

# 有氧运动抑制衰老大鼠脑动脉平滑肌 STOC/BK<sub>Ca</sub> 功能下调

刘雨佳, 李娜, 石丽君

(北京体育大学运动生理教研室, 北京市 100084)

[关键词] 有氧运动; 自发瞬时外向电流; 大电导钙激活钾通道; 脑动脉; 衰老

[摘要] **目的** 探讨有氧运动训练对衰老大鼠脑动脉平滑肌细胞全细胞 K<sup>+</sup> 电流、自发瞬时外向电流及大电导钙激活钾通道生物物理特性的影响。**方法** 19~21 月龄雄性 Wistar 大鼠 12 只(老年组), 随机分为安静组和有氧运动组, 并选用 2 月龄 Wistar 大鼠安静处理作为青年对照组。12 周后取脑动脉, 急性分离动脉平滑肌细胞。分别采用膜片钳全细胞模式、穿孔膜片钳模式和单通道内面向外模式观察运动对全细胞 K<sup>+</sup> 电流、自发瞬时外向电流和大电导钙激活钾通道门控特性的影响。**结果** 安静组全细胞 K<sup>+</sup> 电流密度及对 Iberitoxin 敏感性降低; 安静组自发瞬时外向电流幅值降低, 频率无明显变化; 安静组大电导钙激活钾通道平均开放概率和平均开放时间显著低于青年对照组, 而平均关闭时间高于青年对照组; 电压依赖性和钙敏感性亦显著下降; 与安静组相比, 有氧运动可以增加全细胞 K<sup>+</sup> 电流密度、自发瞬时外向电流幅值及大电导钙激活钾通道平均开放概率、电压依赖性和钙敏感性来实现对大鼠脑动脉平滑肌自发瞬时外向电流/大电导钙激活钾通道功能的保护作用。**结论** 长期规律有氧运动可以减弱衰老所致的大鼠脑动脉平滑肌细胞大电导钙激活钾通道功能下调, 这可能是有氧运动改善衰老动脉功能的重要机制之一。

[中图分类号] R339.3<sup>+</sup>8

[文献标识码] A

## Aerobic Exercise Attenuates Aging Induced Downregulation of STOC/BK<sub>Ca</sub> Channels in Cerebral Arteries

LIU Yu-Jia, LI Na, and SHI Li-Jun

(Department of Exercise Physiology, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

[KEY WORDS] Aerobic Exercise; Spontaneous Transient Outward Currents; Large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> Channel; Cerebral Artery; Aging

[ABSTRACT] **Aim** To determine the effects of aerobic exercise training on aging-associated selective changes of the function of the spontaneous transient outward currents and the large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in cerebral arteries. **Methods** Male Wistar rats aged 19~21 months were randomly assigned to sedentary (O-SED) and exercise-trained groups (O-EX). Two-month-old rats were used as Young control. After 12 weeks, the segment of cerebral arteries was carefully dissected free, and separated into smooth muscle cells by two steps digestion. **Results** Whole-cell patch clamp showed that aging decreased the density of whole-cell K<sup>+</sup> current and iberitoxin-sensitive whole-cell K<sup>+</sup> current; The amplitude of spontaneous transient outward currents was decreased by aging, while there was no significant difference in the frequency; Inside-out patch clamp recording on cerebral arteries myocytes showed that aging decreased the open probability and Ca<sup>2+</sup>/voltage sensitivity of single large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel; The opening time was decreased by aging, whereas the close time was increased. However, exercise training inhibited all of these changes.

**Conclusion** These data suggest that regular aerobic exercise can attenuate the functional downregulation of spontaneous transient outward currents/large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in aging cerebral arteries myocytes, which may be one of the important mechanisms underlying the beneficial effects of aerobic exercise on aging arteries.

[收稿日期] 2014-09-23

[修回日期] 2014-11-29

[基金项目] 国家自然科学基金(31371201);北京市自然科学基金(5132017);新世纪优秀人才支持计划(NCET-11-0850);北京体育大学“科研创新团队发展计划”

[作者简介] 刘雨佳, 博士研究生, 研究方向为运动与心血管生理学。李娜, 博士研究生, 研究方向为运动与心血管生理学。通讯作者石丽君, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事运动与心脑血管功能调控相关研究, E-mail 为 l\_j\_shi72@163.com。

随着我国进入老龄化社会, 老龄人口的不断增加引起了更多的关注。衰老是心血管疾病的重要危险因素。随着年龄的增长, 动脉血管结构和功能发生重构, 出现动脉硬化、内皮功能减退和舒张能力减弱等变化<sup>[1]</sup>, 这些衰老变化使得心血管疾病的发生阈值降低。与衰老相反, 长期规律性运动, 尤其是有氧运动, 可以增强血管功能, 延缓心血管疾病的发生<sup>[2]</sup>, 降低心血管疾病发病率<sup>[3-5]</sup>。其作用机制非常复杂, 除神经和体液调节外, 发生在血管本身的结构和功能改善亦非常重要。钙火花 (calcium sparks) 是细胞内肌浆网上一个或一些紧密成簇分布的兰诺丁受体 (Ryanodine receptor, RyR) 所产生的一过性局部微小钙释放活动。钙火花引起胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度会一过性增高, 激活邻近膜上 10 ~ 100 个大电导钙激活钾通道 (large conductance calcium-activated potassium channels,  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ ), 产生自发瞬向外向电流 (spontaneous transient outward currents, STOC)<sup>[6]</sup>, STOC 是  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道开放的表现, 常作为评价钙火花与  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道之间耦联的重要指标。 $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道是血管平滑肌细胞上分布最丰富、单通道电导最大 (200 ~ 300 pS) 的  $\text{K}^+$  通道, 由  $\alpha$  亚基和  $\beta 1$  亚基构成, 在血管张力的负反馈调节中发挥着重要作用<sup>[7-8]</sup>。 $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的激活可引起细胞膜超极化, 导致电压依赖性钙通道关闭,  $\text{Ca}^{2+}$  内流减少, 细胞内钙离子浓度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 下调, 从而抑制血管平滑肌的兴奋-收缩耦联, 使血管舒张。近期本课题组研究发现, 在青年大鼠肠系膜动脉上, 有氧运动可以通过上调  $\text{BK}_{\text{Ca}}$   $\beta 1$  亚基的功能使此通道活性增加, 从而诱发血管舒张能力增强。然而, 有研究报道, 衰老将引起某些血管床  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的结构和功能改变<sup>[9]</sup>。有氧运动对于衰老脑动脉  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的功能有何影响, 至今尚未见报道。因此, 本研究拟采用膜片钳技术探讨有氧运动对衰老大鼠脑动脉平滑肌细胞  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的影响, 以期能为有氧运动延缓血管衰老的细胞学机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

