论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2112-04

电压门控性钾通道亚型 Kv2.1 在低氧性肺动脉高压形成和恢复中的作用

徐贤华,彭华生,胡 猛,肖欣荣,王万华,何晓英 (成都军区总医院干部病房,成都 610083)

摘 要:目的 研究电压门控性钾通道亚型 Kv2.1 基因表达变化在大鼠低氧性肺动脉高压形成以及恢复中的作用。**方法** 32 只雄性 SD 大鼠均分为正常对照组、高原慢性低压低氧组(CH 组)、二氯醋酸钠(DCA)治疗组(CH + DCA 组)和高原低氧返回平原恢复 7 d 组(CHR_7组)。正常对照组在常压常氧平原条件下喂养,其余各组在模拟高原 5 000 m 低压氧舱内喂养 21 d,动物模型建成后用闭式胸腔法测平均肺动脉压(mPAP),荧光定量 PCR 法检测 4 组大鼠肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs)的 Kv2.1 mRNA 表达;免疫组织化学方法检测大鼠 PASMCs Kv2.1 的表达;图像分析技术检测肺小动脉形态改变及 Kv2.1 表达强度变化;Western blot 法检测肺动脉平滑肌细胞 Kv2.1 蛋白表达。**结果** 模拟高原 5 000 m 缺氧 21 d 后,与正常对照组相比,CH 组 Kv2.1 mRNA 和蛋白表达明显下降,免疫组化显示 PASMCs Kv2.1 表达的平均光密度值(mIOD)减少,而 mPAP 明显增高,肺小动脉管壁增厚,管腔狭窄,肺血管重构明显。与 CH 组相比,DCA + CH 组和 CHR_7组 Kv2.1 mRNA 和蛋白则明显恢复表达,PASMCs Kv2.1 表达的 mIOD 增加,mPAP 下降,血管重构减弱。**结论** Kv2.1 基因表达变化与高原低氧性肺动脉高压变化存在负相关性,表明 Kv2.1 在低氧性肺动脉高压的形成和恢复中可能起着一定的作用。

关键词:低氧;肺动脉高压;基因表达;重构;恢复;Kv2.1

中图法分类号:R329.27;R339.54;R543.202 **文献标识码**:A

Role of voltage-gated K^+ channel Kv2.1 in development and regression of hypoxic pulmonary artery hypertension in rats

XU Xian-hua, PENG Hua-sheng, HU Meng, XIAO Xin-rong, WANG Wan-hua, HE Xiao-ying (Department of Geratology, General Hospital of Chengdu Military, Chengdu 610083, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of the expression of voltage-gated K^+ channel Kv2.1 in the development and regression of pulmonary arterial hypertension (PAH) in hypobaria and hypoxia rats. **Methods** Totally 32 adult male Sprague-Dawley rats (200 to 250 g) were randomly and equally divided into 4 groups, normal group (N group), chronic hypoxia group (CH group), Dichloroacetate (DCA, 70 mg · kg^{-1} · d^{-1}, introgastrically) treated group (CH + DCA group), and chronic hypoxia return to normal conditions for 7 d group (CHR_7 group). For the rats of the CH, CH + DCA and CHR_7 groups, 5 000 meter high altitude circumstance was simulated by exposure rats in a hypobaric and hypoxia chamber for 21 d. Rats in N group were fed in normal air pressure and PO_2 conditions. The animals of N, CH and CH + DCA groups were sacrificed for mPAP measurement and tissue harvest at day 21. The mPAP measurement and tissue harvest of CHR_7 group were performed after the rats returned to normal conditions for 7 d. Real time PCR, immunohistochemical staining and Western blot analysis were carried out to detect the Kv2.1 expression in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs). **Results** Compared with the rats in N group, the mRNA and protein expressions of Kv2.1 in the PASMCs in CH rats were deceased but mPAP were increased significantly, and the pulmonary artery wall were thickened significantly. However, compared with the CH rats, the Kv2.1 mRNA and protein expressions of the CH + DCA group and CHR_7 group were restored and mPAP were decreased, and the pulmonary artery wall thicken was slightly. **Conclusion** The expression of Kv2.1 is negatively correlated with the chronic hypoxia hypertension, suggesting that Kv2.1 may play an important role in the development and regression of PAH.

