

· 基础研究 ·

特异性抑制内向整流性钾电流对缺血再灌注心脏的保护作用

黄芸¹, 翁俊美¹, 孟一迪¹, 徐秋梅¹, 聂大安², 李子进², 刘杰², 李景东², 姚东晓^{3*}

(华中科技大学同济医学院附属协和医院:¹老年病科,²心血管内科,³神经外科,武汉 430022)

【摘要】目的 探究转基因特异性抑制心脏内向整流性钾电流(I_{K1})的小鼠在缺血预适应中对缺血心脏的保护作用。**方法** 选取 I_{K1} 基因抑制小鼠分为2组:阳性表达者为观察组,阴性表达者为对照组。监测各组小鼠心律失常发生情况,采用离体心脏,观察缺血预适应对心脏缺血再灌注后心肌梗死面积、凋亡的影响。采用Western blot检测相关信号蛋白的表达。采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,样本间比较采用 t 检验。**结果** 与对照组相比,观察组心律失常评分分值[(3.50±0.67) vs (7.42±0.70)分]、心肌梗死面积/左室面积的比值[(0.25±0.04)% vs (0.38±0.02)%]和心肌细胞凋亡指数[(202±93)% vs (822.5±97.5)%]均显著降低($P<0.05$)。Western blotting结果表明,与对照组相比,观察组磷酸化糖原合成酶激酶3[(1.41±0.16) vs (0.77±0.05)]和AKT[(1.84±0.20) vs (0.81±0.14)]及p-AKT[(1.87±0.27) vs (1.08±0.22)]均显著上调。**结论** Kir2.1转基因抑制可减少缺血预适应后再灌注心肌梗死中心律失常的发生、心肌细胞的凋亡及心肌梗死面积,其机制可能部分与再灌注损伤补救激酶信号通路有关。

【关键词】 肌细胞,心脏;心律失常;心脏内向整流性钾电流;抑制性基因突变;缺血预适应

【中图分类号】 R541

【文献标志码】 A

【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2018.10.177

Specific inhibition of inward rectifier potassium current protects the heart after ischemia/reperfusion

HUANG Yun¹, WENG Jun-Mei¹, MENG Yi-Di¹, XU Qiu-Mei¹, NIE Da-An², LI Zi-Jin², LIU Jie², LI Jing-Dong², YAO Dong-Xiao^{3*}

(¹Department of Geriatrics, ²Department of Cardiology, ³Department of Neurosurgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

【Abstract】Objective To investigate the protective effects of the specific inhibition of inward rectifier potassium current (I_{K1}) on the ischemic heart in a transgenic mouse model with ischemic preconditioning (IPC). **Methods** Mice with genetic inhibition of I_{K1} were divided into 2 groups: observation group with positive expression and control group with negative expression. Arrhythmia was monitored in each group. With the isolated heart, the effects were observed of IPC on the myocardial infarct size and apoptosis following ischemia/reperfusion (IR). Western blot was employed to detect the expressed proteins. SPSS statistics 17.0 was used for statistical analysis, and t -test for comparison between groups. **Results** Compared with the control group, the observation group had significantly lower arrhythmia score [(3.50±0.67) vs (7.42±0.70) scores], ratio of myocardial infarct size to left ventricular area [(0.25±0.04)% vs (0.38±0.02)%] and cardiomyocyte apoptosis index [(202±93)% vs (822.5±97.5)%], $P<0.05$. Western blotting revealed significantly greater up-regulation in the observation group than in the control group of phosphorylated glycogen synthase kinase 3 [(1.41±0.16) vs (0.77±0.05)], AKT [(1.84±0.20) vs (0.81±0.14)], and p-AKT [(1.87±0.27) vs (1.08±0.22)]. **Conclusion** Transgenic inhibition of Kir2.1 can potentially reduce the occurrence of arrhythmia, myocardial cell apoptosis, and myocardial infarct size in myocardial infarction following IPC, and its mechanism may be partially related to the Reperfusion Injury Salvage Kinases (RISK) pathway.

【Key words】 myocytes, cardiac; arrhythmias; inward rectifier potassium current; inhibition gene mutation; ischemic preconditioning
This work was supported by the Natural Science Foundation of Hubei Province (2017CFB791).

