

# ZD7288抑制风湿性心瓣膜病变心房颤动患者右心耳心肌细胞HCN2表达

刘文洲 孙宇 梁飞海 赵文 韦高翔 邓海龙 钱俊 冼磊

**【摘要】 目的:**观察 ZD7288 抑制超极化激活环核苷酸调控通道基因家族-2 (HCN2) 在风湿性心瓣膜病变心房颤动 (房颤) 患者右心耳组织中的作用。**方法:**收集 43 例风湿性心瓣膜病变患者右心耳组织,分为窦性心律患者 (SR 组)、心房颤动组 (AF 组)、ZD7288 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 干预房颤组 (Z1 组) 和 ZD7288 (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 干预房颤组 (Z2 组);采用全细胞膜片钳技术记录  $I_f$  电流密度,荧光定量聚合酶链反应及 Western blot 检测右心耳组织心肌细胞中 HCN2 表达水平。**结果:**相同激活电位时,AF 组心肌细胞  $I_f$  电流密度明显大于 SR 组、Z1 组和 Z2 组,且随电位增加激活更快,尤其在 -70 mV 时,AF 组电流密度明显高于 SR 组、Z1 组和 Z2 组,分别为 (48.36 $\pm$ 1.05) pA/pF、(31.03 $\pm$ 1.17) pA/pF、(31.12 $\pm$ 1.48) pA/pF 和 (30.32 $\pm$ 1.33) pA/pF ( $P<0.01$ )。荧光定量聚合酶链反应结果显示 AF 组、SR 组、Z1 组和 Z2 组 HCN2 mRNA 表达水平分别为 1.60 $\pm$ 0.36、0.24 $\pm$ 0.02、0.28 $\pm$ 0.02 和 0.25 $\pm$ 0.03; Western blot 结果显示 AF 组、SR 组、Z1 组和 Z2 组 HCN2 蛋白表达量分别为 0.95 $\pm$ 0.21、0.22 $\pm$ 0.08、0.27 $\pm$ 0.07 和 0.23 $\pm$ 0.08;AF 组 HCN2 mRNA 和蛋白表达水平均明显高于 SR 组、Z1 组和 Z2 组 ( $P$  均 $<0.01$ )。**结论:**HCN2 参与风湿性心瓣膜病患者房颤的发生发展过程,而 ZD7288 可抑制 HCN2 的表达。

**【关键词】** 风湿性心脏瓣膜病;心房颤动;ZD7288;超极化激活环核苷酸调控通道基因家族-2

doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.03.012

**ZD7288 inhibits the expression level of HCN2 in cardiomyocytes of atrial fibrillation complicated with rheumatic heart disease** LIU Wenzhou, SUN Yu, LIANG Feihai, ZHAO Wen, WEI Gaoxiang, DENG Hailong, QIAN Jun, XIAN Lei Department of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China.

**【Abstract】 Objective:** To find out the expression level of HCN2 inhibited by ZD7288 in atrial fibrillation (AF) patients with rheumatic heart disease (RHD). **Methods:** A total of 43 patients with RHD were divided into 4 groups, sinus rhythm (SR) group, AF group, Z1 group (intervene at AF by 10 $\mu\text{M}$  ZD7288) and Z2 group (intervene at AF by 50 $\mu\text{M}$  ZD7288). The  $I_f$  density was measured by a whole-cell patch clamp technique. The expression of HCN2 was detected by FQ-PCR and western blotting. **Results:** Compared SR group, Z1 group and Z2 group,  $I_f$  density in single myocyte was significantly increased in AF group under same activate potential, and the activation was faster with the increase of the potential. Especially at -70 mV, the current density of the AF group was significantly higher than that of the other three groups [(48.36 $\pm$ 1.05) pA/pF, (31.03 $\pm$ 1.17) pA/pF, (31.12 $\pm$ 1.48) pA/pF, and (30.32 $\pm$ 1.33) pA/pF,  $P<0.01$ ]. The results of FQ-PCR showed that the expressions levels of HCN2 mRNA in AF group, SR group, Z1 group and Z2 group were 1.60 $\pm$ 0.36, 0.24 $\pm$ 0.02, 0.28 $\pm$ 0.02 and 0.25 $\pm$ 0.03. The results of western blotting showed the expressions levels of HCN2 in AF group, SR group, Z1 group and Z2 group were 0.95 $\pm$ 0.21, 0.22 $\pm$ 0.08, 0.27 $\pm$ 0.07 and 0.23 $\pm$ 0.08. The expressions levels of HCN2

in AF group were higher than the other groups (all  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** The high expression level of HCN2 play an important role in AF in the patients with RHD, and ZD7288 can inhibit the expression levels of HCN2.

