78 \pm 0.04 ^b
0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.67 \pm 0.09 ^a	0.73 \pm 0.06 ^b
1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.51 \pm 0.05 ^b	0.63 \pm 0.06 ^b
5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.43 \pm 0.05 ^b	0.48 \pm 0.09 ^b
10.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.36 \pm 0.11 ^b	0.40 \pm 0.07 ^b
20.0 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.29 \pm 0.10 ^b	0.34 \pm 0.10 ^b

^a: $P<0.05$;^b: $P<0.01$,与对照组比较。

表 3 各时间组与对照组 HCN 通道基因相对表达量比较($\bar{x}\pm s,n=5$)

组别	HCN2 基因相对表达量	HCN4 基因相对表达量
对照组	1.00 \pm 0.00	1.00 \pm 0.00
1 h 组	0.50 \pm 0.04 ^b	0.63 \pm 0.10 ^a
6 h 组	0.39 \pm 0.06 ^b	0.57 \pm 0.10 ^a
12 h 组	0.19 \pm 0.06 ^b	0.30 \pm 0.06 ^b
24 h 组	0.31 \pm 0.06 ^b	0.37 \pm 0.08 ^b
48 h 组	0.38 \pm 0.04 ^b	0.41 \pm 0.12 ^b

^a: $P<0.05$;^b: $P<0.01$,与对照组比较。

2.3 实验组与对照组大鼠 HCN2、HCN4 蛋白相对表达量比较 与对照组比较,实验组大鼠 HCN2、HCN4 蛋白相对表达水平明显下调,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 1、表 4。

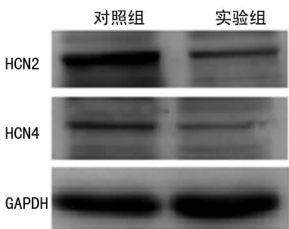


图 1 实验组与对照组 Western blot 检测

表 4 两组大鼠 HCN2、HCN4 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s,n=5$)

组别	HCN2 蛋白	HCN4 蛋白
对照组	1.18 \pm 0.17	0.56 \pm 0.13
实验组	0.54 \pm 0.05 ^a	0.22 \pm 0.08 ^a

^a: $P<0.01$,与对照组比较。

3 讨 论

HCN 通道是电压门控性阳离子通道,并且是心肌电重构中重要的离子通道,在心律失常中起着非常重要的作用。利用实时荧光定量 PCR 与 cDNA 库扫描技术在哺乳类克隆到 4 个异构型(HCN1、HCN2、HCN3、HCN4),又在心脏发现 HCN1、HCN2 和 HCN4 的表达^[8]。人类正常心肌细胞的 HCN 通道多是 HCN2 或者 HCN4 组成的异元多聚体,而 HCN1 并非主要的

通道亚型^[9]。其中 HCN2 参与了心脏起搏,并且维持心脏稳定的起搏节律^[2-3],基本表达在非自发活动的心肌细胞中^[4];HCN4 则参与维持基础心率和产生正常的起搏电位^[5-6],表达在传导系统中具有自发活动的细胞中^[4]。有研究通过收集临床患者心肌标本,应用实时荧光定量 PCR 方法,检测房颤组与窦性心律组 HCN2 mRNA 和 HCN4 mRNA 表达水平,结果房颤组的 HCN2 mRNA 和 HCN4 mRNA 表达水平均有增加^[10-11]。Lai 等^[12]在对人类左右心房及心耳组织的研究中发现,HCN 通道在慢性心房颤动患者的心肌组织中表达明显高于窦性心律的患者。Stillitano 等^[13]研究发现,在晚期缺血性心脏病患者的心肌细胞中,HCN2 mRNA 和 HCN4 mRNA 表达水平相比对照组是显著增加的,HCN 通道的表达变化可能是心力衰竭心律失常的内在机制。有实验证明,HCN2、HCN4 在心房和心室中均有表达,且与临床常见心律失常相关^[4-5,10-11]。

决奈达隆为Ⅲ类抗心律失常药物,与胺碘酮一样,是一种多通道阻滞剂,可表现出Ⅰ~Ⅳ类抗心律失常药物的电生理作用^[14]。Verrier 等^[15]以猪为实验对象建立房颤模型,实验发现决奈达隆可有效降低心室率 22.1%,提高 PR 间期 8.7%、QT 间期 3.3%,心房有效不应期(AERP)、心室有效不应期(VERP)分别提高 6.2%和 11.7%。胺碘酮作为器质性心脏病患者出现室性心动过速时的首选药物,与之比较,决奈达隆不仅在室性心律失常中治疗作用相当,在治疗房性心律失常方面也有明显的作用,而且因为其不含碘,减小了对患者甲状腺及甲状腺激素的影响,不良反应小,更适合作为临床心律失常用药。李红霞等^[16]研究发现胺碘酮呈浓度和时间依赖性降低乳鼠心室肌细胞 HCN2 和 HCN4 的 mRNA 水平,作者推测与胺碘酮同为苯并呋喃衍生物的决奈达隆可能通过抑制 HCN2 和 HCN4 通道表达从而发生抗心律失常作用。

