

二十二碳六烯酸对低氧性肺血管收缩的影响及机制

刘培晶, 陈蕊, 严金川, 王中群

(江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 二十二碳六烯酸; 低氧性肺血管收缩; 肺动脉平滑肌细胞; 钾电流

[摘要] **目的** 探讨二十二碳六烯酸(DHA)对大鼠低氧性肺血管收缩的影响及电生理机制。**方法** 12只雄性SD大鼠随机分为两组:低氧组和低氧+DHA组。将大鼠三级肺动脉制备成去除内皮的血管环,急性缺氧溶液诱导血管环收缩后用二十二碳六烯酸处理血管环,测定其舒张血管的作用。建立大鼠肺动脉平滑肌细胞全细胞膜片钳法并观察二十二碳六烯酸对肺动脉平滑肌细胞膜上钾离子通道的作用。**结果** 二十二碳六烯酸(1 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$)可显著舒张急性缺氧诱发的血管收缩($P < 0.05$, $n = 6$),最大舒张率为 $48.63\% \pm 9.16\%$ 。二十二碳六烯酸可显著激活总钾离子电流($P < 0.01$)。在指令电位 +60 mV 时,细胞外给予 10 $\mu\text{mol/L}$ 二十二碳六烯酸后,该电流由 121.52 ± 17.43 pA/pF 增加至 209.81 ± 12.57 pA/pF。该钾电流为混合电流,能被蝎毒素和4-氨基吡啶部分阻断。二十二碳六烯酸(10 $\mu\text{mol/L}$)对肺动脉平滑肌细胞大电导钙激活的钾离子通道可产生显著激活作用($P < 0.05$, $n = 6$),指令电压 +60 mV 时的增加率是 $125.21\% \pm 5.62\%$;对电压门控钾通道可产生显著抑制作用($P < 0.05$, $n = 6$),指令电压 +60 mV 时的抑制率是 $63.21\% \pm 7.32\%$ 。**结论** 二十二碳六烯酸可通过开放大电导钙激活的钾离子通道而舒张急性缺氧引起的肺血管收缩。

[中图分类号] Q4

[文献标识码] A

Effects of Doehsahehexecnoic Acid on Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction and Its Mechanism

LIU Pei-Jing, CHEN Rui, YAN Jin-Chuan, and WANG Zhong-Qun

(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Doehsahehexecnoic Acid; Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction; Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell; K^+ Current

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of doehsahehexecnoic acid (DHA) on hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) and its mechanism. **Methods** Pulmonary arteries were cut by 2 to 3 mm for vascular rings. Following the vascular constriction induced by acute hypoxia, DHA was administrated and the relaxing forces were measured without endothelia. Using the whole cell patch-clamp technique in freshly isolated pulmonary artery smooth muscle cells, the effects of DHA on total K^+ currents, the large conductance Ca^{2+} -activated K^+ (BK_{Ca}) and voltage gated K^+ currents were recorded. **Results** DHA relaxed vascular ring tone without endothelia ($P < 0.05$). DHA could significantly activate total K^+ currents in pulmonary artery smooth muscle cells ($P < 0.01$). It also greatly enhanced BK_{Ca} currents ($P < 0.05$) and at a testing potential of +60 mV, $125.21\% \pm 5.62\%$ of BK_{Ca} currents were increased. In contrast, DHA inhibited K^+ currents and at a testing potential of +60 mV, $63.21\% \pm 7.32\%$ of K^+ currents were decreased. **Conclusion** DHA can activate BK_{Ca} channels and relax the vascular constriction induced by acute hypoxia.

[收稿日期] 2013-03-24

[基金项目] 国家自然科学基金(81170279);江苏省自然科学基金(BK2010335;BK2011486);江苏省科教兴卫工程(LJ201116);镇江市心血管病重点实验室资助项目(SS2012002)

[作者简介] 刘培晶,主任医师,硕士研究生导师,主要研究方向为肺动脉高压的基础和临床治疗,E-mail 为 jdfylpj@ sina.com。陈蕊,硕士研究生,住院医师,主要研究方向为肺动脉高压。通讯作者严金川,教授,博士研究生导师,主要研究方向为冠心病基础和介入治疗,E-mail 为 yanjinchuan@hotmail.com。王中群,博士研究生,住院医师,主要研究方向为冠心病基础和临床治疗。

