

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.03.003

低硒心肌损伤与钾离子通道蛋白的关系研究*

刘倩^{1,2} 李凤兰¹ 孙美娜¹ 陈明子¹ 赵汉东¹ 李晖^{1△}

(1 哈尔滨医科大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室 黑龙江 哈尔滨 150081;

2 黑龙江农垦职业学院 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘要 目的:心肌上的离子通道蛋白与心肌损伤有很大的关系,本研究通过低硒喂养对 C57BL/6 小鼠心肌组织损伤的影响及其对钾通道蛋白的改变。方法:将实验小鼠分为 4 组:对照组,低硒 30 天组,低硒 90 天组和低硒 180 天组。采用低硒饲料(硒含量 0.0045 $\mu\text{g/g}$)喂养的方法建立低硒小鼠模型,对照组给予正常饲料(硒含量 0.256 $\mu\text{g/g}$),与低硒组同时喂养;硒含量的测定和 HE 染色方法观察心肌损伤情况,Western Blotting 方法检测其钾通道蛋白的表达。结果:低硒饲料喂养小鼠的心脏硒含量与正常饲料喂养的硒含量相比明显降低($P<0.01$);并出现轻微的心肌损伤,钾通道蛋白的表达量在低硒 30 天组,低硒 90 天组和低硒 180 天组下调($P<0.01$)。结论:成功建立低硒小鼠模型,低硒能引起小鼠心肌损伤,这种改变可能有心脏的钾通道蛋白的表达水平有关。

关键词: 低硒;心肌损伤;钾通道蛋白

中图分类号:Q95-3,Q581,R54 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)03-411-03

Study of Relationship between Cardiomyocytes Injury Induced by Selenium-deficiency and Potassium Channel Protein*

LIU Qian^{1,2}, LI Feng-lan¹, SUN Mei-na¹, CHEN Ming-zi¹, ZHAO Han-dong¹, LI Hui^{1△}

(1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical Science College, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150081, China; 2 Heilongjiang Nongken Vocational College, Harbin, Heilongjiang, 150025, China)

ABSTRACT Objective: Many studies showed that cardiomyocytes injury had related to ion channel, to study the effects of melatonin on heart tissue in C57BL/6 mice caused by low selenium diet and discuss the possible mechanism. **Methods:** The mice were divided into four group, with three treatment groups fed with selenium-deficient diet (0.0045 $\mu\text{g/g}$) for control group, 30 day low-selenium, 90 day low-selenium, 180 day low-selenium. Then selenium and heart tissues were examined in mice. Western Blotting was employed to identify the down-stream protein of potassium channel protein expression level. **Results:** Compared with the control group, the selenium levels of the 30 days, 90 days and 180 days selenium deficiency mice were reduce ($P<0.01$) and there was cardiomyocytes injury. And the expression of potassium channel protein in 30 days, 90 days and 180 days selenium deficiency mice was also down-regulated ($P<0.05$). **Conclusion:** We established a selenium-deficient mice model successful. Low selenium can caused cardiomyocytes injury and these changes might be caused by the level of potassium channel protein.

Key words: Selenium deficiency; Cardiomyocytes injury; Potassium channel protein

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, Q581, R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)03-411-03

前言

硒(Se)最早是由瑞典的化学家 Brezelius 于 1817 年发现的是人体中一种重要的微量营养元素和抗氧化剂^[1]。其中硒作为一种重要的因子参与构成这些酶的活性中心从而以活性硒蛋白发挥生理功能^[2]。大量的流行病学的资料证明,心血管疾病的发病率与饮食中的含量及人体硒水平呈负相关^[3],硒在体内通过合成含硒酶例如 GPx^[4]、TR^[5]或者硒蛋白 P^[6]清除体内的脂质过氧化物来维持系统的完整性,从而保护心肌免受损伤,维持正常代谢^[7]。我国科学工作者根据大量的研究确定了克山病是由于当地饮食中的硒元素缺乏引起的^[8],缺硒是导致克山病的一个必要条件^[9],至此便有了硒与人类疾病关系的报道^[10],对于硒与人类肿瘤的关系也越来越受到大家的关

