



论文

心肌细胞横管的形态发生: *Junctophilin-2* 的作用

韩晶, 吴昊迪, 王其伟, 王世强*

北京大学生命科学学院, 生物膜与膜工程国家重点实验室, 北京 100871

* 联系人, E-mail: wsq@pku.edu.cn

收稿日期: 2013-02-07; 接受日期: 2013-03-28

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2011CB809101)资助项目

摘要 横管系统是心脏和肌肉细胞兴奋收缩偶联的结构基础. 在新生鼠的心肌细胞中并不存在横管结构, 横管的形态发生是心肌细胞成熟过程中的一个重要标志. 本文对心肌细胞成熟过程中横管的形态变化进行定量分析, 并对连接横管和肌质网的关键分子 *Junctophilin-2* (JP2) 在这个过程中所发挥的作用进行研究. 对心肌细胞图像的分析显示, 在横管成熟的过程中, 横管的横向组分逐渐增加, 纵向组分逐渐减少. 通过对横管图像进行傅里叶变换分析, 发现横管排列的规律性随心肌细胞的成熟而逐渐增加. 横管的这些变化伴随着 JP2 蛋白表达量的上升, 并且可以被 JP2 表达量的敲减所逆转. 这些现象表明, JP2 在横管形态发生过程中发挥重要作用.

关键词

横管

Junctophilin-2

心肌细胞

形态发生

横管是心肌细胞膜内化形成的管状结构, 可以将胞外的去极化信号传递至细胞纵深, 从而引起整个细胞的同步收缩^[1,2]. 大部分横管为横向, 沿心肌细胞 Z 线延伸; 少量横管为纵向, 存在于相邻的 Z 线之间^[3]. 心肌细胞中横管的平均直径为 180~280 nm^[3,4]. 横管上分布有大量膜蛋白, 如电压门控钠通道、L 型钙通道和钠钾交换体, 它们分别在细胞兴奋、兴奋收缩偶联及胞内钙离子移除方面发挥重要作用^[1,5~7]. 横管在心肌细胞中广泛分布, 与肌质网形成二联体结构(偶联子), 横管膜与肌质网膜之间的距离约为 12 nm^[8,9]. 在兴奋收缩偶联过程中, 横管上的 L 型钙通道所介导的钙离子内流引起肌质网 ryanodine 受体(ryanodine receptor, RyR)钙释放, 进而引发一次钙瞬变^[10,11]. 这一钙致钙释放过程是心肌细胞收缩的基础^[12,13].

在哺乳动物的心肌细胞中, 细胞周边的二联体

结构(由表面膜与肌质网形成的偶联结构)在胚胎发生的过程中已经形成^[14,15], 但横管的形态发生及横管与肌质网二联体结构的形成则发生较晚^[14,16]. 横管网络从出生后 7~10 天才开始出现^[14,17]. 到目前为止, 研究者提出过 2 种横管发育模式: 内陷模式与先偶联后融合模式^[14,17]. 在内陷模式中, 横管是由细胞膜逐渐内陷并延伸到细胞中心形成的. 肌质网独立于横管发育, 并随着横管延伸形成二联体结构. 在先偶联后融合模式中, 细胞内未与细胞膜连通的膜泡先与肌质网形成偶联, 然后再与细胞膜融合, 从而形成横管. 尽管对于横管形成的机制现在仍然存在争议, 但可以肯定, 与肌质网的偶联在横管形成过程中发挥了重要作用.

Junctophilin-2 (JP2) 是将肌质网与横管/细胞膜锚定在一起的结构蛋白, 它由横跨肌质网膜的疏水羧基端, 以及与细胞膜相互作用的胞质结构域组

引用格式: 韩晶, 吴昊迪, 王其伟, 等. 心肌细胞横管的形态发生: *Junctophilin-2* 的作用. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 738~744

英文版见: Han J, Wu H D, Wang Q W, et al. Morphogenesis of T-tubules in heart cells: the role of *junctophilin-2*. *Sci China Life Sci*, 2013, 56: 647~652, doi: 10.1007/s11427-013-4490-4

成^[15,18]. 越来越多的证据表明, JP2 对于横管-肌质网二联体结构的形成及钙质钙释放过程的正常进行非常重要^[19-24]. JP2 缺失的小鼠会在胚胎期死亡^[15]. 在心衰的心肌细胞中, JP2 表达量下降, 引起横管-肌质网偶联子密度的减少及细胞内钙释放过程的去同步化^[23,24].

