

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.14.007

网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20190529.1634.023.html(2019-05-30)

## 兔心房组织 Kv4.3 钾通道基因表达的增龄性变化研究\*

酉鹏华<sup>1</sup>, 王军伟<sup>1</sup>, 何晓敏<sup>2△</sup>

(1. 陕西省人民医院心血管内科, 西安 710068; 2. 西安理工大学医院, 西安 710068)

**[摘要]** **目的** 观察不同年龄组兔心房 Kv4.3 钾通道 mRNA 表达的增龄性变化。**方法** 选择家兔 24 只, 分为幼年组(14~21 d)、成年组(8~10 个月)、老年组(30~35 个月), 每组 8 只, 实时荧光定量 PCR 检测兔心房 Kv4.3 钾通道 mRNA 表达情况。**结果** 3 组 Kv4.3 钾通道 mRNA 表达水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。老年组与幼年组比较表达水平明显增高 ( $P < 0.05$ ); 成年组与老年组表达水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。**结论** 增龄引起 Kv4.3 钾通道转录水平的增高, 可能是参与心房颤动电重构的一个。

**[关键词]** 心房颤动; 电重构; 增龄; Kv4.3 钾通道

**[中图分类号]** R54

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2019)14-2364-03

### Study on age-related changes of gene expression of Kv4.3 potassium channel of atrium in rabbit\*

YOU Penghua<sup>1</sup>, WANG Junwei<sup>1</sup>, HE Xiaomin<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an, Shaanxi 710068, China;

2. The Hospital of Xi'an University of Technology, Xi'an, Shaanxi 710068, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe age-related changes of gene expression of Kv4.3 potassium channel of rabbit atrium in different age groups. **Methods** Twenty-four rabbits were selected and divided into the juvenile group (14–21 d), the adult group (8–10 months) and the elder group (30–35 months), with 8 in each group. The mRNA expression of Kv4.3 potassium channel in rabbit atrium was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** The mRNA expression of Kv4.3 potassium channel was significantly different among the three groups ( $P < 0.05$ ). Compared with the juvenile group, the mRNA expression level of the elder group significantly increased ( $P < 0.05$ ); there was no significant difference between the adult group and the elder group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The age-associated increase of the transcription level of Kv4.3 potassium channel may be involved in a link of atrial fibrillation electrical remodeling.

**[Key words]** atrial fibrillation; electrical remodeling; aging; Kv4.3 potassium channels

随着年龄的增加, 心房颤动发病率明显增加<sup>[1-2]</sup>。年龄是心房颤动发生、发展的独立危险因素。心房肌电生理异常是心房颤动的发病及维持机制, 其中电重构起着极其非常重要的作用。心房颤动电重构是指快速不规则的心房激动造成的心房肌电生理特性改变, 表现为心房有效不应期及动作电位时程的缩短, 心房内传导速度减慢等<sup>[3]</sup>。大量的证据显示电重构对维持心房颤动起着非常重要的作用, 心房电重构主要表现和机制是离子通道重构, 离子通道相应基因的改变及电流密度的改变与心房颤动发生相关。瞬时外向钾电流(Ito)属于钙依赖性的外向钾电流, 心房肌复极 1 期主要是瞬时外向钾电流内流的结果。Kv1.4 钾通道和 Kv4 钾通道(包括 Kv4.2 钾通道和 Kv4.3 钾通道)构成 Ito 的  $\alpha$  亚基, Kv4.3 钾通道在心房比较丰富, Kv4.2 钾通道在心室比较丰富, 一般多将 Kv4.

3 钾通道作为 Ito 的编码基因。Ito 是心房肌细胞复极的主要电流, 参与动作电位 1 期的复极, 与 0 期去极化电流共同形成动作电位的峰电位, 决定动作电位平台期起始的高度。老年人心房颤动高发率是否与钾通道增龄性改变有关尚不明确。本研究就增龄对家兔心房组织 Kv4.3 钾通道基因表达的变化进行研究, 为增龄是心房颤动发生的危险因素提供实验依据, 现报道如下。

#### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康实验家兔 24 只, 雌雄不限, 按月龄分为 3 组: 幼年组 8 只, 日龄 14~21 d, 平均(18.6±2.1)d, 平均体质量(240.0±30.0)g; 成年组 8 只, 月龄 8~10 个月, 平均(9.0±0.9)个月, 平均体质量(2.0±0.3)kg; 老年组 8 只, 月龄 30~35 个月, 平均(32.8±1.8)个月, 平均体质量(4.0±0.5)kg。幼

