

DOI:10.16781/j.0258-879x.2021.02.0189

· 论 著 ·

过表达氯离子通道蛋白3对异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌肥厚的预防作用与机制

汪 帅¹, 孙 宇¹, 陈梦青², 唐 敬³, 卢 群¹, 李春梅^{1*}

1. 广东药科大学生命科学与生物制药学院生物化学与分子生物学系, 广州 510006

2. 中国科学院深圳先进技术研究院合成生物学研究所, 深圳 440305

3. 北京润美康医药有限公司, 北京 101312

[摘要] **目的** 探讨氯离子通道蛋白3 (*ClC-3*) 基因过表达对异丙肾上腺素 (ISO) 诱导的小鼠心肌肥厚的预防作用及机制。**方法** 运用腺相关病毒9 (AAV9) 感染方法构建 *ClC-3* 过表达小鼠模型和原代心肌细胞模型, 采用蛋白质印迹法与 qRT-PCR 检测小鼠心脏组织和原代心肌细胞中 *ClC-3* 的表达以确定模型是否建立成功。32 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组, 每组 8 只。对照组连续 7 d 腹腔注射生理盐水, ISO 组连续 7 d 腹腔注射 ISO 7.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, AAV9-bv+ISO 组用空白载体 AAV9 病毒颗粒感染小鼠 4 周后连续 7 d 腹腔注射 ISO 7.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹, AAV9-*ClC-3*+ISO 组用携带 *ClC-3* 基因的 AAV9 病毒颗粒感染小鼠 4 周后连续 7 d 腹腔注射 ISO 7.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹。采用心脏超声检查小鼠心功能变化, 计算心脏体重指数, 采用 qRT-PCR 检测心肌组织中心房钠尿肽 (ANP)、脑钠肽 (BNP) 的 mRNA 表达水平, H-E 染色观察左心室形态学变化, 苦味酸-天狼星红 (PSR) 染色观察心脏组织胶原纤维变化。取小鼠摘出心脏, 体外培养原代心肌细胞并分为 4 组, 对照组未予任何干预, ISO 组用 0.1 μmol/L ISO 干预 48 h, AAV9-*ClC-3* 组用携带 *ClC-3* 基因的 AAV9 病毒颗粒感染细胞 48 h, AAV9-*ClC-3*+ISO 组用携带 *ClC-3* 基因的 AAV9 病毒颗粒和 0.1 μmol/L ISO 共同干预 48 h。采用芯片膜片钳技术检测小鼠原代心肌细胞的容积激活性氯电流 (*I_{Cl,vol}*)。**结果** 蛋白质印迹法和 qRT-PCR 检测结果均表明 *ClC-3* 过表达小鼠和原代心肌细胞模型成功建立。AAV9 介导的 *ClC-3* 过表达能缓解 ISO 诱导的小鼠心脏体重指数、收缩末期室间隔厚度、收缩期左室后壁厚度和舒张期左室后壁厚度的增加, 改善心脏组织形态学异常和心脏纤维化, 减少心脏组织中 ANP、BNP mRNA 表达的增加, 并能体外抑制 ISO 导致的心肌细胞 *I_{Cl,vol}* 降低。**结论** *ClC-3* 过表达可预防 ISO 诱导的小鼠心肌肥厚, 其机制可能与心肌细胞 *I_{Cl,vol}* 激活有关。

[关键词] 氯离子通道蛋白3; 异丙肾上腺素; 肥厚型心肌病; 容积激活性氯电流

[中图分类号] R 542.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2021)02-0189-08

Preventive effect of chloride channel protein 3 overexpression on isoprenaline-induced myocardial hypertrophy in mice and its mechanisms

WANG Shuai¹, SUN Yu¹, CHEN Meng-qing², TANG Jing³, LU Qun¹, LI Chun-mei^{1*}

1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Life Sciences and Biopharmaceuticals, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, Guangdong, China

2. Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 440305, Guangdong, China

3. Beijing Runmeikang Medical Co., Ltd, Beijing 101312, China

[Abstract] **Objective** To explore the preventive effect of chloride channel protein 3 (*ClC-3*) gene overexpression on isoprenaline (ISO)-induced myocardial hypertrophy in mice and its mechanisms. **Methods** *ClC-3* overexpression mouse model and primary cardiomyocyte model were constructed using adeno-associated virus 9 (AAV9) infection method. Western blotting and quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) were used to detect the expression of *ClC-3* in mouse heart tissues and primary cardiomyocytes to determine whether the

[收稿日期] 2020-06-30 **[接受日期]** 2020-12-09

[基金项目] 国家自然科学基金 (31500926), 2018 年度广东省大学生创新创业训练计划项目 (201810573042)。Supported by National Natural Science Foundation of China (31500926) and 2018 Annual Training Program of Innovation and Entrepreneurship for College Students of Guangdong (201810573042)。

[作者简介] 汪 帅, 硕士生。E-mail: 1054423537@qq.com

*通信作者 (Corresponding author)。Tel: 020-39352192, E-mail: gylichunmei@126.com

model was successfully established. Thirty-two male C57BL/6 mice were randomly divided into 4 groups: control group (normal saline intraperitoneally for 7 d), ISO group (ISO 7.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ intraperitoneally for 7 d), AAV9-bv+ISO group (ISO 7.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ intraperitoneally for 7 d after infected AAV9 with carrying blank vector for 4 weeks) and AAV9-CLC-3+ISO group (ISO 7.5 mg·kg⁻¹·d⁻¹ intraperitoneally for 7 d after infected AAV9 with carrying *CIC-3* gene for 4 weeks), with 8 mice in each group. The cardiac function of the mice was detected by echocardiography, and the heart-body weight index was calculated. The mRNA expression of atrial natriuretic peptide (*ANP*) and brain natriuretic peptide (*BNP*) in myocardial tissues was detected by qRT-PCR. The morphological changes of left ventricle were observed by hematoxylin-eosin staining, and the changes of cardiac collagen fibers were observed by picric-sirius red (PSR) staining. Suckling mice were selected and the primary cardiomyocytes were isolated *in vitro* and divided into 4 groups: control group (without any intervention), ISO group (0.1 μmol/L ISO intervention for 48 h), AAV9-CLC-3 group (AAV9 carrying *CIC-3* gene infection for 48 h) and AAV9-CLC-3+ISO group (AAV9 carrying *CIC-3* gene infection and 0.1 μmol/L ISO intervention for 48 h). The volume activating chloride current (*I_{Cl,vol}*) of primary mouse cardiomyocytes was measured by patch clamp technique.

