

· 论 著 ·

小鼠脑动脉平滑肌钙激活钾通道基本特性和动力学调控研究*

刘雪茹¹, 谭晓秋², 杨 艳², 曾晓荣², 唐显玲^{1△}

(泸州医学院附属医院:1. 麻醉科;2. 医学电生理学省部共建教育部重点实验室, 四川泸州 646000)

摘要:目的 采用膜片钳技术记录小鼠脑动脉平滑肌细胞上的大电导钙激活钾通道(BK_{Ca})和自发瞬时外向电流(STOCs),研究了其基本特性以及钙离子对通道动力学的调控。方法 采用两步法急性酶分离小鼠脑动脉,得到单个平滑肌细胞。使用200 μg/mL两性霉素B为穿孔剂进行穿孔全细胞膜片钳实验,包括全细胞宏观电流记录和STOCs记录,采用inside-out和outside-out构型进行单通道电流记录。结果 BK_{Ca}宏观电流和STOCs能够被BK_{Ca}的特异性阻断剂IbTX(200 nmol)阻断。BK_{Ca}单通道具有明显电压依赖性(半数最大激活电压V_{1/2}=78.09 mV)、K⁺选择性和钙敏感性(Ca²⁺解离常数K_d=0.881 μmol),能够被胞外IbTX阻断。胞内Ca²⁺调控通道动力学特性主要表现为减少了开放时间常数,促进了通道由关闭向开放的转变。结论 BK_{Ca}宏观电流和STOCs非常容易记录,单通道活性好,具有BK_{Ca}的电生理学特性。小鼠脑动脉平滑肌是研究BK_{Ca}功能活动和血管活性药物作用机制的良好实验标本。

关键词:血管平滑肌;大电导钙激活钾通道;动力学;钙调控

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.17.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)17-1675-03

Characteristics and kinetics modulation of BK_{Ca} in mouse smooth muscle cells*Liu Xueru¹, Tan Xiaochu², Yang Yan², Zeng Xiaorong², Tang Xianling^{1△}

(1. Department of Anesthesiology; 2. Key Laboratory of Medical Electrophysiology,

Ministry of Education, Affiliated Hospital Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the basic characteristics of BK_{Ca} and STOCs and the effect of calcium on BK_{Ca} kinetics by using patch clamp technique. **Methods** Smooth muscle cells were freshly isolated from mouse cerebral arteries with two steps. BK_{Ca} macro-currents and STOCs were recorded by perforated patch clamp. Single channel current of BK_{Ca} was recorded in inside-out and outside-out configuration. **Results** BK_{Ca} macro-currents and STOCs were significantly suppressed by 200 nM IbTX, a specific blocker of BK_{Ca}. The characteristics of single channel included large conductance, voltage dependence (V_{1/2} = 78.09 mV) and calcium dependence (K_d = 0.881 μM) and being blocked by extracellular IbTX. Intracellular calcium ion modulated the kinetics of BK_{Ca} including reducing the closed time constant and facilitating the transition from closed state to open state. **Conclusion** The characteristic properties of BK_{Ca} in mouse cerebral arterial smooth muscle cells are very similar to those found in other tissues. The currents can be recorded easily and good for studying the modulation of BK_{Ca}.

Key words: vascular smooth muscle; large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel; kinetics; calcium modulation

大电导钙激活钾通道 (large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, BK_{Ca}) 在血管平滑肌等多种组织中表达,并且在许多病理和生理过程中起重要作用,是一些内源性和外源性血管活性物质发挥作用的重要靶点^[1]。BK_{Ca}在血管平滑肌细胞上分布极为丰富,携带约70%~80%的外向电流, BK_{Ca}的激活引起膜的超极化,从而调节细胞的兴奋性^[2]。近年来,细胞内局部自发性的Ca²⁺释放事件日益引起了人们的关注。平滑肌细胞内肌质网(sarcoplasmic reticulum, SR)上钠诺定钙释放通道的协调开放产生的钙火花引起细胞内局部、瞬时的Ca²⁺浓度升高激活邻近细胞膜上的BK_{Ca},使其开放概率显著增加,产生自发瞬时外向电流(spontaneous transient outward currents, STOCs)^[3]。STOCs可进一步引起细胞膜超极化,抑制经L型钙通道的Ca²⁺内流,促使平滑肌舒张。本研究通过应用两性霉素B穿孔的全细胞膜片钳技术,在前期工作基础上,研究急性酶分离的小鼠脑动脉平滑肌细胞STOCs的基本特性,并利用单通道膜片钳技术进行通道动力学调控研究。