**【Keywords】** Rheumatic heart disease; Atrial fibrillation; ZD7288; Cyclic nucleotide-gated ion channel 2

风湿性心瓣膜病在我国西南欠发达地区的发病率仍较高。风湿性心瓣膜病患者最常见和最严重的并发症为心房颤动(房颤)。房颤是临床上最常见的心律失常,导致心房收缩功能降低<sup>[1]</sup>。房颤患者的卒中风险明显增加,部分房颤患者在卒中后 1 年内死亡,而高达 1/3 的幸存者永久性残疾<sup>[2]</sup>。尽管对于房颤的治疗方法有药物、介入手术等,但风湿性心脏病瓣膜病变的房颤仍难以彻底治愈。国外由于风湿性心瓣膜病变发病率低,且人心肌标本获取极其困难,相关研究主要是通过动物模型完成,故国外相关研究极少。既往本课题组研究<sup>[3-4]</sup>显示,超极化激活环核苷酸调控通道(HCN)主要存在于右心耳组织,且 HCN2 和 HCN4 在调控窦房结起搏电流节律和频率及维持电流水平上起着重要作用,HCN2 和 HCN4 在风湿性心脏病二尖瓣狭窄并发房颤患者右心耳组织中表达上调,可能是引发房颤的机制之一。目前对于采用超极化 HCN 抑制剂干预研究 HCN 诱发房颤的研究甚少,为进一步探索风湿性心瓣膜病患者发生房颤的机制,本实验在原有研究基础上,采取抑制剂 ZD7288 对房颤心肌细胞进行干预,观察 HCN2 在右心耳组织中的表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

收集广西医科大学第二附属医院胸心血管外科诊断为风湿性心脏瓣膜病、纽约心脏病协会(NYHA)心功能 II~III 级并排除其他并发症的患者 43 例。根据超声心动图及心电图结果,分为风湿性心脏瓣膜病变合并房颤患者 20 例和风湿性心脏瓣膜病变合并窦性心律患者 23 例(SR 组);实验标本均来源于术中建立体外循环时取下的右心耳组织,约 80 mg,迅速保存于有氧 Cardiplegic 转运液中后送实验室进行心肌细胞分离,选择优质细胞保存待实验。将每例房颤组患者标本分成 3 等分,为无 ZD7288 干预组(AF 组)、ZD7288 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 干预组(Z1 组)和 ZD7288 (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 干预组(Z2 组)。Z1 组和

Z2 组分别于细胞保存液中加入浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  和 50  $\mu\text{mol/L}$  的 ZD7288 液各 1 mL<sup>[5]</sup>。静置 4 h 后,进行后续实验。研究经过医院伦理委员会批准并于术前与患者沟通签署知情同意书。

### 1.2 实验试剂和引物

Cardiplegic 转运液, ZD7288 (Sigma 公司), RNA simple TotalRNA 试剂盒 (Tiangen 公司, 北京), RevertAid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (Fermentas 公司, 加拿大), SYBR Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, 日本); 聚合酶链反应 (PCR) 仪 (ABI, 美国)。HCN2 上游引物 5'-CAACTGCTGGGTGTCCATCAA-3', 下游引物 5'-CCAGATGTCCGTCATGCTCTC-3', 139bp;  $\beta$ -actin 上游引物 5'-TGGCACCCAGCACA ATGAA-3', 下游引物 5'-CTAAGTCATACTCCGCC TAGAAGCA-3', 由日本 TaKaRa 公司合成。HCN2 抗人单克隆抗体及相应二抗 (Abcam 公司)。

