

• 基础研究 •

有氧运动对心力衰竭大鼠心室肌细胞钾通道重构的影响

胡菱 孟林凤 胥亚楠 裴赫男 王茜 胡华刚 赵冬琰 刘梅洁

【摘要】 目的:探讨有氧运动(AE)对充血性心力衰竭(CHF)大鼠心室肌细胞钾通道重构的作用及机制。 方法:将 SD 大鼠随机分为假手术组、CHF 组、假手术+AE 组、CHF+AE 组。建立 CHF 及假手术大鼠模型后,4 组大鼠先进行适应性训练 1 周,假手术组、CHF 组进行一般照护 8 周,假手术+AE 组和 CHF+AE 组给予 AE 干预 8 周。各组饲养及训练结束后行超声心动图检测左室射血分数(LVEF)及左室后壁厚度(LVPWD),HE 染色、天狼星红染色检测心肌组织形态学及纤维化程度,计算左室质量指数(LVWI),定量分析 N 末端脑钠肽前体(NT-proBNP)水平,实时荧光定量聚合酶链反应检测快速激活延迟整流钾电流(IKr)编码基因 *KCNH2* 及慢激活延迟整流钾电流(IKs) α 亚基编码基因 *KCNQ1* 的 mRNA 表达水平,Western blot 检测 *KCNH2* 和 *KCNQ1* 蛋白表达水平。 结果:与假手术组比较,CHF 组大鼠心肌组织损伤严重,LVEF 明显降低,LVPWD、LVWI 及 NT-proBNP 水平均明显升高;与 CHF 组比较,CHF+AE 组大鼠心肌组织损伤明显减轻,LVEF 明显升高,LVPWD、LVWI 及 NT-proBNP 水平均明显降低(P 均 <0.05)。与假手术组比,CHF 组 *KCNQ1* 及 *KCNH2* 的 mRNA 表达水平均明显上调;与 CHF 组比,CHF+AE 组 *KCNQ1* 及 *KCNH2* 的 mRNA 表达水平均明显下调(P 均 <0.05)。与假手术组比,CHF 组 *KCNQ1* 及 *KCNH2* 的蛋白表达水平均明显下调;与 CHF 组比,CHF+AE 组 *KCNQ1* 及 *KCNH2* 的蛋白水平均明显上调(P 均 <0.05)。假手术组与假手术+AE 组各指标差异无统计学意义。 结论:AE 参与调控 CHF 大鼠心肌结构与 IKr、IKs 离子通道重构。

【关键词】 充血性心力衰竭;心室重构;有氧运动;延迟整流钾离子通道

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2021.03.010

Effects of aerobic exercise on remodeling of potassium channel in ventricular myocytes from rats with heart failure HU Ling¹, MENG Linfeng¹, XU Yanan¹, PEI Henan¹, WANG Qian¹, HU Huagang¹, ZHAO Dongyan¹, LIU Meijie². 1. Beijing Xiaotangshan Hospital, 102211 Beijing; 2. Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, 100700 Beijing, China

【Abstract】 Objective: To investigate the effects and mechanism of aerobic exercise (AE) on remodeling of potassium channel in ventricular myocytes from rats with congestive heart failure (CHF).

Methods: SD rats were randomly divided into sham operation(SO), CHF, SO + AE and CHF + AE groups. All the rats took aerobic training for one week. The rats in SO and CHF groups were given regular feeding for 8 weeks then, while the rats in SO + AE and CHF + AE groups were given

基金项目:北京市医院管理局临床医学发展专项经费(ZYLX201835);北京市自然科学基金(7192242)

作者单位:102211 北京小汤山医院(胡菱,孟林凤,胥亚楠,裴赫男,王茜,胡华刚,赵冬琰);100700 北京,中国中医科学院动物实验中心(刘梅洁)

