



尿素通道蛋白 B 基因敲除对小鼠心电图 与心肌动作电位的影响

孟 艳^① 张学新^② 赵华山^① 郭丽荣^① 吕 斌^① 赵春燕^{②*}
赵雪俭^{①*} 杨宝学^{①③}

(① 吉林大学基础医学院 病理生理学教研室, 长春 130021; ② 吉林大学基础医学院 生理学教研室, 长春 130021;

③ Department of Medicine, University of California, San Francisco (UCSF), CA 94122-0521, USA)

摘要 尿素通道蛋白 B(UT-B)为介导尿素跨膜转运的通道蛋白,在肾脏和其他肾外组织,如红细胞、脑、心脏、膀胱和睾丸等组织、细胞中广泛表达。为探讨 UT-B 缺失对心脏表型的影响,应用 RT-PCR, Western blot 检测 UT-B mRNA, UT-B 蛋白在野生型小鼠(UT-B^{+/+})和 UT-B 基因敲除纯合子小鼠(UT-B^{-/-})心脏组织的表达情况,对比观察 6, 16, 52 周 UT-B 基因敲除纯合子(UT-B^{-/-})与野生型小鼠肢体 II 标准导联心电图,应用悬浮微电极法记录分离的 16 周小鼠心室肌细胞动作电位各参数变化。结果显示 UT-B 的 mRNA 和蛋白在 UT-B^{+/+}小鼠心脏有表达,而 UT-B^{-/-}小鼠无表达; UT-B^{-/-}小鼠 P-R 间期((43.5 ± 4.2), (45.5 ± 6.9), (43.8 ± 7.6)ms)明显长于 UT-B^{+/+}小鼠((38.6 ± 2.9), (38.7 ± 5.6), (38.2 ± 7.3)ms, $P < 0.05$),随增龄 P-R 间期无明显延长,但老龄组(52 周)II 度和 III 度房室传导阻滞发现率超过 20%;动作电位记录结果显示 UT-B^{-/-}小鼠的动作电位幅值(APA),动作电位最大除极速度($V_{\max}$)与 UT-B^{+/+}小鼠比较,前者明显受到抑制($P < 0.05$),其 APD₅₀, APD₉₀ 明显延长($P < 0.05$)。总之,本研究发现野生型小鼠心肌有 UT-B 表达, UT-B 基因敲除导致小鼠进展型心脏传导阻滞,提示 UT-B 在介导心肌电生理特性方面有重要作用。

关键词 尿素通道蛋白(urea transporter, UT) 基因敲除 心电图 小鼠 心肌动作电位

尿素通道蛋白(urea transporter, UT)是介导尿素顺浓度差跨膜转运的膜通道蛋白,目前至少克隆出了 7 种尿素通道蛋白(UT-A1~6, UT-B)^[1,2]。UT-B 在肾脏内髓的直小血管的内皮细胞高表达,参与尿浓缩机制,也在骨髓、心脏、脾、脑、睾丸等多种组织中表达^[3]。但对于它对肾外组织生理功能的调节的研究还很欠缺。Yang 等人^[4]建立了 UT-B 基因缺失小鼠,提供了第一个尿素通道蛋白缺失的动物模型。本研究应用 UT-B 基因缺失小鼠,对其心脏 UT-B 的表达情况、体表心电图和心室肌细胞的动作电位进行研究,探

讨 UT-B 对小鼠心脏生理功能的作用。

1 材料与方法

1.1 动物

UT-B 基因敲除小鼠由美国加州大学旧金山医学院医学系引进,遗传背景为 C57 小鼠,在本中心稳定繁殖、传代,通过基因组 DNA PCR 进行基因型鉴定。

1.2 RT-PCR 检测心肌 UT-B mRNA 表达

Trizol 一步法提取小鼠心脏总 RNA,逆转录成

cDNA. 25 μ L PCR 扩增体系内含 cDNA 1 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μ L, 25 pmol/L 的上下游引物各 2 μ L, 5 mmol/L 的 dNTP 1 μ L 和 2.5 U Taq DNA 聚合酶. 同时以 β -actin 作为内参对照. β -actin(引物: S, 5'-TTGTT ACCAA CTGGG ACG-3'; AS, 5'-GGCAT AGAGG TCTTT ACGG-3')和 *UT-B*(引物: S, 5'-CCACT CTGAC AGCCC TCTT-3'; AS, 5'-GATGA CACCC AGCAA CGA-3')扩增条件: 94 $^{\circ}$ C, 5 min 热启动; 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 45 s; 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. PCR 产物 10 μ L 于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 观察电泳行为图分析结果.

