

长期高盐所致高血压大鼠主动脉血管平滑肌细胞 大电导钙激活钾通道电流的变化

王云霞^{2,3}, 吴志婷², 石秀明², 盛国太¹, 葛郁芝^{1,2}

(1.江西省人民医院心内一科,江西省南昌市 330006;2.江西省人民医院 江西省心血管病研究所,
江西省南昌市 330006;3.南昌大学江西医学院,江西省南昌市 330006)

[关键词] 高盐饮食; 高血压; 血管平滑肌细胞; 大电导钙激活钾通道

[摘要] **目的** 观察高盐饮食后大鼠血压水平及主动脉血管平滑肌细胞(VSMC)大电导钙激活钾通道(BKCa)电流的变化。**方法** 3周龄雄性 Wister 大鼠随机分为2组:对照组和模型组,每组24只大鼠;对照组予以正常(含0.5%NaCl)饮食,模型组予以高盐(含4%NaCl)饮食。采用尾动脉测压法测量大鼠血压,全细胞膜片钳技术记录大鼠主动脉 VSMC 膜 BKCa 电流。**结果** 模型组从第8周开始血压明显升高,随着高盐饮食时间延长,血压逐渐增加;在第10、12、14、16周时血压较对照组均显著升高($P<0.01$)。模型组大鼠主动脉 VSMC 膜 BKCa 电流和电流密度随高盐饮食时间延长而显著增大;在第8、12、16周时,BKCa 峰电流密度较对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 高盐饮食可导致大鼠血压升高;大鼠 BKCa 电流密度随着高盐饮食所致血压的升高而逐渐增加。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Changes of large-conductance calcium-activated potassium channels in vascular smooth muscle cells in rats of hypertension induced by long-term high-salt diet

WANG Yun-Xia^{2,3}, WU Zhi-Ting², SHI Xiu-Ming², SHENG Guo-Tai¹, GE Yu-Zhi^{1,2}

(1.Department of Cardiology, Jiangxi Provincial People's Hospital; 2.Jiangxi Provincial People's Hospital & Jiangxi Institute of Cardiovascular Diseases; 3.Jiangxi Medical College of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[KEY WORDS] High-salt diet; Hypertension; Vascular smooth muscle cell; Large-conductance calcium-activated potassium channels

[ABSTRACT] **Aim** To observe the changes of blood pressure level and large-conductance calcium-activated potassium channels (BKCa) current in aortic vascular smooth muscle cell (VSMC) in rats after high-salt diet. **Methods** 3 weeks old male Wister rats were randomly divided into two groups: control group and model group, 24 rats in each group. The control group was given with normal diet (containing 0.5% NaCl), and the model group was treated with high-salt diet (containing 4% NaCl). The blood pressure in rats was measured by tail artery manometry. Whole-cell patch clamp technique was used for recording BKCa currents in rat aortic VSMC membrane. **Results** In the model group, the blood pressure increased significantly from the eighth week, and the blood pressure gradually increased with the prolongation of the high-salt diet time. At the tenth, twelfth, fourteenth and sixteenth week, the blood pressure in the model group was significantly higher than that in the control group ($P<0.01$). The BKCa current and current density of aortic VSMC membrane in the model group increased significantly with the prolongation of the high-salt diet time. At the eighth, twelfth and sixteenth week, the peak current density of BKCa in the model group was significantly higher than that in the control group, and the difference was statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** High-salt diet can lead to elevated blood pressure in rats. The BKCa current density in rats increases gradually with the increase of blood pressure due to high-salt diet.

[收稿日期] 2016-12-17

[修回日期] 2017-03-13

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81260031);江西省卫生计生委科技计划项目(20155056、20161002);江西省科技厅科研院所基础设施配套项目(20142BBA13042)

[作者简介] 王云霞,博士研究生,研究方向为高血压发病的电生理机制,E-mail 为 yunxia0510@126.com。通讯作者葛郁芝,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为高血压发病的电生理机制,E-mail 为 ygege50@yahoo.com。

高盐饮食是引起高血压的最重要因素之一^[1]。大量的流行病学和临床研究证实,钠盐摄入量高的人群中,平均血压水平比较高,高血压患病率也比较高。有报道称,盐敏感性高血压患者占我国高血压人群的 50%~60%。因此深入研究高盐饮食与高血压的关系具有重要意义。

