

4-氨基吡啶调节大鼠低氧高二氧化碳性肺血管收缩时 ERK1/2 信号通路的作用

马迎春¹, 郑梦晓¹, 黄林静¹, 王淑君³, 汪洋^{1,2}, 王万铁^{1,2}

(温州医科大学 1. 基础医学院病理生理学教研室, 2. 缺血再灌注损伤研究所, 浙江省温州市 325035;

3. 赤峰上京内分泌专科医院内分泌科, 内蒙古赤峰市 024000)

[关键词] 低氧高二氧化碳; 细胞外信号调节激酶 1/2; 电压依赖性钾离子通道; 4-氨基吡啶

[摘要] **目的** 探讨电压依赖性钾离子通道(K_v)及细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)信号通路在大鼠低氧高二氧化碳性肺血管收缩(HHPV)中的作用。**方法** 制作正常 SD 大鼠离体二级肺动脉环,在常氧及低氧高二氧化碳条件下分别观察肺动脉环的张力变化。在急性低氧高二氧化碳条件下,分别用 K_v 阻断剂 4-氨基吡啶(4-AP)、ERK1/2 信号通路抑制剂 U0126、4-AP + U0126 孵育二级肺动脉环,测定各组血管环的张力值。**结果** 在急性低氧高二氧化碳条件下:①肺动脉环呈现双向性的收缩(与常氧状态比较, $P < 0.05$);②经 4-AP 孵育的二级肺动脉环收缩幅度增强,尤其是 II 期持续收缩($P < 0.05$);③U0126 能使 4-AP 所致的二级肺动脉环的 II 期持续收缩幅度显著降低($P < 0.05$)。**结论** 4-AP 可增强大鼠的 HHPV,而 U0126 能使 4-AP 所致的二级肺动脉环的 II 期持续收缩幅度显著降低,提示 ERK1/2 信号通路可能在电压依赖性钾离子通道调节大鼠 HHPV 的机制中发挥重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

4-Aminopyridine Regulate ERK1/2 Signal Pathway During Hypoxic Hypercapnia Pulmonary Vasoconstriction in Rats

MA Ying-Chun¹, ZHENG Meng-Xiao¹, HUANG Lin-Jing¹, WANG Shu-Jun³, WANG Yang^{1,2}, and WANG Wan-Tie^{1,2}

(1. Department of Pathophysiology, Basic Medicine College; 2. Institute of Ischemia & Reperfusion Injury, Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325035; 3. Department of Endocrine, Chifeng Shangjing Incretin Specialized Subject Hospital, Chifeng, Inner Mongolia 024000, China)

[KEY WORDS] Hypoxia Hypercapnia; Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2; Voltage Dependent K^+ Channel; 4-Aminopyridine

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role and significance of voltage dependent K^+ channel(K_v) and ERK1/2 signal pathway in the pathological process of hypoxia hypercapnia pulmonary vasoconstriction (HHPV) in rats. **Meth-**

ods We made the second pulmonary artery rings of SD rats in vitro, and divided the rings randomly into: control group, hypoxia hypercapnia group, hypoxia hypercapnia + DMSO incubation group(HD group), hypoxia hypercapnia + 4-aminopyridine(4-AP) incubation group(4-AP group), hypoxia hypercapnia + U0126 incubation group(U0126 group), hypoxia hypercapnia + 4-AP + U0126 incubation group(4-AP + U0126 group). Under acute hypoxia hypercapnia condition, we observed the effects of the three stages of HHPV incubated by 4-AP or the combined application of 4-AP and U0126. At the same time, the values of rings' tension changes were recorded. **Results** Under the acute hypoxia hypercapnia condition, we observed a biphasic pulmonary artery contractile response; The second pulmonary artery rings were incubated by 4-AP which phase II persistent vasoconstriction were enhanced compared with the HD group($P < 0.05$); U0126 can significantly relieve the phase II persistent vasoconstriction created by 4-AP($P < 0.05$). **Conclusion** The blocker of voltage dependent K^+ channel 4-AP enhanced HHPV, U0126 can significantly relieve the phase II persistent vasoconstriction.