2 月龄健康雄性 Wistar 大鼠购自北京维通利华实验技术有限公司, 饲养至 19 ~ 21 月龄 (老年组), 随机分为安静组 (O-SED,  $n = 6$ ) 和有氧运动组 (O-EX,  $n = 6$ )。另选取 2 月龄雄性 Wistar 大鼠 6 只作为青年对照组 (Young)。大鼠按照国家标准啮齿类

动物饲料喂养, 自由饮食, 温度维持在 22 ~ 24°C, 相对湿度 40% ~ 60%, 昼夜节律人工控制光照 (光照时间为 6:00-18:00)。

### 1.2 主要药物

牛血清蛋白 (BSA)、I 型胶原酶 (type I-S collagenase)、木瓜蛋白酶 (Papain)、F 型胶原酶 (type F collagenase)、二巯苏糖醇 (DTT)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸 (HEPES)、Iberitoxin (IBTX) 均购自 Sigma (美国), 其余为国产分析纯试剂。

### 1.3 训练方案

有氧运动组大鼠先进行 1 周适应性跑台训练, 之后进行 12 周跑台运动, 坡度 0°, 每分钟 15 m, 每天 60 min, 每周 5 天。安静组与青年对照组不运动。三组均于 13 周结束后的 24 ~ 48 h 内取材。

### 1.4 大鼠脑动脉平滑肌细胞分离

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg), 断头后迅速打开颅腔取脑置于 4°C 无钙分离液 I (PSS I) 中, 小心剥离基底动脉和 Willis 环, 将其剪成约 1.5 mm 的小段, 室温静置约 10 min 后放入酶 I 中, 内含木瓜蛋白酶 (papain, 0.3 g/L)、DDT (dithiothreitol, 1 g/L) 和牛血清白蛋白 (BSA, 1 g/L), 37°C 温育 25 min<sup>[10]</sup>; 之后转入酶 II 继续消化 10 min, 酶 II 含胶原酶 Type F (1.5 g/L)、Type I-S (1 g/L) 和 BSA (1 g/L)。消化完毕后, 组织用 PSS II 洗 3 ~ 4 遍, 钝头吸管轻轻吹打, 制备细胞悬液, 4°C 保存备用。PSS I 成分 (mmol/L): 137 NaCl, 5.6 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glucose, 0.03 硝普钠 (NaOH 调节 pH 至 7.4)。PSS II 成分 (mmol/L): 137 NaCl, 5.6 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 10 Glucose, 0.42 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.44 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (NaOH 调节 pH 至 7.3 ~ 7.4)。

### 1.5 全细胞钾电流记录

全细胞  $\text{K}^+$  电流采用膜片钳技术传统全细胞模式进行记录。记录电极经控制仪两部控制后电极尖端直径约为 1 ~ 2  $\mu\text{m}$ , 充灌电极内液后电极阻抗为 3 ~ 5 M $\Omega$ 。电极内液成分 (mmol/L): 110 天冬氨酸钾 (K-Asp), 30 KCl, 1 EGTA, 3 Na<sub>2</sub>ATP, 0.85 CaCl<sub>2</sub>, 10 Glucose, 10 HEPES (用 KOH 将 pH 调至 7.2)。细胞浴液成分 (mmol/L): 134 NaCl, 6 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 1.8 CaCl<sub>2</sub>, 10 Glucose, 10 HEPES (用 NaOH 将 pH 调至 7.4)。刺激方案为: 钳制电压在 -60 mV, 逐步去极至 +80 mV, 阶跃 +10 mV, 脉冲时程为 400 ms。

### 1.6 大电导钙激活钾通道单通道记录

单通道电流采用内面向外模式进行单通道记录, 细胞内外液采用对称性高  $\text{K}^+$  (145 mmol/L) 方式。

记录电极经控制仪两部控制,经抛光仪抛光,充灌电极内液后电极阻抗为 10~15 MΩ。电极内液成分 (mmol/L):100 KCl,45 K-Asp,1 EGTA,10 HEPES,5 Glucose (用 KOH 将 pH 调至 7.4)。细胞浴液成分 (mmol/L):45 KCl,100 K-Asp,1 EGTA,10 HEPES,5 Glucose (用 KOH 将 pH 调至 7.4)。溶液中的游离  $Ca^{2+}$  浓度  $[Ca^{2+}]_{free}$  通过加入适量  $CaCl_2$  和 EGTA,控制所有  $CaCl_2$  和 EGTA 的量利用 WinMAXC 软件 (WinMAXC, Chris Patton, Stanford University) 计算得到。采样为 Gap free 模式,采样频率为 10 kHz,八极 Bessel 低通滤波频率为 2 kHz。采用通道在封接过程中开放的数目来计算通道开放概率。NPo-voltage(V) 关系采用 Boltzmann 方程拟合:  $P_o = 1 / \{1 + \exp[-ZF/RT(V - V_{1/2})]\}$  (其中  $V_{1/2}$  表示有半数通道激活的膜电位, F 表示法拉第常数, R 为气体常数, T 为绝对温度)。  $Ca^{2+}$  依赖性激活曲线采用 Hill 方程拟合:  $P_o = [Ca^{2+}]_i \eta^H / (K_d \eta^H + [Ca^{2+}]_i \eta^H)$  (其中  $\eta^H$  为希尔系数,  $K_d$  为解离常数)。

