

短暂缺氧对心肌细胞 K_{ATP} 通道的影响

冯力¹, 赵岐², 刘杰³

(1. 中山医科大学药理学教研室, 广东 广州 510089; 2. 广州军区广州总医院眼科, 广东 广州 510010;
3. 第一军医大学病理生理教研室, 广东 广州 510515)

摘要:【目的】探讨 K_{ATP} 通道在心肌缺血预适应(IP)中的作用。【方法】用膜片钳单通道记录技术的细胞贴附式研究急性短暂缺氧复氧对新鲜分离的豚鼠心肌细胞细胞膜 K_{ATP} 通道影响。【结果】短暂缺氧 10 min 可明显引起细胞膜 K_{ATP} 通道的开放, 缺氧诱导的 K_{ATP} 通道的开放以簇状开放为主。复氧 2 min 及用 2 mmol/L ATP 可抑制通道开放, 其电导值为 89.7 pS。缺氧使通道开放概率(P_o)明显增加, 并可诱发通道出现二级开放。【结论】短暂缺氧可以激活心肌细胞膜 K_{ATP} 通道的开放, 说明心肌细胞膜 K_{ATP} 通道参与了 IP 的保护作用。

关键词: 缺氧复氧; 钾通道; 缺血预适应; 心肌

中图分类号: R972 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0056-04

The Effect on Cardiac Plasma Membrane K_{ATP} Channel by Brief Hypoxia

FENG Li¹, ZHAO Qi², LIU Jie³

(1. Department of Pharmacology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou 510089 China;
2. Department of Ophthalmology, Guangzhou Military General Hospital, Guangzhou 510010, China;
3. Department of Physiopathology, the First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: 【Objective】In order to study the role of the cardiac myocyte membrane K_{ATP} channel in ischemic preconditioning(IP) *in vitro*. 【Method】The effect of 10 min hypoxia on K_{ATP} channel of isolated ventricular myocyte was observed, by using patch clamp technique (cell-attached configuration). 【Result】The result show that K_{ATP} channel can be easily opened by 10 min brief hypoxia, and inhibited by reoxygenation within 2 min or by 2 mmol/L ATP. The opening of K_{ATP} channel was in burst. The single-channel conductance activated by hypoxia was 89.7 pS, the P_o (open state probability) was increased by hypoxia, and the secondary opening of K_{ATP} channel was also induced. 【Conclusion】Brief hypoxia could activated cardiac plasma membrane K_{ATP} channel and the results proved that K_{ATP} channel should take part in the IP.

Key words: anoxia and reoxygenation; potassium channels; ischemic preconditioning; myocardium

近几年的研究发现, 给予多次短暂缺血和复灌后, 心肌可以耐受随后长时间的缺血, 梗塞面积可以缩小。这种多次短暂的缺血称为心肌缺血预适应(ischemic preconditioning, IP)^[1]。许多实验证明 K_{ATP} 通道参与了 IP 的保护作用^[2,3], 但缺乏在体外细胞水平 K_{ATP} 通道参与 IP 的证据。因此本实验采用新鲜分离的豚鼠心肌细胞, 并模拟 IP 的短暂缺氧、复氧过程, 直接观察在短暂缺氧环境下

K_{ATP} 通道开放的情况。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

链酶蛋白酶 E (pronase E) (Sigma), 优降糖 (glybenclamide, GLY) (Sigma)。实验用液体配制: 无钙台氏液 (mmol/L): NaCl 116, KCl 5.4,

收稿日期: 2000-04-18

基金项目: 广东省博士启动基金资助项目(994054)

