



钙通道激动剂Bay k 8644对重症失血性休克大鼠细动脉平滑肌细胞膜电位的作用

重症休克的发生是众多创伤及感染性疾病发展的共同归宿,是导致病人死亡率居高不下的直接原由[1]。而微血管对升压药物反应性丧失致使休克病人对所有的治疗措施均处于无反应状态[2][3]。我室的研究发现,休克后期小动脉平滑肌细胞膜超极化是引起血管反应性下降的主要原因[4][5][6]。细胞膜的超极化与钾通道的开放增多和钙通道的抑制有关,实验证明[5][8],失血性休克2 h后,ATP敏感钾通道(ATP sensitive potassium channels, K_{ATP})和大电导钙激活钾通道(large conductance calcium-activated potassium channels, BK_{Ca})大量开放电流增加,钾通道阻断剂优降糖和TEA均对休克后期血管低反应性有一定的恢复作用,但是细胞膜的超极化同时抑制钙离子的内流,平滑肌细胞收缩时所需内钙升高的相对不足使血管反应性不能完全恢复。L型钙通道(L type calcium channel, L-Ca)是外钙内流的主要通道,本实验采用L型钙通道的特异性激动剂Bay k 8644,旨在探讨钙的内流对休克后期小动脉平滑肌细胞膜电位超极化的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂、仪器

Wistar大鼠,雌雄不拘,体质量180~220 g,由我校实验动物中心提供。氯醛糖、木瓜酶、胶原酶XI、Bay k 8644购自美国Sigma公司;DiBAC₄(3)购自美国Molecular Probe公司。其它为国产分析纯试剂。激光共聚焦显微镜为德国Leica TCS SP2。

1.2 方法

1.2.1 失血性休克模型复制 用13.3%的乌拉坦+0.5%的氯醛糖(0.65 ml/100 g)肌肉麻醉大鼠,分离双侧股动脉和一侧股静脉,分别用于测量血压、放血和回输血液及药品。将收缩压维持在40 mmHg以下,2 h后回输总放血量的1/2且血压不超过40 mmHg,复制失血性休克大鼠模型视为成功。正常对照组只做手术不放血。

1.2.2 肠系膜细动脉平滑肌细胞的分离 正常对照大鼠和失血性休克模型成功后的大鼠断头处死,迅速剪取肠系膜并置于0 °C的无钙HPSS液(130 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L HEPES, 10 mmol/L 葡萄糖,用NaOH调pH 7.4)中,小心剥去周围组织,分离出肠系膜A₂、A₃动脉(直径80~150 μm),用眼科剪将细动脉剪成2~3 mm的血管段,室温平衡10~20 min后,置于含0.3 mg/ml木瓜酶和2 mmol/L二硫苏糖醇的无钙HPSS液中37 °C温浴消化25 min后,移入含1 mg/ml胶原酶和低钙(含0.1 mmol/L CaCl₂)HPSS液中37 °C温浴消化10 min。用热刨光的平头吸管轻轻吸出酶液,并沿壁加入0 °C的低钙HPSS冲洗血管以终止消化。最后用自制细头吸管沿壁小心机械吹打3~5次,即可得到大量的长形、梭形和椭圆形的单个平滑肌细胞。分离好的细胞悬液置于4 °C冰箱保存,6~8 h内选用边缘清晰的细胞进行荧光探针标记。

1.2.3 血管平滑肌细胞(ASMCs)的荧光标记 将300 μl细胞悬液滴加在特制的petri皿上,4 °C静置10 min,待细胞贴壁后移去剩余液体,加入3 μmol/L细胞膜电位特异荧光探针DiBAC₄(3)500 μl标记细胞,

37 °C保持30 min后上机检测。

1.2.4 平滑肌细胞膜电位的测定 用488 nm激发光照射细胞，于530 nm左右范围检测荧光。当DiBAC₄(3)进入细胞内增多，荧光增强时表明细胞膜电位负值减小，出现去极化变化，反之为超极化。

