

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2001)-01-0024-03

正常肠系膜动脉平滑肌细胞钙激活钾通道活性的观察

罗兴林, 魏宗德, 饶华, 王文艳, 杨艳, 曾晓荣

(泸州医学院附属医院心内科, 四川省泸州 646000)

[关键词] 钾通道; 膜电导; 膜片钳制技术; 肌, 平滑, 血管

[摘要] 为了解人体正常肠系膜动脉平滑肌细胞钙激活钾通道的特性, 取 24 例人体正常肠系膜动脉小枝节段, 用酶消化法获取标本细胞, 以膜片钳制技术检测钙激活钾通道的活性, 通过 Pclamp 专用软件实时采样记录其平均开放时间、平均关闭时间及平均开放概率等。结果发现, 人体肠系膜动脉平滑肌细胞钙激活钾通道开放具有明显电压依赖性, 在对称性高钾液中, 电流-电压关系曲线在 10~60 mV 范围内可被直线拟合。在细胞吸附式膜片和内面向外膜片中, 通道电导分别为 192.3 ± 29.2 Ps 和 202.5 ± 58.3 Ps。开放概率和开放数目随 Ca^{2+} 浓度的增加而增加, 膜内面应用四乙胺可减少通道开放概率及电流幅值。提示人体肠系膜动脉平滑肌细胞钙激活钾通道与人体其他血管相似, 主要为大电导钙激活钾通道, 具有电压和钙浓度双重依赖性。

[中图分类号] R331.6

[文献标识码] A

The Characters of Calcium- Activated Potassium Channels of Artery Smooth Muscle Cell from Normal Human Mesentery

LUO Xing- Lin, WEI Zong- De, RAO- Hua, WANG Wen- Yan, YANG Yan, and ZENG Xiao- Rong

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

MeSH Potassium Channel; Membrane Conductance; Patch Clamp Technique; Muscle, Smooth, Artery

ABSTRACT **Aim** To investigate the characters of Ca^{2+} -activated K^{+} channels (KCa) of artery smooth muscle cell (SMC) from normal human mesentery. **Methods** Human normal mesenteric artery branch was digested by enzyme. Patch clamp technique was used to pull cell-attached and inside-out patches on the normal human mesenteric artery SMC respectively.

The signal channel open and close times, open probability (P_0), open channel number per patch were recorded. **Results**

The channels showed obviously voltage dependent, the amplitude voltage relation curve can be linearly fitted during the voltage range from 10~60 mV (in symmetrical $[\text{K}^{+}]_0$ 140 mmol/L and $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}} < 10^{-9}$ mol/L). The KCa channels have slope conductance of 192.3 ± 29.2 Ps and 202.5 ± 58.3 Ps, in cell-attached and inside-out patches respectively. The channels were Ca^{2+} sensitive. The single channel P_0 and open channel number per patch were increased apparently according to the increase of Ca^{2+} (10^{-8} ~ 10^{-6} mol/L) in cytoplasm. TEA in 2×10^{-4} mmol applied in the out side of the channel can reduce the signal channel current amplitude.

Conclusion The characters of KCa from normal human mesenteric artery SMC were mainly big conductance KCa, which have voltage and Ca^{2+} concentration dependent and similar to other artery smooth muscle cell of human.

实验研究表明, 钙激活钾通道 (Ca^{2+} -activated K^{+} channel, KCa) 广泛存在于各种可兴奋细胞, 对调节血管张力具有重要作用, 但组织类型和来源不同, 钙激活钾通道特性差异极大^[1], 已证明人体冠状动脉和软脑膜动脉主要存在大电导钙激活钾通道^[2], 但目前尚未见人体肠系膜血管平滑肌细胞钙激活钾通道研究的报道。本文观察了 24 例人体正常肠系膜血管平滑肌细胞钙激活钾通道的特性, 现予报告。

[基金项目] 四川省教育厅自然科学基金重点资助课题(1996-16)