Results Western blotting and qRT-PCR results showed that the mouse model and primary cardiomyocyte model with *CIC-3* overexpression were successfully established. AAV9-mediated *CIC-3* overexpression could reduce the ISO-induced increases in heart-body weight index, end-systolic interventricular septum (IVSs), systolic left ventricular posterior wall (LVPWs), diastolic left ventricular posterior wall (LVPWd), and mRNA expression of *ANP* and *BNP* in cardiac tissues, alleviate the abnormal cardiac histomorphology and cardiac fibrosis, as well as inhibit the ISO-induced decrease of *I_{Cl,vol}* *in vitro*.

Conclusion *CIC-3* overexpression can prevent ISO-induced myocardial hypertrophy in mice, which may be related to the activation of *I_{Cl,vol}*.

[Key words] chloride channel protein 3; isoproterenol; hypertrophic cardiomyopathy; volume activating chlorine current

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(2): 189-196]

心肌肥厚被认为是心力衰竭必经的一个病理过程,是心脏对压力超负荷的一种代偿性反应^[1-2]。心肌肥厚以心肌细胞增大、胎儿基因如心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, *ANP*)和脑钠肽(brain natriuretic peptide, *BNP*)等的激活为特征,常伴纤维化、心肌重构、细胞容积增加^[3-4]。研究显示,异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)等儿茶酚胺类物质可通过激活肾上腺素能受体促进*ANP*和*BNP*表达,从而导致心肌肥厚,增加心血管疾病的风险^[5-7],但其具体机制尚不清楚。

氯离子通道蛋白3(chloride channel protein 3, *CIC-3*)是电压门控氯离子通道基因家族成员之一^[8]。研究表明*CIC-3*在心脏心房和心室细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞等细胞中含量十分丰富^[9]。Liang等^[10]研究认为,*CIC-3*是心肌细胞和血管平滑肌细胞容积调节性氯离子通道的关键组成部分,参与了细胞增殖、分化、迁移、凋亡、容积调节等生命活动。Clemo等^[11]研究发现,心肌肥厚能诱导大鼠心室外向整流的氯电流,充血性心力衰竭刺激犬心脏肿胀也能诱发氯电流。Xiong等^[12]发现,特异性敲除小鼠心脏*CIC-3*基因会诱导心肌肥厚和心力衰竭的发生、发展。

我们前期研究发现,在ISO诱导的大鼠原代肥大心肌细胞、H9c2肥大心肌细胞和野生型C57BL/6小鼠肥厚心肌组织中*CIC-3*的表达水平降低^[13-14]。

本研究通过腺相关病毒9(adeno-associated virus 9, AAV9)载体构建*CIC-3*过表达小鼠模型及*CIC-3*过表达原代心肌细胞模型,探讨*CIC-3*过表达对ISO诱导的小鼠心肌肥厚的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 48只6~8周龄健康雄性C57BL/6小鼠(体重为18~22 g)和8只乳鼠购于广东省医学实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2018-0002],在广东药科大学实验动物中心SPF级环境中饲养[实验动物使用许可证号:SYXK(粤)2017-0125]。本实验符合广东药科大学实验动物伦理委员会制定的伦理学标准。

1.2 主要试剂与仪器 ISO购于美国Sigma公司;*CIC-3*兔一抗(稀释比例为1:1 000)购于英国Abcam公司,GAPDH鼠一抗(稀释比例为1:1 000)、羊抗兔二抗(稀释比例为1:1 000)、羊抗鼠二抗(稀释比例为1:1 000)均购于上海碧云天生物技术有限公司;携带*CIC-3*基因的AAV9(AAV9-*CIC-3*)和空白载体AAV9均购自上海汉恒生物科技有限公司;反转录试剂盒(QPS-201)、荧光定量PCR试剂盒均购于日本ToYoBo公司;蛋白酶抑制剂PMSF、CFX™系列Real-Time PCR仪、蛋白电泳系统、蛋白转膜系统均购于美国Bio-Rad公司;ECL发光液、RIPA裂解液均购于美国

ThermoFisher Scientific 公司;引物由生工生物工程(广州)有限公司合成;Tanon-5200 蛋白成像系统、凝胶成像系统均购于广州誉维生物科技仪器有限公司;Vevo™ 2100 型小动物超声实时影像系统购于加拿大 VisualSonics 公司。

