

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.19.010

TLR4 在四氯化碳诱导的肝硬化大鼠骨髓血窦内皮细胞的表达 *

赵 松¹ 李玉军² 宋武琦² 田蓝天¹ 刘连新¹ 张伟辉¹ 付英梅^{2△}

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院普外科 黑龙江 哈尔滨 150001;

2 哈尔滨医科大学微生物学教研室 黑龙江省感染与免疫重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要 目的:检测 Toll 样受体 4(TLR4)在四氯化碳诱导的肝硬化大鼠骨髓血窦内皮细胞的表达,为进一步研究肝硬化时骨髓损伤的发生机制提供实验依据。**方法:**选择 Wistar 大鼠给予腹腔注射 CCl₄,一周两次,建立肝硬化大鼠模型。分别于建模 8 周和 12 周检测大鼠血浆内毒素的水平,免疫组化检测大鼠骨髓血窦内皮细胞上 TLR4 的表达情况,RT-PCR 测定骨髓组织中 TLR4 mRNA 的表达,分析 TLR4 的表达与内毒素血症间的关系。**结果:**给予 CCl₄ 8 周和 12 周时,对照组大鼠血浆内毒素水平分别为(0.216±0.024) Eu/ml 和(0.133±0.022) Eu/ml,模型组大鼠血浆内毒素水平分别为(0.626±0.021) Eu/ml 和(0.725±0.031) Eu/ml,分别较对照组显著升高,差异均有统计学意义(P<0.001);骨髓血窦内皮细胞 TLR4 蛋白表达及骨髓组织中 TLR4 mRNA 的表达均显著高于对照组,差异均有统计学意义(P<0.05)。大鼠骨髓 TLR4 蛋白和 mRNA 表达与血浆内毒素水平均呈显著正相关(r=0.841, 0.803, P 均<0.001)。**结论:**CCl₄ 诱导的肝硬化大鼠骨髓血窦内皮细胞 TLR4 表达升高,并伴随大鼠内毒素血症的发生,提示肝硬化时肠源性内毒素血症可能参与了骨髓的造血功能的损害和病变。

关键词:肝硬化;骨髓;Toll 样受体 4

中图分类号:R-33, R575.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)19-3638-04

The Expression of TLR4 in Bone Marrow Sinusoidal Endothelial Cells of CCl₄ Induced Liver Fibrosis in Rats*

ZHAO Song¹, LI Yu-jun², SONG Wu-q², TIAN Lan-tian¹, LIU Lian-xin¹, ZHANG Wei-hui¹, FU Ying-mei^{2△}

(1 Dept. of General Surgery of First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 Dept. of Microbiology, Heilongjiang Provincial Key Laboratory for Infection and Immunity,

Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the TLR4 expression on bone marrow endothelial cells and serum endotoxin level in rats with liver fibrosis, and provide experimental basis for the research on the mechanisms of bone marrow damage in liver cirrhosis. **Methods:** Wistar rats were intraperitoneally injected with carbon tetrachloride (CCl₄) twice a week for 8 to 12 weeks to induce liver fibrosis. Serum endotoxin level was assayed and TLR4 expression in bone marrow sinusoidal endothelial cells was detected by immunohistochemistry (IHC). The mRNA level of TLR4 in bone marrow was examined by semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** The serum endotoxin levels were 0.216±0.024 Eu/ml and 0.133±0.022 Eu/ml in rat with liver cirrhosis induced for 8 weeks and 12 weeks, respectively (P<0.001). IHC examination revealed increased expression of TLR4 on bone marrow sinusoidal endothelium of the cirrhotic rats, compared with the control (P<0.01). mRNA levels of TLR4 on bone marrow tissues from cirrhotic rats were also higher than that from the control (P<0.05). The TLR4 protein and mRNA expression in bone marrow tissue were significantly correlated with the serum endotoxin level (r=0.841, 0.803, both P<0.001). **Conclusion:** With the development of endotoxemia, TLR4 was upregulated on bone marrow sinusoidal endothelial cells in cirrhotic rats induced by CCl₄, which indicated that intestinal endotoxemia might contribute to the bone marrow functional lesions.