大电导钙激活钾通道(large-conductance calcium-activated potassium channels, BKCa)广泛分布于主动脉血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)上,对血管舒张功能起重要调节作用。在生理条件下, BKCa 通道持续激活并作为超极化因素以减少电压依赖的钙离子通道的活性和钙离子内流,以此对抗血管收缩作用, BKCa 通道被阻断即可引起平滑肌收缩^[2]。本研究选取 VSMC 作为研究对象,探讨高盐饮食对动脉 VSMC 及其 BKCa 通道电流的影响,进而对高盐饮食引起血压升高的具体机制及其靶器官的变化进行深入的探讨。

1 材料和方法

1.1 大鼠模型建立与分组

3 周龄雄性 Wister 大鼠 48 只, 体重 50~70 g, 由江西中医学院动物中心提供(JZDW 2015-0123)。随机分为 2 组:模型组和对照组,模型组予以高盐(含 4%NaCl)饮食,对照组予以正常(含 0.5%NaCl)饮食;用尾动脉测压仪测鼠尾动脉压,分别于 4、8、12、16 周测量大鼠血压,每次测血压时间均固定于 8:00 至 14:00,每只大鼠在安静状态下测量血压 5 次,取其平均值。模型组 12 周后血压为 142.0 ± 4.0 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 比对照组血压增加 30 mmHg 以上,表明高盐饮食诱导高血压模型已成功建立。

1.2 实验器材及试剂

动物恒温系统、无创血压测量分析系统(上海奥尔科特生物科技有限公司),膜片钳放大器(Axopatch 200B 型)及 DigiData 1200B 型数/模(或模/数)转换器(Axon 公司,美国),荧光倒置显微镜、O3-D 玻璃微电极拉制仪(武汉东山新技术应用研究所)。透明质酸酶、胶原酶、二硫苏糖醇、木瓜蛋白酶、牛血清白蛋白(Sigma 公司,美国),乙二醇二乙醚二胺四乙酸、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸(北京化学试剂公司);余试剂均为国产分析纯。

1.3 血压测量方法

大鼠尾动脉无创性血压测量:将大鼠尾动脉测压仪开启,预热约 20 min,进行压力信号定标。根据

大鼠体质量将其装入固定盒内固定,之后放入动物固定架,大鼠尾部通过加压套插入至接近尾根部,此时鼠尾已穿过脉搏传感器插入尾部加热器中的加热管内,使鼠尾刚好处于脉搏传感器的“脉搏信号传感片”上方,并调节脉搏传感器使传感片紧贴鼠尾下方的尾动脉,待大鼠脉搏稳定后进行血压测量。

1.4 大鼠主动脉 VSMC 分离

水合氯醛(每 100 g 体重 0.3~0.45 mg)麻醉大鼠,剖开胸腔,取出胸主动脉,游离出血管中膜,剪成长 2~4 mm、宽 2 mm 的条块,分别放入酶液 I(木瓜蛋白酶 1.75 g/L,二硫苏糖醇 1.75 g/L,白蛋白 2.5 g/L)和酶液 II(胶原酶 I 2.5 g/L,透明质酸酶 2.5 g/L,白蛋白 2.5 g/L)(均为 Sigma 公司产品)中,用急性酶分离法获得单个主动脉平滑肌细胞。