1.3 Western blot

取新鲜的成年雄鼠心肌组织 100 mg, 匀浆提取细胞总蛋白, Bio-Rad 蛋白检测试剂盒(BioRad, Richmond, CA)测定蛋白浓度, 100 $^{\circ}$ C 沸水加热变性后进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压 110 V), 电泳 90 min. 常规半干转膜(Gelman Scientific, Ann Arbor, MI)、封闭、杂交、显色, 一抗分别为兔抗小鼠 *UT-B* 蛋白抗体和兔抗小鼠 β -actin 蛋白抗体. 观察电泳行为图, 半定量分析.

1.4 小鼠体表心电图描记

随机选取 6, 16, 52 周 *UT-B*^{+/+} 小鼠和 *UT-B*^{-/-} 小鼠, 每组 20 只, 20% 氨基甲酸乙酯(2 g/kg 体重)腹腔注射麻醉小鼠, 待动物安静后, 取小鼠仰卧位固定于鼠板上. 电极连线分为红色(左下肢), 黄色(右上肢), 黑色(右下肢), 将针电极分别刺入其四肢皮下, 记录 II 标准导联的心电图, 应用 BL-420S 生物机能实验系统(四川成都泰盟科技有限公司)对记录的心电图进行分析.

1.5 小鼠心室肌细胞动作电位记录

开胸取 16 周小鼠心脏置于“Landendorff”的灌流架上, 以 5 mL/min 速度灌流正常的 Tyrode 液(NaCl 140.0 mmol/L, KCl 5.4 mmol/L, MgCl₂ 1.0 mmol/L, CaCl₂ 2.0 mmol/L, Hepes 5.0 mmol/L, Glucose 10.0 mmol/L, pH 7.4). 用多芯毛胚拉成的微电极内冲灌 3 mol/L KCl, 其电阻值为 10~20 M Ω , 应用悬浮微电极法通过 BL-420E+多功能生物信号记录分析系统记录心室肌细胞动作电位, 进行分析.

1.6 尿素水平检测

取雄性 16 周龄小鼠鼠尾血液, 离心获得血清, 同时取心脏组织用 PBS 清洗后匀浆, 应用自动生化

分析仪(美国加州大学临床化学实验室)测定血清及心脏组织匀浆液尿素水平.

1.7 小鼠心脏组织形态学观察

取雄性 16 周龄小鼠心脏组织经福尔马林固定 24 h, 石蜡包埋、切片后, 分别做苏木素-伊红(HE)染色, Masson 染色, 显微镜下观察拍照记录.

1.8 数据统计

数据采用 $\bar{X} \pm SD$ 表示, 各组之间的数值采用 *t* 检验和多因素方差分析进行比较分析, *P* < 0.05 为有显著性差异.

2 结果

2.1 *UT-B* 在小鼠心脏的基因与蛋白表达

(1) 小鼠心肌的 *UT-B* mRNA 表达: PCR 结果显示 *UT-B*^{+/+} 小鼠和 *UT-B*^{-/-} 小鼠的心脏均有 β -actin 表达(600 bp), *UT-B*^{+/+} 小鼠的心脏有 *UT-B* mRNA 表达(500 bp), 而 *UT-B*^{-/-} 小鼠的心脏中无 *UT-B* mRNA 表达(图 1), 说明 *UT-B* 基因敲除成功.

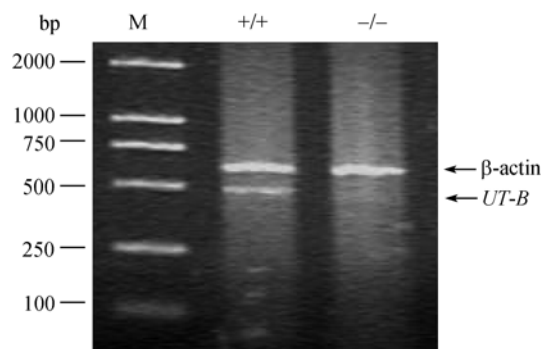


图 1 小鼠心脏中 *UT-B* mRNA 的表达

M 示 marker(DL2000); +/+ 示野生型小鼠; -/- 示 *UT-B* 基因敲除纯合子小鼠

(2) *UT-B* 蛋白在小鼠心肌的表达: Western blot 结果显示 2 种基因型小鼠心脏提取的总蛋白在 42 kD 的位置都有 β -actin 蛋白的表达, 只有 *UT-B*^{+/+} 小鼠的心肌组织中有 *UT-B* 蛋白的表达(46 kD), 而在 *UT-B*^{-/-} 小鼠无表达(图 2).

