

网络出版时间: 2021-6-11 15:56 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210611.0928.014.html>

容积激活性氯离子通道蛋白 CIC-3 表达下调促进 H9c2 心肌细胞肥大及其机制研究

孙宇¹ 陈梦青² 汪帅¹ 李艳文¹ 喻阳¹ 李咏琪¹ 李春梅¹

摘要 目的 探讨容积激活性氯离子通道蛋白 CIC-3 表达下调对 H9c2 心肌细胞的影响及其机制。方法 用 siRNA 转染 H9c2 心肌细胞构建 CIC-3 表达下调的细胞模型; 免疫荧光染色观察 H9c2 细胞表面积; qRT-PCR 检测 H9c2 细胞心房利钠肽 (ANP)、脑钠肽 (BNP) 和 β -肌球蛋白重链 (β -MHC) 的 mRNA 表达水平; JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位 (MMP) 水平; 图像分析系统研究 H9c2 心肌细胞的调节性体积回缩能力 (RVD); 全细胞膜片钳技术检测 H9c2 细胞膜上氯电流的变化。结果 与空白组相比, siRNA 转染 H9c2 细胞 72 h 能降低 CIC-3 mRNA 和蛋白的表达水平; 而 CIC-3 下调与异丙肾上腺素相似, 都增加 H9c2 心肌细胞表面积和心肌肥大标志性因子 mRNA 的表达, 同时降低 H9c2 细胞的 MMP 和容积调节能力, 抑制容积激活性氯离子电流的激活。

结论 CIC-3 表达的下调能诱导 H9c2 心肌细胞肥大, 其机制可能与其损伤线粒体功能、降低细胞容积调节能力和抑制容积激活性氯离子电流的激活有关。

关键词 CIC-3; H9c2 细胞; 心肌细胞肥大; 线粒体膜电位; 容积激活性氯电流

中图分类号 R 329.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)07-1075-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.014

心肌肥大的主要特点是心肌细胞体积增大, 易引发心律失常, 最终导致心力衰竭和心肌梗死等疾病^[1]。CIC-3 是电压门控氯通道基因家族成员之一, 在心脏、脑等组织中广泛表达^[2]。许多研究^[3-4]表明, CIC-3 的功能具有多效性, 包括作为容积调节性氯离子通道的关键组成部分, 能调节细胞体积, 保护心肌细胞免受低氧、缺血或肥大时细胞体积过度增加的影响。前期研究^[2,5]表明异丙肾上腺素能诱导大鼠原代心肌细胞、H9c2 细胞和 C57 小鼠 CIC-3 表达降低, 且 AAV-9 介导的 CIC-3 过表达小鼠能明

2021-04-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31500926)

作者单位: ¹ 广东药科大学生命科学与生物制药学院, 广州 510006

² 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳 440305

作者简介: 孙宇, 男, 硕士研究生;

李春梅, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: gylichunmei@126.com

cancer cells, the level of mitochondrial oxidative stress and tumor formation in nude mice. **Methods** Colon cancer cells SW480 were randomly divided into a blank control group (Control), a negative control group (miR-NC), and an overexpression group (miR-302 mimic); the expression of miR-302 after transfection was detected by qRT-PCR; inflammatory factors interleukin (IL)-6 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were tested with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); IL-1 β and tumor necrosis factor α (TNF- α) mRNA expression were detected by qRT-PCR detection; the changes in mitochondrial membrane potential were detected by flow cytometry; oxidative stress markers malondialdehyde (MDA) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected by kits; mitochondrial damage-related proteins B-cell lymphoma/leukemia 2 (Bcl-2) associated X (Bax), Bcl-2, cleaved caspase 3 (Cleaved cas-3) and cas3, c-Myc, and their relative levels (Bax/Bcl2, Cleaved cas3/cas3) were detected by Western blot; a nude mouse xenograft model was established to detect tumor tissue weight; caspase 3 positive expression was detected by immunohistochemistry. **Results** Compared with the miR-NC group, the miR-302 expression, IL-6 and iNOS protein concentrations, IL-1 β and TNF- α mRNA levels, oxidative stress marker levels (MDA, LDH), mitochondrial damage-related protein expression (Bax/Bcl2, Cleaved cas3/cas3) and the positive expression of caspase 3 in tumor tissue significantly increased ($P < 0.05$); compared with miR-NC group, miR-302 Mimic group mitochondrial membrane potential, c-Myc expression and tumor tissue weight significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Overexpression of miR-302 induces increased levels of inflammatory factors in colon cancer cells, mitochondrial oxidative stress, and inhibits tumor formation in nude mice.