虽然 JP2 对横管-肌质网偶联结构的形成很重要, 但对于它是否参与横管的形态发生过程这一问题目前仍然不清楚. 本研究检测了心肌细胞成熟过程中横管的形态及 JP2 表达量的变化, 并利用 RNA 干扰 (RNAi) 技术进一步研究 JP2 表达量下调对横管形态的影响.

1 材料与方法

1.1 大鼠心肌细胞的分离与病毒感染

使用之前报道的酶消化法分离不同日龄(出生后 15, 20, 30 和 60 天) Sprague-Dawley 大鼠的心室肌细胞^[25]. 简要流程如下: 腹腔注射氨基甲酸乙酯(1000 mg/kg)麻醉大鼠后, 迅速取出其心脏并将其置于 Langendorff 灌流装置上. 随后使用 II 型胶原酶灌流心脏分离心肌细胞. 将分离下的单个大鼠心肌细胞静置于台氏液中, 台氏液成分为(单位: mmol/L): 137 NaCl, 4.0 KCl, 1.0 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 10 葡萄糖及 10 HEPES, 并使用 NaOH 将 pH 调至 7.36.

在 RNAi 实验中, 将分离的 60 日龄大鼠的心肌细胞培养在 M199 培养基中, 置于含有 5% CO₂ 的恒温 37°C 培养箱中. 将包装有 JP2 靶向 shRNA 或无特异靶向的对照 shRNA 的腺病毒以最适感染复数加入培养基中以感染细胞. JP2 siRNA 的序列为: 5'-ACA CCGTCCTCATCTGTAT-3'; 对照序列为: 5'-TTCTC CGAACGTGTCACGT-3'. 实验组与对照组均在腺病毒感染 48 h 后进行成像与生化实验.

1.2 细胞膜染色与成像

使用终浓度为 1 μ mol/L 的细胞膜染料 di-8-ANEPPS(Sigma, 美国)对不同发育阶段的心肌细胞进行染色, 室温 30 min. 然后使用台氏液清洗细胞 3 次以除去残余的染料. 而在 JP2 RNAi 实验中, 培养的大鼠心肌细胞则采用另一种膜染料 RH237 (Invitrogen, 美国)进行染色. RH237 的母液浓度为 5 mmol/L, 溶解在 DMSO 中, 其使用浓度为 10 μ mol/L, 室温染色 5 min. 心肌细胞图像采集使用倒置的激光

共聚焦显微镜(LSM-710, Carl Zeiss, 德国), 采用氩激光器(488 nm)及 40 倍、1.3NA 的油镜完成.

1.3 蛋白质免疫印迹

在蛋白质裂解液中对不同日龄大鼠的心室肌组织匀浆并提取蛋白质. 每个样品上样量为 15 μ g, 经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后, 将蛋白质转移至 PVDF 膜上. 随后将 PVDF 膜与兔源 JP2 抗体(1:1000) 4°C 孵育过夜. JP2 抗体由北京奥维亚生物科技有限公司制作. 后加入 GAPDH-HRP 抗体(1:20000, 康成, 中国)和羊抗兔 IgG-HRP (1:1000, Thermo scientific, 美国)孵育, 化学发光试剂显色曝光并用扫描仪扫描. 蛋白质条带利用 Quantity One 软件(Bio-Rad, 美国)进行分析, 以 GAPDH 为内参对 JP2 进行标准化分析.