[作者简介] 罗兴林, 男, 1950 年出生, 重庆市开县人, 心血管内科主任医师、教授、硕士研究生导师, 主要从事老年心血管疾病的研究。

1 材料和方法

1.1 材料

血管平滑肌细胞取自因消化性溃疡、胆石症手术的患者, 共 24 例, 其中男 14 例, 女 10 例, 年龄 48~65 岁, 平均 52.1 ± 5.3 岁。所有对象血压正常, 无器质性心血管疾病。在患者腹部手术中经探查无肠道血管病变者, 取肠系膜动脉小分枝 2~4 cm, 内径 1~2 mm, 用酶消化法^[1]获得单个平滑肌细胞。

1.2 溶液制备(单位均为 mmol/L)

台氏液: NaCl 127, KCl 5.9, Cl 2.4, MgCl_2 1.2, Glucose 12.0, HEPES 10.0, 用 NaOH 调节 pH 至 7.4。
电极液: K-Asp 40.0, MgCl_2 1.0, CaCl_2 0.05, KCl

100.0, DIDS 0.1, 用 NaOH 调节 pH 至 7.1~7.2。浴液: K- Asp 100.0, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 0.1, HEPES 20.0, KCl 40.0, HGTA 2.0, 用 KOH 调节 pH 至 7.1~7.2。以上电极液与浴液为对称性高钾液, 由 Nernst 方程 $E_k = (RT/F) (\ln [K^+]_o / [K^+]_i)$ 计算, 由此所得 $E_k = 0$ 有利于通道电流记录分析 (E_k 为钾通道平衡电位, R 为气体常数 $8.3 \times 10^{-3} \text{ J/mol}$, T 为绝对温度, F 为法拉第常数 96500 C/mol)。

1.3 通道电流记录

将平滑肌细胞置于相差倒置显微镜载物台小室中, 标本浸浴于台氏液, 微电极内灌以电极液, 使其尖端靠近细胞表面并持续发放脉冲, 观察应答电流至形成高阻封接 ($10 \text{ G}\Omega$) 制成细胞吸附式膜片。然后迅速将电极尖端拉出液-气交界面 2~3 s, 重新置于浴液内制成内面向外膜片, 通道电流经膜片引入记忆示波器及 12 倍 A/D 转换器, 输入电子计算机用 Pclamp6.2 专用软件实时采样, 室温 20~22℃, 记录不同钳制电压下单通道电流的平均开放时间、平均关闭时间及平均开放概率, 并绘制成电流-电压关系曲线。

1.4 数据处理

采用 FETCHAN 分析确定通道开放和关闭状态, 并用非线性最小二乘法指数拟合 $F_t = \sum (p_i/t_i) \exp(-t/t_i)$, 通道开放概率 $P_0 = \sum(T_j)/T$, 通道电流幅度通过高斯曲线拟合后得到。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 钙通道开放的电压依赖性

细胞吸附式膜片及内面向外式膜片下均观察到通道电流随钳制电压绝对值增大而增大, 在 10~60 mV 钳制电压范围内通道电流-电压关系可被直线拟合 (图 1, Figure 1)。

通道电导在细胞吸附式膜片为 $192.3 \pm 29.2 \text{ Ps}$, 内面向外膜片下为 $202.5 \pm 58.3 \text{ Ps}$, 在生理情况钙浴液时通道开放概率 (P_0) 与通道开放时间 (T_0) 随去极化电压的增大而增大 (表 1, Table 1)。

2.2 钙激活钾通道对 Ca^{2+} 敏感性 & Ca^{2+} 对通道动力学的影响

细胞内面向外膜片下, 浴液中游离钙分别为 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} mol/L 时, 在相同钳制电压下, 通道电导无改变, 但 P_0 和 T_0 开放数目显著增加, 且可用指数拟合, 说明钙可改变钙激活钾通道的动力学特性 (图 2, Figure 2)。