Key words colon cancer; SW480 cells; miR-302; nude mice tumor formation; oxidative stress

显抑制异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚。该研究利用 siRNA 转染 H9c2 心肌细胞构建 CIC-3 表达下调模型,观察其对心肌细胞的影响及机制,为研究 CIC-3 在心脏中的功能提供借鉴,同时也为临床心肌肥大的防治提供思路。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂 H9c2 细胞购自上海中国科学院细胞库。异丙肾上腺素(ISO)购自美国 Sigma 公司。CIC-3 一抗购自英国 Abcam 公司。siRNA CIC-3 及转染试剂盒购自苏州瑞博生物有限公司。Bradford 蛋白浓度试剂盒、JC-1 线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)试剂盒、细胞骨架染色 α -Tubulin 一抗均购自北京碧云天生物技术有限公司。DMEM 培养基、FBS 胎牛血清、0.25% 胰酶均购自上海 Gibco 公司。TRIzol 购自大连 TaKaRa 生物公司。PCR 引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成。Prime ScriptTMRT Reagent 及 SYBR PCR Mix 购自日本 ToYoBo 公司。

1.2 主要方法

1.2.1 细胞培养及分组 大鼠 H9c2 心肌细胞株在含 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,每 2 d 更换 1 次。在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养传代,取对数期、生长良好的细胞进行实验。将 2×10^4 个细胞接种于 6 孔板中,待细胞融合度达到 60% ~ 70% 时进行转染。加入小干扰 RNA 在培养箱中转染 48 h 和 72 h 后,更换为完全培养基继续培养 48 h,采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测转染效率。实验主要分为 4 组:空白组、siRNA 空载对照组、肥大模型组:ISO(10 μ mol/L 诱导心肌肥大)以及 siRNA 转染敲低 CIC-3 组。

1.2.2 Western blot 检测 CIC-3 蛋白表达 H9c2 细胞经 100 nmol/L 的 siRNA 转染不同时间后,提取蛋白,并用 Bradford 法测定蛋白浓度。加入上样缓冲液后,用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白样品,转膜后用奶粉封闭 2 h。4 °C 孵育一抗,过夜后室温孵育二抗。采用 ECL 化学发光法检测。各组蛋白均以 GAPDH 作为内参校正。

1.2.3 α -Tubulin 免疫荧光染色 将生长状态良好的 H9c2 细胞经胰蛋白酶消化后,接种于带有细胞小圆玻片的 48 孔板中,每孔 200 μ l,计数后调节细胞浓度约 8×10^3 个/孔,培养 24 h 细胞贴壁后,进行饥饿处理 12 h,细胞换液按分组分别处理 48 h 后,弃去培养基, PBS 洗 3 次,每次 5 min,用 4% 的多

聚甲醛固定 15 min,弃固定液, PBS 洗 3 次,室温封闭 1 h,然后加入 α -Tubulin(1:100)一抗 4 °C 过夜。第 2 天加入羊抗鼠二抗室温避光孵育 1 h, DAPI 染色, PBS 洗 3 次后封片,荧光显微镜拍照,用 Image Pro Plus 6.0 进行图像处理和分析。

1.2.4 总 RNA 提取和 qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平

1.2.4.1 mRNA 提取 细胞按 2×10^4 个/孔的密度接种于 6 孔板中,每孔给予每组相应处理后加入 TRIzol 试剂裂解细胞。用细胞刮刮下细胞,收取细胞悬液于 1.5 ml EP 管中,振荡 1 min,使细胞完全裂解。加入氯仿,剧烈振荡 15 s,混匀后室温放置 3 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 15 min,取上清液加异丙醇,颠倒混匀,室温静置 10 min, 12 000 r/min 4 °C 离心 10 min,弃上清液,加 75% 的乙醇进行洗涤, 7 500 r/min 4 °C 离心 5 min,弃上清液,倒扣 EP 管在洁净的滤纸上,室温静置 20 min。加入 10 μ l 的 DEPC 水冰上溶解,吹打混匀后分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。

1.2.4.2 qRT-PCR 检测 按逆转录试剂盒(QPS-201)说明书反转录后,以 GAPDH 为内参, RT-PCR 检测心肌组织 ANP、BNP、 β -MHC 的相对表达量。引物序列如下: ANP 上游引物 5'-TACGAGACAGT-GACGGACAA-3', 下游引物 5'-GAAGAAGC-CCAGGGTGAT-3'; BNP 上游引物 5'-CAGCTCTCAAAGGACCAAGG-3', 下游引物 5'-CGATCCGGTC-TATCTTCTGC-3'; β -MHC 上游引物 5'-GGGTATC-CGCATCTGTAGGA-3', 下游引物 5'-CCTTTCCGGC-TATCAATGAA-3'; CIC-3 上游引物 5'-AGACATTGCTGCTGACTGGA-3', 下游引物 5'-CCCTCTCT-TCAAACGTCGTC-3'; GAPDH 上游引物 5'-AGGAG-TAAGAAACCCTGGAC-3', 下游引物 5'-CTGGGATG-GAATTGTGAG-3'。PCR 反应体系为 SYBR MIX 10 μ l、上游引物 1 μ l、下游引物 1 μ l、cDNA 2 μ l、ddH₂O 6 μ l。根据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组相对 mRNA 的含量。