### 1.7 自发瞬向外向电流的记录

采用两性霉素 B 穿孔全细胞膜片钳技术记录 STOC。电极内液成分 (mmol/L):110 K-Asp, 30 KCl,10 NaCl,0.05 EGTA,1  $MgCl_2$ ,10 HEPES (用 KOH 调节 pH 至 7.2),充灌电极时加入两性霉素 B,终浓度为 250 mg/L;细胞浴液成分 (mmol/L):134 NaCl,10 HEPES,1  $MgCl_2$ ,6 KCl,10 Glucose,1.8  $CaCl_2$  (用 NaOH 调节 pH 至 7.4)。钳制电压从 -40 mV 去极化至 -10 mV。采用 Mini Analysis 6.0 program (Synaptosoft, Inc., Decatur, GA, USA) 对 STOC 进行分析,STOC 阈值设为 10 pA。

所有的电生理实验均采用 Axon700B 放大器、DigData1440 数模模数转换器、pClamp 10.2 和 Clamfit 10.2 进行数据采集和处理。

### 1.8 统计学分析

所有结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS17.0 进行数据统计分析,采用 Origin8.0、Sigmaplot 10.0 和 GraphPad Prism 5 进行作图。三组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA),  $P < 0.05$  为差异有显著性,  $P < 0.01$  为差异有非常显著性。

## 2 结果

### 2.1 有氧运动抑制衰老大鼠脑动脉平滑肌大电导钙激活钾通道电流降低

为了研究脑动脉平滑肌细胞上  $BK_{Ca}$  电流的变

化,采用全细胞模式记录得到的全细胞  $K^+$  电流如图 1 所示。在同样的实验条件下,可以看到青年对照组全细胞电流密度 (pA/pF) 明显高于安静组,而有氧运动组介于两者之间。在全细胞  $K^+$  电流的基础上在细胞浴液中加入  $BK_{Ca}$  通道的特异性阻断剂 Iberiotoxin (IBTX, 100 nmol/L),全细胞  $K^+$  电流大部分被阻断。这一结果表明,衰老可以引起全细胞外向  $K^+$  电流对 IBTX 的敏感性降低,即衰老引起  $BK_{Ca}$  通道功能降低。与安静组相比,有氧运动组全细胞  $K^+$  电流密度和全细胞 IBTX 敏感电流密度明显增高,表明有氧运动可以抑制由于衰老引起的  $BK_{Ca}$  电流密度降低。

### 2.2 有氧运动抑制衰老引起大鼠脑动脉平滑肌大电导钙激活钾通道功能降低

采用单通道内面向外模式对  $BK_{Ca}$  通道的单通道功能及门控特性进行了检测。在所有三个组别中,单通道的标准化开放概率 (normalized P<sub>o</sub>, NP<sub>o</sub>) 均随着膜去极化电压的增加而增加,呈现出电压依赖性。

以自由钙浓度为 1 μmol/L 时记录到的 NP<sub>o</sub> 为纵坐标,不同的钳制电压为横坐标,做通道标准化总开放概率-电压 [(Normalized NP<sub>o</sub>)-V] 关系曲线 (图 2A),Normalized NP<sub>o</sub> 与 V 的关系用 Boltzmann 方程拟合以得出通道达 50% 最大开放概率的电压值 ( $V_{1/2}$ )。各组 Normalized NP<sub>o</sub> 均随电压的增加而增大,表现出明显的电压依赖性。与青年对照组相比,安静组和有氧运动组的 (Normalized NP<sub>o</sub>)-V 曲线都沿着电压轴右移,而有氧运动组相对于安静组左移。由此可以得出,衰老可以使大鼠脑动脉平滑肌  $BK_{Ca}$  通道电压敏感性降低,而有氧运动可以在一定程度上增强衰老大鼠脑动脉平滑肌  $BK_{Ca}$  通道电压敏感性。

以膜电位 +40 mV 下记录到的 Normalized NP<sub>o</sub> 为纵坐标,不同胞内自由钙离子浓度为横坐标,做通道标准化总开放概率-钙离子浓度 (Normalized NP<sub>o</sub>- $Ca^{2+}$ ) 关系曲线 (图 2B),Normalized NP<sub>o</sub> 与钙离子浓度的关系用希尔方程拟合。与电压敏感性曲线相似,相比于青年对照组,安静组和有氧运动组的 Normalized NP<sub>o</sub>- $Ca^{2+}$  关系曲线都右移,但安静组右移的更加明显,相对于安静组,有氧运动组则明显左移。以上结果可以推断,衰老可以降低大鼠脑动脉平滑肌  $BK_{Ca}$  通道的钙敏感性,而有氧运动可以在一定程度上增强衰老大鼠脑动脉平滑肌  $BK_{Ca}$  通道电压敏感性。