Corresponding author: YAO Dong-Xiao, E-mail: yaodongxiao@163.com

收稿日期: 2018-07-27; 修回日期: 2018-08-23

基金项目: 湖北省自然科学基金(2017CFB791)

通信作者: 姚东晓, E-mail: yaodongxiao@163.com

冠心病心肌缺血和急性心肌梗死可导致心脏重构、心力衰竭和心律失常^[1,2]。心肌再灌注治疗是最有效的治疗方法之一,但有导致再灌注损伤的不利作用^[3,4]。缺血预适应可通过再灌注损伤补救激酶激活等机制,减轻心肌再灌注损伤^[5,6]。内向性整流性钾电流(inward rectifier potassium current, I_{K1})在心肌缺血时下调,并在心肌细胞缺血预适应模型中起着重要作用^[7,8]。长期以来,因无特异性的心脏 I_{K1} 抑制剂,对其下调与缺血预适应和再灌注损伤的关系尚未阐明。为此,本研究选用转基因抑制心脏 I_{K1} 小鼠,建立心脏缺血预适应模型,研究特异性抑制心脏 I_{K1} 在缺血预适应时是否具有减轻再灌注损伤的作用及其机制,可望为开发新一代特异性心脏 I_{K1} 抑制手段治疗冠心病心肌缺血提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与液体配制

转基因心脏 I_{K1} 抑制小鼠(Kir2.1-AAA)由美国 Michigan 大学 Anatoli N. Lopatin 赠送,小鼠饲养于华中科技大学同济医学院实验动物中心 SPF 级(无特定病原体级实验动物, Specific Pathogen Free)环境中。Kir2.1-AAA 转基因鉴定引物序列:正向为 5'-CTGTGTCGACATCCGCTGGAGGTGG-3',反向为 5'-CCCACTCTCCACATCAAGCAGAGTT-3',其聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)产物为 420 bp,将此条带测序,阳性者为 GYG 突变为 AAA。实验取 3~6 个月龄小鼠,体质量 18~25 g,分为观察组($n=9$)和对照组($n=12$),雌雄比例相同。

Langendorff 离体心脏灌流液:KHB (Krebs-Henseleit bicarbonate) 溶液配制 1 L 需要氯化钠 6.89 g、氯化钾 0.35 g、碳酸氢钠 2.1 g、硫酸镁 0.144 g、磷酸二氢钾 0.144 g、氯化钙 0.368 g、乙二胺四乙酸钠(EDTA Na)0.416 g、葡萄糖 2.702 g、丙酮酸盐 2.703 g,浓盐酸调整 pH=7.35。1% 氯代三苯基四氮唑(triphenyltetrazolium chloride, TTC)磷酸缓冲液:每 100 ml 含 1 g TTC、88 mmol/L Na_2HPO_4 和 1.8 mmol/L NaH_2PO_4 , pH=7.8。

1.2 方法

1.2.1 体表心电图 麻醉小鼠后,以温控小电热毯保持其体温在 36℃~37℃,利用 RM6240 数据采集分析系统(成都仪器公司)持续记录基础状态下小鼠心电图 5 min,测量心率(heart rate, HR)、PR 间期和 QRS 间期,并监测心律失常发生情况。

1.2.2 心脏缺血预适应模型的建立 用 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,从主动脉远端

分离心脏并连接至 Langendorff 灌流装置,以 95% O_2 和 5% CO_2 的混合气体持续冲入(37.0±0.5)℃的 KHB 液,先稳定 10 min,缺血 2 min,灌注 5 min,2 个循环,然后全心缺血 20 min,再灌注 45 min。实验结束后,取心脏 -80℃ 保存。

1.2.3 心律失常检测 将 3 个 Ag^+/AgCl 电极分别置于心脏心尖部和左右两侧形成 Einthoven 三角,记录离体心脏心电图。心律失常评分标准为:无心律失常(0 分),房早或室早(1 分),室上速或成对室性早搏或 T 波电交替(2 分),室早呈三联率或呈短阵 ≥3 个但 ≤10 个(3 分),持续室速(定义为室早 ≥10 个)或多行性室速或尖端扭转性室速(4 分)^[9]。

1.2.4 心肌梗死面积测定 取冷冻心脏,横切成约 2 mm 薄片 5 层,置入 1% TTC 磷酸缓冲液(pH 7.4)中 37℃ 孵育 20 min。梗死区呈灰白色,非梗死区呈深红色。拍照后,以 ImageJ2x 软件测定心肌梗死面积。

1.2.5 Tunel 凋亡检测 灌流结束后将心脏置入 4% 的甲醛磷酸盐缓冲液,固定 48 h,石蜡包埋心脏组织,切片,采用 Roche 的 *In situ* cell death 定量药盒检测。凋亡指数(‰) = 凋亡心肌细胞核数/正常心肌细胞核数 × 1000‰。

