

γ-谷氨酰转肽酶在心肌梗死大鼠心肌 Ito 通道重构机制中的作用*

郑明奇¹ 刘刚¹ 郭继鸿²

[摘要] 目的:研究心肌梗死(心梗)后心肌钾通道重构是否与 γ-谷氨酰转肽酶(GGT)活性调控相关联。方法:取体重 180~200 g 的雄性 SD 大鼠,建立心梗动物模型(心梗组);另取大鼠(对照组)进行同样手术,但不结扎冠状动脉。两组大鼠术后 6~8 周提取心肌细胞膜蛋白,用生物化学法分析 GGT 活性,用 Real-Time PCR 分析 GGT 的 mRNA 表达,用 Western blotting 分析 GGT 蛋白表达。酶解法获得单一心室肌细胞,应用全细胞膜片钳技术记录瞬时外向钾电流(Ito)。结果:①心梗组心肌 GGT 活性较对照组显著增加(左心室增加 45%,室间隔增加 31%),GGT 的 mRNA 和蛋白表达亦显著增加;②心梗组左室肌细胞 Ito 密度较对照组显著降低[(16.2±3.1)pA/pF:(30.9±3.8)pA/pF, P<0.05];经细胞外还原型谷胱甘肽(GSHo)预处理 4~5 h 后,心梗组 Ito 密度恢复至对照组水平[(30.1±3.3)pA/pF:(30.9±3.8)pA/pF, P>0.05];③GSHo 完全抑制了 GGT 特异性阻滞剂对 Ito 密度的正常化,但不影响 N-乙酰半胱氨酸对 Ito 密度的正常化。结论:GGT 介导了细胞外 GSHo 对 Ito 通道的脱重构作用,调控钾通道的功能表达;GGT 对 GSHo 的催化分解可逆转心肌电重构。

[关键词] 心肌梗死;钾通道重构;谷胱甘肽;γ-谷氨酰转肽酶

[中图分类号] R542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-1439(2013)03-0179-05

Effect of γ-glutamyl transpeptidase on Ito channel remodeling in rat heart post-myocardial infarction

ZHENG Mingqi¹ LIU Gang¹ GUO Jihong²

(¹Department of Cardiology, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050031, China; ²Heart Center, People's Hospital, Peking University)

Corresponding author: LIU Gang, E-mail: cardio2004@163.com

Abstract Objective: To identify whether GGT activity is relative to Kv channel remodeling in post-myocardial infarction. **Method:** We selected 180-200 g male SD rats to establish myocardial infarction (MI) model (MI group), and control group that have the same operation with the MI group but without ligation of coronary artery. 6-8 weeks after operation, we extracted cell membrane proteins of myocardium, then analyzed GGT activity with biological chemical method, detected GGT mRNA expression with Real Time PCR, and tested GGT protein expression with Western blotting. Single ventricular myocytes were obtained by enzymatic method, and Ito was recorded by whole cell patch clamp technique. **Result:** ①Compared with control group, GGT activity in MI group increased significantly (left ventricular increased 45%, ventricular septal increased 31%), while expressions of GGT mRNA and protein increased significantly too. ②The density of Ito decreased significantly in MI group than that in control group [(16.2±3.1)pA/pF vs (30.9±3.8)pA/pF, P<0.05], then was recovery to the level of control group after preconditioning with GSHo in 4~5 h [(30.1±3.3)pA/pF vs (30.9±3.8)pA/pF, P>0.05]. ③The functions of GGT specific blockers on Ito density were completely inhibited by GSHo, but the effect of NAC on Ito density didn't affected by GSHo. **Conclusion:** GGT mediates the remodeling effect of GSHo on Ito channels. The catalytic decomposition of GGT could be used as a clinical treatment strategy to reverse cardiac electrical remodeling.