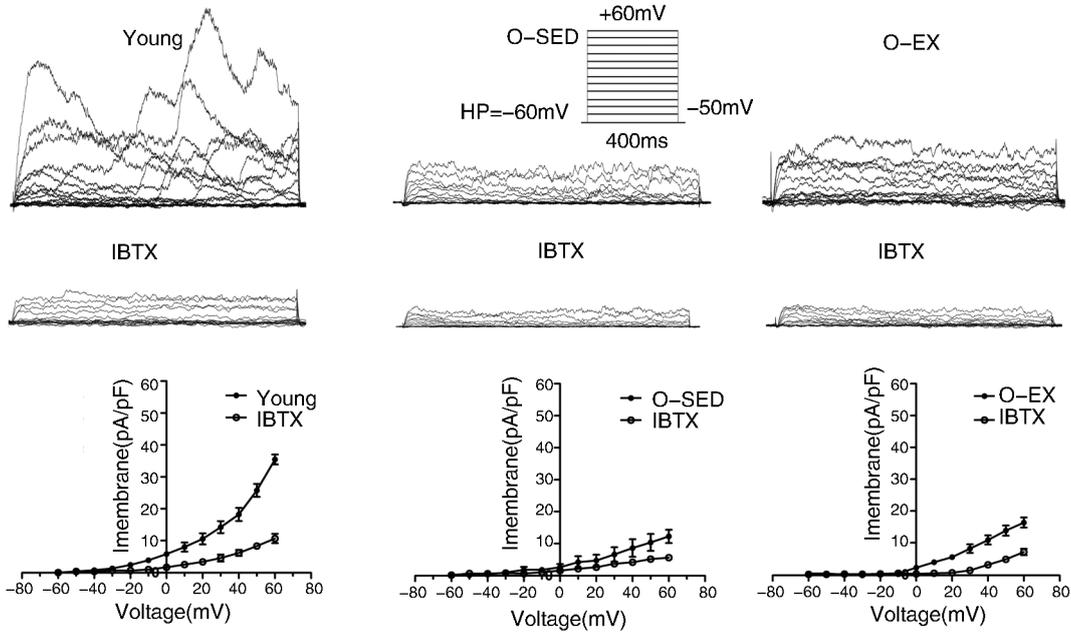


图 1. 有氧运动对衰老大鼠脑动脉平滑肌细胞的全细胞钾电流的影响 左图为青年对照组 (Young), 中图为安静组 (O-SED), 右图为有氧运动组 (O-EX); 上图为阶跃模式记录得到的典型全细胞  $K^+$  电流, 中图为 IBTX (100 nmol/L) 阻断后的全细胞  $K^+$  电流, 下图为不同钳制电压下的电流密度及 IBTX 阻断后的电流密度。各组  $n$  为 20 个细胞, 来自 6 只大鼠。

Figure 1. Whole-cell  $K^+$  currents in myocytes of cerebral arteries

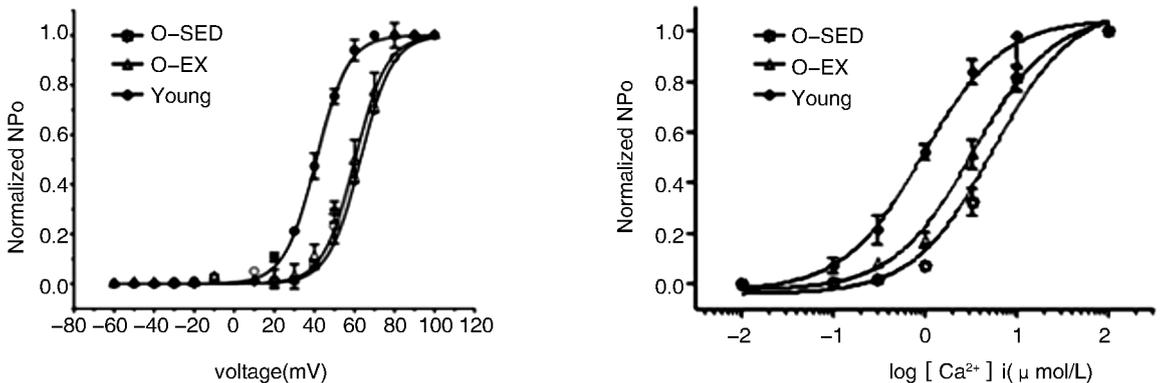


图 2. 有氧运动对衰老脑动脉平滑肌细胞大电导钙激活钾通道电压敏感性和钙敏感性的影响 左图为  $1 \mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  浓度下的电压敏感性; 右图为钳制电压在  $+40 \text{ mV}$  时的钙敏感性。各组  $n$  为 20 个细胞, 来自 6 只大鼠。

Figure 2. Effects of exercise training on  $\text{Ca}^{2+}$ /voltage sensitivity of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels in aging cerebral artery smooth muscle cells

当钳制电压为  $+80 \text{ mV}$  时, 三组的  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道活动差别不大。在钳制电压为  $+40 \text{ mV}$ ,  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$  浓度分别为  $1 \mu\text{mol/L}$  和  $3 \mu\text{mol/L}$  时, 对三组脑动脉平滑肌  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的动力学特性进行了研究, 通过线性拟合得出三组的电导值分别为:  $239.3 \pm 9.2 \text{ pS}$  (青年对照组)、 $226.6 \pm 6.3 \text{ pS}$  (安静组)、 $240.9 \pm 18.1 \text{ pS}$  (有氧运动组), 三组的电导值相似, 差异没有统计学意义 (图 3)。与青年对照组相比, 安静组的  $\text{NPo}$  显著性降低。而与安静组相比, 有氧运动组又有所增加。采用单指数方程对  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的开放

和关闭进行拟合, 结果表明安静组和有氧运动组的平均开放时间小于青年对照组, 而有氧运动组大于安静组; 安静组和有氧运动组的平均关闭时间大于青年对照组 ( $P < 0.01$ ), 而有氧运动组小于安静组 ( $P < 0.01$ ; 图 3)。由此可以推知, 衰老使大鼠脑动脉平滑肌  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的电压敏感性和钙敏感性下降, 导致其活性降低, 平均开放时间缩短, 平均关闭时间延长, 而有氧运动可以在一定程度上增强衰老大鼠脑动脉平滑肌  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道钙敏感性。

