

氟灭酸对豚鼠微动脉平滑肌细胞间缝隙连接的抑制作用*

张治平¹, 司军强¹, 李新芝², 李丽¹, 赵磊¹, 魏丽丽¹, 于秀石¹, 马克涛^{1△}
(石河子大学医学院: 1. 生理学教研室; 2. 病理生理学教研室, 新疆石河子 832002)

摘要:目的 探讨氟灭酸(FFA)对微动脉平滑肌细胞间缝隙连接的影响。方法 采用全细胞膜片钳技术观察 FFA 对微动脉段上平滑肌细胞膜电容(C_{input})、膜电导(G_{input})或膜电阻(R_{input})的影响。结果 FFA 可以浓度依赖和可逆的降低微动脉段上平滑肌细胞的 C_{input} 和 G_{input} (或者增加 R_{input})。FFA 抑制肠系膜动脉(MA)和脑动脉(BA)平滑肌细胞 G_{input} 的 IC₅₀ 分别为 56、33 $\mu\text{mol/L}$, 微动脉间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。FFA 浓度大于或等于 300 $\mu\text{mol/L}$ 时, MA 和 BA 微动脉段上平滑肌细胞的 C_{input} 、 G_{input} 或 R_{input} 与相应单个平滑肌细胞十分接近。结论 FFA 可以浓度依赖和可逆的阻断微动脉平滑肌细胞间缝隙连接, FFA 的浓度大于或等于 300 $\mu\text{mol/L}$ 时可以完全阻断微动脉平滑肌细胞间的缝隙连接。FFA 对 MA 和 BA 微动脉细胞间缝隙连接具有同源性。

关键词:膜片钳术; 肌细胞, 平滑肌; 微动脉; 氟灭酸; 缝隙连接

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.05.023

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)05-0572-03

Inhibitory effects of flufenamic acid on gap junction of vascular smooth muscle cells in guinea pig*

Zhang Zhiping¹, Si Junqiang¹, Li Xinzhi², Li Li¹, Zhao Lei¹, Wei Lili¹, Yu Xiushi¹, Ma Ketao^{1△}

(1. Department of Physiology; 2. Department of Pathophysiology, School of Medicine of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of flufenamic acid(FFA) on gap junction intercellular communication in vascular smooth muscle cells(VSMC) in situ of acutely isolated arteriole segments. **Methods** Whole-cell patch clamp recordings were used to study the effects of FFA on membrane input capacitance(C_{input}), membrane input conductance(G_{input}) or membrane input resistance(R_{input}) of VSMCs embedded in arteriole segments. **Results** FFA concentration-dependently and reversibly suppressed G_{input} or increased R_{input} , with an IC₅₀ of 56 and 33 $\mu\text{mol/L}$ in acutely isolated mesenteric artery(MA) and brain artery(BA) segments respectively. There was not significant difference between MA and BA($P > 0.05$). After application of FFA($\geq 300 \mu\text{mol/L}$), the C_{input} , G_{input} and R_{input} of the in situ cells were very close to the respective dispersed cell in MA and BA. **Conclusion** FFA is a reversible gap junction blocker, achieving a complete electrical isolation of the recorded VSMC at $\geq 300 \mu\text{mol/L}$. FFA suggesting a homogeneous property of the gap junctions between MA and BA.

Key words: patch-clamp techniques; myocytes, smooth muscle; arteriole; flufenamic acid; gap junction

氟灭酸(flufenamic acid, FFA)是临床常见的非甾体抗炎药物,研究发现氟灭酸能够阻断 Cl^- 通道^[1-2]、调节非选择性阳离子通道^[3-4],还可以抑制培养的成纤维细胞和神经母细胞瘤细胞间的缝隙连接通道^[5]。本实验主要研究氟灭酸对急性分离的微动脉细胞间缝隙连接通道的电生理特性影响。许多组织和器官上都表达有缝隙连接通道,是细胞间进行电学信息通讯的直接途径^[6-7]。缝隙连接通道由相邻的两个细胞各提供一个连接子对接而成,每个连接子由 6 个不同或相同的连接蛋白(connexin, Cx)构成,缝隙连接通道的孔径约 1.5 nm,允许相对分子量小于 1KD 的分子通过。目前发现超过 20 种 Cx 表达在不同的细胞^[6,8]。