2.2 *UT-B* 基因敲除纯合子小鼠房室传导阻滞

II 标准导联心电图描记结果显示 *UT-B*^{-/-} 小鼠的 P 波时间、P-R 间期、QRS 波群的间期与 *UT-B*^{+/+} 小

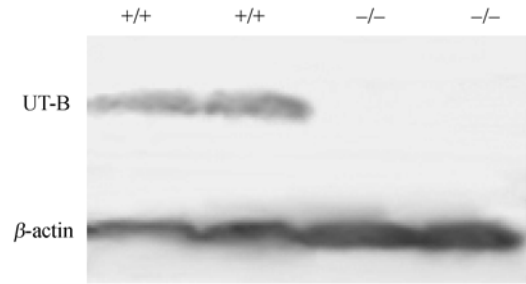


图 2 小鼠心脏中 UT-B 蛋白的表达
+/+示野生型小鼠; -/-示 UT-B 基因敲除纯合子小鼠

鼠之间没有明显差别, 但 UT-B^{-/-}小鼠的最大值与最小值范围都较 UT-B^{+/+}小鼠大, 变异度较大(表 1)。P-R 间期 UT-B^{-/-}小鼠明显延长。UT-B^{+/+}小鼠 6 周龄组为(38.6±2.9) ms, 16 周龄组为(38.7±5.6) ms, 52 周龄组为(38.2±7.3) ms; UT-B^{-/-}小鼠 3 个不同周龄组分别为(43.5±4.2), (45.5±6.9), (43.8±7.6) ms。心电图都显示 P-R 间期明显延长($P<0.05$), UT-B^{-/-}小鼠随龄增加 P-R 间期无明显变化, 但 52 周组小鼠 20%发生 II 度、III 度房室传导阻滞(图 3, 4), 呈现随年龄变化的进展型房室传导阻滞。

2.3 心室肌细胞动作电位

16 周 UT-B^{-/-}小鼠与 UT-B^{+/+}小鼠比较, 心室肌细胞动作电位幅值 APA((92.17±10.56) mV vs (110.51±10.38) mV)、动作电位最大除极速度 V_{max} ((101.89±9.54) mV/s vs (109.53±10.64) mV/s)受到抑制($P<0.05$), 而心室肌细胞动作电位复极 50% APD₅₀((123.83±11.17) ms vs (108.27±10.85) ms)、90%时程 APD₉₀

((195.43±16.41) ms vs (171.00±15.53) ms)明显延长($P<0.05$)。详细数据见表 2, 典型的心室肌细胞动作电位图形见图 5。

2.4 尿素水平

UT-B 缺失后, UT-B^{-/-}小鼠血清尿素水平(16.56±

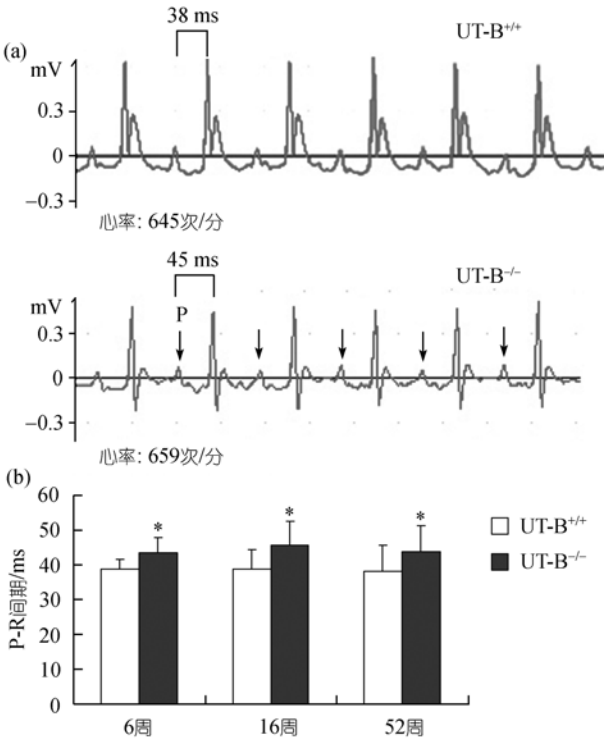


图 3 UT-B 敲除对小鼠心电图的影响
(a) UT-B^{+/+}小鼠和 UT-B^{-/-}小鼠 II 标准导联心电图比较。 (b) UT-B^{+/+}小鼠和 UT-B^{-/-}小鼠 P-R 间期($\bar{x}\pm SD$, $n=20$, *示与 UT-B^{+/+}组相比, $P<0.05$)