1.4 图像分析

横管图像使用交互数据语言(IDL) 5.5 按照之前报道的方法进行编程分析^[23,26]. 对横向与纵向延伸的横管分别定量分析. 使用快速傅里叶变换分析横管的排列, 采用能表征横管排列规律性的 power 值评估横管的发育.

1.5 统计分析

本研究中的所有数据均以 $\bar{x} \pm SE$ 的形式表示. 根据不同情况选择使用 One-way ANOVA 检验或 *t* 检验对数据进行比较分析. 当 $P < 0.05$ 时则认为差异显著.

2 结果

2.1 心肌细胞成熟过程中横管的形成

使用细胞膜染料 di-8-ANEPPS 对不同发育时期的心肌细胞进行染色, 通过激光共聚焦显微镜对细胞膜及横管成像. 根据之前的报道, 横管从出生后 7~10 天开始出现^[14,17], 因此主要对出生后 15~60 天的横管成熟过程进行观察(图 1A). 在出生后 15 天, 横管主要出现在细胞膜附近的区域, 在细胞中央区域只有少量横管. 到出生后 20 天, 横管开始向除了细胞核以外的整个胞内区域延伸. 在这一时期, 横管染色形成的横跨细胞的条纹清晰可见. 在出生后 30 和 60 天的心肌细胞中, 排列规律的横管网络在胞内广泛分布. 在上述心肌细胞成熟过程中, 横管在心

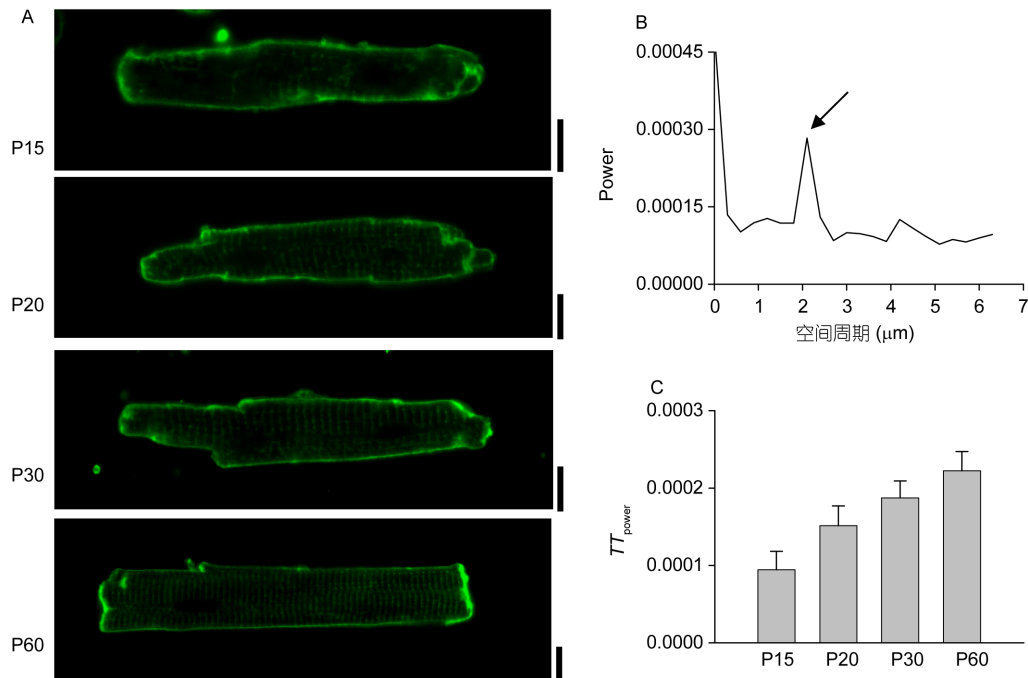


图1 心肌细胞成熟过程中横管排列的规律性

A: 急性分离的不同发育阶段的心肌细胞使用膜染料 di-8-ANEPPS 染色后成像. 标尺: 10 μm ; P15: 出生后 15 天; P20: 出生后 20 天; P30: 出生后 30 天; P60: 出生后 60 天. B: 快速傅里叶变换分析横管排列的空间周期. 在约 2 μm 处的 power 值定义为 TT_{power} , 表示横管排列的规律性. C: TT_{power} 在发育过程中逐渐增加. 每组 $N>15$ 来自 3 只实验动物; One-way ANOVA; $P<0.01$

肌细胞内的排列逐渐变得井然有序, 相邻横管间的距离约为 2 μm .