### 1.3 实验方法

1.3.1 人心肌细胞的分离和选择 采用酶解法获取人活心肌细胞,使用预先配制好的台氏液冲洗所获取右心耳组织,在 37  $^{\circ}\text{C}$  下将右心耳组织置于自制 Langendorff 灌流装置,于台氏液灌流 10 min,后换为无钙台氏液(配方与台氏液相同,但无钙离子)灌流 5 min,最后使用含有 II 型胶原酶的无钙台氏液灌流 5 min<sup>[6]</sup>。将右心耳组织剪碎,使用吹管轻轻吹散后获取心房肌细胞,此时选择细胞膜完整,细胞内不被染色,可见明显横纹且活性良好的心肌细胞,约占 60%,置于细胞培养液中备用。

1.3.2 全细胞膜片钳记录心肌超极化激活的内向离子电流( $I_f$ ) 分别从 4 组细胞选取细胞膜完整光滑、横纹清晰、折光性好的活心肌细胞,按标准膜片钳方法检测内向离子电流。

电极外液 (mmol/L): NaCl 140、KCl 25、CaCl<sub>2</sub> 1、MgCl<sub>2</sub> 1.2、D-Glucose 5.5、Hepes-NaOH 5,用 NaOH 调 pH 值至 7.4,用 BaCl<sub>2</sub> 0.2、CdCl<sub>2</sub> 0.2、4-AP 4 (分别用于阻断 IK1、ICa-L 和 Ito)。

电极内液 (mmol/L): K-Aspartate 110、KCl 40、

NaCl 10、MgATP 2、GTP 0.3、CaCl<sub>2</sub> 1、EGTA 11、Hepes-KOH 10、用 KOH 调 pH 值至 7.2。

保持电位 -40 mV, 施予 1 500 ms, 阶跃电压 10 mV, 指令电位步阶范围 -140 ~ -30 mV, 获得各电压下电流, 均以电流密度 (pA/pF) 表示。

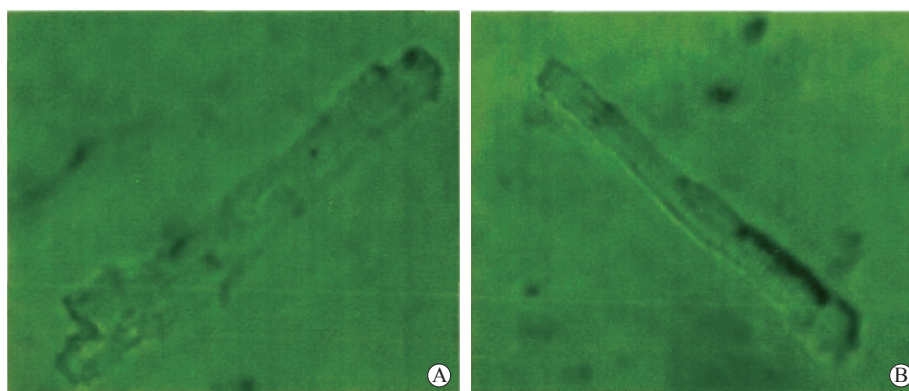
**1.3.3 总 RNA 提取及 cDNA 合成** 按试剂盒说明书提取右心耳组织心肌细胞中总 RNA。所提取总 RNA 于 NanoDrop 2000 超微量分光光度仪测定浓度及 A260/280 值, 1% 凝胶电泳分析其完整性。按 Fermentas 一步法合成 cDNA。

**1.3.4 荧光定量 PCR 反应** 按试剂盒说明书进行配液及反应。20  $\mu$ L 反应体系中 SYBR Premix Ex TaqTM II 10  $\mu$ L, 上下游引物各 0.8  $\mu$ L, ROX Reference Dye (50 $\times$ ) 0.4  $\mu$ L, cDNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu$ L。扩增参数: 95  $^{\circ}$ C 30 min; 95  $^{\circ}$ C 5 s, 60  $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 每个循环第 3 步结束后进行荧光信号强度的采集和检测, 采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 于 ABI StepOne 软件进行数据收集和定量分析各组标本中 HCN2 mRNA 的相对表达水平。