注^[11]。

硒对心肌损伤的保护作用主要是通过增加抗氧化功能,保护受损伤心肌,维持正常电生理活动,有报道称人体血硒含量低于正常值即低硒时可引起心肌损伤等各种疾病,心肌细胞 K⁺ 通道数量多且种类不同^[12]。钾离子通道作为一种蛋白质,有几个亚基构成,这些亚基由不同的基因编码,离子通道与低硒导致的心脏病变有一定的关系^[13],本研究从建立低硒小鼠模型开始,在各个时间点取小鼠的心肌组织,硒含量测定小鼠的心脏硒含量,检测心肌组织是否被损伤,检测钾离子通道蛋白的变化情况,为心肌损伤与钾离子通道的研究提供重要的基础依据。

1 材料与方法

* 基金项目:国家自然科学基金项目(30771863;81172616)

作者简介:刘倩,女,硕士,主要研究方向:低硒导致的心肌损伤与离子通道的关系,电话:13766866794

△通讯作者:李晖,博士生导师,教授,电话:13936695263, E-mail: lihui@ems.hrbmu.edu.cn

(收稿日期:2013-05-25 接受日期:2013-06-19)

1.1 低硒饲料的配制

低硒酵母(硒含量为 $0.0045 \mu\text{g/g}$)46.84%,猪油 4%,色拉油 1%,常量元素 5.37%,微量元素 0.06%,混合微量元素 0.5%,无 VE 的混合维生素 0.1%,氯化胆碱 0.2%,DL 甲硫氨酸 0.4%,VE36.6%,砂糖 4.93%。

1.2 实验动物

实验动物 C57BL/6 小鼠 80 只,雌雄各半,体重为 18-25 g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司。C57BL/6 小鼠随机分为 4 组:对照组(control),低硒 1 个月(LD-30d),低硒 3 个月(LD-90d),低硒 6 个月(LD-180d)。本实验通过低硒饲料喂养小鼠来建立低硒模型,低硒组的小鼠饮用水为高压灭菌后的去离子水,正常对照组给予正常饮用水。对照组给予正常硒含量饲料,其中酵母的硒含量为 $0.219 \mu\text{g/g}$,其他成分均相同。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物心脏硒含量的测定 各实验点取小鼠的心脏称重,消化后加消化液甲(3 mL)和消化液已(10 mL),将三角瓶放置于电炉上逐渐加热,约 10 min 后即可见激烈反应,片刻后溶液变为无色液体并伴随白烟,此时继续加热至液体变为淡黄色液体微带着绿色即可认为反应达到终点,立即去下,直至消化液冷却后变为无色,此时加入 20 mL 的水,摇匀后再加入 2 mL 的 0.2 mol EDTA,然后混匀。

将上述溶液用氨水及盐酸调 pH 至 1.5-2.0,加盐酸羟胺溶液 2 mL 后放置 5 min,避光加入 DNA 试剂 4 mL,混匀后至于沸水浴中,5 min 后冷水浴冷却,然后加 6 mL 环己烷,在振荡器上震荡 5 min,将全部溶液移至分液漏斗中,分层后弃下层,将上层溶液 1500 rpm 离心 2 min,将环己烷在荧光光度计上测定苯硒脑的荧光强度,每批测定的同时都要做试剂空白组,硒标准($0.1 \mu\text{g}$)。

计算公式:每克组织样品中硒含量 = [标准硒含量 ÷ (标准荧光读数 - 空白荧光读数)] × [(样品荧光读数 - 空白荧光读数) ÷ 样本重量]

1.3.2 实验动物心肌 HE 染色 取出心脏组织,D-Hank,s 液冲洗 3 min,放入 10%的甲醛中固定,石蜡包埋切片。切片脱蜡,浸入苏木素染色液中 5-10 min,流水冲洗 10 min,蒸馏水冲洗 5-10 s,浸入 95%乙醇片刻,伊红染色液染色 5 min,二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜下观察,蓝紫色为细胞核,粉红色为细胞浆,拍照。

