

本文引用:刘燕青,彭瑞云,高亚兵,等.微波辐射对大鼠窦房结组织 HCN4 基因表达的影响[J].新乡医学院学报,2014,31(9):685-687.

【基础研究】

## 微波辐射对大鼠窦房结组织 HCN4 基因表达的影响

刘燕青<sup>1,2</sup>, 彭瑞云<sup>1</sup>, 高亚兵<sup>1</sup>, 赵黎<sup>1</sup>, 董霁<sup>1</sup>, 姚斌伟<sup>1</sup>

(1. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850; 2. 中国人民武装警察部队后勤学院附属医院病理科, 天津 300162)

**摘要:** **目的** 观察微波辐射对受损大鼠窦房结(SAN)组织超极化激活环核苷酸门控阳离子通道4(HCN4)基因表达的影响,探讨微波辐射致窦房结损伤的可能机制。**方法** 将60只Wistar雄性大鼠随机分为假辐射组和50 mW·cm<sup>-2</sup>组,每组30只,建立微波辐射致窦房结损伤大鼠模型,于辐射后1、7、14、28 d及3、6个月,采用原位杂交法检测窦房结HCN4 mRNA表达变化。**结果** 与假辐射组比较,50 mW·cm<sup>-2</sup>组大鼠于辐射后1、7、14、28 d,窦房结细胞胞质内HCN4 mRNA表达显著增加;而于辐射后3、6个月显著减少,其差异均有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。**结论** HCN4异常表达是微波辐射致SAN损伤的重要致伤分子之一。

**关键词:** 微波辐射;大鼠;窦房结;超极化激活环核苷酸门控阳离子通道4

**中图分类号:** R818 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)09-0685-03

### Effect of microwave radiation on the expression of HCN4 in rats' sinoatrial nodal tissue

LIU Yan-qing<sup>1,2</sup>, PENG Rui-yun<sup>1</sup>, GAO Ya-bing<sup>1</sup>, ZHAO Li<sup>1</sup>, DONG Ji<sup>1</sup>, YAO Bin-wei<sup>1</sup>

(1. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Logistic College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

**Abstract:** **Objective** To observe the effect of microwave radiation on the expression of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4 (HCN4) gene in order to investigate the possible mechanism of sinoatrial node (SAN) injury from microwave radiation. **Methods** Sixty Wistar male rats were randomly divided into non-radiation group and 50 mW·cm<sup>-2</sup> group, with 30 rats in each group. The model of rats' SAN injuries resulted from microwave radiation were established. In situ hybridization (ISH) was employed to detect the expression changes of mRNA of HCN4 in SAN after 1 day, 7, 14 and 28 days, 3 and 6 months respectively. **Results** Compared with non-radiation group, the expression of mRNA of HCN4 in the cytoplasm of SAN cells increased significantly in the 50 mW·cm<sup>-2</sup> group after the radiation for 1 day and 28 days while it decreased significantly after the radiation for 3 and 6 months ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** The abnormal expression of HCN4 is one of the important damage-causing factors of SAN injury from microwave radiation.

**Key words:** microwave radiation; rat; sinoauricular node; hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4

微波辐射具有广泛的生物学效应,心脏是微波辐射较为敏感的靶器官之一。本课题组前期研究表明,50 mW·cm<sup>-2</sup>微波辐射可导致大鼠窦房结(sinoatrial node, SAN)功能的变化<sup>[1]</sup>和结构的损伤<sup>[2]</sup>,但迄今引起上述损伤的机制不明。近年研究发现,超极化激活的环核苷酸门控阳离子通道4(hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel 4, HCN4)在调控SAN起搏细胞的起搏电流及维持SAN电生理功能方面扮演着重要的角色,并且在多种SAN损伤模型中,发现了HCN4的异常表达<sup>[3]</sup>。研究表明,HCN4的异常表达可能导致SAN功能障

碍,还可加速异位起搏,引发心律失常<sup>[4]</sup>。HCN4信号通路可能在微波辐射致SAN损伤过程中发挥重要作用。目前关于微波辐射后SAN组织HCN4基因表达变化尚未见文献报道,探讨微波辐射后SAN组织HCN4基因表达变化具有重要的病理生理意义。

本实验将以前期研究已证实具有明确损伤效应的50 mW·cm<sup>-2</sup>微波辐射后的SAN作为研究对象,采用组织原位杂交(in situ hybridization, ISH)及图像分析方法,检测50 mW·cm<sup>-2</sup>微波辐射后6个月内大鼠SAN组织中HCN4 mRNA水平的变化,旨在研究微波辐射致SAN损伤后HCN4表达的变化规律,为其进一步致伤机制研究提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物与分组 Wistar雄性大鼠60只,8