表 1 UT-B^{+/+}小鼠和 UT-B^{-/-}小鼠 II 标准导联心电图比较($\bar{x}\pm SD$)^{a)}

	N	心率/次·min ⁻¹	P-R 间期/ms	QRS/ms	P-R >45 ms	II 和 III 度房室传导阻滞
UT-B ^{+/+}						
6 w	20	643.18±53.88	38.6±2.9	11.5±0.7	0	0
16 w	20	634.23±65.42	38.7±5.6	11.6±1.4	1	0
52 w	20	672.01±113.75	38.2±7.3	11.1±2.2	2	0
UT-B ^{-/-}						
6 w	20	638.40±67.05	43.5±4.2*	11.0±0.9	6	0
16 w	20	631.62±52.78	45.5±6.9*	11.5±1.1	9	0
52 w	20	584.30±123.09 [#]	43.8±7.6*	11.2±2.3	8	4

a) *示与 UT-B^{+/+}组比较, $P<0.05$. # 示与 UT-B^{+/+}组和 6, 16, 52 周的 UT-B^{-/-}组比较, $P<0.05$

表 2 小鼠心室肌细胞动作电位参数比较($\bar{x}\pm SD$, $n=10$)^{a)}

	APA/mV	V_{max} /mV·s ⁻¹	APD10/ms	APD50/ms	APD90/ms
16w UT-B ^{+/+}	110.51±10.38	109.53±10.64	10.13±2.32	108.27±10.85	171.00±15.53
16w UT-B ^{-/-}	92.17±10.56*	101.89±9.54*	12.70±2.70	123.83±11.17*	195.43±16.41*

a) *示与 UT-B^{+/+}组比较, $P<0.05$

图 4 $UT-B^{-/-}$ 小鼠的典型心律失常心电图

(a) II 度房室传导阻滞; (b) III 度房室传导阻滞

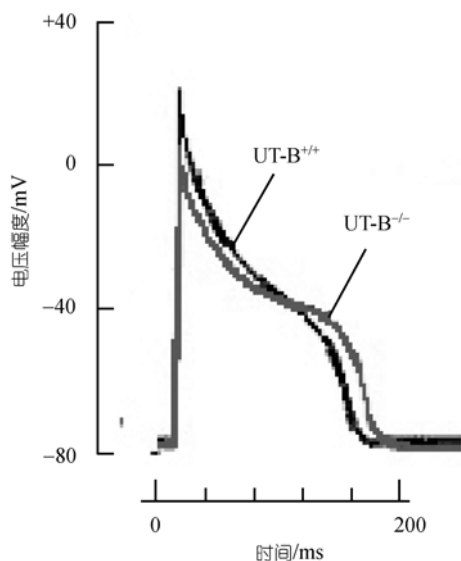


图 5 心室肌细胞动作电位

0.43) mmol/L 较 $UT-B^{+/+}$ 小鼠 (21.22 ± 1.13) mmol/L 明显升高 ($P < 0.05$), $UT-B^{-/-}$ 小鼠心脏组织尿素水平 (14.88 ± 1.11) mmol/L 也较 $UT-B^{+/+}$ 小鼠 (17.93 ± 1.38) mmol/L 明显升高 ($P < 0.05$). 说明 $UT-B^{-/-}$ 小鼠体内尿素滞留, 心脏组织也存在尿素蓄积 (图 6).

2.5 形态学观察

图 7 可见 $UT-B$ 缺失后, $UT-B^{-/-}$ 小鼠心脏组织形态结构及纤维分布与 $UT-B^{+/+}$ 小鼠没有明显区别.

