

肾上腺素诱导的血管平滑肌细胞 Cl^- 电流 及其与 Ca^{2+} 运动的关系

阮红梅¹, 关永源, 贺华, 丘钦英

(中山医科大学药理学教研室, 广东省广州市 510089, 1. 广州医学院生理学教研室, 510182)

[主题词] 肾上腺素; 肌, 平滑, 血管; 氯通道; 膜片钳技术

[摘要] 为观察肾上腺素对主动脉平滑肌细胞 Cl^- 电流的影响及其与 Ca^{2+} 内流的关系, 采用膜片钳单离子通道 (细胞贴附式) 技术和 Fura-2 荧光法测定细胞内游离 Ca^{2+} 浓度变化。结果发现, 10 $\mu\text{mol/L}$ 肾上腺素可引起氯通道开放概率由对照组的 0.061 ± 0.0042 增加到 0.690 ± 0.011 ; 平均开放时间由 1.08 ± 0.23 ms 延长到 6.44 ± 0.57 ms。此 Cl^- 电流可被硝苯地平 and EGTA 抑制。肾上腺素可引起平滑肌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度由静息时 77 ± 13 nmol/L 快速升高达峰值随后维持在高水平的内流平台相, 达 216 ± 27 nmol/L。 Cl^- 通道阻断剂尼氟灭酸在一定范围内呈浓度依赖性抑制肾上腺素诱发的 Cl^- 电流及 Ca^{2+} 内流, 8 $\mu\text{mol/L}$ 尼氟灭酸对细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的抑制率达 $27\% \pm 8\%$ 。结果表明, Cl^- 通道开放在调节平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流中起重要作用。

[中图分类号] Q463; R332

[文献标识码] A

Adrenaline-Induced Chloride Currents in Vascular Smooth Muscle Cells and its Relationship with Ca^{2+} Movement

RUAN Hong-Mei¹, GUAN Yong-Yuan, HE Hua, and QIU Qin-Ying

(Department of Pharmacology, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China; 1. Department of Physiology, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

[MeSH] Adrenaline; Muscle, Smooth, Vascular; Chloride Channels; Patch-Clamp Techniques

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the characteristic of chloride currents and Ca^{2+} entry induced by adrenaline (Adr) in A10 vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Cell-attached patch-clamp and Fura-2 fluorescence techniques were used to observe the chloride currents and the changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. **Results** The open probability (P_o) and mean open time (τ_o) of chloride channels were increased by 10 $\mu\text{mol/L}$ Adr; the P_o were increased from 0.061 to 0.69; the τ_o were increased from 1.08 ms to 6.44 ms. The activation of chloride channels were decreased by 10 $\mu\text{mol/L}$ nifedipine and nearly completely inhibited by subsequent addition of 1.5 mmol/L EGTA. Application of Adr activated Ca^{2+} influx from the extracellular space. Both of the chloride currents and Ca^{2+} influx could be inhibited by the chloride channels blockers niflumic acid (NFA) in a concentration-dependent manner. **Conclusion** The Adr can increase the activation of chloride channels in VSMC and the action is dependent on the extracellular Ca^{2+} influx. The chloride channels play an important role in the regulation of Calcium movement in VSMCs.

已有研究表明, 血管活性物质如肾上腺素 (adrenaline, Adr) 和内皮素 1 等可引起大鼠主动脉血管环和肾微循环动脉收缩及细胞内游离 Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 水平升高, 非特异性 Cl^- 通道阻断剂 furosemide 和 DIDS 可抑制上述反应, 提示 Cl^- 可能参与血管活性物质引起的血管收缩及 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平升高。由于在平滑肌细胞存在多种 Cl^- 转运机制, 如

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$ 共转运、 Na^+ 依赖性和非依赖性 $\text{HCO}_3^- - \text{Cl}^-$ 交换、 Cl^- 通道^[1-4]等。 Cl^- 通道是否参与激动剂引起上述反应未完全明了。另有实验结果提示, 在新鲜分离的血管平滑肌细胞上, 采用全细胞膜片钳技术观察到去甲肾上腺素和内皮素 1 可诱发 Cl^- 电流, 而有关在培养的平滑肌细胞上单通道 Cl^- 电流的报道较少。为此, 本实验采用膜片钳单通道记录技术并结合 Fura-2 荧光检测 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化技术, 在培养的胚胎鼠主动脉平滑肌细胞上, 观察可能存在的 Cl^- 通道的类型及 Adr 对 Cl^- 电流的影响及其与 Ca^{2+} 内流的关系。