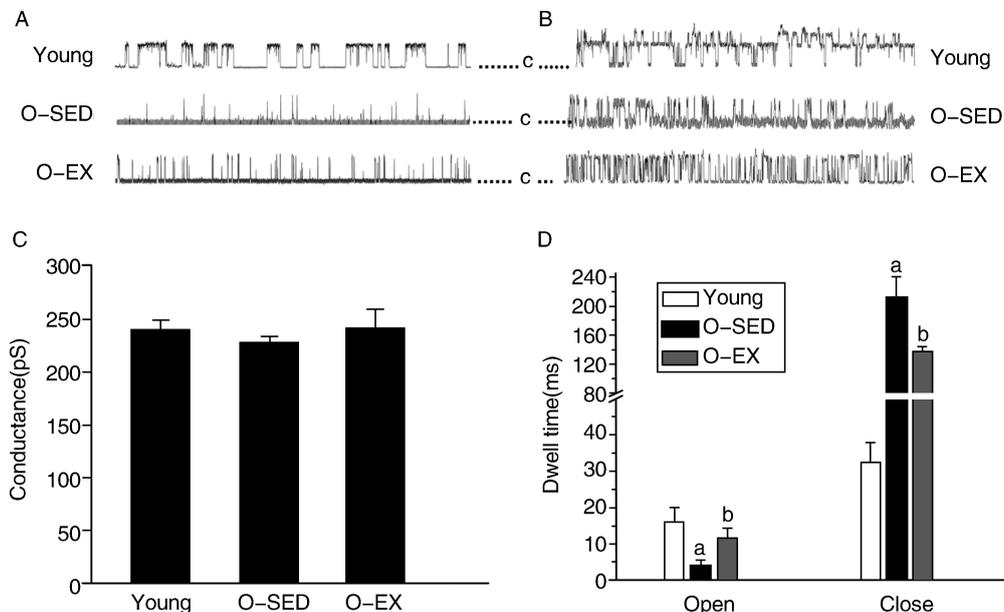


图 3. 有氧运动对衰老脑动脉平滑肌细胞大电导钙激活钾通道特性及门控特性的影响 A 为钳制电压在 +40 mV 时 1  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  浓度记录的单通道电流; B 为钳制电压在 +40 mV 时 3  $\mu\text{mol/L}$   $\text{Ca}^{2+}$  浓度记录的单通道电流; C 为  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道单通道电导值; D 为  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道平均开放/关闭时间。a 为  $P < 0.01$ , 与青年对照组 (Young) 比较; b 为  $P < 0.01$ , 与安静组 (O-SED) 比较。各组  $n$  为 24 个细胞, 来自 6 只大鼠。

Figure 3. Effects of exercise training on aging-induced alteration of  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channel activity and gating properties in cerebral artery smooth muscle cells

### 2.3 有氧运动抑制衰老引起大鼠脑动脉平滑肌自发瞬时外向电流幅值降低

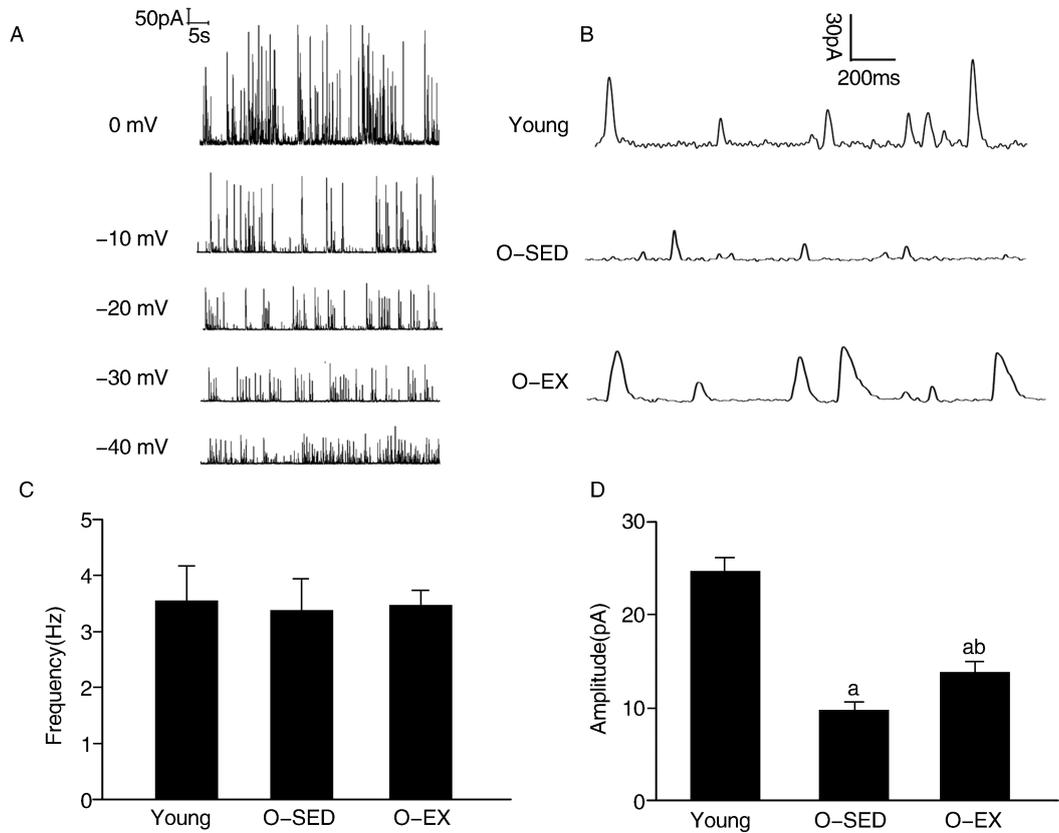
采用穿孔膜片钳对三组大鼠脑动脉平滑肌 STOC 进行记录, 结果表明随着钳制电压的去极化, 三组 STOC 的频率和幅值均增大, 呈现出明显的电压依赖性 (图 4A)。而在加入雷诺丁敏感的钙释放通道 (RyR) 特异性阻断剂 Ryanodine (30  $\mu\text{mol/L}$ ) 后, STOC 被完全阻断 (图未示)。经统计发现, 三组间 STOC 在相同钳制电压下其频率差异无显著性, 以钳制电压为 -40 mV 时为例, 三组 STOC 的频率分别为  $3.6 \pm 0.6$  Hz (青年对照组)、 $3.4 \pm 0.6$  Hz (安静组)、 $3.5 \pm 0.1$  Hz (有氧运动组)。而与青年对照组相比, 安静组的幅值显著减小 ( $P < 0.01$ )。有氧运动组与安静组相比, 幅值增大 ( $P < 0.01$ )。例如在 -40 mV 时, 各组的幅值分别为:  $24.7 \pm 1.5$  pA (青年对照组)、 $9.6 \pm 1.1$  pA (安静组)、 $13.8 \pm 1.2$  pA (有氧运动组) (图 4B-D)。

## 3 讨论

本研究采用全细胞模式对全细胞  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道介导的  $\text{K}^+$  电流进行记录, 结果发现与青年对照组相比, 同等实验条件下老年安静组  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道介导的全细胞  $\text{K}^+$  电流以及电流密度均降低。这与众多关于