通信作者:胥亚楠,E-mail:282984303@qq.com

corresponding intervention after modeling. Left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular posterior wall thickness (LVPWD) were examined by echocardiography. HE staining and Sirius red staining were used to detect myocardial histomorphology and fibrosis. And the left ventricular mass index (LVMI) were calculated. N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) levels were measured. The mRNA levels of *KCNH2* and *KCNQ1* were detected by real-time PCR, which were the encoding gene of rapidly activating delayed rectifier K^+ current (IKr) and α subunits of slowly activating delayed rectifier K^+ current (IKs), respectively. Expression levels of *KCNH2* and *KCNQ1* protein were detected by western blot. **Results:** Compared with SO group, the rats in CHF group had severer myocardial injury, LVEF decreased significantly, and LVPWD, LVWI and NT-proBNP levels increased significantly. Compared with CHF group, the myocardial injury alleviated in CHF + AE group, with higher LVEF, lower LVPWD, LVWI and NT-proBNP levels (all $P < 0.05$). Compared with SO group, the mRNA expression levels of *KCNQ1* and *KCNH2* in CHF group were significantly up-regulated. Compared with CHF group, the mRNA expression levels of *KCNQ1* and *KCNH2* in CHF + AE group were significantly decreased (all $P < 0.05$). Compared with SO group, the protein expression levels of *KCNQ1* and *KCNH2* in CHF group were significantly decreased. Compared with CHF group, the protein levels of *KCNQ1* and *KCNH2* in CHF + AE group were significantly increased (all $P < 0.05$). There was no statistically significant difference between SO group and SO + AE group. **Conclusions:** Aerobic exercise is involved in the regulation of myocardial structure and IKr, IKs ion channel remodeling in rats with heart failure.

【Key words】 Congestive heart failure; Ventricular remodeling; Aerobic exercise; Delayed rectifier potassium channel

充血性心力衰竭(CHF)是多种心血管疾病进展的终末阶段,约 50% 的患者死于恶性心律失常^[1],而恶性心律失常发生的主要机制是心肌细胞电重构。心肌细胞离子通道重构是心肌细胞电重构的重要基础。多项研究表明,适量有氧运动(AE)能够显著改善心血管内皮功能,提高受试者运动耐力,降低交感神经兴奋性,抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAAS)的活动,从而显著改善心肌缺血及缺氧状况^[2-7]。但 AE 对心室肌细胞离子通道重构的作用尚未明确。延迟整流钾电流(IK)是心室肌细胞复极的主要电流之一,本研究建立 CHF 大鼠模型,通过 AE 干预,观察快速激活延迟整流钾电流(IKr)编码基因 *KCNH2* 及慢激活延迟整流钾电流(IKs) α 亚基编码基因 *KCNQ1* 的表达水平,探讨 AE 在 CHF 治疗中的作用及病理生理机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料

12 周龄清洁级 SD 大鼠 48 只,体质量(240 ± 25)g,由中国中医科学院医学实验中心动物部提供。天狼星红染液购自海德创业生物科技有限公司,苏木精-伊红染液购自北京博润莱特科技有限公司,大鼠 N 末端脑钠肽前体(NT-ProBNP)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自武汉菲恩生物科技

有限公司,miScript SYBR[®] Green PCR Kit 购自 Thermo 公司,TRIzol reagent 购自 Invitrogen 公司,兔抗大鼠 *KCNH2* 抗体、兔抗大鼠 *KCNQ1* 抗体购自 Creative Diagnostics 公司。