1.2.5 JC-1 染色 接种 H9c2 细胞于 48 孔板中, 1×10^5 个/孔,待细胞贴壁后按 1.2.1 进行分组及给药后,按试剂盒说明书进行操作,荧光显微镜下进行拍照,并用 Image J 软件进行分析。

1.2.6 容积调节性能力检测 在观察不同渗透压条件下细胞的容积调节性能力(RVD)时,用等渗液(ISO)灌流细胞 5 min,改换低渗液灌流 20 min,再等渗液灌流 5 min。细胞玻片安放在浴槽中,用数字

式摄像机连接相差显微镜与计算机,调节好显微镜焦距及亮度后,拍摄图像,采用 Image Pro Plus 软件进行处理。

1.2.7 全细胞膜片钳记录 ICl 电流 该实验使用芯片膜片钳技术检测 H9c2 细胞膜上氯电流的变化。膜片钳技术用于记录电压钳位条件下一小片膜中的电流,将细胞悬浮液置于芯片上。然后,通过气泵施加压力进行抽吸,将单个细胞吸引并定位在孔上。通过向孔施加负压来实现膜的密封和破裂以建立整个电池构造。在 NPC 系统中,压力由 Patch-Control 软件控制。使用此软件,可以运行预定义的协议,仪器收集的电流信号由 EPC 10 USB 膜片钳放大器处理后呈现于显示屏并通过程序记录下来。观察并记录等渗条件下的稳定电流 5 min,接着将细胞外环境的等渗液换为低渗液,待细胞电流稳定后,持续记录稳定电流 5 min,最后将细胞外环境的低渗液换为等渗液,记录全程的电流变化。

1.3 统计学处理 应用 GraphPad Prism 8.0 统计软件分析处理数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 转染 H9c2 心肌细胞后 CIC-3 mRNA 及蛋白的表达 图 1 显示,与空白组比较,siRNA 空载对照组并不能影响细胞内 CIC-3 mRNA 和蛋白水平,而 siRNA 转染 H9c2 细胞 48 h 后,使细胞内 CIC-3 mRNA 降低($F = 6.35$, $P < 0.05$)但并没有引起细胞内 CIC-3 蛋白水平的变化($F = 2.77$, $P > 0.05$); siRNA CIC-3 转染 72 h 后,能诱导细胞内 CIC-3 mRNA 和蛋白水平都降低($F = 52.84$, $P < 0.01$ 和 $F = 70.93$, $P < 0.01$)。结果表明,siRNA 转染 H9c2 细胞 72 h 后可以成功构建 CIC-3 表达下调模型。

