

[文章编号] 1000-4718(2009)03-0467-05

长期睾酮缺失对雄性大鼠胸主动脉平滑肌 细胞电压依从性钾通道的影响*

周萍¹, 富路^{2△}, 潘振伟³, 马丹², 曹君娴²

(哈尔滨医科大学¹附属二院老年病科,³药理学学院,黑龙江哈尔滨 150086;

²哈尔滨医科大学附属一院心内三科,黑龙江哈尔滨 150061)

[摘要] 目的:研究去势后长期睾酮缺失对雄性大鼠主动脉平滑肌细胞电压依从性钾通道(Kv)的影响。方法:雄性Wistar大鼠去势后6个月,用张力换能器测量主动脉环等长张力,全细胞膜片钳和Western blotting技术检测电压依从性钾通道的功能和Kv1.5通道蛋白的变化。结果:雄性大鼠去势后6个月,电压依从性钾通道阻断剂(4-氨基吡啶,4-AP)对主动脉环的收缩明显降低。去势组主动脉平滑肌细胞电压依从性钾通道的幅度与对照组相比明显降低,同时Kv1.5通道蛋白表达也相应降低,应用生理剂量睾酮替代治疗后电压依从性钾通道的功能和转录后改变都有所恢复。结论:长期内源性睾酮缺失引起电压依从性钾通道功能衰减,Kv1.5通道蛋白表达可解释该改变,生理剂量的睾酮替代治疗对受损的电压依从性钾通道有修复作用。

[关键词] 睾酮;去势;钾通道,电压依从性;膜片钳术;血管收缩

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of long-term endogenous testosterone deprivation on function of voltage-dependent potassium channels in rat aortic artery

ZHOU Ping¹, FU Lu², PAN Zhen-wei³, MA Dan², CAO Jun-xian²

(¹Department of Geriatric, The Second Affiliated Hospital, ³College of Pharmacy, Harbin Medical University, Harbin 150086, China; ²Department of Cardiovascular Diseases, The First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150061, China. E-mail: fulu_harbin@163.com)

[ABSTRACT] AIM: To explore the effect of long-term (6 months) endogenous testosterone deprivation by orchidectomy on the function of voltage-dependent potassium channels of vascular smooth muscle cells in rats. METHODS: Wistar rats were raised for 6 months after castration. Isometric tension measurement of aortic rings, whole-cell patch-clamp technique and Western blotting analysis were employed to examine the functional and posttranscriptional alterations of voltage-dependent potassium channels. RESULTS: Voltage-dependent potassium channel blocker, 4-aminopyridine, significantly decreased the constriction of aortic artery rings from male rats after 6-month castration. In castrated rats the amplitude of voltage-dependent potassium currents of aortic artery smooth muscle cells was significantly decreased compared with that in control rats. Meanwhile, the expression of Kv 1.5 channel protein, which plays an essential role in mediating vasomotor function, was also reduced. The functional and molecular alterations of voltage-dependent potassium channels were both restored when the rats were concomitant applied with physiological level of testosterone after castration. CONCLUSION: Long-term deprivation of endogenous testosterone in rats significantly attenuates the function of voltage-dependent potassium channels, and the decreases in expression of Kv1.5 channel protein accounts for this alteration. Long-term application of physiological concentration of testosterone, which recovered the impaired function of voltage-dependent channels, may be beneficial for male gender with hypotestosteronaemia.

