

Crim1 过表达抑制肥大乳鼠心室肌细胞瞬向外向钾电流改变

何炯红 邓娜 杨龙 唐倩 夏桂玲 杨英 黄勇淇 赵义冬

【摘要】 目的:探讨半胱氨酸丰富跨膜成骨蛋白调控因子(Crim1)对肥大乳鼠心室肌细胞瞬向外向钾电流(Ito)的调控作用。 方法:将 1 d 龄 SD 乳鼠心室肌细胞培养 48 h 后分组干预。重组腺病毒空载体(Ad-null)组给予 Ad-null 感染细胞 32 h。重组腺病毒空载体+苯肾上腺素(Ad-null+PE)组给予 Ad-null 感染细胞 8 h 后,再予苯肾上腺素(PE)干预 24 h。Crim1 过表达重组腺病毒+苯肾上腺素(Ad-Crim1+PE)组给予携带 Crim1 基因的重组腺病毒感染细胞 8 h 后,再予 PE 干预 24 h。结晶紫染色培养细胞,ImageJ 软件计算细胞表面积。全细胞膜片钳技术检测 Ito,计算电流密度。 结果:PE 干预诱导心室肌细胞肥大,减小 Ito 电流密度;该效应可被过表达 Crim1 所抑制。 结论:过表达 Crim1 可抑制 PE 诱导的心室肌细胞肥大及 Ito 改变。

【关键词】 心室肥大;半胱氨酸丰富跨膜成骨蛋白调控因子;瞬向外向钾电流;离子通道

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.06.007

Overexpression of Crim1 inhibits the change of transient outward potassium current in neonatal rat hypertrophic ventricular myocytes HE Jionghong¹, DENG Na², YANG Long¹, TANG Qian², XIA Guiling¹, YANG Ying¹, HUANG Yongqi¹, ZHAO Yidong¹. 1. Department of Cardiology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guizhou 550002; 2. Department of Cardiology, People's Hospital of Guizhou Medical University, Guizhou 550025, China

【Abstract】 Objective: To investigate the regulation of cysteine-rich motor neuron 1 (Crim1) on transient outward potassium current (Ito) in neonatal rat hypertrophic ventricular myocytes. **Methods:** After cultured for 24 hours, the ventricular myocytes of 1-day old Sprague-Dawley rats were divided into three groups according to different intervention. Null adenoviral vectors (Ad-null) were used to infect the cells in Ad-null group for 32 hours. The cells were infected with empty adenovirus vector for eight hours, then were stimulated with phenylephrine (PE) for 24 hours in Ad-null-PE group. The cells were infected with Crim1-expressing recombinant adenovirus (Ad-Crim1) for eight hours, then were stimulated with phenylephrine for 24 hours in Ad-Crim1-PE group. The cell surface area was evaluated using ImageJ software. Ito was detected by whole-cell patch clamp technique and current density was calculated. **Results:** PE induced ventricular myocyte hypertrophy and reduced Ito current density, which was inhibited by overexpression of Crim1. **Conclusions:** Overexpression of Crim1 inhibits PE-induced ventricular myocyte hypertrophy and Ito changes.

【Key words】 Ventricular hypertrophy; Cysteine-rich motor neuron 1; Transient outward potassium current; Ion channel

基金项目:贵州省科技计划项目(黔科合基础[2019]1205号);贵州省科学技术厅临床研究中心项目(黔科合平台人才[(2017)5405])

作者单位:550002 贵阳,贵州省人民医院心内科(何炯红,杨龙,夏桂玲,杨英,黄勇淇,赵义冬); 550025 贵阳,贵州医科大学附属医院心内科(邓娜,唐倩)

通信作者:杨龙,Email:yanglong1001@163.com

病理性心肌肥大导致的心室重构是慢性充血性心力衰竭(CHF)最主要的病理生理机制^[1-2]。心脏性猝死是 CHF 患者主要的死亡原因^[3]。心肌细胞离子通道重构是导致心肌细胞动作电位改变,进而引发恶性室性心律失常的重要病理生理基础^[4-5]。