1.2.6 Western blotting 取心脏左心室,检测样本浓度,15 μg/孔上样,SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭,Ⅰ抗的稀释度为 1:1000,4℃ 孵育过夜。相应Ⅱ抗室温孵育 2 h 后,暗室曝光。蛋白条带相对浓度用 Lab Image 软件测定。Ⅱ抗包括 p-AKT、AKT、p-GSK3β 和 GSK3β。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,样本间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转基因阳性小鼠鉴定及基因检测结果

Kir2.1-AAA 转基因阳性与阴性 PCR 片段均显示 420 bp 条带(图 1A)。阴性者显示 KCNJ2 孔道区为 GGCTATGGT(编码相应氨基酸为 GYG),阳性为 GCCGCTGCT(AAA),见图 1B。

2.2 基础状态下 2 组小鼠的体表心电图

基础状态下观察组($n=9$)和对照组($n=12$)的 HR 分别为(446.4 ± 35.9)和(463.6 ± 46.8)次/min, PR 间期分别为(53.58 ± 12.32)和(52.15 ± 13.23)ms, QRS 间期分别为(22.95 ± 17.33)和(21.5 ± 16.67)ms,2 组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

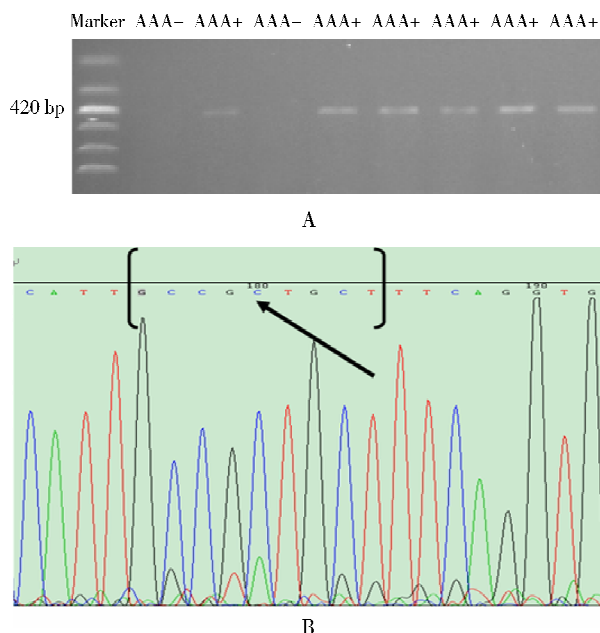


图 1 PCR 检测结果

Figure 1 Results of PCR

A: PCR band of Kir2.1-AAA; B: sequencing result of PCR products.

PCR: polymerase chain reaction

2.3 Kir2.1-AAA 对小鼠心律失常的影响

与对照组 ($n = 12$) 相比, 观察组 ($n = 9$) 心律失常评分分值显著降低 [(3.50 ± 0.67) vs (7.42 ± 0.70) 分, $P < 0.01$], 提示抑制 I_{K1} 可减少缺血致心律失常的发生。

2.4 Kir2.1-AAA 对小鼠心肌梗死面积的影响

与对照组 ($n = 10$) 相比, 观察组 ($n = 8$) 小鼠心肌梗死面积/左室面积的比值显著减少 [$(0.25 \pm 0.04)\%$ vs $(0.38 \pm 0.02)\%$, $P < 0.05$]。

2.5 Kir2.1-AAA 对小鼠心肌细胞凋亡的影响

与对照组 ($n = 7$) 相比, 观察组 ($n = 8$) 小鼠心肌细胞凋亡指数显著降低 [$(202 \pm 93)\%$ vs $(822.5 \pm 97.5)\%$, $P < 0.001$], 提示特异性抑制 I_{K1} 具有减缓心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞凋亡的作用。

2.6 Kir2.1-AAA 对再灌注损伤补救激酶信号通路关键分子蛋白表达的影响

GSK3 相对表达量在观察组和对照组中分别为 (0.79 ± 0.11) 和 (0.77 ± 0.15) , 2 组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但观察组磷酸化糖原合成酶激酶 3 (phosphorylated glycogen synthase kinase 3, p-GSK3) 相对表达量显著高于对照组 [(1.41 ± 0.16) vs (0.77 ± 0.05) , $P < 0.05$], 提示 p-GSK3 可能介导了 Kir2.1-AAA 对缺血再灌注心脏的保护作用 (图 2A)。此外, 观察组中无论是 AKT [(1.84 ± 0.20) vs