[KEY WORDS] Testosterone; Castration; Potassium channels, voltage dependent; Patch-clamp techniques; Vasoconstriction

[收稿日期] 2008-03-05

[修回日期] 2008-10-27

* [基金项目] 黑龙江省卫生厅基金资助项目(No. 2003-053)

△通讯作者 Tel: 0451-8555473; E-mail: fulu_harbin@163.com

心血管疾病 (cardiovascular diseases, CVD) 是引起人类发病率和死亡率增加的主要原因,且男性发病率较绝经前妇女高^[1],过去认为差别源于雌激素的心血管保护作用或睾酮的有害作用,然而近来越来越多的证据表明,男性生理水平的睾酮对心血管系统有益^[2,3],Martorell 等^[4]证实,内源性睾酮缺失引起大鼠主动脉血管收缩性前列腺素类的产生增加,进一步说明男性睾酮缺乏对心血管系统不利。临床资料显示,老年男性高血压病患者血清睾酮水平降低^[5],CVD 的很多危险因素与低睾酮血症有关,而睾酮替代治疗则可改善心肌缺血,缓解心绞痛症状^[6]。研究表明,睾酮在体外有血管舒张作用,然而内源性睾酮对血管活性的调节作用和机制目前尚存争议。

电压依从性钾通道 (voltage dependent - potassium channels, Kv) 对静息膜电位的调节起决定性作用且其功能受多种致病因素的影响,如有中风倾向的自发高血压大鼠中,主动脉内皮细胞 Kv 电流减低,同时血管舒缩功能的主要调节蛋白 Kv1.5 的表达降低^[7],外源性睾酮替代治疗可通过激活 Kv3.4 和 Kv1.5 而调节心室肌细胞 Kv 通道^[8],然而,内源性睾酮缺失对血管平滑肌细胞 Kv 通道蛋白和电流的影响尚不清楚,因此本研究用雄性去势后 6 个月以及去势后睾酮替代治疗大鼠的胸主动脉,探讨长期睾酮缺失对血管平滑肌细胞 Kv 通道功能的影响。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 主要试剂 4-氨基吡啶 (4-aminopyridine, 4-AP)、四乙铵 (tetraethylammonium, TEA)、兔多克隆特异 Kv1.5 抗体、 β -actin 购于 Sigma, 丙酸睾酮购于天津氨基酸制药厂,特级胎牛血清购于杭州四季青生物制品公司,其它化学分析纯购于纯化化学药品有限公司,所有药品为当天或 -20 °C 储备原液稀释配制。

1.2 动物 7 周龄雄性 Wistar 大鼠,体重 160 - 220 g (购自哈尔滨医科大学动物中心),室温 22 - 24 °C, 50% 相对湿度,12 h 昼夜周期环境下饲养。

2 方法

2.1 去势和激素替代治疗 戊巴比妥麻醉 (60 mg · kg⁻¹), 无菌环境下随机行双侧睾丸切除和假手术,2 周后存活大鼠又随机分为 3 组:(1)假手术对照组 (CON, $n = 10$); (2)去势组 (CAS, $n = 10$);

(3)去势睾酮替代治疗组 (CAST, $n = 10$), CON 和 CAS 组给予等剂量的生理盐水安慰剂皮下注射, CAST 组给予丙酸睾酮 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 皮下注射直至处死,处死前测尾动脉收缩压,心室采血 5 mL 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清置于 -20 °C 冰箱保存并于 2 个月内送检,睾酮用放射免疫法检测。

2.2 离体主动脉环的制备和 4-AP 诱导的血管收缩 戊巴比妥钠 (60 mg · kg⁻¹, ip) 麻醉后迅速开胸取出胸主动脉置于含下列成分的 Krebs - Henseleit 液中 (mmol/L): NaCl 120, KCl 5.48, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 20, glucose 10, NaH₂PO₄ 1.2, 调 pH 在 7.3 - 7.4 之间,小心分离周围结缔组织并切割成 3 - 4 mm 的血管环,置于含有 10 mL KH 液的浴槽中并通以 95% O₂ 和 5% CO₂, 温度 37 °C。用棉签小心去内皮,用连接于多通道采集和分析系统 (BL - 420 型, 成都科技公司) 的张力换能器 (J YH - 4 型) 测量血管环收缩功能,血管环平衡 30 min 后加 1 g 的静息张力再平衡 90 min,平衡期间浴槽持续通气并保持恒温,每 20 min 换 1 次 KH 液,平衡后用氯化钾 (KCl, 60 mmol/L) 达到稳定的最大收缩张力,乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach, 0.1 mmol/L) 加入浴槽检测内皮功能,然后用 KH 液冲洗 2 次,进一步实验前血管重新平衡 30 min,分别测量 3 组对 4-AP 的收缩反应,4-AP 浓度累加 (2 - 16 mmol/L) 方式每隔 15 min 加入浴槽中,4-AP 最大浓度时 (16 mmol/L) 引起的张力改变作为 100%。