Conclusion The blocker of voltage dependent K^+ channel 4-AP enhanced HHPV, U0126 can significantly relieve the phase II persistent vasoconstriction.

[收稿日期] 2014-01-14

[基金项目] 卫生部科学研究基金-浙江省医药卫生重大科技项目(WKJ2009-2-030);浙江省中医药重点学科建设项目(2012-XK-A28)

[作者简介] 马迎春,硕士研究生,研究方向为肺动脉高压发病机制研究,E-mail 为 mayingchun2@163.com. 通讯作者王万铁,教授,硕士研究生导师,研究方向为肺动脉高压发病机制研究及器官缺血再灌注损伤机制研究,E-mail 为 wwt@wzmc.edu.cn.

tion created by 4-AP, which pointed out that the ERK1/2 signal pathway's participation may be one of the important mechanisms of K_v 's regulation to the process of HHPV in rats.

以低氧性肺血管收缩为特点并引起的各种相关肺心疾病严重影响着人类的身体健康和生活质量,而在疾病的发生及进展过程中常伴有二氧化碳的潴留,故低氧高二氧化碳性肺血管收缩(hypoxia hypercapnia pulmonary vasoconstriction, HHPV)的研究更具有实际意义。细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular signal-regulated kinase 1/2, ERK1/2)是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号家族一重要成员。本室先前研究证实^[1], ERK1/2 信号转导通路参与调控大鼠 HHPV 及肺动脉高压的形成。而有研究发现^[2]:在低氧性肺血管收缩及血管重构的过程中,肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC)上钾离子通道功能的异常发挥重要作用,其中最重要且研究较多的是电压依赖性钾离子通道(voltage dependent K^+ channel, K_v)。那么 ERK1/2 信号通路在 HHPV 中发挥的作用与钾离子通道是否有关,目前未见详细报道。本研究用电压依赖性钾离子通道阻断剂 4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-AP)及 ERK1/2 信号通路抑制剂 U0126 在急性低氧高二氧化碳条件下孵育 SD 大鼠离体二级肺动脉环,动态观察血管环张力变化的情况,探讨电压依赖性钾离子通道及 ERK1/2 信号通路对大鼠急性 HHPV 的影响,为临床肺动脉高压及肺心病防治机制的研究提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

雄性 SD 大鼠(清洁级)由温州医科大学实验动物中心提供[SCXK(浙)2010-0044]。DMSO 购自上海申工生物技术有限公司, U0126 购自美国 Bio-source 公司, 乙酰胆碱(Ach)、4-AP 购自美国 Sigma 公司, 重酒石酸去甲肾上腺素购自上海禾丰制药有限公司, 其余均为市场所售分析纯。

1.2 模型的复制

SD 大鼠 36 只, 体重 300 ± 20 g, 随机分成 6 组($n=6$), 按照本室先前报道的方法^[3]制备大鼠二级肺动脉环灌流模型, 平衡肺动脉环并检测其内皮的完整性。

1.3 电压依赖性钾离子通道阻断剂及细胞外信号调节激酶 1/2 信号通路抑制剂对 HHPV 的影响

在急性低氧高二氧化碳介质中, 分别用 4-AP 及 4-AP 和 U0126 联合孵育二级肺动脉环, 观察药物处

理对 HHPV 的影响(60 min), 以明确其在 HHPV 中的作用。所有二级肺动脉环随机分为: 常氧组($n=6$); 低氧高二氧化碳组($n=6$); 低氧高二氧化碳 + DMSO 组(溶媒对照组, $n=6$); 低氧高二氧化碳 + 4-AP 组(4-AP 组, $n=6$); 低氧高二氧化碳 + U0126 组(U0126 组, $n=6$); 低氧高二氧化碳 + 4-AP + U0126 组(4-AP + U0126 组, $n=6$)。常氧组、低氧高二氧化碳组不做药物处理, 溶媒对照组、4-AP 组、U0126 组和 4-AP + U0126 组分别是用 DMSO(0.05%)、4-AP(10^{-3} mol/L)、U0126(10^{-5} mol/L)、4-AP(10^{-3} mol/L) + U0126(10^{-5} mol/L)孵育肺动脉环 20 min, 然后按照低氧高二氧化碳反应性测定方法, 检测肺动脉环张力的变化。