半胱氨酸丰富跨膜成骨蛋白调控因子(Crim1)是调控胚胎组织器官发育的重要因子,并参与心肌细胞及心室组织肥大的调控^[6-7]。Crim1 是否参与肥大心肌细胞离子通道重构的调控目前尚不清楚。研究发现,在培养的肥大乳鼠心肌细胞模型中,编码瞬时外向钾电流(Ito)离子通道 α 亚基的 Kv4.2 基因和蛋白表达下调,心肌细胞 Ito 离子通道失活加快,而致 Ito 电流密度减小,细胞动作电位时程(APD)延长^[8]。本研究旨在探讨 Crim1 过表达对肥大心肌细胞 Ito 的调控作用。

1 对象与方法

1.1 主要试剂和仪器

兔抗鼠 Crim1 抗体(北京博奥森公司),兔抗鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(Santa Cruz 公司),羊抗兔辣根过氧化物酶-IgG(北京中杉金桥公司),胰酶和Ⅱ型胶原酶(Sigma 公司)。高糖 DMEM 培养基、特优级胎牛血清(FBS)、苯肾上腺素(PE)、5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-BrdU)均为 Gibco 公司产品。携带 Crim1 基因的重组腺病毒(Ad-Crim1)、腺病毒空载体(Ad-null)购自上海 ThermoFisher SCIENTIFIC 公司。Axopatch 700B 膜片钳放大器及 Digidata 1322 数据转换器(美国 Axon 公司),Sutter p-97 微电极拉制仪(美国 Sutter 公司),BJ-40 玻璃微电极(北京正天易科贸有限公司)。

记录钾电流的细胞外液(mmol/L):NaCl 136, HEPES 10.0, KCl 5.4, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0, Glucose $\cdot \text{H}_2\text{O}$ 10.0, NaH_2PO_4 0.33, BaCl_2 0.5, CdCl_2 0.3, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0,用 NaOH 溶液将 pH 值调至 7.4。电极内液(mmol/L): $\text{Na}_2 \cdot \text{ATP}$ 5.0, KCl 140, HEPES 10.0, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0, EGTA 5.0,用 KOH 溶液将 pH 值调至 7.2。含钙台氏液(mmol/L): NaH_2PO_4 0.33, NaCl 136, KCl 5.4, 葡萄糖 10.0, HEPES 10.0, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0,用 NaOH 溶液将 pH 值调至 7.4。

1.2 实验动物

清洁级 1 d 龄 SD 大鼠乳鼠,雌雄不限,购于北

京大学医学部动物中心[许可证号 SYXK(京)2011-0039]。此动物实验通过贵州省人民医院伦理委员会批准(院伦理审查[2012]001 号)。

1.3 原代乳鼠心肌细胞的分离和培养

乙醚气雾麻醉下处死乳鼠,75%乙醇体表消毒。分离左心室,保留室间隔。剪碎心肌组织,给予终浓度分别为 0.1%的胰蛋白酶和 0.03%的 2 型胶原酶混合酶解液分离细胞。差速贴壁与 BrdU 结合处理获得纯化的心肌细胞^[7,9-10]。加入 10%FBS-DMEM 培养基,于 37℃ 5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后换成无血清 DMEM 高糖培养基进行后续实验。

1.4 重组腺病毒感染原代心肌细胞的有效性鉴定

细胞培养 48 h 后换成无血清 DMEM 高糖培养基,分 4 组,分别给予 Ad-null 和 Ad-Crim1 [分 3 组,感染复数(MOI)分别为 25、100、200] 感染原代心肌细胞 32 h,Western blot 检测 Crim1 蛋白表达,验证 Ad-Crim1 感染过表达的有效性,并据此筛选出合适的病毒感染滴度用于后续实验。

