

运动对大鼠血管平滑肌大电导钾通道 生物物理特性的影响*

许建文¹⁾ 谢静²⁾ 王法²⁾ 赵虎成^{2)**}

¹⁾广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530023; ²⁾清华大学工程力学系生物力学实验室, 北京 100084

摘要 对大鼠进行不同强度的游泳训练以建立动物模型, 应用膜片钳技术分析训练 1~4 周以及对照组的大鼠血管平滑肌细胞大电导钾通道(BK 通道)的门控。实验结果显示, BK 通道的开放概率在游泳训练第 2、3 周时明显升高, 到第 4 周趋于稳定; 游泳训练后, 通道对膜电位、胞内钙离子的敏感性显著增加, 通道的平均开放时间常数增大, 关闭时间常数减小。实验结果还显示, 由游泳训练导致的被动牵张并不改变通道的电导。BK 通道在被动牵张力作用下生物物理特性的变化, 可能有缓解由于游泳训练而导致血压升高的作用, 进而使机体保持正常的生理状态。

关键词 运动, 血管平滑肌细胞, BK 通道

学科分类号 Q6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00374

导致原发性高血压的最基本原因是血管平滑肌张力的持续增加, 这种现象是由平滑肌细胞的收缩状态决定的。细胞的收缩系统由细胞骨架中肌动蛋白丝与肌球蛋白丝的相对滑动所致, 钙离子在整个过程中始终起着举足轻重的作用^[1-2], 胞内钙离子浓度增高将有利于细胞收缩。大电导钾通道 (large-conductance Ca^{2+} and voltage-activated K^{+} channels, BK) 在血管平滑肌大量表达, 并精确地调控着细胞内钙离子的浓度, 它的活动对血管平滑肌细胞收缩有着重要的影响^[3]。

当血管平滑肌细胞膜电位去极化时, 会激活电压依赖性 Ca^{2+} 通道, 引起胞外 Ca^{2+} 内流进入胞浆。 Ca^{2+} 的内流激活肌质网上的雷诺啉(ryanodine)受体, 引起肌质网局部的 Ca^{2+} 释放(钙火花, Ca^{2+} Sparks), 胞浆内 Ca^{2+} 浓度迅速提高。肌质网的 ryanodine 受体与 BK 通道位置非常接近 (< 20 nm), 释放的钙火花可以活化 BK 通道, 产生瞬时外向钾电流 (spontaneous transient outward currents, STOCs) 而使膜电位复极化, 减少 Ca^{2+} 的内流, 从而降低血管平滑肌张力, 使得血管平滑肌舒张, 对抗了张力的持续增加^[4]。在四乙胺(TEA)、卡律蝎毒素(charybdotoxin, CTX)阻断 BK 通道后,

血管平滑肌细胞出现去极化和收缩的现象, 从而验证了 BK 通道维持血管正常生理功能的作用^[5]。可见, BK 通道的表达和活性改变可以通过负反馈作用对高血压进行调节。运动可以降低血压, 但其机制尚不完全清楚。本研究以 BK 通道为研究对象, 分析运动对其生物物理特性的影响。

1 方 法

1.1 大鼠游泳模型的建立

采用 McMullen 等^[6]建立的经过长期力竭性游泳训练大鼠的方法。SD 大鼠购于北京大学医学部实验动物中心, 雌性, 体重 100 g 左右。购回后在本实验室动物室内适应性饲养(室温 $18^{\circ}\text{C} \sim 26^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 45%~65%, 自然光照) 3 天后。随机分成 2 组: a. 对照组(C)8 只, 常规饲养, 不加干预。分成 4 组分别作为游泳训练 1、2、3、4 周的对照组, 分别记做 C-1、C-2、C-3、C-4; b. 运

* 国家自然科学基金资助项目(11072132, 11272184)。

** 通讯联系人。

Tel/Fax: 010-62785624, E-mail: zhaohc@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2012-09-12, 接受日期: 2013-02-04

动组 12 只, 采用游泳训练, 分成 4 组, 分别训练 1、2、3、4 周, 记做 SW-1、SW-2、SW-3、SW-4.

运动组训练方式为: 买回动物经过 3 天的适应性饲养后, 开始在水箱(65 cm×50 cm×65 cm)中游泳, 水温控制在(30 ± 3)°C. 在游泳训练前进行 8 天预游泳训练, 第一天游泳时间为 10 min, 之后每天增加 10 min, 每天训练 2 次. 直到 8 天后, 游泳时间达到 90 min. 预游泳训练完后, 每天游泳 90 min, 上下午各 1 次, 持续 4 周.

