

# 血管紧张素Ⅱ受体 1 型-钙调神经磷酸酶信号通路对乳鼠肥大心室肌细胞 L 型钙离子流的调控作用

杨英 夏桂玲 杨龙 何炯红 霍照美 郭楚娴

**【摘要】** 目的:探讨血管紧张素Ⅱ受体 1 型(AT1R)-钙调神经磷酸酶(CaN)信号通路对乳鼠肥大心室肌细胞 L 型钙离子通道电流( $I_{Ca-L}$ )和动作电位时程(APD)的调控作用。 方法:分离获得 1 d 龄 SD 乳鼠心室肌细胞,分为 4 组,对照组不予干预;苯肾上腺素(PE)组常规培养 1 h 后加入 PE(终浓度 0.1 mmol/L)干预 24 h;氯沙坦(Los) + PE 组先予 Los(终浓度 1  $\mu$ mol/L)干预 1 h,再予 PE 干预 24 h;环孢素 A(CsA) + PE 组先予 CsA(终浓度 0.25  $\mu$ g/mL)干预 1 h,再予 PE 干预 24 h。实时荧光定量聚合酶链反应检测肌球蛋白重链  $\beta$ ( $\beta$ MHC)的 mRNA 表达水平。Western blot 检测 CaN A 亚基  $\beta$  亚单位(CaNA $\beta$ )蛋白表达水平。全细胞膜片钳技术检测细胞膜  $I_{Ca-L}$  和单细胞 APD。 结果:PE 组  $\beta$ MHC 的 mRNA 表达水平和 CaNA $\beta$  的蛋白表达水平均高于对照组; $I_{Ca-L}$  电流密度峰值绝对值[(-18.23  $\pm$  1.44)pA/pF 对(-10.78  $\pm$  1.87)pA/pF]、50% APD[(25.7  $\pm$  2.4)ms 对(15.3  $\pm$  3.0)ms]和 90% APD[(197.6  $\pm$  10.6)ms 对(91.8  $\pm$  21.3)ms]均高于对照组( $P$  均 $<0.05$ )。Los + PE 组  $\beta$ MHC 的 mRNA 表达水平和 CaNA $\beta$  的蛋白表达水平均低于 PE 组; $I_{Ca-L}$  电流密度峰值绝对值[(-14.02  $\pm$  1.51)pA/pF]、50% APD [(20.4  $\pm$  2.9)ms]和 90% APD [(128.7  $\pm$  18.5)ms]均低于 PE 组( $P$  均 $<0.05$ )。CsA + PE 组  $\beta$ MHC 的 mRNA 表达水平和 CaNA $\beta$  的蛋白表达水平均低于 PE 组; $I_{Ca-L}$  电流密度峰值绝对值[(-12.19  $\pm$  1.09)pA/pF]、50% APD [(22.7  $\pm$  1.9)ms]和 90% APD [(121.7  $\pm$  15.0)ms]均低于 PE 组( $P$  均 $<0.05$ )。 结论:AT1R-CaN 信号通路参与乳鼠肥大心室肌细胞  $I_{Ca-L}$  和 APD 的调控。

**【关键词】** 心室肌细胞;钙电流;动作电位;全细胞膜片钳技术

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2021.05.011

**Regulation of AT1R-calcineurin signaling pathway on L-type calcium current of hypertrophic ventricular myocytes from neonatal rats** YANG Ying, XIA Guiling, YANG Long, HE Jionghong, HUO Zhaomei, GUO Chuxian Department of Cardiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, China

**【Abstract】 Objective:** To investigate the role of angiotensin II receptor 1 type (AT1R) -calcineurin (CaN) signaling pathway in regulating L-type  $Ca^{2+}$  channel current ( $I_{Ca-L}$ ) and action potential duration (APD) of hypertrophic ventricular myocytes from neonatal rats. **Methods:** The ventricular myocytes were isolated from one-day-old SD rats and divided into 4 groups depending on the treatment administered. The control group was not intervened; the phenylephrine (PE) group was treated with 0.1 mmol/L PE for 24 hours after cultured for 1 hour; the losartan (Los) + PE group was treated with 1  $\mu$ mol/L Los for 1 hour, and then with 0.1 mmol/L PE for 24 hours; the cyclosporine A (CsA) + PE

