

K_{ATP} 通道 E23K 突变对阿霉素诱导的细胞凋亡的影响

刘剑芳 王梦龙 叶 晶 徐 瑶 王 震 姜慧敏 叶 迪 赵生娣 万 军

摘 要 **目的** 研究 ATP 敏感性钾通道 Kir6.2 亚基 E23K 突变对阿霉素诱导的心肌细胞凋亡的影响。**方法** (1) 在心肌组织中提取总 RNA, RT-PCR 法获取 cDNA, 合成特异性引物, 用 PCR 法获得 kir6.2, SUR2A 的 ORF 片段, 用 T4DNA 连接酶将上述片段与线性化的 pEGFP-C1 连接, 重组的 pEGFP-C1/kir6.2 用 PCR 法进行 E23K 定点突变, 获得真核表达质粒 pEGFP C1/kir6.2, pEGFP C1/kir6.2 (E23K) 及 pEGFP C1/SUR2A。(2) 重组质粒采用脂质体法瞬时共转染 H9C2 细胞, 使其在 H9C2 细胞中表达。(3) 生理盐水与 1mg/L 阿霉素 (Adriamycin, ADR) 分别处理转染后细胞, 分为 4 组: A 组为野生型重组质粒 + 生理盐水处理组 (WT + NS); B 组为含 E23K 突变重组质粒 + 生理盐水处理组 (E23K + NS); C 组为野生型重组质粒 + 阿霉素损伤组 (WT + ADR); D 组为含 E23K 突变重组质粒 + 阿霉素损伤组 (E23K + ADR)。(4) 采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡指数 (AI)。(5) Western blot 法测定 caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达。AlphaEase FC 软件取值读取各样品条带灰度值。**结果** (1) TUNEL 结果示, 应用 ADR 后凋亡比例升高, 与 WT + ADR 组相比, E23K + ADR 组凋亡比例更高 ($P < 0.05$)。(2) 阿霉素处理后, 所有组促凋亡相关蛋白 (caspase-3、Bax) 表达均增高, 抗凋亡蛋白 (Bcl-2) 表达降低, 且 E23K + ADR 组 caspase-3 与 Bax 蛋白表达均大于 WT + ADR 组, Bcl-2 蛋白表达低于 WT + ADR 组 ($P < 0.05$)。**结论** K_{ATP} 通道 kir6.2 亚基 E23K 突变加重阿霉素诱导的细胞凋亡。

关键词 K_{ATP} 通道 E23K 突变 细胞凋亡

中图分类号 R542.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.02.008

Effect of E23K Mutant of K_{ATP} Channel on Apoptosis Induced by Adriamycin. Liu Jianfang, Wang Menglong, Ye Jing, et al. Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University; Cardiovascular Research Institute, Wuhan University; Hubei Key Laboratory of Cardiology, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of E23K mutant on kir6.2 subunit of K_{ATP} channel on myocardial cell apoptosis induced by Adriamycin. **Methods** (1) Total RNA was obtained in myocardial tissue and cDNA was obtained by RT-PCR method. Using specific primers to get ORF fragments of kir6.2, SUR2A by PCR method, using T4DNA ligase to connected the fragment with linearized pEGFP-C1, restructuring pEGFP-C1/kir6.2 (E23K) by point mutation fixed in the PCR method, then get the pEGFP-C1/kir6.2, pEGFP-C1/kir6.2 (E23K) and pEGFP-C1/SUR2A. (2) The plasmid transiently transfected the H9C2 cells and expressed the target proteins. (3) Saline and 1mg/L adriamycin (ADR) add to the cells after transfection, divided into four groups. A: wild type and saline treatment group (WT + NS); B: E23K mutation and saline treatment group (E23K + NS); C: Wild type and Adriamycin treatment group (WT + ADR); D: E23K mutation and adriamycin treatment group (E23K + ADR). (4) TUNEL method to detect myocardial apoptosis index (AI). (5) The Western blot method to test caspase-3, Bcl-2, Bax protein expression. Alpha Ease FC software to read grey value. **Results** (1) TUNEL results showed that with an increase in apoptosis after application of ADR, compared with (WT + ADR) group, apoptosis rate of (E23K + ADR) group was higher. (2) After being treated with Adriamycin, the expression of caspase-3 and Bax proteins of all groups were increased, while the Bcl-2 was decreased, and in (E23K + ADR) group, the expression of caspase-3, Bax protein were increased than in (WT + ADR) group but Bcl-2 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** E23K mutation aggravated the apoptosis of myocardial cell induced by Adriamycin.

