

主动脉平滑肌钙激活钾通道的增龄变化

罗兴林, 李秀芹¹, 杨 艳

(泸州医学院附属医院心内科, 四川省泸州市 646000; 1. 山东省潍坊市人民医院, 山东省潍坊市)

[关键词] 生理学; 膜片钳技术; 大鼠主动脉; 平滑肌细胞; 钙激活钾通道; 老化

[摘要] 目的 研究不同月龄大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道的活性, 探讨老化过程中血管平滑肌细胞钙激活钾通道的变化。方法 取三组 Wistar 大鼠(分别为 1 月龄、6 月龄、20 月龄各 20 只)主动脉用酶消化法获得单个平滑肌细胞。以膜片钳技术检测细胞钙激活钾通道的活性, 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、平均开放概率、电流幅值, 并绘制成电流—电压关系曲线。对比各月龄组 Wistar 大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道活性。结果 (1) 各月龄组大鼠主动脉平滑肌细胞随着膜电位从 +10 mV 向 +60 mV 方向去极化, 钙激活钾通道的电流强度逐渐加大, 但加大幅度随月龄增加而降低。1 月龄、6 月龄和 20 月龄大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道的电导值分别为 192 ± 47 ps、 177 ± 56 ps 和 163 ± 35 ps, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。(2) 在内面向外式膜片上, 20 月龄和 1 月龄大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道平均开放概率分别为 0.009 ± 0.001 和 0.015 ± 0.004 , 两组比较具有显著性差异($P < 0.01$)。20 月龄和 1 月龄大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道平均关闭时间分别为 2260 ± 653 和 $2512 \pm 185^*$, 两组比较具有显著性差异($P < 0.01$)。(3) 在同样的对称性高钾溶液中, 加入不同浓度钙后, 发现钙对各月龄组大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道均有明显的激活作用, 表现为平均开放概率逐渐加大, 平均关闭时间逐渐缩短。但对各月龄相同钙浓度间比较发现, 6 月龄组平均开放概率比 1 月龄加大, 而 20 月龄组平均开放概率和平均开放时间比 6 月龄和 1 月龄组均显著降低。结论 大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道的活性随着年龄增大而下降。

[中图分类号] R33

[文献标识码] A

Research of Changement of Calcium-Activated Potassium Channels in Rat Aortic Smooth Muscle with Aging

LUO Xing-Lin, LI Xiur-Qin, and YANG Yan

(Institute of Cardiovascular Disease, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

[KEY WORDS] Patch Clamp Technique; Calcium-Activated Potassium Channels; Aging; Rat Aortic Smooth Muscle

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the changes of Ca^{2+} -activated K^+ (KCa) channels of rats aortic smooth muscle cells with aging. **Methods** The aortic smooth muscle cells from rats of three groups (1, 6, 20 months, $n = 20$ respectively) was digested by enzyme and studied the activity of KCa in the rats aortic smooth muscle cells by the Patch clamp technique. The signal channel open probability (P_o), open dwell-time(T_o), close dwell-time (T_c) and current amplitude (AM) were recorded. **Results** (1) The conductance of the rats aortic smooth muscle cells of 1, 6, 20 months was 192 ± 47 ps, 177 ± 56 ps, 163 ± 35 ps respectively. There was no significant difference in each group ($P > 0.05$). But the AM of the rats aortic smooth muscle cells decreased with aging. (2) The P_o of KCa in the rats aortic smooth muscle cells was 0.009 ± 0.001 , 0.015 ± 0.004 respectively, The T_c was 2260 ± 653 , 2512 ± 185 respectively in 20 month-old rats and in 1 month-old rats under inside-out patch. The activity of KCa had significant difference between two groups ($P < 0.01$). (3) The sensitivity of KCa channel to Ca^{2+} in the aortic smooth muscle cells from different month-old rats: After adding Ca^{2+} (5×10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} mol/L) to cytoplasm, the P_o increased and the T_c decreased in each group. While comparison of different month-old rats, the P_o and the T_o of 20 month-old rats was less than that of 6 month-old rats and 1 month-old rats. **Conclusion** The activity of KCa reduced in rats aortic smooth muscle with aging.