1.2 血管平滑肌细胞的急性分离

在训练结束后取出胸主动脉, 剥离主动脉外周包被的脂肪组织. 将主动脉剪成约 1 mm 的动脉环, 置于预冷的含钙生理盐溶液(PSS)中, 冰浴 30 min. 将组织转移到无钙的 PSS 液中, 37°C 温浴 10 min. 吸弃无钙 PSS, 加入 3 ml 胶原酶 IV(浓度为 1 g/L, 无钙 PSS 稀释)37°C 消化 10 min. 消化完毕后, 用小剪刀将动脉环轻轻剪碎. 吸弃胶原酶, 加入 3 ml 消化液(3 g/L 木瓜蛋白酶、1 mmol/L DTT, 无钙 PSS 溶解)37°C 消化 10 min. 吸管轻轻吹打, 待组织块沉淀后, 收集上清液. 将收集到的上清液 200 目筛子过滤. 1 000 r/min, 离心 3 min. 弃上清, 加入 1 ml 无钙 PSS 吹打. 细胞悬液冰上保存

备用.

1.3 膜片钳记录

待细胞贴壁后在室温下记录. 膜片钳放大器为 Axon 200B, 微电极采用 PC-10(NARISAGE)两步控制, 电极电阻为 5MΩ 左右. 通过压力控制系统对膜片施加负压. 记录模式为内膜向外(inside-out). 应用 pClamp 10.0 进行数据采集和分析, 用于分析细胞开放概率(P_o)的记录持续时间为 2000~4000 ms. 电极液(pH 7.4): 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L HEPHS, 5 mmol/L 葡萄糖, 145 mmol/L K-葡萄糖盐. 浴液(pH 7.4): 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L HEPHS, 5 mmol/L 葡萄糖, 145 mmol/L K-葡萄糖盐, 钙浓度由 CaCl₂ 来调节(所需 CaCl₂ 的量通过 WinMAXC 软件计算, <http://www.stanford.edu/~cpatton/winmaxc2.html>)

2 结 果

2.1 运动对 BK 通道开放概率的影响

应用内膜向外的记录模式, 分析游泳训练对血管平滑肌细胞 BK 通道活性的影响. 结果显示(图 1), 随游泳训练的时间延长, BK 通道的开放概率明显高于对照组. 从第 3 周开始, 对照组与游泳

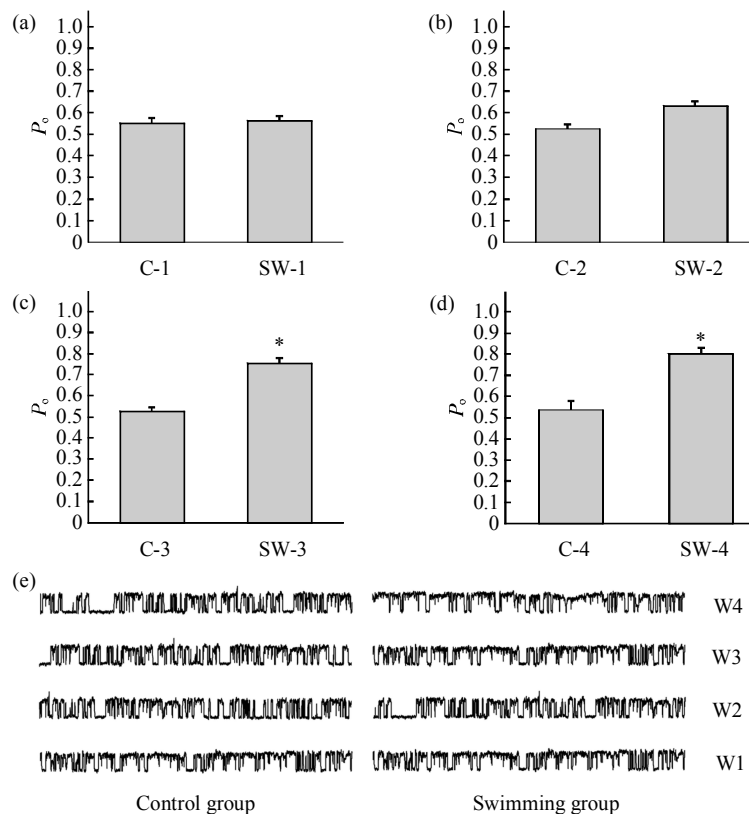


Fig. 1 Effect of exercise training on open probability of the BK channels

Membrane potential +40 mV, bath solution contained 3 μ mol/L Ca²⁺, n=12, * $P < 0.05$. (a) Swimming one week and control group. (b) Swimming two weeks and control group. (c) Swimming three weeks and control group. (d) Swimming four weeks and control group. (e) Representative current traces.