Key words K_{ATP} channel; E23K mutation; Apoptosis

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81170208)

作者单位: 430060 武汉大学人民医院心血管内科、武汉大学心血管病研究所、心血管病湖北省重点实验室 (刘剑芳、王梦龙、叶晶、徐瑶、王震、姜慧敏、叶迪、万军); 430081 武汉市普仁医院心内科 (赵生娣)

通讯作者: 万军, 电子信箱: wanjun1963@126.com

ATP 敏感性钾通道 (K_{ATP} 通道) 是在代谢旺盛的细胞中广泛分布的离子通道, 其中在心肌细胞表达水平非常高^[1]。研究显示, K_{ATP} 通道在心肌细胞的代谢、功能中起重要作用^[2]。前期研究结果显示, 在扩张型心肌病 (dilated cardiomyopathy, DCM) 患者中

K_{ATP}通道 E23K 突变比例增高,具体机制不明^[3]。本实验研究 K_{ATP}通道 E23K 突变对阿霉素损伤心肌细胞凋亡的影响,探讨 K_{ATP}通道在扩张型心肌病致病相关因素影响下所起的作用,为探讨扩张型心肌病发生、发展过程及临床干预提供依据。

材料及方法

1. 试剂:构建质粒过程中所用 DNA 聚合酶、限制性内切酶 Hind Ⅲ、XhoI 及 T4 DNA 连接酶均购自美国 Fermentas 公司。Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司。细胞凋亡原位检测试剂盒 (Insitu Cell Death Dectection,POD Kit)购自美国 Roche (罗氏)公司。Bax 抗体、Bcl-2 抗体购自美国 CST 公司,caspase-3 抗体购自美国 ABclonal 公司。

2. 实验方法:(1)重组质粒的构建:用 Trizol 法从大鼠心肌组织中提取总 RNA,取 RNA 做反转录模板进行反转录 PCR 反应获得相应的 kir6.2 及 SUR2A 亚基 cDNA,将上述 cDNA 与相应的真核表达载体 pEGFP-C1 进行双酶切反应,连接后构建真核表达载体 pEGFP-C1/kir6.2、pEGFP-C1/SUR2A。PCR 法对 pEGFP-C1/kir6.2 进行 E23K 位点定点突得到含 E23K 位点突变的 pEGFP-C1/Kir6.2 (E23K)。(2)重组质粒在 H9C2 细胞中表达:H9C2 细胞采用含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素的 MEM 培养液,置于 37℃、5% CO₂培养箱中培养。转染前将 H9C2 细胞按照 5 × 10⁵ 个/孔的密度铺于六孔板中,待细胞生长达 70% 融合度时吸出培养液,用 PBS 清洗 2 次,每次 10s,加入 OPTI-MEMI 培养液 500μl,将 10μgDNA 和 1ml OPTI-MEMI 混合,10μl PLUS,室温孵育 10min,10μl LTX 和 500μl OPTI-MEMI 混合,随后将两液混合,室温静置 30min 后按照 1:5 的比例加入培养孔,置于 37℃、5% CO₂培养箱中培养。5h 后更换为正常培养液,37℃、5% CO₂培养箱继续培养 48h,荧光显微镜下观察转染效率。(3)阿霉素诱导细胞凋亡:正常培养 H9C2 细胞或转染重组质粒 48 ~ 72h 的 H9C2 细胞,更换含 1mg/L 阿霉素的培养基,作用 4h 后更换为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基。建立心肌细胞损伤模型,用于后续实验。(4)实验分组:A 组:野生型重组质粒 + 生理盐水处理组 (WT + NS);B 组:含 E23K 突变重组质粒 + 生理盐水处理组 (E23K + NS);C 组:野生型重组质粒 + 阿霉素损伤组 (WT + ADR);D 组:含 E23K 突变重组质粒 + 阿霉素损伤组 (E23K + ADR)。(5)细胞凋亡检测:采用 TUNEL 法检测细胞凋亡。