1.4 统计学处理方法

用 SPSS 17.0 统计软件分析, 计量资料均进行正态性检验, 数据(张力变化率)以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组样本均数比较进行方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析。方差齐性者两两比较采用 LSD 法, 方差不齐者进行 Dunnet's T3 法检验。 $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧高二氧化碳对二级肺动脉环张力的直接影响

常氧组持续通入 95% O_2 + 5% CO_2 混合气体 60 min, 张力变化率(P%) 未见明显变化。低氧高二氧化碳组持续通入 92% N_2 + 8% CO_2 混合气体 60 min, 其张力曲线呈双向性收缩(biphasic pulmonary artery vasoconstriction), 即在急性低氧高二氧化碳条件下 1 ~ 5 min 内出现 I 期快速收缩(phase I constriction), 5 ~ 15 min 内 I 期舒张(phase I vasodilation), 15 ~ 20 min 后又出现缓慢、持久的 II 期持续收缩(phase II vasoconstriction); 低氧高二氧化碳组二级肺动脉环的张力变化率与常氧组相比, 差异有显著性($P < 0.05$)。与低氧高二氧化碳组相比, 溶媒对照组张力变化率变化不明显($P > 0.05$; 图 1 和图 2)。

2.2 4-AP 对二级肺动脉环 HHPV 的影响

用 4-AP 孵育二级肺动脉环时发现, 4-AP 可增强二级肺动脉环的 HHPV, 尤其是 II 期持续收缩, 与溶媒对照组相比, 差异有显著性($P < 0.05$; 图 3 和图 4)。

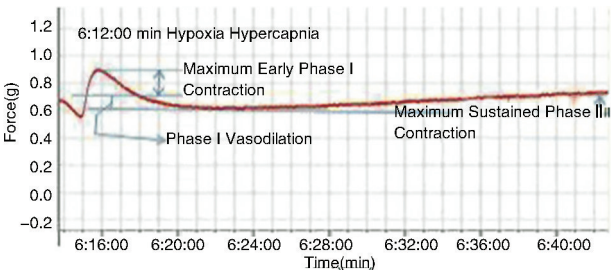


图 1. 低氧高二氧化碳条件下二级肺动脉环张力的动态变化
二级肺动脉环在低氧高二氧化碳条件下的双相收缩。
Figure 1. Dynamic changes of the second pulmonary artery rings' tension under the hypoxia hypercapnia condition

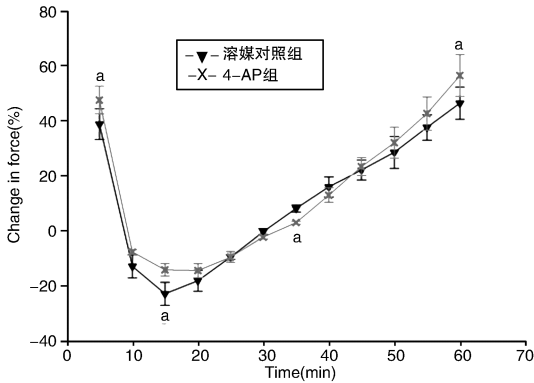


图 4. 4-AP 对二级肺动脉环 HHPV 的影响 a 为 $P < 0.05$, 与溶媒对照组比较。
Figure 4. Effect of 4-AP on the second pulmonary artery rings' hypoxic hypercapnia pulmonary vasoconstriction

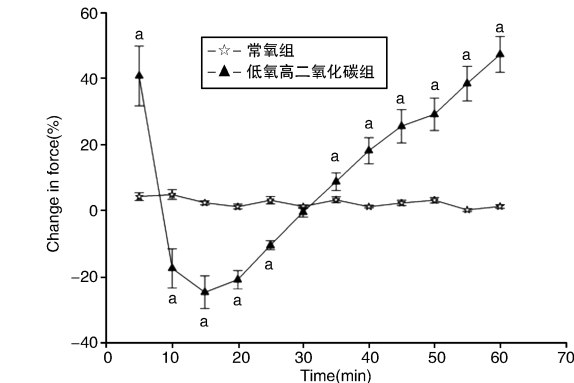


图 2. 低氧高二氧化碳对二级肺动脉环张力的影响 a 为 $P < 0.05$, 与常氧组比较。
Figure 2. Effect of hypoxia hypercapnia on the second pulmonary artery rings' tension