\* 基金项目: 中国医师协会心房颤动专项基金资助(2013-1-21)。  
△ 通信作者, E-mail: 153345984@qq.com。

作者简介: 酉鹏华(1982-), 主治医师, 硕士, 主要从事心律失常机制

年组和成年组购于西安交通大学动物实验中心,老年组购于四川省医学科学院动物实验中心。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本获取** 取出家兔,称体质量,成年组、老年组使用 20%乌拉坦以 6 mL/kg 的剂量经耳缘静脉注射麻醉,幼年组以 3%戊巴比妥 30 mg/kg 剂量腹腔内注射麻醉。将家兔仰卧位于实验手术台上,开胸将心脏暴露,取下心脏,分离心脏纤维膜及结缔组织,使用磷酸盐缓冲液(PBS)反复冲洗血迹,沿冠状沟分离心房和心室,并分离左右心房,分别保存于冻存管中,置于液氮中急冷,存于 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存以备。

**1.2.2 心房组织 Kv4.3 钾通道实时荧光定量 PCR 测定基因表达的变化** 兔心房组织总 RNA 提取采用 Trizol RNA 提取方法。检测 RNA 浓度及纯度: NanoDropDN-100 全波长紫外分光光度计测定方法测定总 RNA 浓度和  $OD_{260}/OD_{280}$  比值,OD 值在 1.8~2.0 为纯度较高,可以进行下一步反转录操作。使用 TaKaRa 公司反转录试剂盒进行反转录。具体条件: $37^{\circ}\text{C}$  15 min(反转录反应), $85^{\circ}\text{C}$  5 s(反转录酶失活反应),合成 cDNA。以 NCBI GenBank 提供的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)及 KCND3 引物序列,由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成,引物序列如下,GAPDH:上游-3'-GCT TTT AAC TCT GGC AAA GTG-5',下游-3'-GAT GAT GAC CCT TTT GGC TC-5'; KCND3:上游-3'-GCC GCA GTA AGA AGA CCA CAC-5',下游-3'-TTG GTC TCA GTC CGT CGT CTG-5';按照 TaKaRa 实时荧光定量 PCR 试剂盒操作说明书进行反应,采用 3 步法 PCR 扩增程序:第 1 步  $95^{\circ}\text{C}$  30 s;第 2 步  $95^{\circ}\text{C}$  30 s, $62^{\circ}\text{C}$  (GAPDH、KCND3)、 $62.5^{\circ}\text{C}$  (KCND3)30 s  $72^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环;第 3 步  $59.5^{\circ}\text{C}$  变性 1 min,然后冷却至  $55^{\circ}\text{C}$ 。从  $55^{\circ}\text{C}$  开始每一步增加  $0.5^{\circ}\text{C}$ ,持续 30 s,直至  $95^{\circ}\text{C}$ ,总共 81 步,读取吸光值,进行溶解曲线分析,记录 CT 值。以溶解曲线为单峰引物特异性较强,反应特异性较高。使用 20 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检验 PCR 产物是否特异,见单一的扩增条带,无引物二聚体等其他非特异性条带,表明扩增反应特异。

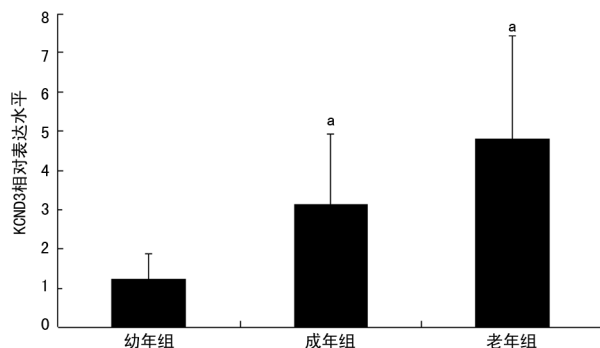
**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 软件进行数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,比较采用秩和检验,其中多重比较采用秩变换技术结合完全随机设计的方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同年龄组 Kv4.3 钾通道 KCND3 相对表达水平比较** 幼年组 KCND3 基因相对表达水平为 6.14,成年组为 12.29,老年组为 14.57,3 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 不同年龄组间 Kv4.3 钾通道 KCND3 表达水平多重比较** 幼年组 KCND3 基因表达水平为  $(1.23 \pm 0.64)$ ,成年组为  $(3.12 \pm 1.80)$ ,老年组为  $(4.78 \pm$

