

• 基础研究 •

人 HCN 2 基因编码的心脏起搏通道的电生理

李春 郭继鸿 李继文 郝雪梅 王世强

【摘要】 目的 将人超极化激活的阳离子通道基因 2 (human hyperpolarization-activated cation channel 2, hHCN2) 表达于 HEK293 细胞系上, 观察其表达的通道的电生理特点。方法 利用全细胞膜片钳技术, 记录转染了 hHCN2 的 HEK293 细胞上的超极化激活的阳离子流 (I_f)。结果 转染 hHCN2 的 HEK293 细胞上表达 I_f 样内向电流, 在超极化时激活, 随刺激电压的延长而增大, 半数最大激活电压为 (-109.1 ± 0.7) mV, 曲线斜率为 (-12.7 ± 0.7) mV。刺激电压变负时, 激活变快。-100mV 和 -160mV 时, 激活时间常数分别为 (2.5 ± 1.1) s 和 (217 ± 29) ms。此电流是细胞外钾离子浓度依赖性的, 对钠离子和钾离子的相对通透性为 0.67。2mmol/L 的 Cs^+ 可明显抑制此电流。结论 目的基因 hHCN2 在 HEK293 细胞上成功表达, 表达的蛋白能形成有功能的通道, 产生 I_f 样电流。

【关键词】 超极化激活的阳离子通道; HEK293 细胞; 全细胞

Electrophysiology of pacemaker channel encoded by human HCN 2 gene

LI Chun, GUO Jihong, LI Jiwen, et al

Laboratory of Cardiac Electrophysiology, Department of Internal Medicine, Peoples Hospital, Beijing 100044, China

【Abstract】 Objective To investigate expression of the human HCN2 gene in HEK293 cells and the electrophysiology of the expressed channel protein. Methods The whole cell hyperpolarization-activated cAMP-gated cation channel currents of HEK293 cells transfected by hHCN2 were recorded. Results I_f -like currents could be found in HEK293 cells transfected by hHCN2. The currents were activated by hyperpolarization and increased with prolongation of stimulation duration, with half maximal activation voltage being (-109.1 ± 0.7) mV and a slope factor of (-12.7 ± 0.7) mV. The activation kinetics was faster with higher hyperpolarization voltage, with the activation constant being (2.5 ± 1.1) s and (217 ± 29) ms at -100 mV and -160 mV respectively. The currents increased with increase in extracellular $[\text{K}^+]$, with a relative permeation of 0.67 for sodium and potassium. Cs^+ at 2mmol/L could obviously inhibit these currents. Conclusions The target gene hHCN2 was successfully expressed in HEK293 cells. The expressed protein can form functional channels and result in I_f -like currents.

【Key words】 hyperpolarization-activated cation channel; HEK293; whole cell

心脏的自发性节律活动是由窦房结的起搏细胞所控制的, 而动作电位的 4 相缓慢自动去极化是起搏细胞自律性的基础。在动作电位的 4 相去极化过

程中, 有多个离子流起作用, 其中 I_f 电流的作用日益受到重视。 I_f 电流是一个电压和时间依赖性的、非选择性的内向阳离子流, 是窦房结、房室结和蒲肯野纤维细胞上主要的舒张期去极化电流。目前认为, 编码 I_f 电流的是超极化激活的环核苷酸门控的阳离子通道 (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel, HCN) 基因家族。已经发现了 4 种 HCN 通道亚型: HCN1~HCN4。目前国内对于 HCN 通道各亚型的电生理学特点尚无报道。本文目的是将人 HCN2 通道基因 (hHCN2) 表达于 HEK293 细胞系上, 观察其表达的通道的电生理特点。

收稿日期: 2005-12-22

作者单位: 100044 北京市, 北京大学人民医院心内科心脏电生理室 (李春、郭继鸿、李继文); 100084 北京市, 北京大学生命科学学院生物膜与膜生物工程国家重点实验室 (郝雪梅、王世强)