Key words: Liver cirrhosis; Bone marrow; TLR4

Chinese Library Classification: R-33, R575.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)19-3638-04

前言

肝硬化患者常合并外周血细胞计数降低^[1,2],目前研究认为脾脏淤留和破坏等因素是其发生的主要原因。骨髓血窦内皮细胞是造血微环境重要组成部分,参与造血支持和造血调控,是造血干细胞出髓和归巢的“门户”,在骨髓造血过程中具有不可

替代的作用。因此,骨髓血窦内皮细胞的损伤或功能异常会直接破坏骨髓造血微环境的稳定和完整性,影响骨髓造血功能。我们前期的研究发现,肝硬化患者和动物模型中,骨髓血窦内皮细胞的超微结构发生改变,并伴随炎症因子和选择素家族的高表达^[3]。肝硬化时,肠黏膜功能受损^[4],可伴发肠源性内毒素(LPS)血症,引致全身炎症反应综合征和多脏器功能损伤^[5]。

* 基金项目:黑龙江省教育厅资助项目(11521190)

作者简介:赵松(1971-),男,副教授,主要研究方向:肝硬化的基础和临床,电话:18804635075, E-mail: zhaosong998@126.com

△ 通讯作者:付英梅, E-mail: yingmeifu@foxmail.com

(收稿日期:2014-02-15 接受日期:2014-03-12)

Toll 样受体家族 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类跨膜蛋白, 能识别微生物抗原进而通过细胞内信号传递激活免疫应答, 是抵御感染性疾病的第一道屏障。其中, TLR4 能特异识别脂多糖(LPS), 是参与 LPS 信号转导的主要受体^[6]。研究已发现 TLR4 在多种血管内皮细胞病变中参与血管损伤性炎症因子的招募和富集^[7], 但 TLR4 是否参与肝硬化骨髓内皮细胞损伤, 目前并不清楚。四氯化碳(CCl₄)诱导的大鼠肝硬化模型在肝硬化发生相关的组织学、生物化学、细胞和分子改变等方面与人肝硬化相似^[8]。本研究通过 CCl₄ 诱导大鼠肝硬化模型, 旨在检测 TLR4 在骨髓中的表达情况, 为进一步研究 TLR4 信号在肝硬化时骨髓损伤机制中的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型建立和分组

健康雄性 Wistar 大鼠, 体重(200±20) g, 购自中国科学院上海实验动物中心, 许可证号: SCXK(沪)2003~0003, 在哈尔滨医科大学实验动物中心饲养、造模及观察。将所有大鼠随机分为对照组(8只)、8周 CCl₄ 模型组(10只)和 12周 CCl₄ 模型组(10只)。模型组参考 Kim 等的方法^[9], 以 50%的 CCl₄ 花生油溶液 1 mL/kg 剂量腹腔注射, 每周两次, 共 8周和 12周, 对照组给予花生油腹腔注射和含苯巴比妥钠饮用水。大鼠于分别在造模后第 8、12周末给予 10%水合氯醛 3 mL/kg 麻醉后处死。无菌操作留取肝组织和骨髓组织, 切取部分组织常规病理固定和切片, 其余组织 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2 肝组织学观察

肝组织石蜡切片, 常规方法进行 HE 染色和 Masson 染色, 观察并判定肝组织纤维程度的组织学分期^[9]。

1.3 免疫组织化学染色检测骨髓组织中 TLR4 的表达

中性甲醛固定肋骨组织常规脱钙、石蜡包埋, 2 μm 连续切片, 用免疫组化 Envision 二步法检测 TLR4 表达, DAB 显色。兔抗大鼠 TLR4 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。阴性对照以 PBS 代替一抗; 阳性对照为公司提供已知阳性切片。应用 Image-Pro Plus 6.0 医学图像采集分析系统进行定量分析。每份标本的上、中、下极各随机选取 5 个视野, 在相同条件下测定组织中棕黄色颗粒的累积光密度(IOD)值, 用其平均值反映 TLR4 的表达量。