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.09.003

收稿日期: 2014-03-10

基金项目: 国家863计划项目(编号: 2011AA1005)

作者简介: 刘燕青(1975-),女,天津人,博士,讲师,主要从事电磁辐射生物学效应研究。

通信作者: 彭瑞云(1966-),女,河南夏邑人,博士,研究员,博士研究生导师,研究方向: 实验病理学。

周龄,体质量( $200 \pm 20$ )g,购自军事医学科学院实验动物中心并负责统一喂养。采用标准实验室饲料,自由进食、进水。根据辐射的平均功率密度,将大鼠随机分为假辐射组和  $50 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  组,每组 30 只。

**1.1.2 主要仪器和试剂** 原位杂交检测试剂盒(HCN4, MK3601-r)购于武汉博士德生物工程有限公司。多功能显微摄像系统为德国 Lecia 公司产品(M6000B),多功能图像分析管理系统为中国北航公司产品(CMIAS-II)。

## 1.2 方法

**1.2.1 微波辐射方法** 采用军事医学科学院自建的微波模拟辐射源对大鼠进行全身均匀辐照。首先将大鼠置于自制的有机玻璃盒中,固定体位;然后将辐射盒置于布满吸收材料的微波室内,辐射台旋转以保证大鼠接受全身均匀辐照。辐照采用的平均功率密度为  $50 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$ ,辐射时间为 6 min,辐射 1 次。假辐射组进行同等条件伪辐照。

**1.2.2 大鼠 SAN 组织取材及切片方法** 于辐射后 1、7、14、28 d 及 3、6 个月 6 个时间点,每组随机选取 5 只大鼠,根据文献[5]中的方法进行 SAN 组织取材,组织经体积分数 10% 中性缓冲甲醛固定,常规石蜡包埋。切片方法为自上腔静脉断端至右心房做水平连续切片,片厚  $3 \sim 4 \mu\text{m}$ 。切片隔 5 张取 1 张行苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光镜下观察以确定是否含有 SAN 组织。

**1.2.3 大鼠 SAN 组织 HCN4 mRNA 原位杂交方法** 于辐射后各时间点,每组取 3 例含 SAN 的阳性石蜡切片,主要操作步骤如下:(1)常规切片脱蜡至水。(2)内源性过氧化物酶的灭活:体积分数 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  室温处理 10 min, ddH<sub>2</sub>O 洗 3 次,每次 3 min。(3)mRNA 核酸片段的暴露:体积分数 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶  $37^\circ\text{C}$  消化 20 min;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 3 次,每次 3 min; ddH<sub>2</sub>O 洗 1 次。(4)预杂交:滴加预杂交液  $20 \mu\text{L}$ ,温箱( $38 \sim 42^\circ\text{C}$ )孵育 2 h,吸去多余液体,不洗。(5)杂交:每张切片滴加  $20 \mu\text{L}$  杂交液,然后加盖免疫组织化学专用盖玻片,温箱  $42^\circ\text{C}$  杂交过夜。(6)杂交后的洗涤:轻柔揭去盖玻片,  $37^\circ\text{C}$  的  $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  标准柠檬酸盐(standard saline citrate, SSC)液洗 3 次,每次

5 min;  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  SSC 液洗 1 次,每次 15 min;  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  SSC 液洗 1 次,每次 15 min;然后滴加封闭液:  $37^\circ\text{C}$  封闭 30 min, 甩去多余液体,不洗。(7)滴加生物素化鼠抗地高辛:  $37^\circ\text{C}$  孵育 60 min;  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 液洗 3 次,每次 5 min。(8)滴加 SABC(链霉卵白素+辣根过氧化物酶标记生物素):  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min;  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 液洗 3 次,每次 5 min。(9)滴加生物素化过氧化物酶:  $37^\circ\text{C}$  孵育 20 min;  $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS 液洗 4 次,每次 5 min。(10)二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色后,充分水洗,苏木精复染,水溶性封片剂封片。

**1.2.4 结果分析方法** ISH 染色结果判断: HCN4 mRNA 阳性表达部位位于细胞质,阳性杂交信号呈棕黄色颗粒状,苏木精复染后细胞核呈蓝色。在  $10 \times 20$  倍光镜下观察,每张切片随机选取 3 个视野采集图像,采用 CMIAS-II 彩色病理图像分析系统进行积分光密度(integral optical density, IOD)测定大鼠 SAN 组织 HCN4 mRNA 的表达水平。