1.3 心肌细胞 *CIC-3* 过表达小鼠模型的建立及动物实验分组 将 AAV9-*CIC-3* 或空白载体 AAV9 病毒颗粒通过尾静脉分别注入小鼠,注射病毒滴度为 $1.9 \times 10^{11} \sim 1.9 \times 10^{12}$ copy/mL,稀释成 100~200 μ L 注射,诱导小鼠心肌细胞特异性过表达 *CIC-3*。4 周后取小鼠心脏组织,采用蛋白质印迹法和 qRT-PCR 确定 *CIC-3* 过表达小鼠模型是否建立成功。32 只小鼠随机分为 4 组:对照组、ISO 组、AAV9-bv+ISO 组、AAV9-*CIC-3*+ISO 组,每组 8 只。(1) 对照组:小鼠连续 7 d 腹腔注射与 ISO 组等体积生理盐水;(2) ISO 组:小鼠连续 7 d 腹腔注射 ISO ($7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);(3) AAV9-bv+ISO 组:使用空白载体 AAV9 病毒颗粒感染小鼠 4 周后连续 7 d 腹腔注射 ISO ($7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$);(4) AAV9-*CIC-3*+ISO 组:用 AAV9-*CIC-3* 病毒颗粒感染小鼠 4 周后,连续 7 d 腹腔注射 ISO ($7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。各组小鼠饲养条件相同,给药完成后禁水、禁食 1 d 后进行心脏超声检查。

1.4 小鼠心脏超声检查 小鼠吸入异氟烷麻醉后固定于 37 °C 恒温加热板,剃除胸毛,于胸部涂少量耦合剂。用 Vevo™ 2100 型小动物超声实时影像系统测量舒张末期室间隔厚度(end-diastolic interventricular septum, IVSd)、收缩末期室间隔厚度(end-systolic interventricular septum, IVSs)、舒张期左室后壁厚度(diastolic left ventricular posterior wall, LVPWd)、收缩期左室后壁厚度(systolic left ventricular posterior wall, LVPWs)。所有指标均连续测量 3 个心动周期,取平均值。

1.5 小鼠心脏体重指数计算 各组小鼠进行心脏超声检查后称体重,运用颈椎脱臼法处死小鼠,取出心脏称其质量,计算心脏体重指数,心脏体重指数(mg/g)=心脏质量(mg)/体重(g)。然后进行后续实验。

1.6 蛋白质印迹法检测蛋白表达 取小鼠心脏组织冰上剪碎,用预冷的 PBS 清洗至上清液澄清,按 50 g/L 加入 RIPA 裂解液,冰上匀浆后 4 °C $3\,000 \times g$ 离心 15 min,取上清,BCA 法进行蛋白定

量。用 10% SDS-PAGE 分离蛋白后电转移至 PVDF 膜上,用脱脂奶粉溶液封闭 2 h,加入 *CIC-3* 一抗 4 °C 孵育过夜,加入二抗室温孵育 1 h, ECL 发光液浸泡 1 min 后用 Tanon-5200 蛋白成像系统采集图像。利用 ImageJ 软件进行灰度分析,以目的蛋白与内参照 GAPDH 条带灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.7 qRT-PCR 检测 mRNA 表达 用苯酚法提取小鼠心脏组织总 RNA,微量紫外分光光度计测定 RNA 的 D_{260}/D_{280} 值, D_{260}/D_{280} 值介于 1.9~2.1 表明纯度较好。按照反转录试剂盒说明书完成反转录,获得 cDNA。以 cDNA 模板、*GAPDH* 为内参照进行 PCR 扩增,反应条件:95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s 循环 40 次, 95 °C 1 min, 60 °C 1 min。引物序列:*CIC-3* 上游引物 5'-GGTCAGGATGGCTTGTGTGTT-3', 下游引物 5'-ACAATGCACTGAGGCAGATG-3'; *ANP* 上游引物 5'-TAGGAGACAGTGACGGACAA-3', 下游引物 5'-GAAGAAGCCCAGGGTGAT-3'; *BNP* 上游引物 5'-CAGCTCTCAAAGGACCAAGG-3', 下游引物 5'-CGATCCGGTCTATCTTCTGC-3'; *GAPDH* 上游引物 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGA-3', 下游引物 5'-TTCACCACCATGGAGAAGGC-3'。每个样本的基因表达用内参照 *GAPDH* 均一化。以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因 mRNA 的相对表达水平。

1.8 H-E 染色和苦味酸-天狼星红(picro-sirius red, PSR)染色 取小鼠心脏组织用 PBS 冲洗后,4% 多聚甲醛溶液固定、二甲苯透明、乙醇梯度脱水、浸蜡、石蜡包埋、制作切片。H-E 染色:取小鼠心脏组织石蜡切片,依次进行脱蜡至水、苏木精染细胞核、伊红染细胞质、脱水封片,最后于显微镜下观察,采集图像并分析。

PSR 染色: 取小鼠心脏组织石蜡切片,脱蜡后蒸馏水浸洗 2 min。加入适量苏木精染液染 3~5 min,蒸馏水冲洗 3 次。加入 PSR 染液染 15~30 min 后进行无水乙醇直接分色与脱水、二甲苯透明。风干后采用中性树胶封片,于显微镜下观察。染色呈黄色为心脏组织纤维,红色为纤维沉积。从每个样本中随机取 15~20 个视野放大 200 倍拍摄图像。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析纤维沉积区域,计算纤维沉积量(红色区域面积所占百分比)。