1.5 细胞分组干预

心肌细胞培养 48 h 后更换无血清 DMEM 高糖培养基,按干预方式不同分为 3 组。重组腺病毒空载体(Ad-null)组:Ad-null 感染细胞 32 h。重组腺病毒空载体 + 苯肾上腺素(Ad-null + PE)组:Ad-null 感染细胞 8 h 后,予 PE 干预 24 h。Crim1 过表达的重组腺病毒 + 苯肾上腺素(Ad-Crim1 + PE)组:Ad-Crim1 感染细胞 8 h 后,予 PE 干预 24 h。

1.6 心肌细胞结晶紫染色

结晶紫行活细胞染色。每组细胞在 400 倍显微镜下随机拍照 10 个视野,ImageJ 软件测量细胞表面积,计算细胞平均面积。

1.7 Western blot 检测

提取总蛋白。细胞蛋白按 40 μg 上样量进行电泳。转膜后用 5%羊血清 37℃ 封闭 2 h,加入一抗兔抗鼠 Crim1 抗体(1:100)或兔抗 GAPDH (1:1000),4℃ 孵育过夜,再与二抗羊抗兔辣根过氧化物酶-IgG,37℃ 孵育 2 h。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进行半定量分析,以 GAPDH 为内参进行校正。每组样本重复 3 次实验。

1.8 全细胞膜片钳检测心肌细胞 Ito

预温的 0.125%胰酶消化心肌细胞,制成单细胞悬液。于直径 35 mm 培养皿中调整细胞数约

为 1×10^2 个/mL, 37°C 95% CO_2 培养 2~3 h 使细胞贴壁。选择立体感强, 大小适中的细胞进行实验。玻璃微电极充灌电极液后电阻为 2~4 M Ω 。施加负压使电极与细胞表面形成 1 G Ω 以上高阻抗封接。破膜, 给予慢电容补偿, 形成全细胞记录。设置钳制电压为 -80 mV, 给予指令电位从 -40~+70 mV, 跃阶电压 10 mV, 波宽 300 ms, 频率 0.2 Hz 的刺激, 记录 I_{to} 。5 mmol/L 的 4-氨基吡啶能阻断该电流, 证实该电流为 I_{to} 。为避免因细胞大小所造成的误差, 采用电流密度分析, 电流密度 (pA/pF) = 电流强度/电容。电流信号经 Ag/AgCl 电极引导, 由膜片钳 AXON 700B 放大器放大, 通过 AD/DA 转换板, 存储于计算机硬盘中。实验过程由 pCLAMP 10.0 软件程进行序刺激发放和信号采集。

1.9 统计学处理

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。采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。数据以均数 \pm 标准差表示。应用单因素方差分析进行多组间比较, 多组间两两比较方差齐性时用 LSD 检验, 方差不齐性时用 Dunnett T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ad-Crim1 感染心室肌细胞促 Crim1 蛋白表达

为证实 Ad-Crim1 感染原代心室肌细胞促 Crim1

蛋白表达的有效性, 分别用 Ad-Crim1 或者 Ad-null 感染原代心室肌细胞 32 h。当 Ad-Crim1 滴度为分别 MOI 25、100 及 200 时, Ad-Crim1 3 组心室肌细胞 Crim1 蛋白相对表达水平均较 Ad-null 组 (Ad-null 组为 1) 明显升高, 分别为 1.83 ± 0.13 、 2.51 ± 0.12 和 2.82 ± 0.27 (P 均 < 0.05), 说明 Ad-Crim1 感染原代心室肌细胞促 Crim1 蛋白表达有效。Ad-Crim1 3 组中 MOI 25 组 Crim1 蛋白表达水平较 MOI 100 组和 MOI 200 组低, 而 MOI 100 组和 MOI 200 组表达水平相近。因此, 后续实验选取 Ad-Crim1 感染心室肌细胞的病毒滴度为 MOI = 100。见图 1。