1 材料与方

1.1 材料 正常小鼠10只,体质量18~22 g,雌雄不拘,由泸州医学院动物房提供。F型胶原酶、II型胶原酶、二巯苏糖醇

(DTT)、二巯基赤藓醇(DTE)、木瓜蛋白酶、清蛋白、两性霉素B、IbTX均购自Sigma公司,其余试剂为国产分析纯。采用微管电极拉制仪(PC-10, Narishige, Japan)进行玻璃微管电极的拉制,电极在充灌电极液后尖端阻抗为2~4 MΩ,电流信号经膜片钳放大器(Axopatch 200B)放大,2 kHz低通滤波,经12位A/D-D/A转换器(Digidata1322A)转换后在专用软件系统pClamp(Version 9.0, Axon Instruments, USA)控制下记录并储存于计算机硬盘内,采样频率为10 kHz,适当补偿串阻后的入口阻抗小于或等于10 MΩ。

1.2 单个脑动脉平滑肌细胞的分离 小鼠断头处理,迅速取出大脑置于冰的生理盐溶液(PSS)中,小心分离出大脑底部动脉(包括willis环及其分支),置于4℃低钙PSS液(0.1 mmol/L CaCl₂)中,去除血管周围组织及筋膜,将血管组织置于盛有酶I(0.3 mg/mL木瓜蛋白酶和0.2 mg/mL DTE)EP管中,36.5℃恒温水浴箱中消化7.0~7.5 min;再加入酶II(0.8 mg/mL F型胶原酶,1.0 mg/mL II型胶原酶和1.0 mg/mL DTT)消化7.0~7.5 min,轻轻吹打,得到单个脑动脉平滑肌细胞,置于4℃冰箱备用。

1.3 全细胞电流的记录 全细胞电流记录采用两性霉素B

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370527;30670763)。

△ 通讯作者, Tel:13980259019; E-mail:anesthesia2000@163.com。

(200 μg/mL)穿孔膜片钳进行。浴液为:NaCl 137 mmol/L, KCl 5.9 mmol/L, MgCl₂ 1.2 mmol/L, CaCl₂ 1.8 mmol/L, glucose 14 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, pH 7.4(NaOH);电极液为:KCl 128 mmol/L, NaCl 12 mmol/L, MgCl₂ 4 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 0.05 mmol/L, pH 7.2(KOH), 200 μg/mL 两性霉素 B。对于宏观电流记录采用阶跃刺激方案(保持电位-60 mV,从-60~+60 mV,时程400 mV)和斜坡刺激方案(保持电位-60 mV,从-80~+70 mV,斜率 0.375 V/s,时程 400 ms),刺激频率 1 Hz,采样频率 10 kHz。STOCs 记录采用固定某一电位进行记录,时程 30 s。

1.4 单通道电流的记录 单通道电流记录主要采用 inside-out 构型进行。电极内液成分:K-Asp 40 mmol/L, KCl 100 mmol/L, pH 7.2 HEPES-K 10 mmol/L, EGTA 2 mmol/L;浴液成分:K-Asp 100 mmol/L, KCl 40 mmol/L, pH 7.4 HEPES-K 10 mmol/L 和 EGTA 1 mmol/L。分别记录不同电压和不同游离 Ca²⁺ 浓度(0、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L)下 BK_{Ca} 的活性,选取膜电位+40 mV时的电流作为统计值,分析 BK_{Ca} 的电压依赖性、Ca²⁺ 敏感性和通道动力学特征。

1.5 统计学处理 采用 MiniAnalysis program (synaptosoft software, leonia, NJ)分析 STOCs(钳制电位=-30 mV,记录 30 s)的幅度和频率,设定 STOCs 的阈值为 10 pA,其余膜片钳数据采用 ClampFit 10.1 进行分析。采用 SPSS 14.0 软件单因素方差进行统计学分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。药物浓度与标准化的总开放概率(NPo)关系用 Hill 方程 $Y = Xb / (cb + Xb)$ (X:胞内游离 Ca²⁺ 浓度;c:Ca²⁺ 解离常数(Kd);b:希氏常数(nH))。