3 讨论

小鼠 $UT-B$ 基因位于染色体 18E3, 具有 9 个外显子长 40.5 kb (GenBank 登录号 108052), 转录起始密码 ATG 位于外显子 2. 除了在红细胞膜上丰富的表达

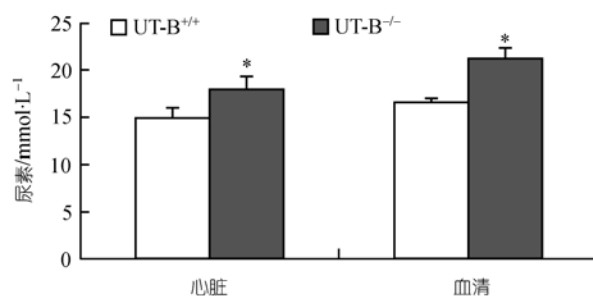
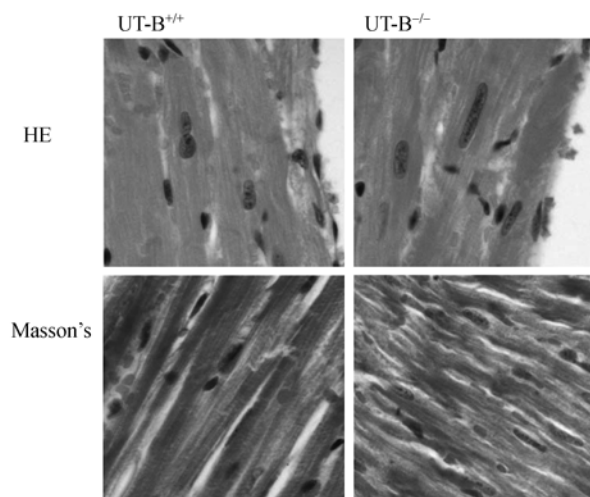
图 6 $UT-B$ 敲除对小鼠血清和心脏组织尿素水平的影响 $\bar{X} \pm SD$, $n=6$, * 示与 $UT-B^{+/+}$ 组相比, $P < 0.05$ 

图 7 心肌细胞 HE 染色及 Masson's 三色染色结果

外^[5], 还在肾脏和其他肾外组织中广泛分布^[3]. 人类红细胞膜上的 $UT-B$ 蛋白与 JK 抗原是同一种分子^[5]. 而 Jk_{null} 显型非常罕见, 有报道此类个体的尿浓缩功能有轻度降低^[6]. 人类 $UT-B$ 缺失对与其他各脏器功能的影响目前未见报道.

Yang 等人^[4]定向敲除外显子 4~7 构建了 $UT-B$ 基因敲除小鼠. 本研究应用该 $UT-B$ 基因敲除小鼠作为研究模型. 通过体表心电图检测, 发现 6, 16 和 52 周龄组 $UT-B^{-/-}$ 小鼠的 II 标准导联心电图的 P-R 间期较野生小鼠明显延长, 在 $UT-B$ 基因敲除的 52 周组小鼠有 20% 发生 II 度、III 度房室传导阻滞, 说明 $UT-B$ 基因缺失小鼠发生了进展型房室传导阻滞. P 波是 AP 在心房的传导时程, 而 QRS 波是 AP 在心室的传导时程, 本研究发现 P-R 间期延长, 说明心房激动通过房室交界区下传至心室的传导被延迟. 其机制可能是房室交界区发生病变影响激动传导, 也可能是心室肌细胞的兴奋性下降所致. 对心室肌的动作电位进行观察发

现UT-B^{-/-}小鼠的APA, Vmax明显受到抑制, APD₅₀, APD₉₀明显延长, 说明心室肌细胞的兴奋性、传导性均下降, 这可能是心电图上P-R间期延长的原因之一。本研究对心肌组织形态学进行了观察, UT-B基因敲除小鼠的心脏组织在光学显微镜下未见明显形态学变化, 心肌组织中间质胶原纤维也没有明显增生。因此UT-B缺失并未引起严重的心肌细胞病变和结构重塑。若进一步对其心脏传导系统进行研究, 可能发现UT-B缺失与房室传导阻滞机制间的联系。