为了定量分析横管在发育过程中排列规律性的变化, 采用快速傅里叶变换的方法计算横管排列的空间周期^[23,26](图 1B). 分析后发现, 最显著的空间周期约为 2 μm (图 1B 中箭头所示), 这代表心肌细胞中相邻横管间的距离. 采用约 2 μm 处空间周期的 power 值(TT_{power})作为衡量横管排列的定量指标. 分析结果显示, TT_{power} 在心肌细胞成熟过程中逐渐增大 (图 1C). 在越晚的发育阶段, TT_{power} 值越高, 表明横管以更加规律的方式在细胞内排布.

在心肌细胞成熟过程当中, 大部分横管沿 Z 线横向延伸, 但也有少量横管会出现纵向延伸. 为了定量分析横管在成熟过程中的走向, 对其横向组分和纵向组分的密度分别进行测量. 方向不确定的点状信号(图 2A 中绿框所示)不被考虑在内. 结果显示, 与心肌细胞成熟过程中 TT_{power} 的增加同步, 横向组分的密度逐渐增加(图 2B), 纵向组分的密度逐渐减少(图 2C), 2 种组分的变化在出生 30 天后的心肌细胞中达到稳态. 这些发现表明, 横管排列的空间周期及

方向在心肌细胞成熟过程中都得到了统一.

2.2 JP2 表达量对横管形态的影响

JP2 是心肌细胞中连接肌质网和横管/细胞膜的结构蛋白^[15]. 为了阐明 JP2 在横管形态发生过程中可能发挥的作用, 通过蛋白免疫印迹方法对不同成熟阶段的大鼠心室肌组织中 JP2 的表达量进行定量分析(图 3A). 结果显示, JP2 蛋白的表达量在心肌细胞成熟过程中逐渐增加, 在出生后 30 天左右达到稳定水平(图 3B).

为了检验在心肌成熟过程中 JP2 表达量上升与横管形态变化之间的关系, 利用 RNAi 技术下调 JP2 的表达量, 进而研究其对横管形态造成的影响. 使用含有 JP2 靶向 shRNA 的腺病毒感染培养的、出生后 60 天的心肌细胞. 这些心肌细胞中的横管系统成熟, 空间排列规律, 横向组分比例远远高于纵向组分. 腺病毒载体中还含荧光蛋白 DsRed 的序列, 通过监测荧光蛋白的表达, 发现转染 48 h 后 90%以上的心肌细胞都被成功转染. 蛋白质免疫印迹分析的结果显示, 与对照相比, RNAi 组 JP2 蛋白的表达量下降了约