ω -3 多不饱和脂肪酸 (ω -3 polyunsaturated fatty acid, ω -3 PUFA) 是重要的天然不饱和脂肪酸, 主要包括二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 和二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA)。研究表明 ω -3 PUFA 能通过扩张血管、调节血压和改善组织灌注发挥保护心血管的作用^[1]。但目前有关于 ω -3 PUFA 对肺动脉高压的作用研究报道甚少。本研究拟探讨 DHA 对低氧性肺血管收缩 (hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV) 的作用及电生理机制。

1 材料和方法

1.1 动物和器材

清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 180 ± 30 g。血管功能实验中 12 只雄性 SD 大鼠随机分为两组: 低氧组和低氧 + DHA 组, 由江苏大学动物中心提供。301A 单通道血管张力测定仪 (丹麦 DMT 公司); Multi-clamp 700B 膜片钳放大器、DigiData 1322 型数/模 (或模/数) 转换器、pClamp10.2 脉冲发放和数据采集软件 (美国 Axon 公司); DHA (美国 Sigma 公司)。

1.2 试剂及溶液

DHA 使用前以无水乙醇配制成 10 mmol/L 的母液, 分装避光保存于 -20°C 备用。使用时无水乙醇的终浓度 $< 0.4\%$, 以防止无水乙醇对离子通道的影响。分离血管用 PSS 溶液成份: NaCl 130 mmol/L, KC 15 mmol/L, MgCl₂ 1.2 mmol/L, CaCl₂ 1.5 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L; 分离细胞用无钙 PSS 液, 将分离血管 PSS 液中的 CaCl₂ 用等摩尔 MgCl₂ 代替。两种 PSS 液用 NaOH 调节 pH 至 7.4。分离肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMC) 酶液: 木瓜蛋白酶 4 g/L, I 型胶原酶 2 g/L, 牛血清白蛋白 1 g/L, 二硫苏糖醇 0.5 g/L, 溶于无钙 PSS 液中。记录大电导钙激活性钾通道 (the large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, BK_{Ca}) 电流细胞外液: NaCl 145 mmol/L, KCl 4.0 mmol/L, CaCl₂ 1.0 mmol/L, MgCl₂ 1.0 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L, 用 NaOH 调 pH 至 7.4, 同时细胞外液加 5 mmol/L 电压门控型钾离子通道 (the voltage-dependent potassium channel, K_v) 特异性抑制剂 4-氨基吡啶 (4-AP)。BK_{Ca} 电流电极内液: KCl 125 mmol/L, Na₂ATP 5 mmol/L, Na₂GTP 0.5 mmol/L, MgCl₂ 4 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 0.1 mmol/L, 用 KOH 调节 pH 值至 7.4。记录 K_v 电流细胞外液为无钙 PSS

液, K_v 电流电极内液: KCl 125 mmol/L, Na₂ATP 5 mmol/L, Na₂GTP 0.5 mmol/L, MgCl₂ 4 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, EGTA 10 mmol/L, 用 KOH 调节 pH 值至 7.4。急性缺氧溶液: 2 mmol/L 连二亚硫酸钠的 PSS 灌流液, 此时氧分压在 60 min 内为 0 mm-Hg, pH 值不发生改变^[2]。

1.3 血管功能实验

以 3% 戊巴妥钠 (70 mg/kg) 腹腔注射深度麻醉后, 开胸迅速取肺组织, 分离获得三级肺动脉 (管腔直径约 50 ~ 100 μm), 置于 PSS 缓冲液中。去除血管内皮: 将 PC 管插入剪好的血管环中, 在浸湿的手掌上轻轻地来回滚动去除内皮。将血管剪成 2 ~ 3 mm 长的血管环, 两根不锈钢金属丝穿过微血管内腔, 将微血管样本固定于固定架上, 缓冲液 (37°C) 持续通以 95% O₂ + 5% CO₂, 平衡 40 ~ 60 min 待血管张力稳定后开始实验。以 80 mmol/L KCl 使血管环平滑肌去极化, 血管环收缩达平值后洗脱, 重复 2 次, 再用 2 mmol/L 连二亚硫酸钠预收缩血管, 待张力上升达平台后加入 DHA (0.001、0.01、0.1、1 和 10 $\mu\text{mol/L}$) 舒张血管, 检测血管最大舒张反应, 低氧组用等浓度二甲基亚砷。