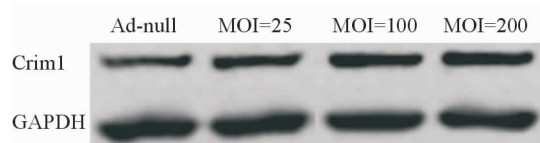
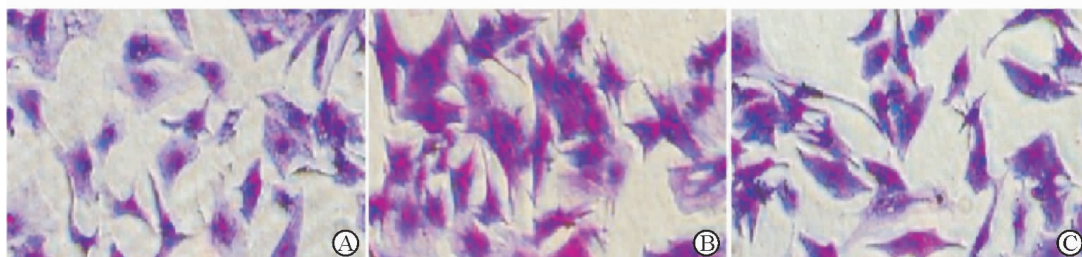


图 1 腺病毒感染培养的心室肌细胞促 Crim1 蛋白表达

2.2 过表达 Crim1 抑制 PE 诱导的心室肌细胞肥大

结晶紫染色显示 Ad-null 组、Ad-null + PE 组和 Ad-Crim1 + PE 组心室肌细胞大小有差异, 见图 2。ImageJ 软件测量 Ad-null 组、Ad-null + PE 组和 Ad-Crim1 + PE 组心室肌细胞面积分别为 $(279.76 \pm 73.71) \mu\text{m}^2$ 、 $(568.29 \pm 84.37) \mu\text{m}^2$ 和 $(396.82 \pm 45.64) \mu\text{m}^2$ 。PE 干预 24 h 诱导心室肌细胞面积明显增大, 该效应可被过表达 Crim1 抑制 (P 均 < 0.001)。



注: A 为 Ad-null 组; B 为 Ad-null + PE 组; C 为 Ad-Crim1 + PE 组

图 2 各组心室肌细胞结晶紫染色 ($\times 400$)

2.3 过表达 Crim1 抑制 PE 诱导的心室肌细胞 I_{to} 改变

在刺激电压为 20~70 mV 时, Ad-null + PE 组细胞 I_{to} 电流密度较 Ad-null 组明显减小, 而 Ad-Crim1 + PE 组较 Ad-null + PE 组明显增大 ($P < 0.05$), 见图 3、表 1。

3 讨论

Crim1 是 I 型跨膜蛋白, 在胎儿生长发育过程中的多个组织器官表达, 调控胚胎发育, 包括心脏的发育调控^[11-15]。Crim1 对于胚胎期心脏发育的影响提示其可能参与出生后心肌肥大的病理生理过程, 然而, 相关证据极少。在培养的牵张刺激肥大

乳鼠心室肌细胞和在体腹主动脉结扎肥大大鼠心室肌组织模型中发现,Crim1 基因和蛋白表达皆明显下调;给予氯沙坦或替米沙坦干预能显著减轻心室肌细胞肥大和心室肥大,同时上调 Crim1 基因和蛋白的表达,提示 Crim1 可能参与对此模型心室肌细胞及心室组织肥大的调控,且 Crim1 表达对病理性心肌梗大为负性调节作用^[6-7]。

本研究发现,给予肾上腺素能 α 受体激动剂 PE 干预培养的乳鼠心室肌细胞,导致细胞肥大、细胞 Ito 电流密度减小;通过重组腺病毒感染心室肌细胞获得 Crim1 蛋白过表达干预,可明显抑制 PE 诱导的上述效应,证明 Crim1 参与心室肌细胞肥大的调控,并证实 Crim1 参与肥大心室肌细胞离子通道重构的调控。