尿素是蛋白质代谢的重要终产物。尿素生成不仅在肝脏, 也在许多能合成多胺的组织中, 如心脏、睾丸、脑等^[4]。尿素为高极性分子, 如果没有尿素通道蛋白, 尿素的跨膜速度非常慢。因此UT-B缺失小鼠肾直小血管的尿素通透性受阻, 导致尿浓缩能力下降 1/3^[4], 本研究发现其血中尿素浓度明显提高, 说明有尿素在小鼠体内滞留。慢性肾衰患者血中尿素浓度升高, 90%以上有心电图异常, 心律失常是尿毒症患者的常见并发症和死亡原因之一, 血液透析可明显降低心律失常的发生率, 提示尿毒症患者血中增加的尿素, 可能引起心律失常, 影响到心脏的电生理功能。本研究发现UT-B缺失小鼠伴随房室传导阻滞, 也可能与血中增高的尿素水平有关。

Timmer等人^[3]在大鼠心脏中, 用Western blot方法检测出 44, 70 和 98 kD 大小的UT-B蛋白的片段, 可能是不同的糖基化的结果。目前还没有其在心脏表达的准确定位。本研究首次在小鼠的心脏组织中检测到了UT-B mRNA和蛋白的表达。说明UT-B参与心脏组织的尿素转运。同时在心脏表达的还有UT-A蛋白。尿毒症、高血压等诱发人和大鼠的左心室肥大时, UT-A表达峰度明显增高, 在末期衰竭时人类心肌肥大伴随着多胺合成增加, 心脏 51 kD 和 56 kD UT-A蛋白峰度明显增高^[7]。因为尿素是精氨酸转化鸟氨酸的产物, Sands等人^[1]假设心脏可能需要尿素通道蛋白排出细胞内产生的尿素。本研究发现当UT-B缺失后, 心脏组织尿素水平明显升高, 说明有尿素在心脏组织蓄积。Weisensee 等人^[8]用血液透析病人血清, 体外灌注培养鼠心肌细胞时发现, 尿素可

降低培养心肌细胞的收缩性, 诱发心肌细胞的不同步收缩, 且随其浓度的增加, 对心肌抑制作用增强。张木兰等人^[9]也报道说随尿素氮浓度增高, Q-T间期延长、心室肥厚、及各种传导阻滞等心电图改变程度成正比增加。也有研究显示体内尿素可抑制巨噬细胞中一氧化氮的合成和降低诱导性一氧化氮合酶(iNOS)的活性, 而NO水平与心血管系统的功能密切相关^[10]。因此改变心脏的UT-A或UT-B表达水平可能通过增高的尿素含量直接或间接影响NO水平而作用于心脏, 引起心肌兴奋性和传导性的生理学改变。

对 UT-B 基因敲除小鼠的心脏形态、功能进行深入研究, 将为相关疾病的确诊、治疗和预防提供理论依据。

参 考 文 献

- 1 Sands J M. Molecular mechanisms of urea transport. *J Membr Biol*, 2003, 191(3): 149—163[DOI]
- 2 Yang B, Bankir L. Urea and urine concentrating ability: New insights from studies in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288(5): F881—896[DOI]
- 3 Timmer R T, Klein J D, Bagnasco S M, et al. Localization of the urea transporter UT-B protein in human and rat erythrocytes and tissues. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(4): C1318—1325
- 4 Yang B, Bankir L, Gillespie A, et al. Urea-selective concentrating defect in transgenic mice lacking urea transporter UT-B. *J Biol Chem*, 2002, 277(12): 10633—10637[DOI]
- 5 Lucien N, Sidoux-Walter F, Roudier N, et al. Antigenic and functional properties of the human red blood cell urea transporter hUT-B1. *J Biol Chem*, 2002, 277(37): 34101—34108[DOI]
- 6 Lucien N, Sidoux-Walter F, Olives B, et al. Characterization of the gene encoding the human Kidd blood group/urea transporter protein. Evidence for splice site mutations in Jknull individuals. *J Biol Chem*, 1998, 273(21): 12973—12980[DOI]
- 7 Duchesne R, Klein J D, Velotta J B, et al. UT-A transporter protein in heart - increased abundance during uremia, hypertension, and heart failure. *Circul Res*, 2001, 89(2): 139—145
- 8 Weisensee D, Low-Friedrich I, Riehle M, et al. *In vitro* approach to 'uremic cardiomyopathy'. *Nephron*, 1993, 65(3): 392—400
- 9 张木兰, 李颖军, 孙英贤, 等. 尿毒症性心脏病: 附 93 病例分析. *吉林医学*, 1993, 14(4): 212—213
- Moeslinger T, Spieckermann P G. Urea-induced inducible nitric oxide synthase inhibition and macrophage proliferation. *Kidney Int Suppl*, 2001, 78:S2—8[DOI]