

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

赵 清, 赵克森 (南方医科大学病理生理教研室, 广东 广州 510515)

摘要:目的 探讨平滑肌细胞外钙内流对正常膜电位和休克后期超极化膜电位状态的影响。方法 制作失血性休克大鼠模型,分离血管平滑肌细胞(ASMCs),用 DiBAC₄(3)标记细胞膜电位,共聚焦显微镜观察 Bay k 8644 和 TEA 对正常对照组和休克组细胞膜电位的影响。结果 Bay k 8644 使正常对照组的 ASMCs 膜电位超极化,而 Bay k 8644 对休克组 ASMCs 膜电位的作用是去极化,但这种作用可被 TEA 逆转。结论 在正常情况下外钙大量内流会激活 BK_{Ca} 使细胞膜电位超极化,而在休克后期外钙内流会直接导致 ASMCs 膜电位的去极化,对于休克后期低反应性的治疗有重要意义。

关键词:失血性休克;膜电位;L型钙通道;大电导钙激活钾通道

中图分类号:Q424 文献标识码:A 文章编号:1673-4254(2006)04-0421-04

Effect of Bay K 8644 on arteriole smooth muscle cell membrane potential in rats with severe hemorrhagic shock

ZHAO Qing, ZHAO Ke-sen

Department of Pathophysiology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels on normal and hyperpolarized membrane potential of arteriole smooth muscle cells (ASMCs) in rats. **Methods** The ASMCs isolated from normal rats and those with severe hemorrhagic shock were labeled with DiBAC₄ (3) for membrane potential detection. **Results** Ca²⁺ influx caused hyperpolarization of the membrane potential in the normal ASMCs but depolarization in the cells from rats with hemorrhagic shock, and this effect could be inhibited by TEA. **Conclusion** Ca²⁺-activated potassium channels activated by Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels in normal ASMCs to cause hyperpolarization but leads directly to membrane potential depolarization in ASMCs from rats with severe hemorrhagic shock. This finding can be meaningful for treatment of vascular hyporeactivity in advanced stage of severe shock.

Key words: hemorrhagic shock; membrane potential; L-type Ca²⁺ channels; Ca²⁺-activated potassium channels

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因^[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^[4-6]。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

收稿日期:2005-07-29

基金项目:国家自然科学基金(30070735)

Supported by National Natural Science Foundation of China (30070735)

作者简介:赵 清(1974-),女,讲师,博士研究生,现工作单位为南方医科大学分析测试中心,电话:020-61648172, E-mail: qingzhao@fimmu.com

通讯作者:赵克森,电话:020-61648232, E-mail: shock@fimmu.com

失血性休克大鼠模型视为成功。正常对照组只做手术不流血。

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的大鼠断头处死,迅速剪取肠系膜并置于 0℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 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℃ 保持 30 min 后上机检测。

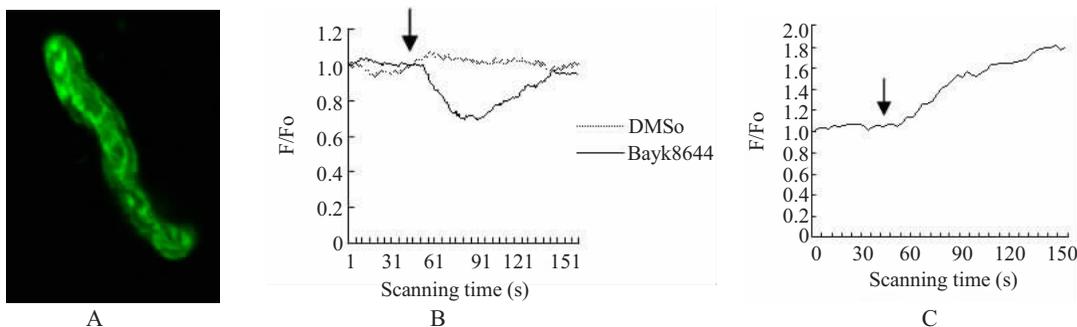


图 1 Bay k 8644 对正常和休克大鼠小动脉平滑肌细胞膜电位的作用

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.