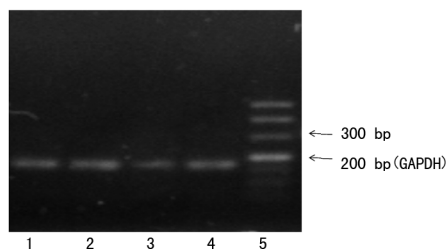
2.67)。与幼年组比较,成年组及老年组表达差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而成年组与老年组之间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 1。



a:  $P < 0.05$ , 与幼年组比较

图 1 不同年龄组家兔心房组织 Kv4.3 钾通道(KCND3)多重表达水平比较

**2.3 Kv4.3 钾通道 KCND3 及 GAPDH mRNA 的转录** Kv4.3 钾通道 KCND3 mRNA 转录图见图 2, Kv4.3 钾通道基因及 GAPDH 的 PCR 产物电泳带位置与理论值相符。



1~4: KCND3; 5: Marker; KCND3: 165 bp

图 2 Kv4.3 钾通道 KCND3 mRNA 转录图

## 3 讨论

国内外众多流行病学研究均显示年龄与心房颤动发生密切相关<sup>[4]</sup>。美国弗莱明翰心脏中心关于心房颤动的回顾性调查显示:众多危险因素中老年居首位,是心房颤动发病的独立危险因素<sup>[5]</sup>。促使心房颤动发生和维持的重要因素是心房结构重构和电重构,而结构重构与电重构相互影响并相互作用,结构重构可促发电重构,使老龄患者心房颤动发病率增加<sup>[6-7]</sup>;心房电重构的电生理机制是离子通道重构,目前大量研究均证实离子通道重构是发生心房颤动发病因素之一<sup>[8-10]</sup>,增龄可使心房离子通道基因、蛋白及电流水平均发生变化,是引起老龄心房电重构的电生理基础。心房肌 Kv4.3 钾通道(Ito 电流)参与心房复极 1 期及 0 期去极化过程,二者共同形成动作电位峰电位,影响动作电位形状、时程及有效不应期变化。老年人心房颤动高发率是否与钾通道增龄性改变相关目前研究尚不明确。

产生 Ito 电流的 Kv 钾通道主要有 Kv4.2 钾通道和 Kv4.3 钾通道,Kv4.3 钾通道在心房分布较丰富,Kv4.3 钾通道主要产生 Ito 电流<sup>[11]</sup>。编码 Kv4.3 钾通道的基因是 KCND3,Ito 电流是动作电位早期复极

1 期的主要离子流,与 0 期去极化共同形成动作电位峰电位,其大小对动作电位形态和时程有较大的影响。Ito 电流的升高,将会加快 1 期复极,缩短动作电位时程和有效不应期,参与心房颤动电重构。目前的研究中,大部分发现心房颤动时 Ito 电流改变,而且 Kv4.3 钾通道基因和蛋白水平同步改变,与 Ito 电流密度改变一致,并认为 Kv4.3 钾通道 mRNA 改变是 Ito 电流改变的分子机制。而 YUE 等<sup>[12-13]</sup> 在心房颤动犬模型中发现电流密度及其主要编码基因 Kv4.3 钾通道 mRNA 表达水平改变,并与心房电重构有关。

随着年龄的增加,心脏在解剖结构和电生理功能等方面也将发生变化,这些改变将参与心房颤动发生和发展。LIU 等<sup>[14]</sup> 研究提示 Ito 电流密度随年龄增长增高。DUN 等<sup>[15]</sup> 研究了心房组织 Ca<sup>2+</sup> 通道及 Ito、Isus 电流的增龄性变化,也发现 Ito 电流随年龄增长而增高。本研究选择了编码 Kv4.3 钾通道的基因 KCND3 作为目的基因,结果显示 KCND3 表达存在增龄性上调,与 DUN 等<sup>[15]</sup> 细胞电生理 Ito 研究结论相一致;其中,幼年组与中年组和老年组分别比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。通道基因表达是通道电流的改变的分子机制,电流水平与基因水平一致。因此笔者推测 Kv4.3 基因表达的升高,可能将促使 Ito 电流升高,使复极 1、2 期加速,从而缩短动作电位时程和有效不应期及降低 2 期平台期高度,可能是心房颤动电重构的一个环节。