group was treated with 0.25  $\mu\text{mol/L}$  CsA for 1 hour, and then with 0.1 mmol/L PE for 24 hours. The mRNA expression of myosin heavy chain beta ( $\beta\text{MHC}$ ) was detected by real time PCR. The protein expression of the  $\beta$  isoform of the CaN A-subunit (CaNA $\beta$ ) was assayed by western blot analysis.  $I_{\text{Ca-L}}$  and action potential were recorded by whole-cell patch clamp technique. **Results:** The expression levels of  $\beta\text{MHC}$  mRNA and CaNA $\beta$  protein in PE group were higher than those in control group. The absolute peak value of  $I_{\text{Ca-L}}$  current density [ $(-18.23 \pm 1.44)$  pA/pF vs.  $(-10.78 \pm 1.87)$  pA/pF], 50% APD [ $(25.7 \pm 2.4)$  ms vs.  $(15.3 \pm 3.0)$  ms] and 90% APD [ $(197.6 \pm 10.6)$  ms vs.  $(91.8 \pm 21.3)$  ms] in PE group were higher than those in control group (all  $P < 0.05$ ). The expression levels of  $\beta\text{MHC}$  mRNA and CaNA $\beta$  protein in Los + PE group were lower than those in PE group. The absolute peak value of  $I_{\text{Ca-L}}$  current density [ $(-14.02 \pm 1.51)$  pA/pF], 50% APD [ $(20.4 \pm 2.9)$  ms] and 90% APD [ $(128.7 \pm 18.5)$  ms] were lower than those in PE group (all  $P < 0.05$ ). The expression levels of  $\beta\text{MHC}$  mRNA and CaNA $\beta$  protein in CsA + PE group were lower than those in PE group. The absolute value of  $I_{\text{Ca-L}}$  current density [ $(-12.19 \pm 1.09)$  pA/pF], 50% APD [ $(22.7 \pm 1.9)$  ms] and 90% APD [ $(121.7 \pm 15.0)$  ms] were lower than those in PE group (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions:** The AT1R-CaN signaling pathway is involved in the regulation of  $I_{\text{Ca-L}}$  and APD of hypertrophic ventricular myocytes from neonatal rats.

**【Key words】** Ventricular myocyte; Calcium current; Action potential; Whole-cell patch clamp technique

心肌异常肥大导致的心室重构是慢性充血性心力衰竭 (CHF) 发生、发展主要的病理生理机制<sup>[1]</sup>。恶性室性心律失常导致的心源性猝死是 CHF 患者的主要死亡原因<sup>[2]</sup>。后除极是恶性室性心律失常的主要促发机制, L 型钙离子通道电流 ( $I_{\text{Ca-L}}$ ) 的增强是诱发后除极, 尤其是早期后除极的始动因素<sup>[3-4]</sup>。血管紧张素 II 受体 1 型 (AT1R)-钙调磷酸酶 (CaN) 信号通路在心肌细胞肥大及伴随的离子通道重构的调控中有重要作用<sup>[5-7]</sup>。但该信号通路对肥大心室肌细胞  $I_{\text{Ca-L}}$  的调控作用尚不清楚。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

苯肾上腺素 (PE)、胎牛血清 (FBS)、高糖 DMEM 培养基和胰蛋白酶购自 Gibco 公司。5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-Brdu)、氯沙坦 (Los)、环孢素 A (CsA)、苯肾上腺素 (PE) 和 II 型胶原酶购自 Sigma 公司。兔源钙 CaN A 亚基  $\beta$  亚单位 (CaNA $\beta$ ) 抗体购自德国 Merck Millipore 公司, 鼠源 GAPDH 抗体购自上海康成生物公司。BCA 蛋白质定量试剂盒购自北京中杉金桥公司。其他试剂均为国产分析纯以上级别。Bio-Rad 550 酶标仪、Bio-Rad 化学发光仪购自 Bio-Rad 公司。PCR 仪购自加拿大 MJ Research 公司。电极拉制仪 (PP830 型) 购自日本 Narishige 公司。膜片钳放大器 (Axopatch700B) 及附件购自美国 Axon 公司。

### 1.2 实验动物

1 d 龄 SD 大鼠乳鼠, 雌雄不限, 清洁级别, 由斯贝福 (北京) 实验动物科技有限公司提供, 许可证号 SCXK (京) 2016-0006。

### 1.3 乳鼠心室肌细胞分离培养及分组

分离乳鼠心室, 剪碎, 消化 (胰蛋白酶终浓度 0.1%、II 型胶原酶终浓度 0.03%) 细胞。采用差速贴壁分离技术, 得到纯化的心室肌细胞<sup>[7]</sup>。于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养。