参照试剂盒说明书操作。光镜下计算心肌细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI)。AI 计算方法:细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞,即凋亡细胞,数 5 个高倍视野,分别计算凋亡细胞数和总细胞数, AI (%) = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%。(6)凋亡蛋白的检测:收取细胞后提取蛋白,采用 Western blot 法测定 caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达。AlphaEase FC 软件取值读取各样品条带灰度值。检测心肌细胞中凋亡相关蛋白 caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白的表达。

3. 统计学方法:实验结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,数据用 SPSS 18.0 统计学软件、GraphPad 软件等对数据进行分析处理,统计学比较应用 LSD-t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 采用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI):C、D 组凋亡比例高于 A、B 组,差异有统计学意义 (P < 0.05),与 C 组比较,D 组凋亡比例更高,差异有统计学意义 (P < 0.05,表 1)。

表 1 心肌细胞凋亡指数

组别	n	AI (%)
A 组	6	11.63 ± 2.61
B 组	6	13.21 ± 2.43
C 组	6	23.67 ± 1.84 [#]
D 组	6	26.40 ± 2.27 ^{Δ*}

与 A 组比较,[#]P < 0.05;与 B 组比较,^{*}P < 0.05;与 C 组比较,^ΔP < 0.05

2. 心肌细胞凋亡相关蛋白 caspase-3、Bcl-2、Bax 的表达:(1)心肌细胞 caspase-3 蛋白的表达:Western blot 法检测结果显示,C、D 组 caspase-3 蛋白的表达分别高于 A、B 组,差异有统计学意义 (P < 0.05),与 C 组相比,D 组 caspase-3 蛋白的表达更高,差异有统计学意义 (P < 0.05),见图 1。(2)心肌细胞 Bcl-2 蛋白的表达:Western blot 法检测结果显示,C、D 组 Bcl-2 蛋白的表达分别低于 A、B 组,差异有统计学意义 (P < 0.05),与 C 组比较,D 组 Bcl-2 蛋白的表达更低,差异有统计学意义 (P < 0.05,图 2)。(3)心肌细胞 Bax 蛋白的表达:Western blot 法检测结果显示,C、D 组 Bax 蛋白的表达分别低于 A、B 组,差异有统计学意义 (P < 0.05),与 C 组比较,D 组 Bax 蛋白的表达更高,差异有统计学意义 (P < 0.05),见图 3。

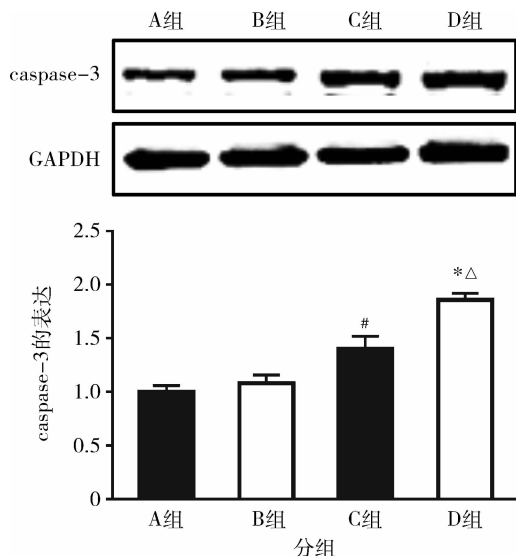


图1 各组心肌细胞凋亡蛋白 caspase-3 的表达

与 A 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^{*} $P < 0.05$;
与 C 组比较, ^Δ $P < 0.05$