本研究显示成年组与老年组 KCND3 基因表达比较,差异无统计学意义( $P < 0.05$ ),但老年组有不断上升的趋势,分析原因如下:心房颤动发病率随年龄增加而增加,60 岁发病率开始增高,>80 岁发病率为 10%,老年组发病率更高,本实验老年组家兔为 30~35 个月龄,而家兔正常生命周期为 6~8 年,从家兔的生理年龄来看,30~35 个月龄家兔属于老龄下限,因受实验动物饲养时间的限制,目前国内外关于老龄家兔研究中,把大于 30 月龄的家兔定为老龄,若研究对象的年龄进一步增大,可能会出现不同的结果。

## 参考文献

- [1] SCHNABEL R B. Can we predict the occurrence of atrial fibrillation? [J]. Clin Cardiol, 2012, 35(1): S5-9.
- [2] SAKABE K, FUKUDA N, SOEKI T, et al. Relation of age and sex to atrial electrophysiological properties in patients with no history of atrial fibrillation[J]. Pacing Clin Electrophysiol, 2003, 26(5): 1238-1244.
- [3] WIJFFELS M C, KIRCHHOF C J, DORLAND R, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in a-

wake chronically instrumented goats [J]. Circulation, 1995, 92: 1954-1968.

- [4] WILLIAM B K, ROBERT D A, DANIEL D S, et al. Epidemiologic features of chronic atrial fibrillation[J]. N Engl J Med, 1982, 306: 1018-1022.
- [5] SCHNABEL R B, LEVY D, SULLIVAN L M, PENCI-NA M J, et al. Development of a risk score for atrial fibrillation (Framingham Heart Study): a community-based cohort study[J]. Lancet, 2009, 373: 7-45.
- [6] DUN W, BOYDEN P A. Aged atria: electrical remodeling conducive to atrial fibrillation[J]. Interv Card Electrophysiol, 2009, 25(1): 9-18.
- [7] LU Z, SCHERLAG B J, LIN J, et al. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation: autonomic mechanism for atrial electrical remodeling induced by short-term rapid atrial pacing[J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2008, 1(3): 184-192.
- [8] MASAKI M, IWATA E, NAKADA C, et al. Atrial fibrillation-mediated upregulation of mir-30d regulates myocardial electrical remodeling of the G-protein-gated K<sup>+</sup> channel, IK<sub>1</sub> ACh[J]. Circ J 2016, 80(6): 1346-1355.
- [9] BRUNDEL B J, VANGELDER I C, HENNING R H, et al. Alterations in potassium channel gene expression in atria of patients with persistent and paroxysmal atrial fibrillation: differential regulation of protein and mRNA levels for K1 channels[J]. J Am Col Cardiol, 2001, 37(3): 926-32.
- [10] SAMPSON K J, TERRENOIRE C, CERRANTES D O, et al. Adrenergic regulation of a key cardiac potassium channel can contribute to atrial fibrillation: evidence from an IKs transgenic mouse[J]. J Physiol, 2008, 586(2): 627-637.
- [11] 张琳, 钟理, 宋治远. 心脏离子通道基因与心房颤动的研究进展[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2008, 8(3): 174-177.
- [12] YUE L, FENG J, GASPO R, et al. Ionic remodeling underlying action potential changes in a canine model of atrial fibrillation[J]. Circ Res, 1997, 81(4): 512-525.
- [13] YUE L, MELUYK P, GASPO R, et al. Molecular mechanisms underlying ionic remodeling in dog model of atrial fibrillation[J]. Circ Res, 1999, 84(7): 776-784.
- [14] LIU J, WYETH P, MELCHERT B, et al. Aging-associated changes in whole cell K<sup>+</sup> and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in rat ventricular myocytes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2000, 279(3): H889-900.
- [15] DUN W, YAGI T, ROSEN M R, et al. Calcium and potassium currents in cells from adult and aged canine right atria[J]. Cardiovascul Res, 2003, 58(3): 526-534.