Key words myocardial infarction; Kv channel remodeling; Glutathione; γ-glutamyl transpeptidase

慢性心肌梗死(心梗)诱发的心室功能障碍可引起一系列心肌电重构,包括电压门控钾通道(Kv)表达的下调。在缺血和心力衰竭大鼠的心室肌细

胞,瞬时外向钾电流(Ito)和延迟整流钾通道电流(Ik),以及相应 mRNA 和通道蛋白(Kv4.2、Kv4.3 与 Kv1.4)的表达都显著降低,但经还原型谷胱甘肽(GSHo)或 N-乙酰半胱氨酸(NACo,谷胱甘肽前体)预处理 5 h 后正常化^[1]。γ-谷氨酰转肽酶控制着细胞内谷胱甘肽(GSH)的生物合成,维持 GSH 稳态平衡和正常的氧化还原状态,从而维持细胞的正常生理功能^[2]。γ-谷氨酰转肽酶(GGT)是这一循

* 基金项目:国家自然科学基金(No:81100127);河北省自然科学基金(No:C2011206056);河北省留学人员科技活动项目择优资助项目(No:2011)

¹ 河北医科大学第一医院心内科(石家庄,050031)

² 北京大学人民医院心脏中心

通信作者:刘刚, E-mail: cardio2004@163.com

环的惟一催化酶,位于细胞膜外表面,分解 GSHo 使其变成三肽(谷氨酸、半胱氨酸及甘氨酸)后通过细胞膜,进入细胞内重新合成谷胱甘肽(GSHi)^[3]。GGT 对心肌细胞功能,尤其是病理状态下心肌 Kv 重构的调控机制仍然不清楚。本研究拟明确 GSHo 作用下 GGT 对梗后心肌细胞 Kv 通道重构的逆转作用。

1 材料与方法

1.1 梗死动物模型建立

本实验得到河北医科大学伦理道德委员会批准,雄性 SD 大鼠均购自河北医科大学实验动物中心。大鼠(180~200 g)用美索比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后,气管插管,呼吸机维持正常通气,行胸廓切开术暴露心脏,在肺动脉流出道和左心房间置缝线结扎左冠状动脉(冠脉)降支,关闭胸腔。造模成功的大鼠恢复 6~8 周后进行实验研究。使用 VisualSonics Vevo 770 高分辨率成像系统评价左心功能衰竭的生理学指征,左心室游离壁梗死面积 30%~40% 为心肌梗死^[4]。梗死面积计算采用氯化硝基四氮唑蓝(NBT)法:术后 4 周摘出大鼠心脏,用 0.9% 氯化钠溶液清洗,剔除血管脂肪等非心肌组织,用吸水纸吸去水分,将全心室置 -20℃ 冻存 5 min 后,从心尖至心底横切成 1~2 mm 的心室组织切片,置于 0.5% NBT 溶液中,37℃ 温孵 10 min,非梗死区染色为红色,梗死区不染色;在透明纸上描出轮廓,扫描后接入图像分析系统测定左室及梗死区面积,并计算梗死面积百分比。梗死面积% = 左心室组织切片梗死区面积/左心室组织切片总面积 × 100%。心肌梗死大鼠每批 20 只,术中及术后死亡率 40%~60%。另取相似体重的正常大鼠作为对照组进行同样的手术过程,但不结扎冠脉。

1.2 大鼠单个心室肌细胞分离和心脏灌流

采用胶原酶解法获得单一心室肌细胞。大鼠称重后用戊巴比妥钠行腹腔麻醉(50 mg/kg),迅速开胸,取出心脏置 Langendoff 灌流装置行主动脉逆行灌流,先用有钙液灌流 5 min,心脏复跳有力,再予以无钙液灌流 5~10 min 使心脏停跳,于无钙液中加入胶原酶 II 型(0.8 mg/ml, Worthington)循环灌流 28 min,剪下心室,将心室肌剪碎置于洗细胞液中,200 m 滤膜过滤,每 10~15 min 复钙 1 次至终浓度为 0.9 mmol/L。最后将单个心室肌细胞置于 DMEM 培养基中并放于 37℃ 孵育箱 5% CO₂/95% O₂ 直到使用。左心室心肌组织用上述方法以 DMEM 液体灌流离体心脏,并通以 5% CO₂/95% O₂,给予 30 g 葡聚糖减少水肿和 5 mol/L 肌球蛋白抑制剂减少收缩活动。心脏灌流液包括无钙液和有钙液,无钙液(mmol/L): NaCl 138, NaHCO₃ 16, NaH₂PO₄ 0.8, Glucose 5, Adensine 0.001, KCl 8, HEPES 5, HCl, pH=7.35; 有钙液; 无钙液