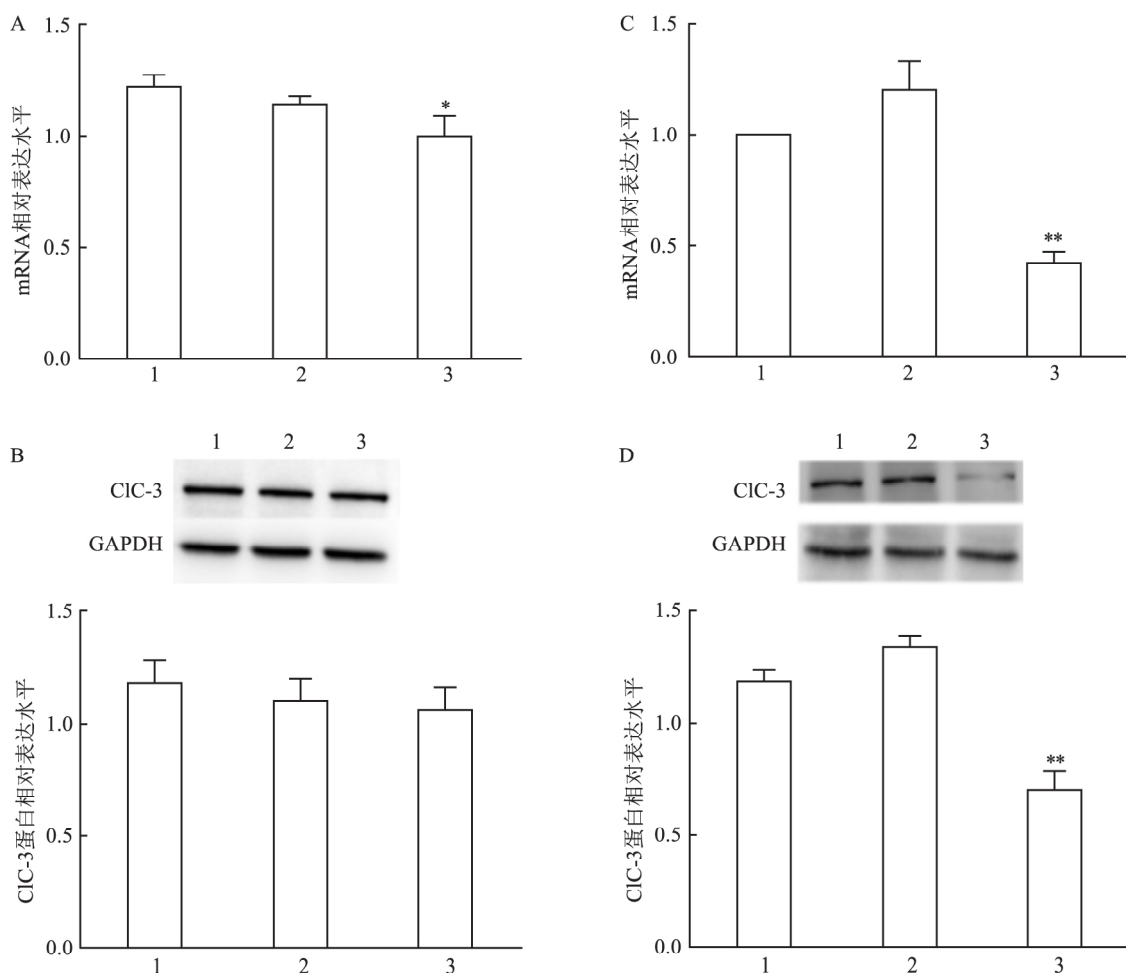


图1 siRNA CIC-3抑制H9c2细胞CIC-3表达

A: 用 siRNA 转染 48 h 细胞中 CIC-3 mRNA 的表达; B: Western blot 法测量 siRNA 48 h 转染的细胞中 CIC-3 蛋白的水平; C: 用 siRNA 转染 72 h 细胞中的 CIC-3 mRNA 表达; D: Western blot 法检测 siRNA 转染 72 h 细胞中 CIC-3 蛋白的水平; 1: 空白组; 2: 转染空载组; 3: CIC-3 敲低组; 与空白组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 CIC-3 表达下调对 H9c2 心肌细胞的影响 该研究分别采用 α -tubulin(一种细胞骨架蛋白)进行荧光染色和 qRT-PCR 的方法来观察 CIC-3 表达下调对 H9c2 心肌细胞表面积和细胞内几个常见的心肌肥大标志因子 ANP、BNP 和 β -MHC mRNA 的表达水平的影响。如图 2 所示,ISO(10 μ mol/L)刺激 H9c2 细胞 48 h 后,心肌细胞的表面积增加[ISO 组 *vs* 空白组, (2 130.40 $\pm$ 369.78) *vs* (877.33 $\pm$ 109.88), $F = 11.33$, $P < 0.01$, 图 2A、B],且 ANP、BNP 和 β -MHC mRNA 的表达水平降低($F = 9.38$ 、597.9、86.51 均 $P < 0.01$);而与 siRNA 空载对照组不同,siRNA 诱导的 CIC-3 敲低组的细胞表面积增加[CIC-3 敲低组 *vs* 空白组, (2 127.33 $\pm$ 109.62) *vs* (877.33 $\pm$ 109.88), $F = 4.93$, $P < 0.01$],ANP、BNP 和 β -MHC mRNA 的表达水平升高($F = 12.8$ 、1 088.63、6.6 $P < 0.01$)。

2.3 CIC-3 表达下调对 H9c2 心肌细胞线粒体功能的影响 JC-1 是一种广泛用于检测 MMP $\Delta\Psi_m$ 的理想荧光探针,红色荧光代表 JC-1 聚集体(即 MMP 较高),绿色荧光代表 JC-1 单体(即 MMP 较低),绿色荧光与红绿荧光强度的比值越高说明 MMP 越高;线粒体电子传递链抑制剂 CCCP(CON+) 被用

作阳性对照。如图 3 所示,与空白组相比,siRNA 空载组不能引起 MMP 发生变化($F = 3.26$, $P > 0.05$),而与 CCCP(CON+) ($F = 64.5$, $P < 0.01$) 和 ISO($F = 30.49$, $P < 0.01$) 处理一样,siRNA CIC-3 能使 MMP 下降($F = 280.5$, $P < 0.01$),说明 CIC-3 表达下调能诱导线粒体结构和功能损伤。

2.4 CIC-3 表达下调对 H9c2 心肌细胞容积激活性氯离子电流的影响 与空白组相比,空载 siRNA 处理后不会引起细胞容积激活性氯电流的改变($F = 17.25$, $P < 0.01$),而 ISO 诱导与 CIC-3 表达下调都可抑制细胞容积激活性氯离子电流($F = 7.72$, $P < 0.01$)。结果显示,CIC-3 可能通过调节容积激活性氯离子电流调控 H9c2 心肌细胞的表面积大小。见图 4。

2.5 CIC-3 表达下调对 H9c2 心肌细胞容积调节能力的影响 如图 5 所示,与空白组相比,ISO 诱导 H9c2 心肌细胞肥大后,H9c2 细胞的容积调节能力下降($F = 1.49$, $P < 0.01$);而空载 siRNA 不引起细胞容积调节能力的改变($F = 4.59$, $P > 0.05$);siRNA 转染敲低 CIC-3 组与 ISO 组类似,也可抑制细胞容积调节能力($F = 2.67$, $P < 0.01$)。以上结果表明 CIC-3 表达下调导致 H9c2 细胞的肥大可能与