作者简介: 李春, 女, 1973 年 2 月生, 山东省淄博市人, 医学博士, 主治医师。Tel: 13001929903, 13501226269, E-mail: yxh9956@vip.sina.com

通讯作者: 郭继鸿, Tel: 010-68314422-5353

1 方法

1.1 细胞培养 HEK293 细胞为本实验室保存,培养液为低糖的 DMEM 溶液,含青霉素 10U/ml,链霉素 100 μ g/ml,胚胎牛血清 10%。每 48h 换液。细胞置于含 5%CO₂ 的 37 $^{\circ}$ C 培养箱中。实验所用的细胞均为 35 代之内。

1.2 质粒的构建 人 HCN2 cDNA 被克隆到 pcDNA1.1/Amp 的 HindIII/Xba 位点,由 Kaupp U B 博士惠赠(Forschungszentrum Julin,德国)。经过酶切和连接,hHCN2 cDNA 插入 CMV 启动子的下游,构建 pAdTrack-CMV-hHCN2 穿梭质粒。利用 AdEasy-1 将线性质粒转染 Bj5183 细菌,获得腺病毒质粒 pAd-hHCN2,之后转染 HEK293 细胞。

1.3 溶液 HEK293 细胞转染后 1~3d,即可记录相应的 hHCN2 电流。如无特殊说明,记录所用的液体 (mmol/L) 为: NaCl 120, KCl 20, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1, 4-氨基吡啶 2, HEPES 10, 葡萄糖 5, 用 NaOH 调节 pH 到 7.40。在部分实验中,记录电流所用的液体为标准 Tyrode 液 (mmol/L): NaCl 135, KCl 5, CaCl₂ 2.0, MgCl₂ 1, 4-氨基吡啶 2, HEPES 10, 葡萄糖 5, 用 NaOH 调节 pH 到 7.40。电极内液 (mmol/L) 为: 天冬氨酸钾 130, MgCl₂ 2, EGTA 11, Na₂ATP 5, CaCl₂ 5, HEPES 10, 用 KOH 调节 pH 到 7.40。

1.4 电生理学记录 实验方法为标准的全细胞记录方法。利用 Axon 200B (Axon Instruments) 放大器记录电流,利用软件 pClamp 6.0 (Axon Instruments) 来采集和分析数据,并经过 A/D 转换存入计算机。记录所用的电极为北京大学微电子所的硅硼酸盐玻璃电极,经微电极控制仪 (Narishiger, PP-83) 控制而成,充以电极内液后,电极阻抗为 3~8M Ω 。滤波频率为

2kHz。所有实验均在室温下完成。

1.5 数据分析 保持电位为 -50mV,超极化电压从 -60mV 到 -150mV,阶跃为 -10mV,持续时间为 3s。超极化起始的电流与超极化终末的电流之差作为超极化激活的电流。其电导 $g = I / (V_m - V_{rev})$ 。其中, I 是电流幅度, V_m 是膜电位, V_{rev} 是反转电位。用 g/g_{max} 将电流标准化 (g_{max} 是最大电导值),即得到电流的稳态激活曲线,此曲线可用 Boltzmann 方程进行拟合: $g/g_{max} = 1 / \{1 + \exp[(V_{1/2} - V_m) / S]\}$ 。 V_m 是膜电位, $V_{1/2}$ 是膜达到 1/2 最大激活时的电位, S 是曲线的斜率。电流的激活动力学曲线由对电流进行单指数拟合而得到。利用尾电流的幅度来计算反转电位。保持电位为 -50mV,超极化到 -140mV,维持 3s,然后给予从 -60mV 到 +20mV 的电压,从所得的电流-电压图上可计算 V_{rev} 。应用 Goldman-Hodgkin-Katz 方程计算得出通道对钠和钾的相对通透性 ($P_{Na/K}$)。结果以均数士标准误表示。