1.9 小鼠原代心肌细胞培养与分组处理 取 8 只

乳鼠剖开胸腔取出心脏,用PBS洗涤至无残留血污后混合所有心脏组织并切碎,加入含有胰酶和胶原酶的消化工作液,在37℃恒温水浴锅中消化5 min,收集消化后的上清液,剩余组织加入消化液继续消化并收集上清液,直至组织块被完全消化。将收集到的上清液以 $250\times g$ 离心5 min,留沉淀重悬于DMEM-F12完全培养液,再次以 $250\times g$ 离心5 min,弃上清液,剩余沉淀再次悬浮于DMEM-F12完全培养液,用250目过滤网过滤到培养皿中。按照每孔 5×10^5 个细胞的密度接种至6孔板(确保病毒感染时细胞融合度不低于50%),然后用AAV9-CIC-3病毒颗粒感染。病毒液体积=感染时细胞数(按接种细胞数的2倍计算) $\times$ 感染复数(multiplicity of infection, MOI)/病毒滴度。先用含病毒颗粒(MOI= 1×10^5)的培养液1 mL培养细胞4 h后,不换液,追加1 mL新鲜完全培养液继续培养48 h,运用蛋白质印迹法和qRT-PCR确定CIC-3过表达原代心肌细胞模型是否建立成功,实验重复3次。模型建立成功后分为4组。(1)对照组:运用完全培养液进行细胞培养;(2)ISO组:加入10 μ L ISO干预48 h,ISO处理浓度为0.1 μ mol/L;(3)CIC-3过表达(AAV9-CIC-3)组:加入AAV9-CIC-3病毒颗粒感染小鼠原代心肌细胞48 h;(4)CIC-3过表达+ISO干预(AAV9-CIC-3+ISO)组:先后加入AAV9-CIC-3病毒颗粒和10 μ L ISO(浓度为0.1 μ mol/L)共同干预48 h。

1.10 小鼠原代心肌细胞容积激活性氯电流(volume activating chlorine current, $I_{Cl,vol}$)检测 使用芯片膜片钳技术检测小鼠原代心肌细胞膜氯电流的变化。取适量等渗液重悬细胞,将细胞悬浮液置于芯片上,设置 $I_{Cl,vol}$ 记录程序,按照单通道膜片钳设备(nano-patch-clamp, NPC)系统中的PatchControl协议,由EPC10USB膜片钳放大器呈现于显示屏并自动记录电流信号,由数据分析程序自动生成电流-电压曲线。原始电流数据采用PatchMaster及Igor软件进行分析和测量,使用SigmaPlot软件对数据进行拟合并绘图。实验重复3次。

1.11 统计学处理 应用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(两两比较采用Tukey检验)。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 心脏CIC-3过表达小鼠模型的确定 空白载体AAV9组与AAV9-CIC-3组小鼠心脏组织中CIC-3的mRNA表达水平分别为 1.00 ± 0.00 、 2.44 ± 0.38 , CIC-3蛋白表达水平分别为 0.21 ± 0.08 、 0.60 ± 0.12 (图1),差异均有统计学意义($t=10.69$ 、 7.59 , P 均 < 0.05)。证明心脏CIC-3过表达小鼠模型成功建立。

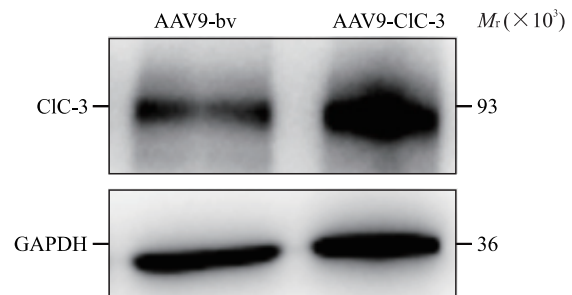


图1 蛋白质印迹法检测CIC-3过表达小鼠模型心脏组织中CIC-3的表达

Fig 1 CIC-3 expression in cardiac tissues of CIC-3 overexpression mouse model detected by Western blotting
AAV9-bv group: The mice were infected with adeno-associated virus 9 (AAV9) carrying blank vector; AAV9-CIC-3 group: The mice were infected with AAV9 carrying CIC-3 gene. CIC-3: Chloride channel protein 3; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

2.2 CIC-3过表达抑制ISO诱导的小鼠心脏体重指数增加 ISO组和AAV9-bv+ISO组小鼠心脏体重指数分别为(4.91 ± 0.27) mg/g、(4.72 ± 0.18) mg/g,均高于对照组的(4.20 ± 0.13) mg/g($t=6.55$ 、 6.71 , P 均 < 0.01);而AAV9-CIC-3+ISO组小鼠心脏体重指数为(4.26 ± 0.14) mg/g,低于AAV9-bv+ISO组($t=5.86$, $P< 0.05$),说明CIC-3过表达抑制了ISO诱导的小鼠心脏体重指数增加。

2.3 CIC-3过表达缓解ISO诱导的小鼠心肌肥厚 如图2、表1所示,ISO组和AAV9-bv+ISO组小鼠都出现了明显的心肌肥厚,表现为IVSs、IVSd、LVPWs、LVPWd均较对照组增加($t=6.17$ 、 4.01 、 5.03 、 2.60 和 $t=5.59$ 、 5.03 、 4.10 、 3.60 , P 均 < 0.05);而AAV9-CIC-3+ISO组小鼠上述指标均下降,其中IVSs、LVPWs和LVPWd与AAV9-bv+ISO组相比差异均有统计学意义($t=2.87$ 、 3.78 、 3.65 , P 均 < 0.05),说明CIC-3过表达能够缓解ISO诱导的小鼠心肌肥厚。

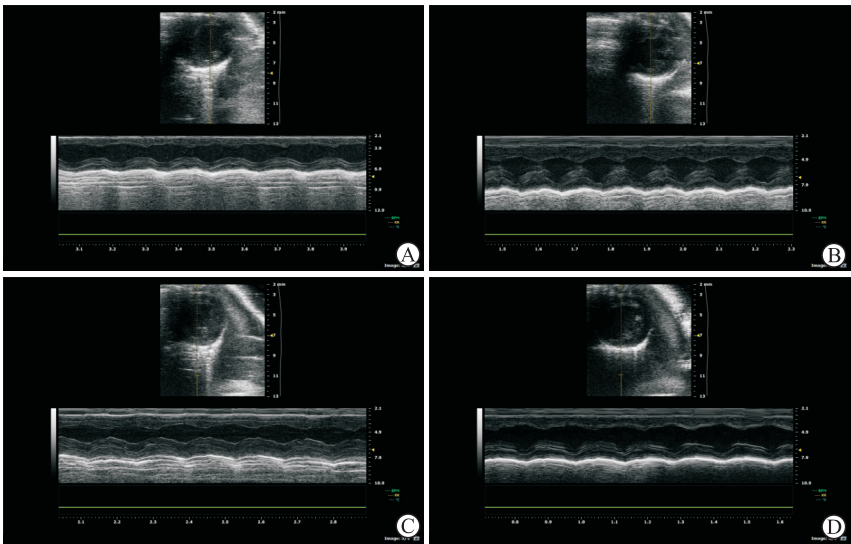


图2 心脏超声检查示 *CIC-3* 过表达缓解 ISO 诱导的小鼠心肌梗厚

Fig 2 Overexpression of *CIC-3* alleviating ISO-induced cardiac hypertrophy in mice detected by echocardiography