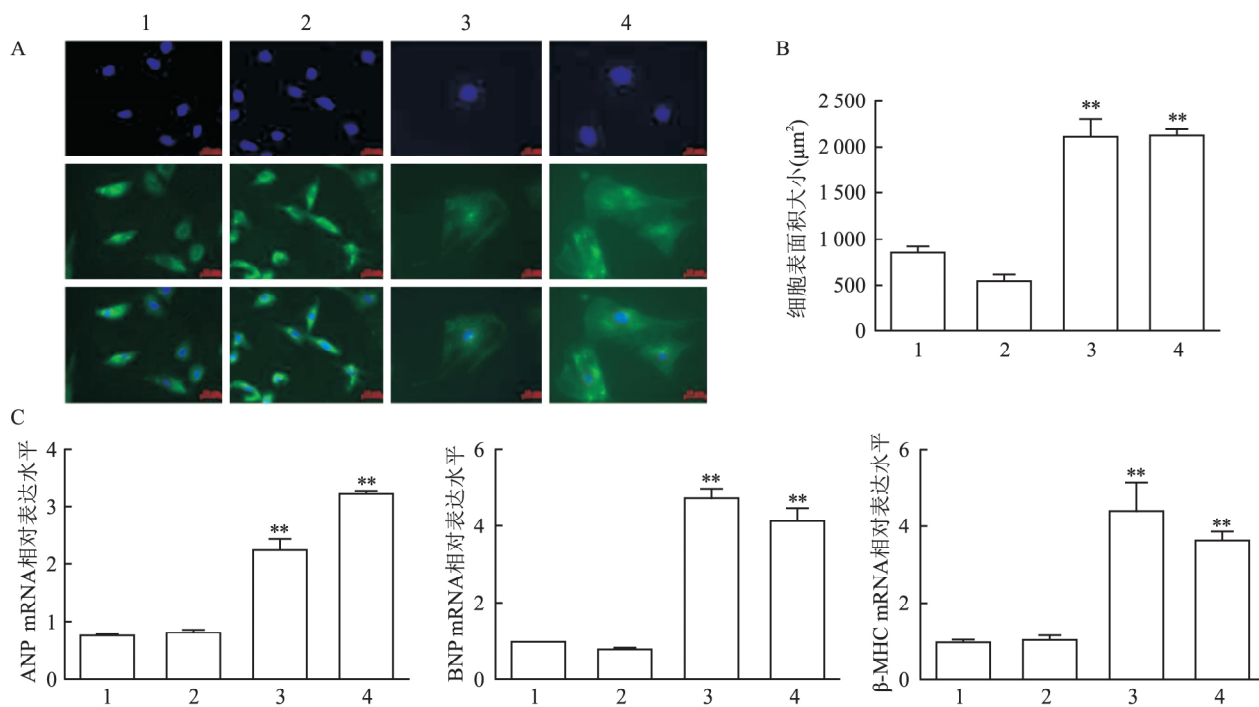


图2 CIC-3 表达下调可使 H9c2 细胞产生心肌肥大

A: 免疫荧光检测细胞表面积; B: H9c2 细胞面积统计图; C: 心肌肥大标志因子 ANP、BNP 和 β -MHC mRNA 的表达水平; 1: 空白组; 2: siRNA 空载对照组; 3: siRNA 转染敲低 CIC-3 组; 4: CIC-3 敲低组; 与空白组比较: ** $P < 0.01$