2 结果

2.1 超极化激活的内向电流的电压依赖性 给予超极化刺激时,未转染 hHCN2 的 HEK293 细胞无明显内向电流(图 1A)。保持电位为 -50mV,超极化电压从 -60mV 到 -150mV,可见转染 hHCN2 的 HEK293 细胞上出现随着刺激时间延长而增大的 I_f 样内向电流。图 1B 为一个细胞记录的原始电流图形。可见刺激电压越负,电流越大,刺激时间越长,电流也越大。对于大部分细胞,当电压为 -80mV 时,即可见电流激活。将电流标准化后,利用 Boltzmann 方程进行拟合,得到其半数最大激活电压为 (-109.1 \pm 0.7)mV,曲线斜率为 (-12.7 \pm 0.7)mV(图 2)。

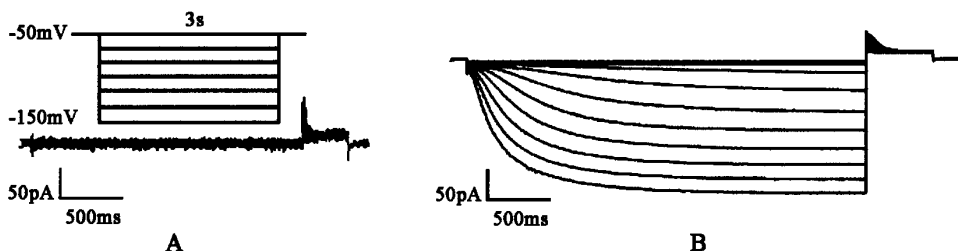


图 1 原始电流图形

上面是刺激模式图。保持电位为 -50mV,超极化电压从 -60mV 到 -150mV,阶跃为 -10mV,持续时间为 3s。A 是未转染质粒的 HEK293 细胞,给予超极化刺激时,未见内向电流。B 是转染了 hHCN2 质粒的 HEK293 细胞,可见超极化时激活了一个随刺激时间延长而增大的内向电流

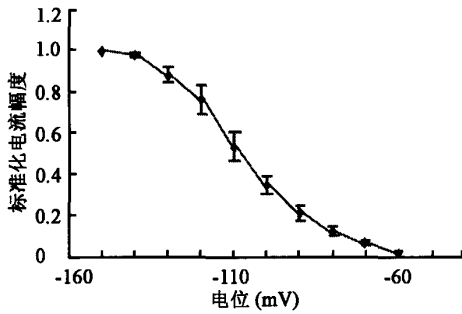


图2 hHCN2 通道电流的激活曲线
 其半数最大激活电压为(-109.1±0.7)mV,
 曲线斜率为(-12.7±0.7)mV, n=10

2.2 通道激活的动力学 对所记录的超极化激活的内向电流进行拟合,忽略掉电流起始部分一个很小的延迟后,单指数曲线能对此电流进行很好的拟合。图3示时间常数对电压作图所得到的激活动力学拟合曲线。可见随着电压变负,激活变得更快。电压为-100mV时,激活时间常数为(2.5±1.1)s,电压为-160mV时,激活时间常数缩短为(217±29)ms,明显变快。

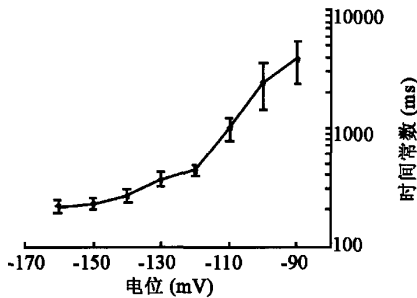


图3 hHCN2 通道电流的激活动力学曲线
 n=19,可见刺激电压越负,通道激活越快

2.3 细胞外钾离子浓度对电流的作用 为了研究细胞外钾离子浓度对此电流的影响,我们选用了两种溶液:记录溶液和标准 Tyrode 液,其细胞外钾离子浓度分别为 20 mmol/L 和 5mmol/L,钠离子做等

