论著

文章编号:1000-5404(2006)01-0044-03

小鼠肾近曲小管上皮细胞顶侧膜钾通道的膜片钳研究

刘亚利,黄 维,高恩泉,叶本兰 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究小鼠肾脏近曲小管上皮细胞顶侧膜 K^+ 通道的生理学特性。**方法** 采用膜片钳细胞贴附式单通道记录急性分离的近曲肾小管上皮细胞顶侧膜 K^+ 通道电流。**结果** 该通道在超极化状态下表现为内向电流,斜率电导为(11.4±0.6)pS,且通道开放活动随极化程度增大而增加。在反极化状态下表现为外向电流,并具有内向整流特性。**结论** 小鼠肾脏近曲小管上皮细胞顶侧膜上存在一类低电导的 K^+ 通道,其分布广泛,可能参与钾离子转运、调节细胞体积及维持电势能的稳定。

关键词:肾脏近曲小管;钾离子通道;膜片钳

中图法分类号:R322.61;R329.24 **文献标识码**:A

Study of K^+ channels at the apical membrane of mouse renal proximal tubule cell with patch-clamp

LIU Ya-li, HUANG Wei, GAO En-quan, YE Ben-lan (Department of Physiology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the property of the K^+ channels at the apical membrane of mouse renal proximal tubule cells. **Methods** Single-channel recording of the K^+ channel currents in apical membrane of freshly isolated renal proximal tubule cells was performed using the cell-attached mode of the patch-clamp technique. **Results** This kind of potassium channel appeared to be an inward rectifier, and its limiting inward slope conductance was (11.4±0.6) pS. The channel activity increased with hyperpolarization. **Conclusion** The potassium channel with spontaneous current was observed in most of the cell-attached patches, which is thought to be involved in volume regulation, potassium recycling and stabilization of the apical potential.

Key words: renal proximal tubule; potassium channel; patch clamp

肾脏近曲小管钾离子通道在维持细胞膜电位、保持细胞体积以及维持水与电解质的重吸收和分泌等方面,均起着非常关键的作用,且近曲小管是缺氧和中毒损伤最易发生的部位[1],因此,对肾脏近曲小管钾离子通道的研究具有较重要的生理学意义。目前尚未完全了解其生理学特性,已有的研究主要是在两栖类动物和哺乳类兔、大鼠等[2,3]物种或者细胞株[4]中进行,因分离方法所限,对小鼠的研究比较少。我们对急性分离的小鼠近曲小管上皮细胞进行膜片钳技术研究,由于肾小管细胞具有极性[5],基底膜贴附培养皿,故探讨的是顶侧膜 K^+ 通道特性,为以后研究药物对近曲小管 K^+ 通道的损伤及修复建立理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

清洁级昆明小白鼠 50 只,雌雄不拘,>6 周龄,体质量 18~22 g,由第三军医大学实验动物中心提供。HEPES 为美国 Sigma 公司产品,DMEM 培养基及小牛血清为 Hyclone 公司,其余无机盐均为国产分析纯产品。

1.1.1 试剂 肾脏组织冲洗、孵育溶液(mmol/L):140 KCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 HEPES, pH 7.4。膜片钳实验中的肾小管浴液(mmol/L):140 KCl, 1 $MgCl_2$, 1 $CaCl_2$, 0.001 TTX, 0.2 $CdCl_2$, 10 HEPES, pH 7.4。电极充灌液除不含 TTX 和 $CdCl_2$ 外,其余同浴液。盐桥的制备采用高浓度钾溶液:1 mol/L KCl, 1 g/L 琼脂, pH 7.4。

1.1.2 仪器设备 微电极拉制器(PP-83,日本成茂)、膜片钳放大器(华中科大仪博生命科学仪器有限公司 PC2C)、倒置显微镜(重庆光学仪器厂)、微电极操纵器(SM-21,日本成茂)、数/模转换器(Digidata1200,美国)、Pclamp9.0 软件(美国 Axon)。

1.2 小鼠近曲小管上皮细胞的急性分离及原代培养

参照 Millar 等[6]方法加以改进。采用清洁级昆明小白鼠,常规无菌操作,脱臼处死,迅速摘取肾脏,置于冰冷的肾脏孵育液中(事先充 95% O_2 +5% CO_2 5 min)。去除包膜,取极薄皮质(<0.5 mm),剪碎并置于 80 目不锈钢网筛,研磨并以孵育液充分冲洗,网下液体分别过 100、200 目不锈钢网筛,收集 200 目网上物于 0.1% 胶原Ⅰ中 37 ℃消化 10 min,1 000 r/min 离心 10 min,弃上清,用 32% Percoll 分离液进行密度梯度离心,4 ℃,