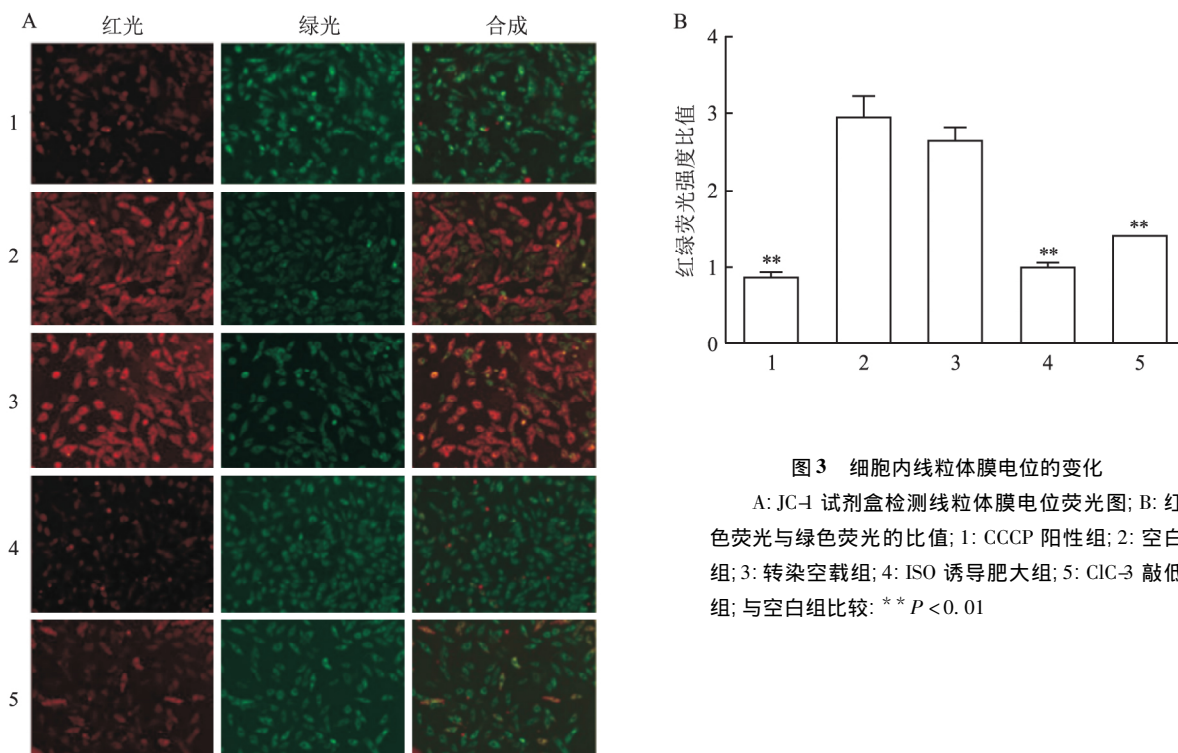


图3 细胞内线粒体膜电位的变化

A: JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位荧光图; B: 红色荧光与绿色荧光的比值; 1: CCCP 阳性组; 2: 空白组; 3: 转染空载组; 4: ISO 诱导肥大组; 5: CIC-3 敲低组; 与空白组比较: ** $P < 0.01$

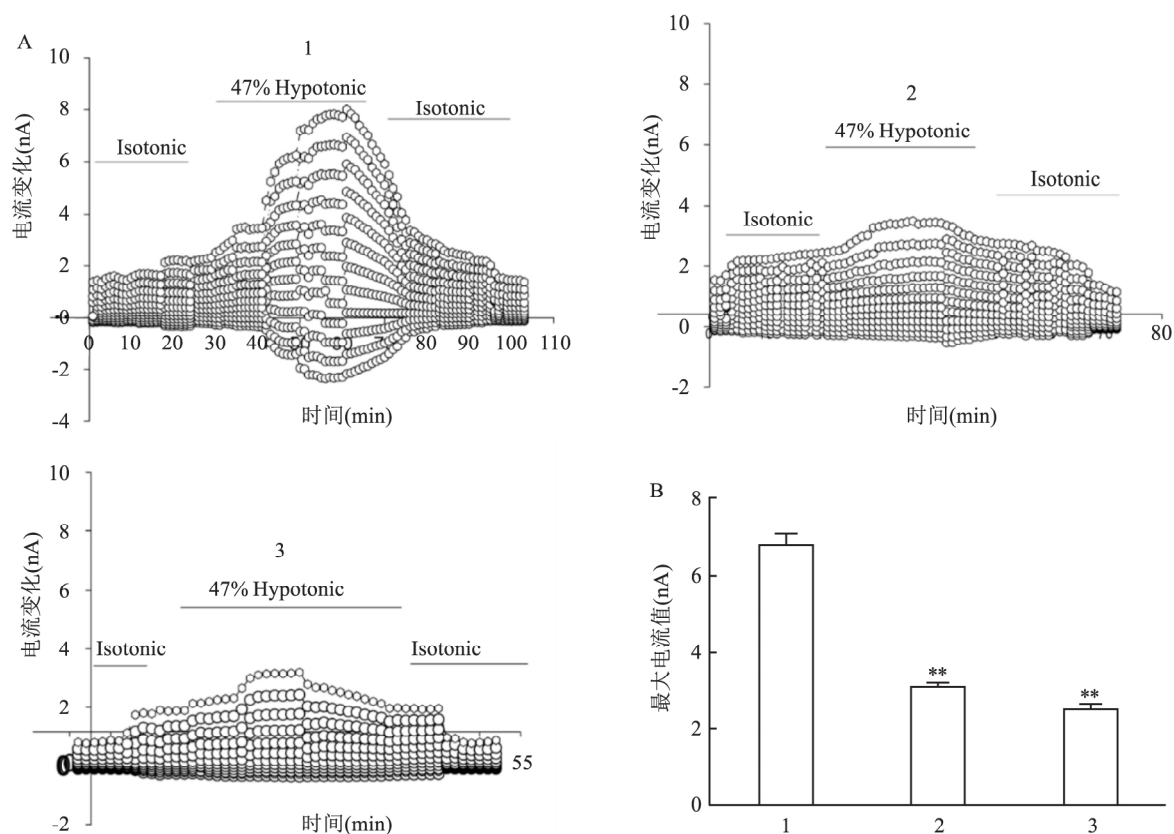


图4 CIC-3 表达下调对 H9c2 细胞容积激活性氯离子电流的影响

A: H9c2 细胞在等渗 - 低渗 - 等渗溶液中全过程记录的细胞容积激活性氯电流; B: 低渗状态下细胞最大容积激活性氯电流值统计图; 1: 空白组; 2: ISO 诱导肥大组; 3: CIC-3 敲低组; 与空白组比较: ** $P < 0.01$