2.3 主动脉平滑肌细胞分离 按文献描述的方法略加修改^[9],将胸主动脉剪切成 1 mm 的碎片,1 g/L 胶原酶处理 1 h 去除内皮细胞,然后用无 Ca²⁺ - PSS 冲洗,置于含有 1 g/L 胶原酶和 0.5 g/L 弹性蛋白酶的 PSS 液中,37 °C 温箱孵育 2 h,细胞悬液 800 × g 离心 5 min,细胞片状沉淀物用 PSS 冲洗混悬。

2.4 全细胞膜片钳电生理检测 平滑肌细胞移至细胞室中并不断用 PSS 表面灌注 [成分 (mmol/L): NaCl 130, KCl 5, MgCl₂ 1.2, CaCl₂ 1.5, Hepes 10, glucose 10, NaOH 调 pH 至 7.4], 玻璃毛细管控制电极移液管 (4 - 6 M Ω), 灌以内液 [成分 (mmol/L): KCl 125, Na₂ATP 5, Na₂GTP 0.5, MgCl₂ 4, Hepes 10, EGTA 10, 用 KOH 调 pH 至 7.2]。封接前电阻抗 >10 G Ω , 外液为无 Ca²⁺ 并含有 1 mol/L 四乙铵 (TEA, K_{Ca} 通道阻滞剂) 的 PSS 溶液。Kv 通道电流用 Axopatch 200A 增幅器 (Axon Instruments) 记录,控制电位 -60 mV 时,用 10 mV 梯度逐步从 -50 mV 到

+60 mV 去极化,数据 5 kHz 时被滤过,用 Digidata 1200 模拟数字转换器数字化,用 pClamp (Axon 仪器)软件分析。全细胞电流标准化为细胞电容,所有电生理实验在室温下进行。

2.5 Western blotting 分析 胸主动脉组织刮至 0.3 mL 裂解液中(1% Nonidet 乙基苯基聚乙二醇,0.5% 去氧胆酸钠,0.1% SDS,100 mg/L 苯甲磺酰氟和 30 mL/L 抑酞酶)并放置冰块上孵育 30 min,溶解产物用超声破裂并 $16\ 099 \times g$ 离心 10 min,不溶解部分丢弃,上清液用 BCA 法测定所含蛋白浓度,以牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)为标准,50 μg 的蛋白在 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳上样缓冲液中混匀并 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min,蛋白用 10% SDS-PAGE 分离并在小的电转移印记槽中(Bio-Rad)抗湿电转法将凝胶上的蛋白转移到硝酸纤维素膜上,转移条件为 4 $^{\circ}\text{C}$,300 mA 电转 2 h。将转印膜放进平皿加入含 5% 脱脂奶粉的封闭液,在旋转摇床摇动封闭 1 h。用 TBS/T(加 0.1% Tween-20 PBS)洗 3 次,每次 5 min。然后加入稀释的亲纯化兔多克隆特异 Kv1.5 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜或室温 2 h,用 TBS/T 洗膜 3 次,单克隆特异抗平滑肌细胞 β -actin (Sigma) 抗体作为内参照,之后冲洗转移膜并用抗兔辣根过氧化物酶结合的 IgG 在室温下孵育 120 min,再用 TBS/T 洗膜 3 次后,用增强型化学发光试剂处理 1 min,塑料膜包好硝纤膜,然后于暗室中与 X 光片压片放置暗盒中曝光、显影、定影,观察结果。