作者简介:刘亚利(1974-),女,河南省开封市人,硕士研究生,助教,主要从事肾脏生理学方面的研究。电话:(023)68752254

收稿日期:2005-06-11;修回日期:2005-09-15

15 000 *g* 离心 30 min，小心吸取高密度层细胞[7]，取一部分细胞制成悬液用来做膜片钳，另一部分继续原代培养用于鉴定。整个过程在 20～22 ℃室温下完成。

1.3　近曲小管上皮细胞的鉴定

分别采用光镜检查，台盼蓝拒染实验鉴定细胞活性，改良 Gomori 法碱性磷酸酶染色及原代培养第 2 代细胞透射电镜鉴定细胞类型。

1.4　单通道记录

选用胞体光滑，折光性好，细胞直径为 8.5～10.5 μm 的圆形细胞[6]进行膜片钳的单通道记录，采用标准的膜片钳单通道封接技术。玻璃微电极采用外径 1.5 mm sutter instrument 玻璃微吸管，经 2 次拉制成锥度约 20°、尖端开口直径约 1 μm 的微电极，再经热抛光。电极充灌液经直径为 0.25 μm 的微孔滤膜滤过后，充灌。内灌电极液的微电极阻值为 3～8 MΩ。在倒置显微镜监视下使微电极与细胞形成高阻封接。以 gap-free 连续采样，用 pCLAMP9.0 软件包中 Clampfit 程序进行数据分析。实验在室温下（20～22 ℃）进行。

1.5　统计学处理

实验数据处理用 pCLAMP9.0 软件包中 Clampfit 程序进行。拟合采用 Gaussian 与 Exponential 方式，用 ViewResiduals 进行拟合优度检验。

2　结果

2.1　小鼠近曲小管上皮细胞的鉴定

光镜见急性分离未贴壁的细胞呈圆形，细胞直径 8.5～10.5 μm，胞体光滑，折光性强；较分散细胞贴壁后形态不一，体积增大呈梭形，镜下透明度增大而折光性减弱，7～10 d 可见融合的单层细胞呈鹅卵石样铺满瓶底；台盼蓝拒染 >95% 的细胞有活性；碱性磷酸酶染色阳性；电镜检查见面向液层的刷状缘有微绒毛形成，细胞内可见丰富的线粒体、内质网（图 1）。这些特征表明该方法分离获得的细胞为近曲小管上皮细胞。

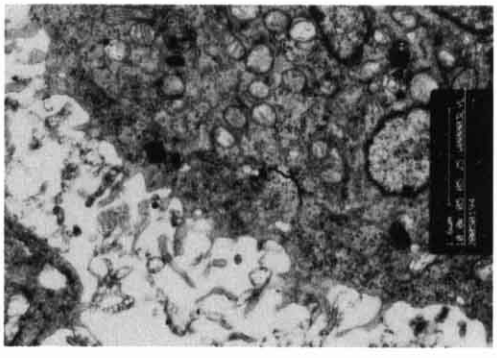


图 1　PTC 透射电镜图　（TEM ×5 200）

2.2　小鼠近曲小管上皮细胞 K^+ 通道的单通道电流幅度及电导

在所观察的 107 个封接中有 65 个观察到通道电流，阳性结果为 61%。而且，多数膜片在以 cell-attached 形式形成高阻封接后即可观察到以钾离子为载体的离子通道自发性开放活动，如图 2A，在一些无自发性通道活动的膜片中，当电极稍稍外撤（0.5～1 μm），即形成牵张状态时可激活通道开放，如图 2B。图 2 所示微电极钳制电压电极液与细胞浴液同为 140 mmol/L KCl 的对称性溶液，电极钳制电压为 +60 mV 时的观察结果。