A: Control group (the mice were injected with normal saline); B: ISO group (the mice were injected with ISO); C: AAV9-bv+ISO group (the mice infected by adeno-associated virus 9 [AAV9] carrying blank vector were injected with ISO); D: AAV9-CIC-3+ISO group (the mice infected by AAV9 carrying *CIC-3* gene were injected with ISO). *CIC-3*: Chloride channel protein 3; ISO: Isoprenaline.

表1 *CIC-3* 过表达对小鼠心脏超声指标的影响

Tab 1 Effect of *CIC-3* overexpression on mouse echocardiographic indexes

Group	mm, $n=8, \bar{x} \pm s$			
	IVSs	IVSd	LVPWs	LVPWd
Control	1.09 ± 0.13	0.82 ± 0.08	1.14 ± 0.14	0.85 ± 0.07
ISO	$1.39 \pm 0.04^{**}$	$0.96 \pm 0.06^{*}$	$1.35 \pm 0.11^{**}$	$0.95 \pm 0.07^{*}$
AAV9-bv+ISO	$1.44 \pm 0.16^{**}$	$1.00 \pm 0.08^{**}$	$1.41 \pm 0.23^{*}$	$0.95 \pm 0.08^{*}$
AAV9-CIC-3+ISO	$1.25 \pm 0.16^{\Delta}$	0.89 ± 0.08	$1.22 \pm 0.07^{\Delta}$	$0.87 \pm 0.06^{\Delta}$
<i>F</i> value	13.95	11.22	13.74	6.71
<i>P</i> value	0.011	0.013	0.012	0.020

Control group: The mice were injected with normal saline; ISO group: The mice were injected with ISO; AAV9-bv+ISO group: The mice infected by adeno-associated virus 9 (AAV9) carrying blank vector were injected with ISO; AAV9-CIC-3+ISO group: The mice infected by AAV9 carrying *CIC-3* gene were injected with ISO. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ vs control group; $^{\Delta}P<0.05$ vs AAV9-bv+ISO group. *CIC-3*: Chloride channel protein 3; ISO: Isoprenaline; IVSs: End-systolic interventricular septum; IVSd: End-diastolic interventricular septum; LVPWs: Systolic left ventricular posterior wall; LVPWd: Diastolic left ventricular posterior wall.

2.4 *CIC-3* 过表达改善 ISO 诱导的小鼠心脏组织形态学异常 H-E 染色结果 (图 3A) 显示, 对照组小鼠心肌纤维排列规则、无断裂, 细胞核无异常增大; ISO 组小鼠心肌纤维断裂, 细胞核见少许异常增大, 甚至出现细胞核聚集和核溶解, 说明 ISO 干预后小鼠心脏组织发生明显异常重构; AAV9-bv+ISO 组小鼠心脏组织形态学改变与 ISO 组相似; AAV9-CIC-3+ISO 组小鼠心肌纤维排列规则、无断裂, 细胞核也分布正常, 没有出现异常增大和聚集的现象, 与对照组小鼠心脏组织形态学相似。

PSR 染色结果 (图 3B) 显示, 相比对照组, ISO 组与 AAV9-bv+ISO 组小鼠心脏组织间质和血管周围纤维沉积均增多, 心脏纤维化程度均加重 [心肌纤维沉积量: $(10.71 \pm 0.85) \%$ 、 $(8.53 \pm 0.80) \%$ vs $(2.11 \pm 0.35) \%$, $t=26.49$ 、 20.67 , P 均 <0.01]; 与 AAV9-bv+ISO 组比较, AAV9-CIC-3+ISO 组小鼠的心脏组织间质和血管周围纤维沉积均减少, 心脏纤维化程度降低 [心肌纤维沉积量: $(2.25 \pm 0.41) \%$ vs $(8.53 \pm 0.80) \%$, $t=19.70$, $P<0.01$]。