缝隙连接在维持人体正常生理功能中扮演着重要角色,在血管舒缩运动中更为突出^[9-13]。调节血管舒缩运动的电、化学信息在平滑肌细胞和内皮细胞之间传递,以及平滑肌细胞的同步化都需要缝隙连接功能和结构的完整性^[9,14]。为了研究缝隙连接在生理和病理生理状态下所发挥的作用,特异性缝隙连接阻断剂是必不可少的。有报道发现在培养的细胞上氟灭酸能够抑制细胞间的缝隙连接通讯^[5],但在急性分离的血管段标本上尚未见相关报道。本实验采用微动脉段全细胞膜片钳技

术在急性分离的脑动脉(brain? artery, BA)和肠系膜动脉(mesenteric artery, MA)上,研究氟灭酸对血管平滑肌细胞间缝隙连接通道电生理特性的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 实验所用豚鼠(新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心动物饲养科提供,动物质量符合一级标准)雌雄不限,体质量约 200~300 g,麻醉状况下放血处死,迅速取出肠系膜和脑,置于生理盐溶液中,生理盐溶液成分如下:NaCl 138.0 mmol/L, KCl 5.0 mmol/L, CaCl_2 1.6 mmol/L, MgCl_2 1.2 mmol/L, Na-HEPES 5.0 mmol/L, HEPES 6.0 mmol/L, 葡萄糖 7.5 mmol/L。生理盐溶液中迅速取出 BA 和 MA。所用药物用生理盐溶液配制,通过开关控制药物灌注标本,保持灌注速度、温度和其他成分不变。所用药物有:氟灭酸由 Sigma 公司提供,其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 微动脉段标本制备 截取好的微动脉标本置于直径 35 mm 的培养皿中,血管微动脉长约 0.4 mm,直径在 40~80 μm 之间,两端用细铂金片固定在培养皿底部,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱中用含有胶原酶 A(1.5 mg/mL)的生理盐溶液处理 15 min,生理

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2012CB526600);国家自然科学基金资助项目(31100829, 30960417, 30900490, 31260247, 81260519, 81000411)。作者简介:张治平(1977—),主治医师,硕士,主要从事循环生理学研究工作。△ 通讯作者, Tel: 15001645180; E-mail: maketao@hotmail.com。

表 1 微动脉段上和单个平滑肌细胞的膜电生理特性的比较

膜电生理特性	微动脉段标本		单个平滑肌细胞	
	BA(n=20)	MA(n=20)	BA(n=21)	MA(n=33)
R _{input} (M)	385.00±44.00	300.00±53.00	2 910.00±198.00 *	2 459.00±115.00 *
G _{input} (nS)	3.26±0.40	5.16±0.74	0.38±0.03 *	0.45±0.03 *
C _{input} (pF)	185.00±27.00	312.00±76.00	8.94±0.56 *	13.9±0.54 *

* : P<0.01, 与微动脉段标本比较。

盐溶液置换 2 次去除残存胶原酶 A, 体显微镊下进一步去除附在微动脉上的结缔组织。

1.2.2 单个平滑肌细胞制备 将微动脉置于细胞分离液中 20 min, 细胞分离液成分为: NaCl 142.00 mmol/L, KCl 5.00 mmol/L, CaCl₂ 0.05 mmol/L, MgCl₂ 1.00 mmol/L, Na-HEPES 4.00 mmol/L, HEPES 5.00 mmol/L, 葡萄糖 7.50 mmol/L。将微动脉剪成几段放入消化液后, 在 37 °C 温箱中消化 20~25 min, 消化液成分包括: 木瓜蛋白酶 0.75 mg/mL, 胶原酶 I 1.00 mg/mL, 牛血清清蛋白 3.75 mg/mL, 二巯苏糖醇 0.30 mg/mL。1 000 r/min 离心 6 min 后弃上清液, 加入细胞分离液制成细胞悬浮液, 如此反复替换 3 次后, 将液体移至用多聚赖氨酸处理过的培养皿内, 静置 30 min 使细胞贴壁。生理盐溶液冲洗 20 min 后进行全细胞膜片钳实验。