**1.3.5 Western blot 检测** 用蛋白裂解液提取蛋白上清液后检测蛋白浓度, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (电

压浓缩胶 80 V, 分离胶 120 V)。后进行转膜, 时间 45~90 min, 将膜取出放入 TBS-T 中洗 1 次 (时间 5 min) 后封闭, 室温放置 1 h, 分别进行 HCN2 一抗和二抗孵育, DAB 显色和 ECL 曝光, 并用 Lab Works 软件进行灰度分析, 其中每张反应膜同时检测  $\beta$ -actin 的表达水平来作为相应内参照, 从而避免因上样量和曝光时间差异而导致的误差。HCN2 吸光度值/ $\beta$ -actin 吸光度值表示 HCN2 蛋白的相对表达水平。

**1.3.6 右心耳心肌细胞急性分离选择** 风湿性心瓣膜病变患者右心耳组织经过急性分离后, 可见 3 类心肌细胞, 第一类细胞细胞膜完整, 细胞内不被染色, 细胞内可见明显的横纹, 此类细胞活性较好, 约占细胞总数的 60%; 第二类细胞细胞膜有部分缺失、破坏, 此类细胞细胞膜破坏处可见明显染色, 细胞内隐约可见横纹, 细胞内无明显颗粒, 此类细胞约占细胞总数的 20%~25%; 第三类细胞细胞膜形态消失, 细胞完全缩成团状, 细胞内呈颗粒状, 整个细胞被染成蓝色, 占 15%~20%。后 2 类细胞均为死亡的心肌细胞, 占 40%。本研究选取第一类心肌细胞, 见图 1。



注: A 为第一类心肌细胞; B 为第二类心肌细胞

图1 风湿性心瓣膜病变患者右心耳正常心肌细胞 ( $\times 400$ )

## 1.4 统计学分析

用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。数据均采用均数  $\pm$  标准差表示, 计量资料采用 *t* 检验或方差分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料比较

实验组与对照组患者的性别、年龄、左右心房内径等的差异均无统计学意义。

### 2.2 各组心肌细胞中 $I_f$ 电流-电压关系曲线 (I-V 曲线) 及稳态激活的特征

当激活电位为 -70 mV 时, AF 组、SR 组、Z1 组和 Z2 组电流密度分别为 ( $48.36 \pm 1.05$ ) pA/pF、( $31.03 \pm 1.17$ ) pA/pF、( $31.12 \pm 1.48$ ) pA/pF 和 ( $30.32 \pm 1.33$ ) pA/pF, AF 组明显高于 SR 组、Z1 组和 Z2 组 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 而 SR 组、Z1 组和 Z2 组两两比较差异无统计学意义, 见图 2A。随激活电位增加, AF 组

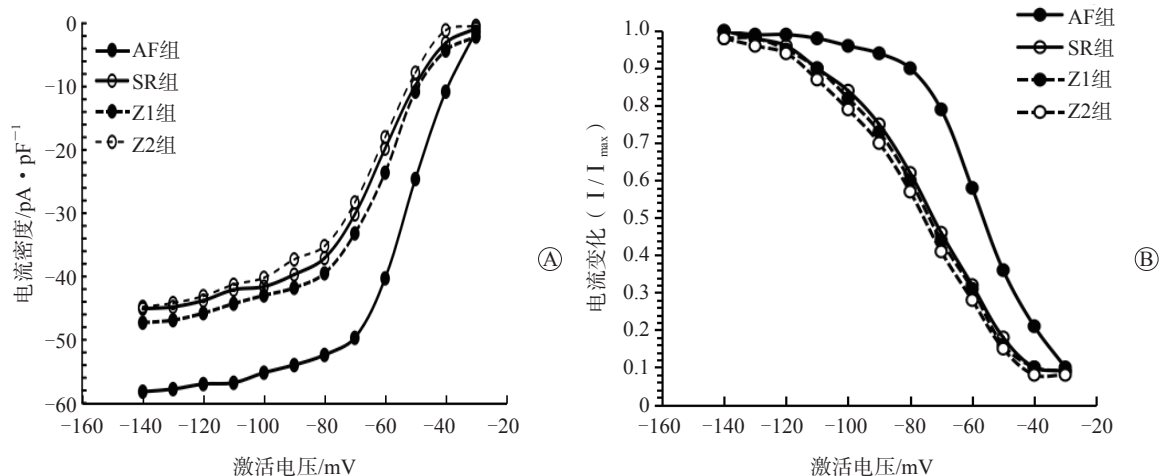


$I_f$  电流密度增加更为明显, 并较早接近最大电流密度, 当激活电位为  $-40$  mV 时, AF 组较 SR 组、Z1 组和 Z2 组  $I_f$  激活加快, 半稳态激活电位较窦性心律组更接近保持电位, 见图 2B, 表 1。