中加入 CaCl₂ 1.8 mmol/L。洗细胞液:无钙液中加入 0.5% BSA 及 90 μ mol/L CaCl₂, HCl, pH=7.3。若非特别注明,所有化学药品均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)。

1.3 电流记录

取细胞置于倒置显微镜上的器皿中,用电极外液进行灌流。玻璃微电极用电极拉制仪(Model P-97, Sutter Instrument)拉制而成,充灌电极内液。后电极电阻 2~4 M Ω 。电极与膜补偿串联电阻和电极电容后构成全细胞记录,全细胞膜电容由膜电容下的面积除以刺激脉冲值(5 mV) 而得。刺激脉冲由计算机软件(Pclamp 8.1, Axon Instrument)控制,电流信号经 16 位 D/A 转换器(DIGIDATA 1322A, Axon Instrument)转换,低通滤波器(2 kHz)滤波后采样(采样频率 4 kHz)并存于计算机中。Ito 的刺激脉宽为 500 ms,刺激电压范围为 -40~+60 mV,阶跃 10 mV,频率 0.2 Hz,保持电位 -80 mV,100 ms 预脉冲到 -60 mV 以失活快钠通道,Ito 幅值取峰值外向电流值与刺激脉冲结束时电流值之差,电流幅值除以细胞膜电容为电流密度。所有电生理记录均在室温 22℃~24℃ 完成。电极外液(mmol/L): NaCl 138, KCl 4, MgCl₂ 0.5, HEPES 5, CaCl₂ 1.8, 葡萄糖 10, NaOH, pH=7.4。电极内液(mmol/L): KCl 135, MgCl₂ 3, Na₂ATP 3, GTP 0.5, EGTA 10, HEPES 10, KOH, pH=7.2。

1.4 GGT 活性分析检测

采用标准的分光光度计检测 GGT 活性^[5]。心肌组织样本在冰的缓冲液(0.1 mol/L, pH 8.0, 加入 2 mmol/L EDTA)匀浆,4℃、6 000 × g 离心 1 h, 获取提纯后的膜蛋白。5 μ l (10 μ g) 蛋白加入含有反应缓冲液(Tris-HCl: 0.1 mol/L, 0.6 ml, pH 8.0; L-g-glutamyl-p-nitroanilide: 5 mmol/L, 0.2 ml, pH 8.0; glycylglycine: 0.1 mmol/l, 0.2 ml, pH 8.0)的小管中,温度 37℃。反应开始于膜蛋白的加入,在波长 410 nm 记录对硝基苯胺的产生速率。GGT 活性表达为毫单位/毫克蛋白。

1.5 GGT 膜蛋白 Western blot 分析

对心肌组织样本蛋白按照标准程序做 GGT 膜蛋白免疫沉降分析。以 TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-glycerol-buffer, 1 μ g/ml aprotinin, 2 mmol/L EDTA, pH 7.0)加 1% Triton X-100 对样本进行匀浆提取膜蛋白,使用 kit(Pierce)分析蛋白浓度,将所有检测样本蛋白等量加入 10% 聚丙烯酰胺凝胶板上电泳,转膜到聚偏氟乙烯膜,用 TBST 洗膜 5 min 3 次,用考马斯亮蓝染色后水冲洗,经 5% 牛奶 TBS-T (Tris 缓冲盐溶液 + 0.05% Tween 20, pH 7.0) 加上抗 GGT 一抗(1:1 000 稀释, sc-20639, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)

4°C 孵育过夜并轻轻晃动。用 15 ml TBS-T 清洗 3 次,每次 5 min。加入二抗山羊抗兔 IgG 抗体(1 : 5 000 稀释,Pierce Chemical, Rockford, IL)。用 15 ml TBS-T 清洗 3 次。GGT 蛋白信号通过增强的化学发光试剂(Pierce Chemical),使用 UVP 生物成像系统进行分析(Upland, CA)。将 GGT 蛋白除以提纯的总蛋白量以进行标准化。