Key words: hypoxia; pulmonary artery hypertension; gene expression; remodeling; regression; Kv2.1

低氧可造成肺小动脉痉挛,肌型小动脉平滑肌层增厚,增加肺循环阻力,形成肺动脉高压(pulmonary artery hypertension,PAH),长期肺动脉压力升高将增加右心负荷、右心室重构而引起肺源性心脏病,严重者引起右心衰竭[1]。较多研究认为,急性或慢性低氧可引

作者简介:徐贤华,男,重庆市人,苗族,硕士研究生,主治医师,主要从事慢性阻塞性肺病、肺动脉高压方面的研究。电话:(028)86570135,E-mail:xxhlxli@sina.com

通信作者:肖欣荣,电话:(028)86570405,E-mail:xiaoxinrong1963@yahoo.com.cn

收稿日期:2009-05-05;修回日期:2009-06-24

起 Kv2.1 活性降低、肺动脉压升高[2,3],同时观察到 Kv2.1 活性和基因表达增高,肺动脉重构减弱,肺动脉压下降[4],因此认为 Kv2.1 基因表达变化在低氧性肺动脉高压的形成中可能起着非常重要作用。有学者发现二氯醋酸钠(Dichloroacetate, DCA)可以激活线粒体丙酮酸脱氢酶复合体活性,而丙酮酸脱氢酶复合体是决定进入三羧酸循环的关键-氧化脱羧反应,其活性增强可以促进糖的有氧代谢,为机体氧化磷酸化反应提供 ATP、NADH + H、FDAH2[5]。后来发现上调常压低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉平滑肌细胞 Kv2.1 表达,可以降低肺动脉压[4]。进入高原环境 72 h 即可见有明显肺动脉压升高[6]。本研究模拟低压低氧建立高原慢性低压低氧性肺动脉高压动物模型,以 DCA 干预和改善大气压以及氧浓度恢复肺动脉平滑肌细胞 Kv2.1 表达,研究 Kv2.1 在肺动脉高压形成以及恢复中的作用。

1　材料与方法

1.1　动物分组与处理

SD 雄性大鼠 32 只(购于第三军医大学实验动物中心),体质量 200 ~ 250 g,分为 4 组:①正常对照组;②高原慢性低氧组(CH 组);③因 DCA 具有上调常压低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉平滑肌细胞 Kv2.1 表达作用[4]。我们设立以 DCA 干预上调大鼠肺动脉平滑肌细胞 Kv2.1 基因表达(CH + DCA)组;④为了模拟从高原返回平原一段时间的变化,设立高原低氧返回平原 7 d 组(CHR_7),每组 8 只。正常对照组置于常氧常压条件下喂养21 d,CH 组和 CH + DCA 组置于低压氧舱(第三军医大学高原军事医学系低压氧舱室)模拟海拔 5 000 m 21 d, 23 h/d(放回平原 1 h 打扫清洁及喂食),二氯醋酸钠(Dichloroacetate, DCA,Sigma 公司)10 g 溶于 500 ml 生理盐水中配成 20 mg/ml 浓度的溶液,将 CH + DCA 组大鼠按 70 mg · kg^{-1} · d^{-1}灌胃,CH 组、正常对照组、CHR_7组根据体质量以同等体积的生理盐水灌胃。

1.2　肺动脉压的测定

正常对照组和 CHR_7组大鼠在常压常氧条件下测平均肺动脉压(mPAP)和取肺组织,CH 组和 CH + DCA 组均在模拟海拔 4 000 m 的低压氧舱内测肺动脉和取组织。以 10% 氨基甲酸乙酯 10 ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠后置于动物手术平台上,分离右颈总静脉插管至肺动脉干,用八道生理记录取仪(Powerlab/8sp,AD Instruments Pty Ltd. Australia)测肺动脉压,后分离左侧颈总动脉,测定左心室压(SBP)。

1.3　标本取材处理

测完肺动脉压和左心室压后,立即放血处死大鼠,取右上全肺置入 4% 中性甲醛液中固定,常规制成 HE 切片。以 IMAGE-PRO Plus 6.0 在 HE 染色切片上分别测量肺小动脉(直径 50 ~ 150 μm)的外径、管壁厚度(WT)、管壁面积(WA)、血管总面积(TA),计算管壁厚度占外径的百分比(WT%)和管壁面积占血管总面积的百分比(WA%)。其余部份肺置于冰上,在体视显微镜下分离肺动脉平滑肌细胞。