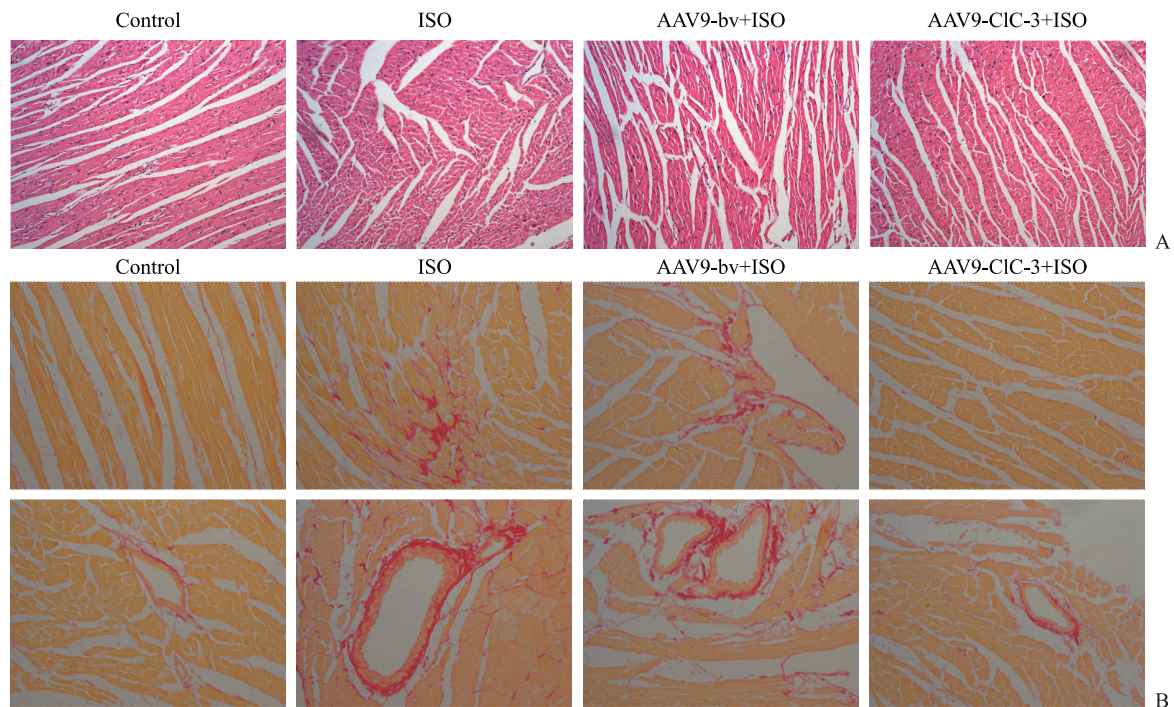


图3 *CIC-3* 过表达改善 ISO 诱导的小鼠心脏组织形态学改变

Fig 3 Overexpression of *CIC-3* improving morphological changes induced by ISO in mice

A: Hematoxylin-eosin staining (200 $\times$); B: Picro-sirius red staining (200 $\times$). Control group: The mice were injected with normal saline; ISO group: The mice were injected with ISO; AAV9-bv+ISO group: The mice infected by adeno-associated virus 9 (AAV9) carrying blank vector were injected with ISO; AAV9-CIC-3+ISO group: The mice infected by AAV9 carrying *CIC-3* gene were injected with ISO. *CIC-3*: Chloride channel protein 3; ISO: Isoprenaline.

2.5 *CIC-3* 过表达下调 ISO 诱导的小鼠心脏组织 *ANP*、*BNP* 的 mRNA 表达升高 ISO 组和 AAV9-bv+ISO 组小鼠心脏组织中 *ANP*、*BNP* 的 mRNA 表达水平均高于对照组 (*ANP* mRNA: 2.60 ± 0.17 、 2.11 ± 0.20 vs 1.00 ± 0.00 , $t=27.13$ 、 15.37 , P 均 <0.01 ; *BNP* mRNA: 1.31 ± 0.36 、 1.48 ± 0.25 vs 1.00 ± 0.00 , $t=2.42$ 、 5.40 , P 均 <0.01); 而 AAV9-CIC-3+ISO 组小鼠心脏组织中 *ANP*、*BNP* 的 mRNA 表达水平均较 AAV9-bv+ISO 组下降 (*ANP* mRNA: 0.84 ± 0.38 vs 2.11 ± 0.20 , $t=8.36$, $P<0.01$; *BNP* mRNA: 0.95 ± 0.45 vs 1.48 ± 0.25 , $t=2.90$, $P<0.01$).

2.6 *CIC-3* 过表达小鼠原代心肌细胞模型的确定 空白载体 AAV9 组与 AAV9-CIC-3 组小鼠原代心肌细胞中 *CIC-3* 的 mRNA 表达水平分别为 0.24 ± 0.02 、 1.38 ± 0.09 , *CIC-3* 蛋白表达水平分别为 1.46 ± 0.18 、 2.71 ± 0.30 (图 4), 差异均有统计学意义 ($t=21.57$ 、 6.22 , P 均 <0.05)。证明 *CIC-3* 过表达小鼠原代心肌细胞模型成功建立。

2.7 *CIC-3* 过表达抑制 ISO 体外诱导的心肌细胞 $I_{Cl,vol}$ 降低 由图 5 可见, 与对照组相比, ISO 组心肌细胞 $I_{Cl,vol}$ 降低 [(3.44 ± 0.03) nA vs

(7.83 ± 0.07) nA, $t=15.72$, $P<0.01$], AAV9-CIC-3 组心肌细胞的 $I_{Cl,vol}$ [(7.92 ± 0.76) nA] 与对照组相近, 而 AAV9-CIC-3+ISO 组心肌细胞的 $I_{Cl,vol}$ [(6.06 ± 0.04) nA] 较 ISO 组增加 ($t=6.94$, $P<0.05$), 说明 *CIC-3* 参与维持心肌细胞 $I_{Cl,vol}$ 。

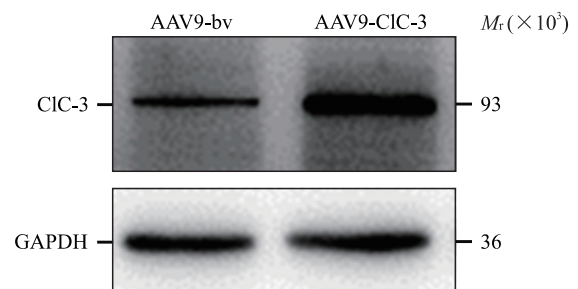


图4 蛋白质印迹法检测 *CIC-3* 过表达小鼠原代心肌细胞模型 *CIC-3* 的表达

Fig 4 *CIC-3* expression in *CIC-3* overexpression mouse primary cardiomyocyte model detected by Western blotting