1.2.5 实验分组 实验分为正常对照组(Control)和休克组(Shock)。分别记录Bay k 8644(1 μmol/L)对细胞膜电位的作用，BK_{Ca}通道特异性阻断剂TEA(对休克组细胞膜电位的变化作为阳性对照)。

1.2.6 统计学处理 所有数据采用均数±标准差表示，用SPSS 10.0软件处理，两个样本间比较采用t检测，以P<0.05为差异有显著性。

2 结果

2.1 Bay k 8644对正常组ASMCs膜电位的影响

正常组ASMC的DiBAC₄(3)荧光染色图象(图1A)。当加入1 μmol/L Bay k 8644后，荧光强度明显减弱，说明正常组ASMCs膜电位发生超极化变化，而当加入等浓度的荧光探针溶剂DMSO则不引起明显的荧光强度变化(图1B，箭头标示加入Bay k 8644的时间，图中纵坐标为标准化荧光值)。

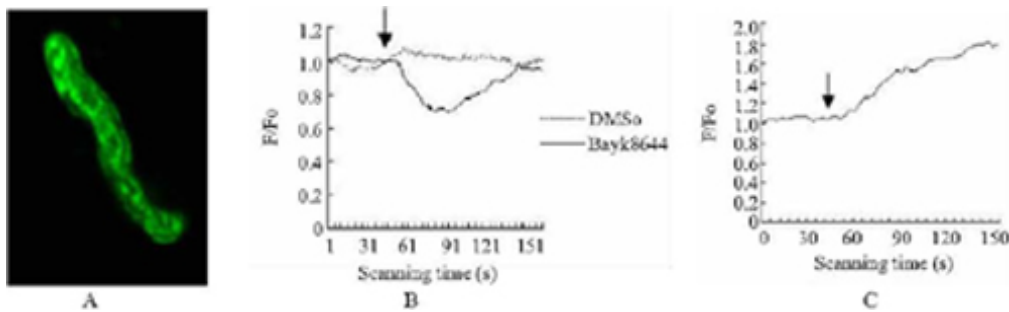


图1 Bay k 8644对正常和休克大鼠小动脉平滑肌细胞膜电位的作用

Fig.1 Cell morphology of normal rat ASMCs labelled by DiBAC₄(3) (A) and the effects of Bay K 8644 on the membrane potential of normal rat ASMCs (B) and ASMCs of rats with severe hemorrhagic shock (C) DiBAC₄(3) fluorescence was normalized to calculate the relative percentage change of fluorescence of the cells.

2.2 Bay k 8644对休克组ASMCs膜电位的影响

当加入同浓度Bay k 8644后，荧光强度明显增强，说明休克组ASMCs膜电位发生去极化变化。这与正常组有明显差异，P<0.01，n=14，15(图1C)。

2.3 Bay k 8644和TEA对正常和休克组ASMCs膜电位的影响

用BK_{Ca}通道的特异性阻断剂TEA(1 mmol/L)孵育2 min后，1 μmol/L Bay k 8644未使正常组细胞膜电位发生超极化，而是弱的去极化作用(图2A)，暗示Bay k 8644激活L型钙通道导致钙内流增加，钙内流激活了BK_{Ca}通道，使膜电位发生超极化，而用TEA阻断BK_{Ca}通道后，钙内流增加导致去极化发生。Bay k 8644和TEA均可使休克组ASMCs膜电位发生去极化，但去极化结果有统计学差异，P<0.05，n=12。提示此变化通过不同机制(图2B)。