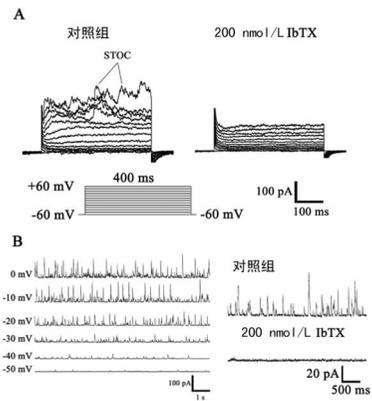
2 结 果

2.1 BK_{Ca}全细胞基本特性 本实验采用全细胞穿孔膜片钳技术记录 BK_{Ca} 宏观电流和 STOCs,保持电位为-60 mV,接近平滑肌细胞的静息电位。结果显示,BK_{Ca} 激活呈明显电压依赖性,随着去极化电压的增加,BK_{Ca} 宏观电流密度明显地增加(图 1)。进一步分析宏观电流特征可以看出,STOCs 随机叠加于 BK_{Ca} 宏观电流之上,呈大噪声样(图 1)。而对于 STOCs 的记录则在持续稳定的膜电位下进行长时程采样分析(-50~0 mV,共 6 个电位水平,持续时间 30 s)。多个膜电位水平均可记录到 STOCs,随着膜去极化电位的增加,STOCs 的频率和幅度均增加,表现出明显的电压依赖性。BK_{Ca} 宏观电流和 STOCs 都能被 BK_{Ca} 的特异性阻断剂 IbTX(200 nmol/L)抑制(图 1),表明 STOCs 电流主要为 BK_{Ca} 所携带。

2.2 BK_{Ca}单通道基本特性 采用 inside-out 和 outside-out 膜片记录 BK_{Ca} 的单通道特性(图 2)。在 inside-out 构型下,本实验还采用了内面向外单通道膜片钳技术对 BK_{Ca} 进行研究。在浴液和电极液呈对称性高钾(140 mmol/L)状态下,钳制电位从-40 mV 去极化到+40 mV,每次记录时间为 30 s,可见随着钳制电位的增加,通道开放频率明显增加。将不同电压下的通道开放概率作图并经过 Boltzmann 方程拟合,得到通道的电压依赖性曲线和半数最大激活电压(V_{1/2})为 78.09 mV。

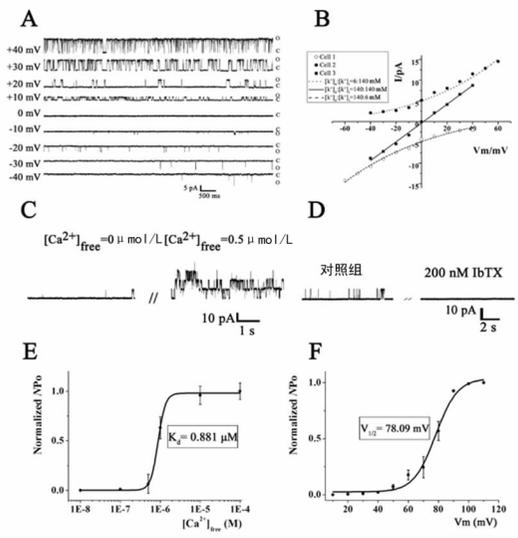
通过改变细胞膜内外 K⁺ 浓度,即 $[K^+]_o : [K^+]_i = 140 : 140, [K^+]_o : [K^+]_i = 140 : 6, [K^+]_o : [K^+]_i = 6 : 140$,分别在以上几种情况下记录不同钳制电位下的电流,然后做 I-V 曲线,经 Goldman-Hodgkin-Katz 方程拟合,得到反转电位与伦斯特方程 $EK = (RT/F) \ln [K^+]_o / [K^+]_i$ 计算得到的理论值基本一致,在对称性高钾溶液中,BK_{Ca} 的反转电位为零,结果表明 BK_{Ca} 具有明显的 K⁺ 选择性(图 2)。在对称性高钾溶液中,通过计算得到单个 BK_{Ca} 电导值为(205.4 ± 43.6) pS(n