2.3 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

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)。

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)。

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)。

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

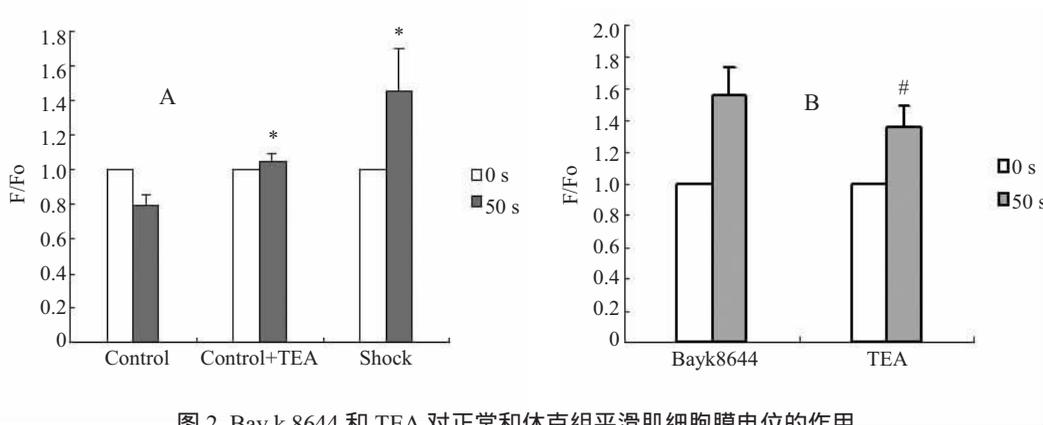


图 2 Bay k 8644 和 TEA 对正常和休克组平滑肌细胞膜电位的作用

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.

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,进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。

参考文献:

- [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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} 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 Ca^{2+} channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a rho kinase/myocarein/SRF-dependent mechanism[J] Circ Res, 2004, 95: 406-14.
- [15] Ji JZ, Yang SN, Huang XH, et al. Modulation of L-type Ca^{2+} 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 its regulation after hemorrhagic shock in the rat [J] Shock, 2005, 23(6): 576-81.

(上接 420 页)

外, 拉丁方试验结果的分析也比较简便。第二次拉丁方试验是在第一次试验的基础上进一步细化培养条件各因素的水平。拉丁方试验设计方法能够给出所检测因素各水平之间的差异, 但是其结果必须经过验证。

我们在综合摸索培养条件的试验中采用拉丁方进行试验设计, 结果发现, 三个培养条件因素中, 诱导温度的影响最大, 42℃诱导时 hIL-2-mGM-CSF 蛋白的相对表达量较 37℃诱导明显提高。培养菌种类对蛋白的表达和全菌产量也有较大影响, 高浓度肉汤的培养效果优于 LB 和 2×YT 培养基。较低的 IPTG 浓度诱导可以得到更高的表达量。通过验证试验, 验证了拉丁方试验所推导出的改良培养条件, 并将之与常规培养条件相比较, 最终得到了最佳的培养条件, 即采用高浓度肉汤培养基培养, 42℃和 0.3 mmol/L IPTG 诱导表达的条件下, 目的蛋白的表达量可由常规培养条件下的 4.9% 提高到 26.73% ($P < 0.05$)。在扩大培养的条件下, 产量进一步提高, 相对表达量提高了 5 倍。

本研究根据拉丁方试验设计方法摸索优化了工程菌 BL21/pET-11 c/hIL-2-mGM-CSF 的培养条件, 与常规培养条件下的结果进行比较, 优化的培养条件

明显提高了目的蛋白的相对表达量, 扩大培养的结果也验证了拉丁方试验的结果是可靠的。这为我们下一步纯化双功能蛋白和深入研究其生物学活性创造了有利的条件。

参考文献:

- [1] 孙卫民, 王惠琴. 细胞因子研究方法学[M] 北京: 人民卫生出版社, 1999: 620-6.
- [2] Glenn D. GM-CSF-based cancer vaccines[J] Immunol Rev, 2002, 188: 147-54.
- [3] 黄树其, 方向东, 陈德元, 等. 人 IL2GMCSF 融合基因的克隆及序列测定[J] 解放军广州医高专学报, 1997, 20(2): 87-9.
- [4] [美] 蒋庆琅. 实用统计分析方法[M] 方积乾, 柳青, 骆福添, 等译. 北京: 北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1998: 100-111, 273-85.
- [5] 杨俊英, 王晓波, 王孙准. 拉丁方设计及其统计分析方法 - 常用的临床试验设计方案及其统计分析方法之四[J] 新乡医学院学报, 2000, 17(3): 224-6.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M] 侯云德, 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第 2 版, 北京: 科学出版社, 1992: 908.
- [7] 黄树其, 林来兴妹, 齐锡位, 等. IL2-GMCSF 融合蛋白高效表达条件的初步研究[J] 第一军医大学学报 (J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 1996, 16(3): 224-6.
- [8] John S, Jian HW, Nathaniel B, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 fusion cDNA for cancer gene immunotherapy[J] Cancer Res, 2004, 64: 8795-9.