组间 BK 通道的开放概率存在显著差异. 表明, 游泳训练可以提高大鼠血管平滑肌细胞 BK 通道的开放概率.

2.2 运动对 BK 通道膜电位依赖性和钙离子依赖性的影响

由于 BK 通道具有明显的膜电位依赖性, 本研究分析了运动训练对 BK 通道膜电位依赖性的影响. 由图 2 可见, BK 通道的电压依赖性随着训练

的进行而增强, 其 P_o - V 拟合曲线的高电位端在第 4 周时明显上扬. 训练组 P_o - V 曲线整体上在 1、2 周时基本与对照组曲线平行并稍有上移, 而 3、4 周时高电位端曲线上升更明显. 3 周和 4 周训练组与对照组的 $V_{1/2}$ 分别为: $(0.08 \pm 0.06)^*$, (-0.66 ± 0.04) ; $(0.16 \pm 0.06)^*$, $(0.05 \pm 0.01)^*$ ($*P < 0.05$), 训练组与对照组间存在显著差异. 结果表明, 由运动引起牵张力环境使 BK 通道的膜电位敏感性增加.

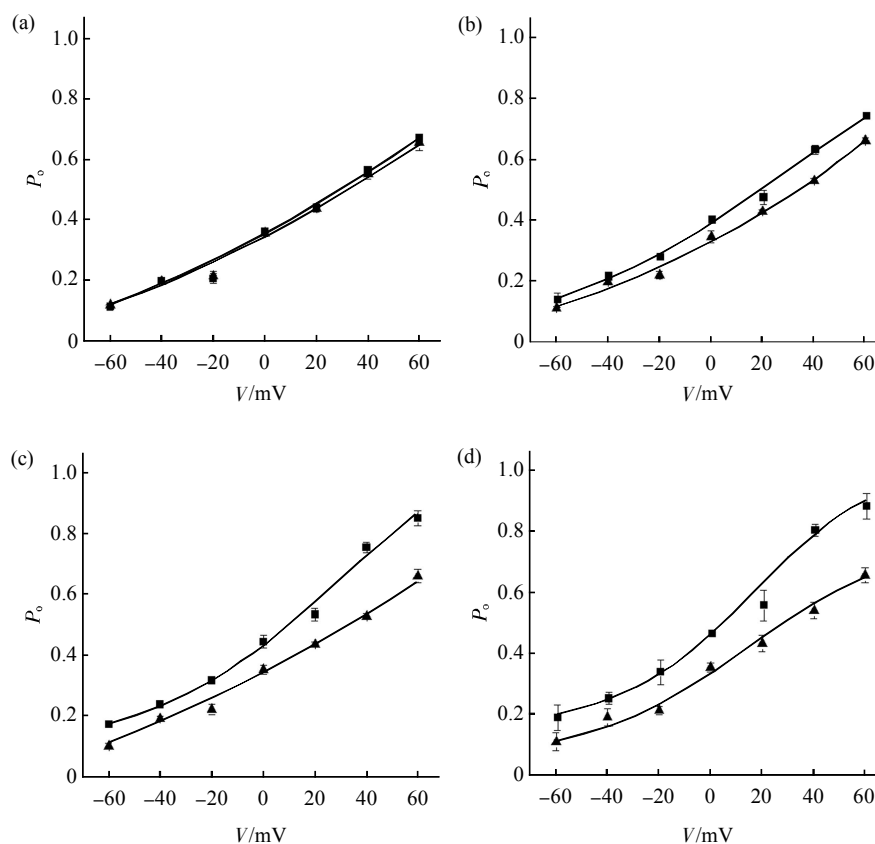


Fig. 2 Effect of exercise training on the voltage dependence of the BK channels

Bath solution contained $3 \mu\text{mol/L Ca}^{2+}$, $n=9$. P_o - V curve was fit by the Boltzmann equation. (a) Swimming one week and control group. ■—■: SW-1; ▲—▲: C-1. (b) Swimming two weeks and control group. ■—■: SW-2; ▲—▲: C-2. (c) Swimming three weeks and control group. ■—■: SW-3; ▲—▲: C-3. (d) Swimming four weeks and control group. ■—■: SW-4; ▲—▲: C-4.