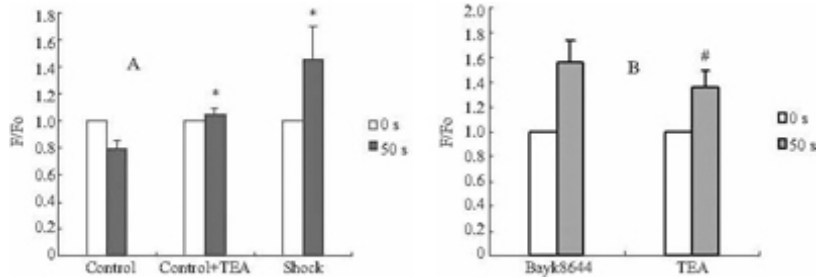


图2 Bay k 8644和TEA对正常和休克组平滑肌细胞膜电位的作用

Fig.2A Effects of Bay K 8644 on the membrane potential of ASMCs in different groups Control group: Normal ASMCs; Control+TEA group: Normal ASMCs pre-incubated with TEA for 2 min; Shock group: ASMCs of rats with hemorrhagic shock. *P<0.05 vs control group (n=14-15).

Fig.2B Effects of Bay k 8644 compared with that of TEA on membrane potential in ASMCs of rats with severe hemorrhagic shock.

#P<0.05 vs Bay k 8644 (n=12). DiBAC₄(3) fluorescence was normalized to calculate the relative percentage change of fluorescence of the cells.

3 讨论

电压依赖的钙通道(VDCCs)是钙进入多种细胞的主要通道,它在调节钙依赖的细胞功能如平滑肌的收缩中起着关键作用。L-Ca是在肌肉兴奋收缩耦联中起至关重要角色的电压传感器,是钙进入心肌和平滑肌组织的重要通道[11][12]。L型钙通道调节大部分可兴奋性和非兴奋性细胞的活动,是细胞膜外钙离子内流的主要途径。Bay k 8644是一种特异的L型钙通道的激动剂,L型钙通道开放钙离子内流增加,导致血管收缩和正性肌力作用。有文献报道[13],Bay k 8644低于 10^{-8} mol/L时是血管收缩作用,高于此浓度时为舒张作用。而在膜片钳实验中[14][15],Bay k 8644在 10^{-6} mol/L时明显增加外钙的内流。

有实验证实[16],在失血性休克后期,平滑肌细胞钙超载和钙失敏是血管低反应发生的重要原因。我室实验证明在重症休克后期, K_{ATP} 和 BK_{Ca} 通道大量开放,血管平滑肌细胞处于超极化状态,此时平滑肌细胞受升压药物影响,细胞内钙升高较正常组明显减小,说明此状态下,平滑肌细胞收缩所需内钙不足。因此,只是阻断钾通道不能使血管反应性完全恢复。由于膜电位的超极化抑制了钙通道的开放,内钙升高相对不足,这是导致微血管对升压药物反应丧失的重要原因之一。本实验发现,在正常状态下加入钙通道的激动剂 Bay k 8644可使细胞膜电位超极化,而在应用了 BK_{Ca} 的阻断剂TEA之后Bay k 8644引起膜电位的去极化,这可能是因为 Bay k 8644激活了L型钙通道使外钙内流,外钙内流使细胞内钙离子浓度明显增加,从而激活了 BK_{Ca} 使钾离子外流形成STOCs,STOCs电流使细胞膜出现超极化的变化。而在休克后期,相同浓度Bay k 8644可使处于超极化状态的平滑肌细胞膜出现去极化的变化,这说明在休克的状态下,由于内钙的相对不足,增加外钙的内流不会使已经激活的 BK_{Ca} 再次被激活而引起细胞膜更进一步的超极化,细胞膜向去极化状态改变有助于钙离子的持续内流,近而可以使休克后动物的小动脉平滑肌细胞在受到升压药物的作用时正常收缩。因此,休克后期外钙内流减弱ASMCs膜电位的超极化程度,对于治疗休克后期血管反应性下降有着重要的意义。

在休克后期给予 BK_{Ca} 的阻断剂TEA也有助于细胞膜去极化,但此药物用量较大,而另一种 BK_{Ca} 的阻断剂蝎毒(ChTX)由于毒性大也不适宜直接用作治疗休克动物的药物。因此,Bay k 8644不但可以增加钙的内流,而且同时也引起细胞膜去极化,这对于纠正休克动物平滑肌细胞的异常状态从而治疗休克后期血管反应性下降有着重要的意义。但其作为治疗休克动物的药物还需进一步的实验证明。