1.4 RT-PCR 检测骨髓组织中 TLR4 的 mRNA 表达

100 mg 大鼠骨髓组织加入 Trizol 试剂, 研磨匀浆后提取总

RNA, -80℃ 保存备用。RT-PCR 检测 TLR 所用引物, 上游引物 GCCGAAAGTTATTGTGGTGGT, 下游引物 ATGGGTTT-TAGGCGCAGAGTTT, 扩增产物 356bp。扩增 β-actin 的上下游引物序列分别是 AGGGAAATCGTGCGTGAC 和 CTGGAAG-GTGGACAGTGAG, 扩增产物 444 bp。

1.5 大鼠血液标本的采取和血浆内毒素的检测

大鼠开腹手术时, 经下腔静脉取血约 2 mL, 放入抗凝管, 采用血细胞计数仪检测血常规。无菌、无热原污染条件下经腹主动脉取血 3 mL, 离心取上层血浆, 无菌 -80℃ 冰箱保存。血浆内毒素含量采用鲎试剂定量检测法测定。

1.6 统计学处理

实验数据以均数±标准差表示, 用 SPSS16.0 统计软件进行处理, 组间比较采用单因素方差分析, 用 Pearson 相关检验分别对大鼠骨髓中 TLR4 蛋白和 mRNA 表达与血浆内毒素水平的关系进行相关性分析, P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝组织的结构形态比较

对照组肝组织结构清晰, 肝细胞完整, 排列整齐, 肝组织无病变, 肝小叶结构正常, 肝细胞索结构规整, 无异常纤维增生。模型组给予 CCl₄ 8周时部分大鼠出现肝硬化, 给药 12周时全部出现明显肝硬化, 部分动物腹腔内有腹水; MASSON 染色显示汇管区扩大, 胶原纤维增生显著, 增生的纤维自中央静脉或汇管区向外延伸分割肝小叶。模型组除形成假小叶外, 部分肝细胞脂肪变性。在肝硬化模型的建立过程中, 肝脏纤维化程度逐渐增强(对照组 <8周模型组 <12周模型组)。

2.2 各组大鼠血浆内毒素水平的比较

给予 CCl₄ 8周和 12周时, 对照组大鼠血浆内毒素水平分别为(0.216±0.024) Eu/ml 和(0.133±0.022) Eu/ml, 模型组大鼠血浆内毒素水平分别为(0.626±0.021) Eu/ml 和(0.725±0.031) Eu/ml, 分别较对照组显著升高, 差异均有统计学意义(P<0.001)。

2.3 各组大鼠骨髓血窦内皮细胞 TLR4 表达的比较

对照组大鼠骨髓内皮细胞未见阳性染色, 累积光密度(IOD)值为(53.16±17.94)。CCl₄ 造模 8周, 可见骨髓内皮细胞少量灶性染色, 累积光密度(IOD)值为(167.78±61.35); 造模 12周, 可见骨髓血窦内皮细胞 TLR4 呈灶性强阳性染色, 累积光密度(IOD)值为(206.56±50.23), 均较对照组显著升高, 差异有统计学意义(P<0.01), 见图 1。