1.3.3 Western blot 检测钾通道蛋白的表达 取小鼠的肝、脑、肾组织分别放入与匀浆器中,裂解,匀浆,紫外分光光度计检测蛋白浓度。取 $10 \mu\text{L}$ 蛋白样品,用 10%的 SDS-PAGE 电泳,转膜,封闭,加入 Sel P 和 SBP1 抗体(1:1000), 4°C 过夜。1× TBST 洗三次,二抗室温孵育 2 h,膜用 1× TBST 洗三次,洗涤后加入 ECL 发光剂,曝光,显影。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析,对符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差表示,偏态分布的计量资料以中位数 ± 四分位数间距表示,正态分布资料采用 t 检验,偏态分布资料采用 Mann-Whitney 检验, $P < 0.05$ 有统计学差异, $P < 0.01$ 有显著性差异。

2 结果

2.1 心脏硒含量的测定结果

利用荧光法检测微量元素硒在各组动物实验中的含量变化,图 1 的结果显示,与对照组相比,低硒 30 天、90 天、180 天随着时间的延长,心脏的硒含量称降低趋势,并在低硒 180 天

时最为明显($P < 0.01$)。说明小鼠的心脏处于低硒水平状态。

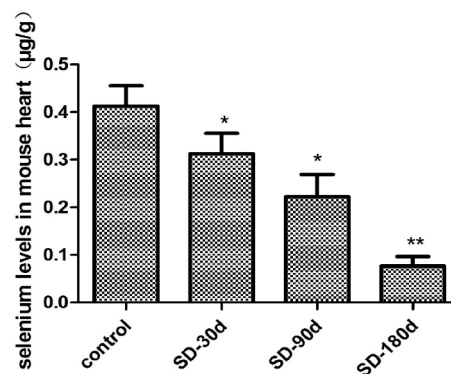


图 1 小鼠心脏硒含量

Fig. 1 The selenium levels in heart

2.2 心肌组织损伤程度的鉴定

将各组的心肌组织进行包埋固定,在显微镜下观察病理形态学的变化,图 2 结果显示正常的心肌组织细胞紧密呈长梭形,结构完整,细胞核明显,心肌间质无异常变化,而低硒组的心肌组织细胞疏松并排列紊乱,失去正常心肌细胞的形态,在低硒 180 天组有明显的细胞核溶解,细胞间质间隙加宽,说明有轻微心肌损伤的趋势。

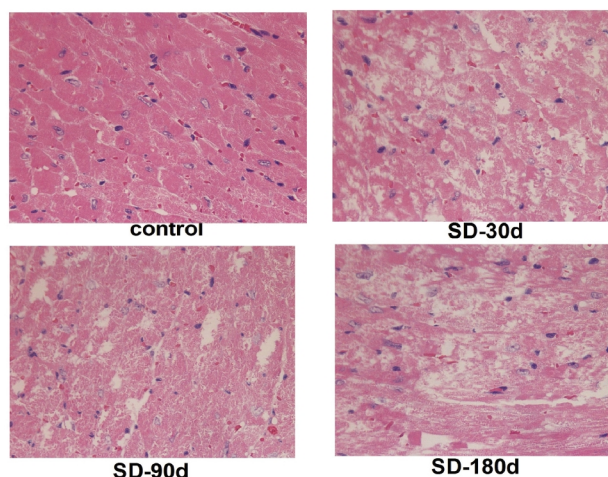


图 2 HE 染色检测心肌组织情况($\times 400$)

Fig. 2 HE staining in mouse myocardial($\times 400$)