(0.81 ± 0.14)] 还是 P-AKT [(1.87 ± 0.27) vs (1.08 ± 0.22)] 的表达均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 提示 AKT 和 P-AKT 均可能介导了抑制 I_{K1} 对缺血再灌注心脏的保护作用 (图 2B)。

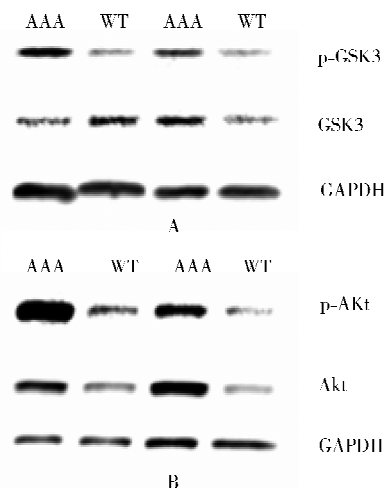


图 2 Kir2.1-AAA 对 RISK 信号通路关键分子蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of Kir2.1-AAA on the expression of key proteins of RISK signal pathway

A: expression of GSK3 and p-GSK3; B: expression of Akt and p-Akt.

RISK: reperfusion injury salvage kinases; p-GSK3: phosphorylated glycogen synthase kinase 3

3 讨论

冠心病及其并发症严重威胁着人类的生命与健康^[2], I_{K1} 在冠心病心力衰竭时下调, 在心脏重构过程中起着重要作用^[10,11]。近年来, 随着溶栓和介入技术的广泛应用, 心肌缺血再灌注损伤越来越受到关注, 缺血预适应可改善心肌缺血再灌注损伤, 但其机制尚待深入研究^[6]。本研究采用转基因特异性抑制 I_{K1} 小鼠建立缺血预适应模型, 结果发现特异性抑制 I_{K1} 可以改善缺血预适应对缺血再灌注损伤的保护作用, 减少心律失常发生以及心肌细胞凋亡和心肌梗死面积。

本研究结果表明, I_{K1} 抑制小鼠在离体心脏缺血再灌注模型缺血预适应后, 其心律失常明显少于对照组小鼠。理论上讲, 特异性抑制 I_{K1} 既可能抑制也可能促进心律失常的发生, 因为抑制 I_{K1} 会降低静息膜电位的稳定性, 促进除极化, 使自律性增加^[12]。但抑制 I_{K1} 又可均一地延长动作电位时间和不应期, 降低心室复极离散度而防止折返形成, 延缓异常兴奋的传播, 从而具有抗心律失常作用^[13]。高血压性心肌肥大、心肌病及各种原因所致的心力衰竭均伴

有 I_{K1} 下调^[14], 过度表达 I_{K1} 的小鼠表现为心律失常及心脏肥大等异常^[15]。本研究结果也证实了均一特异性抑制 I_{K1} 具有抗心律失常的作用。

本研究表明, 转基因抑制 I_{K1} 可减少心肌梗死面积和心肌细胞凋亡。研究表明, 缺血预适应会引起再灌注损伤补救激酶的激活, 包括 PI3K/Akt/GSK3 β 和 Erk1/2 通路的活化, 再进一步激活或抑制下游信号分子包括酶代谢、凋亡分子等, 抑制有害的线粒体膜通透性转换, 从而保护心肌^[16]。本研究结果显示, Akt 蛋白与 GSK3 β 蛋白在观察组 (I_{K1} 抑制) 的表达量高于对照组, 提示抑制 I_{K1} 可能加大激活这些信号传导的级联反应。值得提出的是, 在文献^[17]报道的与本研究相同的模型中, 缺血预适应对野生型小鼠 (本研究中的对照组) 心脏本身即具有保护作用, 因而本研究发现的特异性抑制 I_{K1} 带来的有益作用至少部分是额外的协同作用。

综上所述, 本研究结果证实特异性抑制 I_{K1} 可保护缺血心脏。在离体心脏缺血再灌注模型缺血预适应后, 转基因特异性抑制 I_{K1} 小鼠相比野生型小鼠在抗心律失常方面具有明显优势, 并且可减少心肌梗死范围、抗细胞凋亡, 但对其具体分子机制还有待进一步研究。本研究可望为未来治疗缺血性心脏病提供新的理论依据。