心室肌细胞培养 24 h, 更换含 5% FBS 的 DMEM 培养基, 据干预方式不同分为 4 组: 对照组细胞不予干预; PE 组细胞常规培养 1 h 后予终浓度为 0.1 mmol/L 的 PE 干预 24 h; Los + PE 组先予 1  $\mu\text{mol/L}$  Los 干预 1 h, 再予终浓度为 0.1 mmol/L 的 PE 干预 24 h; CsA + PE 组先予 0.25  $\mu\text{g/ml}$  CsA 干预 1 h, 再予终浓度为 0.1 mmol/L 的 PE 干预 24 h。

### 1.4 心室肌细胞肥大刺激有效性鉴定

实时荧光定量聚合酶链反应 (qRT-PCR) 测定心室肌细胞肌球蛋白重链 ( $\beta\text{MHC}$ ) 的 mRNA 表达水平。 $\beta\text{MHC}$  引物序列: 上游 5'-CTCCCTCAA GCTCCTAAGTAATC-3', 下游 5'-ACACGGTCT GAAAGGATGAG-3'。GAPDH 引物序列: 上游 5'-GGGAAACCCATCACCATCTT-3', 下游 5'-CCAGTAGACTCCACGACATACT-3'。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 10 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  退火

30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 40 个循环。以  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  计算各组样品间表达水平的相对差异。

1.5 Western blot 检测心室肌细胞 CaNAβ 的蛋白表达水平

提取心室肌细胞总蛋白,测定蛋白浓度。取 40 μg 总蛋白上样,电泳后转移蛋白至 NC 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h。加兔抗大鼠 GAPDH 抗体 (1 : 1 000)、兔抗大鼠 CaNAβ 抗体 (1 : 500),4 ℃ 孵育过夜。充分漂洗后,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,Bio-Rad 化学发光仪进行检测。利用 ImageJ 专业图像分析软件对发光条带半定量测定,以 GAPDH 为内参,计算蛋白的相对表达水平。

1.6 全细胞膜片钳检测心室肌细胞  $I_{Ca-L}$  和动作电位

玻璃微电极与细胞形成高阻抗封接、破膜,全细胞膜片钳记录  $I_{Ca-L}$  离子电流。 $I_{Ca-L}$  去极化阶跃方案:设置钳制电压为 -80 mV,脉冲刺激波宽为 500 ms,刺激频率为 0.1 Hz,刺激电压从 -40 mV 开始,每次增加 10 mV,直至最大刺激电压 +50 mV。采用电流密度分析以避免细胞大小造成的误差。电流密度 = 电流强度/电容 (pA/pF)。电信号经特制银/氯化银 (Ag/AgCl) 电极引导,由膜片钳 AXON 700B 放大器放大,通过模-数转换/数-模转换 (AD/DA 转换) 后存储于计算机中。实验过程由 pCLAMP 10.0 软件程序进行刺激发放和信号采集。

应用全细胞膜片钳技术中的电流钳模式,予 1 nA 电流脉冲,波宽 5 ms,引发心房肌细胞动作电位。记录动作电位并分析动作电位时程 (APD) 的时程。

1.7 统计学分析

采用 pCLAMP 10.0 软件进行数据和图形转换;运用 SigmaPlot 软件绘制离子通道电流密度-电压曲线。用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析。数据以均数 ± 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),组间两两比较用 LSD 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 βMHC 的 mRNA 表达水平比较

4 组间 βMHC mRNA 表达水平的差异有统计学意义 ( $F = 82.932, P < 0.001$ )。组间两两比较显示,PE 组 βMHC mRNA 表达水平较对照组明显升高;Los + PE 组和 CsA + PE 组 βMHC mRNA

表达水平较 PE 组均明显下降 ( $P$  均  $< 0.05$ ),见表 1。

2.2 各组 CaNAβ 的蛋白表达水平比较

4 组间 CaNAβ 蛋白表达水平的差异有统计学意义 ( $F = 180.209, P < 0.001$ )。组间两两比较显示,PE 组 CaNAβ 蛋白表达水平较对照组明显升高;Los + PE 组和 CsA + PE 组 CaNAβ 蛋白表达水平较 PE 组均明显下降 ( $P$  均  $< 0.001$ ),见表 1、图 1。