作者简介: 冯力(1966-), 女, 河北石家庄人, 博士, 主治医师。

NaH₂PO₄ 1.4, NaHCO₃ 15, MgSO₄ 1, Glucose 15, pH 7.3~7.4。台氏液 (mmol/L): NaCl 150, KCl 5.4, MgCl₂ 2, Glucose 10, HEPES 5, CaCl₂ 1.8, pH 7.3~7.4。浴槽液 (mmol/L): KCl 120, KOH 20, EGTA 5, MgCl₂ 1, TTX 0.001, HEPES 10, pH 7.3。电极液 (mmol/L): KCl 140, MgCl₂ 1, CaCl₂ 2, CdCl₂ 0.3, TTX 0.001, HEPES 10, pH 7.3。

1.2 心室肌细胞的急性分离

健康豚鼠 250~350 g, 雌雄不拘, 猛击枕部致昏, 迅速打开胸腔, 取出心脏, 置于 4 °C 无钙台氏液中冲洗, 剪开心包, 主动脉插管后固定于 Langend-off 灌流架上, 用无钙台氏液经豚鼠主动脉逆行灌注离体心脏, 将冠状动静脉中的血液冲净, 后改用含链酶蛋白酶 E 0.1 g/L, CaCl₂ 150 μmol/L 的无钙台氏液 50 mL, 灌流 2~3 min, 可见心脏比原来膨胀 30%~50%, 立即切下心室肌, 剪开心室腔, 在上述含酶的无钙台氏液用吸管洗去残留的血块并将心室肌切碎, 在上述酶液中温孵 3~5 min, 用细尼龙网过滤, 去掉心室肌碎块, 将上清液稀释 5 倍至含钙 1.8 mmol/L 的无钙台氏液 (保育液) 中, 室温下保存, 待用。

1.3 体外细胞水平模拟 IP 短暂缺氧复氧模型

将含有细胞的保育液滴入记录通道活动的浴槽内, 先用台氏液灌流浴槽, 使细胞表面保持清洁以利于与微电极形成高阻封接, 封接成功后将台氏灌注液改为浴槽高钾缺氧液正式缺氧灌注 10 min。此缺氧液的制备是在密闭玻璃容器中给灌注液通以体积分数为 95% N₂+5% CO₂ 混合气体 20~30 min, 使灌注液氧分压降至 4 kPa 以下, 以恒定的灌注速度灌注, 同时在浴槽表面也通以体积分数为 95% N₂+5% CO₂ 混合气体来保持浴槽内溶液的缺氧程度, 缺氧 10 min 后改为通以体积分数为 95% O₂+5% CO₂ 混合气体的台氏灌注液继续灌注。

1.4 单离子通道记录

本实验采用膜片钳技术的细胞贴附式记录模式。记录用玻璃微电极的尖端直径约为 0.5~1.5 μm, 充灌液体后电阻约为 8~16 MΩ。内插乏极化氯化银电极与膜片钳放大器探头相连。单通道电流经膜片钳放大器放大, 放大器探头反馈电阻为 10 GΩ。低通滤波频率为 3 kHz, 经 Digidata 转换, 在 Fetchex 下采样。

1.5 资料分析

用 pCLAMP 分析程序 Fetchan 进行开关事件的测量, 设定通道的开、关事件的时间分辨率为 200 μs, 测量幅度的时间分辨率为 500 μs, 本文时间资料分析只选用单级开放的资料。将测量结果用 pSTAT 程序进行统计分析。

2 结果

2.1 分离的心肌细胞的形态学

用上述方法分离的细胞, 在光学显微镜下约有 30%~40% 呈条柱状细胞直径为 20~60 μm 不等, 长度约 40~150 μm。细胞边界清楚, 横纹排列清楚, 台盼蓝染色为活细胞。在实验中我们采用这些条柱状细胞进行细胞膜的离子通道研究, 发现封接较容易, 封接成功率为 88%。