3 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。血管环数据以对静息张力的百分数表示,两组均值比较采用 *t* 检验。

结 果

1 长期睾酮缺失对大鼠血压的影响

模型制备后 6 个月分别测量 CON、CAS 和 CAST 组大鼠收缩压,结果显示,各组间无显著差异,但 CAS 组有增高趋势[CON:(132.0 ± 6.2)mmHg, $n = 10$; CAS:(143.0 ± 6.8)mmHg, $n = 10$; CAST:(137.0 ± 5.6)mmHg, $n = 10$; $P > 0.05$]。

2 血清睾酮浓度

CAS 组睾酮水平明显降低[CON:(527.0 ± 10.2)ng/dL; CAS:(53.6 ± 6.4)ng/dL; $P < 0.01$], CAST 组睾酮水平[(512.0 ± 7.6)ng/dL]与 CON 组相比 $P > 0.05$,见图 1。

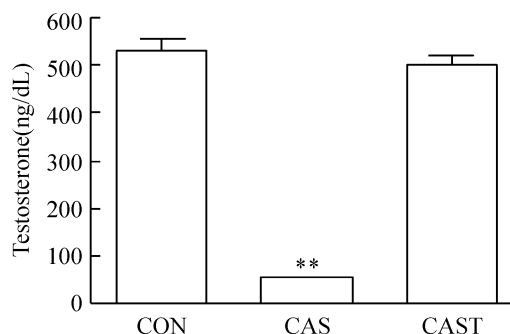


Fig 1 Serum testosterone levels from sham-operated control (CON, $n = 10$), castrated (CAS, $n = 12$) and castrated rats treated with testosterone (CAST, $n = 10$) at the time of death. $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$ vs CON.

图 1 各组间血清睾酮浓度比较

3 大鼠主动脉环对 4-AP 的收缩反应

4-AP 浓度依赖性(2、4、6、8、10、12、14 和 16 mmol/L)地引起去内皮主动脉环的收缩(图 2),去势后 6 个月主动脉环对 4-AP 的反应($n = 6$)在 16 mmol/L 浓度时与假手术对照组相比降低约 47%,说明去势后血管平滑肌细胞 Kv 通道活性降低,而睾酮替代治疗组对降低的 Kv 通道活性有恢复作用($P < 0.05$)。

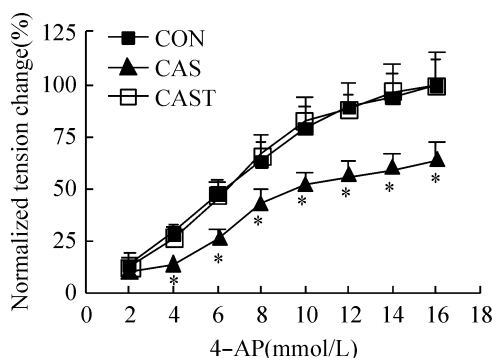


Fig 2 Vasoconstrictive response curves for 4-AP in thoracic aorta from male control (CON), castrated male (CAS) and castrated male rats treated with testosterone (CAST). $\bar{x} \pm s$, $n = 10$. * $P < 0.05$ vs CON.