- [1] 赵克森, 金丽娟. 休克的细胞和分子基础[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 82-115.
- [2] Zhao KS, Liu J, Jin CH, et al. The role of membrane potential and calcium kinetic changes in the pathogenesis of vascular hyporeactivity during severe shock[J]. Chin Med J, 2000, 113: 59-64.
- [3] Liu J, Zhao KS, Jin CH, et al. Effect of intracellular acidosis on the pathogenesis vascular hyporeactivity in severe hemorrhagic shock[J]. Crit Care Shock, 1999, 3: 112-8.
- [4] Zhao KS, Liu J, Yang G, et al. Peroxynitrite leads to arteriolar smooth muscle cell membrane hyperpolarization and low vasoreactivity in severe shock[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2000, 23: 259-67.
- [5] Liu J, Zhao KS. The ATP-sensitive K⁺ channel and membrane potential in the pathogenesis of vascular hyporeactivity in severe hemorrhagic shock[J]. Chin J Trauma, 2000, 3: 39-44.
- [6] Zhao KS, Huang XL, Liu J, et al. New approach to treatment of shock-restitution of vasoreactivity[J]. Shock, 2002, 18: 189-92.
- [7] 赵克森. 重症难治性休克的机制和治疗[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19: 133-6.
- Zhao KS. Mechanism and treatment of severe and refractory shock[J]. Chin J Trauma, 2003, 19: 133-6.
- [8] 赵桂玲, 潘秉兴, 黄绪亮, 等. 平滑肌大电导钙激活钾通道在重症失血性休克细胞膜超极化中的作用[J]. 中华创伤杂志, 2003, 19: 329-33.
- Zhao GL, Pan BX, Huang XL, et al. Role of large conductance calcium-activated potassium channel of arteriolar smooth muscle cells in cell membrane hyperpolarization after severe hemorrhagic shock[J]. Chin J Trauma 2003, 19: 329-33.
- [9] 刘杰, 赵克森. 钙动力学变化在重症休克血管反应性低下发生中的作用[J]. 中华创伤杂志, 1997, 13(6): 333-5.
- Liu J, Zhao KS. Role of calcium kinetic changes in vascular hyporeactivity during severe hemorrhagic shock[J]. Chin J Trauma, 1997, 13(6): 333-5.
- [10] 刘杰, 赵克森. 重症休克大鼠细动脉平滑肌膜电位变化在血管反应性低下中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 1998, 14: 39.
- Liu J, Zhao KS. The role of arteriolar membrane potential in the pathogenesis of vascular hyporeactivity during severe hemorrhagic shock[J]. Chin J Pathophysiol, 1998, 14: 39.
- [11] Quignard JF, Rakotoarisoa L, Mironneau J, et al. Stimulation of L-type Ca²⁺ channels by inositol pentakis- and hexakisphosphates in rat vascular smooth muscle cells[J]. J Physiol, 2003, 549(3): 729-37.
- [12] Keef KD, Hume JR, Zhong JM. Regulation of cardiac and smooth muscle Ca²⁺ channels by protein kinases[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 281: C1743-56.
- [13] Hill MA, Meininger GA. Calcium entry and myogenic phenomena in skeletal muscle arterioles[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 1994, 267(3Pt2): H1085-92.
- [14] Wamhoff BR, Bowles DK, McDonald OG, et al. L-type voltage-gated Ca²⁺ channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism[J]. Circ Res, 2004, 95: 406-14.
- [15] Ji JZ, Yang SN, Huang XH, et al. Modulation of L-type Ca²⁺ channels by distinct domains within SNAP-25[J]. Diabetes, 2002, 51: 1425-36.
- [16] Xu J, Liu LM. The role of calcium desensitization in vascular hyporeactivity and

[回结果列表](#)