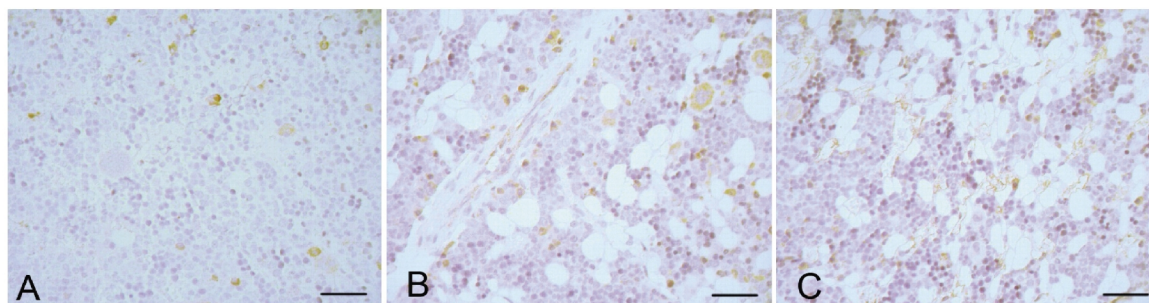


图 1 免疫组化检测各组大鼠骨髓血窦内皮细胞 TLR4 表达的比较(×400)

Fig. 1 Comparison of the TLR4 expression in the liver sinusoidal endothelial cells of bone marrow among rats from different groups detected by immunohistochemistry(×400)

A. 对照组大鼠骨髓血窦内皮细胞未见 TLR4 阳性染色(标尺: 60 μm)。B. CCl₄ 建模 8 周大鼠骨髓血窦内皮 TLR4 表达, 骨髓血窦内皮细胞见 TLR4 灶性染色(标尺: 50 μm)。C. CCl₄ 建模 12 周大鼠骨髓血窦内皮 TLR4 表达, 骨髓血窦内皮细胞见 TLR4 灶性强阳性染色(标尺: 50 μm)。
A. Bone marrow sinusoidal endothelial cells from control rats, no positive staining(scale bar: 60 μm). B. CCl₄ injection for 8 weeks, focal staining on sinusoidal endothelial cells(scale bar: 50 μm). C. CCl₄ injection for 12 weeks, focal strong positive staining(scale bar: 50 μm).

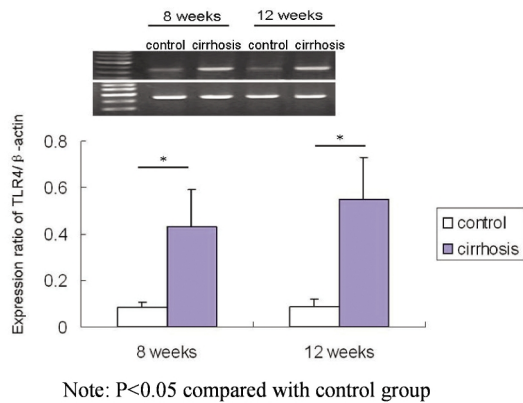


图2 各组大鼠骨髓组织 TLR4 mRNA 表达的比较

Fig. 2 Comparison of the TLR4 mRNA expression in the bone marrow among rats from different groups detected by RT-PCR

Note: P<0.05 compared with control group

2.4 各组大鼠骨髓组织 TLR4 mRNA 表达的比较

TLR4 mRNA 在对照组的表达强度较低, CCl₄ 造模 8 周及 12 周时, 大鼠骨髓组织 TLR4 mRNA 的表达均较对照组显著增强, 差异均有统计学意义(P<0.05), 见图 2。

2.5 大鼠骨髓组织 TLR4 表达与血浆内毒素水平的相关性分析

采用 Pearson 相关分析, 对大鼠骨髓 TLR4 蛋白表达强度、mRNA 相对表达量和血浆内毒素水平做相关性检验, 结果显示骨髓内皮细胞 TLR4 蛋白与血浆内毒素水平呈高度正相关($r=0.841, P<0.001$), 骨髓组织 mRNA 相对表达量与血浆内毒素水平也呈高度正相关($r=0.803, P<0.001$)。

3 讨论

肝硬化患者常合并外周血细胞计数异常^[10], 部分患者脾切除后外周血细胞计数异常仍无改善^[11]。研究发现肝硬化患者骨髓造血组织存在不同程度的脂肪化、纤维化和病态造血等病理学改变^[12, 13], 提示外周血细胞减少的原因除了脾亢进导致的脾脏滞留、血细胞破坏外, 可能与骨髓发生病变、影响造血功能有关。