1.4 全细胞膜片钳实验

大鼠单个肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMC) 的分离采用传统的酶解方法^[3]。取酶解获得的细胞悬液于预处理有 L-多聚赖氨酸的玻璃片中, 将玻片粘于灌流槽, 待细胞充分贴壁, 平放在倒置显微镜上, 取状态良好的细胞进行膜片钳实验。记录电极用玻璃毛细管, 经电极控制仪拉制成微电极, 阻抗为 3 ~ 6 M Ω , 用全细胞膜片钳记录方法在电压钳下记录 IBK_{Ca} 电流。记录电流时, 钳制电压为 -70 mV, 给予从 -60 mV 至 $+60$ mV, 阶跃电压为 10 mV, 脉冲时间为 400 ms 的去极化刺激 13 次, 频率为 0.2 Hz, 信号采集频率为 10 kHz, 滤波频率为 2 kHz。采样后数据由 Clampfit 10.2 软件自动记录, 存储于计算机硬盘内, 供测量分析。所有实验均在室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 下进行。通道电流密度 (pA/pF) 为电流强度与细胞膜电容的比值, 以消除不同细胞表面积的电误差, 膜电容可直接在放大器上读出。观察 10 $\mu\text{mol/L}$ DHA 对总钾电流、BK_{Ca} 电流及 K_v 电流的影响。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 自身对照采用配对 t 检验, 组间资料采用非配对 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。运用 OriginPro 7.5 科技绘图及数据分析软件。

2 结果

2.1 DHA 对大鼠肺动脉血管张力的调节作用

DHA 可以舒张急性缺氧诱发的血管收缩,最大舒张率为 $48.63\% \pm 9.16\%$,明显大于低氧组 ($P < 0.05$);DHA 低浓度 ($1 \times 10^{-9} \sim 1 \times 10^{-7}$ mol/L) 时,无显著舒张血管的作用 ($P > 0.05$;图 1)。