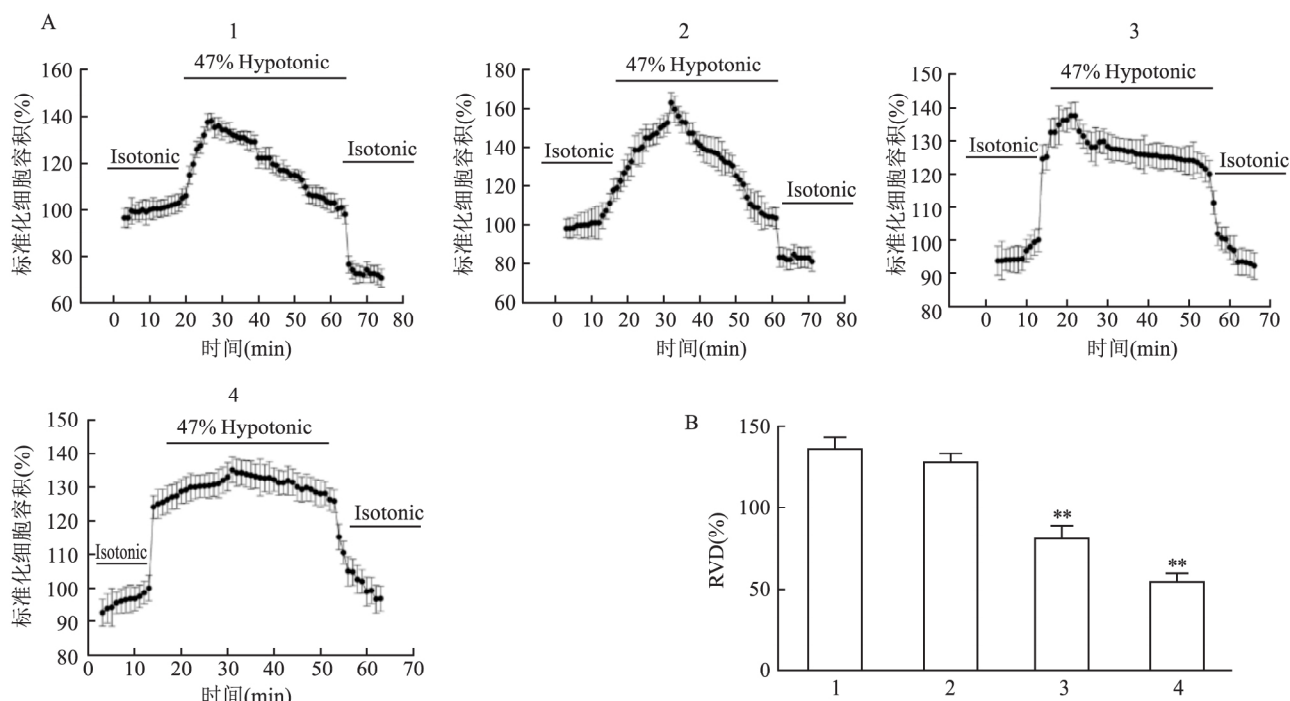


图5 CIC-3 表达下调对 H9c2 细胞 RVD 的影响

A: H9c2 细胞在等渗-低渗-等渗溶液中标准体积的变化; B: RVD 值的统计图; 1: 空白组; 2: 转染空载体组; 3: ISO 诱导肥大组; 4: CIC-3 敲低组; 与空白组比较: ** $P < 0.01$

其下调细胞的容积调节能力有关。

3 讨论

心肌肥大的特征是长期高血压引起的室壁厚度增加,是心血管疾病的主要危险因素,严重威胁到人类健康。它常会引起心脏收缩功能障碍、心肌间质的纤维化以及胎儿基因 ANP、BNP、 β -MHC 的等效分子的表达增加^[6]。CIC-3 氯通道是容积调节性氯离子通道基因家族成员之一,在各类动物体内广泛表达。参与到细胞兴奋、迁移、增殖、分化、凋亡和体积稳态的过程中^[7]。研究^[8-9]表明 CIC-3 在主动脉缩窄术诱导的心肌肥厚及心力衰竭中起着重要作用。因此, CIC-3 可能具有调控心肌肥大的作用。该研究在前期研究基础上进一步采用 siRNA 转染 H9c2 心肌细胞 72 h 成功构建了 CIC-3 表达下调的细胞模型。CIC-3 下调的同时能诱导 H9c2 心肌细胞表面积增加,心肌肥大标志性因子 ANP、BNP 和 β -MHC mRNA 的表达水平升高,表明 CIC-3 表达下调能诱导心肌细胞肥大。这与前期研究^[2]在大鼠原代心肌细胞、H9c2 细胞和 C57 小鼠以及 AAV-9 介导的 CIC-3 过表达小鼠的结果是一致的。同时该研究还通过与计算机连接的显微镜和膜片钳技术检测了细胞 RVD 能力和细胞容积激活性氯离子电流。