研究表明, 老化可导致心血管系统形态变化和
功能衰退, 是动脉粥样硬化的重要危险因素。关于
老化的机制目前尚未完全明确, 有认为老化是人体
连续受到各种随机性损伤的结果; 亦有证据表明老

化是按细胞内“预置”的基因程序进行的, 而这些学
说均未被可靠的实验证实。离子通道是介导离子进
出细胞膜的特殊蛋白质系统, 推测在人体及动物衰
老过程中不可避免地会出现结构及功能变化, 因此
研究通道的增龄变化, 有助于更深入的揭示老化的
机制。钙激活钾(KCa)通道是血管平滑肌上最重要的
的钾通道^[1], 它的激活可引起细胞膜超级化, 关闭 L
型钙通道, 减少钙离子内流, 血管舒张, 从而对血管

[收稿日期] 2004-04-05 [修回日期] 2005-05-25

[基金项目] 四川省卫生厅科学研究基金资助(000117)

[作者简介] 罗兴林, 教授, 主要从事老年心血管病研究; 联系电话
13508036536, 0830-2392712-5395(0), E-mail 为 lx15468@163.com。

张力的调节起着十分重要的作用^[2]。老化引起的血管变化是否与钾通道的功能变化有关尚未见报道,本文研究其在增龄过程中通道活性的变化。

1 材料与方法

1.1 实验仪器

膜片钳放大器(CEZ-2200型)和记忆示波器(VC-11型)为Nihon kondens生产;微电极抛光仪(MF-83型)、微管电极拉制器(PP-83型)和三维操纵器(WN 203型)为Narishige生产;倒置相差显微镜(IMT-2型)为Olympus公司生产;A/D-D/A转换器(Digital-1200型)为美国Axon仪器公司生产;恒温水浴振荡器(HZS-H型)为哈尔滨东联电子技术开发公司生产。

1.2 实验试剂

(1)电极液的配方(mmol/L):K-Asp 40.0, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 0.05, KCl 100.0, DIDS 0.1, 用NaOH调pH至7.1~7.2。(2)浴液配方为(mmol/L):K-Asp 100.0, MgCl₂ 1.0, CaCl₂ 0.1, HEPES 20.0, KCl 40.0, EGTA 2.0, 用KOH调pH至7.1~7.2。(3)溶液配方为(mmol/L):NaCl 127, KCl 5.9, CaCl₂ 2.4, MgCl₂ 1.2, 葡萄糖 12.0, HEPES 10.0;用NaOH调pH至7.1~7.2。(3)酶液iv配方为(g/L):木瓜蛋白酶 1.25, DTT 1.2, 白蛋白 1.25。(4)酶液 \oplus 配方为(g/L):胶原酶 1.25, 透明质酸酶 1.25, 白蛋白 1.25。

HEPES购自GERMANY,各种消化酶及EGTA购自Sigma公司,余为国产分析纯。电极液与浴液为对称性高钾液, $E_k = 0$ (由Nernst方程 $E_k = (RT/zF) \ln [K^+]_o/[K^+]_i$ 计算所得),由此有利于通道电流记录分析。

1.3 实验材料

选择1月龄、6月龄、20月龄Wistar大鼠各20只,体重分别为28~30 g, 90~110 g, 450~550 g,雌雄不拘,由我院实验动物科提供,均为一级清洁动物。将Wistar大鼠断头处死,迅速开胸,沿主动脉起始部剪下胸主动脉,放入含溶液的器皿中,在室温下纵向剖开动脉管条,剪成长约2~4 mm、宽2 mm的条块。将组织块放入盛有酶液iv的玻璃小瓶中,于37℃恒温水浴箱内振荡10~15 min,取出组织块放入盛有酶液 \oplus 的小瓶中,在恒温水浴箱中振荡约3~5 min,取部分组织块放入含溶液的小瓶中,用细口吸管轻轻吹打,取部分细胞悬液置于倒置相差显微镜下观察,若找到呈梭形、蚯蚓状或香蕉状的单个平滑肌细胞(aortic smooth muscle cells, ASMC) 2~3个