$\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道增龄变化的研究结果相一致<sup>[11]</sup>。由此可以得出结论, 衰老引起大鼠脑动脉平滑肌上  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的活动减少, 功能降低。Nishimaru 等<sup>[12]</sup> 通过对幼龄和老龄大鼠  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道以及冠状动脉平滑肌细胞  $\alpha$  亚基转录水平的研究发现,  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的  $\alpha$  亚基和  $\beta 1$  亚基功能表达和蛋白水平呈现年龄依赖性下降, 这可能是衰老引起  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道功能下降的原因。除蛋白表达减少外,  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的活性下降也是  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道功能降低的影响因素。

通过穿孔膜片钳实验发现衰老引起大鼠脑动脉平滑肌 STOC 的幅值降低, 但是组间的频率差别不大。STOC 的产生是由于内质网上 RyR 的开放, 引起 RyR 敏感的钙库释放, 激发出钙火花, 使细胞膜局部范围的钙浓度高于其他部位, 使邻近的  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道开放概率增加引起激活而产生的外向瞬时电流。STOC 的活动抑制了细胞膜的去极化, 使电压依赖性的 L 型  $\text{Ca}^{2+}$  通道开放减少, 降低胞内  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , 引起细胞舒张来实现对血管张力的调节<sup>[13]</sup>。钙火花是 STOC 产生的直接来源, 同时 STOC 又反映了细胞局部  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道的宏观活动, 因此 STOC 被认为是反映钙火花与  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  通道耦联关系的重要指标。Perez 等<sup>[14]</sup> 应用激光共聚焦扫描实验与膜片钳电生理实验相结合的方法也证实了这种耦联关系的存在。对钙火花和 STOC 在生理膜电位



**图 4. 有氧运动对衰老脑动脉平滑肌细胞自发瞬时外向电流的影响** A 为穿孔膜片钳记录得到的典型 STOC 电流;B 为钳制电压在  $-40$  mV 时记录得到的三组 STOC 电流;C 为钳制电压为  $-40$  mV 时各组 STOC 频率;D 为钳制电压为  $-40$  mV 时 STOC 幅值。a 为  $P < 0.01$ , 与青年对照组 (Young) 比较;b 为  $P < 0.01$ , 与安静组 (O-SED) 比较。各组  $n$  为 18 个细胞,来自 6 只大鼠。

**Figure 4 . Effects of exercise training on aging-induced alteration of STOC in cerebral artery smooth muscle cells**

下的同步记录结果表明,几乎每一次钙火花就能够激发一次明显的 STOC,而 STOC 的幅值与钙火花呈现出明显的正相关,尽管钙火花和 STOC 的幅值并不相同。因此 STOC 的发生频率在一定程度上能够反映胞内钙释放时间的活动频率。通过比较老年安静组和青年对照组,STOC 的频率没有显著性差异。这一结果在一定程度上说明衰老对钙火花的发生频率影响不大,但是具体的影响效应如何需要通过激光共聚焦扫描实验才能更好的进行说明。

老年安静组的 STOC 幅值明显低于青年对照组,说明衰老使钙火花与  $BK_{Ca}$  通道的耦联功能下降,而其可能的因素是多方面的。RyR 释放钙的功能是影响 STOC 幅值的重要因素,而衰老引起 STOC 幅值降低可能是 RyR 在内质网上的表达数量减少或钙火花发放位点减少,虽然钙火花发放频率并没有变化,但是对胞内  $[Ca^{2+}]_i$  的作用降低,不能够激活全胞  $BK_{Ca}$  通道,进而使 STOC 幅值降低<sup>[15]</sup>。STOC 幅值减小的另外一个重要影响因素可能是  $BK_{Ca}$  通道功能降低。当钙火花活动引起膜电位以及胞内  $[Ca^{2+}]_i$  变化时,由于  $BK_{Ca}$  通道功能降低,电压

敏感性和  $Ca^{2+}$  敏感性下降,不能够对胞内微小的电位变化和  $[Ca^{2+}]_i$  变化做出反应,被激活的  $BK_{Ca}$  通道数量减少,STOC 幅值因此而减小。而平滑肌细胞上  $BK_{Ca}$  通道表达的数量是 STOC 的决定性因素。大量研究都证实,衰老会使  $BK_{Ca}$  通道在血管平滑肌上表达减少,但是所选取的血管床和实验方法不同也会存在差异。

为确定衰老是否引起  $BK_{Ca}$  通道单通道功能的变化,采用膜片钳内面向外单通道记录模式对青年对照组、安静组和有氧运动组三组脑动脉平滑肌细胞上  $BK_{Ca}$  通道的电生功能及门控特性进行了研究。结果显示安静组电压敏感性和钙敏性下降、平均开放时间缩短而平均关闭时间延长。

$BK_{Ca}$  通道具有电压依赖性和钙敏感性,其电导值一般为  $100 \sim 300$  pS。实验发现青年对照组、安静组和有氧运动组三组脑动脉平滑肌细胞上  $BK_{Ca}$  通道的电导值并没有显著差异。前人的研究也显示老年大鼠胸主动脉平滑肌细胞  $BK_{Ca}$  通道电导值不会由于增龄而发生改变<sup>[16]</sup>,Zhao 等<sup>[17]</sup> 的研究也发现运动未影响青年小鼠主动脉平滑肌细胞  $BK_{Ca}$  通

道的电导值,许建文等<sup>[18]</sup>的研究证明游泳运动也未改变大鼠动脉平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub>通道的电导值。这表明衰老和运动对 BK<sub>Ca</sub>通道的电导值影响不大。