1 材料与方法

[收稿日期] 2001-09-27 [修回日期] 2002-03-07

[基金项目] 国家自然科学基金 (39970849) 和广东省自然科学基金团队项目、广东省医学科学技术研究基金 (B2000066) 资助。

[作者简介] 阮红梅, 女, 1967 年出生, 四川省黔江人, 博士, 讲师, 主要从事心血管药理学及生理学研究。关永源, 男, 1946 年出生, 广东省新会市人, 教授, 博士研究生导师, 中国药学会心血管专业委员会常务委员。贺华, 女, 1945 年出生, 广东省广州市人, 副主任技师, 主要从事心血管药理学研究。

1.1 实验材料

实验用 DMEM/F12、hepes、N-Methyl-D-Glucamine (NMDG)、EGTA、硝苯地平 (nifedipine, Nif)、DIDS 和尼氟灭酸 (niflumic acid, NFA) 购于 Sigma 公司(USA), 其余试剂均为国产市售分析纯。

1.2 细胞培养

A10 细胞培养于 DMEM/F12(含 10% NCS) 培养基。用于膜片钳实验的细胞传代时种于直径为 35 mm 培养皿, 实验取传代后 1~2 天未融合的细胞。

1.3 膜片钳单通道电流的记录

用细胞贴附式 (cell-attached) 记录 A10 细胞 Cl^- 通道活动。采用自身对照实验设计, 即在相同条件下记录同一膜片上药物作用前后的通道开放情况, 比较两者的差异。

1.3.1 对照组浴槽液成分为 (mmol/L): NaCl 150, KCl 5, CaCl_2 2, MgCl_2 1, 葡萄糖 5, hepes 10; 实验组用的浴槽液即在上述浴槽液中加入不同浓度的药物。电极液成分为 (mmol/L): HCl 150, CaCl_2 2, MgCl_2 1, 葡萄糖 5, hepes 10; NMDG 调 pH 至 7.0。实验前, 上述各溶液均用孔径为 0.22 μm 的纤维滤膜过滤。实验于 22 $^{\circ}\text{C}$ ~27 $^{\circ}\text{C}$ 进行。

1.3.2 玻璃微电极尖端直径为 1.0~1.7 μm , 充灌电极液电极阻抗 2.0~5.0 $\text{M}\Omega$, 密封阻抗大于 10 $\text{G}\Omega$ 。通过改变电极电位 (± 50 mV) 以确定膜片上是否存在氯通道, 随后观察在不同情况下此小片膜上的离子通道的活动。

1.3.3 单通道电流用 Axo patch 1D 膜片钳放大器 (Axon Instruments, USA) 放大和滤波 (滤波频率为 3 kHz), 经 Digi Data 1200 数模转换板, 将信号输入计算机, 用 Pclamp 6.04 自动测量, 主要分析参数是通道开放概率 (P_o) 及开放时间 (τ_o)。

1.4 细胞内 Ca^{2+} 浓度的测定

细胞内游离 Ca^{2+} 的测定方法同文献[5]。简述如下: 当细胞生长达 80%~90% 融合时, 常规消化。以 1 $\mu\text{mol/L}$ Fura2/Am 的 DMEM/F12(含 0.05% BSA) 负载, 离心收集细胞, 再用 HBSS [($\mu\text{mol/L}$): NaCl 145, KCl 5, CaCl_2 1.5, MgCl_2 1, 葡萄糖 5, hepes 10, 0.01% BSA, pH 7.4] 重悬细胞, 调整细胞密度为 5×10^{10} 个/L。实验采用 RF-5000 荧光分光光度计, 激发光波长为 340 nm 和 380 nm, 发射光波长为 510 nm, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 进行 Fura2 荧光 [Ca^{2+}]i 测定。实验结果由计算机自动存贮、计算并打印。所用试剂在有效剂量范围内经证明均无荧光干扰。

1.5 数据处理和统计分析

实验原始记录由计算机直接打印, 实验数据以

均数土标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学分析采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。Adr 引起的 Ca^{2+} 净释放量和净内流量及药物对 Ca^{2+} 内流的抑制率按下列公式计算:

$$\text{Ca}^{2+} \text{ 内流量 } ([\text{Ca}^{2+}] \text{ of influx}) = \text{坪台相} [\text{Ca}^{2+}]_i - \text{静息} [\text{Ca}^{2+}]_i$$

$$\text{抑制率} (\%) = \{ \text{加药前坪台相} [\text{Ca}^{2+}]_i - \text{加药后坪台相} [\text{Ca}^{2+}]_i \times 100\% \} \div \{ \text{加药前坪台相} [\text{Ca}^{2+}]_i - \text{净息} [\text{Ca}^{2+}]_i \}$$