由图 3 可以看出, 在 40 mV 的膜电位下, 胞内钙离子浓度从 $1 \sim 10 \mu\text{mol/L}$ 变化时, 第一周通道开放概率几乎与对照组无差别, 2~4 周时 BK 通道开放概率整体上高于对照, 不同浓度下提高幅

度基本一致. 这表明, 牵张状态下通道的钙离子敏感性可能增强, 较低的钙离子浓度即可促使通道达到较高的开放概率.

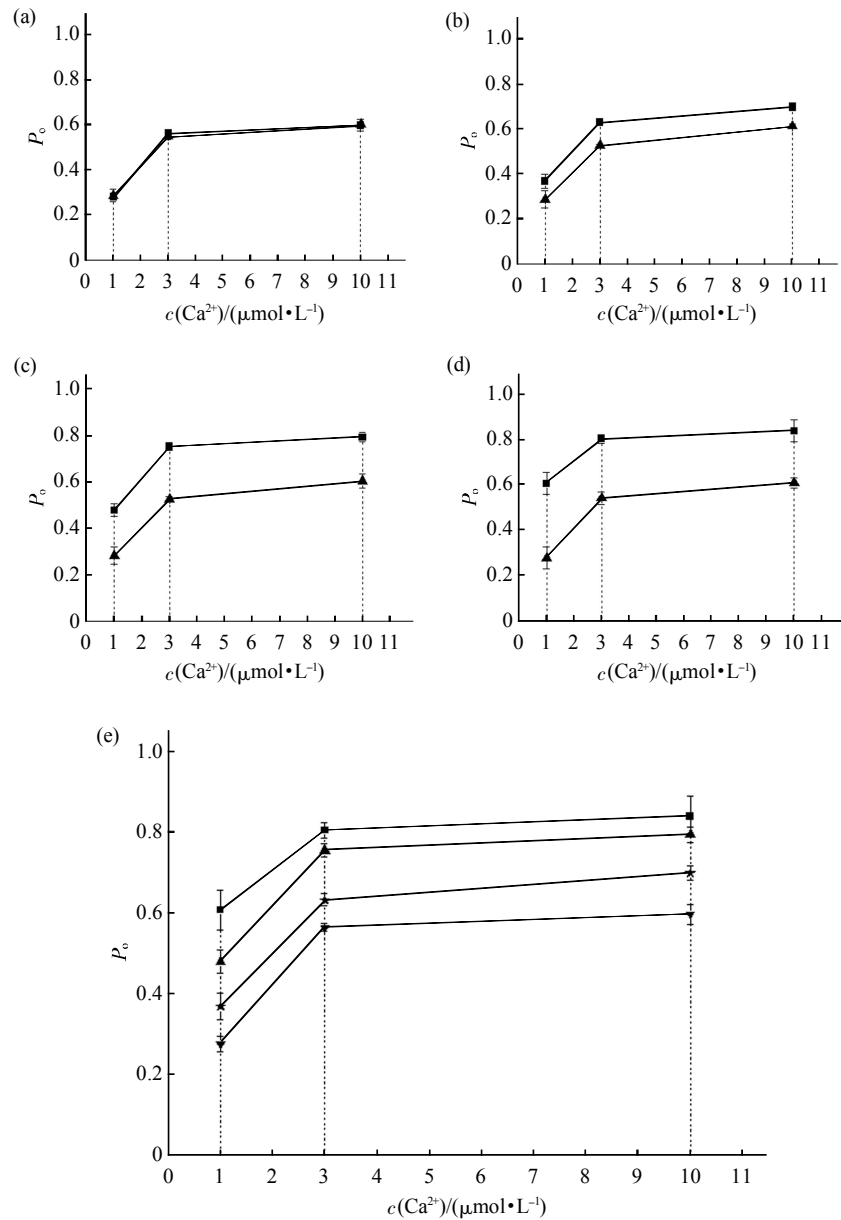


Fig. 3 Effect of exercise training on the Ca²⁺ dependence of the BK channels

Membrane potential +40 mV, *n* = 8. (a) Swimming one week and control group. ■—■: SW-1; ▲—▲: C-1. (b) Swimming two weeks and control group. ■—■: SW-2; ▲—▲: C-2. (c) Swimming three weeks and control group. ■—■: SW-3; ▲—▲: C-3. (d) Swimming four weeks and control group. ■—■: SW-4; ▲—▲: C-4. (e) Swimming from one to four weeks. ■—■: SW-4; ▲—▲: SW-3; ★—★: SW-2; ▼—▼: SW-1.

2.3 运动对 BK 通道电导的影响

BK 通道对细胞起主要调节作用的基础之一, 是其所具有的大电导特性, 这使得它比小电导钾通道(small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, SK)和中电导钾通道(intermediate conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels, IK)通道更受关注. 