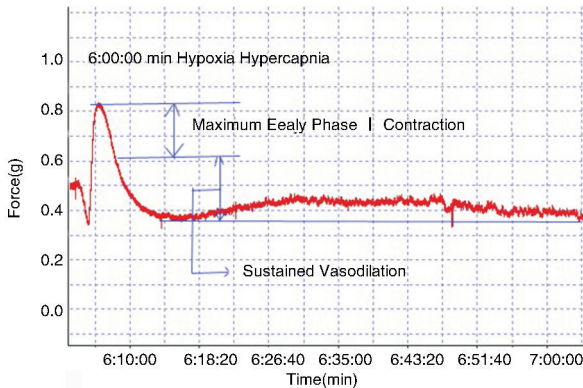


图 5. 低氧高二氧化碳条件下 U0126 组二级肺动脉环张力的动态变化 U0126 可缓解二级肺动脉环的 HHPV 的 II 期持续性收缩。
Figure 5. The dynamic curve of the second pulmonary artery rings' tension changes of the U0126 group under the hypoxia hypercapnia condition

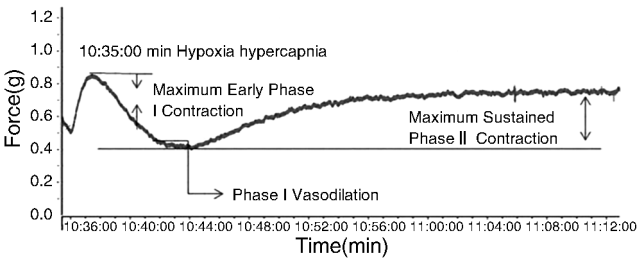


图 3. 低氧高二氧化碳条件下 4-AP 组二级肺动脉环张力的动态变化 4-AP 可增强二级肺动脉环的 HHPV。
Figure 3. The dynamic curve of the second pulmonary artery rings' tension changes of the 4-AP group under the hypoxia hypercapnia condition

2.3 U0126 对二级肺动脉环 HHPV 的影响

用 U0126 孵育二级肺动脉环时发现, U0126 不能缓解急性低氧高二氧化碳引起的二级肺动脉环 I 期快速收缩, 但可明显缓解 II 期持续性收缩, 与溶媒对照组相比, 差异有显著性 ($P < 0.05$; 图 5 和图 6)。

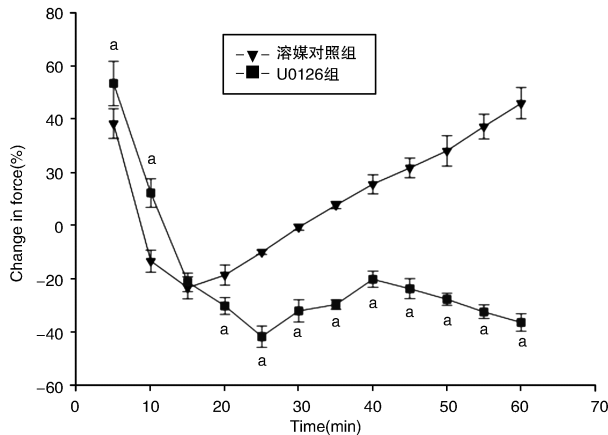


图 6. U0126 对二级肺动脉环 HHPV 的影响 a 为 $P < 0.05$, 与溶媒对照组比较。
Figure 6. Effect of U0126 on the second pulmonary artery rings' hypoxic hypercapnia pulmonary vasoconstriction

2.4 4-AP 与 U0126 联合应用对二级肺动脉环 HH-PV 的影响

用 4-AP 与 U0126 联合孵育二级肺动脉环,发现 U0126 能减弱 4-AP 所致的肺动脉收缩幅度,使

血管环张力下降。在急性低氧高二氧化碳介质中,4-AP + U0126 组Ⅱ期持续性收缩较溶媒对照组、4-AP 组明显缓解 ($P < 0.05$;图 7 和图 8)。