1.6 RNA Real-Time PCR 测定

按照 RNAeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA)使用手册提取心肌组织样本总量 RNA 进行 real-time PCR 测定。使用随机引物 (TaqMan reverse transcription reagents)将 1 μ g 总 RNA 逆转录为 cDNA,然后取 1 μ l cDNA 用进行 45 个循环 PCR 扩增,对 GGT 和 GAPDH 进行基因表达分析。引物序列为,GGT:5'-ACCACTCACCCAACCGC-CTAC-3',5'-ATCCGAACCTTGCCGTCCTT-3';GAPDH:5'-ACCCCAATGTATCCGTTGT-3',5'-TACTC-CTTGAGGCCATGT-3'。使用 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR 系统对样本重复两次进行测定。目标基因的定量为表达量除以 GAPDH 的量。

1.7 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌梗后心肌细胞 GGT 的表达

与对照组相比,心肌梗组左室和室间隔的 GGT 活性分别增高了 45% 和 31%。从上述样本提取膜蛋白和 mRNA,分别进行 Western blotting 和 Real-Time PCR 分析,显示其与 GGT 生物活性一致。GGT 蛋白量与 mRNA 表达水平在心肌梗组显著高于对照组见图 1。

2.2 GSHo 对心肌细胞 Ito 电流密度的影响

各组 Ito 电流密度为:对照组(29 只)(30.9 \pm 3.8) pA/pF,心肌梗组 GSHo 处理前(42 只)(16.2 \pm 3.1) pA/pF,心肌梗组 GSHo 处理后(35 只)(30.1 \pm

3.3) pA/pF,其中心梗组 GSHo 处理前与对照组及处理后比较均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),处理后与对照组差异无统计学意义。GSHo 对 Ito 的影响可被两种 GGT 特异性阻滞剂 S-hexyl-GSH (100 mol/L)和 acivicin(10 mol/L)完全抑制,GSH 的前体 N-乙酰半胱氨酸(NAC,10 mmol/L)也可以使 Ito 密度正常化。与 GSH 作用不同,上述两种 GGT 阻滞剂并没有阻断 NAC 干预后的 Ito 正常化见图 2。

2.3 GSHo 影响 Ito 重构的机制

对分离的心梗后心肌细胞以谷氨酰半胱氨酸合成酶(GCS)抑制剂丁硫氨酸亚砷胺(BSO)处理 18 h 后重复 GSHo 实验。单独 BSO(10 mol/L)既没有改变 Ito 的基础电流密度,也没有抑制 GSHo 增大 Ito 电流密度的趋势,高浓度的 BSO(100 mol/L)对 Ito 几乎无影响。使用两种 GSH 的前体 L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate(OTC)和谷胱甘肽乙基酯(GME)对心梗后心肌细胞预处理 4~5 h,均没有增大 Ito 电流密度。见图 3。

3 讨论

哺乳动物心脏蛋白巯基的主要作用是在生理条件下维持还原状态,氧化状态下起保护作用。细胞内存在高浓度的 GSH 和巯基氧化还原系统,如 Trx 和 Grx 系统^[3]。但在病理条件下,细胞内 GSH 水平降低,严重影响了细胞功能,包括离子通道的活性^[6-7]。所以,增加细胞内 GSH 水平可以恢复细胞功能,补充细胞外 GSH 可起到相同的作用。最近的研究显示,细胞外 GSH 的治疗可以使糖尿病大鼠和心梗大鼠的心室肌细胞 Ito 电流密度正常化,这一作用需要数小时方能显现。在牛和人类心房肌细胞,GSH 的消减与 L 型钙离子通道电流密度降低有关,这种电生理表现在体外可被 GSH 或 NAC 逆转^[6]。缺氧也显示,通过 GSHo 逆转机制可调控豚鼠心室肌细胞一过性和持久性钠离子电流^[7]。实验研究阐述了 GSHo 有意义地影响离子