一般 BK 通道的电导分布在 200 ~ 350 pS 之间, 本实验中实际测得血管平滑肌细胞 BK 通道电导普遍在 250 pS 以上. 由图 4 可见, 在对大鼠进行为期 4 周的游泳

训练过程中, BK 通道的大电导特性并未发生明显变化. 在第 1 周时, 经历游泳训练的大鼠平滑肌细胞 BK 通道的电导为(260.50 ± 2.08) pS, 对照组的通道电导则为(259.22 ± 1.71) pS. 而到第 4 周时, 训练组和对照组的通道电导分别为(260.78 ± 2.03) pS 和(257.28 ± 2.36) pS. 第 2、3 周的电导情况亦与此类似, 无显著的变化幅度或趋势. 因此, 在牵张力环境下 BK 通道的大电导性质保持了稳定, 这是通道稳定调节细胞功能的基础.

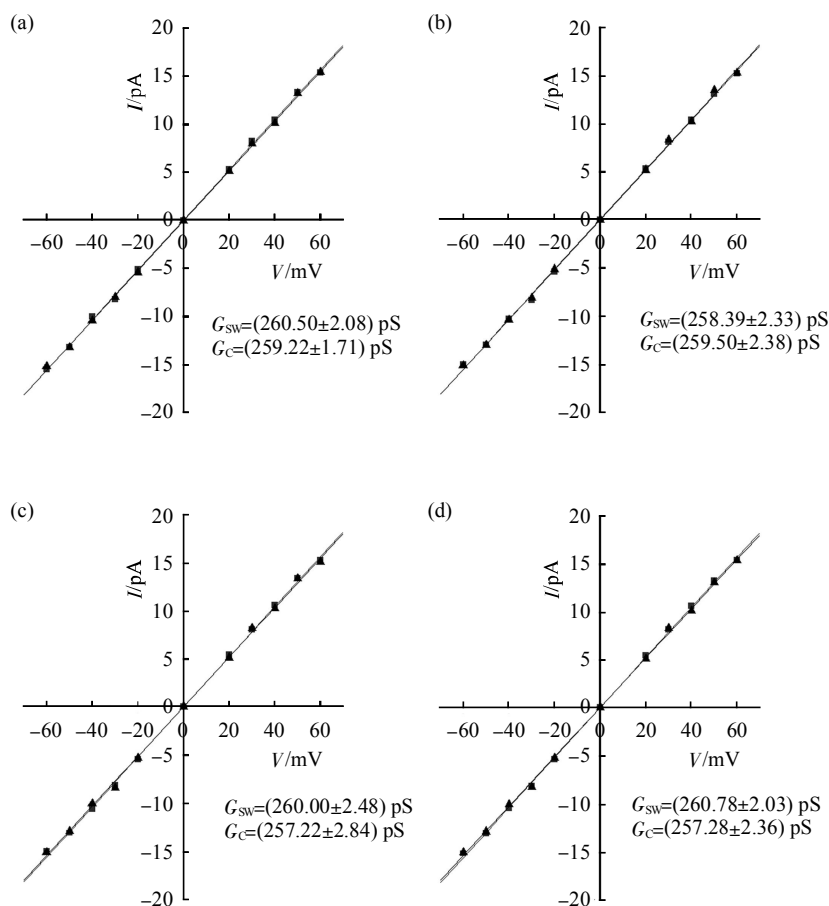


Fig. 4 Effect of exercise training on conductance of the BK channels

Bath solution contained $3 \mu\text{mol/L Ca}^{2+}$, $n=6$. (a) Swimming one week and control group. ■—■: SW-1; ▲—▲: C-1. (b) Swimming two weeks and control group. ■—■: SW-2; ▲—▲: C-2. (c) Swimming three weeks and control group. ■—■: SW-3; ▲—▲: C-3. (d) Swimming four weeks and control group. ■—■: SW-4; ▲—▲: C-4.