图 2 各组大鼠胸主动脉血管环对 4-AP 收缩反应的比较

4 去势对 Kv 电流的影响

全细胞膜片钳技术检测血管平滑肌细胞 Kv 电流,存贮电位 -60 mV 时 Kv 电流由 -50 mV 到 +60 mV 的电压梯度诱发,图 3A 分别显示 3 组主动脉血管平滑肌细胞代表性的 Kv 电流记录,CON 组 Kv 电流峰值在 +60mV 时为 (11.68 ± 1.26)pA/pF, CAS 组电流明显减弱[(5.29 ± 1.27)pA/pF vs (11.68 ± 1.26)pA/pF]。CAST 组 Kv 电流活性较 CAS 组有所恢复[(11.18 ± 1.03)pA/pF vs (5.29 ± 1.27)pA/pF],见图 3B。

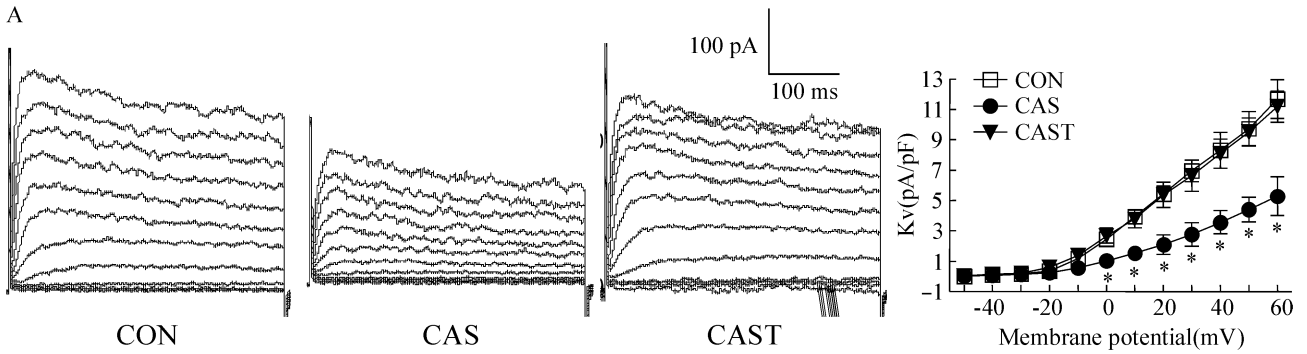


Fig 3 Effects of castration and testosterone replacement on the amplitude of voltage dependent potassium currents (Kv) in male rats. A: representative traces of Kv currents recorded from CON, CAS and CAST rats; B: the normalized current - voltage relationship of Kv currents in the three groups. $\bar{x} \pm s$, $n = 20$. * $P < 0.05$ vs CON.

图3 各组间胸主动脉平滑肌细胞 Kv 电流的变化

5 大鼠主动脉平滑肌 Kv1.5 通道蛋白的表达

如图 4 所示, CAS 组 Kv1.5 蛋白表达与 CON 组比较明显降低, 而 CAST 组与 CON 组无明显差异。

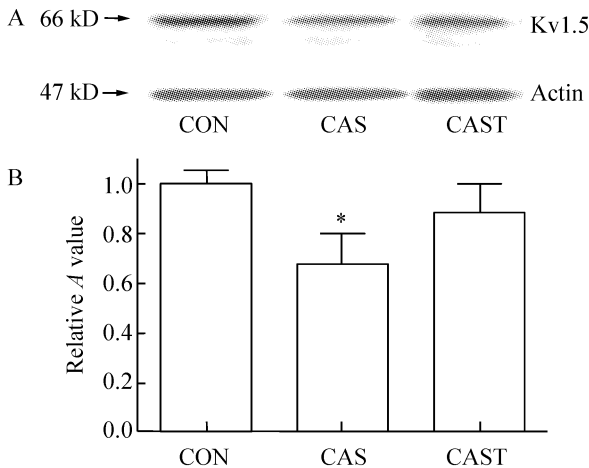


Fig 4 Quantitation of Kv1.5 expression in CON, CAS and CAST. A: representative images of actin and Kv1.5; B: densitometric quantitation of Kv1.5/actin. Bar graph, mean relative to CON group. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. * $P < 0.05$ vs CON.