### 2.3 各组 HCN2 相对的表达

HCN2 mRNA AF 组、SR 组、Z1 组和 Z2 组

右心耳组织心肌细胞中的相对表达水平分别为  $1.60 \pm 0.36$ 、 $0.24 \pm 0.02$ 、 $0.28 \pm 0.02$  和  $0.25 \pm 0.03$ , AF 组 HCN2 mRNA 表达水平明显高于 SR 组、Z1 组和 Z2 组 ( $P$  均  $< 0.001$ ), 而 SR 组、Z1 组和 Z2 组两两比较差异均无统计学意义。



注: A 为心肌细胞的  $I \sim V$  曲线; B 为心肌细胞的稳态激活曲线  
图2 风湿性心瓣膜病患者右心耳心肌细胞  $I-V$  曲线及稳态激活的特征

HCN2 蛋白在 AF 组、SR 组、Z1 组和 Z2 组右心耳组织心肌细胞中的相对表达水平分别为  $0.95 \pm 0.21$ 、 $0.22 \pm 0.08$ 、 $0.27 \pm 0.07$  和  $0.23 \pm 0.08$ ,

AF 组 HCN2 蛋白表达水平明显高于 SR 组、Z1 组和 Z2 组 ( $P$  均  $< 0.001$ ), 而 SR 组、Z1 组和 Z2 组两两差异均无统计学意义, 见表 1。

表1 各组右心耳组织心肌细胞  $I_f$  特征及 HCN2 mRNA 和蛋白表达量比较

组别	例数	$I_f$ 电流密度/pA $\cdot$ pF $^{-1}$	半稳态激活电位/mV	稳态激活曲线斜率	HCN2mRNA 表达水平	HCN2 蛋白表达水平
AF组	20	$-48.36 \pm 1.05$	$-53.75 \pm 1.15$	$10.82 \pm 0.19$	$1.60 \pm 0.36$	$0.95 \pm 0.21$
SR组	23	$-31.03 \pm 1.17^{(1)}$	$-66.77 \pm 1.84^{(1)}$	$12.69 \pm 0.86^{(1)}$	$0.24 \pm 0.02^{(1)}$	$0.22 \pm 0.08^{(1)}$
Z1组	20	$-31.12 \pm 1.48^{(1)}$	$-66.65 \pm 2.27^{(1)}$	$12.67 \pm 1.17^{(1)}$	$0.28 \pm 0.02^{(1)}$	$0.27 \pm 0.07^{(1)}$
Z2组	20	$-30.32 \pm 1.33^{(1)}$	$-67.88 \pm 1.93^{(1)}$	$13.20 \pm 1.01^{(1)}$	$0.25 \pm 0.03^{(1)}$	$0.23 \pm 0.08^{(1)}$

注: 与 AF 组比较,  $^{(1)}P < 0.01$ .

### 3 讨论

HCN 控制细胞膜上的钠-钾通道<sup>[7]</sup>, 其中 HCN2 和 HCN4 主要分布于人右心耳窦房结中。本研究发现, 在风湿性心瓣膜病并发房颤患者右心耳组织心肌细胞中, HCN2 的表达明显上调, 与既往研究<sup>[8]</sup>相似, 其机制可能是 HCN2 表达上调时,  $I_f$  增大, 心肌细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 增加, 从而加速舒张期去极化和心率, 引起房颤。

ZD7288 作为 HCN 抑制剂, 具有较好的特异

性, 故被广泛应用于 HCN 的实验研究<sup>[9]</sup>。本研究结果显示, AF 组经不同剂量 ZD7288 干预处理后, 心肌细胞的  $I_f$  的电流密度明显低于 AF 未干预组, 而与窦性心律组比较无统计学差异, 提示 ZD7288 可抑制  $I_f$  电流, 从而调控心肌细胞舒张期去极化, 最终抑制房颤的发生<sup>[10]</sup>。