1.2 CHF 模型建立及实验分组

SD 大鼠随机分为假手术组、CHF 组、假手术 + AE 组和 CHF + AE 组,每组 12 只。SD 大鼠禁食 12 h,称量体质量,腹部脱毛后采用 10%水合氯醛(0.3 mL/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,CHF 模型建立参照参考文献[8]。将大鼠仰卧固定,消毒后沿剑突自腹中线略偏左侧垂直切开腹部皮肤,钝性分离腹主动脉及左肾动脉。用 4 号手术缝线于左肾动脉上方约 1.0 cm 处结扎腹主动脉,使腹主动脉狭窄约 80%[腹主动脉直径约(1.76 ± 0.10) mm],逐层缝合。假手术组于腹主动脉下放置手术缝线但不结扎,CHF 组结扎腹主动脉,两组大鼠手术 1 周后,先进行适应性游泳 1 周,再进行一般照护 8 周。假手术 + AE 组及 CHF + AE 组采取无负重游泳训练,在 120 cm × 80 cm × 70 cm 的长方形塑料水桶中进行,水桶四壁光滑,水深约 40 cm,水温(32.0 ± 2.5)℃,每天游泳运动 1 次,每次 20 min,两组大鼠手术 1 周后,先进行适应性游泳 1 周,再进行 AE 训练 8 周。

1.3 心功能指标测定

各组饲养及训练结束后,采用 VisualSonics 770 超声,17.5 MHz 探头测定 SD 大鼠的左室后壁厚度 (LVPWD)及左室射血分数 (LVEF)。取大鼠内眦静脉血冰上静置 2 h,3 000 转/min 离心 15 min,取上清液,用 ELISA 试剂盒测定血浆中 NT-proBNP 含量。使用过量 10%水合氯醛将大鼠处死,摘取心脏,分离心房,剪去右心室游离壁,称量左室质量,左室质量指数(LVWI)=左室质量/大鼠体质量。

1.4 HE 染色及天狼星红染色检测心室肌组织形态及纤维化程度

将心室肌组织用 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,进行 HE 染色和天狼星红染色。

1.5 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测 KCNQ1 和 KCNH2 的 mRNA 表达水平

使用 Trizol Reagent 提取各组心室肌细胞总 RNA。大鼠 KCNQ1 上游引物为 5'-CGCCTCCTGTTTCTCTGTCT-3',下游引物为5'-CGTCTTCGTCTCCGTCTTTG-3'。大鼠 KCNH2 上游引物为 5'-ACCCACAATGTCACCGAGAAG-3',下游引物为 5'-CCCTGACCGAGTAAGACGAC-3'。GAPDH 上游引物为 5'-GGTGCTGAGTA TGTCGTGGAGT-3',下游引物为5'-TAGTGACGGTGGGTCTTCTGA-3'。反应条件为 95 ℃预变性10 min,95 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s,40 个循

环。以 2^{-ΔΔCt} 计算 KCNQ1 和 KCNH2 mRNA 的相对表达水平。

1.6 Western Blot 检测 KCNQ1 和 KCNH2 的蛋白表达水平

提取各组心室肌细胞总蛋白,使用 BCA 法测定蛋白浓度。取 60 μg 总蛋白上样,行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电泳后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,用 5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入 KCNH2、KCNQ1 一抗,4 ℃孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h。充分漂洗后显影、摄片并进行条带灰度定量测定。以 GAPDH 作为内参,利用 ImageJ 软件对条带进行半定量分析。

1.7 统计学分析

统计分析采用 Graphpad Prism 6 软件。计量资料以均数±标准差表示,采用单因素方差分析进行多组间比较。*P*<0.05为差异有统计学差异。

2 结果

2.1 各组心功能指标比较

与假手术组相比,CHF 组的 LVEF 显著降低,LVPWD、LVWI 及 NT-proBNP 水平均明显升高(*P*均<0.01);假手术+AE 组与假手术组的心功能指标差异均无统计学意义。与 CHF 组相比,CHF+AE 组 LVEF 明显升高,LVPWD、LVWI 及 NT-proBNP 水平均明显降低(*P*均<0.01)。见表 1。