/视野,即可终止酶解,所获细胞保存于溶液中,在6~8 h内使用。

1.4 通道活性测定与分析

将形态典型的ASMC置于倒置相差显微镜台浴槽内,浴槽内盛浴液4 mL,将充灌好电极液的微电极安装在电极探头上,用注射器向电极腔内略施加正压(1~2 cm H₂O),以防止液体中颗粒物堵塞电极尖端。同时由电子刺激器经膜片钳放大器向微电极发放电压为1 mV,波宽为40 ms的方波脉冲信号,用于观察封接过程。当微推进器将电极送入浴液后,缓慢向选定好的细胞表面推进,此时应随时调节放大器上“V-COPM”旋扭,将电极电压补偿到0。当微电极尖端接触到细胞膜表面,立即可看到应答电流变小,此时撤去正压,通过注射器向电极腔内略施加负压(10~30 cm H₂O),应答电流逐渐下降至0,电流噪声随之减少,提示微电极尖端与细胞膜表面之间形成近似电绝缘,其阻抗高达10~100 GΩ,说明高阻封接形成。高阻封接形成时的膜片钳即为细胞贴附式膜片钳(cell-attached patch);轻轻将电极提起在空气中暴露2~3 s,然后再放回浴液,即形成内面向外式膜片钳(inside-out patch)。通道电流经膜片钳放大器引入记忆示波器及12倍A/D转换器,输入电子计算机,采用p-CLAMP6.0.6分析软件对通道的开放概率(probability of open, P_o)、平均开放时间(mean open time, T_o)、平均关闭时间(mean closed time, T_c)、电流幅值(current amplitude, A_m)等数据进行分析处理。并对电流幅值的全点直方图(all-points histogram)进行函数拟合。然后分别加入不同浓度Ca²⁺ (10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶和10⁻⁵ mol/L)后再检测 T_o 、 T_c 、 P_o 、 A_m 等参数变化。

1.5 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通道对Ca²⁺的敏感性数据分别采用自身前后对照,进行配对t检验;不同月龄组间采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同月龄大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道的电压依赖性和电导

在对称性高钾溶液($[K^+]_o:[K^+]_i = 140/140$ mmol/L)中,当游离钙离子($[Ca^{2+}]_f$)浓度 $< 10^{-9}$ mol/L时,在内面向外式膜片上,将膜电位分别钳制在+10 mV、+20 mV、+30 mV、+40 mV、+50 mV和+60 mV时,发现随着钳制电压加大,通道的电流幅

值逐渐加大,但加大幅度随月龄增加而降低(图 1, Figure 1)。1 月龄、6 月龄和 20 月龄大鼠主动脉平滑肌 KCa 通道的电导值分别为 192 ± 47 ps、 177 ± 56 ps 和 163 ± 35 ps, 各组比较无显著性差异($P > 0.05$)。

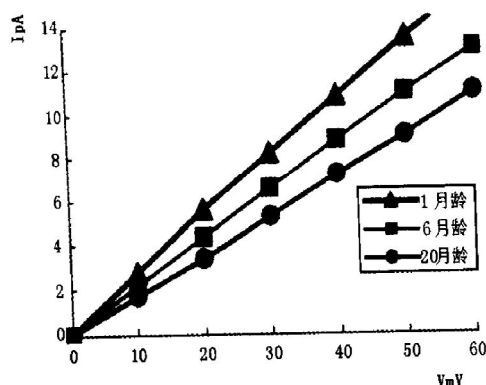


图 1. 大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道的电流—电压关系曲线

Figure 1. The relationship curve of current voltage in the KCa channel of aortic smooth muscle cells from different month-old rats

2.2 不同月龄大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道活性比较

在对称性高钾浴液中,在内面向外式膜片上,当膜电位钳制在+40 mV 时,20 月龄与 1 月龄大鼠相

比,其主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道 P_o 显著减小, T_c 显著延长(表 1, Table 1)。

表 1. 内面向外式膜片上不同月龄大鼠平滑肌细胞钙激活钾通道活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Comparison of the activity of KCa in the aortic smooth muscle cells from different month-old rats in inside out patch

月龄	To (ms)	Tc (ms)	Po	Am (pA)
1	6.43 ± 4.35	512 ± 185	0.015 ± 0.004	4.04 ± 1.29
6	5.14 ± 4.79	1020 ± 618^b	0.013 ± 0.004	6.91 ± 2.47
20	7.28 ± 4.21	2260 ± 653^{bd}	0.009 ± 0.001^{ac}	7.47 ± 1.97^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 1 月龄组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 6 月龄组比较。

2.3 不同月龄大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道对 Ca^{2+} 的敏感性

在同样的对称性高钾浴液,加入不同浓度 Ca^{2+} 后,发现 Ca^{2+} 对各月龄组大鼠主动脉平滑肌细胞 KCa 通道均有明显的激活作用,表现为 P_o 逐渐加大, T_c 逐渐缩短。当月龄相同时,在不同 Ca^{2+} 浓度间比较发现, P_o 在 6 月龄比 1 月龄显著增加,而 20 月龄组 P_o 、 T_o 比 1 月龄、6 月龄均显著降低(表 2, Table 2)。