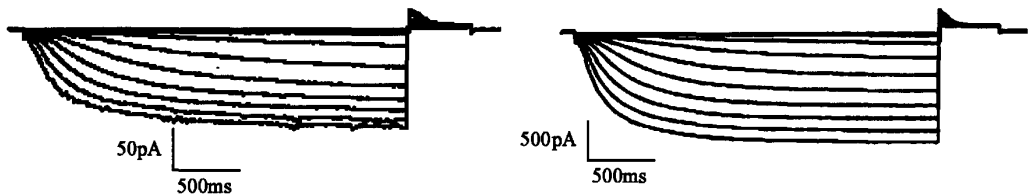


图4 同一个细胞,在细胞外液不同钾离子浓度时所记录的 hHCN2 通道电流
 A 细胞外液为 Tyrode 液,钾离子浓度为 5mmol/L。B 细胞外液为记录溶液,钾离子浓度为 20mmol/L。
 可见钾离子浓度增高时,此电流明显增大(AB 图的标尺不同)

摩尔替换。结果发现:细胞外钾离子浓度升高时,记录的 hHCN2 通道电流明显增大(图 4)。

2.4 离子选择性 hHCN2 通道电流的 V_{rev} 利用尾电流来测量。给予一个 -140mV 的超极化刺激,然后给以从 -60mV 到 +20mV 的电压,测量尾电流的幅度,从所得的电流-电压图上可计算 V_{rev} (图 5)。我们发现:当细胞外钾离子浓度为 20mmol/L 时, V_{rev} 为 -20.1mV。根据 Goldman-Hodgkin-Katz 方程计算得出,通道对钠和钾的 $P_{Na/K}$ 为 0.67。

2.5 细胞外 CS^+ 的作用 细胞外给予低浓度的 CS^+ (2mmol/L),内向的 hHCN2 通道电流即被明显抑制,但去活的外向电流变化很小,这与文献报道相一致。

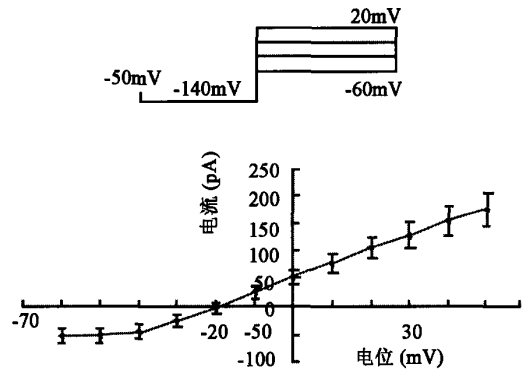


图5 hHCN2 通道电流的反转电位
 n=13,上面是刺激模式图。细胞外钾离子浓度为 20mmol/L 时,反转电位为 -20.1mV

3 讨论

目前认为,在动作电位的 4 相自动去极化过程中,可能多个离子流发挥作用,包括 I_f 的激活^[1,2],钾电流的衰减^[3]和持续内向电流(I_{ss})^[4]及 TTX 敏感的背景钠电流^[5]、钙电流等^[6]。其中 I_f 在 4 相自动去极化中的作用日益受到重视。由于其仅仅在超极化时被激活,不影响动作电位的复极化,因此对动

作电位的时程没有影响,没有致心律失常作用,不会引起尖端扭转型室速等致命性心律失常。 I_f 电流是一个电压和时间依赖性的、非选择性的内向阳离子流,是窦房结、房室结和蒲肯野纤维细胞上主要的舒张期去极化电流^[7,8],也见于豚鼠、犬、大鼠和人的心房、心室肌,可能与病理条件下这些部位的异常自律性增高有关。产生 I_f 电流的通道是 HCN 家族^[9]。HCN 通道在结构上类似电压依赖性的钾通道,为 4 个亚基形成的四聚体,每个亚基包括 S1~S6 共 6 个跨膜片段,其中 S4 为电压感受器,S5 与 S6 之间为对离子通透的孔道,在 C 端有环核苷酸结合位点(CNBD),可以与 cAMP 结合。哺乳动物 HCN 基因家族有 4 个亚型:HCN1~HCN4,其中 HCN3 仅仅见于神经元中,HCN2 在窦房结、心房、心室都有表达,HCN4 在兔窦房结占绝对优势。不同亚型可以相互聚合形成有功能的多聚体,从而使不同组织本身的 I_f 电流特点差别很大。不同亚型的激活动力学、受 cAMP 调控的程度也不同。从 HCN1 到 HCN4,通道的激活依次变慢。cAMP 对 HCN1 无影响,但可明显加快 HCN2 和 HCN4 的激活动力学。