表 1 各组心室肌细胞 βMHC mRNA 和 CaNAβ 蛋白表达水平比较

组别	<i>n</i>	βMHC mRNA 表达水平	CaNAβ 蛋白 表达水平
对照组	3	1	1
PE 组	3	2.74 ± 0.42 <sup>(1)</sup>	1.95 ± 0.18 <sup>(1)</sup>
Los + PE 组	3	2.08 ± 0.32 <sup>(2)</sup>	0.53 ± 0.04 <sup>(3)</sup>
CsA + PE 组	3	1.01 ± 0.12 <sup>(3)</sup>	0.33 ± 0.04 <sup>(3)</sup>

注:与对照组比较,<sup>(1)</sup>  $P < 0.001$ ;与 PE 组比较,<sup>(2)</sup>  $P < 0.01$ ,<sup>(3)</sup>  $P < 0.001$

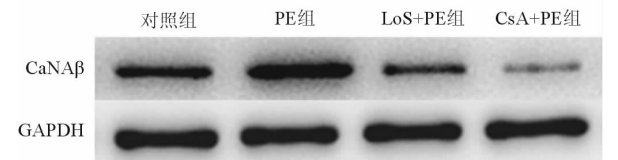


图 1 各组乳鼠心室肌细胞 CaNAβ 蛋白表达水平

2.3 各组乳鼠心室肌细胞  $I_{Ca-L}$  比较

图 2 为各组心室肌细胞  $I_{Ca-L}$  峰值电流原始图,图 3 为  $I_{Ca-L}$  电流密度-电压曲线图。 $I_{Ca-L}$  表现为内向电流,PE 组电流密度-电压曲线较对照组下移,而 Los + PE 组和 CsA + PE 组电流密度-电压曲线较 PE 组上移,较对照组下移。统计分析发现,在 -20 mV ~ +40 mV 各级刺激电压水平,PE 组  $I_{Ca-L}$  电流密度绝对值均大于对照组 ( $P$  均  $< 0.01$ ),Los + PE 组和 CsA + PE 组  $I_{Ca-L}$  电流密度绝对值均小于 PE 组 ( $P$  均  $< 0.05$ )。在钳制电压为 0 mV 时,各组内向  $I_{Ca-L}$  电流皆达峰值,各组间总体差异有统计学意义 ( $F = 48.547, P < 0.001$ )。组间  $I_{Ca-L}$  峰值电流密度绝对值比较显示,PE 组较对照组显著增大 [(-18.23 ± 1.44) pA/pF 对 (-10.78 ± 1.87) pA/pF,  $P < 0.001$ ], Los + PE 组 [(-14.02 ± 1.51) pA/pF] 和 CsA + PE 组 [(-12.19 ± 1.09) pA/pF] 较 PE 组均显著减小 ( $P$  均  $< 0.001$ )。