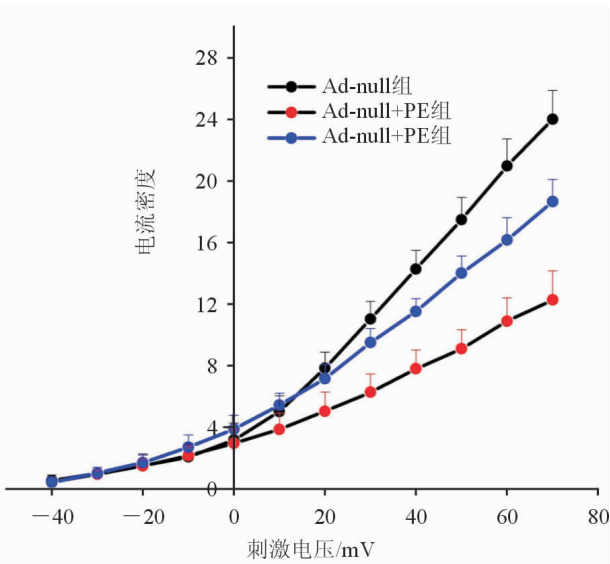


图 3 心室肌细胞瞬时外向钾电流的密度

表 1 各组不同电压下的瞬时外向钾电流的电流密度比较 (pA/pF,n=10)

组别	10 mV	20 mV	30 mV	40 mV	50 mV	60 mV	70 mV
Ad-null 组	5.41±0.87	8.17±0.89	11.32±0.93	14.63±0.95	17.90±1.14	21.58±1.02	24.72±1.36
Ad-null + PE 组	4.01±1.00 ⁽¹⁾	5.18±1.09 ⁽¹⁾	6.39±0.90 ⁽¹⁾	7.76±0.96 ⁽¹⁾	9.05±0.97 ⁽¹⁾	10.60±1.35 ⁽¹⁾	11.97±1.88 ⁽¹⁾
Ad-Crim1 + PE 组	5.26±0.70 ⁽²⁾	6.49±1.90 ⁽²⁾	9.27±0.65 ⁽²⁾	11.37±0.78 ⁽²⁾	13.95±1.21 ⁽²⁾	16.05±1.56 ⁽²⁾	18.73±1.58 ⁽²⁾

注:Ad-null 组相比,⁽¹⁾P<0.001;与 Ad-null + PE 组相比,⁽²⁾P<0.001

Ito 是一种快速激活和快速失活的外向钾电流,主要参与动作电位的 1 期,与心室肌细胞动作电位的形状和时程有关。Ito 减小可延缓动作电位 1 期复极化,减小 1 期切迹深度,从而影响其他离子通道活性。在器质性心脏病的肥大心室肌中,尤其是合并心力衰竭、心肌损伤时,心室肌细胞编码 Ito 离子通道的 Kv4.3 基因及其蛋白表达皆下调,Ito 离子通道功能活性减低,导致早期复极异常、复极延迟和 APD 延长,易发生致命性室性心律失常^[16-18]。

本研究结果显示,Crim1 过表达对心室肌细胞肥大及伴随的 Ito 电流密度改变有抑制作用,针对 Crim1 的干预,有可能对心室肥大及伴随的室性心律失常具有防治作用。

参考文献

[1] Hill JA, Olson EN. Cardiac plasticity[J]. N Engl J Med, 2008, 358(13):1370-1380.

[2] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 97(2): 245-262.

[3] Mareev VY, Mareev YV. Methods of prevention of sudden death in chronic heart failure[J]. Kardiologiia, 2015, 55(9): 72-83.

[4] Wang Y, Tandan S, Hill JA. Calcineurin-dependent ion channel regulation in heart[J]. Trends Cardiovasc Med, 2014, 24(1):14-22.