取心脏沿房室间沟剪去心房、主动脉和肺动脉,再沿前后室间沟将右心室游离壁分离,剖开心室和室间隔,用滤纸吸干,将右心室游离壁和左心室 + 室间隔并分别称重,以右心室/(左心室 + 室间隔,RV/LV + S)比率反映右心室肥厚情况。

1.4　实时荧光定量 PCR 法检测 Kv2.1 mRNA 的表达

取分离的肺动脉平滑肌细胞,采用 Trizol 试剂(大连 TaKaRa 生物技术公司)提取总 RNA,取 5 μl 总 RNA 逆转录合成cDNA,-20 ℃保存备用。采用 RT-PCR 法测定 Kv2.1 mRNA 相对量。引物(TaKaRa 公司合成)序列为(Genbank: KCNB1, NM013186):上游 5′-ACACGGGAGCACTAGGGATCAG-3′,下游 5′-CTCAGTGGCAGCAAGCCAAG-3′,取正常对照组作参考。反应体系为 30 μl,共 45 个循环。对 PCR 反应过程中的每一个循环阈值实时检测,测定条样品的循环阈值 Ct,并与标准拟合直线进行比较得出拷贝数,代表反应模板产物。

1.5　免疫组织化学法测定肺动脉平滑肌 Kv2.1

肺组织经中性甲醛固定、石蜡包埋、制成 4 μm 切片,切片经脱蜡至水,枸橼酸钠缓冲液微波处理 15 min 行抗原修复后,加 1∶100 稀释的山羊多克隆抗体(Santa Cruz 公司),4 ℃过夜,生物素标记二抗(中杉公司 PV-6003),二甲基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染。肺动脉平滑肌显黄色为阳性,以 IMAGE-PRO Plus 6.0 测量各肺动脉 Kv 2.1 阳性染色相对的平均光密度值(mean integrated optical density,mIOD)。

1.6　Western blot 法检测 Kv2.1 蛋白表达

将分离的肺动脉平滑肌组织以提取总蛋白,将蛋白调整到 2 mg/ml;SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后半干电泳仪 400 mA 转膜 60 min。PVDF 膜经封闭液(5% 脱脂奶粉)封闭 90 min 后,加 1∶200 稀释的 Kv2.1 单克隆抗体过夜,TBST 洗膜后,室温下与 HRP 标记二抗孵育 90 min,洗膜,化学发光显色,以 GAPDH 作内参。

1.7　统计学分析

采用 SPSS 13.0,分别对正常对照组、CH 组、CH + DCA 组和正常对照组、CH 组、CHR_7 3 组间差异比较采用方差分析,两组间差异比较采用 q 检验。

2　结果

2.1　各组大鼠平均肺动脉压与右室肥厚指数的变化

从表 1、图 1 可见,与正常对照组比较,CH 组大鼠平均肺动脉明显升高,CH + DCA 组则明显降低($P < 0.01$)。CH 组大鼠 RV/LV + S 较正常对照组明显升高($P < 0.01$),而 CH + DCA 和 HAR_7组则明显降低($P < 0.01$)。CH 组大鼠肺小动脉管壁比正常对照组显著增厚,管腔狭窄,WT% 和 WA% 明显上升,表现为肺血管重构($P < 0.01$);与 CH 组比较,DCA 干预组肺血管壁增厚情况不明显,重构明显改善, WT% 和 WA% 明显下降($P < 0.01$),CHR_7组大鼠肺血管重构开始恢复,平均肺动脉压下降,WT% 和 WA% 下降($P < 0.01$)。