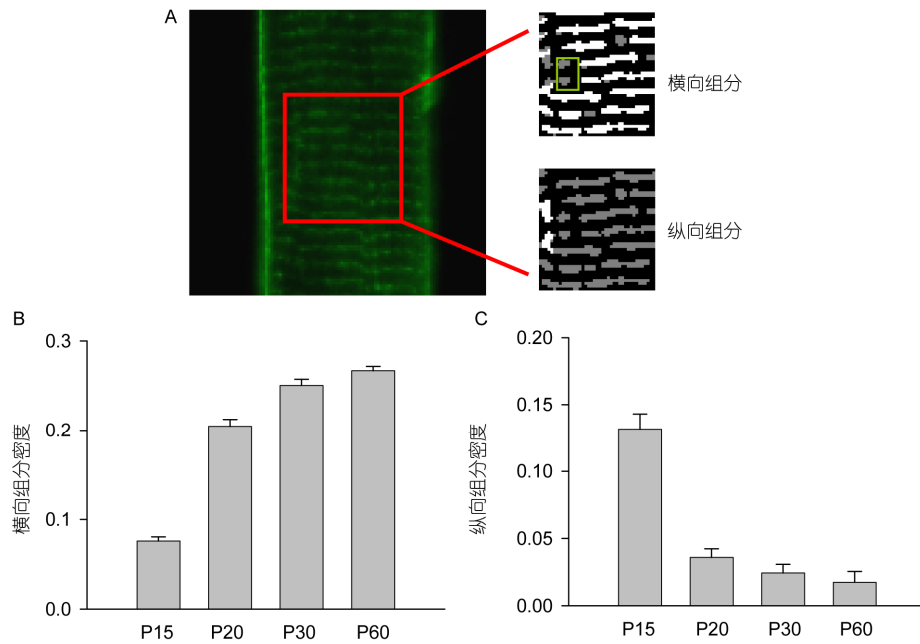


图 2 心肌细胞成熟过程中横管延伸方向的变化

A: 由膜染料标记的横管信号(左图)分为横向组分(右上)和纵向组分(右下)两部分。绿框中的点状信号方向无法确定, 不列入考虑范围; B: 横向组分的密度(即横向组分所占面积除以所选区域的面积)在心肌成熟过程中逐渐增加; C: 纵向组分的密度在心肌成熟过程中逐渐降低。每组 $N>15$ 来自 3 只实验动物; One-way ANOVA; $P<0.01$

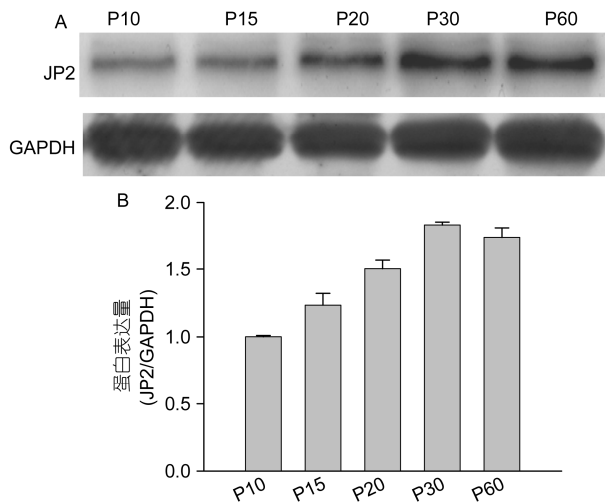


图 3 JP2 表达量在心肌细胞成熟过程中的变化

A: 使用蛋白免疫印迹的方法分析 JP2 蛋白的表达, 以 GAPDH 作为内参; B: JP2 蛋白表达水平在心肌细胞成熟过程中逐渐增加。每组 $N=3$ 来自 3 只实验动物; One-way ANOVA; $P<0.05$

40% (图 4A)。

为了避免与 DsRed 蛋白荧光的互相干扰, 使用另一种荧光染料 RH237 对细胞膜进行染色。发现在

培养的大鼠心肌细胞, JP2 敲减会引起横管结构的重塑(图 4B)。与对照组相比, JP2 敲减组横管结构紊乱、在细胞内排列不规律。使用基于快速傅里叶变换算法得到的 TT_{power} 定量分析横管的形态变化后发现, JP2 敲减组 TT_{power} 显著低于对照组(图 4C)。

接下来, 对横向组分和纵向组分在总横管中所占的比例进行定量分析。结果显示, 同对照组相比, JP2 敲减组横管的横向组分所占的比例明显降低(图 5A), 而纵向组分的比例显著升高(图 5B)。这些由 JP2 敲减所引起的横管形态变化与横管在成熟过程中的变化相反, 表明 JP2 对于心肌细胞中横管的形态发育非常重要。