AAV9-bv group: The cardiomyocytes were infected by adeno-associated virus 9 (AAV9) carrying blank vector; AAV9-CIC-3 group: The cardiomyocytes were infected by AAV9 carrying *CIC-3* gene. *CIC-3*: Chloride channel protein 3; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

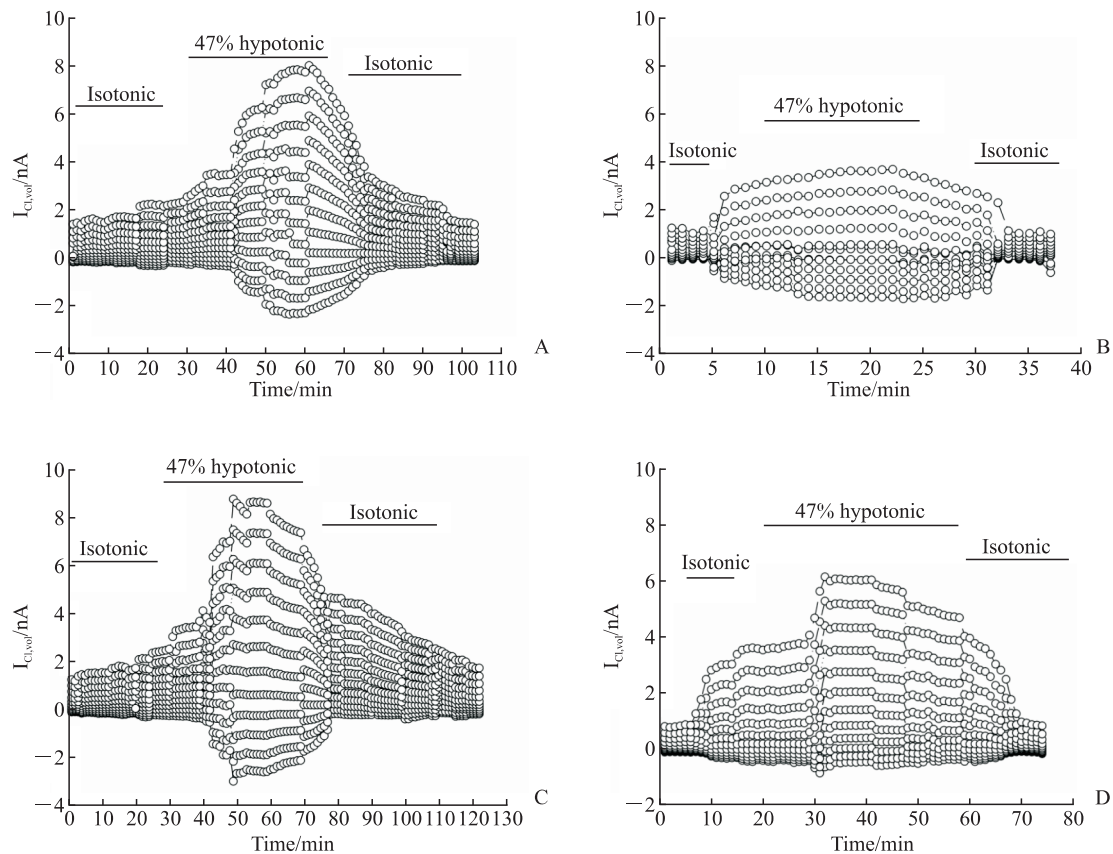


图5 *CIC-3* 过表达抑制 ISO 体外诱导的心肌细胞 $I_{Cl,vol}$ 降低

Fig 5 *CIC-3* overexpression inhibiting the decrease of cardiomyocyte $I_{Cl,vol}$ induced by ISO *in vitro*

A: Control group (the cardiomyocytes were treated without any intervention); B: ISO group (the cardiomyocytes were treated with ISO); C: AAV9-*CIC-3* group (the cardiomyocytes were infected by adeno-associated virus 9 [AAV9] carrying *CIC-3* gene); D: AAV9-*CIC-3* + ISO group (the cardiomyocytes were infected by AAV9 carrying *CIC-3* gene and treated with ISO). *CIC-3*: Chloride channel protein 3; ISO: Isoprenaline; $I_{Cl,vol}$: Volume activating chlorine current.

3 讨论

目前心血管疾病已成为世界上三大致死疾病之一,心肌肥厚被认为是心血管事件的独立危险因素,其能导致患者心律失常,进而诱发心力衰竭,增加患者猝死概率^[15]。研究表明, β -肾上腺素能受体激动剂如 ISO 对 β -肾上腺素能受体的慢性刺激可诱发心肌肥厚^[16]。本研究前期实验(结果未展示)发现,ISO ($7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 连续腹腔注射 7 d 能诱导 C57BL/6 小鼠发生心肌肥厚。

研究发现 *CIC-3* 在细胞容积的自我调节过程中发挥重要作用,而在心肌肥厚及扩张型心肌病中能检测到细胞容积稳定性的改变^[17]。还有研究发现,敲除 *CIC-3* 基因会出现心房增大、左心室容积增加等心肌肥厚征象^[18]。本实验结果显示,*CIC-3* 过表达能减缓 ISO 诱导的心肌肥厚小鼠的心脏体重指数、IVSs、LVPWs 和 LVPWd 的增加,缓解心肌重

构,减少心肌纤维化、下调心肌肥厚标志因子 *ANP* 的 mRNA 表达,表明 *CIC-3* 可能在预防 β -肾上腺素能受体诱发心肌肥厚的过程中起重要作用,或许是一个潜在的防治心肌肥厚的药物靶点。