表 1 各组大鼠 LVEF、LVPWD、LVWI、NT-proBNP 检测结果比较

项目	假手术组	CHF 组	假手术 + AE 组	CHF + AE 组
LVEF	60.83 ± 2.17	40.50 ± 1.73 ⁽¹⁾	62.00 ± 1.79	53.33 ± 2.08 ⁽²⁾
LVPWd	0.12 ± 0.01	0.20 ± 0.01 ⁽¹⁾	0.11 ± 0.01	0.16 ± 0.01 ⁽²⁾
LVWI	0.11 ± 0.01	0.19 ± 0.01 ⁽¹⁾	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01 ⁽²⁾
NT-proBNP	409.40 ± 17.99	776.80 ± 17.67 ⁽¹⁾	457.60 ± 11.84	505.20 ± 12.81 ⁽²⁾

注:与假手术组相比,⁽¹⁾*P*<0.01;与 CHF 组相比,⁽²⁾*P*<0.01

2.2 各组心室肌组织形态学及纤维化程度比较

HE 染色结果显示,假手术组、假手术+AE 组心肌细胞形态正常,排列整齐;CHF 组可见心肌细胞明显肥大、水肿,部分心肌细胞呈脂肪样变性,出现间质充血及纤维排列紊乱,CHF+AE 组的上述情况较 CHF 组减轻。见图 1。

天狼星红染色可显示心肌间质及血管周围胶原分布情况。假手术组、假手术+AE 组成纤维细胞未见明显增殖,细胞排列整齐;CHF 组成纤维细胞增殖,胶原累积,Ⅲ型胶原增多,细胞外基质沉积,CHF+AE 组的上述表现较 CHF 组明显好转。

见图 1。

2.3 各组心室肌细胞 KCNH2 和 KCNQ1 表达水平比较

与假手术组相比,CHF 组 KCNQ1 和 KCNH2 的 mRNA 表达水平均明显上调(*P*均<0.05);假手术+AE 组与假手术组 KCNQ1 和 KCNH2 mRNA 表达水平的差异均无统计学意义。与 CHF 组相比,CHF+AE 组 KCNQ1 及 KCNH2 的 mRNA 表达水平均明显下调(*P*均<0.05)。见表 2。

与假手术组相比,CHF 组心室肌细胞 KCNQ1 及 KCNH2 蛋白表达水平明显下调(*P*均<0.05);

假手术+AE 组与假手术组心肌细胞 KCNQ1 及 KCNH2 蛋白表达水平的差异均无统计学意义。与 CHF 组相比,CHF+AE 组 KCNQ1 及 KCNH2 蛋白表达水平明显上调(P 均 <0.05)。见图 2、表 2。