3 讨论

在本研究中, 我们检测了横管形态及 JP2 表达在心肌细胞成熟过程中的变化, 并对两者之间的联系进行研究。在横管系统成熟过程中, 它以 $\sim 2 \mu m$ 为空间周期的特征越来越明显, 而且横向组分的比例越来越高。这些变化伴随着 JP2 表达量同步上升, 并且可以被 JP2 蛋白的敲减所逆转, 因此推测 JP2 蛋白的

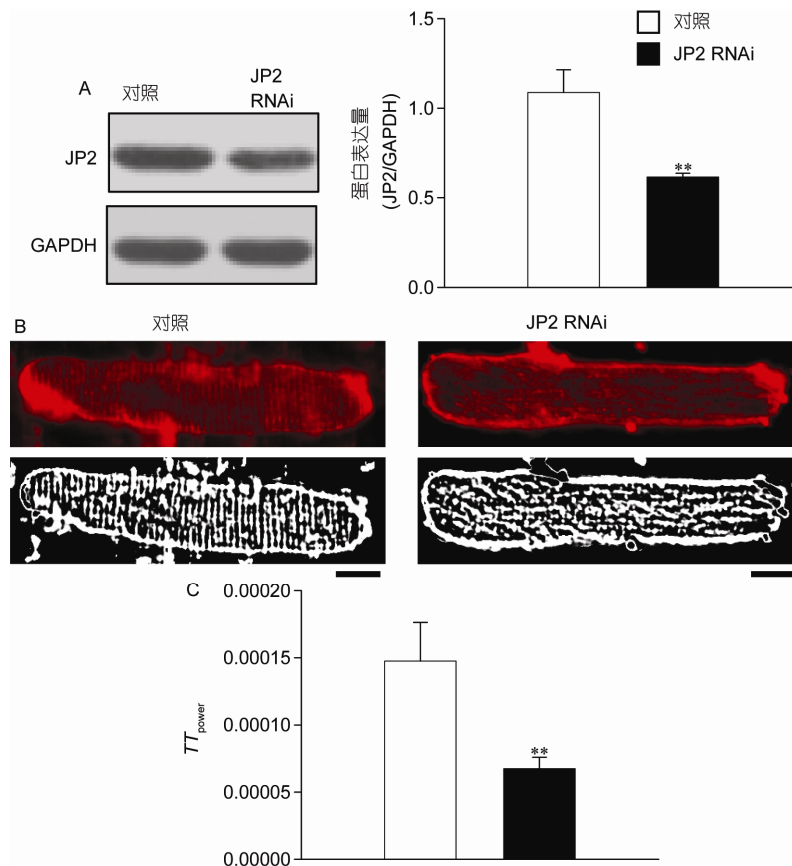


图4 在培养心肌细胞中, JP2 蛋白的敲减降低了横管排列的规律性

A: 蛋白免疫印迹分析 JP2 敲减组与对照组 JP2 蛋白的表达量. RNAi 组 JP2 蛋白表达量下降了约 40%. B: 对照组与 JP2 RNAi 组心肌细胞使用细胞膜染料 RH237 染色后成像, 标尺: 10 μm . 原始图下方显示的为高反差图像. C: JP2 表达量的下调降低了培养心肌细胞的 TT_{power} . 每组 $N>20$ 来自 3 只实验动物; t 检验; **: $P<0.01$

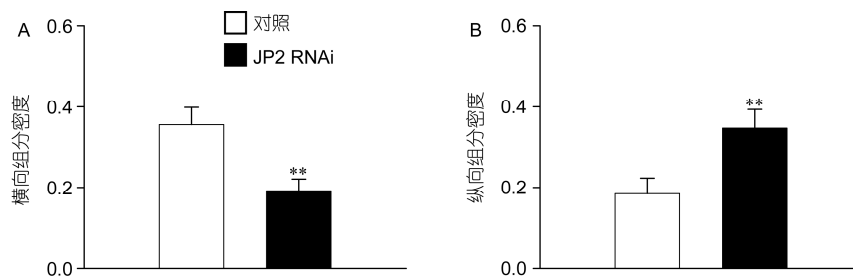


图5 JP2 表达量的下调改变了培养心肌细胞中横管的延伸方向

A: JP2 敲减降低了横管横向组分的比例; B: JP2 敲减增加了纵向组分的比例. 每组 $N>20$ 来自 3 只实验动物; t 检验; **: $P<0.01$

表达水平是影响心肌细胞横管形态成熟的一个重要因素.