动脉平滑肌上的 BK<sub>Ca</sub>通道是由 4 个同源  $\alpha$  亚基和 4 个  $\beta$ 1 亚基组成的异源多聚体通道。 $\alpha$  亚单位是构成通道的结构单位,而  $\beta$ 1 亚单位起到调节作用。 $\beta$ 1 亚基可以增加 BK<sub>Ca</sub>的电压敏感性和钙敏感性,从而使通道活性增强,并且增强对某些药物的敏感性<sup>[19]</sup>,如 Tamoxifen<sup>[20]</sup>、雌激素和 DHS-1<sup>[21]</sup>。正常情况下  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基的结合比例是 1:1<sup>[22]</sup>,通道的药理学特性会由于比例改变而影响。因此,维持动脉平滑肌细胞的正常生理状态依赖于两亚基的平衡。有关于 BK<sub>Ca</sub>通道  $\beta$ 1 亚基基因敲除的研究证实,由于  $\beta$ 1 亚基的缺失,通道的钙敏感性明显降低、开放概率减小,与钙火花失耦联,从而导致对血管收缩物质敏感性增加、血管张力增加,表现为血压升高<sup>[23-24]</sup>。本课题组关于衰老引起肠系膜动脉 BK<sub>Ca</sub>通道功能降低的研究发现,衰老使肠系膜动脉上 BK<sub>Ca</sub>通道  $\alpha$  亚基和  $\beta$ 1 亚基不平行下调,引起其生物活性改变<sup>[25]</sup>。因此,衰老引起脑动脉平滑肌 BK<sub>Ca</sub>通道物理特性和门控特性的变化机制可能与肠系膜动脉相一致,即衰老导致脑动脉平滑肌 BK<sub>Ca</sub>通道  $\alpha$  亚基和  $\beta$ 1 亚基比例失调,功能下降,极有可能是  $\beta$ 1 亚基功能下降。

有关衰老对动脉 BK<sub>Ca</sub>通道生物物理学特性的影响,前人已有部分报道。如罗兴林等<sup>[16]</sup>的实验结果表明 Wistar 大鼠主动脉 BK<sub>Ca</sub>通道由于增龄而出现钙敏感性和电压敏感性下降,开放概率降低,关闭时间延长;另外,吴爱山等<sup>[26]</sup>也发现人肠系膜动脉 BK<sub>Ca</sub>通道由于增龄衰老而表现为电压敏感性和钙敏感性下降、开放概率降低、开放时间缩短且关闭时间延长。这些结果与本研究结果相一致。但是 Nishimaru 等通过巨膜片内面向外记录技术发现衰老 F344 大鼠冠状动脉<sup>[12]</sup>和脑动脉<sup>[24]</sup> BK<sub>Ca</sub>通道钙敏感性和电压敏感性变化不大;而通过对冠状动脉平滑肌上 BK<sub>Ca</sub>通道的检测发现, BK<sub>Ca</sub>通道的  $\alpha$  亚基和  $\beta$ 1 亚基表达均下降,且以 1:1 的比例下降,从而导致全细胞 BK<sub>Ca</sub>通道电流密度下降,而脑动脉平滑肌细胞上 BK<sub>Ca</sub>通道  $\alpha$  亚基和  $\beta$ 1 亚基表达均未下降,全细胞电流密度也因此未发生改变。此研究结果与本研究不一致,这可能是由于实验方法不同所造成的。尽管如此,我们仍可以明确衰老具有选择性地使不同动脉上的 BK<sub>Ca</sub>通道亚基表达和功能减退。然而,发生这种选择性变化的机制还不清楚,

需要进一步的研究。

前人的研究更多的集中在衰老对 BK<sub>Ca</sub>通道表达和功能的影响,并未深入研究运动对它的影响。本实验中实验结果表明,除 STOC 频率和单通道电导值外,运动均可以削弱由衰老导致的 BK<sub>Ca</sub>通道功能减退。近年来,Albarwani 等<sup>[11]</sup>研究发现低强度的有氧运动可以使老龄 F344 大鼠冠状动脉平滑肌全细胞 BK<sub>Ca</sub>通道电流增强,而使 BK<sub>Ca</sub>通道蛋白的减少效应降低,从而使衰老大鼠冠状动脉平滑肌对血管张力调控的能力增强。但他们没有运用单通道记录技术来研究有氧运动对 BK<sub>Ca</sub>通道门控特性的影响。本研究发现老年大鼠通过 12 周低强度的有氧运动可以使脑动脉平滑肌 BK<sub>Ca</sub>通道的门控特性改变,钙敏感性和电压敏感性增强,通道活性增加,但仍低于青年对照组。这一结果提示有氧运动只能对衰老造成的脑动脉平滑肌 BK<sub>Ca</sub>通道功能减退在一定程度上起到延缓的趋势。

本课题组最近的研究表明 12 周不同运动量的有氧运动可以增强青年大鼠胸主动脉 BK<sub>Ca</sub>通道活性,诱导胸主动脉的功能重塑<sup>[19]</sup>;有氧运动可使青年大鼠肠系膜动脉平滑肌  $\beta$ 1 亚基表达上调从而增加 BK<sub>Ca</sub>通道对血管张力的调控<sup>[10]</sup>。诸多实验表明有氧运动能够诱导动脉平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub>通道功能重塑,增强血管张力调节能力。但是,衰老和有氧运动调节血管功能的分子机制仍未明确。现有资料显示,糖尿病大鼠动脉平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub>通道  $\beta$ 1 亚基可由于 FOXO-3a/FBXO 途径的激活而下调<sup>[27]</sup>;  $\beta$ 1 亚基表达因 SRF-MYOC 信号途径激活而增加,但  $\alpha$  亚基表达无影响<sup>[28]</sup>; Ang II 诱发的高血压可以通过激活钙调神经磷酸酶/NFATc3 途径下调 BK<sub>Ca</sub>通道  $\beta$ 1 亚基表达<sup>[29]</sup>;此外对人肺动脉平滑肌的研究发现  $\beta$ 1 亚基表达增加通过 HIF $\alpha$  的表达增加而实现<sup>[30]</sup>。但是,衰老和有氧运动影响 BK<sub>Ca</sub>通道功能和表达的分子学机制还需要更多的研究证实。

衰老使大鼠脑动脉平滑肌细胞上 STOC/BK<sub>Ca</sub>功能下降,而有氧运动在一定程度可减弱此变化,这可能是有氧运动改善衰老动脉舒张功能的一个重要分子机制。