结果显示, CIC-3 下调降低细胞的 RVD 能力和细胞的容积激活性氯离子电流,这些可能与其诱导心肌细胞肥大具有一定关系。

心脏是机体的重要器官,线粒体约占心肌细胞质量的 30%,心脏空白运转所需的能量约 95% 来自线粒体^[10]。因此,线粒体功能与心脏功能息息相关,线粒体在细胞内信号传导、细胞死亡等方面发挥着重要作用^[11]。有报道^[12]显示,由于线粒体功能受损导致的能量生成障碍将导致心脏代谢疾病。有研究^[13]表明,肥大性心肌病中也观察到心脏线粒体肿胀、嵴断裂、呼吸链复合物活性降低。MMP 作为重要的生物能量指标,能够反映线粒体的功能。该研究表明这与 ISO 处理相似, CIC-3 下调也能诱导 MMP 降低,而导致线粒体功能损伤,这可能也与其能诱导心肌细胞肥大有关。

参考文献

- [1] Samak M, Fatullayev J, Sabashnikov A, et al. Cardiac hypertrophy: an introduction to molecular and cellular basis [J]. Med Sci Monit Basic Res, 2016, 22(2): 75-9.
- [2] Li C, Huang D, Tang J, et al. CIC-3 chloride channel is involved in isoprenaline-induced cardiac hypertrophy [J]. Gene, 2018, 642(5): 335-42.
- [3] Liang G, Cheng L, Chen X, et al. CIC-3 promotes angiotensin II-

- induced reactive oxygen species production in endothelial cells by facilitating Nox2 NADPH oxidase complex formation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(11): 1725–34.
- [4] Wang D, Wang H, Gao F, et al. ClC-3 promotes osteogenic differentiation in MC3T3-E1 cell after dynamic compression [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(6): 1606–13.
- [5] 陈梦青, 黄丹, 孙宇, 等. 腹腔注射去甲肾上腺素小鼠心肌组织形态学、容积调节性氯离子通道蛋白3表达变化及其意义[J]. *山东医药*, 2019, 59(12): 41–3.
- [6] Protsenko Y, Balakin A, Kuznetsov D, et al. Contractility of right ventricular myocardium in male and female rats during physiological and pathological hypertrophy [J]. *Bull Exp Biol Med*, 2017, 162(3): 303–5.
- [7] Guo R, Pan F, Tian Y, et al. Down-regulation of ClC-3 expression reduces epidermal stem cell migration by inhibiting volume-activated chloride currents [J]. *J Membr Biol*, 2016, 249(3): 281–92.
- [8] Halbach M, Egert U, Hescheler J, et al. Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2003, 13(5): 271–84.
- [9] Xiong D, Heyman N S, Airey J, et al. Cardiac-specific, inducible ClC-3 gene deletion eliminates native volume-sensitive chloride channels and produces myocardial hypertrophy in adult mice [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(1): 211–9.
- [10] Gibb A A, Lazaropoulos M P, Elrod J W. Myofibroblasts and fibrosis: mitochondrial and metabolic control of cellular differentiation [J]. *Circ Res*, 2020, 127(3): 427–47.
- [11] Wang L, Gao K, Wang D. Exercise training has restorative potential on myocardial energy metabolism in rats with chronic heart failure [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(8): 818–23.
- [12] Wang Y, Che J, Zhao H, et al. Platycodin D inhibits oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 3219–24.
- [13] Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, et al. Aging and autophagy in the heart [J]. *Circ Res*, 2016, 118(10): 1563–76.

The volume-activated chloride channel protein ClC-3 down-expression promotes the hypertrophy of H9c2 cardiomyocytes and its mechanism

Sun Yu¹, Chen Mengqing², Wang Shuai¹, et al

(¹*School of Life Sciences and Biopharmaceuticals, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006;*

²*Shenzhen Institute of Advanced Technology Chinese Academy of Science, Shenzhen 440305)*

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of down-regulation of volume-activated chloride channel protein ClC-3 on H9c2 cardiomyocytes. **Methods** H9c2 cardiomyocytes were transfected with siRNA to construct a cell model of down-regulated ClC-3; immunofluorescence staining was used to observe the surface area of H9c2 cells; qRT-PCR was used to detect ANP, BNP and β -MHC of H9c2 cells; the level of mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 fluorescent probe; the image analysis system was used to study the regulatory volume decrease (RVD) of H9c2 cardiomyocytes; the change of chloride current on H9c2 cell membrane was detected by whole cell patch clamp technology. **Results** Compared with the control group, siRNA transfection of H9c2 cells for 72 h could reduce the expression levels of ClC-3 mRNA and protein; and the down-regulation of ClC-3 expression was similar to isoproterenol, which could increase the surface area of H9c2 cardiomyocytes and the ionic factors. Besides, it decreased the mitochondrial membrane potential of H9c2 cells, reduced the capacity of volume regulation, and inhibited the activation of volume-activated chloride ion current. **Conclusion** The down-regulation of ClC-3 expression induces H9c2 cardiomyocyte hypertrophy. Its mechanism may be related to its damage to mitochondrial function, reduction of cell volume regulation and inhibition of volume-activated chloride current activation.

Key words ClC-3; H9c2 cells; cardiomyocyte hypertrophy; mitochondrial membrane potential; volume activated chlorine current