[5] Wang Y, Hill JA. Electrophysiological remodeling in heart failure[J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(4):619-632.

[6] 何炯红, 杨龙, 夏桂玲, 等. Crim1 在肥大心肌组织中的表达及 AT1R 对其表达的调控作用[J]. 临床心血管病杂志, 2018, 34(6):609-611.

[7] 唐倩, 杨龙, 夏桂玲, 等. Crim1 在乳鼠肥大心室肌细胞中的表达及 AT1R 对 Crim1 表达的调控作用[J]. 国际心血管病杂志, 2018, 45(3):160-164.

[8] 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, 98(41):3345-3349.

[9] 胥亚楠, 杨龙, 杨天和, 等. 牵张刺激对乳大鼠心室肌细胞瞬时外向钾电流和内向整流钾电流的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(8):1489-1492.

[10] 邓娜, 夏桂玲, 杨龙, 等. AT1R-Ca²⁺ 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.

[11] Pennisi DJ, Wilkinson L, Kolle G, et al. Crim1KST264/KST264 mice display a disruption of the Crim1 gene resulting in perinatal lethality with defects in multiple organ systems [J]. Dev Dyn, 2007, 236(2):502-511.

[12] Wilkinson L, Gilbert T, Kinna G, et al. Crim1KST264/

KST264 mice implicate Crim1 in the regulation of vascular endothelial growth factor-A activity during glomerular vascular development[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(6): 1697-1708.

[13] Wilkinson L, Wen D, Piper M, et al. CRIM1 regulates the rate of processing and delivery of bone morphogenetic proteins to the cell surface[J]. J Biol Chem, 2003, 278(36): 34181-34188.

[14] Kolle G, Georgas K, Holmes GP, et al. CRIM1, a novel gene encoding a cysteine-rich repeat protein, is developmentally regulated and implicated in vertebrate CNS development and organogenesis[J]. Mech Dev, 2000, 90(2): 181-193.

[15] Lovicu FJ, Kolle G, Yamada T, et al. Expression of Crim1 during murine ocular development[J]. Mech Dev, 2000, 94 (1/2):261-265.

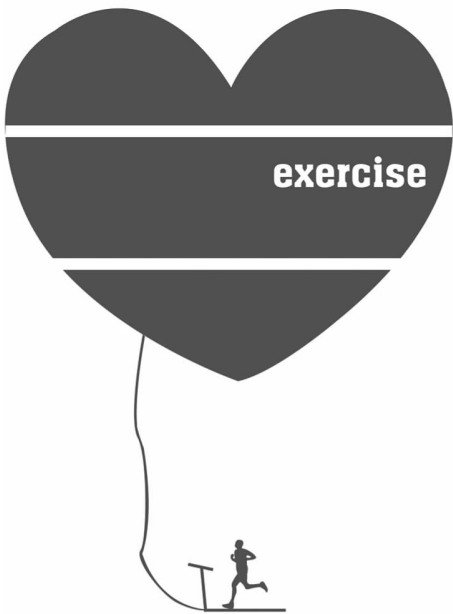
[16] Rossow CF, Minami E, Chase EG, et al. NFATc3-induced reductions in voltage-gated K⁺ currents after myocardial infarction[J]. Circ Res, 2004, 94(10):1340-1350.

[17] Gong N, Bodi I, Zobel C, et al. Calcineurin increases cardiac transient outward K⁺ currents via transcriptional up-regulation of Kv4. 2 channel subunits[J]. J Biol Chem, 2006, 281(50):38498-38506.

[18] Wickenden AD, Kaprielian R, Kassiri Z, et al. The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure[J]. Cardiovasc Res, 1998, 37(2):312-323.

(收稿:2019-04-28 修回:2019-06-28)

(本文编辑:丁媛媛)



运动演绎精彩

健康成就未来