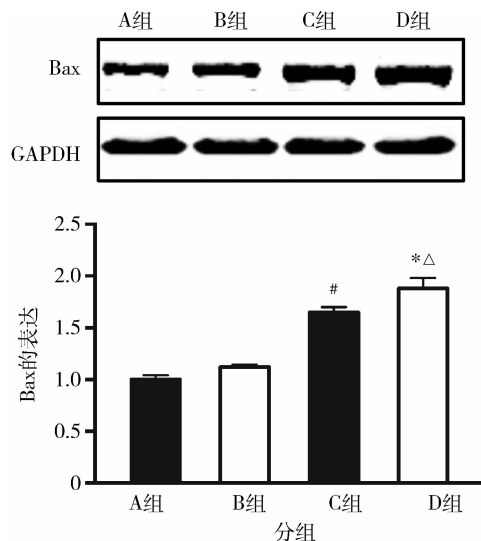


图3 各组心肌细胞凋亡蛋白 Bax 的表达

与 A 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^{*} $P < 0.05$;
与 C 组比较, ^Δ $P < 0.05$

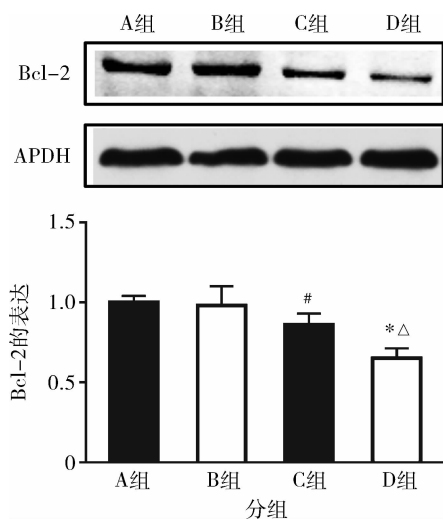


图2 各组心肌细胞凋亡蛋白 Bcl-2 的表达

与 A 组比较, [#] $P < 0.05$; 与 B 组比较, ^{*} $P < 0.05$;
与 C 组比较, ^Δ $P < 0.05$

讨 论

K_{ATP} 通道的结构是一个八聚体,由来源于 Kir6.1 或 Kir6.2 的 4 个亚单位组成离子进出通道的孔,由调节性的 SUR1 或 SUR2 提供另外 4 个亚单位,4 个亚单位围绕在 Kir6.1 或 Kir6.2 的周围^[4,5]。在正常生理状态下, K_{ATP} 通道关闭,在使用钾通道开放剂(P-COs)或者缺血、缺氧、代谢抑制及酸中毒等异常生理状态时, K_{ATP} 通道开放产生心肌保护作用^[6-8]。E23K 多态性是指在部分人群中 K_{ATP} 通道的 Kir6.2 亚基上

第 634 位碱基 G 替换为 A,其对应的氨基酸由原来的谷氨酸(E)替换成赖氨酸(K)。谷氨酸是带负电荷的酸性氨基酸,赖氨酸是带正电荷的碱性氨基酸,即由原来带负电荷的酸性氨基酸向带正电荷的碱性氨基酸转变。研究证实,在高血压人群中,E23K 多态性与左心室大小相关^[9]。而在心力衰竭人群中 E23K 多态性的 KK 亚型比例高于正常人群^[10];与此同时,对中国的扩张型心肌病人群进行研究,发现 E23K 多态性不仅与扩张型心肌病患者左心腔体积及左心室射血分数相关,还与心律失常的发生相关^[3]。说明 E23K 多态性在心脏疾病中起重要作用,然而,到目前为止,对其在心脏疾病中致病机制尚未完全阐明。