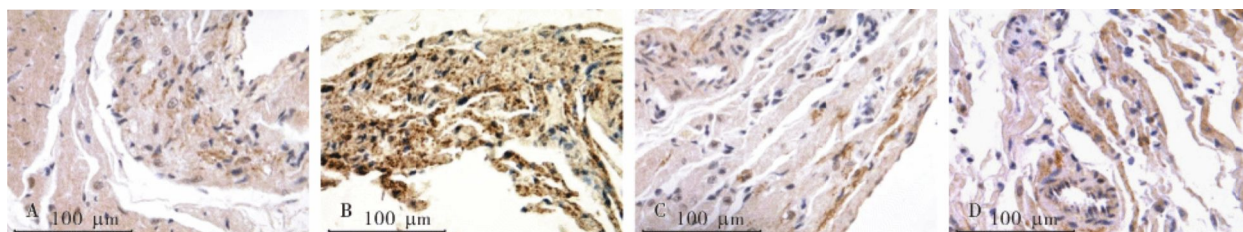
**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,计量数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 Tukey *T* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 2 组大鼠 SAN 组织 HCN4 mRNA 表达变化

结果见图 1。假辐射组大鼠 SAN 组织 HCN4 mRNA 的阳性杂交信号主要集中于 SAN 细胞的胞质,呈棕黄色颗粒状(图 1A);  $50 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  组大鼠辐射后 1 d HCN4 mRNA 在 SAN 细胞的胞质内呈深褐色、棕褐色或棕黄色阳性或强阳性表达(图 1B),辐射后 3 个月, HCN4 mRNA 在细胞质内呈浅棕黄色弱阳性表达(图 1C),辐射后 6 个月, HCN4 mRNA 在细胞质内呈棕黄色阳性表达(图 1D)。

**2.2 2 组大鼠 SAN 组织 HCN4 mRNA 表达水平比较** 结果见表 1。与假辐射组比较,  $50 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  组大鼠辐射后 1、7、14 及 28 d HCN4 mRNA 表达显著增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $0.01$ ),辐射后 3、6 个月,其表达呈下降趋势,其中辐射后 3 个月其表达与假辐射组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



A: 假辐射组; B:  $50 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  组辐射后 1 d; C:  $50 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  组辐射后 3 个月; D:  $50 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  组辐射后 6 个月。

图 1 假辐射组和  $50 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  组大鼠 SAN 组织 HCN4 mRNA 的表达 ( $\times 400$ )

Fig. 1 Expression of HCN4 mRNA in the tissue of SAN in the non-radiation group and  $50 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$  group ( $\times 400$ )

表 1 假辐射组和 50 mW · cm<sup>-2</sup>组大鼠 SAN 组织 HCN4 mRNA 表达水平比较

Tab.1 Comparison of HCN4 mRNA in the tissue of SAN in the non-radiation group and 50 mW · cm<sup>-2</sup> group

(x̄ ± s, × 10 <sup>-1</sup> )							
组别	n	1 d	7 d	14 d	28 d	3 个月	6 个月
假辐射组	30	9.33 ± 0.56	8.75 ± 0.70	9.13 ± 1.53	9.48 ± 1.36	9.50 ± 1.70	9.23 ± 0.83
50 mW · cm <sup>-2</sup> 组	30	30.13 ± 2.49 <sup>a</sup>	13.48 ± 2.61 <sup>b</sup>	21.15 ± 2.22 <sup>a</sup>	14.95 ± 1.18 <sup>b</sup>	5.15 ± 0.27 <sup>b</sup>	7.28 ± 0.58

注:与假辐射组比较<sup>a</sup>P<0.01,<sup>b</sup>P<0.05。

3 讨论

本课题组既往研究表明,大鼠 SAN 体积微小,且位置隐蔽,仅凭肉眼或体视显微镜很难做到准确取材,只有通过连续切片才能获得<sup>[6]</sup>。因此,研究大鼠 SAN 的实验研究宜尽量选择在组织切片原位进行。

已有研究表明,由 HCN4 编码的离子通道对 SAN 正常起搏功能起至关重要的作用。HCN4 基因敲除大鼠在出生前就死亡,而且胚胎患有严重的心动过缓,心脏 If 电流下降 85%<sup>[7]</sup>。HCN4 主要作用是使 P 细胞的起搏频率维持在一定水平,并随着机体不同的生理状态对频率进行调整。总之,目前的研究表明,HCN4 是构成 SAN P 细胞起搏电流的重要因素,决定基本心率<sup>[8]</sup>。