A：自发产生的电流；B：牵张激活的单通道电流

图 2　小鼠近曲小管上皮细胞 K^+ 通道的细胞贴附式单通道电流

该钾离子通道的开放活动与钳制电压有明显的依赖关系。电极钳制电压为 0 mV 时，通道活动稀少。电流幅度在同一钳制电压下基本相同，呈时间不等的矩形方波。其幅度分布直方图呈对称的单峰状，能很好地进行正态拟合。当细胞处于钳制电压为正值（膜处于超极化状态）时，通道电流表现为内向电流。通道电流幅度随钳制电压的升高而增加。而当细胞处于钳制电压为负值时，通道电流表现为外向电流，单电流幅值的增加与钳制电压并非成正比，而是表现出明显的内向整流特性。在钳制电压为 −80 ～ +60 mV 的范围内，以电压值（mV）为横轴，相应的电流幅度（pA）为纵轴作图，可得一近似直线，直线的斜率即为电导值，对 7 例细胞的通道电流进行统计分析得到该通道电导值为（11.4 ± 0.6）pS（图 3）。

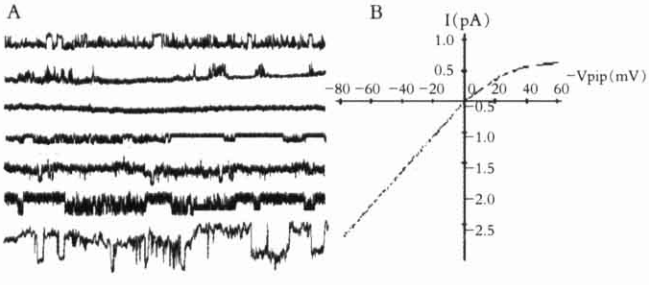


图 3　细胞贴附式记录下小鼠近曲小管上皮细胞 K^+ 通道的各种钳制电压下的电流图（A），通道的电流-电压关系曲线（B）

2.3　通道的动力学特性

2.3.1　通道的开放时间　　通道的开放时间长短不一，短的小于 1 ms，长的为几十毫秒，开放时间分布直方图可以进行指数拟合。我们对 20 例膜电位 −40 mV 时的膜片数据进行分析，开放时间常数的均值为（1.43 ± 0.03）ms。

2.3.2　通道的关闭时间　　通道的关闭时间差异也很大，有短于 1 ms 的闪烁样关闭，也有长达数百毫秒的长时程关闭。通道的关闭时间可以使用二次指数拟合，说明通道的关闭时间呈现两种状态：快速的短暂关闭和长时程的通道活动静息期。对 20 例膜片进行动力学分析表明，在膜电位为 −40 mV 时，双指数拟合的两个时间常数平均值为（0.64 ± 0.04）ms 和（1.81 ± 0.18）ms。

2.3.3　通道的开放概率及状态　　通道的开放概率是指在某一钳制电压下，通道的总开放时间占通道持续去极化或超极化过程的比值。在膜电位为 +60 mV 时，通道的平均开放概率为

(0.38 ±0.09)。通道的开放常常被短暂的关闭所打断,呈猝发样开放(burst)。这种开放有时又可以呈现簇状(cluster),即彼此相隔一定的时间间隔的连续数个 burst 样开放串。在两串簇状开放之间有较长时间的关闭。在簇状开放期间通道的开放概率比较大,通道在大部分时间是处于开放状态。在本实验中这两种情况并存,无明显的差异。

3 讨论

本实验取极薄皮质片经两次筛网过滤以除去肾小球,剩下基本为近曲小管和远曲小管,经 Percoll 分离液提纯后高密度带 95% 以上为近曲小管上皮细胞[7],应用光镜观察,细胞直径测量,台盼蓝拒染实验、碱性磷酸酶染色及透射电镜检查鉴定此方法分离出的细胞为近曲小管上皮细胞,活性较好,效果可靠。

本实验在急性分离的小鼠近曲肾小管上皮细胞顶侧膜记录到的通道电流,在钳制电压一定时,电流幅度均一,呈均匀正态分布,是单通道电流。因为在浴液中先加入了 TTX 和 $CdCl_2$,分别阻断了 Na^+ 通道和 Ca^{2+} 通道,所以记录的电流不是 Na^+ 通道和 Ca^{2+} 通道。而采用细胞贴附式记录时很难记录到 Cl^- 通道,所以亦不可能是 Cl^- 通道电流。表明本实验所记录到的单通道电流应为 K^+ 通道电流。

随着膜片钳实验技术的广泛应用,人们对肾脏离子通道进行了大量研究,对肾小管钾离子通道活动的特点及其功能均有一定的了解。肾脏近曲小管是肾小球滤过液中电解质、水、葡萄糖、尿素和氨基酸等主要的重吸收部位,也是很多临床常用药物的急、慢性损伤部位。目前在肾脏钾离子通道中,对髓襻升支粗段(TAL)细胞和皮质集合管(CCD)基底膜和顶侧膜钾通道研究较多[8],研究多集中在两栖类[9]和兔、大鼠等哺乳动物[2,3],因分离方法所限,对小鼠的研究比较少。但迄今为止转基因动物只在小鼠中得到成功应用,所以在肾脏近曲小管钾离子通道的纵向、深入研究中小鼠才是最合适的物种。