2 实验结果

2.1 Cl^- 通道的鉴定和特性

实验中, 用 NMDG 阻断了 Na^+ 和 K^+ 通道的开放后, Cl^- 是浴槽液和电极液中唯一的可通透的阴离子; 在钳制电压为 -20 mV、-40 mV、-60 mV、-80 mV 及 -100 mV 条件下, 通道出现内向电流活动 (图 1, Figure 1), 通道电导为 43.6 ± 4.8 pS ($n = 6$), 此电流可被氯通道阻断剂 DIDS (50 mmol/L) 阻断; 在一定范围内, 通道电流幅度随去极化程度增大而增大; P_o 及 τ_o 随去极化程度增大而增大。在同一钳制电压下, 通道电流幅度基本相等, 其幅度分布直方图呈对称的单峰状, 并能很好地进行正态分布拟合 (图 2, Figure 2)。

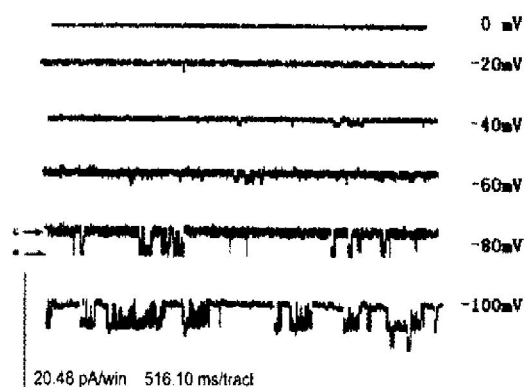


图 1. 在不同钳位电压下 A10 细胞膜的氯电流。

Figure 1. The chloride currents at different holding potentials in A10 cells.

2.2 肾上腺素对 Cl^- 通道开放概率 (P_o)、开放时间 (τ_o) 及电流幅度的影响

当钳制电压为 -80 mV 时, 在浴槽液中加入浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Adr 可迅速增加 Cl^- 的开放概率, P_o 由对照组 0.061 ± 0.0042 增加到 0.69 ± 0.011 ($n = 5, P < 0.01$), 平均开放时间 (τ_o) 延长, 由原来的 1.08 ± 0.23 ms 增加到 6.44 ± 0.57 ms。电流幅度未见有明显的改变 (图 3, Figure 3)。

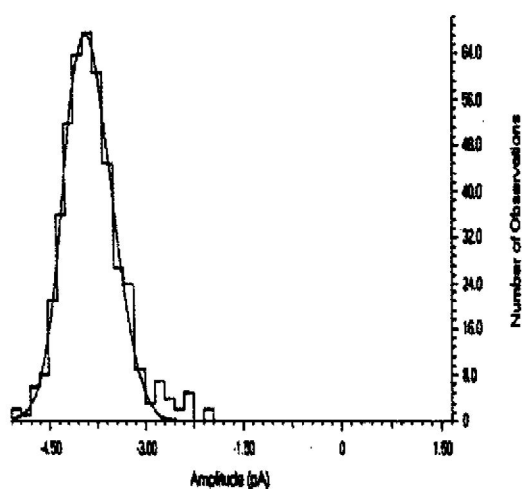


图2. 钳位电压为 -80 mV 时 Cl^- 电流分布直方图及高斯拟合曲线.

Figure 2. The current amplitudes distribution histogram and Gaussian distribution curve (cell attached recording configuration, $V_h = -80\text{ mV}$).



图3. 硝苯地平 and EGTA 对肾上腺素诱导的 A10 细胞 Cl^- 电流的影响(钳位电压 -80 mV).

Figure 3. Effects of nifedipine ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) and EGTA (1.5 mmol/L) on adrenaline ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) induced Cl^- currents at holding-potential -80 mV in A10 cells.

2.3 硝苯地平 and EGTA 对激活的 Cl^- 通道开放概率的影响

$10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Nif 可使 Adr 激活的 Cl^- 通道开放概率由原来的 0.72 ± 0.01 降到 0.20 ± 0.01 , 加入 1.5 mmol/L EGTA 后, P_o 明显降低为 0.062 ± 0.023 , 接

近对照水平(表 1 和图 3, Table 1 and Figure 3)。提示 Cl^- 通道的开放有赖于外钙内流。

表 1. 硝苯地平 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 和 EGTA (1.5 mmol/L) 对肾上腺素 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 诱导的 A10 细胞 Cl^- 通道开放概率和开放时间的影响 ($V_h = -80\text{ mV}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$).