在胚胎期和新生个体的心肌细胞中, 几乎检测不到横管的存在, 横管在出生后的前几周形成并逐渐发育^[14,17]. 从出生后 10~20 天是横管网络的快速生

长时期, 横管逐渐从细胞膜周边延伸到细胞内部. 本研究主要探讨横管在成熟过程中的变化, 因此主要对出生后 15~60 天横管的形态变化进行分析. 据本实验室所知, 这是首次对发育过程中横管的形态变化进行量化分析. 运用这种方法分析, 我们得出横管在

成熟过程中的 2 种形态变化: 1) TT_{power} 的增加, 反映了横管在成熟过程中逐渐定位到间距约为 $2\ \mu\text{m}$ 的 Z 线上; 2) 横管的纵向和横向组分此消彼长, 反映了横管逐渐沿着 Z 线方向延伸.

在哺乳动物心肌细胞中, 横管网络中只包含少量的纵向组分, 其余大部分都是与 Z 线平行的横向组分^[3,4]. 这种规则排列的横管系统对于动作电位发生时, 心肌细胞快速、同步的电兴奋及钙释放非常重要^[6]. 在 JP2 敲减的大鼠心肌细胞中, 横管的空间分布不规律, 其纵向组分所占比例增加, 而横向组分所占比例减少, 表明 JP2 参与横管的形态重塑过程. 之前的报道表明, JP2 与胚胎干细胞向心肌细胞的转化有关^[27]. HL-1 细胞中敲减 JP2 会引起肌细胞发生肥厚^[21]. 但是, 在培养的成年大鼠心肌细胞中敲减 JP2 并未对细胞形态产生明显影响, 细胞的长度和宽度都未发生变化^[24], 这与实验中所观察到的现象一致.

引言中提到横管形成的 2 种模式, 其中横管与肌质网的偶联都是重要的一步^[14,17]. 根据之前的报道, 肌质网末端定位到 Z 线附近这一事件的发生早于横管的形成^[17,28]. JP2 是横跨肌质网的蛋白, 它与细胞膜或膜蛋白的相互作用可能会在横管沿着肌质网终池的轨迹上生长发挥重要作用. 在这种情况下, 足量的 JP2 表达对保证横管与尽可能多的肌质网终池锚定很重要. 尽管肌质网与细胞膜偶联形成的周边二联体结构在出生前就已经形成^[15], 但在出生后的发育早期, JP2 表达量比较低, 分子数量比较少, 不足以将大量横管锚定在 Z 线附近. 随着心肌细胞的发育, JP2 表达量越来越多, 形成的横管-肌质网二联体结构也越来越多; 从而使得横管系统的排列更加规则, 兴奋收缩偶联功能便更加成熟. 因此, 在心肌细胞成熟阶段, JP2 蛋白的大量表达对规则排列的横管网络的形成非常重要.