= 25),表明 BK_{Ca} 具有大电导特性。



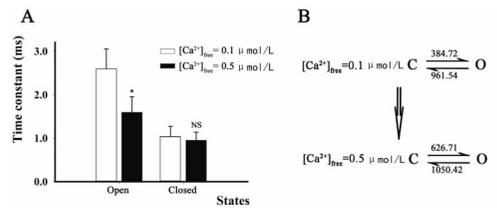
A: BK_{Ca}通道全细胞宏观电流图;B: STOCs 的电压依赖性图。

图 1 小鼠脑动脉平滑肌 BK_{Ca} 宏观电流和 STOCs 基本特性



A: inside-out 构型下, BK_{Ca} 通道具有明显的电压依赖性; B: 不同钾离子浓度梯度下 BK_{Ca} 通道的 I-V 曲线(用 Na⁺ 替代 K⁺); C: BK_{Ca} 通道钙离子依赖性的典型电流记录图(inside-out 构型下, +40 mV 膜电位); D: BK_{Ca} 通道 IbTX 敏感性; E: 不同 [Ca²⁺]_{free} 时的量效曲线; F: BK_{Ca} 开放概率的电压依赖性。

图 2 小鼠脑动脉平滑肌 BK_{Ca} 单通道电流基本特性



A: [Ca²⁺]_{free} = 0.1 μmol/L 和 0.5 μmol/L 对 BK_{Ca} 单通道开放和关闭时间常数的影响; B: 胞内钙对通道动力学影响的模式图; “C”和“O”代表 BK_{Ca} 通道“关闭”和“开放”的两个状态。

图 3 胞内 Ca²⁺ 对 BK_{Ca} 动力学的影响

另外,改变浴液 Ca²⁺ 浓度,可见通道具有明显的 Ca²⁺ 依赖性,开放概率随着浴液游离 Ca²⁺ 浓度的增加而增加,在 Ca²⁺ 浓度为 0.5 μmol 时,通道呈多个水平同时开放,见图 2。将不同 [Ca²⁺]_{free} 时通道的标准化开放概率进行拟合,得到 [Ca²⁺]_{free} 的量效曲线和通道 Ca²⁺ 解离常数(Kd)为

0.881 $\mu\text{mol/L}$ (图 2)。在外面向外式膜片下, BK_{Ca} 的特异性阻断剂 IbTX(200 nmol)能明显抑制该电流(IbTX 作用于通道外口)。

2.3 Ca^{2+} 对 BK_{Ca} 的动力学调控 为研究 Ca^{2+} 对通道的动力学调控,选择了 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 0.1 \mu\text{mol/L}$ 和 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 进行分析。从图 3 可以看出, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} = 0.5 \mu\text{mol/L}$ 时, BK_{Ca} 的开放时间常数明显降低 $[(2.599 0 \pm 0.452 6) \text{ vs } (1.596 0 \pm 0.357 3) \text{ms}, P < 0.05, n = 5]$, 但是通道的关闭时间常数没有明显改变 $[(1.041 0 \pm 0.231 4) \text{ vs } (0.952 0 \pm 0.186 3) \text{ms}, P > 0.05, n = 5]$ (图 3)。进一步采用开放和关闭两个状态分析通道的动力学, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ 由 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 增加到 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时,通道的开放速率明显增加(由 384.72 s^{-1} 增加到 626.71 s^{-1})然而,通道的关闭速率没有明显影响,见图 3。表明胞内 Ca^{2+} 通过促进了 BK_{Ca} 由关闭向开放状态的转变而激活 BK_{Ca} , 但是没有改变通道从开放状态向关闭状态的转变。

3 讨 论

钾通道及他们携带的 K^+ 电流在血管张力的调节中十分重要。血管平滑肌上的钾通道主要有钙激活钾通道(K_{Ca}), ATP 敏感钾通道(K_{ATP}), 延迟整流钾通道和电压依赖性钾通道。其中主要为大电导钙激活钾通道,携带约 70%~80% 的外向电流,其功能状态及变化对平滑肌的紧张性调节起重要作用^[4]。本研究旨在研究小鼠脑动脉平滑肌细胞 BK_{Ca} 基本电生理特性,包括钙敏感性、电压依赖性、 K^+ 选择性、大电导特性、IbTX 依赖性等,结果表明小鼠脑动脉平滑肌细胞 BK_{Ca} 具有与人肠系膜动脉平滑肌、人奥迪括约肌、支气管平滑肌、猪冠状动脉平滑肌、大鼠主动脉平滑肌等组织 BK_{Ca} 类似的电生理学特性^[5-7]。平滑肌细胞全胞内钙浓度的增加激活肌质网上的纳诺定受体,引起胞内钙库释放钙(Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR),产生钙火花,这种局部 Ca^{2+} 浓度升高激活邻近的 BK_{Ca} 通道产生 STOCs,引起细胞膜的超极化,导致细胞舒张。STOCs 是胞内钙火花事件在膜电流变化上的体现。因此,STOCs 是反应 BK_{Ca} 通道胞内钙敏感性的指标之一^[3,8-9]。STOCs 只在细胞功能活动正常时才能记录到。通过 STOCs 电流的记录可以看出,通道电流非常容易记录,细胞具有较好的活性,利于研究通道功能调控和血管活性药物的作用机制。