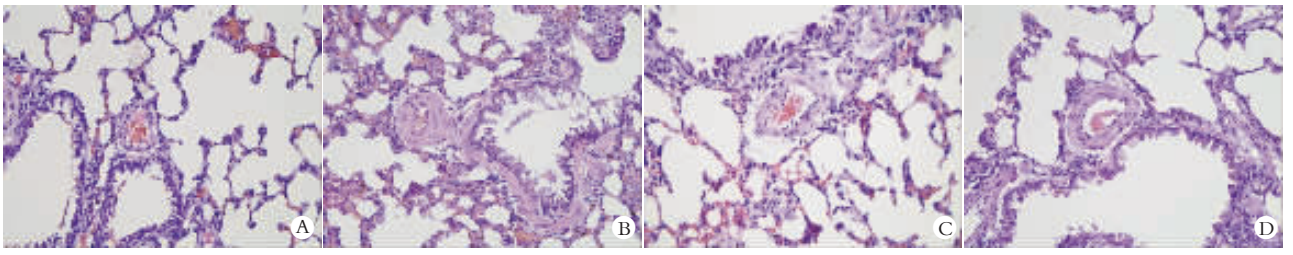
2.2　各组间 Kv2.1 mRNA 表达变化

正常对照组大鼠肺动脉平滑肌中 Kv2.1 mRNA 表达较强($P < 0.01$),CH 组明显下调,表达较弱($P < 0.01$),CH + DCA 组则明显好于缺氧组,基本恢复至正常水平($P < 0.01$),CHR_7组有一定程度的恢复(图 2)。

表1　各组大鼠肺小动脉各项指标的变化（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

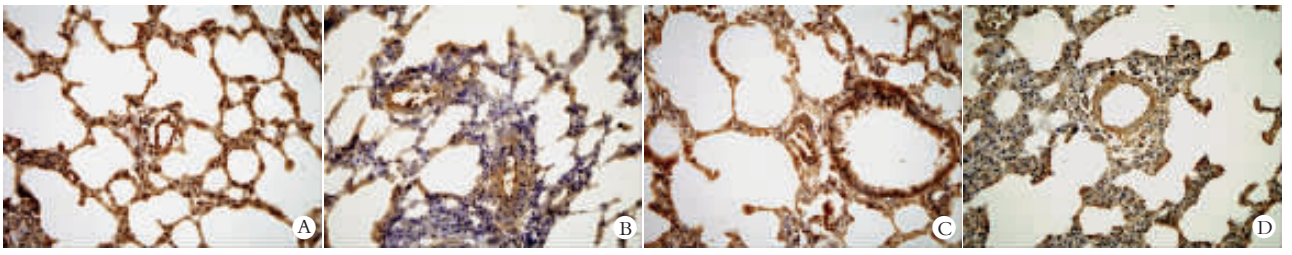
组别	mPAP(mmHg)	RV/LV+S(%)	WT(μm)	WT%	WA(μm²)	WA%	Kv2.1(mIOD)
正常对照组	13.18±0.98	23.64±1.32	8.29±0.52	12.77±0.70	1 212±88	44.52±2.11	0.339±0.015
CH 组	30.35±1.13[a]	38.33±2.00[a]	31.47±4.21[a]	32.99±4.51[a]	3 047±200[a]	89.52±6.71[a]	0.120±0.009[a]
CH+DCA 组	18.37±0.69[b]	30.25±1.75[b]	16.44±3.68[b]	17.22±1.33[b]	1 890±106[b]	60.49±3.69[b]	0.324±0.017[b]
CHR_7组	21.13±1.09[b]	33.62±1.69[b]	19.22±3.72[b]	24.19±2.08[b]	1 987±138[b]	66.28±3.97[b]	0.241±0.014[b]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与 CH 组比较