另有研究发现,HCN4 表达改变与多种心脏疾病、心律失常的发生密切相关。SAN 组织 HCN4 的异常表达可能导致 SAN 功能障碍,还可加速异位起搏,并导致心律失常<sup>[4]</sup>。张洪涛等<sup>[3]</sup>研究表明,心源性猝死者的 SAN 组织 HCN4 基因表达上调,从而得出结论即 HCN4 表达上调与 SAN 病理性改变导致心源性猝死有一定的相关性。Stieber 等<sup>[9]</sup>研究发现,某些心律失常的产生原因可能与 SAN 急性缺血/再灌注损伤后,SAN 组织 HCN4 表达降低,其主导的 If 电流异常有关。Zicha 等<sup>[10]</sup>研究表明,SAN HCN4 mRNA 和蛋白水平下调参与了充血性心力衰竭所诱导的 SAN 功能障碍。SAN 组织 HCN4 表达降低可出现不同程度的窦性心动过缓;在 SAN 内上调表达起搏电流 If,可缓解缓慢性心律失常。综上所述,If 电流及其通道蛋白 HCN4 表达的改变可能是揭示 SAN 功能变化最直接的证据。但迄今 HCN4 通道在微波辐射致 SAN 损伤中的变化及意义不明。

本研究结果显示,大鼠微波辐射后 1、7、14、28 d SAN 组织 HCN4 mRNA 表达较假辐射组显著增加,辐射后 3、6 个月其表达较假辐射组显著减少,提示 HCN4 的异常表达参与了微波辐射致 SAN 损伤过程,且可能为该损伤过程中一个重要的致伤分子,其详尽机制有待进一步研究。

Muto 等<sup>[11]</sup>发现,醛固酮可以通过激活盐皮质激素受体上调 HCN4 mRNA 和蛋白质的表达,进而加速自发搏动的频率。Graf 等<sup>[12]</sup>研究发现,肾上腺素活性增高可以上调 HCN4 的表达。据此推测,微波辐射后 SAN 组织 HCN4 表达上调的可能机制为:(1)微波辐射后,机体内肾素-血管紧张素系统激活,血浆和心

脏局部血管紧张素Ⅱ水平增高,醛固酮分泌增加,并通过盐皮质激素受体激活 HCN4 及其调控,上调 HCN4 的表达;(2)微波辐射后,机体内交感神经兴奋性增强,血浆和心脏局部肾上腺素活性增高,激活 HCN4 及其调控机制,上调 HCN4 表达。

总之,本研究在微波辐射致 SAN 损伤模型上,通过检测 HCN4 mRNA 的变化证实 HCN4 的异常表达参与了微波辐射致 SAN 损伤过程,且可能为该损伤过程中一个重要的致伤分子。

参考文献:

[1] 刘燕青,彭瑞云,徐新萍,等.微波辐射对大鼠心脏窦房结功能的影响[J].中国体视学与图像分析,2012,17(3):226-232.

[2] 刘燕青,彭瑞云,高亚兵,等.微波辐射对大鼠窦房结组织结构的影响[J].中国体视学与图像分析,2012,17(3):262-268.

[3] 张洪涛,于建宪,张七一,等.心源性猝死者窦房结病理学观察和 HCN4、Cx45 的表达及其意义[J].现代生物医学进展,2009,9(23):4480-4483.

[4] Fan X, Chen Y, Xing J, et al. Protective effects of adenosine in rabbit sinoatrial node ischemia-reperfusion model *in vivo*: control of arrhythmia by hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN)4 channels [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 38(3): 1723-1731.

[5] 刘燕青,彭瑞云,高亚兵,等.成年大鼠窦房结的定位方法及其在超微结构研究中的应用[J].新乡医学院学报,2013,30(10):790-793.

[6] 刘燕青,彭瑞云,高亚兵,等.成年大鼠窦房结的解剖学定位和组织学特点的定量观察[J].中国体视学与图像分析,2013,18(1):60-66.

[7] 李海玲.与心律失常相关的 microRNAs 研究现状[J].国际心血管病杂志,2010,37(5):268-271.

[8] Stillitano F, Lonardo G, Zicha S, et al. Molecular basis of funny current (If) in normal and failing human heart[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 45(2):289-299.

[9] Stieber J, Hofmann F, Ludwig A. Pacemaker channels and sinus node arrhythmia [J]. *Trends Cardiovas Med*, 2004, 14(1):23-28.

[10] Zicha S, Fernández-Velasco M, Lonardo G, et al. Sinus node dysfunction and hyperpolarization-activated (HCN) channel subunit remodeling in a canine heart failure model [J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 66(3):472-481.

[11] Muto T, Ueda N, Opthof T, et al. Aldosterone modulates If current through gene expression in cultured neonatal rat ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol-Heart C*, 2007, 293(5):H2710-H2718.

[12] Graf E M, Heubach J F, Ravens U. The hyperpolarization-activated current If in ventricular myocytes of non-transgenic and β2-adrenoceptor overexpressing mice [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2001, 364(2):131-139.

(本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)