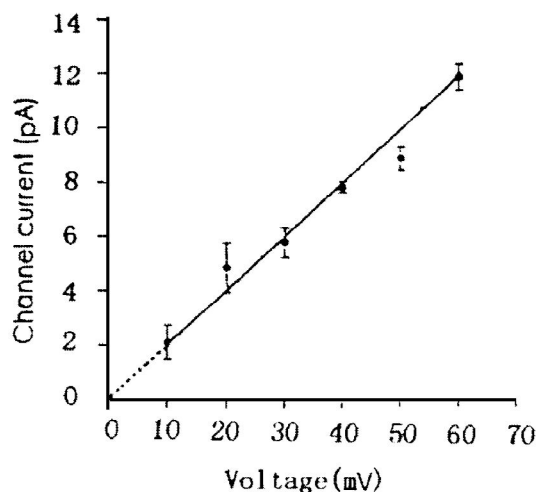


图 1 钙激活钾通道开放的电流-电压关系

Figure 1 Relationship between current and voltage for KCa channels in mesenteric artery SMC of normal human

表 1 人体正常肠系膜血管平滑肌细胞钙激活钾通道不同钳制电压下通道开放概率 (P_0) 和开放时间 (T_0) 的变化

Table 1 Change of P_0 and T_0 in different voltage in human normal mesenteric artery SMC

VP(mV)	P_0 (ms)	T_0 (ms)
20	0.010 ± 0.002	7.335 ± 1.840
40	0.013 ± 0.002	8.364 ± 1.643
60	0.048 ± 0.008^a	14.731 ± 2.893^a

a: $P < 0.001$, compared with 20 mV group.

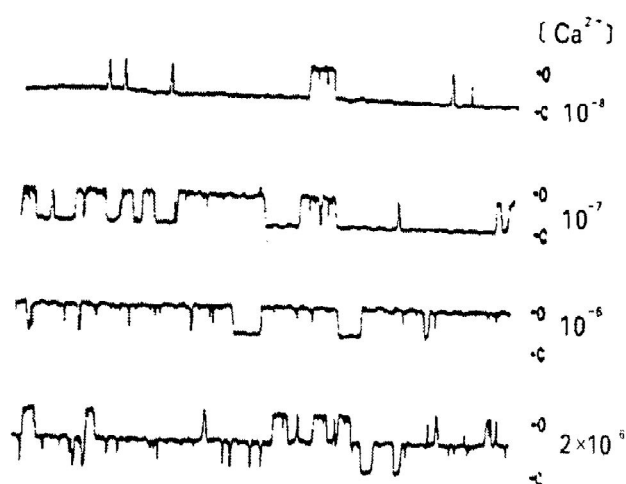


图 2 不同钙浓度对通道开放概率 (P_0) 和开放时间 (T_0) 的影响

Figure 2 Effect of Ca^{2+} in cytoplasm side on P_0 and T_0 of KCa in mesenteric artery SMC of normal human

2.3 四乙铵对钙激活钾通道的阻断作用

应用四乙铵 0~40 mmol/L, 在细胞吸附式膜片下对钙激活钾通道无阻断作用, 但在内面向外膜片下, 通道平均开放概率及电流幅值明显减少, 呈浓度依赖性(图 3, Figure 3)。