1.2.3 全细胞膜片钳记录 室温条件下(22~25 °C)标本持续灌注生理盐溶液(0.2 mL/min)进行全细胞膜片钳实验。记录电极阻抗约为 5 MΩ, P-97 拉制仪拉制。电极内液成分为: K-gluconate 130.0 mmol/L, NaCl 10.0 mmol/L, CaCl₂ 2.0 mmol/L, MgCl₂ 1.2 mmol/L, HEPES 10.0 mmol/L, EGTA 5.0 mmol/L, 葡萄糖 7.5 mmol/L。通过微操纵器接触到细胞后给予负压形成 GΩ 封接。补偿电极电容后给予瞬时较强负压或者电刺激击破细胞膜形成全细胞膜片钳, 膜电流用 10 kHz(-3 dB)低频滤过^[15]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 t 检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 微动脉平滑肌细胞间的缝隙连接 微动脉段上和单个平滑肌细胞的细胞膜电生理特性(表 1), MA 和 BA 微动脉段上平滑肌细胞 C_{input} 大约是消化分离的单个平滑肌细胞的 10 倍, G_{input} 大约是单个平滑肌细胞的 20 倍。

结果发现, 氟灭酸干预前拟合效果较差(r≤0.90), 干预后拟合效果较好(r>0.98), 细胞 C_{input} 的充放电的时间常数也由 11.00 ms 减少至 0.32 ms。

表 2 氟灭酸对微动脉段上平滑肌细胞膜电生理特性的影响

血管种类	膜电生理特性	对照组(n=9)	处理组(n=9)
			氟灭酸(300 μmol/L)
BA	R _{input} (M)	379.00±41.00	3 910.00±728.00 *
	G _{input} (nS)	2.98±0.56	0.29±0.12 *
	C _{input} (pF)	185.00±27.00	7.80±0.49 *
MA	R _{input} (M)	249.00±31.00	3 256.00±616.00 *
	G _{input} (nS)	4.78±0.68	0.41±0.08 *
	C _{input} (pF)	312.00±76.00	11.36±0.98 *

* : P<0.01, 与对照组比较。

应用斜坡电压刺激显示氟灭酸净电流的电流/电压(I/V)曲线呈线性(图 2), 且微动脉段上记录平滑肌细胞的静息电位与翻转电位点十分接近, 提示氟灭酸主要抑制相邻细胞间缝隙连接通道。