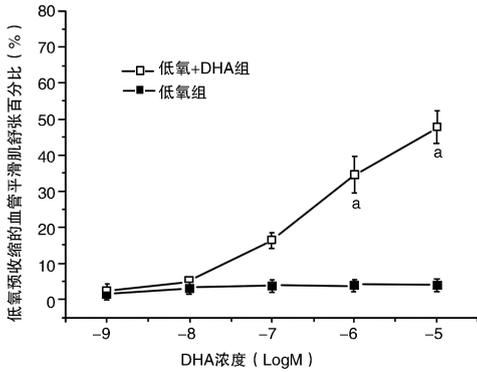


图 1. DHA 对大鼠肺动脉血管张力的调节作用 ($n=6$) a 为 $P < 0.05$,与低氧组比较。

Figure 1. Regulation effects of DHA on rat pulmonary vascular tone

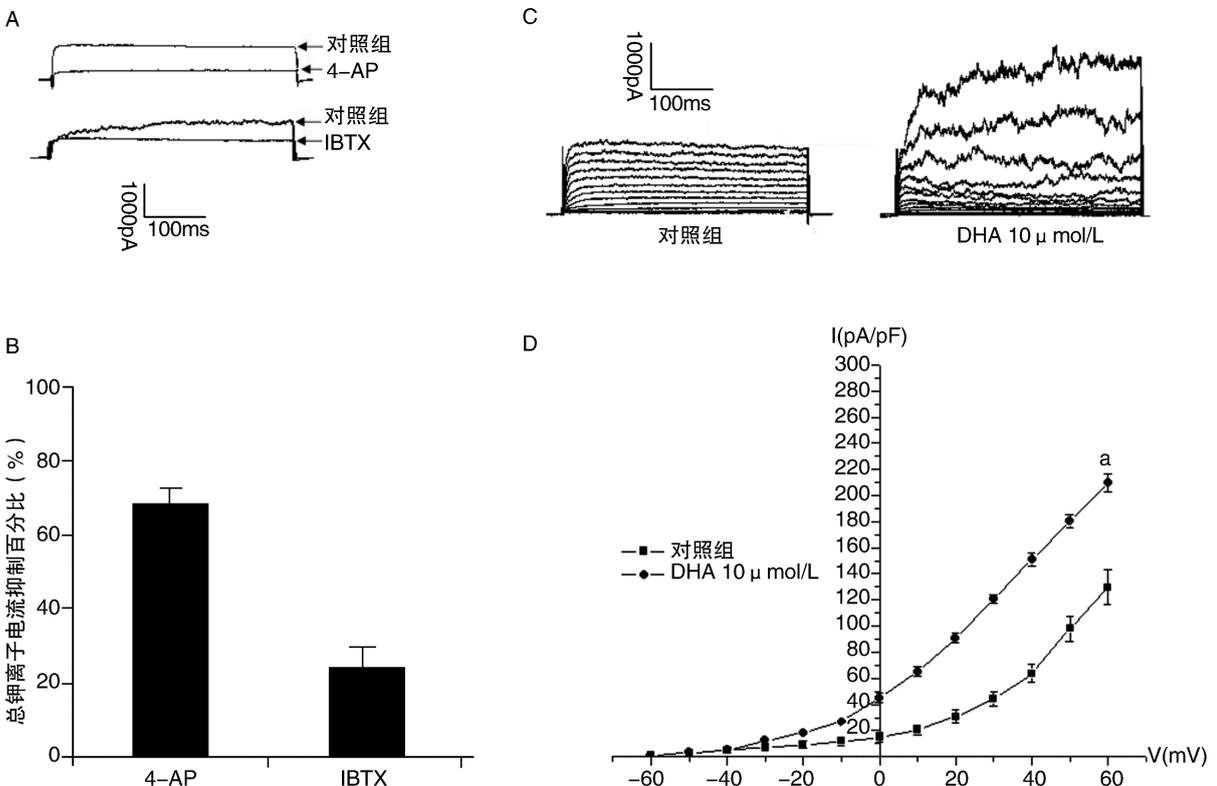


图 2. DHA 对 PASMC 总钾离子流的影响 ($n=6$) a 为 $P < 0.01$,与对照组(未灌流 DHA 前)比较。

Figure 2. Effects of DHA on total K^+ currents in PASMC

2.2 DHA 对 PASMC 总钾离子流的影响

在基础状态下,PASMC 总钾离子流相对较低。当电极内液 K^+ 被 Cs^+ 取代(其他成分不变)时,该外向电流几乎完全被阻断。该电流为混合电流,可被 K^+ 通道阻滞剂 4-AP 及蝎毒素(iberiotoxin, IBTX)部分阻断(图 2A 和 2B)。DHA 可显著激活急性分离的 PASMC 总钾离子流 ($P < 0.01$;图 2C)。在指令电位 +60 mV 时,细胞外给予 DHA ($10 \mu\text{mol/L}$) 后,可使该电流由用药前 121.52 ± 17.43 pA/pF 增至 209.81 ± 12.57 pA/pF,增加百分比为 $67.42\% \pm 4.82\%$ 。I~V 曲线图显示总钾离子电流密度加入 DHA 后较基础状态明显增加(图 2D)。

2.3 DHA 对 PASMC 大电导钙激活的钾通道、电压门控钾通道电流的影响

DHA 能显著增加 BK_{Ca} 电流(图 3A),I~V 曲线上移(图 3B; $P < 0.05$),且该激活电流能被 IBTX 抑制。在指令电压 +60 mV 时,DHA ($10 \mu\text{mol/L}$) 对 BK_{Ca} 电流增加百分比为 $125.21\% \pm 5.62\%$ 。DHA 对 K_v 电流密度显著抑制。在指令电位 +60 mV 时,细胞外给予 DHA ($10 \mu\text{mol/L}$) 后电流密度抑制百分比是 $63.21\% \pm 7.32\%$ (图 4; $P < 0.05$)。