骨髓血窦内皮细胞是造血微环境重要组成部分, 参与造血支持和调控, 其损伤或功能异常直接影响骨髓造血微环境的稳定和完整性。我们以往的研究发现, 肝硬化患者和动物模型中, 骨髓血窦内皮细胞过度活化, 内皮细胞损伤标志物 E- 选择素、P- 选择素等表达上调, 并伴有骨髓血窦内皮细胞和造血干细胞超微结构的改变^[3]。

肝硬化患者抵抗力低下, 极易并发感染和肠源性内毒素血症, 而内毒素(LPS)是导致内皮细胞损伤的重要因素之一^[14]。TLR4 作为 LPS 的识别受体, 通过信号传导参与细胞和组织损伤的发生。研究发现, 肝硬化患者和动物模型的外周血和肝脏组织中都有 TLR4 表达的升高, 并且, TLR4 的表达水平与肝硬化的严重程度和血浆 LPS 的含量正相关^[15-17], 反映了 TLR4 参与肝硬化组织损伤中的作用。

骨髓血窦内皮细胞特殊的解剖学定位使其成为髓-血屏障的主要结构^[20], 骨髓造血血窦与肝血窦的解剖结构相近。肝硬化时, 内毒素可随体循环进入骨髓造血血窦。因此, TLR4 在内皮细胞的表达情况可反映血液中 LPS 对内皮系统的影响程度。本研究建立的大鼠肝硬化模型, CCl₄ 诱导后 8 周

至 12 周均伴有内毒素血症的发生, 与以往报道相同^[18, 19]。CCl₄ 造模 8 周时, 骨髓血窦内皮细胞即可见 TLR4 灶性强阳性表达, 至造模 12 周时, 大鼠骨髓内 TLR4 的表达明显升高。相关性分析结果显示, 骨髓中 TLR4 蛋白和 mRNA 的水平与血浆内毒素呈正相关, 说明随着肝硬化进展和内毒素血症的加重, LPS 对骨髓血窦内皮细胞的攻击也随之增加。这些证据提示, 肝硬化时内毒素血症可引发骨髓内 TLR4 表达升高, TLR4 可能参与了骨髓血窦内皮细胞和造血微环境的损伤, 影响骨髓的正常造血功能。肝硬化患者骨髓造血组织存在不同程度的脂肪化、纤维化、肉芽肿及浆细胞异常增多和病态造血等病理学改变。LPS 信号系统在骨髓血窦内皮细胞上述损伤中的具体作用, 值得进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Ikura Y, Ohsawa M, Okada M, et al. The significance of platelet consumption in the development of thrombocytopenia in patients with cirrhosis [J]. *Am J Med Sci*, 2013, 346(3): 199-203
- [2] Rahimi RS, Rockey DC. End-stage liver disease complications [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2013, 29(3): 257-263
- [3] Zhao S, Fu YM, Li XF, et al. Alterations of bone marrow sinusoidal endothelium in rat and patients with liver cirrhosis [J]. *Dig Dis Sci*, 2010, 55(3): 654-661
- [4] Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Tsiaoussis GI, et al. Intestinal mucosal proliferation, apoptosis and oxidative stress in patients with liver cirrhosis [J]. *Ann Hepatol*, 2013, 12(2): 301-307
- [5] 陆伦根. 内毒素受体、内毒素血症与肝硬化[J]. *胃肠病学*, 2007, 12(7): 385-386
Lu Lun-gen. Endotoxin receptors, endotoxemia and liver cirrhosis [J]. *Gastroenterology*, 2007, 12(7): 385-386
- [6] Hackam DJ, Good M, Sodhi CP. Mechanisms of gut barrier failure in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors throw the switch [J]. *Semin Pediatr Surg*, 2013, 22(2): 76-82
- [7] Sikorski K, Chmielewski S, Olejnik A, et al. STAT1 as a central mediator of IFN γ and TLR4 signal integration in vascular dysfunction [J]. *JAKSTAT*, 2012, 1(4): 241-249
- [8] Liedtke C, Luedde T, Sauerbruch T, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects [J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2013, 6(1): 19
- [9] 中华肝脏病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. *中华肝脏病杂志*, 2002, 10(5): 327-328
Hepatic Fibrosis Study Group of Chinese Liver Diseases. Association Consensus on evaluation of the diagnosis and efficacy of hepatic fibrosis [J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2002, 10(5): 327-328
- [10] Forties SJ, Russo FP, Rey V, et al. A significant proportion of myofibroblasts are of bone marrow origin in human liver fibrosis [J]. *Gastroenterology*, 2004, 126(4): 955-963
- [11] 张伟辉, 赵松, 付英梅, 等. 肝硬化门静脉高压症患者脾切除术后血细胞数减少的病因分析 [J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(18): 1285-1286
Zhang Wei-hui, Zhao Song, Fu Ying-mei, et al. Causal analysis of hypocytosis in liver cirrhosis patients with portal hypertension after splenectomy [J]. *National Medical Journal of China*, 2005, 85(18): 1285-1286
- [12] 朴云峰, 林英, 高普军, 等. 肝硬化脾功能亢进患者骨髓病理的某些特点 [J]. *临床肝胆病杂志*, 1996, 12(1): 31-32
Piao Yun-feng, Lin Ying, Gao Pu-jun, et al. Pathological features of