Table 1. Effects of nifedipine ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) and EGTA (1.5 mmol/L) on $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Adr-induced P_o and τ_o of chloride channels in A10 cells. ($V_h = -80\text{ mV}$)

Groups	P_o	τ_o (ms)
Control	0.0564 ± 0.0085	1.251 ± 0.136
Adrenaline	0.7214 ± 0.0096	6.871 ± 1.445
Nifedipine	0.2001 ± 0.0076^b	4.844 ± 1.051^a
Subsequence EGTA	0.0623 ± 0.0058^b	1.645 ± 0.304^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with adrenaline group.

2.4 氯通道阻断剂尼氟灭酸对肾上腺素触发的 Cl^- 通道开放概率和开放时间的影响。

在浴槽液中给予 Adr ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 激活 Cl^- 电流, 待通道开放稳定后加入 Cl^- 通道阻断剂 NFA, 观察到 NFA 呈浓度依赖性抑制 Adr 激活的 Cl^- 通道的开放概率及开放时间($n = 5$, $P < 0.01$, 表 2, Table 2)。

表 2. 尼氟灭酸($\mu\text{mol/L}$) 对肾上腺素($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) 诱导的 A10 细胞 Cl^- 通道开放概率和开放时间的影响 ($V_h = -80\text{ mV}$, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$).

Table 2. Effects of NFA ($\mu\text{mol/L}$) on $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Adr-induced P_o and τ_o (ms) of chloride channels in A10 cells.

Groups	P_o	τ_o (ms)
Control	0.062 ± 0.011	1.546 ± 0.054
Adr	0.690 ± 0.025	6.084 ± 2.041
NFA 5	0.430 ± 0.038^b	5.235 ± 1.008
10	0.180 ± 0.022^b	3.541 ± 0.564^b
20	0.051 ± 0.0094^b	1.021 ± 0.058^b

b: $P < 0.01$, compared with adrenaline group.

2.5 Cl^- 通道阻断剂尼氟灭酸对肾上腺素触发的 Ca^{2+} 内流的影响

$10\text{ }\mu\text{mol/L}$ Adr 可引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 呈双相性升高, 表现为快速的 Ca^{2+} 释放相和随后的 Ca^{2+} 内流相。在 Ca^{2+} 内流相对稳定时, 逐渐加入累积浓度的 NFA, 每次加药后待变化稳定时继续加药。结果发现, NFA 在一定范围内呈浓度依赖性抑制 Ca^{2+} 内流。 $8\text{ }\mu\text{mol/L}$ NFA 可抑制 $27\% \pm 8\%$ 。由于 NFA $> 15\text{ }\mu\text{mol/L}$ 对荧光有干扰, 实验未能观察到其对 Ca^{2+} 内流的

最大抑制效应(表 3, Table 3)。

表 3. 尼氟灭酸 ($\mu\text{mol/L}$) 对肾上腺素诱导的 A10 细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nmol/L) 影响

Table 3. Effects of NFA ($\mu\text{mol/L}$) on plateau $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nmol/L) induced by $10 \mu\text{mol/L}$ Adr in A10 cells ($x \pm s$, $n=6$)

Groups	$[\text{Ca}^{2+}]_i$
Resting	77 ± 13
Pre-treatment	216 ± 27
NFA 1	206 ± 18 (7% $\pm 2\%$) ^a
2	195 ± 16 (16% $\pm 7\%$) ^b
4	189 ± 15 (20% $\pm 7\%$) ^b
8	179 ± 23 (27% $\pm 8\%$) ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with pretreatment group. The inhibitory rates were shown in parentheses.

3 讨论

1998 年 Lamb 等^[6]在离体血管环收缩实验中发现去甲肾上腺素经 α_1 肾上腺素受体引起血管环收缩,降低灌流液 Cl^- 浓度或用氯通道阻断剂对上述反应有不同的影响,提示氯离子参与 α_1 受体介导血管环收缩。然而,在平滑肌, Cl^- 可被多种阴离子载体及氯通道介导进或出细胞;且目前所公认的氯通道阻断剂如 NFA 和 Furosemide 均有一定的非特异性。因此,我们采用膜片钳实验有以明确 Cl^- 通道在激动剂引起收缩反应中的作用。结果发现,大鼠胚胎主动脉平滑肌 A10 细胞上,存在有可传导性氯通道。肾上腺素可激活一内向的 Cl^- 电流,当有肾上腺素存在时, Cl^- 通道的开放概率(P_o)增加、开放时间(τ_o)均延长。这些氯通道是受细胞外 Ca^{2+} 内流调节的,用 EGTA 络合外钙,取消 Ca^{2+} 内流,氯电流消失。NFA 为一种环氧化酶抑制剂,是目前公认的一种较强的 Ca^{2+} 激活的 Cl^- 通道阻断剂^[7]。本实验观察到它呈浓度依赖性抑制肾上腺素触发的 I_{Cl} ,也说明 Ca^{2+} 在氯通道开放中起重要作用。