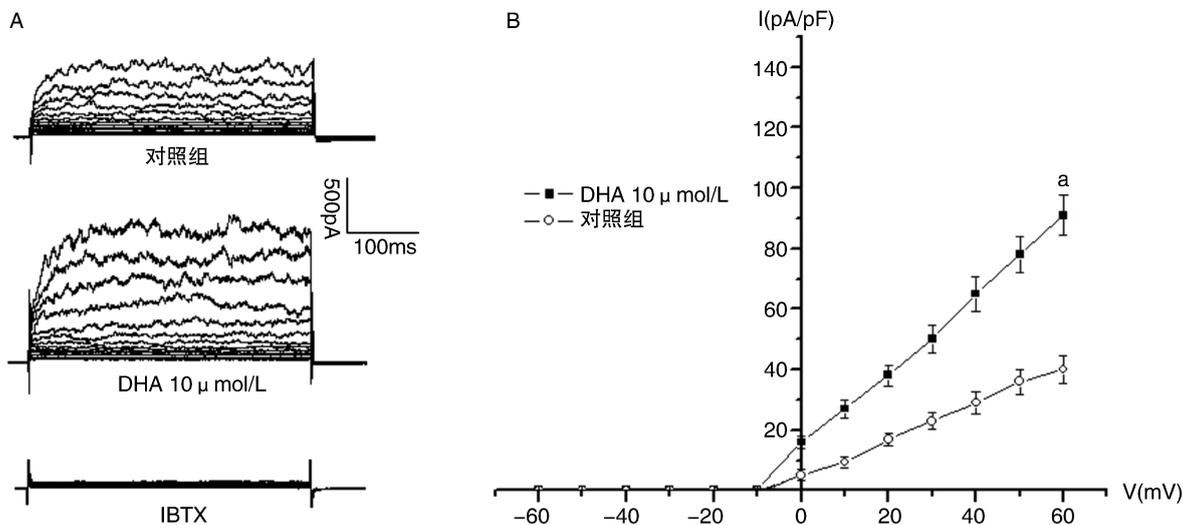


图 3. DHA 对 PASMC BK_{Ca} 通道的影响 (n=6) a 为 P<0.05, 与对照组 (未灌流 DHA 前) 比较。

Figure 3. Effects of DHA on BK_{Ca} currents in PASMC

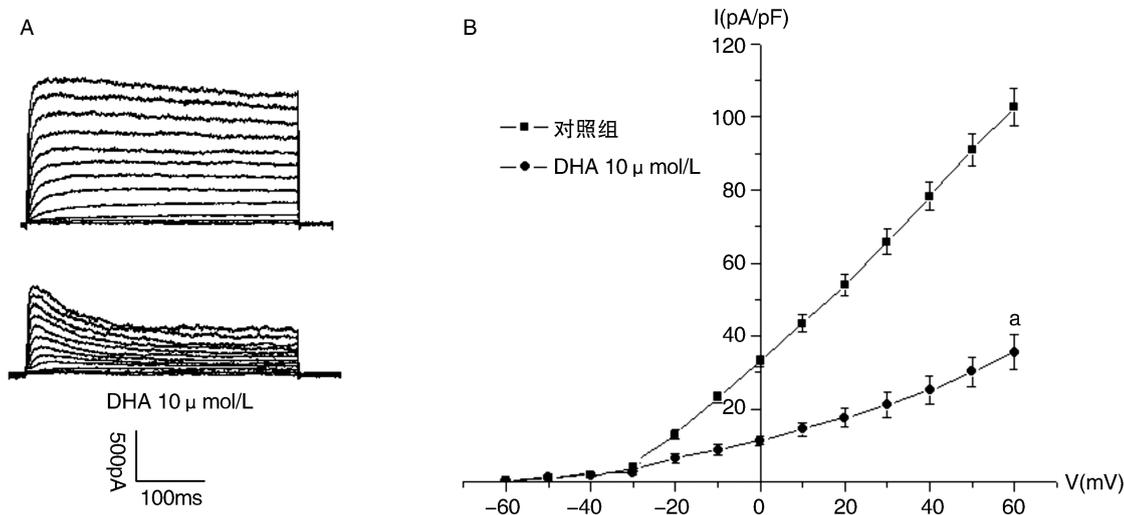


图 4. DHA 对 PASMC K_v 通道的影响 (n=6) a 为 P<0.05, 与对照组 (未灌流 DHA 前) 比较。

Figure 4. Effects of DHA on K_v currents in PASMC

3 讨论

HPV 是肺血管的生理调节机制, 可使血液更多的循环至肺通气良好的部位, 有益于肺通气-血流匹配, 利于肺部气体交换。然而持续的 HPV 会导致肺泡长期缺氧, 引起肺血管结构重构, 最终导致肺动脉高压^[4]。PASMC 细胞膜上主要存在 5 类钾离子通道: ①钙激活性钾离子通道; ②电压门控型钾离子通道; ③内向整流性钾离子通道; ④ATP 敏感性钾离子通道; ⑤双孔钾通道^[5]。BK_{Ca} 通道是钙激活性钾离子通道的一种亚型, 广泛分布于各类动脉平滑肌细胞上, 该通道表现为电压依赖性和钙敏感