2.2 缺氧诱导心肌细胞膜 K_{ATP} 通道的激活及该通道的特点

2.2.1 K_{ATP} 通道的激活及鉴定 用贴附式模式记录 K_{ATP} 通道, 因细胞是完整的, 在没有缺血、缺氧及代谢受抑制的情况下, 一般记录不到 K_{ATP} 通道的开放, 我们在封接成功的 30 例正常的豚鼠心肌细胞中, 给予细胞膜施加 -100~+60 mV 不同的钳制电压, 没有发现 1 例具有 K_{ATP} 通道特性的电流活动; 而在缺氧 10 min 后, 封接成功的 30 例心肌细胞中有 21 例具有 K_{ATP} 通道特性, 并有 3 例在钳制电压为 -60 mV 时可见有通道二级开放。为了排除其他通道电流活动的影响, 我们在电极液中加入 TTX 阻断了 Na⁺ 通道, 用 CdCl₂ 阻断了 Ca²⁺ 通道, 再结合此通道具有较大的电流幅度, 停止缺氧液灌注恢复台氏灌注液灌注 2 min, 通道电流消失 (图 1), 通道电流活动可以被浓度为 2 mmol/L ATP 所抑制等特性, 证明此通道即为 K_{ATP} 通道。

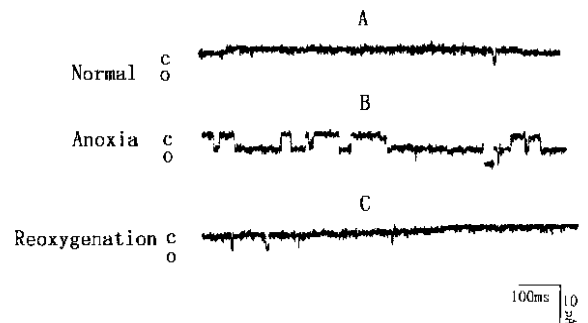


图 1 短暂缺氧对 K_{ATP} 通道的激活作用

Fig. 1 Effects of brief hypoxia on activation of K_{ATP} channel

2.2.2 K_{ATP} 通道的电流幅度及电导 用细胞贴附式记录时, 电流幅度在同一钳制电压下基本相同, 呈时间不等的方波。其幅度分布直方图呈对称的单峰状, 能很好的进行正态分布拟合。在不同的钳制电压下, 通道电流幅度算术均值和几何均值之间相比, 无统计学上显著性差异(表1)。表1表示的是在钳制电压为 -20 mV、 -40 mV、 -60 mV时, 通道电流幅度算术均值和几何均值两者相比, 无显著性差异($P > 0.05$), 说明为单通道电流。

表1 通道电流幅度的算术均值和几何均值的比较

Table 1 The comparison of current amplitude

Holding V_h / mV	Arithmetic \bar{I} / pA	Geometry \bar{I} / pA
-20	2.26 ± 0.30	2.37 ± 0.20
-40	3.82 ± 0.57	3.93 ± 0.36
-60	5.85 ± 0.75	5.32 ± 0.63

以钳制电位(holding potential, V_h / mV)水平为横坐标, 相应通道外向电流幅值(outward current, I_o / pA)为纵坐标, 可见钳制电位在 $-60 \sim 0$ mV范围内, 各点排列基本成线性, 位于一倾斜的直线上, 说明通道无整流。在 40 mV, 上述直线的线性成分丧失, 表示有轻微的内向整流电流成分参与。应用直线回归求出最佳拟合直线(图2, $R = 0.9$), 此即电流-电压关系曲线($I-V$ Curve), 电导值即为该曲线斜率。该通道的电导值为 89.7 pS ($n = 8$)。 $I-V$ 曲线与 X 轴相交处的电压值即为翻转电位, 本组通道的翻转电位为 2.2 mV, 与 K^+ 的平衡电位 0 mV 极为接近, 证明记录到的通道电流为钾离子通道电流。