1.5 膜片钳全细胞 BKCa 电流记录方法

记录用玻璃微电极,采用两步垂直玻璃微电极控制仪控制,内充电极液(单位 mmol/L):KCl 40,天门冬氨酸钾(K_2Asp) 100, $MgCl_2$ 1, 2-氨基乙基四乙酸(EGTA) 0.1, Na_2ATP 4, 羟乙基哌嗪乙磺酸 10; NaOH 调 pH 值至 7.4。将分离出的 VSMC 保存于溶液 II 中,细胞悬液加于灌流槽中,待细胞贴壁后,电极外液以 1~2 mL/min 灌流 15~20 min;灌流液的成分(单位 mmol/L):NaCl 134, KCl 6, $MgCl_2$ 1, $CaCl_2$ 2, 羟乙基哌嗪乙磺酸 10, 葡萄糖 10。电极经拉制抛光后,电极尖端阻抗 4~7 M Ω , 封接电阻 >1 G Ω , 负压破膜,使细胞内液与电极内液完全相通。建立全细胞记录后,运行 Pclamp 9.0 软件(Axon Instruments 公司,美国)的膜测试功能记录细胞膜电容(Cm)(电压钳模式,滤波 5 kHz,保持电位 -60 mV,除极化至 -65 mV)。保存膜测试结果,随后以放大器(Axopatch 200B 型, Axon Instruments 公司,美国)的慢电容补偿和串联电阻补偿(50%~80%),减少瞬时充放电电流和钳位误差,信号采集频率 5 kHz,低通滤波频率 2 kHz,保持钳制电位为 -60 mV,给细胞施加去极化方波刺激,频率 0.2 Hz,持续时间为 400 ms,从 -50 mV 去极化至 +70 mV,以激发外向钾电流,观察到电流基本稳定后,记录电流。电流记录在室温条件(25℃)下进行。

1.6 统计学方法

采用 Pclamp 9.0 软件对单个全细胞记录进行数据和图形转换。电流密度(pA/pF) = 电流强度/电容;计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS 19.0 统计软件做统计分析。采用重复资料测量的方差分析方法来分析 BKCa 电流随刺激电压不同的变化趋势,多组

间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 高盐饮食对大鼠血压的影响

本实验复制了经典成熟的盐敏感高血压大鼠模型,实验结果表明,模型组第 10~16 周血压较对照组明显增高($P<0.01$;表 1、图 1)。

表 1 高盐饮食对大鼠血压的影响 (mmHg, $n=6$)
Table 1. Effect of high-salt diet on blood pressure in rats (mmHg, $n=6$)

时间	对照组	模型组	P 值
0 周	106±5	107±5	>0.05
2 周	107±4	106±3	>0.05
4 周	108±3	107±4	>0.05
6 周	107±4	110±4	>0.05
8 周	110±5	120±6	<0.05
10 周	108±3	131±4	<0.01
12 周	109±4	142±6	<0.01
14 周	110±5	143±6	<0.01
16 周	108±6	144±7	<0.01

周数从脱离哺乳期开始计算。

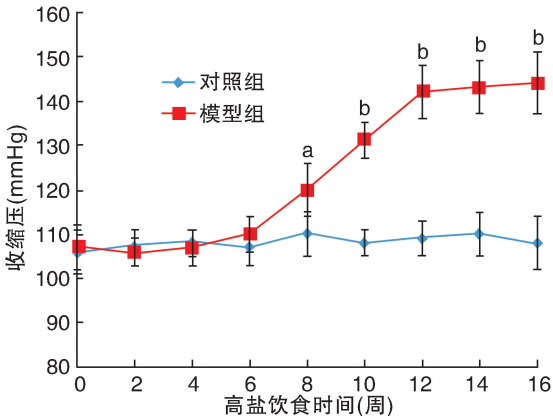


图 1. 高盐饮食对大鼠血压的影响 ($n=6$) a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 1. Effect of high-salt diet on blood pressure in rats ($n=6$)

2.2 高盐饮食对大鼠平滑肌细胞 BKCa 电流的影响

电压钳模式下,保持电位 (holding potential, HP) -90 mV,施予 400 ms,阶跃 $+10$ mV, -50 mV $\sim +70$ mV 的系列刺激,刺激频率 0.5 Hz,可得到各激活电位下的电流图 (图 2)。记录各组大鼠主动脉 VSMC 膜 BKCa 电流,模型组大鼠主动脉 VSMC 膜 BKCa 电流随着高盐饮食持续时间的增加而逐渐增大,对照组大鼠主动脉 VSMC 膜 BKCa 电流无明显变化。