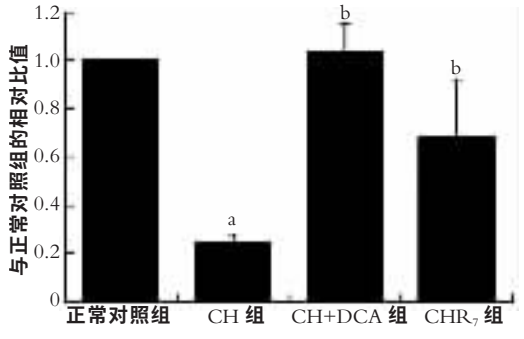
A：正常对照组；B：CH 组；C：CH+DCA 组；D：CHR_7组

图1　各组大鼠肺小动脉管壁平滑肌变化　（HE×400）



A：正常对照组　Kv2.1 表达正常；B：CH 组　Kv2.1 表达下降；C：CH+DCA 组　Kv2.1 表达恢复；D：CHR_7组　Kv2.1 表达部份恢复

图3　各组大鼠肺动脉平滑肌细胞 Kv2.1 的表达　（SABC×400）

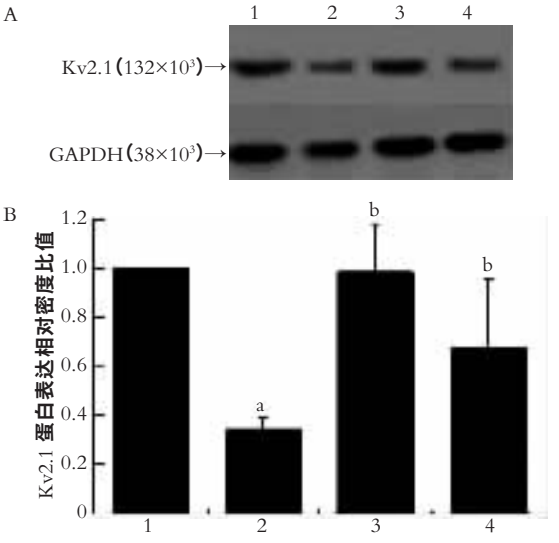


a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与 CH 组比较

图2　各组大鼠肺动脉平滑肌 Kv2.1 mRNA 变化

2.3　各组大鼠肺动脉平滑肌细胞 Kv2.1 蛋白表达的变化

光镜下免疫组化结果显示，正常对照组大鼠肺小动脉管壁阳性染色较强，CH 组大鼠肺动脉平滑肌则染色较弱，CH+DCA 组阳性染色较强，CHR_7组有一定程度的恢复（图3）。平均光密度值（mIOD）分析见表1。Western blot 结果表明，正常对照组蛋白表达丰富，CH 组明显下调（$P<0.01$），CH+DCA 组和 CHR_7 组蛋白表达明显上调（$P<0.01$），与 mRNA 相似（图4）。



1：正常对照组；2：CH 组；3：CH+DCA 组；4：CHR_7 组；a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b：$P<0.01$，与 CH 组比较

A：Western blot 结果；B：定量分析结果

图4　各组肺动脉平滑肌细胞 Kv2.1 蛋白的表达

3　讨论

电压门控性钾通道包括 α 型和 β 型家族成员，在

肺动脉平滑肌细胞上,α 型中的 Kv1.2、Kv1.5、Kv2.1、Kv3.1、Kv9.3 亚型都是氧敏感性钾通道,急性或慢性低氧均可引起肺动脉平滑肌细胞 Kv 活性不同程度的下降,同时低氧抑制氧敏感性 Kv 基因表达[2,3]。Kv 活性下降引起细胞膜去极化,细胞外钙内流使细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,细胞内 Ca^{2+} 浓度增加会引起平滑肌细胞收缩和增殖[7],从而引起肺循环阻力增加,肺动脉压升高。其中 Kv2.1 被证实在调节细胞静息膜电位中起着十分重要的作用[8]。Thébaud 等[9]发现,以 Kv 特导性阻断剂可以使兔的动脉导管收缩,在转移 Kv2.1 基因后的兔动脉导管则能舒张,因此认为 Kv2.1 基因上调有舒张血管平滑肌的作用。同时发现以野百合碱复制大鼠肺动脉高压模型,肺血管重构明显,Kv2.1 基因表达下调[10],因此认为 Kv2.1 无论是在常压低氧性还是在野百合碱诱导的肺动脉高压形成中均起着十分重的作用。本次实验发现,与正常对照组相比,CH 组 Kv2.1 mRNA 和蛋白表达明显下降,同时观察到 mPAP 明显升高,CH 组肺动脉平滑肌细胞增殖明显,血管壁增厚、管腔狭窄,WT% 和 AT% 均明显高于正常对照组,发生了肺小动脉重构。与 Platoshyn 等[2]在常压低氧肺动脉高压模型结果比较,低压低氧条件下,Kv2.1 基因表达下降更加明显,说明 Kv2.1 在高原低压低氧性肺动脉高压中同样起着非常重要的作用。

本次实验中,DCA 干预组大鼠 Kv2.1 mRNA 上调,免疫组化示 Kv2.1 表达的平均光密度明显增加,Western blot 结果显示蛋白表达明显恢复。同时观察到肺动脉平滑细胞增殖明显减弱,管腔明显增大,WT% 和 AT% 明显低于 CH 组,说明 DCA 降低了肺动脉压和部份抑制了肺血管重构。返回平原 7 d 后大鼠 mPAP 有一定程度下降,Kv2.1mRNA 开始上升,免疫组化和蛋白电泳显示该组大鼠肺动脉平滑肌上 Kv2.1 蛋白表达有一定程度的恢复,且肺血管重构开始恢复,管壁开始变薄,管腔变大。用两种不同方法恢复 Kv2.1 表达均能降低肺动脉压,因此上调 Kv2.1 基因表达在肺动脉高压的恢复中可能同样起着重要的作用,随着肺动脉平滑肌细胞 Kv2.1 基因表达上调,肺动脉重构得到部份抑制,mPAP 下降。