参考文献

- Bers D M. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. 2nd ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001
- Forbes M S, Hawkey L A, Sperelakis N. The transverse-axial tubular system (TATS) of mouse myocardium: its morphology in the developing and adult animal. *Am J Anat*, 1984, 170: 143–162
- Brette F, Orchard C. T-tubule function in mammalian cardiac myocytes. *Circ Res*, 2003, 92: 1182–1192
- Soeller C, Cannell M B. Examination of the transverse tubular system in living cardiac rat myocytes by 2-photon microscopy and digital image-processing techniques. *Circ Res*, 1999, 84: 266–275
- Cartwright E J, Oceandy D, Austin C, et al. Ca^{2+} signalling in cardiovascular disease: the role of the plasma membrane calcium pumps. *Sci China Life Sci*, 2011, 54: 691–698
- Cheng H, Cannell M B, Lederer W J. Propagation of excitation-contraction coupling into ventricular myocytes. *Pflügers Arch*, 1994, 428: 415–417
- Song L S, Guatimosim S, Gomez-Viquez L, et al. Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1047: 99–111
- Franzini-Armstrong C, Protasi F. Ryanodine receptors of striated muscles: a complex channel capable of multiple interactions. *Physiol Rev*, 1997, 77: 699–729
- Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. Shape, size, and distribution of Ca^{2+} release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys J*, 1999, 77: 1528–1539
- Kimlicka L, van Petegem F. The structural biology of ryanodine receptors. *Sci China Life Sci*, 2011, 54: 712–724
- Lopez-Lopez J R, Shacklock P S, Balke C W, et al. Local calcium transients triggered by single L-type calcium channel currents in cardiac cells. *Science*, 1995, 268: 1042–1045
- Berridge M J, Bootman M D, Roderick H L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev*, 2003, 4: 517–529
- Bers D M. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*, 2002, 415: 198–205
- Di Maio A, Karko K, Snopko R M, et al. T-tubule formation in cardiac myocytes: two possible mechanisms? *J Muscle Res Cell M*, 2007, 28: 231–241
- Takeshima H, Komazaki S, Nishi M, et al. Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. *Mol Cell*, 2000, 6: 11–22
- Escobar A L, Ribeiro-Costa R, Villalba-Galea C, et al. Developmental changes of intracellular Ca^{2+} transients in beating rat hearts. *Am J Physiol*, 2004, 286: H971–H978
- Snopko R M, Ramos-Franco J, Di Maio A, et al. Ca^{2+} sparks and cellular distribution of ryanodine receptors in developing cardiomyocytes from rat. *J Mol and Cell Cardiol*, 2008, 44: 1032–1044

- 18 Nishi M, Mizushima A, Nakagawara K, et al. Characterization of human junctophilin subtype genes. *Biochem Bioph Res Co*, 2000, 273: 920–927
- 19 Garbino A, Wehrens X H. Emerging role of junctophilin-2 as a regulator of calcium handling in the heart. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31: 1019–1021
- 20 Hirata Y, Brotto M, Weisleder N, et al. Uncoupling store-operated Ca^{2+} entry and altered Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum through silencing of junctophilin genes. *Biophys J*, 2006, 90: 4418–4427
- 21 Landstrom A P, Kellen C A, Dixit S S, et al. Junctophilin-2 expression silencing causes cardiocyte hypertrophy and abnormal intracellular calcium-handling. *Circulation*, 2011, 4: 214–223
- 22 van Oort R J, Garbino A, Wang W, et al. Disrupted junctional membrane complexes and hyperactive ryanodine receptors after acute junctophilin knockdown in mice. *Circulation*, 2011, 123: 979–988
- 23 Wei S, Guo A, Chen B, et al. T-tubule remodeling during transition from hypertrophy to heart failure. *Circ Res*, 2010, 107: 520–531
- 24 Wu H D, Xu M, Li R C, et al. Ultrastructural remodelling of Ca^{2+} signalling apparatus in failing heart cells. *Cardiovasc Res*, 2012, 95: 430–438
- 25 Fu Y, Zhang G Q, Hao X M, et al. Temperature dependence and thermodynamic properties of Ca^{2+} sparks in rat cardiomyocytes. *Biophys J*, 2005, 89: 2533–2541
- 26 Song L S, Sobie E A, McCulle S, et al. Orphaned ryanodine receptors in the failing heart. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 4305–4310
- 27 Liang X, Mei Y, Huang X, et al. Junctophilin 2 knockdown interfere with mitochondrium status in ESC-CMs and cardiogenesis of ES cells. *J Cell Biochem*, 2012, 113: 2884–2894
- 28 Perez C G, Copello J A, Li Y, et al. Ryanodine receptor function in newborn rat heart. *Am J Physiol*, 2005, 288: H2527–H2540