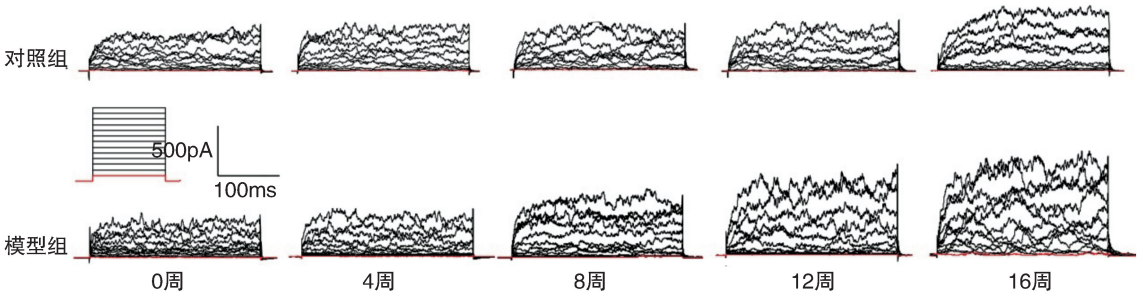


图 2. 高盐饮食时间与大鼠 VSMC 膜 BKCa 电流的关系 ($n=6$)
Figure 2. Relationship between high-salt diet time and BKCa current of VSMC membrane in rats ($n=6$)

2.3 BKCa 电流密度-电压曲线

电压钳模式下,HP -90 mV,施予 400 ms,阶跃 $+10$ mV, -50 mV $\sim +70$ mV 的系列刺激,得到各激活电位下的电流图,以各激活电位下电流密度对相应电位作图,得到电流密度-电压曲线图 (图 3)。

模型组大鼠主动脉 VSMC 膜 BKCa 电流密度在不同高盐饮食时间点,不同电压的电流变化趋势不同($P<0.01$)。随着时间的延长,在第 8、12、16 周时,与对照组相比,模型组大鼠主动脉 VSMC 膜

BKCa 电流密度均增大($P<0.01$;表 2)。
2.4 高盐饮食持续时间对大鼠主动脉 VSMC 膜 BKCa 电流的影响

模型组大鼠主动脉 VSMC 膜 BKCa 电流随高盐饮食时间的延长而增大,第 8、12、16 周时 BKCa 电流密度分别为 143.57 ± 14.17 、 204.98 ± 18.26 、 211.42 ± 7.95 pA/pF,与第 0 周比较,第 8、12、16 周电流密度分别增加 $79.93\%\pm6.87\%$ 、 $156.89\%\pm15.16\%$ 、 $164.97\%\pm18.23\%$;与对照组比较,模型组电流密度显著增加($P<0.01$;图 4)。

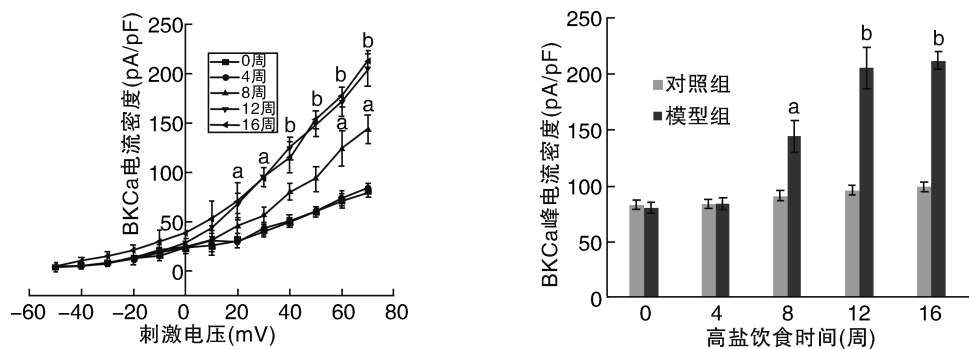


图 3. 大鼠主动脉平滑肌细胞 BKCa 电流密度-电压曲线 ($n=6$) 左图为不同时间高盐饮食大鼠主动脉平滑肌细胞 BKCa 电流密度-电压曲线;右图为模型组与对照组峰电流密度比较。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 3. BKCa current density-voltage curve of rat aortic smooth muscle cells ($n=6$)

表 2. 大鼠主动脉平滑肌细胞 BKCa 峰电流密度 (pA/pF, $n=6$)

Table 2. Peak current density of BKCa in rat aortic smooth muscle cells (pA/pF, $n=6$)