本研究结果同时提示, 风湿性心瓣膜病并发房颤患者右心耳组织心肌细胞中 HCN2 的 mRNA 及蛋白表达明显高于 Z1 组、Z2 组和 SR 组, 而

ZD7288 预处理组 (Z1 组和 Z2 组) 与 SR 组差异无明显统计学意义, 与既往研究报道相似<sup>[11-12]</sup>。提示 ZD7288 可抑制右心耳组织中 HCN 的 mRNA 及蛋白的表达。ZD7288 作为 HCN 特异性抑制剂, 通过离子通道途径抑制心肌细胞 HCN2 的过度表达, 使得窦房结细胞膜上的钠离子通道功能受到阻断, 从而降低心肌细胞内的 cAMP 和细胞膜  $I_f$  电流, 从而减慢舒张期去极化和心率, 最终抑制 AF 的发生<sup>[13-14]</sup>。

综上所述, ZD72988 可能抑制  $I_f$  电流和 HCN2 mRNA 及蛋白的上调表达, 从而减少 HCN2 诱发风湿性心瓣膜病患者房颤的发生, 这可为风湿性心瓣膜病患者房颤的治疗提供靶点。

#### 参 考 文 献

- [1] 付勇, 毛亮, 李妙龄. miR-1 调控靶基因 HCN4 在风湿性心脏病心房颤动中的作用[J]. 实用医学杂志, 2019, 35(15):2419-2421.
- [2] Jonas DE, Kahwati LC, Yun JDY, et al. Screening for atrial fibrillation with electrocardiography: evidence report and systematic review for the us preventive services task force[J]. JAMA, 2018, 320(5):485-498.
- [3] 刘文洲, 周华富, 孙宇, 等. 超级化激活环核苷酸门控离子通道基因家族-2 在风湿性心脏病二尖瓣狭窄伴心房颤动患者右心耳组织中的表达[J]. 中华实验外科杂志, 2014, 31(3):649-652.
- [4] 刘文洲, 孙宇, 王俊龙, 等. 二尖瓣狭窄合并心房颤动患者 HCN2 表达与测序[J]. 临床心血管病杂志, 2014, 30(1): 56-58.
- [5] 吴欣. ZD7288 对钠通道的阻断作用研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2013.
- [6] 韩钟霖, 吴翔, 刘雪华, 等. PDK1-Akt 信号通路干预对心肌细胞 HCN4 离子通道的影响[J]. 中华心血管病杂志, 2020, 48(11):954-956.
- [7] 张健, 李发鹏, 何卫, 等. 持续性心房颤动模型犬左心房肌 HCN2 和 HCN4 通道表达变化[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(20):5002-5005.
- [8] 王红蕊, 崔冰, 周建业, 等. 心律失常中 HCN4 突变与功能改变和表型的相关研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2019, 19(4):3015-3019.
- [9] Zhong W, Darmani NA. The HCN channel blocker ZD7288 induces emesis in the least shrew (*Cryptotis parva*)[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:647021. .
- [10] Chen C, Liu L, Shu YQ, et al. Blockade of HCN2 channels provides neuroprotection against ischemic injury via accelerating autophagic degradation in hippocampal neurons[J]. Neurosci Bull., 2020, 36(8):875-894.
- [11] 张文娟, 曾晓莉, 赵博, 等. 超级化激活环核苷酸门控阳离子通道功能抑制剂 ZD7288 通过凋亡途径对大鼠脑缺血再灌注损伤发挥神经保护作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2018, 32(9):669-672.
- [12] 毛广通, 苗蓓, 王德广. 超级化激活环核苷酸门控离子通道 2 在脏高敏感性大鼠视上核的表达及作用[J]. 实用医学杂志, 2021, 37(4):434-436.
- [13] Pirtle TJ, Carr TL, Khurana T, et al. ZD7288 and mibefradil inhibit the myogenic heartbeat in *Daphnia magna* indicating its dependency on HCN and T-type calcium ion channels[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2018, 222:36-42.
- [14] Ziyatdinova NI, Kuptsova AM, Faskhutdinov LI, et al. Effect of if current blockade on newborn rat heart isolated according to langendorff[J]. Bull Exp Biol Med, 2019, 167(4):424-427.

( 收稿:2021-09-15 修回:2022-04-06 )

( 本文编辑:程雪艳 )