#### [参考文献]

- [1] 温峰,李志樑. 大鼠动脉硬化与血管衰老相关基因的芯片表达谱筛选及其表达研究[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(4): 315-320.
- [2] 钟兴明,何榕,尤少华,等. 有氧运动对高同型半胱氨酸血症

- 载脂蛋白 E 基因敲除小鼠动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(9): 782-786.
- [3] Green DJ, Eijsvogels T, Bouts YM, et al. Exercise training and artery function in humans: nonresponse and its relationship to cardiovascular risk factors [J]. *J Applied Physiol*, 2014, 117(4): 345-352.
- [4] Parmenter BJ, Dieberg G, Smart NA. Exercise training for management of peripheral arterial disease: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Sports Med*, 2015, 45(2): 231-244.
- [5] 米春娟, 马珺. 运动改善血管效应及其分子机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21(7): 663-667.
- [6] Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks [J]. *Physiological Reviews*, 2008, 88(4): 1491-545.
- [7] Carvalho-De-Souza JL, Varanda WA, Tostes RC, et al. BK Channels in cardiovascular diseases and aging [J]. *Aging Dis*, 2013, 4(1): 38-49.
- [8] Brayden JE, Nelson MT. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels [J]. *Science*, 1992, 256(5056): 532-535.
- [9] Maruyama Y. Aging and arterial-cardiac interactions in the elderly [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 155(1): 14-19.
- [10] Shi L, Liu B, Li N, et al. Aerobic exercise increases BK(Ca) channel contribution to regulation of mesenteric arterial tone by up-regulating beta1-subunit [J]. *Exp Physiol*, 2013, 98(1): 326-336.
- [11] Albarwani S, Al-Siyabi S, Baomar H, et al. Exercise training attenuates ageing-induced BKCa channel downregulation in rat coronary arteries [J]. *Exp Physiol*, 2010, 95(6): 746-755.
- [12] Nishimaru K, Eghbali M, Lu R, et al. Functional and molecular evidence of Maxi K channel beta1 subunit decrease with coronary artery ageing in the rat [J]. *J Physiol*, 2004, 559(Pt 3): 849-862.
- [13] Perez GJ, Bonev AD, Patlak JB, et al. Functional coupling of ryanodine receptors to KCa channels in smooth muscle cells from rat cerebral arteries [J]. *J Gen Physiol*, 1999, 113(2): 229-238.
- [14] Perez GJ, Bonev AD, Nelson MT. Micromolar  $Ca^{2+}$  from sparks activates  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^{(+)}$  channels in rat cerebral artery smooth muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001, 281(6): C1769-775.
- [15] Zhuge R, Fogarty KE, Tuft RA, et al. Spontaneous transient outward currents arise from microdomains where bk channels are exposed to a mean  $Ca^{2+}$  concentration on the order of 10  $\mu M$  during a  $Ca^{2+}$  spark [J]. *J Gen Physiol*, 2002, 120(1): 15-27.
- [16] 罗兴林, 李秀芹, 杨艳. 主动脉平滑肌钙激活钾通道的增龄变化 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13(5): 545-548.
- [17] Zhao HC, Wang F. Exercise training changes the gating properties of large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels in rat thoracic aorta smooth muscle cells [J]. *J Biomech*, 2010, 43(2): 263-267.
- [18] 许建文, 谢静, 王法, 等. 运动对大鼠血管平滑肌大电导钾通道生物物理特性的影响 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2013, 40(6): 578-585.
- [19] Shi L, Zhao L, Zeng F, et al. Effect of exercise training volume on arterial contractility and BK(Ca) channel activity in rat thoracic aorta smooth muscle cells [J]. *Eur J Applied Physiol*, 2012, 112(10): 3667-678.
- [20] Duncan RK. Tamoxifen alters gating of the BK alpha subunit and mediates enhanced interactions with the avian beta subunit [J]. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70(1): 47-58.
- [21] Valverde MA, Rojas P, Amigo J, et al. Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the beta subunit [J]. *Science*, 1999, 285(5435): 1929-931.
- [22] 侯晓钰, 朱艳, 傅晓冬. 大电导钙激活钾通道与高血压疾病的研究 [J]. 西南军医, 2013, 15(2): 192-195.
- [23] Kang LS, Kim S, Dominguez JM, et al. Aging and muscle fiber type alter  $K^{+}$  channel contributions to the myogenic response in skeletal muscle arterioles [J]. *J Applied Physiol*, 2009, 107(2): 389-398.
- [24] Nishimaru K, Eghbali M, Stefani E, et al. Function and clustered expression of MaxiK channels in cerebral myocytes remain intact with aging [J]. *Exp Gerontol*, 2004, 39(5): 831-839.
- [25] 张严焱, 张寒梦, 石丽君, 等. 增龄通过下调平滑肌细胞 BK(Ca)通道  $\alpha$  和  $\beta 1$  亚基表达改变肠系膜动脉舒缩性 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(8): 757-762.
- [26] 吴爱山, 罗兴林, 褚现明, 等. 人肠系膜动脉平滑肌 BKCa 增龄变化的研究 [J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(3): 361-363.
- [27] Zhang DM, He T, Katusic ZS, et al. Muscle-specific f-box only proteins facilitate bk channel beta(1) subunit downregulation in vascular smooth muscle cells of diabetes mellitus [J]. *Circul Res*, 2010, 107(12): 1454-459.
- [28] Long X, Tharp DL, Georger MA, et al. The smooth muscle cell-restricted KCNMB1 ion channel subunit is a direct transcriptional target of serum response factor and myocardin [J]. *J Biological Chem*, 2009, 284(48): 33671-682.
- [29] Nieves-Cintrón M, Amberg GC, Nichols CB, et al. Activation of NFATc3 down-regulates the beta1 subunit of large conductance, calcium-activated  $K^{+}$  channels in arterial smooth muscle and contributes to hypertension [J]. *J Biological Chem*, 2007, 282(5): 3231-240.
- [30] Ahn YT, Kim YM, Adams E, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates KCNMB1 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cellular Mol Physiol*, 2012, 302(3): L352-359.

(此文编辑 许雪梅)