我们参照文献资料,对小鼠肾脏近曲小管上皮细胞采用急性分离方法,并应用 Percoll 分离液进一步纯化,获得了大量大小一致、活性良好的细胞,由于肾小管上皮细胞具有极性,记录过程中基底膜贴附灌流槽,所以记录的是顶侧膜钾离子通道,初步探讨了近曲小管顶侧膜钾离子通道活动的特点,但其详细的生理学特性及其离子通道活动的调控机制尚需进一步研究。

在实验所记录的膜片中有 61% 的膜片观察到钾离子通道电流,表明该通道在近曲小管细胞顶侧膜上分布密度较高。本实验所得结果与同部位的其他实验研究[2]相比电导值不尽相同,电压依从性是一致的,其中可能是物种的差异所致。该离子通道可被牵张激活的性质与文献[8]报道一致,但该钾离子通道对其他阳离子的选择通透性如何,文中未作进一步探讨。

肾小管钾离子通道的生理功能主要包括有:维持肾小管细胞内负电位、调节肾小管细胞体积、维持钾离子在小管细胞顶侧膜与基侧膜间循环、分泌钾[10]。而不同类型的通道所起的作用不尽相同,大电导钾离子通道主要是维持小管细胞顶端膜电位及调节细胞体积,中电导钾离子通道除此两项作用外还参与钾离子的泵-漏耦联,小电导钾离子通道则进行钾离子分泌和钾再循环。本实验中记录的近曲小管细胞顶侧膜钾离子通道从电导值上看,属于文献所述的小电导钾离子通道,由于顶侧膜上该类钾离子通道具有牵张敏感性,可以推测:当肾小管体积增大时,细胞膜张力增加,顶侧膜上钾离子通道开放加强,随着钾离子外流增多,氯离子及水向细胞外转运增加,细胞体积减小。因此,顶侧膜上钾离子通道活动也可能参与小管细胞体积的调节,对此尚有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 林茂樟. 临床肾脏生理学[M]. 北京:人民军医出版社, 2004: 55-56.

[2] NOULIN J F, BROCHIERO E, LAPOINTE J Y, *et al*. Two types of K^+ channels at the basolateral membrane of proximal tubule: inhibitory effect of taurine[J]. Am J Physiol, 1999, 277(2 Pt 2): 290-297.

[3] SUZUKI Y, YASUOKA Y, SHIMOHAMA T, *et al*. Expression of the K^+ channel Kir7.1 in the developing rat kidney: role in K^+ excretion [J]. Kidney International, 2003, 63(3): 969-975.

[4] NAKAMWA K, HIRANO J, KUBOKAWA M. Regulation of an inwardly rectifying K^+ channel by nitric oxide in cultured human proximal tubule cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 287(3): F411-F417.

[5] MAUERER U R, BOULPAEP E L, SEGAL A S, *et al*. Properties of an inwardly rectifying ATP-sensitive K^+ channel in the basolateral membrane of renal proximal tubule[J]. J Gen Physiol, 1998, 111(1): 139-160.

[6] MILLAR I D, HARTLEY J A, HAIGH C, *et al*. Volume regulation is defective in renal proximal tubule cells isolated from KCNE1 knockout mice[J]. Exp Physiol, 2004, 89(2): 173-180.

[7] LAVERTY G, MCWILLIAMS C, SHELDON A, *et al*. PTH stimulates a Cl^--dependent and EIPA-sensitive current in chick proximal tubule cells in culture[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(5): F987-F995.

[8] WANG W, HEBERT S C, GIEBISCH G. Renal K^+ channels: structure and function[J]. Annu Rev Physiol, 1997, 59: 413-436.

[9] ROBERSON L, HUNTER M. An intracellular ATP-activated, calcium-permeable conductance on the basolateral membrane of single renal proximal tubule cells isolated from Rana temporaria[J]. J Physiol, 2000, 523 pt 2: 301-311.

[10] 叶本兰. 肾脏钾离子通道的研究进展[J]. 国外医学:泌尿系统分册, 2001, 21(1): 45-47.

(编辑 龙 亮)