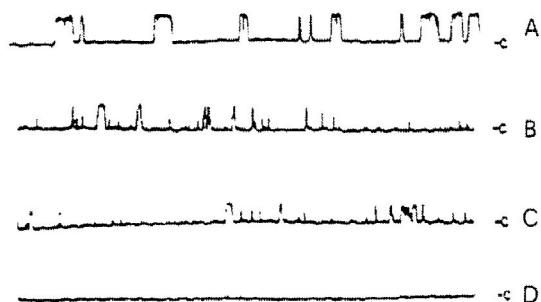


图3 不同浓度四乙铵对钙激活钾通道的影响. A: 0 mmol/L, B: 10 mmol/L, C: 20 mmol/L, D: 30 mmol/L

Figure 3 Effect of TEA on KCa channels in mesenteric artery SMC of normal human

3 讨论

已证明, 动物血管平滑肌细胞主要存在大电导钙激活钾通道, 在细胞外钙离子浓度升高时, 细胞膜去极化可促进通道开放, 钾离子随电-化学梯度出细胞外, 导致细胞膜超极化, 阻止细胞对 Ca^{2+} 的摄取、储存和释放, 使细胞内 Ca^{2+} 浓度降低进而引起血管舒张^[3], 因此钙激活钾通道在维持血管张力中起着十分重要的作用。近年国外学者在人体也作了一些探索, 发现人体冠状动脉、软脑膜动脉和气管平滑肌细胞均存在钙激活钾通道^[2,4], 但尚无关于人体肠系膜血管平滑肌细胞钙激活钾通道研究的报道, 本文观察到人体肠系膜动脉平滑肌细胞上, 单通道电导在细胞吸附式膜片及内向外膜片下, 分别为 192.3 ± 29.2 Ps 和 202.5 ± 58.3 Ps, 略高于 Wistar 大鼠肠系膜动脉钙激活钾通道电导^[5], 但稍低于粥样硬化的人体冠状动脉钙激活钾通道电导^[2]。本文还

显示, 人体肠系膜动脉平滑肌细胞钙激活钾通道在接近生理性低钙环境中, 出现明显电压依赖性, 随着去极化电压的增加, 通道开放时间、开放数目明显增加, 同时钙激活钾通道也表现出明显的钙依赖性, 在 Ca^{2+} 浓度由 10^{-8} 向 10^{-6} mol/L 变动时, 通道开放概率、开放时间和开放数目均显著增加。

本实验还表明, 人体肠系膜血管平滑肌细胞钙激活钾通道可被四乙铵所阻断, 其阻断作用呈浓度依赖性, 但较阻断动物钙激活钾通道所需浓度高(0.2~2 mmol/L), 这可能与结合位点的种族差异有关^[6,7]。四乙铵虽能明显降低电导及电流幅度, 但对开放概率的电压依赖性在完全阻断前无明显影响, 说明结合位点未涉及通道的电压敏感区, 也非影响其门控机制, 推测是与通道位点结合后, 使通道蛋白构象发生改变, 使通道狭窄、通过受阻所致。

参考文献

- [1] Stuenkel EL. Single potassium channels recorded from vascular smooth muscle cell [J]. *AM J Physiol*, 1989, **257**: 760-766
- [2] Wiecha J, Schlager B, Voisard R, et al. Ca^{2+} -activated K^{+} channels in human smooth muscle cells of coronary atherosclerotic plaques and coronary media segment [J]. *Basic Res Cardiol*, 1997, **92**(4): 233-238
- [3] Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle [J]. *AM J Physiol*, 1995, **268**: C799-815
- [4] Snetkov VA, Pandya H, Hirst SJ, et al. Potassium channels in human fetal airway smooth muscle cells [J]. *Pediatr Res*, 1998, **4**(1): 548-554
- [5] Joseph E. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channel [J]. *Science*, 1992, **256**: 24-30
- [6] Gokina NI, Wellman TD, Bevan RD, et al. Role of Ca^{2+} -activated K^{+} channels in the regulation of membrane potential and tone of smooth muscle in human arteries [J]. *Circ Res*, 1996, **79**: 881-886
- [7] Liu YP, Hudetz AG, Kmaus HG, et al. Increased impression of Ca^{2+} -sensitive K^{+} channels in the cerebral microcirculation of genetically hypertensive rats [J]. *Circ Res*, 1998, **82**: 729-737

(此文 2000-04-07 收到, 2000-12-01 修回)

(此文编辑 朱雯霞)