通道动力学调控机制是通道功能调控的重要组成部分。随着研究的深入,探讨药物作用的门控动力学机制、分析药物作用的离子通道靶点已成为目前药物研究的热点之一。研究表明,不同药物对 BK_{Ca} 的门控动力学机制可能表现不一,不同的动力学特征表明药物作用位点的不同。如中药厚朴则对 BK_{Ca} 的开放和关闭状态均起作用,一方面促进了通道由关闭向开放状态的转变,另一方面抑制了通道由开放向关闭状态的

转变^[10]。本研究得出 Ca^{2+} 对通道的门控动力学主要表现为促进了通道由关闭状态向开放状态的转变,这与在其他标本的研究结果一致。表明小鼠脑动脉血管平滑肌 BK_{Ca} 可以作为通道门控动力学调控研究的理想标本之一。

参考文献:

- [1] Latorre R, Brauchi S. Large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK) channel: activation by Ca^{2+} and voltage[J]. Biol Res, 2006, 39(3): 385-401.
- [2] Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, et al. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone [J]. Physiology(Bethesda), 2006, 21: 69-78.
- [3] Jaggar JH, Porter VA, Lederer WJ, et al. Calcium sparks in smooth muscle[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278(2): C235-256.
- [4] Ko EA, Han J, Jung ID, et al. Physiological roles of K^+ channels in vascular smooth muscle cells [J]. J Smooth Muscle Res, 2008, 44(2): 65-81.
- [5] Yang Y, Cai F, Li PY, et al. Activation of high conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels by sodium tanshinoneII-A sulfonate (DS-201) in porcine coronary artery smooth muscle cells[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 598(1/3): 9-15.
- [6] Sorensen MV, Matos JE, Sausbier M, et al. Aldosterone increases KCa1.1 (BK) channel-mediated colonic K^+ secretion[J]. J Physiol, 2008, 586(Pt17): 4251-4264.
- [7] Pluznick JL, Sansom SC. BK channels in the kidney: role in K^+ secretion and localization of molecular components [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 291(3): F517-529.
- [8] Wellman GC, Nathan DJ, Saundry CM, et al. Ca^{2+} sparks and their function in human cerebral arteries[J]. Stroke, 2002, 33(3): 802-808.
- [9] Furstenu M, Lohn M, Ried C, et al. Calcium sparks in human coronary artery smooth muscle cells resolved by confocal imaging [J]. J Hypertens, 2000, 18(9): 1215-1222.
- [10] Wu SN, Chen CC, Li HF, et al. Stimulation of the BK_{Ca} channel in cultured smooth muscle cells of human trachea by magnolol[J]. Thorax, 2002, 57(1): 67-74.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2011-11-22)

(上接第 1674 页)

Med Assoc, 2007, 57(12): 595-599.

- [9] Stevens DP, Mackay IR. Increased carcinoembryonic antigen in heavy cigarette smokers [J]. Lancet, 1973, 2(7840): 1238-1239.
- [10] Alexander JC, Silverman NA, Chretien PB. Effect of age and cigarette smoking on carcinoembryonic antigen levels [J]. JAMA, 1976, 235(18): 1975-1979.

- [11] Anisimov VN. Biology of aging and cancer. Cancer Control [J]. Cancer Contril, 2007, 14(1): 23-31.
- [12] Anisimov VN, Sikora E, Pawelec G. Relationships between cancer and aging: a multilevel approach[J]. Biogerontology, 2009, 10(4): 323-338.

(收稿日期:2011-10-09 修回日期:2011-11-22)