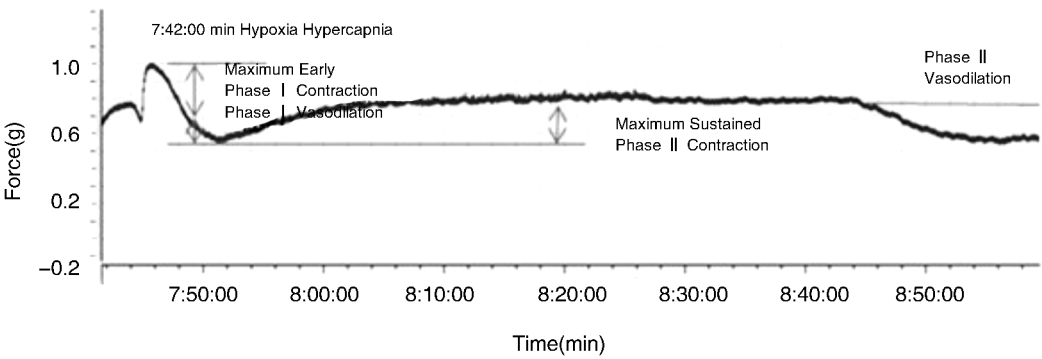


图 7. 低氧高二氧化碳条件下 4-AP + U0126 组二级肺动脉环张力的动态变化 U0126 能明显减弱 4-AP 所致的肺动脉Ⅱ期持续性收缩幅度。

Figure 7. The dynamic curve of the second pulmonary artery rings' tension changes of the 4-AP + U0126 group under the hypoxia hypercapnia condition

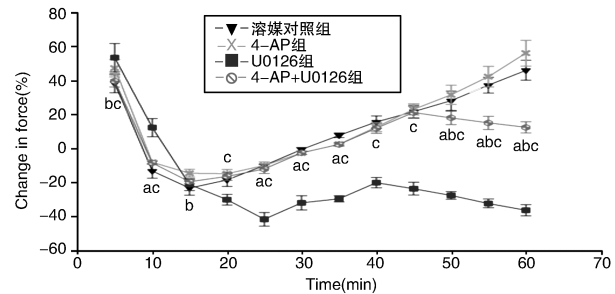


图 8. 低氧高二氧化碳条件下 4-AP 与 U0126 联合孵育时二级肺动脉环张力的动态变化 a 为 $P < 0.05$, 与溶媒对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 4-AP 组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 U0126 组比较。

Figure 8. The dynamic curve of the second pulmonary artery rings' tension changes with the combined application of 4-AP and U0126 under the hypoxia hypercapnia condition

3 讨论

MAPK 即丝/苏氨酸蛋白激酶,是一种细胞外信号调节激酶,它参与了细胞生长、发育、分裂、死亡以及细胞间的功能同步等多种生理反应过程。有关 MAPK 信号转导通路和低氧之间的关系近年来逐渐成为研究的热点,目前研究比较多的是 ERK1/2、p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein, p38MAPK) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 这三个亚族。孔春初等^[4]发现在低氧所致肺动脉高压大鼠肺组织 p-ERK 的表达随低氧时间延长呈动态变化,并较正常组表达明显

增强。实验中我们用 ERK1/2 通路抑制剂 U0126 孵育急性低氧高二氧化碳介质中的二级肺动脉环,结果发现 U0126 可明显缓解急性低氧高二氧化碳引起的二级肺动脉Ⅱ期持续性收缩,但不能缓解Ⅰ期快速收缩,这与我们之前的研究结果是一致的^[3]。血管平滑肌肌球蛋白轻链磷酸化水平的改变被认为与 ERK1/2 参与低氧血管平滑肌细胞收缩反应的调节有关,可能通过钙敏感性调节途径来发挥作用^[5]。但 ERK1/2 通路调节低氧高二氧化碳肺血管收缩的具体机制尚未明了。