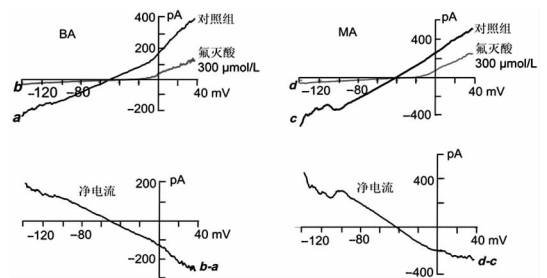


图 2 氟灭酸净电流的 I/V 曲线

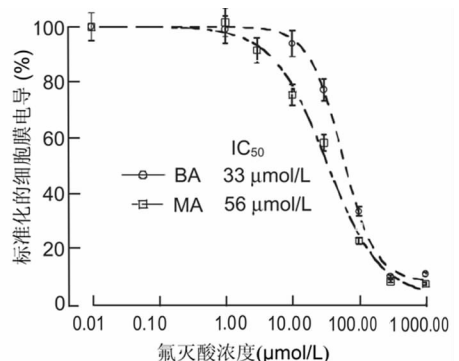


图 3 氟灭酸浓度依赖的抑制微动脉上平滑肌细胞膜电导

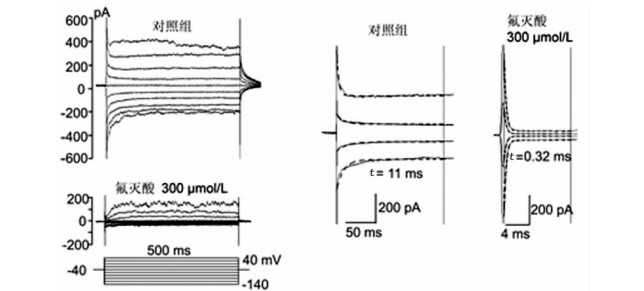


图 1 氟灭酸对微动脉平滑肌细胞间缝隙连接的抑制作用

2.2 氟灭酸抑制微动脉平滑肌细胞间的缝隙连接 应用氟灭酸前细胞膜电流幅度显著大于应用氟灭酸(300 μmol/L)后(图 1), 细胞 R_{input} 从 0.32 GΩ 增加到 2.15 GΩ。表 2 总结了氟灭酸对微动脉段平滑肌细胞 C_{input}、R_{input} 和 G_{input} 的影响, 应用氟灭酸干预后记录平滑肌细胞的 C_{input}、R_{input} 和 G_{input} 与表 1 中单个细胞的数值十分接近。此外, 应用单指数方程分别对氟灭酸干预和对照组记录平滑肌细胞膜电容充放电过程进行拟合。

2.3 氟灭酸浓度依赖的抑制微动脉平滑肌细胞间缝隙连接 氟灭酸可以浓度依赖性的抑制微动脉上平滑肌细胞间缝隙连接(图 3), 氟灭酸(1~1 000 μmol/L)能够浓度依赖的减少微动脉段上平滑肌细胞的 G_{input}。经绘制曲线发现氟灭酸抑制 BA 和 MA 细胞间缝隙连接通道的 IC₅₀ 分别为 33 和 56 μmol/L, 氟灭酸抑制两种微动脉细胞间缝隙连接通道的差异无统计学

意义($P>0.05$)。

3 讨 论

本实验在 BA 和 MA 上通过以下 3 个方面得以证实氟灭酸可以可逆和浓度依赖的抑制细胞间缝隙连接通讯:(1)氟灭酸能够增加微动脉段上平滑肌细胞的 R_{input} 至单个平滑肌细胞水平;(2)氟灭酸可以减小微动脉段上平滑肌细胞 C_{input} 值和 G_{input} 值接近于单个细胞;(3)氟灭酸后能够降低细胞膜开放时间至单个细胞水平,且单指数方程能够较好的拟合^[16-17]。结果提示,当氟灭酸的浓度 $\geq 300 \mu\text{mol/L}$ 时 BA 和 MA 微动脉段上平滑肌细胞间的缝隙连接通道可以被完全抑制。此外,氟灭酸对 BA 和 MA 两种微动脉细胞间缝隙连接通道的抑制作用无统计学差异,提示相同的连接蛋白表达在上述两种微动脉。

Harks 等^[18]报道在健康大鼠肾成纤维细胞和过表达 Cx43 的 SKHep1 细胞上氟灭酸可以阻断细胞间的缝隙连接通讯, IC_{50} 是 $40 \mu\text{mol/L}$,当浓度大于或等于 $250 \mu\text{mol/L}$ 时氟灭酸可以完全阻断细胞间的缝隙连接通讯。此结果与本实验的结果一致。血管微动脉主要表达 Cx37、Cx40、Cx43 和 Cx45,其中平滑肌细胞上主要表达 Cx37、Cx43 和 Cx45,内皮细胞上主要表达 Cx37、Cx40 和 Cx43^[13]。本实验结果提示,在 MA 和 BA 微动脉上平滑肌细胞间缝隙连接通道可能是由 Cx43 和其他几种连接蛋白组成的异聚体。另有文献报道,在 N2A 神经母细胞瘤上氟灭酸能够非选择性阻断由 Cx26、Cx32、Cx40、Cx43、Cx46 和 Cx50 分别组成的缝隙连接通道^[19]。