2.3 Western blot 检测钾通道蛋白的表达情况

为了进一步确定低硒与钾通道的关系,我们又检测了钾通道蛋白的情况,如图 3 所示的结果,对照组相比,钾通道蛋白随着低硒时间的延长,表达量降低。

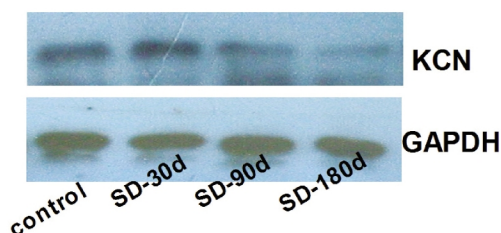


图 3 Western blot 钾通道蛋白表达结果 * $P < 0.01$, vs 空白

Fig. 3 The expression of KCN by Western blot * $P < 0.01$, vs control

3 讨论

硒作为一种机体生理活动所必需的微量元素,其在物质合成过程所起到的重要性不言而喻^[14],低硒可引起机体免疫力下降,同时硒缺乏与多种疾病有关^[15],如克山病、大骨节病^[16]、心血管疾病,近年来,有很多的研究报道称硒与很多的肿瘤疾病也有应得相关性^[17]。钾离子通道基因结构改变或表达异常均会导致钾离子通道的功能异常,心肌肥厚可导致钾通道的改变^[18],钾离子通道基因的正常表达,对于心肌动作电位的产生和房颤也有一定的关系^[19]。很早就有报道称补硒可以激活钾通道,但具体的机制不明^[20],低硒对心血管疾病的临床治疗起到了重要的作用^[21],而研究一直是近年来困扰我们的难题,对于低硒与钙离子通道的关系本课题组已研究多年,那么关于钾离子通道与低硒的关系上不是很清楚。

本实验对低硒小鼠的心肌损伤进行了初步分析。与对照组相比,低硒时间越长,在小鼠心脏内的硒含量就随着时间的延长降低(图1),并呈现显著性的差异($P < 0.05$),由HE染色的结果显示,在低硒30天时几乎在显微镜下看不到心肌组织的损伤情况,在低硒90天知道低硒180时,能看到细胞松弛话,细胞与细胞之间有疏松的间隙出现,说明心肌组织出现了一定程度的损伤情况(图2)。同时,图3的结果显示,在随着低硒时间越长延长,钾通道蛋白的表达量降低,分析数据可知,当心肌细胞处于损伤状态时,有钾离子的外流导致了细胞内的,而此时的钾通道蛋白表达量却减少,可能是由于心急的损伤造成了钾通道蛋白的破坏或者失活。

离子通道与很多疾病例如心房纤颤、心肌肥大、心力衰竭等有一定的关系,对于心肌动作电位的产生和兴奋性的维持都有关键性的意义,本研究在低硒模型的基础上发现低硒时,小鼠的心脏组织有损伤出现,伴随着的是小鼠低硒时引起的心肌损伤可以一定程度的引起钾通道蛋白的表达量降低,但是具体的机制尚未明确,但为低硒病因学说提供分子水平的实验佐证,为低硒与钾离子通道的进一步研究提供了参考依据。

参考文献(References)

- [1] Studies on selenium Nutrition reviews [J]. 1975, 33: 138-140
- [2] Arner ES. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine [J]. Experimental cell research, 2010, 316: 1296-1303
- [3] Shen H, Thomas PR, Ensley SM, et al. Vitamin E and selenium levels are within normal range in pigs diagnosed with mulberry heart disease and evidence for viral involvement in the syndrome is lacking [J]. Transboundary and emerging diseases, 2011, 58: 483-491
- [4] Brigelius-Flohe R, Kipp AP. Physiological functions of GPx2 and its role in inflammation-triggered carcinogenesis [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012, 1259: 19-25
- [5] Solov'yev N, Berthele A, Michalke B. Selenium speciation in paired serum and cerebrospinal fluid samples [J]. Analytical and bioanalytical chemistry, 2013, 405: 1875-1884
- [6] Burk RF, Hill KE. Selenoprotein P: an extracellular protein with unique physical characteristics and a role in selenium homeostasis [J]. Annual review of nutrition, 2005, 25: 215-235
- [7] Boldery R, Fielding G, Rafter T, et al. Nutritional deficiency of selenium secondary to weight loss (bariatric) surgery associated with life-threatening cardiomyopathy [J]. Heart, lung & circulation, 2007, 16: 123-126