已发现血管平滑肌细胞的钾通道主要有 4 种^[6,7],电压依赖性钾离子通道、钙离子激活性钾通道 (calcium-activated potassium channels, K_{Ca})、ATP 敏感性钾通道 (ATP-sensitive K^+ channels, K_{ATP}) 和内向整流性钾通道 (inward rectifier K^+ channels, K_{ir}),肺血管收缩中电压依赖性钾离子通道起着主要作用。现普遍认为低氧可使电压依赖性钾离子通道受抑制,导致膜发生去极化,引起膜上电压依赖性钙离子通道开放, Ca^{2+} 内流增加,触发兴奋收缩偶联机制^[8]。在实验中我们选用电压依赖性钾离子通道的阻断剂 4-AP 在急性低氧高二氧化碳介质中孵育二级肺动脉环,结果发现经 4-AP 孵育的血管环 HHPV 的收缩幅度增强,三期变化较明显,尤其是Ⅱ期持续性收缩。验证了电压依赖性钾离子通道与 HHPV 密切相关,阻断电压依赖性钾离子通道可增强肺动脉环 HHPV 收缩的幅度。

有研究表明常氧条件下 ERK1/2 通路参与 4-AP 阻断大鼠肺动脉平滑肌细胞膜上电压依赖性钾离子通道引起的肺动脉收缩^[9]。为了证实低氧高二氧化碳情况下是否亦有相同或相似的作用,我们选择了电压依赖性钾离子通道和 MAPK 家族成员中的 ERK1/2 为着手点,采用二级肺动脉灌注模型探讨电压依赖性钾离子通道与 ERK1/2 信号通路在 HHPV 中的作用及它们之间的关系。用电压依赖性钾离子通道阻断剂 4-AP 与 ERK1/2 信号通路抑制剂 U0126 联合孵育二级肺动脉环,发现在低氧高二氧化碳条件下 HHPV 的Ⅱ期持续性收缩明显下降。说明 ERK1/2 信号通路在电压依赖性钾离子通道受抑制引起的 HHPV Ⅱ期持续性收缩中发挥着重要的作用。因此我们有理由认为 U0126 能够缓解低氧高二氧化碳条件下通过对电压依赖性钾离子通道的阻断而引起的肺动脉血管环 HHPV 的增强。但其具体机制尚待进一步研究。

综上所述,在急性低氧高二氧化碳条件下,电压依赖性钾离子通道阻断剂 4-AP 增强大鼠 HHPV 的作用可能与 ERK1/2 信号通路的参与有关。

[参考文献]

- [1] 朱阿楠,王园园,王万铁,等. ERK 通路和三七总皂苷干预在低氧高二氧化碳性肺动脉压中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(9): 1 796-801.
- [2] Moudgil R, Michelakis ED, Archer SL. The role of K⁺

channels in detemining pulmonary vascular tone, oxygen sensing, cell proliferation and apoptosis: implications in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension[J]. *Microcirculation*, 2006, 13(8): 615-663.

- [3] 马迎春,陈海娥,王万铁,等. MAPK 通路抑制剂对三七皂甙单体 R1 减轻大鼠低氧高二氧化碳性肺血管收缩的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(10): 1 764-770.
- [4] 孔春初,戴爱国. 丝裂原活化蛋白激酶调节缺氧诱导因子 1 α 对大鼠缺氧性肺动脉高压的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2005, 28(5): 328-332.
- [5] 杨光明,李涛,徐竞,等. ERK 和 p38 MAPK 升高 MLC20 磷酸化调节大鼠平滑肌低氧反应性[J]. 基础医学与临床, 2011, 31(4): 366-370.
- [6] Coppock EA, Martens JR, Tamkun MM. Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated K⁺ channels[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(1): L1-L12.
- [7] Standen NB, Quayle JM. K⁺ channel modulation in arterial smooth muscle[J]. *Acta Physiol Scand*, 1998, 164(4): 549-557.
- [8] Platoshyn O, Yu Y, Ko EA, et al. Heterogeneity of hypoxia-mediated decrease in I[K(v)] and increase in [Ca²⁺] (cyt) in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293(2): 402-416.
- [9] 韩维娜,刘晔,朱大岭,等. ERK1/2 通路在 4-AP 诱导大鼠肺动脉收缩中的作用[J]. 中国药理学通报, 2007; 23(2): 202-206.

(此文编辑 许雪梅)