在心肌病、心律失常、冠心病等心脏病变中,均有细胞凋亡的发生。Kawano 等^[11]对心肌炎患者心肌活检发现,急性心肌炎患者中未发现有凋亡细胞,而慢性心肌炎患者心肌中发现大量凋亡细胞,可以认为细胞凋亡是心肌受损、由炎症损伤演变为慢性心肌病变的一个病理生理过程。蒽环类药物如阿霉素对心脏具有损伤作用,是扩张型心肌病的病因之一。研究表明,接触微摩尔(μmol)浓度级别的阿霉素的细胞,尤其是心肌细胞和内皮细胞,就会发生凋亡,且阿霉素对细胞的损害呈剂量累计效应^[12]。本研究转染了不同重组质粒的 H9C2 细胞在阿霉素损伤后凋亡时发现,加入阿霉素后所有组的凋亡比例增高,且 E23K 组的细胞在损伤后凋亡比例更高,这与前人研究结果相符,说明这 E23K 与心血管疾病的这种相关性,也

许是通过细胞凋亡途径来实现的。

E23K 多态性由于改变了 K_{ATP} 通道的电荷特性, 这种改变引起了心肌细胞膜离子流改变, 在受到外界损伤时, K_{ATP} 通道不能及时通过正常调控途径启闭而启动保护机制, 改变了膜电位的稳态, 最终引起细胞凋亡的发生。研究证实, E23K 多态性广泛存在于正常人群中, 是否 E23K 是一种疾病状态值得探讨^[10]。而本研究发现, 在没有阿霉素损伤的情况下, E23K 突变与野生型的 K_{ATP} 通道过表达的心肌细胞在细胞凋亡蛋白的表达之间没有差异, 说明 E23K 本身没有致凋亡作用, 而是在受到损伤的条件下, K_{ATP} 通道激活发挥作用时, E23K 多态性所导致的细胞易损伤作用才会表现出来。因此, 本研究认为, E23K 多态性并不直接影响细胞凋亡的发生, 而是在病理状态下增加了心肌细胞的易损性。

细胞凋亡是由基因调控的细胞程序性死亡途径, 多种蛋白参与其中^[13]。其中与促进凋亡相关的蛋白包括 caspase 家族、P53, 抗凋亡蛋白主要有 Bcl-2 家族、survivin 等。这些蛋白家族分别参与了不同的细胞凋亡调控途径, 发挥不同的作用。不同药物或损伤引起凋亡的途径不尽相同, 具体的凋亡机制目前还无定论。目前无法明确阿霉素引起凋亡的具体途径和机制, 是否与扩张型心肌病的发生、发展过程所涉及的途径一致也未有定论。本研究发现 E23K 突变使阿霉素诱导的心肌细胞凋亡加重, 其具体的途径和机制还有待进一步深入研究。

综上所述, K_{ATP} 通道 kir6.2 亚基 E23K 突变加重阿霉素诱导的细胞凋亡, E23K 突变可能是部分心肌损害发生、发展的易患因素, 使心脏在病理情况下更容易发生心肌细胞凋亡。为探讨阿霉素诱导心血管损伤相关疾病的发生、发展过程及临床干预提供了依据。

(上接第 27 页)

- 14 Guan H, Sun K, Yang K. The ERK1/2 signaling pathway regulates 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in human trophoblast cells through a transcriptional mechanism[J]. *Biol Reprod*, 2013, 89(4): 92
- 15 Zhu H, Zou C, Fan X, *et al*. Up-regulation of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression by hedgehog ligand contributes to the conversion of cortisol into cortisone[J]. *Endocrinology*, 2016, 157(9): 3529-3539
- 16 Luo L, Deng J, Wang DX, *et al*. Regulation of epithelial sodium channel expression by oestradiol and progestogen in alveolar epithelial cells[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2015, 216: 52-62
- 17 Suzuki S, Tsubochi H, Ishibashi H, *et al*. Inflammatory mediators down-regulate 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in a human lung epithelial cell line BEAS-2B and the rat lung[J]. *Tohoku*