- bone marrow in liver cirrhosis patients with hypersplenism [J]. Chinese Journal of Clinical Hepatology, 1996, 12 (1): 31-32
- [13] Ikura Y, Ohsawa M, Okada M, et al. The significance of platelet consumption in the development of thrombocytopenia in patients with cirrhosis[J]. Am J Med Sci, 2013, 346(3): 199-203
- [14] Wang W, Deng M, Liu X, et al. TLR4 activation induces nontolerant inflammatory response in endothelial cells[J]. Inflammation, 2011, 34 (6): 509-518
- [15] 朱冬芳, 晏春根, 谢青, 等. 肝硬化患者外周血单个核细胞 TLR4 表达及其基因多态性的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(9): 1859-1860
- Zhu Dong-fang, Yan Chun-gen, Xie Qing, et al. Expression and gene-polymorphisms of Toll-like receptor 4 in the peripheral blood mononuclear cells of liver cirrhotic patients [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2008, 24(9): 1859-1860
- [16] Jazaeri F, Tavangar SM, Ghazi-Khansari M, et al. Cirrhosis is associated with development of tolerance to cardiac chronotropic effect of endotoxin in rats[J]. Liver Int, 2013, 33(3): 368-374
- [17] Benias PC, Gopal K, Bodenheimer H Jr, Theise ND. Hepatic expression of toll-like receptors 3, 4, and 9 in primary biliary cirrhosis and chronic hepatitis C [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2012, 36 (5): 448-454
- [18] Liu J, Zhang Z, Gao J, et al. Downregulation effects of beta-elemene on the levels of plasma endotoxin, serum TNF-alpha, and hepatic CD14 expression in rats with liver fibrosis[J]. Front Med, 2011, 5(1): 101-105
- [19] Zhang W, Gu Y, Chen Y, et al. Intestinal flora imbalance results in altered bacterial translocation and liver function in rats with experimental cirrhosis [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2010, 22(12): 1481-1486
- [20] Himburg HA, Harris JR, Ito T, et al. Pleiotrophin regulates the retention and self-renewal of hematopoietic stem cells in the bone marrow vascular niche [J]. Cell Rep, 2012, 2(4): 964-975

(上接第 3637 页)