性, 对血管舒张起重要调节作用。低氧抑制了 PASMC 细胞膜上 K_v 通道或/和 BK_{Ca} 通道, 使细胞膜去极化, Ca²⁺ 内流, 细胞收缩, 导致肺小动脉血管张力增加^[6]。研究表明, DHA 能通过作用于心肌细胞和冠状动脉平滑肌细胞上离子通道、离子泵、交换体等发挥其抗心律失常和扩张冠状动脉血管作用^[7]。动物实验发现 DHA 能通过减少缺氧性肺动脉高压模型中肺血管肌化、抑制肺纤维化等途径实现抗肺动脉高压的作用^[8]。

研究表明低氧诱导的肺血管收缩并不依赖于内皮, 而主要引起平滑肌层收缩^[9]。为此, 本研究采用去内皮细胞的血管环, 结果表明在去除内皮的

阻力性肺动脉, DHA 可以舒张急性缺氧诱导的肺血管收缩, 这一现象可能是通过激活 PASMCM 上 BK_{Ca} 通道, 引起钾离子外流, 细胞膜超极化, 导致血管扩张。但有趣的是我们同时发现 DHA 能显著抑制 PASMCM 膜上 K_v 通道。这与先前报道的 DHA 对冠状动脉平滑肌细胞膜上的 K_v 及 BK_{Ca} 通道作用类似。从理论上来说, K_v 通道受抑制, 会使全细胞钾离子外流下降, E_m 升高, 细胞膜去极化, 钙离子内流, 引起细胞收缩^[10]。然而本研究发现, 在同一浓度下 DHA 对 BK_{Ca} 通道的激活作用大于对 K_v 通道的抑制作用, 使全细胞钾离子外流增加, 细胞膜超极化, 电压门控性钙离子通道关闭, 钙离子内流减少, 血管舒张。这可能是由于 BK_{Ca} 电导值较高 (200 ~ 250 pS), 开放少数通道就能改变 E_m 值, 引起 K^+ 外流增加。因此, 我们认为 DHA 可作为 BK_{Ca} 通道开放剂, 达到舒张血管的作用。

新近研究发现, 在胶质瘤细胞膜上 BK_{Ca} 通道的激活与细胞膜上一种特殊的脂质通道相关^[11]。作为不饱和脂肪酸的 DHA, 其对 BK_{Ca} 通道的激活作用是否也与此类脂质通道相关则有待进一步研究。

本研究表明 DHA 可抑制 PASMCM 上 K_v 通道, 激活 BK_{Ca} 通道, 综合引起钾离子外流, 舒张低氧诱导的肺血管收缩, 为 DHA 在临床上治疗肺动脉高压提供基础研究资料。

[参考文献]

- [1] Nicholson T, Khademi H, Moghadasian MH. The role of marine n-3 fatty acids in improving cardiovascular health: a review[J]. *Food Funct*, 2013, 4 (3): 357-365.
- [2] 许蜀闽, 王培勇, 马红英. 连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用[J]. *第三军医大学学报*, 2005, 27 (4): 359-360.
- [3] 骆红艳, 唐明, 杜以梅, 等. H_2O_2 对大鼠肺动脉平滑

肌细胞 K_v 通道的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22 (11): 2 098-101.

- [4] 张凌云, 高宝安. 肺动脉平滑肌细胞与低氧性肺血管重塑形成机制[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2013, 21 (2): 177-181.
- [5] Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, et al. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms [J]. *Eur Respir J*, 2008, 32 (6): 1 639-651.
- [6] Park WS, Firth AL, Han J, et al. Patho-, physiological roles of voltage-dependent K^+ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. *J Smooth Muscle Res*, 2010, 46 (2): 89-105.
- [7] Wang RX, Chai Q, Lu T, et al. Activation of vascular BK channels by docosahexaenoic acid is dependent on cytochrome P450 epoxygenase activity [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 90 (2): 344-352.
- [8] Andersson C, Zaman MM, Jones AB, et al. Alterations in immune response and PPAR/LXR regulation in cystic fibrosis macrophages [J]. *J Cyst Fibros*, 2008, 7 (1): 68-78.
- [9] Ward JP, McMurtry IF. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9 (3): 287-296.
- [10] Platoshyn O, Yu Y, Ko EA, et al. Heterogeneity of hypoxia-mediated decrease in $I(K_v)$ and increase in $[Ca^{2+}]_{(cyt)}$ in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293 (2): L402-16.
- [11] Weaver AK, Olsen ML, McFerrin MB, et al. BK channels are linked to inositol 1,4,5-triphosphate receptors via lipid rafts: a novel mechanism for coupling $[Ca^{2+}]_{(i)}$ to ion channel activation[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (43): 31 558-568.

(此文编辑 文玉珊)