表 2. 不同月龄大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道对 Ca^{2+} 的反应性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The sensitivity of KCa channel to Ca^{2+} in the aortic smooth muscle cells from different month-old rats

Ca ²⁺ 浓度 (mol/L)	平均开放时间 (ms)			平均关闭时间 (ms)		
	1 月龄	6 月龄	20 月龄	1 月龄	6 月龄	20 月龄
0	6.43 ± 4.35	5.14 ± 4.79	7.28 ± 4.21	512 ± 185	1020 ± 618^d	2260 ± 653^d
10^{-8}	5.20 ± 3.57	6.75 ± 3.25	5.72 ± 2.91	292 ± 69^a	858 ± 493^c	1903 ± 474^d
10^{-7}	5.14 ± 3.88	6.59 ± 2.18	4.48 ± 1.85	288 ± 104^a	506 ± 337^{bc}	1321 ± 358^{ad}
10^{-6}	5.79 ± 2.01	6.33 ± 2.80	3.59 ± 1.72^{ac}	131 ± 72^b	289 ± 52^{bc}	453 ± 268^{bd}
10^{-5}	5.00 ± 1.77^a	6.28 ± 2.10	3.60 ± 1.60^{ac}	56 ± 30^b	191 ± 50^{bd}	259 ± 41^{bd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组 (Ca^{2+} 浓度为 0) 比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 1 月龄比较。

表 3. 不同月龄大鼠主动脉平滑肌细胞钙激活钾通道对 Ca^{2+} 的反应性 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The sensitivity of KCa channel to Ca^{2+} in the aortic smooth muscle cells from different month-old rats

Ca ²⁺ 浓度 (mol/L)	通道开放概率			Am (pA)		
	1 月龄	6 月龄	20 月龄	1 月龄	6 月龄	20 月龄
0	0.015 ± 0.004	0.013 ± 0.004	0.009 ± 0.001^c	4.04 ± 1.29	6.91 ± 2.47	7.47 ± 1.97^a
10^{-8}	0.066 ± 0.009^a	0.133 ± 0.035^{ac}	0.008 ± 0.001^c	7.53 ± 0.73	7.84 ± 1.55	6.77 ± 1.69
10^{-7}	0.134 ± 0.007^b	0.138 ± 0.008^a	0.012 ± 0.002^d	6.64 ± 1.27	7.41 ± 2.27	7.86 ± 1.89
10^{-6}	0.325 ± 0.003^b	0.338 ± 0.013^b	0.019 ± 0.004^{bd}	8.10 ± 1.23^a	7.29 ± 1.95	8.10 ± 1.33
10^{-5}	0.524 ± 0.009^b	0.958 ± 0.043^{bc}	0.032 ± 0.009^{bd}	9.52 ± 1.44^b	8.30 ± 1.22	9.01 ± 1.16

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组 (Ca^{2+} 浓度为 0) 比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 1 月龄比较。

3 讨论

新近报道,大鼠冠状动脉电压和钙激活钾通道数目随增龄而降低。通道密度由 52 ± 9 个/PF(3月龄),减少到 18 ± 5 个/PF(25~30月龄)。这同人的通道蛋白表达随增龄明显降低是一致的,即60~70岁较3~18岁者减少了80%^[3]。在大鼠的肺动脉,血管对Cromakalim(KATP通道开放剂)引起的非内皮依赖的超极化反应,在老龄WKY大鼠(20~26月龄)较成年鼠(6~8月龄)有明显减少^[4]。

我们应用细胞膜片钳技术,研究了不同月龄大鼠KCa通道的活性,结果发现,各月龄组大鼠主动脉平滑肌随着膜电位从+10 mV向+60 mV方向去极化,通道的电流幅值逐渐加大,但加大幅度随月龄增加而降低。在内面向外式膜片上,膜电位为+40 mV时,20月龄与1月龄大鼠相比,其主动脉平滑肌Po显著减小,Tc显著延长,同时发现Ca²⁺对各月龄组大鼠主动脉平滑肌细胞KCa通道均有明显的激活作用,表现为Po逐渐增加,Tc逐渐缩短。但对各月龄相同Ca²⁺浓度组间比较发现,Po在6月龄比1月龄显著增加,而20月龄组Po和To比1月龄和6月龄均显著降低,表明血管平滑肌细胞KCa通道活性随着老化将发生改变。