- [3] 宋浩亮, 陈士林, 梅学仁, 等. 葛根素口服制剂抗心肌缺血及对心肌细胞的保护作用[J]. 中草药, 2003, 34(12): 1104-1107
- Song Hao-liang, Chen Shi-lin, Mei Xue-ren, et al. Protective effect of Puerarin Oral Formulation on myocardial ischemia in rats and on cardiomyocytes of neonatal rats during hypoxia [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2003, 34(12): 1104-1107
- [4] Zhang H, Zhang L, Zhang Q, et al. Puerarin: a novel antagonist to inward rectifier potassium channel (I_{K1}) [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 352(1-2): 117-123
- [5] 陈美烟, 李洪, 张建成. 心脏钾通道各离子流之间的相互作用[J]. 中国心脏起搏与心电生理杂志, 2013(3): 263-265
- Chen Mei-yan, Li Yang, Zhang Jian-cheng. The interaction among the cardiac ionic currents of potassium channels [J]. Chinese Journal of Cardiac Pacing and Electrophysiology, 2013, (3): 263-265
- [6] Andersen MN, Olesen SP, Rasmussen HB. Kv7.1 surface expression is regulated by epithelial cell polarization[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 300(4): C814-C824
- [7] Ishii K, Norota I, Obara Y. Endocytic regulation of voltage-dependent potassium channels in the heart [J]. J Pharmacol Sci, 2012, 120(4): 264-269
- [8] Luo X, Xiao J, Lin H, et al. Genomic structure, transcriptional control, and tissue distribution of HERG1 and KCNQ1 genes[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(3): H1371-H1380
- [9] Barhanin J, Lesage F, Guillemare E, et al. K (V) LQT1 and IsK (minK) proteins associate to form the I (Ks) cardiac potassium current[J]. Nature, 1996, 384(6604): 78-80
- [10] Li Y, Zaydman MA, Wu D, et al. KCNE1 enhances phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) sensitivity of I_{Ks} to modulate channel activity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108 (22): 9095-9100
- [11] Yu H, Lin Z, Mattmann ME, et al. Dynamic subunit stoichiometry confers a progressive continuum of pharmacological sensitivity by KCNQ potassium channels [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110 (21): 8732-8737
- [12] Bartos DC, Giudicessi JR, Tester DJ, et al. A KCNQ1 mutation contributes to the concealed type 1 long QT phenotype by limiting the Kv7.1 channel conformational changes associated with protein kinase A phosphorylation[J]. Heart Rhythm, 2014, 11(3): 459-468
- [13] Zhang GQ, Hao XM, Ma YP, et al. Bepridil inhibition on the delayed rectifier K^+ currents in thyroxine induced hypertrophied guinea pig ventricular myocytes[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2001, 36(7): 489-492
- [14] Campbell CM, Campbell JD, Thompson CH, et al. Selective targeting of gain-of-function KCNQ1 mutations predisposing to atrial fibrillation[J]. Circ Arrhythm Electrophysiol, 2013, 6(5): 960-966
- [15] Kharche S, Adeniran I, Stott J, et al. Pro-arrhythmogenic effects of the S140G KCNQ1 mutation in human atrial fibrillation - insights from modelling[J]. J Physiol, 2012, 590(Pt 18): 4501-4514
- [16] Shamgar L, Ma L, Schmitt N, et al. Calmodulin is essential for cardiac I_{Ks} channel gating and assembly: impaired function in long-QT mutations[J]. Circ Res, 2006, 98(8): 1055-1063
- [17] Sun DD, Wang HC, Wang XB, et al. Tanshinone IIA: a new activator of human cardiac KCNQ1/KCNE1 (I_{Ks}) potassium channels[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 590(1-3): 317-321
- [18] Taniguchi T, Uesugi M, Arai T, et al. Chronic probucol treatment decreases the slow component of the delayed-rectifier potassium current in CHO cells transfected with KCNQ1 and KCNE1: a novel mechanism of QT prolongation[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2012, 59 (4): 377-386
- [19] Xie Y, Grandi E, Puglisi JL, et al. beta-adrenergic stimulation activates early afterdepolarizations transiently via kinetic mismatch of PKA targets[J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 58: 153-161
- [20] Imredy JP, Penniman JR, Dech SJ, et al. Modeling of the adrenergic response of the human I_{Ks} current (hKCNQ1/hKCNE1) stably expressed in HEK-293 cells [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(5): H1867-H1881