分 组	0 周	4 周	8 周	12 周	16 周
对照组	83.01±4.3	83.69±4.38	90.79±4.32	95.84±4.16	98.92±4.19
模型组	79.79±4.8	83.89±4.80	143.57±14.17 ^a	204.98±18.26 ^b	211.42±7.95 ^b

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

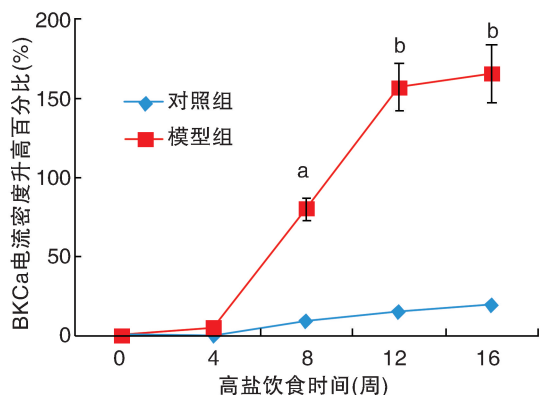


图 4. 高盐饮食持续时间对大鼠主动脉 VSMC 膜 BKCa 电流的影响 ($n=6$) a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 4. Effect of high-salt diet duration on BKCa current in rat aortic VSMC membrane ($n=6$)

3 讨 论

高血压是全球人类最常见的慢性病。我国居民高血压患病率持续增长,估计现患高血压达 3 亿人,已成为威胁我国居民健康的重大疾病,控制高血压是防治心血管疾病的关键^[3]。有报道显示,1/3 的血压正常者和 1/2 的高血压患者是盐敏感者^[4]。本实验建立高盐饮食所致高血压模型,哺乳期后予以喂养高盐饲料,观察到从第 8 周开始,模型组大鼠较对照组血压升高 ($P<0.05$),并且血压随着高盐饮食持续时间的延长而持续升高;此与曾昭华

等^[5]报道类似。

高盐饮食引起高血压的机理十分复杂,其中有关高盐饮食如何通过作用于大血管壁平滑肌细胞离子通道而导致血管收缩功能异常引起血压升高的机理尚不清楚。众所周知,VSMC 在调节血管舒缩状态中起到决定性的作用,进而影响血压的高低。有研究认为,高盐饮食可导致细胞内 Na^+ 浓度增加,接着激活 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换体,使细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,从而导致血管平滑肌的收缩,最终引起高血压^[6]。Zhou 等^[7]证实,细胞内 Ca^{2+} 浓度升高可同时激活 VSMC 膜 BKCa 通道;当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高时导致 BKCa 通道开放,形成自发性一过性 K^+ 外流,引起细胞超极化,使血管扩张,从而使肌张力尽量维持在一定水平^[8]。

BKCa 通道广泛存在于各种平滑肌细胞中,其作用为调节膜电压和钙离子内流,它由膜去极化和细胞内钙离子所激活,在限制去极化和抵抗血管收缩的负反馈机制中起着重要作用。当细胞内钙离子浓度升高时,BKCa 通道激活,钾离子外流,产生超极化,抑制钙离子通道开放,使钙离子内流减少,从而使血管扩张^[9]。使用 BKCa 通道特异性阻滞剂 Iberiotoxin 阻滞 BKCa 电流后,动脉明显收缩,内径缩小,因此,BKCa 通道对动脉血管张力也具有重要的调节作用^[10]。我们前期的研究^[11-12]表明,在寒冷的大鼠,BKCa 通道的活性下降,导致血压升高。

在生理条件下, BKCa 持续激活并作为超极化因素以减少电压依赖的钙离子通道的活性和钙离子内流, 以此对抗血管收缩作用, BKCa 被阻断即可引起平滑肌收缩^[2]。在我们的实验中观察到模型组大鼠 VSMC BKCa 通道的电流及电流密度从第 8 周时开始增大, 而且随着时间延长而逐渐增加; 血压持续上升提示在持续高盐饮食过程中, VSMC 内 Ca^{2+} 浓度随血压的增加而呈现上升趋势。另外, 模型组高盐饮食后第 12、16 周电流、电流密度比对照组也有明显增加, 提示高盐饮食一定时间后血压也会升高; 同样 VSMC 内 Ca^{2+} 浓度随血压的增加而呈现上升趋势。当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高时导致 BKCa 通道开放, 形成自发性一过性 K^+ 外流, 引起细胞超极化, 使血管扩张, 从而使肌张力尽量维持在一定水平^[13]。在盐敏感性高血压模型形成过程中, BKCa 通道作为一种反馈性调节因素随血压升高而大量开放。目前包括脑动脉 (100 μm 内径) 在内, 对不同类别的血管在高血压背景下均有研究, 研究结果均显示了高血压时血管平滑肌 BKCa 电流增加^[14]。同时, 大多数研究认为 BKCa 功能的增强是一种对抗血压进行性升高的保护机制。