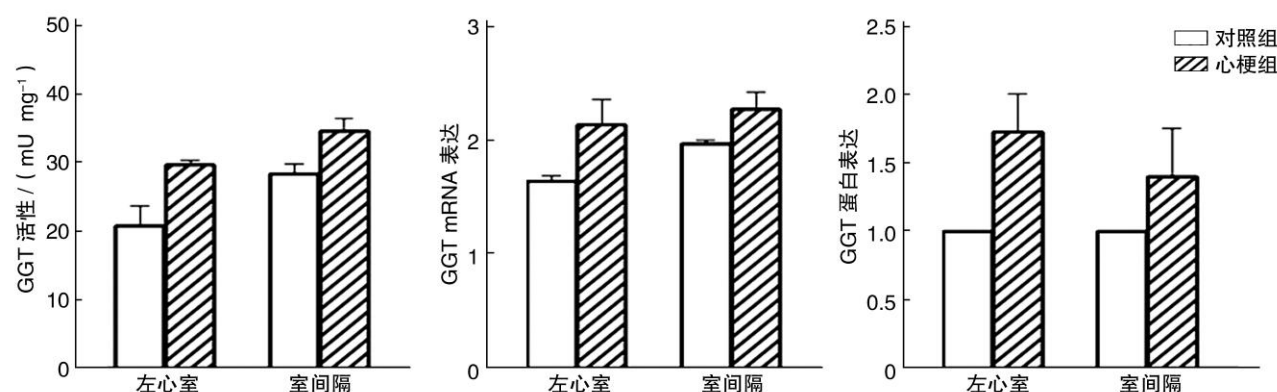
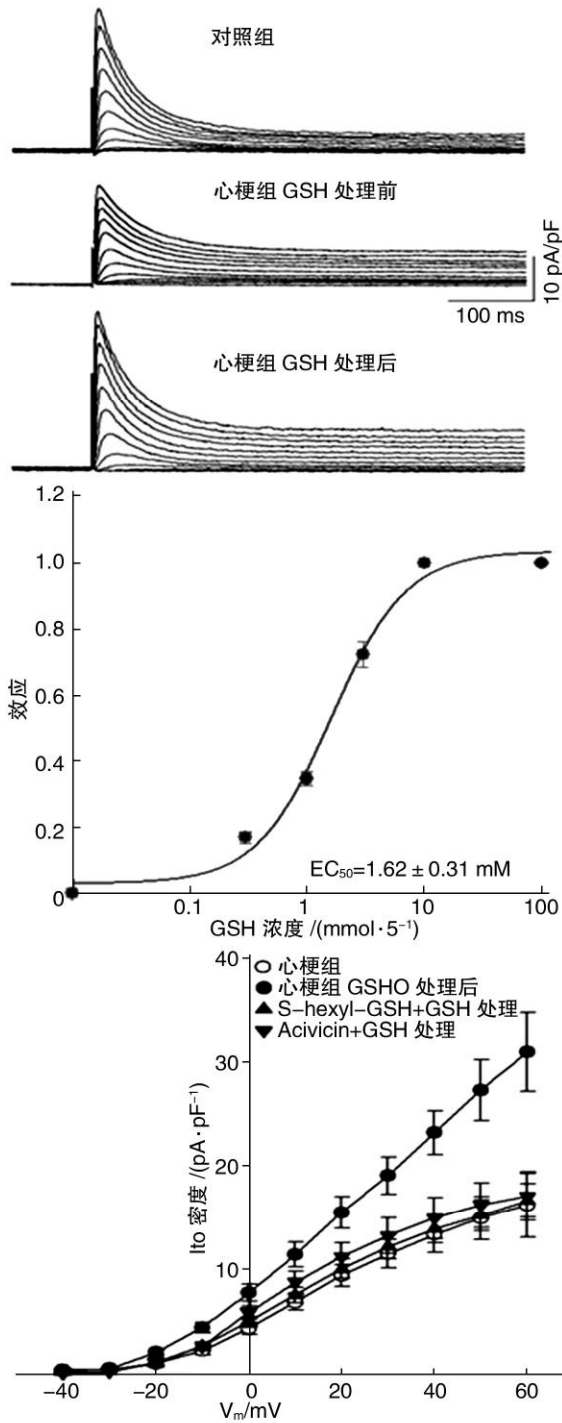


图 1 对照组和与心肌梗组心肌组织 GGT 的表达
Figure 1 Expression of GGT in myocardium



通道的必需浓度为 $(1.62 \pm 0.31) \text{ mmol/L}$, 这个浓度要比体内所测的浓度大得多。体外实验研究需超越生理浓度的 GSHo 的原因还不清楚, 可能与大部分 GSH 氧化或 GSHo 代谢所需催化因子的缺乏有关^[8]。