图4 各组间胸主动脉平滑肌组织 Kv1.5 蛋白表达的变化

讨 论

本实验研究了长期(6个月)内源性睾酮缺失对大鼠主动脉平滑肌细胞 Kv 通道功能的影响以及生理剂量睾酮替代治疗对 Kv 通道功能恢复的作用, 结果显示, 去势降低 Kv 通道阻断剂 4-AP 引起的大鼠主动脉环张力的增加, 说明长期内源性睾酮缺失损伤 Kv 通道功能。同时去势组 Kv 电流的幅度和 Kv1.5 表达的降低进一步证实了张力变化的结果, 而生理剂量睾酮替代治疗则可恢复去势引起的 Kv 通道功能的改变。

研究显示, 男性高血压病患者睾酮水平较正常男性

低^[10], 睾酮治疗后舒张压轻度降低约 4-5 mmHg^[11,12], 说明对血压和血管舒缩功能的调节起重要作用, 本文观察的结果与上述报道一致。Schorr 等^[13]证明肌肉注射睾酮引起离体灌注猪心脏冠状动脉对前列腺素 F_{2α} (prostaglandin F_{2α}, PGF_{2α}) 拟态物 U46619 的收缩增强, 与此相似, 如 Farhat 等^[14]报道皮下注射睾酮 2 周引起离体猪冠状动脉对 KCl 的收缩反应增强。而相反的报道显示, 急性睾酮干预抑制 KCl 和 PGF_{2α} 引起的最终触发血管收缩的离体平滑肌细胞内钙离子的增加^[15], 由此可见, 睾酮引起血管反应性改变的复杂性, 以往的研究多集中于内皮及受体通路方面的研究, 而内源性睾酮对血管平滑肌细胞电压依从性钾通道是否有影响尚未见相关报道。

血管平滑肌细胞中至少存在 4 种 K⁺ 通道, 包括内向整流 K⁺ 通道 (inward rectified - K⁺ channels, K_{in})、ATP-敏感 K⁺ 通道 (ATP-sensitive K⁺ channels, K_{ATP})、电压门控 K⁺ 通道 (voltage dependent K⁺ channels, K_v) 和大电导 Ca²⁺-激活 K⁺ 通道 (large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, BK_{Ca}), 其中 K_v 和 BK_{Ca} 最丰富, K_v 通道是血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMCs) 中普遍表达的 K⁺ 通道族^[16], 可被 4-AP 阻滞。K⁺ 通道通过影响膜电位而调节血管紧张性, K⁺ 通道开放维持负向膜静息电位, 进一步激活导致膜超极化、细胞内钙离子降低, 进而引起血管舒张, 相反, K⁺ 通道抑制引起膜的去极化和血管收缩^[16], K_v 通道功能的损伤引起血管紧张性调节的紊乱, 电生理研究显示, 高血压动物模型 K_v 通道功能表达降低是引起膜去极化进而导致血管紧张性增加的原因^[17]。本研究观察到长期睾酮缺失降低 4-AP 诱导的收缩, 睾酮替代治疗部分恢复 Kv 电流和对 4-AP 的反应, 说明内源性睾酮缺失降低 K_v 通道的功能, 全细胞膜片钳技术观察到去势大鼠血管平滑肌细胞全部 K⁺ 电流密度较

对照组明显降低,预测全细胞稳态 Kv 电流的明显抑制导致膜去极化并增强血管组织兴奋性。

血管平滑肌中可检测到 4 种 Kv 通道蛋白 (Kv1.2、Kv1.3、Kv1.5 和 Kv2.1), 其中 Kv1.5 的表达最丰富,是形成大鼠血管平滑肌细胞自身 Kv 通道的主要亚型基因^[18],Kv1.5 通道受各种效应物质的调节(如:尼古丁和 内皮素-1)^[19]。本实验结果显示,内源性睾酮缺失组 Kv1.5 蛋白表达较假手术对照组明显降低,与膜片钳实验中观察到的结果相平行。该结果说明 Kv 通道功能的抑制可能是内源性睾酮缺失对男性心血管系统不利的另一个机制。