肺血管重构是低氧性肺动脉高压持续发展的病理基础,同时也是肺动脉高压药物疗效不佳的原因之一[1],发生肺动脉重构的原因一般认为是肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡失衡[10]。我们所建高原低氧性肺动脉高压大鼠模型可见肺动脉重构明显,管腔变窄而肺循环阻力升高,符合既往的研究结果。Pal 等[11]发现 Kv2.1 的活性增强,可以增加神经细胞凋亡的易感性,同时发现中国仓鼠卵细胞并无内源性 Kv2.1,在转染 Kv2.1 基因后明显表现出凋亡易感性。本实验中发现,以 DCA 干预和返回正常条件 7 d 均可以增加 Kv2.1 基因表达,同时伴肺血管重构减弱,因此认为 Kv2.1 的活性增加会增强肺动脉平滑肌细胞凋亡,抑制其增殖,维持肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡平衡,从而抑制肺血管重建,降低肺动脉压。本实验发现 DCA 干预组 Kv2.1 mRNA 和蛋白在肺动脉平滑肌的表达几乎完全恢复,而肺动脉压仅是部份下降和肺动脉重构得到部份抑制,可能 DCA 对 Kv 通道的其他亚型并未完全恢复,或对有较强收缩血管作用的内皮素-1(ET-1)并无影响所致。

综上所述,慢性低压低氧可抑制 Kv2.1 的表达和引起肺血管重构,恢复 Kv2.1 表达可以部份抑制肺血管重构,降压肺动脉压。Kv2.1 基因表达的变化可能在低氧性肺动脉高压的形成和恢复中起着十分重要的作用,DCA 干预和返回平原恢复一段时间均可降压低肺动脉压。

参考文献:

[1] 王关嵩,钱桂生. 低氧肺血管重构的分子机制研究概况及展望[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(1): 3-5.

[2] Platoshyn O, Yu Y, Golovina V A, *et al*. Chronic hypoxia decrease Kv channel expression and function in pulmonary artery myocytes[J]. Am J Physiol Lung Mol Physiol, 2001, 280(4): L801-L812.

[3] Whitman E M, Pisarcik S, Luke T, *et al*. Endothelin-l mediates hypoxia-induced inhibition of voltage-gated K^+ channel expression in pulmonary arterial myocytes[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 294(2): L309-L318.

[4] Michelakis E D, McMurtry M S, Wu X C, *et al*. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats, role of increased expression and activity of Voltage-gated potassium channels[J]. Circulation, 2002, 105(2): 244-250.

[5] Stacpoole P W, Nagaraja N V, Hutson A D. Efficacy of dichloroacetate as a lactate-lowering drug[J]. J Clin Pharmacol, 2003, 43(7): 683-691.

[6] 陈　有,高钰琪,李素芝,等. 高原肺水肿动物模型的初步研究[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(11): 1176-1177.

[7] Platoshyn O, Yu Y, Ko E A, *et al*. Heterogeneity of hypoxia-mediated decrease in I(K(v)) and increase in [Ca^{2+}](cyt) in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(2): L402-L416.

[8] Archer S L, Souil E, Dinh-Xuan A T, *et al*. Molecular identification of the role of volgate-gated K + channels, Kv1.5 and Kv2.1, in hypoxia pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes[J]. J Clin Invest, 1998, 101(11): 2319-2330.

[9] Thébaud B, Michelakis E D, Wu X C, *et al*. Oxygen-sensitive Kv channel gene transfer confers oxygen responsiveness to preterm rabbit and remodeled human ductus arteriosus: implications for infants with Patent ductus arteriosus[J]. Circulation, 2004, 110(11): 1372-1379.

[10] McMurtry M S, Bonnet S, Wu X C, *et al*. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis[J]. Cirs Res, 2004, 95(8): 830-840.

[11] Pal S, Hartnett K A, Nerbonne J M, *et al*. Mediation of neuronal apoptosis by Kv2.1-encoded potassium channels[J]. J Neurosci, 2003, 23(12): 4798-4802.

(编辑　吴培红)