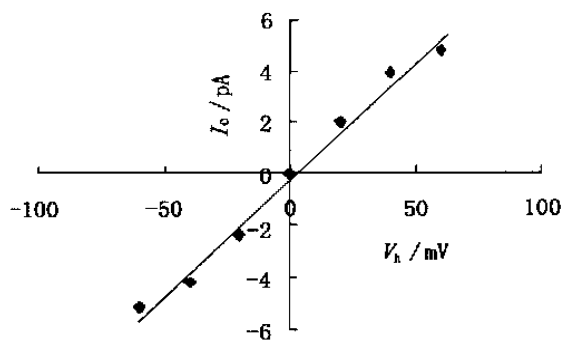


图2 K_{ATP} 通道电流-电压($I-V$)曲线

Fig. 2 Current-Voltage relation curve

2.2.3 K_{ATP} 通道的动力学特性 ①通道开放时间: 缺氧诱导的心肌细胞 K_{ATP} 通道的开放以簇状

开放为主。通道开放时间分布直方图呈指数分布, 并可用双指数拟合。②通道的开放概率: 在正常生理条件下, K_{ATP} 通道通道开放概率(P_o)为0。缺氧导致 P_o 明显增加, 在钳制电压为 -20 mV、 -40 mV 和 -60 mV 时, P_o 分别为 0.219 、 0.337 和 0.404 。

2.2.4 通道的药理学特性 ①ATP的作用: 完成吸附式记录后, 将电极拉开, 使电极下面的一小片细胞膜与细胞的其余部分分离, 膜片内侧朝向浴槽液, 当浴槽液中加入 ATP, 终浓度为 2 mmol/L 时, 通道活动完全被抑制, 证明记录的是 K_{ATP} 通道。

②通道激活与 Ca^{2+} 的关系: 浴槽液用双蒸去离子水配制, 并用 5 mmol/L EGTA 彻底螯合溶液中可能含有的游离 Ca^{2+} , 在进行细胞吸附式及内面向外式记录中, 均可记录到通道的电流活动, 表明通道的激活不受细胞内 Ca^{2+} 的影响。

3 讨论

随着对 IP 机制的深入探讨, 有关 K_{ATP} 通道能在心肌细胞代谢障碍时发挥调节作用的报道日渐增多。基于目前在细胞水平探讨 K_{ATP} 通道在 IP 中作用的文献尚少, 短暂缺氧能否诱发 K_{ATP} 通道的开放仍存有争论^[4,5]。故我们在细胞水平用膜片钳技术观察模拟 IP 时短暂缺氧对 K_{ATP} 通道的影响, 本实验的结果证明, 短暂缺氧 10 min 可以激活 K_{ATP} 通道。

我们用细胞贴附式记录通道情况, 保证了细胞的完整, 细胞的微环境及代谢未受到明显影响, 比较接近在体情况, 故用此方法记录缺氧引起的 K_{ATP} 通道的开放较符合实际情况。 K_{ATP} 通道的激活和失活受细胞内 ATP 浓度($[ATP]_i$)的调控, 此特性可作为其独特的鉴定方式, 在细胞复氧后, 或完成记录后进行内面向外式记录时加入正常生理条件下浓度(mmol/L)的 ATP, 均可使通道失活; 再加上此通道 $I-V$ 曲线与 X 轴交于静息膜电位(0 mV)附近, 其翻转电位与钾离子平衡电位(E_k)很接近(因电极液与浴槽液钾离子浓度相等, $E_k = 0$ mV), 表明此通道对钾离子选择性通透; 电极液和浴槽液内含 CdCl₂ 和 TTX 阻断了 Ca^{2+} 通道和 Na^+ 通道; 本实验中记录的通道电导为 89.7 pS 与最近类似的文献报道相近(83 pS)^[4]。综合以上几点说明我们实验中记录的是 K_{ATP} 通道, 表明短暂