2.4 运动对 BK 通道单通道开放与关闭时间分布的影响

单通道开放时间是通道特性的另一个重要指标. 将 BK 通道单通道开放时间分布的平方根 - 对数图利用幂函数拟合, 可以得到单通道开放的时间常数 τ , 它是通道单次开放时间分布的极大值, 通常有 1~3 个. 图 5 中的通道开放时间常数均有两个, 其中第一个为分布最集中的典型开放时间, 以此作为组间对比标准. 按时间顺序从对照组至游泳训练 4 周组, 单通道开放时间常数依次为 (2.632±0.184) ms, (2.863±0.237) ms, (2.861±0.156) ms,

(3.198±0.132) ms* 和 (3.943±0.122) ms* (* $P < 0.05$). 同理, 在单通道关闭时间拟合所得的图 6 中, 从对照组至游泳训练 4 周组, 单通道关闭时间常数依次为 (3.659 ± 0.089) ms, (3.753 ± 0.102) ms, (2.713 ± 0.156) ms*, (2.660 ± 0.186) ms* 和 (2.193 ± 0.135) ms* (* $P < 0.05$). 由此可见, 单通道开放时间在第 3、4 周中明显延长, 而关闭时间从第 2 周起大幅度缩短. 这种单通道开闭时间性质的变化, 说明在牵张力环境下 BK 通道的门控特性有所改变, 使得通道的开放状态易于保持. 此结果与通道开放概率增大的实验结果是相符的.

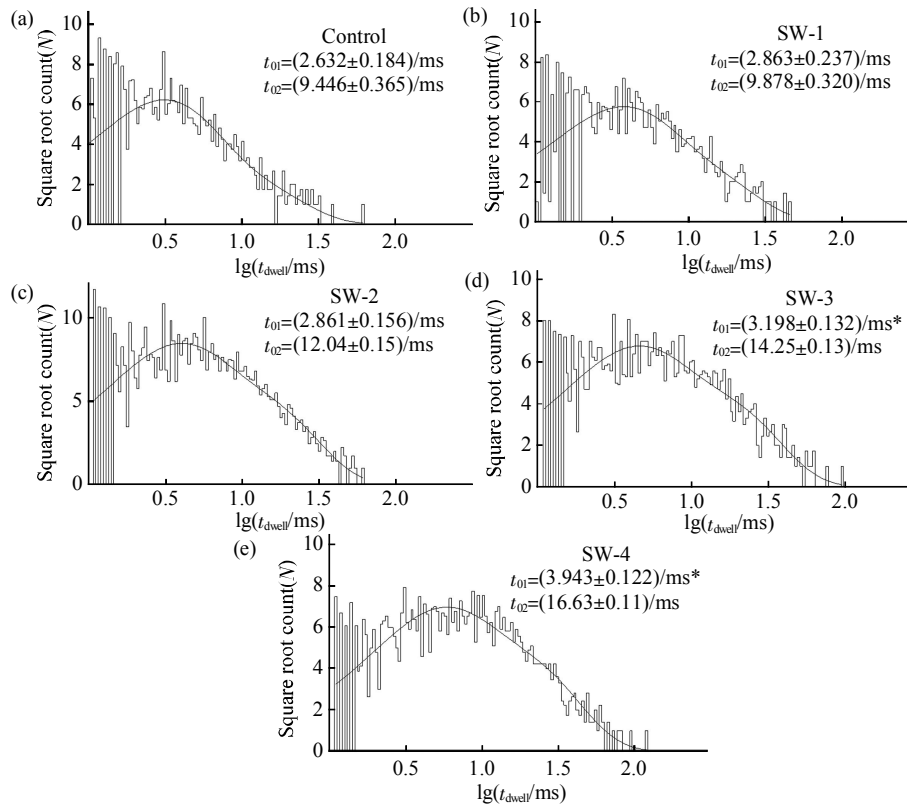


Fig. 5 Open dwell-time distributions of the BK channels in the control and exercise trained rat

Membrane potential +40 mV, bath solution contained 3 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} , $n=12$. (a) Control. (b) Swimming one week. (c) Swimming two weeks. (d) Swimming three weeks. (e) Swimming four weeks.