本实验参照文献^[5,15]方法建立了高盐饮食诱导高血压大鼠模型, 研究表明, 高盐饮食大鼠会出现细胞内钙超载, 从而导致机体血压的升高, BKCa 通道电流作为一种调节血管舒张因素, 在大鼠高盐饮食的过程中起到反馈性的保护调节作用, 利用增强 BKCa 通道的反馈性调节来控制血管平滑肌细胞内 Ca^{2+} 浓度上升, 进而控制机体血压升高。总之, BKCa 在高血压状态下发挥着重要作用, 而其本身也受各种因素的影响和调节, BKCa 在高血压状态下的具体变化及反馈调节机制有待进一步研究。相信随着对 BKCa 更加深入的探究, 有望为心血管疾病的治疗提供新的方向和依据。

[参考文献]

- [1] Alderman MH. Salt, blood pressure and health: a cautionary tale[J]. *Int J Epidemiol*, 2002, 31(2): 311-315.
- [2] Climent B, Schubert R, Stankevicius E, et al. Large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels modulate endothelial cell outward currents and nitric oxide release in the intact rat superior mesenteric artery[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(3): 1 007-013.
- [3] 刘力生, 王文, 姚崇文, 等. 中国高血压防治指南[J].

中华高血压杂志, 2010, 18(1): 11-30.

- [4] Katori M, Majima M. Are all individuals equally sensitive in the blood pressure to high salt intake? [J]. *Acta Physiol Hung*, 2008, 95(3): 247-265.
- [5] 曾昭华, Robert MKW, 罗碧辉, 等. 一种新的高盐致高血压动物模型及其血管重构改变[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(1): 24-26.
- [6] Kamimura D, Ohtani T, Sakata Y, et al. Ca^{2+} entry mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Eur Heart J*, 2012, 33(11): 1 408-416.
- [7] Zhou Y, Xia XM, Lingle CJ. Cadmium-cysteine coordination in the BK inner pore region and its structural and functional implications[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(16): 5 237-242.
- [8] Dong DL, Bai YL, Cai BZ. Calcium-activated potassium channels: Potential target for cardiovascular diseases [J]. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 2016, 104: 233-261.
- [9] Hou S, Heinemann SH, Hoshi T. Modulation of BKCa channel gating by endogenous signaling molecules [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2009, 24(1): 26-35.
- [10] Wang RX, Shi HF, Chai Q, et al. Molecular mechanisms of diabetic coronary dysfunction due to large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel impairment[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(14): 2 548-555.
- [11] 刘燕峰, 王云霞, 葛郁芝, 等. 低温下血压升高对血管平滑肌细胞大电导钙激活钾通道的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2010, 18(9): 837-840.
- [12] Wang Y, Zhang S, Ge Y, et al. Role of BKCa channels in vascular smooth muscle during the development of environmental cold-induced hypertension[J]. *J Therm Biol*, 2013, 38(4): 192-198.
- [13] Joseph BK, Thakali KM, Moore CL, et al. Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: Implications for novel therapeutic approaches[J]. *Pharmacol Res*, 2013, 70(1): 126-138.
- [14] Yan XH, Guo XY, Jiao FY, et al. Activation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels inhibits glutamate-induced oxidative stress through attenuating ER stress and mitochondrial dysfunction[J]. *Neurochem Int*, 2015, 90: 28-35.
- [15] 胡从智, 商黔惠, 刘 婵, 等. 血管平滑肌细胞表型转化在高盐诱导的大鼠颈动脉重构中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24(5): 433-439.

(此文编辑 曾学清)