CIC-3 主要是作为容积激活性氯离子通道激活 $I_{Cl,vol}$,在临床心肌肥厚患者的心肌细胞中可检测到 $I_{Cl,vol}$ 的激活^[19]。研究发现,在兔心力衰竭发生的同时会伴随心肌细胞 $I_{Cl,vol}$ 的减少^[20]。本实验结果显示,*CIC-3* 过表达能抑制 ISO 体外诱导的小鼠心肌细胞 $I_{Cl,vol}$ 降低,表明 *CIC-3* 可能通过激活 $I_{Cl,vol}$ 改善 β -肾上腺素能受体介导的心肌肥厚。

综上所述,*CIC-3* 过表达能预防 ISO 诱导的小鼠心肌肥厚,其机制可能与 $I_{Cl,vol}$ 激活有关。但本实验未深入分析 *CIC-3* 在心肌细胞和心脏成纤维细胞中过表达的比例,在心脏成纤维细胞用腺病毒特异过表达 *CIC-3* 是否对心肌肥厚有影响有待明确,并且过表达 *CIC-3* 对 ISO 诱导的小鼠心肌肥厚是否有

治疗作用也有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] 马力,刘杰,初楠,杨进刚,史旭波,王雅杰,等.心力衰竭模型大鼠心脏肥厚指标与心功能的关系研究[J].首都医科大学学报,2010,31:596-599.
- [2] DENG K Q, WANG A, JI Y X, ZHANG X J, FANG J, ZHANG Y, et al. Suppressor of IKK ϵ is an essential negative regulator of pathological cardiac hypertrophy[J/OL]. Nat Commun, 2016, 7: 11432. DOI: 10.1038/ncomms11432.
- [3] WANG P X, LI Z M, CAI S D, LI J Y, HE P, HUANG Y, et al. C33(S), a novel PDE9A inhibitor, protects against rat cardiac hypertrophy through upregulating cGMP signaling[J]. Acta Pharmacol Sin, 2017, 38: 1257-1268.
- [4] XUE R C, ZENG J Y, CHEN Y L, CHEN C, TAN W P, ZHAO J J, et al. Sestrin 1 ameliorates cardiac hypertrophy via autophagy activation[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21: 1193-1205.
- [5] YILMAZ A, KAYA M G, MERDANOGLU U, ERGUN M A, CENGEL A, MENEVSE S, et al. Association of β -1 and β -2 adrenergic receptor gene polymorphisms with myocardial infarction[J]. J Clin Lab Ana, 2009, 23: 237-243.
- [6] DONG Y, BAI Y, ZHANG S Y, XU W L, XU J H, ZHOU Y, et al. Cyclic peptide RD808 reduces myocardial injury induced by β -adrenoreceptor autoantibodies[J]. Heart Vessels, 2019, 34: 1040-1051.
- [7] 张梓桑,张薪茹,李光宇,张劲松,杜荣增. β 3肾上腺素受体与心血管疾病相关性的研究进展[J].中国动脉硬化杂志,2018,26:207-212.
- [8] ZENG J W, WANG X G, MA M M, LV X F, LIU J, ZHOU J G, et al. Integrin β 3 mediates cerebrovascular remodelling through Src/CIC-3 volume-regulated Cl⁻ channel signalling pathway[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171: 3158-3170.
- [9] DUAN D D. The CIC-3 chloride channels in cardiovascular disease[J]. Acta Pharmacol Sin, 2011, 32: 675-684.
- [10] LIANG G Z, CHENG L M, CHEN X F, LI Y J, LI X L, GUAN Y Y, et al. CIC-3 promotes angiotensin II-induced reactive oxygen species production in endothelial cells by facilitating Nox2 NADPH oxidase complex formation[J]. Acta Pharmacol Sin, 2018, 39: 1725-1734.
- [11] CLEMO H F, STAMBLER B S, BAUMGARTEN C M. Swelling-activated chloride current is persistently activated in ventricular myocytes from dogs with tachycardia-induced congestive heart failure[J]. Circ Res, 1999, 84: 157-165.
- [12] XIONG D, HEYMAN N S, AIREY J, ZHANG M, SINGER C A, RAWAT S, et al. Cardiac-specific, inducible *CIC-3* gene deletion eliminates native volume-sensitive chloride channels and produces myocardial hypertrophy in adult mice[J]. Mol Cell Cardiol, 2010, 48: 211-219.
- [13] LI C, HUANG D, TANG J, CHEN M, LU Q, LI H, et al. CIC-3 chloride channel is involved in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy[J]. Gene, 2018, 642: 335-342.
- [14] 唐敬,付强强,陈梦青,李春梅,陆家政.加入去甲肾上腺素培养的心肌细胞株H9c2体积变化[J].山东医药,2018,58:32-35.
- [15] OKA T, AKAZAWA H, NAITO AT, KOMURO I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure[J]. Circ Res, 2014, 114: 565-571.
- [16] SEE H L, FOSTER S R, WENDT L, PATEL H H, HEADRICK J P, PEART J N, et al. Regulation of the β -adrenergic receptor signaling pathway in sustained ligand-activated preconditioning[J]. Pharmacol Exp Ther, 2019, 369: 37-46.
- [17] 薄冰.心脏CIC-3容积感受性氯离子通道研究进展[J].科技资讯,2014,12:223-224.
- [18] LIU L L, YE L, MCGUCKIN C, HATTON W J, DUAN D. Disruption of *Cln3* gene in mice facilitates heart failure during pressure overload[J]. J Gen Physiol, 2003, 122: 33A.
- [19] PATEL D G, HIGGINS R S, BAUMGARTEN C M. Chronic activation of I_{Cl,swell} in diseased human atrial myocytes[J]. J Am Coll Cardiol, 2003, 41(6 Suppl 1): 112A-113A.
- [20] MAO J W, CHEN L X, XU B, WANG L J, LI H Z, GUO J, et al. Suppression of *CIC-3* channel expression reduces migration of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75: 1706-1716.

[本文编辑] 尹 茶