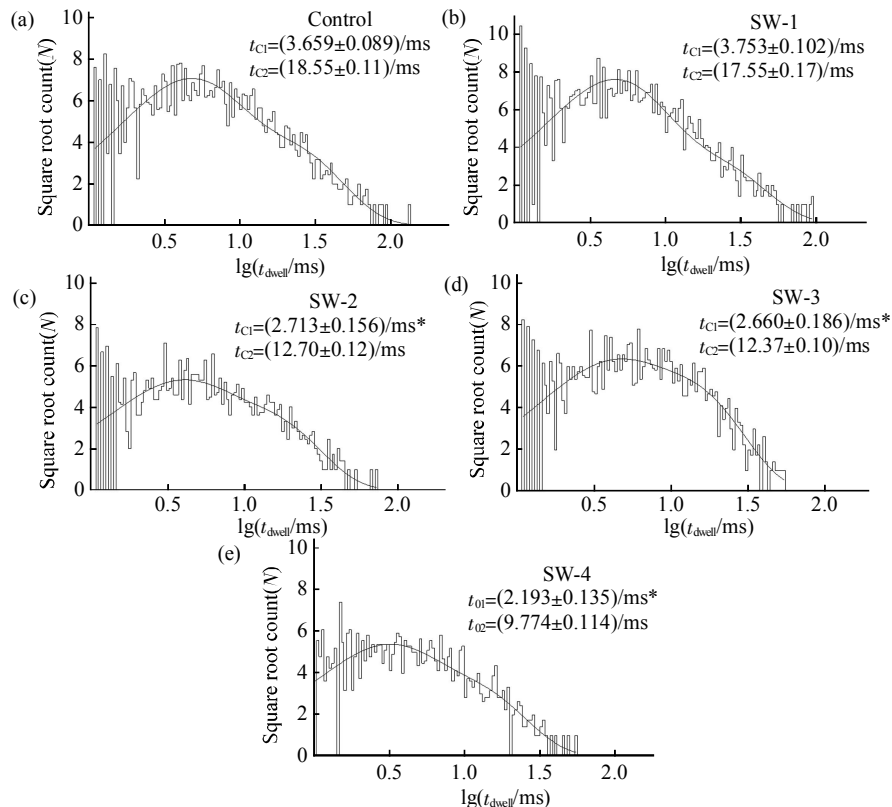


Fig. 6 Closed dwell-time distributions of the BK channels in the control and exercise trained rat

Membrane potential +40 mV, bath solution contained 3 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} , $n=9$. (a) Control. (b) Swimming one week. (c) Swimming two weeks. (d) Swimming three weeks. (e) Swimming four weeks.

3 讨 论

以上实验结果说明, 在利用游泳训练为血管平滑肌细胞创造的牵张力环境下, BK 通道在保持其大电导特性稳定的同时, 相应地改变了其门控特性, 以适应不利环境并对细胞乃至组织进行保护。具体表现为: 通道的开放概率提高; 通道依然保持了电压依赖性和钙离子依赖性, 且敏感性增强; 单通道开放时间常数增加了约 50%, 同时关闭时间常数缩短。通道开放概率的变化主要从第 2 周开始出现, 在第 4 周时变化速度趋于平缓。这说明 BK 通道的调节保护作用有适应过程, 同时也有一定限度, 当不足以抵抗持续的不利环境时, 细胞与组织会出现明显异常变化, 继而引起心血管疾病或加剧疾病的发展。