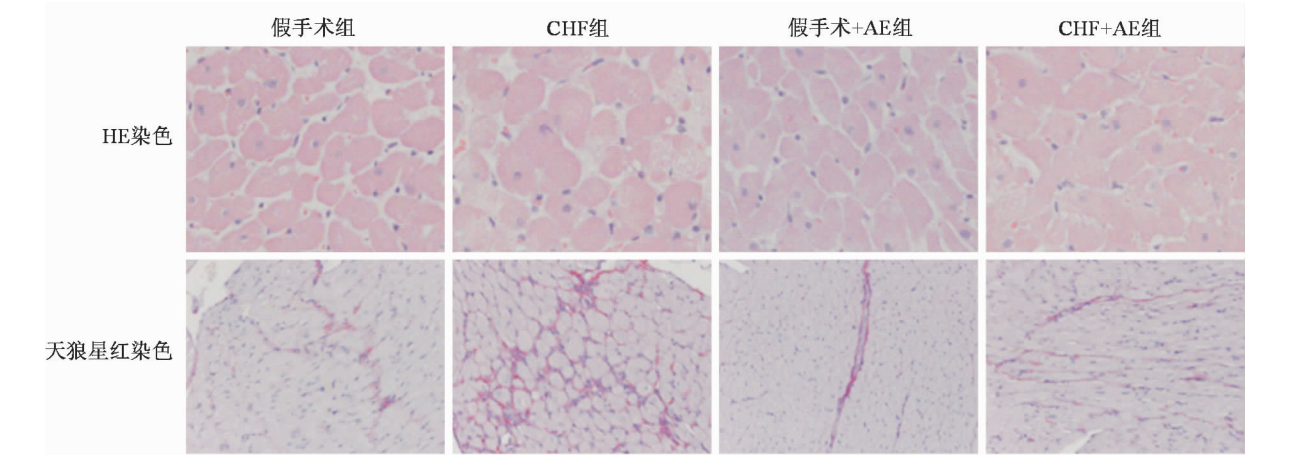


图 1 各组大鼠心肌组织形态学及纤维化程度

表 2 各组 KCNH2 和 KCNQ1 的 mRNA 和蛋白表达水平比较

组别	KCNQ1		KCNH2	
	mRNA 表达水平	蛋白表达水平	mRNA 表达水平	蛋白表达水平
假手术组	1.29 ± 0.34	0.83 ± 0.04	1.37 ± 0.19	1.00 ± 0.12
CHF 组	4.98 ± 0.99 ⁽¹⁾	0.56 ± 0.08 ⁽¹⁾	5.22 ± 0.65 ⁽¹⁾	0.41 ± 0.11 ⁽¹⁾
假手术 + AE 组	1.92 ± 0.29	0.84 ± 0.11	0.83 ± 0.23	0.84 ± 0.045
CHF + AE 组	1.95 ± 0.39 ⁽²⁾	0.80 ± 0.03 ⁽²⁾	1.85 ± 0.12 ⁽²⁾	0.96 ± 0.21 ⁽²⁾

注:与假手术组相比,⁽¹⁾ $P<0.05$;与 CHF 组相比,⁽²⁾ $P<0.05$

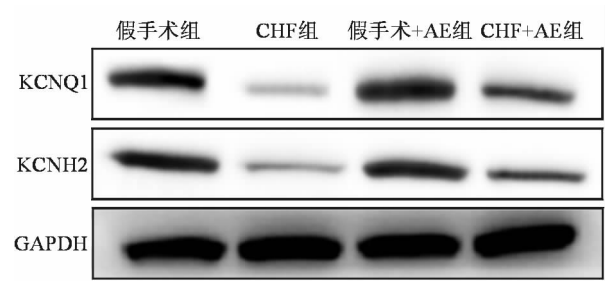


图 2 各组 KCNQ1 及 KCNH2 蛋白表达情况

3 讨论

心室重构包括结构重构及电重构,是 CHF 的重要病理生理机制^[9]。RAAS 是导致心室结构重构的重要因素。NT-proBNP 能对抗 RAAS 引起的水钠潴留,可扩张血管,增加排钠,有较好的稳定性,是评价 CHF 的敏感性及特异性指标。研究证实,AE 可以改善 CHF 患者的心肺耐力,降低 NT-proBNP 水平,改善患者的心功能^[10]。本研究成功建立了 CHF 大鼠模型,发现接受 AE 的 CHF 大鼠的 LVEF 较未接受 AE 的 CHF 大鼠升高, LVWI、NT-proBNP 水平降低,表明 AE 可改善心室射血功能,抑制 CHF 所致心室重构,同时能够对

抗 RAAS 引起的水钠潴留,降低 NT-proBNP 水平。另外,本研究发现,接受 AE 的 CHF 大鼠心肌细胞水肿、增大、脂肪变性、间质充血等病理改变较未接受 AE 的 CHF 大鼠有所减轻,表明 AE 对 CHF 大鼠心肌细胞凋亡有改善作用。这与文献报道 AE 能显著改善 CHF 大鼠的心功能、减轻心肌纤维化一致^[2]。

IK 具有外向整流的特点,包括 3 种亚型,分别为超快激活电流(IK_{ur})、IK_r 和 IK_s,大鼠心肌细胞仅有后 2 种电流,其改变可导致功能衰竭的心室肌细胞发生快速室性心律失常。研究表明,在 CHF 大鼠发生室性心律失常时,存在 IK 及 IK_s 减小,动作电位持续时间(APD)显著延长^[11-13]。本研究检测大鼠心室肌 IK_r 及 IK_s-α 亚基的编码基因 KCNH2 和 KCNQ1,发现 CHF 大鼠 KCNH2 和 KCNQ1 的 mRNA 表达水平明显上升,接受 AE 后,KCNH2 和 KCNQ1 的 mRNA 表达水平明显下降,而 CHF 大鼠 KCNQ1 及 KCNH2 的蛋白表达水平明显下调。转录和翻译是两个不同的过程,在某些特定的条件下可以脱节,翻译过程中,mRNA 可