GSHo 可影响细胞内 GSH 浓度, 哺乳动物细胞并不能直接利用 GSHo, 而是先被 GGT 分解成氨基酸(半胱氨酸、甘氨酸与谷氨酸), 然后进入细胞内通过 GCS 合成 GSH^[8-9]。以前曾有文献报道, 细胞内 GSH 水平降低和细胞功能障碍可以被超生理水平的 GSH 浓度逆转, 推测这一影响被 GGT 所

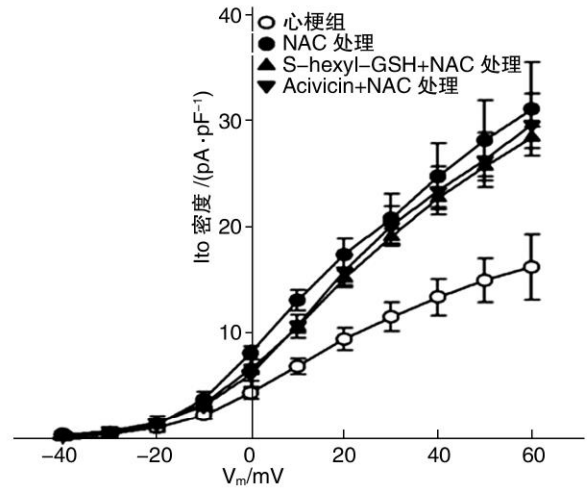
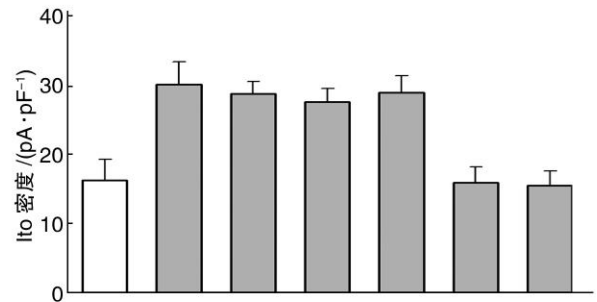


图 2 GSHo 对 Ito 电流密度的影响
 Figure 2 Effects of GSHo on Ito density



从左至右依次示: 对照组、GSH、GSH + BSO (10 mol/L)、GSH + BSO (30 mol/L)、GSH + BSO (100 mol/L)、OTC 及 GME 处理组。

图 3 BSO 和 GSH 前体对 Ito 电流密度的影响
 Figure 3 Effects of BSO and GSH precursors on Ito density

介导。在本项研究中, 我们发现 GSHo 对心梗后大鼠心肌细胞 Ito 电流密度的调控被 GGT 所介导, 但 BSO 没有阻断 GSHo 的作用, 也没有阻断 GSHo 前体的作用, 说明 GGT 并没有参与细胞内 GSH 的合成。

GGT 表达增加可由炎症因子、氧化应激等引发, 在多种疾病包括心血管疾病的病原学上有十分重要的作用。推测应激诱发的 GGT 活性上调是一种细胞补偿机制, 保护蛋白以免受到不可逆的氧化损伤。本研究心梗后大鼠左室和室间隔 GGT 活性及其蛋白表达显著高于对照组, 与氧化应激诱发上调的结论一致。此外, GGT 在不同心脏部位的上调幅度并不一致, 目前还不清楚这种活性梯度的功能意义, 可能反映了与 GSH 合成有关的半胱氨酸的来源区域。