Smith 等在完整的动脉上观察到去甲肾上腺素引起的双时程的 Cl^- 外流增加是依赖于 Ca^{2+} 的。移去细胞外液中 Ca^{2+} ,早期反应减少 50%,而血管收缩于 4.5 min 后消逝。另有研究显示,细胞外 Ca^{2+} 通过电压依赖式钙通道进入细胞内, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高也

可激活平滑肌细胞 Cl^- 通道。在离体实验中观察到 NFA 可降低去甲肾上腺素引起的大鼠主动脉收缩幅度;抑制 5-羟色胺诱导的胃底平滑肌收缩^[8]。在人的肠系膜动脉平滑肌上记录到单个 Cl^- 电导,当 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 从 10 nmol/L 升高到 $10 \mu\text{mol/L}$ 时,通道的开放概率明显增加。在门静脉平滑肌细胞,激活 $I_{\text{Cl-Ca}^{2+}}$ 的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 阈值为 180 nmol/L,当 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 达到 600 nmol/L 时, Ca^{2+} 敏感性 Cl^- 通道完全激活。我们在实验中观察到肾上腺素引起细胞内 Ca^{2+} 升高呈双相性,即内贮 Ca^{2+} 释放引起的快速升高达峰相(约 700 nmol/L)及随后持续的平台相(约 200 nmol/L),推测在 A10 细胞此浓度可激活 $I_{\text{Cl-Ca}}$ 。NFA 在一定范围内呈浓度依赖性抑制肾上腺素触发的 Ca^{2+} 内流,提示氯通道参与 α_1 -受体触发的 Ca^{2+} 内流。由于 $\text{NFA} > 15 \mu\text{mol/L}$ 对荧光有干扰,故本实验无法观察其最大抑制效应。

我们的结果提示,在 A10 细胞,肾上腺素诱导 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 快速升高,导致 Ca^{2+} 敏感性 Cl^- 通道激活, Cl^- 外流,导致细胞膜瞬时去极化,由此引起电压依赖式钙通道开放, Ca^{2+} 内流增加, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 进一步升高。 Cl^- 通道在激动剂引起的血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 内流及收缩中起重要作用。

[参考文献]

- [1] O'Donnell ME, Owen NE. Atrial natriuretic factor stimulates $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ cotransport in vascular smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, **83** (16): 6132-136
- [2] Vigne P, Breittmayer JP, Frelin C, et al. Dual control of the intracellular pH in aortic smooth muscle cells by a cAMP -sensitive $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ antiporter and a protein kinase C-sensitive Na^+/H^+ antiporter. *J Biol Chem*, 1988, **263** (34): 18023-029
- [3] Droogmans G, Callewaert G, Declercq I, et al. ATP -induced Ca^{2+} release and Cl^- current in cultured smooth muscle cells from pig aorta. *J Physiol Lond*, 1991, **440**: 623-634
- [4] Klockner U, Isenberg G. Endothelin depolarizes myocytes from porcine coronary and human mesenteric arteries through a Ca^{2+} -activated chloride current. *Pflügers Arch*, 1991, **418** (1-2): 168-175
- [5] 阮红梅,关永源,贺华,等. 氯通道阻断剂对 α_1 -肾上腺素受体亚型引起的 Ca^{2+} 内流的影响. *中国药理学通报*, 2001, **17** (2): 147-150
- [6] Lamb FS, Barna TJ. Chloride ion currents contribute functionally to norepinephrine-induced vascular contraction. *Am J Physiol*, 1998, **275** (1p2): H151-160
- [7] Hogg RC, Wang Q, Large WA. Action of niflumic acid on evoked and spontaneous calcium-activated chloride and potassium currents in smooth muscle cells from rabbit portal vein. *Br J Pharmacol*, 1994, **112** (3): 977-984
- [8] Scarparo HC, Santos GC, Leal Cardoso JH, et al. Selective inhibitory effects of niflumic acid on 5-HT₂-induced contraction of the rat isolated stomach fundus. *Br J Pharmacol*, 2000, **130** (3): 678-684

(此文编辑 胡必利)