参考文献

- 1 Obata T, Nakashima M. Opening of ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) channels enhance hydroxyl radical generation induced by MPP⁺ in rat striatum[J]. *J Neurol Sci*, 2016, 366: 180-183
- 2 Olson TM, Terzic A. Human K(ATP) channelopathies; diseases of metabolic homeostasis[J]. *Pflugers Arch*, 2010, 460(2): 295-306
- 3 Xi HL, Liu JF, Li L, *et al*. Relationship between dilated cardiomyopathy and the E23K and I337V polymorphisms in the Kir6.2 subunit of the K_{ATP} channel[J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(4): 4383-4392
- 4 Lederer WJ, Nichols CG. Nucleotide modulation of the activity of rat heart ATP-sensitive K^+ channels in isolated membrane patches[J]. *J Physiol*, 1989, 419: 193-211
- 5 Li N, Wu JX, Ding D, *et al*. Structure of a Pancreatic ATP-Sensitive Potassium Channel[J]. *Cell*, 2017, 168(1-2): 101-110
- 6 Budas GR, Jovanovic S, Crawford RM, *et al*. Hypoxia-induced preconditioning in adult stimulated cardiomyocytes is mediated by the opening and trafficking of sarcolemmal KATP channels[J]. *FASEB J*, 2004, 18(9): 1046-1048
- 7 Toib A, Zhang HX, Broekelmann TJ, *et al*. Cardiac specific ATP-sensitive K^+ channel (K_{ATP}) overexpression results in embryonic lethality[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 53(3): 437-445
- 8 Olson TM, Alekseev AE, Moreau C, *et al*. K_{ATP} channel mutation confers risk for vein of Marshall adrenergic atrial fibrillation[J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007, 4(2): 110-116
- 9 Reyes S, Terzic A, Mahoney DW, *et al*. K(ATP) channel polymorphism is associated with left ventricular size in hypertensive individuals: a large-scale community-based study[J]. *Hum Genet*, 2008, 123(6): 665-667
- 10 Reyes S, Park S, Johnson BD, *et al*. K_{ATP} channel Kir6.2 E23K variant overrepresented in human heart failure is associated with impaired exercise stress response[J]. *Hum Genet*, 2009, 126(6): 779-789
- 11 Kawano H, Okada R, Kawano Y, *et al*. Apoptosis in acute and chronic myocarditis[J]. *Jpn Heart J*, 1994, 35(6): 745-750
- 12 金凯, 陈中军, 罗华荣. 盐酸阿霉素对大鼠心肌损伤的分子机制研究[J]. *同济大学学报: 医学版*, 2002, 22(3): 191-193
- 13 Toischer K, Rokita AG, Unsold B, *et al*. Differential cardiac remodeling in preload versus afterload[J]. *Circulation*, 2010, 122(10): 993-1003
(收稿日期: 2017-04-25)
(修回日期: 2017-05-31)
- J Exp Med, 2005, 207(4): 293-301
- 18 Suzuki S, Koyama K, Darnel A, *et al*. Dexamethasone upregulates 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in BEAS-2B cells[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(9): 1244-1249
- 19 Tsubochi H, Suzuki S, Kubo H, *et al*. Early changes in alveolar fluid clearance by nitric oxide after endotoxin instillation in rats[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(2): 205-210
- 20 Sai S, Nakagawa Y, Yamaguchi R, *et al*. Expression of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase 2 contributes to glucocorticoid resistance in lymphoblastic leukemia cells[J]. *Leuk Res*, 2011, 35(12): 1644-1648
- 21 Teshima T, Matsumoto H, Okusa T, *et al*. Effects of carbenoxolone on the canine pituitary-adrenal axis[J]. *PLoS One*, 2015, 10(8): e0135516
(收稿日期: 2017-05-09)
(修回日期: 2017-05-27)