- [8] 徐光禄. 硒预防克山病和低硒与克山病关系的研究进展——纪念克山病发现60周年暨克山病补硒预防方法创立30周年[J]. 地方病通报, 1996, 2: 1-6
Xu Guang-lu. The progress in study of Selenium prevention Keshan disease and low-selenium and Keshan disease [J]. Eedemic Diseases Blulletinul (China), 1996, 2: 1-6
- [9] Li Q, Liu M, Hou J, et al. The prevalence of Keshan disease in China [J]. International journal of cardiology, 2013, 168(2): 1121-1126
- [10] Alftan G, Xu GL, Tan WH, et al. Selenium supplementation of children in a selenium-deficient area in China: blood selenium levels and glutathione peroxidase activities [J]. Biological trace element research, 2000, 73: 113-125
- [11] Cassidy PB, Fain HD, Cassidy JP, et al. Selenium for the prevention of cutaneous melanoma [J]. Nutrients, 2013, 5: 725-749
- [12] 鲍伟胜, 王春雷, 杨英珍. 心肌细胞钾通道的分子学多样性 [J]. 细胞生物学杂志, 2000: 173-176
Bao Wei-sheng, Wang Chun-lei, Yang Ying-zhen. The molecular diversity of myocardial cell potassium channels[J]. Chinese Journal of Coll Biology, 2000: 173-176
- [13] 郭为农, 俞玉梅. 心肌细胞钾通道及其在心脏疾病中的变化[J]. 国外医学(生理、病理科学与临床分册), 1997: 3-5
Guo Wei-nong, Yu Yu-mei. Myocardial cell potassium channel and its change in heart disease [J]. Foreign Medical Sciences (Section of Pathophysiology and Clinical Medicine), 1997: 3-5
- [14] Bock A. Biosynthesis of selenoproteins--an overview [J]. BioFactors (Oxford, England), 2000, 11: 77-78
- [15] Sunde RA, Raines AM. Selenium regulation of the selenoprotein and nonselenoprotein transcriptomes in rodents [J]. Advances in nutrition (Bethesda, Md.), 2011, 2: 138-150
- [16] 王治伦. 大骨节病4种病因学说的同步研究 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2005, 12: 1-7
Wang Zhi-lun. Synchronous study on the four kinds of etiological hypotheses of Kashin-Beck Disease [J]. Journal of Xi' an Jiaotong University(Medical Sciences), 2005, 12: 1-7
- [17] Shi K, Jiang Q, Li Z, et al. Sodium selenite alters microtubule assembly and induces apoptosis in vitro and in vivo [J]. Journal of hematology & oncology, 2013, 6: 7
- [18] 梅其炳, 赵德化. 心肌肥厚的电生理研究进展[J]. 国外医学(生理、病理科学与临床分册), 1998, 35: 44-47
Mei Qi-bing, Zhao De-hua. The electrophysiology research progress of Myocardial hypertrophy [J]. Foreign Medical Sciences (Section of Pathophysiology and Clinical Medicine), 1998, 35: 44-47
- [19] 李亚伟, 邹枫, 曾常茜. 电压门控钾离子通道与癫痫 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2010, 142: 575-576
Li Ya-wei, Zou Sa-feng, Zeng Chang-qian. Voltage-gated potassium channels and epilepsy[J]. Journal of Apoplexy and Nervous Diseases, 2010, 142: 575-576
- [20] 鲍光宏, 于德洁, 刘宇, 等. 低硒大鼠心肌细胞的钾通道[J]. 中国地方病学杂志, 1994, 192: 142-145
Bao Guang-hong, Yu De-jie, Liu Yu, et al. Potassium channel in cardiac myocytes from Selenium deficiency rat heart [J]. Chinese Journal of Cndemiology, 1994, 192: 142-145
- [21] 李改平, 王梦亮, 吉广庆. 硒蛋白对心血管疾病辅助治疗的临床评价[J]. 山西医药杂志, 2002, 1: 17-18
Li Gai-ping, Wang Meng-liang, Ji Guang-qing. Clinical evaluation of the supplementary treatment of selenium protein for cardiovascular disease[J]. Shanxi Medical Journal, 2002, 1: 17-18