关于血管平滑肌细胞KCa通道增龄变化的机制目前尚不清楚,研究表明,KCa通道的激活除与膜电压和胞内钙离子有关外,还可通过受体和第二信使来实现。蛋白激酶A(PKA)和蛋白激酶G(PKG)的激活物质可提高通道活性^[1]。cAMP依赖的血管舒张剂可交叉激活cGMP依赖的蛋白激酶,从而激活KCa通道。Mercedes报道,大鼠主动脉对腺苷的反应性随增龄(从3~4月龄到12~18月龄)而减低,腺苷受体最大转导量减少。去除内皮的老龄兔主动脉对乙酰胆碱(Ach)和SNP引起的血管松弛反应较幼年兔显著减低($P < 0.01$),这种反应性减低与老龄兔主动脉中存在的低cGMP水平有关^[5]。内源性的一氧化氮(NO)和外源性的硝酸酯类可激活鸟苷酸还化酶,通过PKG介导使KCa通道活性增加^[6],NO还可直接激活血管平滑肌细胞KCa通道^[7]。Ach可激活大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞KCa通道引起血管舒张。Cromakalim对兔胸主动脉ATP

激活钾通道的激活能力随增龄有明显降低,并测得老年兔的基础cGMP比青年兔明显降低,这说明增龄降低了血管对Cromakalim的舒张反应,由此我们推测,在老化过程中,Wistar大鼠主动脉平滑肌细胞中第二信使物质如cGMP基础水平的降低或第二信使依赖的激酶(PKC等)减少和激酶所起的磷酸化及其他作用减弱有关^[8]。

此外,80年代以来人们用突变技术去除钾离子(K⁺)通道N末端,可防止K⁺通道快失活。K⁺通道S6段的胞外端和K⁺通道衬里或H5区的特殊氨基酸参与C型失活和P型失活。Shaker K⁺通道463位的缬氨酸(Val)残基突变,使C型失活速度加快100倍,SS1~SS2区序列的突变,可影响N失活^[9]。以上说明了氨基酸的突变可改变通道的功能状态,推测在增龄过程中可能发生了某种突变,引起了通道蛋白的增龄性变化。并导致了与老化相关的疾病如动脉粥样硬化、高血压等的发生和发展^[10]。

[参考文献]

- [1] 罗兴林,魏宗德,饶华,王文艳,杨艳曾,晓荣. 正常肠系膜动脉平滑肌细胞钙激活钾通道活性观察. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(1): 24-26
- [2] Knot HJ, Standen NB, Nelson NT. Ryanodine receptors regulate arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat via Ca²⁺-dependent K⁺ channels. J Physiol, 1998, 508: 211-221
- [3] Marijic J, Li Q, Song M, Nishimaru K, Stefani E, Toro L. Decreased expression of voltage and Ca²⁺-activated K⁺ channels in coronary smooth muscle during aging. Circ Res, 2001, 88(2): 210-216
- [4] Cornfield DN, Saqueton CB, Porter VA, Herron J, Resnik E, Haddad IY, et al. Voltage-gated K⁺ channel activity in ovine pulmonary vasculature is developmentally regulated. Am J Physiol (Lung Cell Mol Physiol), 2000, 278(6): 1297-304
- [5] Ferrer M, Tejera N, Marin J, Balfagon G. Effect of age on the vasorelaxation elicited by cromakalim. Role of K⁺ channels and cyclic GMP. Life Sci, 1998, 63: 2071-078
- [6] Bolotina VM, Najibi S, Palacino JJ, Pagano PJ, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. Nature, 1994, 368: 850-853
- [7] Mantelli L, Amerini S, Ledda F. Roles of nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in vasorelaxant effect of acetylcholine as influenced by aging and hypertension. J Cardiovasc Pharmacol, 1995, 25(4): 595-602
- [8] Moon SK, Thompson LJ, Madamanchi N, Ballinger S, Papaconstantinou J, Horraist C, et al. Aging, oxidative responses and proliferative capacity in cultured mouse aortic smooth muscle cells. Am J Physiol (Heart Circ Physiol), 2001, 280(6): 2779-788
- [9] Takano M, Noma A. Development of muscarinic potassium current in fetal and neonatal rat heart. Am J Physiol (Heart Circ Physiol), 1997, 272: 1188-195
- [10] 罗兴林,魏宗德,何川,杨艳,王文艳,曾晓荣. 血管活性剂对高血压患者肠系膜动脉平滑肌细胞钙激活钾通道活性调控作用的研究. 中华心血管病杂志, 2005, 33(1): 45-48

(此文编辑 胡必利)