在训练导致的长期的牵张力环境下, 血管平滑肌细胞会出现异常收缩与舒张, 整个血管壁对血流的阻力发生改变, 促使血流量变化, 导致作用于血管壁的反作用力也产生变化^[7]。而此时 BK 通道基于其本身的力敏感性特点, 将对一系列环境力的改变进行响应, 自身活性升高, 表现为开放概率升高, 单通道开放时间常数增大。在牵张力作用下, 通道的钙离子依赖性和电压依赖性增强, 可以协同进行调节以维持细胞功能稳定。Horrigan 等^[8]研究发现, 钙离子内流或膜电位去极化引起钾通道开放情况的改变。膜电位去极化会引起钙离子内流导致细胞收缩, 由于膜电位远高于钾离子静息电位^[9], BK 通道通过自身的开放将释放钾离子, 促进膜电位复极化或超极化来对抗钙离子内流。牵张力环境下, 电压依赖性增强, 使得在膜电位去极化过程中, 通道打开更早。而钙离子依赖性的增强, 使得在膜电位去极化钙离子内流的过程中, 只需较低的钙离子浓度即可激活通道。由此可见, BK 通道的电压依赖性和钙离子依赖性的增强, 可以降低动脉张力, 使 BK 通道在高血压环境下对细胞乃至血管有保护作用。这一结论与 Bowles 等^[10]在阻断 BK 通道功能之后发现训练会导致冠状动脉血管内皮

静息张力增大, 而 Bolognesi 等^[11]在对 BK 通道进行过量表达之后发现血管的主动收缩受限的结果相符。

参 考 文 献

- [1] Deng T L, Yu L, Ge Y K, *et al.* Intracellular-free calcium dynamics and F-actin alteration in the formation of macrophage foam cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **338**(2): 748-756
- [2] O'Malley D, Irving A J, Harvey J. Leptin-induced dynamic changes in the actin cytoskeleton mediate the activation and synaptic clustering of BK channels. *FASEB Journal*, 2005, **19**(11): 1917-1925
- [3] Brayden J E, Nelson M T. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science*, 1992, **256**(5056): 532-535
- [4] Nelson M T, Cheng H, Rubart M, *et al.* Relaxation of arterial smooth-muscle by calcium sparks. *Science*, 1995, **270**(5236): 633-637
- [5] Nelson M T, Quayle J M. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth-muscle. *American J Physiology-Cell Physiology*, 1995, **268**(4): C799-C822
- [6] McMullen J R, Shioi T, Zhang L, *et al.* Phosphoinositide 3-kinase (p110) plays a critical role for the induction of physiological, but not pathological, cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(21): 12355-12360
- [7] Tzemos N, Lim P O, Macdonald T M. Exercise blood pressure and endothelial dysfunction in hypertension. *Int J Clin Pract*, 2009, **63**(2): 202-206
- [8] Horrigan F T, Aldrich R W. Coupling between voltage sensor activation, Ca²⁺ binding and channel opening in large conductance (BK) potassium channels. *J General Physiology*, 2002, **120** (3): 267-305
- [9] Knot H J, Nelson M T. Regulation of arterial diameter and wall [Ca²⁺] in cerebral arteries of rat by membrane potential and intravascular pressure. *J Physiol(London)*, 1998, **508**(1): 199-209
- [10] Bowles D K, Laughlin M H, Sturek M. Exercise training increases K⁺-channel contribution to regulation of coronary arterial tone. *J Appl Physiol*, 1998, **84**(4): 1225-1233
- [11] Bolognesi M, Sacerdoti D, Piva A, *et al.* Carbon monoxide-mediated activation of large-conductance calcium-activated potassium channels contributes to mesenteric vasodilatation in cirrhotic rats. *J Pharm Experi Thera*, 2007, **321**(1): 187-194

Effect of Different Intensities of Exercise on Biophysical Property of BK Channel*

XU Jian-Wen¹⁾, XIE Jing²⁾, WANG Fa²⁾, ZHAO Hu-Cheng^{2)**}

¹⁾ *The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China;*

²⁾ *Laboratory of Biomechanics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)*

Abstract We used exercise training rat as animal model, and investigated the effect of exercise training on the property of large-conductance Ca^{2+} voltage-activated K^+ (BK) channels in VSMCs using patch clamp technique. The results showed that the open probability of channels increased significantly during the second and third week of exercise training, then became stable in the fourth week. After the exercise training, the sensitivity of channels to voltage and intracellular Ca^{2+} was enhanced, and its mean opening time got longer while the mean closed time got shorter. Our results also showed that the exercise training had no effect on channel conductance. These changes in biophysical properties of BK channels after exercise training could be considered to prevent membrane depolarization and vasoconstriction.

Key words exercise training, vascular smooth muscle cell, BK channels

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00374

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(11072132, 11272184).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62785624, E-mail: zhaohc@mail.tsinghua.edu.cn

Received: September 12, 2012 Accepted: February 4, 2013