本研究以新生大鼠心室肌细胞为研究对象,运用实时荧光定量 PCR 技术检测决奈达隆对 HCN2 mRNA、HCN4 mRNA 表达的影响,实验发现决奈达隆对 HCN 通道基因有明显的抑制作用,且呈浓度依赖性,其中用浓度为 20 μmol/L 的决奈达隆对心室肌细胞进行细胞培养处理 48 h 后,通过显微镜观察到部分细胞坏死,细胞体积缩小,连接消失,与周围细胞脱离,考虑是药物浓度过高,对细胞有不良反应,故在时间梯度中采用了 10 μmol/L 浓度的决奈达隆对心室肌细胞进行处理,实验发现决奈达隆作用于新生大鼠心室肌后 12 h,对 HCN 通道的抑制作用达到最强,12 h 后随着时间增加,抑制作用逐渐减弱,出现该现象考虑是细胞对药物的代谢作用。Western blot 实验以 10 μmol/L 浓度的决奈达隆对细胞进行处理 12 h 为实验组,结果也证实了决奈达隆可显著抑制新生大鼠心室肌 HCN2、HCN4 的蛋白的表达。

决奈达隆可抑制新生大鼠心室肌 HCN 通道 mRNA 水平和蛋白水平的表达,这为决奈达隆应用于临床心律失常奠定了理论基础。研究报道决奈达隆可用于房性心律失常,但本实验不足之处只以心室肌细胞作为研究对象,对于最终明确决奈达隆对心房肌细胞上的 HCN 通道是否仍然有明显的抑制作用和决奈达隆是否可应用于临床常见的房颤等恶性房性心律失常疾病还需进一步研究。

参考文献

[1] Amoundas AA,Wu R,Juang G,et al. Electrical and struc-

ture remodeling of the failing ventricle[J]. Pharm Ther, 2010,92(2/3):213-230.

[2] 付勇,于风旭,廖斌.超极化激活环核苷酸门控阳离子通道(HCN)与心脏生物起搏的研究进展[J].泸州医学院学报,2009,32(2):177-180.

[3] Qu J,Plotnikov AN,Danilo P,et al. Expression and function of a biological pacemaker in canine heart[J]. Circulation,2003,107(8):1106-1109.

[4] Yasui K,Liu W,Ophthof T,et al. I(f) current and spontaneous activity in mouse embryonic ventricular myocytes. [J]. Circ Res,2001,85(5):536-542.

[5] Juliane S,Franz H,Andreas L. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia[J]. Trends Cardiovasc Med,2004,14(1):23-28.

[6] Juliane S,Karen W,Georg S,et al. Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors [J]. Mol Pharmacol,2006,69(4):1328-1337.

[7] 李博,吴慧颖,朴虎林,等.新生大鼠心肌细胞原代培养方法的改良[J].中国实验诊断学,2012,16(2):200-203.

[8] Nathalie G,Marja S,Guillaume L,et al. Human atrial ion channel and transporter subunit gene-expression remodeling associated with valvular heart disease and atrial fibrillation[J]. Circulation,2005,112(4):471-481.

[9] Altomare C,Terragni B,Brioschi C,et al. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node [J]. J Physiol,2003,549(2):347-359.

[10] 付勇,刘慧,于风旭,等.风湿性心脏病心房颤动 HCN4 基因 mRNA 表达的实验研究[J].临床心血管病杂志,2012,28(11):871-873.

[11] 刘慧,于风旭,毛亮,等.风湿性心脏病心房颤动患者 HCN2mRNA 的表达[J].中国心脏起搏与心电生理杂志,2013,27(1):36-37.

[12] 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.

[13] Stillitano F,Lonardo G,Zicha S,et al. Molecular basis of funny current (If) in normal and failing human heart[J]. J Mol Cell Cardiol,2008,45(2):289-299.

[14] 蒋文平.胺碘酮抗心律失常治疗应用指南[J].中华心血管病杂志,2004,32(2):1065-1071.

[15] Verrier RL,Sobrado MF,Pagotto VP,et al. Inhibition of I(f) in the atrioventricular node as a mechanism for dronedarone's reduction in ventricular rate during atrial fibrillation[J]. J Heart Rhythm Soc,2013,10(11):1692-1697.

[16] 李红霞,杨向军,韩莲花,等.胺碘酮对乳鼠心室肌细胞起搏电流及其基因表达的影响[J].中华心血管病杂志,2007,35(5):466-470.

(收稿日期:2016-08-28 修回日期:2016-11-13)