【参考文献】

- [1] Chapman AR, Adamson PD, Mills NL. Assessment and classification of patients with myocardial injury and infarction in clinical practice[J]. Heart, 2017, 103(1): 10-18. DOI: 10.1136/heartjnl-2016-309530.
- [2] Nowbar AN, Howard JP, Finegold JA, et al. 2014 global geographic analysis of mortality from ischaemic heart disease by country, age and income; statistics from World Health Organisation and United Nations[J]. Int J Cardiol, 2014, 174(2): 293-298. DOI: S0167-5273(14)00755-4.
- [3] Bailey KR, Armstrong PW. Clinical perspectives on reperfusion injury in acute myocardial infarction[J]. Am Heart J, 2014, 167(5): 637-645. DOI: 10.1016/j.ahj.2014.01.015.
- [4] 朱平均, 周浩, 胡舜英, 等. 内质网应激参与调节心肌缺血/再灌注损伤研究的新进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2017, 16(3): 225-228. DOI: 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.03.052.
- Zhu PJ, Zhou H, Hu SY, et al. Research progress of endoplasmic reticulum stress in myocardium ischemia reperfusion injury[J]. Chin J Mult Organ Dis Elderly, 2017, 16(3): 225-228. DOI:

- 10.11915/j.issn.1671-5403.2017.03.052.
- [5] Hausenloy DJ, Yellon DM. The therapeutic potential of ischemic preconditioning; an update[J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 21, 8(11): 619-629. DOI: 10.1038/nrcardio.2011.85.
- [6] Stokfisz K, Ledakowicz-Polak A, Zagorski M, et al. Ischaemic preconditioning — current knowledge and potential future applications after 30 years of experience[J]. Adv Med Sci, 2017, 62(2): 307-316. DOI: 10.1016/j.advms.2016.11.006.
- [7] Diaz RJ, Zobel C, Cho HC, et al. Selective inhibition of inward rectifier k^+ channels (kir2.1 or kir2.2) abolishes protection by ischemic preconditioning in rabbit ventricular cardiomyocytes[J]. Circ Res, 2004, 95(3): 325-332. DOI: 10.1161/01.res.0000137727.34938.35.
- [8] Rubi L, Koenig X, Kubista H, et al. Decreased inward rectifier potassium current I_{K1} in dystrophin-deficient ventricular cardiomyocytes[J]. Channels (Austin), 2017, 11(2): 101-108. DOI: 10.1080/19336950.2016.1228498.
- [9] Wu Y, Temple J, Zhang R, et al. Calmodulin kinase ii and arrhythmias in a mouse model of cardiac hypertrophy[J]. Circulation, 2002, 106(10): 1288-1293. DOI: 10.1161/01.CIR.0000027583.73268.E7.
- [10] Li GR, Dong MQ. Pharmacology of cardiac potassium channels[J]. Adv Pharmacol, 2010, 59(3): 93-134. DOI: 10.1016/s1054-3589(10)59004-5.
- [11] Cordeiro JM, Zeina T, Goodrow R, et al. Regional variation of the inwardly rectifying potassium current in the canine heart and the contributions to differences in action potential repolarization[J]. J Mol Cell Cardiol, 2015, 84(7): 52-60. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2015.04.010.
- [12] Opthof T. I_{K1} blockade is unlikely to be a useful antiarrhythmic mechanism[J]. Cardiovasc Res, 1994, 28(3): 420.
- [13] Rees SA, Curtis MJ. I_{K1} blockade is a potentially useful antiarrhythmic mechanism[J]. Cardiovasc Res, 1994, 28(3): 421.
- [14] Liu C, Liu E, Luo T, et al. Opening of the inward rectifier potassium channel alleviates maladaptive tissue repair following myocardial infarction[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai), 2016, 48(8): 687-695. DOI: 10.1093/abbs/gmw060.
- [15] Li J, McLerie M, Lopatin AN. Transgenic upregulation of I_{K1} in the mouse heart leads to multiple abnormalities of cardiac excitability[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287(6): H2790-H2802. DOI: 10.1152/ajpheart.00114.2004.
- [16] Rossello X, Yellon DM. The risk pathway and beyond[J]. Basic Res Cardiol, 2017, 113(1): 2. DOI: 10.1007/s00395-017-0662-x.
- [17] Sumeray MS, Yellon DM. Ischaemic preconditioning reduces infarct size following global ischaemia in the murine myocardium[J]. Basic Res Cardiol, 1998, 93(5): 384-390.

(编辑: 吕青远)