能会受到其他因子的负调控。这与文献报道 CHF 大鼠在发生室性心律失常时 KCNH2 和 KCNQ1 蛋白表达受抑制结果一致^[14]。

综上所述, 本研究结果显示, AE 参与调控 CHF 大鼠心肌结构与 IKr、IKs 离子通道重构, AE 可改善心肌结构重构, 逆转心肌电重构中 IK 离子通道的改变。该研究为临床运用 AE 治疗 CHF、改善 CHF 预后提供一定理论基础。

参 考 文 献

[1] Tomaselli GF, Zipes DP. What causes sudden death in heart failure?[J]. Circ Res, 2004, 95(8):754-763.

[2] Lu PG, Damatto RL, Cezar MD, et al. Long-term low intensity physical exercise attenuates heart failure development in aging spontaneously hypertensive rats[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 36(1):61-74.

[3] Campos JC, Queliconi BB, Bozi L, et al. Exercise reestablishes autophagic flux and mitochondrial quality control in heart failure[J]. Autophagy, 2017, 13(8):1304-1317.

[4] Sibilitz KL, Berg SK, Rasmussen TB, et al. Cardiac rehabilitation increases physical capacity but not mental health after heart valve surgery: a randomised clinical trial[J]. Heart, 2016, 102(24):1995-2003.

[5] Sandercock G, Hurtado V, Cardoso F. Changes in cardiorespiratory fitness in cardiac rehabilitation patients: a meta-analysis[J]. Int J Cardiol, 2013, 167(3):894-902.

[6] Willenheimer R, van Veldhuisen DJ, Silke B, et al. Effect on survival and hospitalization of initiating treatment for chronic heart failure with bisoprolol followed by enalapril, as compared with the opposite sequence: results of the randomized Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS) III [J]. Circulation,

2005, 112(16):2426-2435.

[7] Yancy CW, Jessup M, Bozkurt B, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of heart failure: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines[J]. J Am Coll Cardiol, 2013, 62(16):e147-e239.

[8] Xue SR, Xue Y, Xue R. Carvedilol restore cardiac calcium release channel structure and function in heart failure[J]. Int J Cardiol, 2007, 116(2):231-235.

[9] 沈鑫, 马依彤, 杨毅宁, 等. 不同年龄小鼠缺血性心力衰竭后心室重塑程度的比较[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(6):988-992.

[10] Renxin JI, Chen W, Qi QL. Summary of proprioceptive training on motor dysfunction rehabilitation [J]. Rehabilitation Medicine, 2017, 27(2):53-55.

[11] Furukawa T, Bassett AL, Furukawa N, et al. The ionic mechanism of reperfusion-induced early afterdepolarizations in feline left ventricular hypertrophy[J]. J Clin Invest, 1993, 91(4):1521-1531.

[12] Naito Y, Tsujino T, Fujioka Y, et al. Increased circulating interleukin-18 in patients with congestive heart failure[J]. Heart, 2002, 88(3):296-297.

[13] Li GR, Lau CP, Ducharme A, et al. Transmural action potential and ionic current remodeling in ventricles of failing canine hearts[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002, 283(3):H1031-H1041.

[14] Tsuji Y, Opthof T, Inden Y, et al. Ionic mechanisms of acquired QT prolongation and torsades de pointes in rabbits with chronic complete atrioventricular block[J]. Circulation, 2001, 104(17S):24-25.

(收稿:2020-07-09 修回:2021-02-02)

(本文编辑:胡晓静)