缺氧后可激活 K_{ATP} 通道,进而发挥其保护心肌的作用。

有报道证明 $100 \mu\text{mol/L}$ 的 ATP 即可抑制 K_{ATP} 通道的激活^[6],但在缺血或缺氧的早期,心肌细胞内 ATP 浓度仍在 mmol/L 水平,那么 K_{ATP} 通道在缺血或低氧早期开放机制是怎样的呢?可能的机制是缺血心肌细胞内 ATP 的分布呈不均匀性, K_{ATP} 通道附近 ATP 丢失较快,并且在缺血或缺氧情况下,ADP、 H^+ 、腺苷释放都增加,可以改变 K_{ATP} 通道对细胞内 ATP 敏感性,从而使 K_{ATP} 通道活性增加。ADP 不仅通过抑制 ATP 与 K_{ATP} 通道的结合,而促进通道的激活;而且也可结合二磷酸核苷酸(NDP)的位点,而促进通道活化,使 K_{ATP} 通道活性增加^[7],但确切的调节机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 1124.
- [2] Koning M M, Gho B C, Van Klaarwater E, *et al.* Rapid

ventricular pacing produces myocardial protection by non-ischemic activation of K_{ATP} channels [J]. *Circulation*, 1996, 93(1): 178.

- [3] Mizumura T, Nithipatikom K, Gross G J. Bimakalim an ATP-sensitive potassium channel opener mimics the effects of ischemic preconditioning to reduce infarct size, adenosine release and neutrophil function in dogs [J]. *Circulation*, 1995, 92(5): 1236.
- [4] Benndorf K, Bollmann G, Friedrich M, *et al.* Anoxia induces time-independent K^+ current through K_{ATP} channels in isolated heart cells of the guinea-pig [J]. *J Physiol (Lond)*, 1992, 454: 339.
- [5] Yan G X, Yamada K A, Kleber A G, *et al.* Dissociation between cellular K^+ loss, reduction in repolarization time, and tissue ATP levels during myocardial hypoxia and ischemia [J]. *Circ Res*, 1993, 72(3): 560.
- [6] Ashcroft S J H, Ashcroft F M. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels [J]. *Cell Signal*, 1990, 2(1): 197.
- [7] Gibble F M, Ashfield R, Ammala C, *et al.* Properties of cloned ATP-sensitive K^+ channels expressed in *Xenopus* oocytes [J]. *J Physiol (Lond)*, 1997, 498(Part 1): 87.

(编辑 张敏瑞)

(上接第9页)

测方法鉴定,因其属于细胞内结构蛋白,广泛存在于横纹肌、平滑肌、心肌细胞,故采用 desmin 免疫细胞化学染色是鉴别成肌细胞和成纤维细胞更为有效的方法。本实验工作为成肌细胞的基础研究和临床治疗实验提供简便、低耗的体外培养途径。

参考文献:

- [1] Law P K. Myoblast transfer: gene therapy for muscular dystrophy [M]. Austin: RG Landes Company, 1994. 35 ~ 37.
- [2] Rando T A, Blau H M. Primary mouse myoblast purification, characterization, and transplantation for cell-mediated gene therapy [J]. *J Cell Biol*, 1994, 125(6): 1275.
- [3] Brown R H, Miller J B. Progress problems, and prospects for gene therapy in muscle [J]. *Curr Opin Rheumat*, 1996, 8(6): 539.

- [4] 鄂征. 组织培养和分子细胞学技术 [M]. 北京: 北京出版社, 1995. 121 ~ 131.
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 西安: 世界图书出版公司, 1996. 62 ~ 72.
- [6] Blau H M, Webster C. Isolation and characterization of human muscle cells [J]. *Cell Biol*, 1981, 78(9): 5623.
- [7] Delaporte C, Dehaupas M, Fardeau M. Comparison between the growth pattern of cell cultures from normal and Duchenne dystrophy muscle [J]. *J Neurol Sci*, 1984, 64(2): 149.
- [8] Fishchman D A. Monoclonal antibodies to desmin: evidence for stage dependent intermediate filament immunoreactivity during cardiac and skeletal muscle development [J]. *Ann NY Acad Sci*, 1985, 455(2): 167.
- [9] Allen R E, Temm-Grove C J, Sheehan S M, *et al.* Skeletal muscle satellite cell cultures [J]. *Methods Cell Biol*, 1997, 52(2): 155.

(编辑 关淡庄)