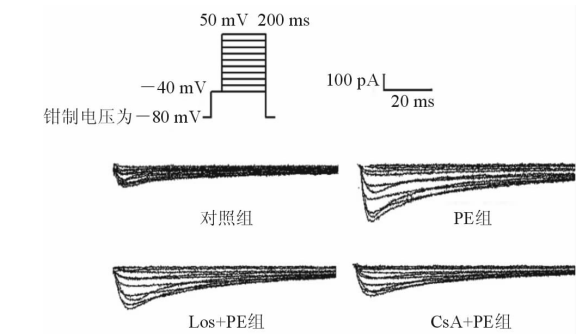


图 2 各组心室肌细胞 L 型钙电流峰值电流原始图

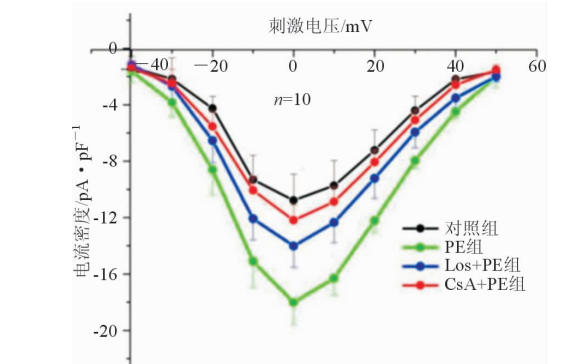


图 3 各组心室肌细胞 L 型钙电流电流密度-电压曲线图

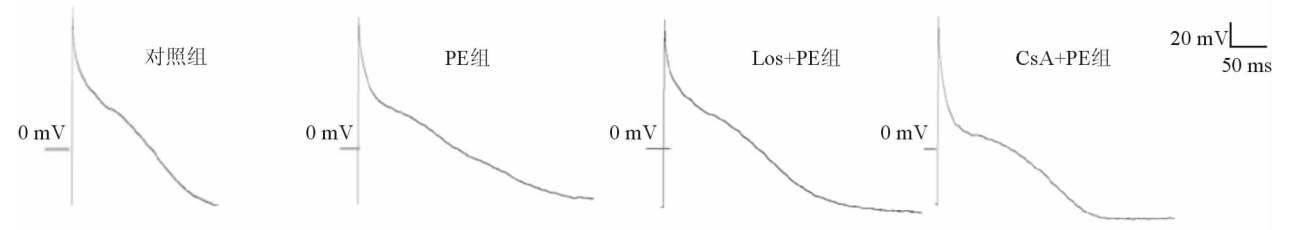


图 4 各组心室肌单细胞动作电位代表图

### 3 讨论

$I_{Ca-L}$  是动作电位 2 期的主要内向电流,其与以钾离子( $K^+$ )电流为主的外向电流相互平衡,形成动作电位的平台期,对细胞 APD 起重要作用。生理状态下,平台期内向钙离子( $Ca^{2+}$ )增加,对细胞质肌浆网  $Ca^{2+}$  大量释放、启动心肌细胞兴奋-收缩耦联起着决定性作用。然而,在心肌疾病如心肌肥大、心肌炎、心力衰竭时,平台期内向  $Ca^{2+}$  的增加是触发早期后除极的直接、主要因素<sup>[3-4]</sup>。同时,在动作电位复极晚期细胞内  $Ca^{2+}$  超负荷可激活非特异性阳离子通道和  $Ca^{2+}$ -钠离子( $Na^+$ )交换泵,增加细胞内阳离子浓度,诱发晚期后除极<sup>[4]</sup>。早期后除极和晚期后除极易诱发室性早搏和室性心动过速,是导致心源性猝死的主要电学机制<sup>[8-9]</sup>。

研究发现,CaN 参与心肌肥大和心肌细胞多种离子通道重构的调控,并受 AT1R 信号的上游调控<sup>[5-7,10]</sup>,但未见 AT1R-CaN 信号通路对  $Ca^{2+}$  通道

### 2.4 各组乳鼠心室肌细胞动作电位比较

无论是 APD<sub>50</sub> 还是 APD<sub>90</sub>,4 组间差异均有统计学意义( $F = 28.976$  和  $70.437$ , $P$  均 $<0.001$ )。组间两两比较显示,PE 组 APD<sub>50</sub> 和 APD<sub>90</sub> 均大于对照组( $P$  均 $<0.001$ );而 Los + PE 组、CsA + PE 组的 APD<sub>50</sub> 和 APD<sub>90</sub> 均小于 PE 组( $P$  均 $<0.05$ )。见表 2、图 4。

表 2 各组心室肌细胞动作电位时程的比较

组别	<i>n</i>	APD <sub>50</sub> /ms	APD <sub>90</sub> /ms
对照组	10	15.3 ± 3.0	91.8 ± 21.3
PE 组	10	25.7 ± 2.4 <sup>(1)</sup>	197.6 ± 10.6 <sup>(1)</sup>
Los + PE 组	10	20.4 ± 2.9 <sup>(3)</sup>	128.7 ± 18.5 <sup>(3)</sup>
CsA + PE 组	10	22.7 ± 1.9 <sup>(2)</sup>	121.7 ± 15.0 <sup>(3)</sup>

注:APD<sub>50</sub>和 APD<sub>90</sub>分别为 50%和 90%动作电位时程;与对照组比较,<sup>(1)</sup> $P<0.001$ ;与 PE 组比较,<sup>(2)</sup> $P<0.05$ ,<sup>(3)</sup> $P<0.001$

重构调控的相关报道。仅有研究显示,激活培养的心肌细胞 CaN,能够增强心肌细胞膜 L 型钙离子通道活性<sup>[11]</sup>。

本研究采用 CaN 的经典抑制剂 CsA 对心肌细胞进行干预,评估充分抑制 CaN 活性对  $I_{Ca-L}$  的影响。结果显示 CsA 能抑制 PE 刺激的 CaN 主要功能结构 CaNA $\beta$  蛋白的表达;同时,CsA 干预能够明显抑制 PE 诱导的心室肌细胞肥大基因  $\beta$ MHC mRNA 表达和心室肌细胞膜  $I_{Ca-L}$  电流密度的增加,提示 CaN 信号参与 PE 对肥大心室肌细胞  $I_{Ca-L}$  的调控。本研究结果还显示,给予 AT1R 特异性阻滞剂 Iso 干预,也能明显抑制 PE 诱导的心室肌细胞 CaNA $\beta$  蛋白表达和肥大基因  $\beta$ MHC mRNA 表达,并且抑制 PE 刺激导致的  $I_{Ca-L}$  电流密度增加效应,提示 AT1R 作为 CaN 的上游信号,可通过调控 CaN 的表达参与 PE 对肥大心室肌细胞  $I_{Ca-L}$  的调控。