本研究进一步解释了临床中观察到的老年男性高血压病患者与低血浆睾酮水平相关的可能机制,并为临床男性心绞痛和心力衰竭合并低睾酮血症患者应用生理水平睾酮替代治疗的血管活性方面的益处^[20]提供了支持证据。

[参 考 文 献]

- [1] Grady D, Herrington D, Bittner V, et al. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (HERS II) [J]. *Jama*, 2002, 288(1): 49-57.
- [2] 高倩萍,富路,李佳,等. 雄激素对家兔动脉粥样硬化的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(1): 72-74.
- [3] 周强,柯俊,胡壮丽,等. 睾酮对慢性心力衰竭雄性大鼠离体心肌收缩功能的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(7): 1442-1444.
- [4] Martorell A, Blanco-Rivero J, Aras-Lopez R, et al. Orchidectomy increases the formation of prostanoids and modulates their role in the acetylcholine-induced relaxation in the rat aorta [J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 77(3): 590-599.
- [5] Simon D, Charles M, Nahoul K, et al. Association between plasma total testosterone and cardiovascular risk factors in healthy adult men: The Telecom Study [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(2): 682-685.
- [6] Muller M, van der Schouw Y, Thijssen J, et al. Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(11): 5076-5086.
- [7] Sadanaga T, Ohya Y, Ohtsubo T, et al. Decreased 4-aminopyridine sensitive K⁺ currents in endothelial cells from hypertensive rats [J]. *Hypertens Res*, 2002, 25(4): 589-596.
- [8] Pham T, Rosen M. Sex, hormones, and repolarization [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 53(3): 740-751.
- [9] Cai B, Gong D, Pan Z, et al. Large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ currents blocked and impaired by homocysteine in human and rat mesenteric artery smooth muscle cells [J]. *Life Sci*, 2007, 80(22): 2060-2066.
- [10] Phillips G, Jing T, Resnick L, et al. Sex hormones and hemostatic risk factors for coronary heart disease in men with hypertension [J]. *J Hypertens*, 1993, 11(7): 699-702.
- [11] Anderson F, Francis R, Faulkner K, et al. Androgen supplementation in eugonadal men with osteoporosis - effects of 6 months of treatment on bone mineral density and cardiovascular risk factors [J]. *Bone*, 1996, 18(2): 171-177.
- [12] Marin P, Holmang S, Jonsson L, et al. The effects of testosterone treatment on body composition and metabolism in middle-aged obese men [J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 1992, 16(12): 991-997.
- [13] Schror K, Morinelli T, Masuda A, et al. Testosterone treatment enhances thromboxane A2 mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs [J]. *Eur J Clin Invest*, 1994, 24(Suppl 1): 50-52.
- [14] Farhat M, Wolfe R, Vargas R, et al. Effect of testosterone treatment on vasoconstrictor response of left anterior descending coronary artery in male and female pigs [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, 25(3): 495-500.
- [15] Murphy J, Khalil R. Decreased Ca²⁺ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17beta-estradiol, progesterone, and testosterone [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 291(1): 44-52.
- [16] Nelson M, Quayle J. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(4 Pt 1): C799-C822.
- [17] Martens J, Gelband C. Alterations in rat interlobar artery membrane potential and K⁺ channels in genetic and nongenetic hypertension [J]. *Circ Res*, 1996, 79(2): 295-301.
- [18] Clement-Chomienne O, Ishii K, Walsh M, et al. Identification, cloning and expression of rabbit vascular smooth muscle Kv1.5 and comparison with native delayed rectifier K⁺ current [J]. *J Physiol*, 1999, 515 (Pt 3): 653-667.
- [19] Remillard C, Tigno D, Platoshyn O, et al. Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(5): C1837-C1853.
- [20] English K, Steeds R, Jones T, et al. Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: A randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Circulation*, 2000, 102(16): 1906-1911.