缝隙连接是相邻细胞间的连接通道排列而组成的一种特殊膜结构,能够允许某些离子以及相对分子质量小于 1×10^3 的分子自由通过,是细胞间进行物质交换和信息通讯的途径^[20]。缝隙连接与血管紧张度的调节密切相关,通过缝隙连接电化学信号的直接交流,使血管能够保持电和机械活动的同步性,对刺激信息作出同步性的反应,保证血管舒缩功能的一致和稳定。病理情况下,伤害性信息也能够相邻细胞间存在的缝隙连接通道进入正常细胞,进而使正常细胞出现病理性改变^[9],如果提前应该缝隙连接阻断剂阻断异常细胞与正常细胞间的缝隙连接通道,则伤害性信息不会传递至正常细胞。Saltman 等^[21]发现在心肌梗死的动物模型上提前应用了缝隙连接阻断剂庚醇,心肌梗死的面积显著降低。因此,缝隙连接阻断剂将会是治疗心脑血管疾病非常重要的工具。

参考文献:

- [1] Duran C, Thompson CH, Xiao Q, et al. Chloride channels: often enigmatic, rarely predictable[J]. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72: 95-121.
- [2] Hartzell C, Putzier I, Arreola J. Calcium-activated chloride channels[J]. *Annu Rev Physiol*, 2005, 67: 719-758.
- [3] Hill K, Benham CD, McNulty S, et al. Flufenamic acid is a pH-dependent antagonist of TRPM2 channels[J]. *Neuropharmacology*, 2004, 47(3): 450-460.
- [4] Saleh SN, Albert AP, Peppiatt CM, et al. Angiotensin II activates two cation conductances with distinct TRPC1 and TRPC6 channel properties in rabbit mesenteric artery myocytes[J]. *J Physiol*, 2006, 577(Pt 2): 479-495.
- [5] Juszczak GR, Swiergiel AH. Properties of gap junction blockers and their behavioural, cognitive and electrophysiological effects; animal and human studies[J]. *Prog Neu-*

ropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2009, 33(2): 181-198.

- [6] McCracken CB, Roberts DC. Neuronal gap junctions: expression, function, and implications for behavior[J]. *International review of neurobiology*, 2006, 73: 125-51.
- [7] Sohl G, Maxeiner S, Willecke K. Expression and functions of neuronal gap junctions[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(3): 191-200.
- [8] Tran CH, Welsh DG. Current perspective on differential communication in small resistance arteries [J]. *Can J Physiol pharmacol*, 2009, 87(1): 21-28.
- [9] Figueroa XF, Isakson BE, Duling BR. Connexins: gaps in our knowledge of vascular function[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2004, 19: 277-284.
- [10] Griffith TM. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis[J]. *Br J Pharmacol*, 2004, 141(6): 881-903.
- [11] Sandow SL. Factors, fiction and endothelium-derived hyperpolarizing factor [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2004, 31(9): 563-570.
- [12] Jiang ZG, Nuttall AL, Zhao H, et al. Electrical coupling and release of K^+ from endothelial cells co-mediate ACh-induced smooth muscle hyperpolarization in guinea-pig inner ear artery[J]. *J Physiol*, 2005, 564(Pt 2): 475-487.
- [13] Figueroa XF, Isakson BE, Duling BR. Vascular gap junctions in hypertension[J]. *Hypertension*, 2006, 48(5): 804-811.
- [14] Segal SS. Regulation of blood flow in the microcirculation [J]. *Microcirculation*, 2005, 12(1): 33-45.
- [15] 陈新燕, 司军强, 李丽, 等. 18β 甘草次酸对 Wistar 大鼠和自发性高血压大鼠脑微动脉平滑肌细胞缝隙连接的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2013, 29(2): 181-184.
- [16] Lindau M, Neher E. Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells [J]. *Pflugers Arch*, 1988, 411(2): 137-146.
- [17] de Roos, AD, van Zoelen EJ, Theuvenet AP. Determination of gap junctional intercellular communication by capacitance measurements[J]. *Pflugers Arch*, 1996, 431(4): 556-563.
- [18] Harks EG, de Roos AD, Peters PH, et al. Fenamates: a novel class of reversible gap junction blockers[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 298(3): 1033-1041.
- [19] Srinivas M, Spray DC. Closure of gap junction channels by arylaminobenzoates[J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 63(6): 1389-1397.
- [20] Mese G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(11): 2516-2524.
- [21] Saltman AE, Aksehirli TO, Valiunas V, et al. Gap junction uncoupling protects the heart against ischemia[J]. *J Thoracic Cardiovascular Surg*, 2002, 124(2): 371-376.