总之, GGT 活性及其 mRNA 和蛋白表达在心梗后大鼠左心室和室间隔增加, GSHo 激发 GGT 使心梗后心肌细胞 Ito 通道活性上调。本研究将为

抗凝治疗对非瓣膜性心房颤动患者 纤溶指标的动态影响

韩冰^{1△} 黄全跃¹ 刘樊¹

【摘要】 目的:探讨纤溶因素在非瓣膜性心房颤动(房颤)患者高凝状态形成中的作用及抗凝治疗早期纤溶指标浓度的变化趋势。方法:应用酶联免疫吸附(ELISA)法分别测定窦性心律组(窦律组,27例)及房颤组(25例)患者抗凝治疗各时间点(1 d、7 d、1个月、2个月)组织型纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)、D-二聚体(D-dimer)浓度和INR值。分析两组患者PAI-1和D-dimer浓度的差异、该指标随抗凝治疗时间的变化趋势及PAI-1、D-dimer和INR三者之间的相关性。结果:①房颤组PAI-1和D-dimer水平均明显高于窦律组;②PAI-1和D-dimer浓度在抗凝治疗各时间点均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),PAI-1浓度随抗凝治疗各时间点下降百分比分别为7%、18%及31%,D-dimer浓度分别下降19%、34%及43%;③房颤组PAI-1浓度在抗凝治疗1个月、2个月时与窦律组比较均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),D-dimer浓度治疗7 d、1个月时均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$);④ $INR \leq 2.0$ 较 $INR > 2.0$ 组PAI-1和D-dimer均值较高(均 $P < 0.05$)。相关分析发现PAI-1、D-dimer和INR之间均呈显著负相关(r 值分别为-0.263、-0.443, P 值分别为0.010、0.000),PAI-1和D-dimer之间呈显著正相关($r = 0.468, P = 0.000$)。结论:低纤溶状态可能是非瓣膜性房颤患者高凝状态形成的重要原因;抗凝治疗可有效快速改善房颤患者的低纤溶状态。

【关键词】 心房颤动,非瓣膜性;组织型纤溶酶原激活物抑制剂-1;D-二聚体

【中图分类号】 R541.7 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1001-1439(2013)03-0183-04

Effects of anticoagulant therapy on alteration of fibrinolysis parameters in patients with nonvalvular atrial fibrillation

HAN Bing HUANG Quanyue LIU Fan

(Department of Cardiology, the Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, 410011, China)

Corresponding author: HUANG Quanyue, E-mail: hqy2248@medmail.com.cn

Abstract Objective: To explore the role of fibrinolysis system in the formation of hypercoagulable state with nonvalvular atrial fibrillation (NVAf) patients and investigate the variation tendency of PAI-1 and D-dimer levels

¹ 中南大学湘雅二医院心内科(长沙,410011)

[△] 现工作于兰州大学第一医院(兰州,730000)

通信作者:黄全跃, E-mail: hqy2248@medmail.com.cn

氧化应激引起的细胞损伤和离子通道重构的调控提供一个新的视点,为临床更有效地防治心律失常提供新的理论依据和治疗策略。

参考文献

[1] ROZANSKI G J. Physiological remodeling of potassium channels in the heart[J]. Cardiovasc Res, 2012, 93:218-219.

[2] BANDERAS D Z, ESCOBEDO J, GONZALEZ E, et al. γ -Glutamyl transferase: a marker of nonalcoholic fatty liver disease in patients with the metabolic syndrome[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2012, 24:805-810.

[3] FILOMENI G, ROTILIO G, CIRIOLO M R. Cell signalling and the glutathione redox system[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64:1057-1064.

[4] 田颖,王江,李振魁,等.大鼠心肌梗死后心力衰竭模型的建立和评估[J].心脏杂志,2006,18(4):404-405.

[5] TATE S S, MEISTER A. Gamma-Glutamyl transpeptid-

ase from kidney[J]. Methods Enzymol, 1985, 113:400-419.

[6] CARNES C A, JANSSEN P M L, RUEHR M L, et al. Atrial glutathione content, calcium current and contractility[J]. J Biol Chem, 2007, 282:28063-28073.

[7] WANG W, MA J, ZHANG P, et al. Redox reaction modulates transient and persistent sodium current during hypoxia in guinea pig ventricular myocytes[J]. Pflugers Arch, 2007, 454:461-475.

[8] PAOLICCHI A, DOMINICI S, PIERI L, et al. Glutathione catabolism as a signaling mechanism[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64:1027-1035.

[9] HANIGAN M H, RICKETTS W A. Extracellular glutathione is a source of cysteine for cells that express gamma-glutamyl transpeptidase[J]. Biochemistry, 1993, 32:6302-6306.

(收稿日期:2012-07-12 修回日期:2012-09-15)