单细胞动作电位分析显示,PE 干预导致心室肌细胞  $APD_{50}$  和  $APD_{90}$  值显著延长;而 Los 和 CsA 干预明显抑制 PE 对 APD 的延长作用。PE 干预激活 CaN,增大  $I_{Ca-L}$  电流密度,使得细胞动作电位 2 期内向阳离子流增加,故而 APD 延长。CaN 激活进而增大  $I_{Ca-L}$  电流密度的机制目前仍不完全清楚。有研究显示,活化的 CaN 能够与 L 型钙离子通道的  $\alpha 1.2$  亚基结合,激活该离子通道,增大  $I_{Ca-L}$  电流密度<sup>[11]</sup>;此外,该现象尚可能与构成 L 型钙离子通道的功能亚基的表达上调有关<sup>[12]</sup>。

综上所述,本研究结果显示 AT1R-CaN 信号通路参与乳鼠肥大心室肌细胞  $I_{Ca-L}$  和 APD 的调控。

### 参 考 文 献

- [1] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 97(2): 245-262.
- [2] Kusumoto FM, Bailey KR, Chaouki AS, et al. Systematic review for the 2017 AHA/ACC/HRS guideline for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines and the heart rhythm society [J]. Circulation, 2018, 138(13):e392-e414.
- [3] Kurata Y, Tsumoto K, Hayashi K, et al. Multiple dynamical mechanisms of phase-2 early afterdepolarizations in a human ventricular myocyte model: involvement of spontaneous SR  $Ca^{2+}$  release [J]. Front Physiol, 2020, 10:1545.
- [4] Wit AL. Afterdepolarizations and triggered activity as a mechanism for clinical arrhythmias [J]. Pacing Clin Electrophysiol, 2018, 41(8):883-896.
- [5] 何炯红, 杨龙, 夏桂玲, 等. 钙调神经磷酸酶基因沉默对肥大乳鼠心室肌细胞瞬时外向钾电流离子通道重构的作用[J]. 中华医学杂志, 2018, 41(41):3345-3349.
- [6] He J, Xu Y, Yang L, et al. Regulation of inward rectifier potassium current ionic channel remodeling by AT1-calcineurin-NFAT signaling pathway in stretch-induced hypertrophic atrial myocytes[J]. Cell Biol Int, 2018, 42(9): 1149-1159.
- [7] 邓娜, 夏桂玲, 杨龙, 等. AT1R-CaN 信号通路在乳鼠肥大心室肌细胞 Nav1.5 蛋白表达调控中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(2):221-226.
- [8] Zhang X, Ai X, Nakayama H, et al. Persistent increases in  $Ca^{2+}$  influx through Cav1.2 shortens action potential and causes  $Ca^{2+}$  overload-induced afterdepolarizations and arrhythmias[J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(1):4.
- [9] O-Uchi J, Komukai K, Kusakari Y, et al. Alpha1-adrenoceptor stimulation potentiates L-type  $Ca^{2+}$  current through  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent Pk II (CaMK II) activation in rat ventricular myocytes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(26):9400-9405.
- [10] Dong D, Duan Y, Guo J, et al. Overexpression of calcineurin in mouse causes sudden cardiac death associated with decreased density of  $K^{+}$  channels[J]. Cardiovasc Res, 2003, 57(2):320-332.
- [11] Tandan S, Wang Y, Wang TT, et al. Physical and functional interaction between calcineurin and the cardiac L-type  $Ca^{2+}$  Channel[J]. Circ Res, 2009, 105(1):51-60.
- [12] Wang Y, Tandan S, Hill JA. Calcineurin-dependent ion channel regulation in heart [J]. Trends Cardiovasc Med, 2014, 24(1):14-22.

(收稿:2020-12-27 修回:2021-04-09)

(本文编辑:胡晓静)