我们通过构建的腺病毒载体,携带目的基因 hHCN2,使之在 HEK293 细胞上进行表达,并检测了所得到的 hHCN2 电流的特点。hHCN2 电流在超极化时激活,起始激活的电压约为 -80mV ,电位越负,电流幅度越大。半数最大激活电压为 $(-109.1 \pm 0.7)\text{mV}$,曲线斜率为 $(-12.7 \pm 0.7)\text{mV}$ 。半数最大激活电压比 Ludwig 等^[9]报道的更负一些。不同实验室记录的 I_f 电流的半数最大激活电压不完全相同,除了与各实验室条件不同有关外,与细胞内 Ca^{2+} 浓度也有关系。有报道当细胞内 Ca^{2+} 浓度从 10^{-10}mol/L 增加到 10^{-7}mol/L 时,激活曲线移动 $+13\text{mV}$ 。我们实验中所用的 EGTA 为 11mmol/L ,因此细胞内 Ca^{2+} 浓度可能比 Ludwig 等实验中所用的细胞低。从通道的激活动力学曲线上可看出,随着电压变负,通道的激活变得更快。刺激电压为 -100mV 时,激活时间常数为 $(2.5 \pm 1.1)\text{s}$,刺激电压为 -160mV 时,激活时间常数缩短为 $(217 \pm 29)\text{ms}$ 。细胞外钾离子浓度增加时,此电流明显增大,说明此

电流为钾离子依赖性的,根据 V_{rev} 可测得,细胞外钾离子浓度为 20mmol/L 时,通道对钠和钾的 $P_{\text{Na/K}}$ 为 0.67,即此通道除对钠离子通透外,还允许钾离子通过。低浓度的 Cs^+ 可以明显抑制 hHCN2 电流。以上结果与文献报道的 I_f 电流相一致,说明目的基因 hHCN2 在 HEK293 细胞上成功表达,表达的蛋白能形成有功能的通道,产生 I_f 样电流。

参考文献

- 1 Di Francesco D. A study of the ionic nature of the pacemaker current in calf Purkinje fibers. *J Physiol*, 1981, 314:377-393.
- 2 Brown HF, Kimura J, Noble D, et al. The ionic currents underlying pacemaker activity in rabbit sinoatrial node: experimental results and computer simulations. *Proc R Soc Lond Ser B*, 1984, 222:329-347.
- 3 Ono K, Ito H. Role of rapidly activating delayed rectifier K^+ current in sinoatrial node pacemaker activity. *Am J Physiol*, 1995, 269:H453-H462.
- 4 Mitsuiye T, Shinagawa Y, Noma A. Sustained inward current during pacemaker depolarization in mammalian sinoatrial node cells. *Circ Res*, 2000, 87:88-91.
- 5 Baruscotti M, Di Francesco D, Robinson RB. A TTX-sensitive inward sodium current contributes to spontaneous activity in newborn rabbit sinoatrial node cells. *J Physiol (Lond)*, 1996, 492:21-30.
- 6 Hagiwara N, Irisawa H, Kameyama M. Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sinoatrial node cells. *J Physiol (Lond)*, 1988, 395:233-253.
- 7 Van Ginneken A, Giles W. Voltage clamp measurements of the hyperpolarization-activated inward current (I_f) in single cells from rabbit sinoatrial node. *J Physiol (Lond)*, 1991, 434:57-83.
- 8 Callwaert G, Carmeliet E, Vereecke J. Single cardiac Purkinje's cells: general electrophysiology and voltage-clamp analysis of the pacemaker current. *J Physiol (Lond)*, 1984, 349:643-661.
- 9 Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, et al. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature*, 1998, 393:587-591.