DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.016

论著

文章编号:1000-5404(2003)05-0410-03

大鼠肾脏近曲小管细胞基侧膜钾离子通道特性的离体研究

叶本兰[1],舒崇湘[2],代静澜[1],侯卫坪[1],万子兵[1] (第三军医大学:[1]基础医学部生理学教研室,重庆 400038;[2]附属大坪医院野战外科研究所放疗科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨大鼠肾脏近曲小管细胞基侧膜钾离子通道生理学特性及其意义。方法 在体视显微镜直视下,从大鼠肾脏冠状切片中机械分离出肾小管,采用膜片钳单通道实验技术,探讨大鼠近曲小管基侧膜钾离子通道的生理学特性。结果 大鼠近曲小管细胞基侧膜上容易记录到一类低电导、有内向整流性的钾离子通道,该通道在多数膜片(81%)中自发性开放,无自发性开放的通道在压力增加时可被激活。在inside-out膜片,通道活动出现run-down现象。通道开放时间常数分别为0.524 ms与5.087 ms,通道关闭的两个时间常数分别为1.029 ms与16.500 ms。结论 大鼠近曲小管细胞基侧膜广泛分布一类低电导的钾离子通道,具有牵张敏感性和化学敏感性双重特性,呈现两个开放状态与两个关闭状态的动力学特征。

关键词:肾小管;基侧膜;钾离子通道
中图法分类号:R-332;R334.1 文献标识码:A

A study of a K^+ channel in the basolateral membrane of renal proximal tubule recorded from single rat nephron *in vitro*

YE Ben-lan, SHU Chong-xiang, DAI Jing-lan, HOU Wei-ping, WAN Zi-bing (Department of Physiology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To study the physiological properties of a potassium channel in the basolateral membrane (BLM) of proximal tubule. **Methods** Nephrons were dissected from rat kidney under a stereoscopic microscope. The standard configuration for single-channel tight seal patch-clamp technique was used to record channel currents from the BLM. **Results** A kind of potassium channel with low conductance and inward rectification was easily recorded in the BLM of the proximal tubule. The channel current occurred spontaneously in 81% seals made on the BLM. In the patches, with no spontaneous channel activity, the channel current occurred when the pressure increased. In the inside-out configuration, run-down was present in channel activity. The open dwelling time constants of the potassium channel were 0.524 ms and 5.087 ms, while the closed dwelling time constants were 1.029 ms and 16.500 ms. **Conclusion** A type of potassium channels with low conductance, stretch-sensibility and chemistry-sensibility, presenting kinetic properties as two opening and two closing states, are widely distributed in the basolateral membrane of proximal tubule.

Key words: kidney tubule; basolateral membrane; potassium channel

肾脏近曲小管细胞钾离子通道在维持细胞膜电位、保持细胞体积、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[1,2],而且,钾离子通道与Na^+,K^+-ATPase泵功能关系密切,因为Na^+,K^+-ATPase的作用使Na^+泵出细胞同时K^+进入细胞,要使细胞内K^+能保持稳态,K^+必须同时通过离子通道被动流出细胞外。另一方面,钾离子通道活动还通过膜电位水平影响Cl^-的转运等[1,2]。因此,对肾小管钾离子通道的研究很重要。但是,由于肾小管细胞具有极性,细胞不同侧面膜的功能不尽相同,不同侧面膜上离子通道的生理学特性也有一些差异。在通常所采用的对单个肾小管细胞进行膜片钳实验中,基侧膜由于贴附培养皿而使电极不易接近,因此对肾小管细胞基侧膜上离子通道的研究报道较少[3,4],而对顶侧膜上离子通道的研究资料较多[5,6]。本实验采用分离的大鼠肾小管组织为研究对象,对近曲小管细胞基侧膜进行膜片钳实验,以探讨近曲小管细胞基侧膜钾离子通道活动的生理学特性及其意义。

基金项目:第三军医大学基础医学部青年科研基金项目(2000)
作者简介:叶本兰(1964—),女,湖北省武汉市人,博士,教授,主要从事肾脏生理方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68752254
收稿日期:2002-04-27;修回日期:2002-06-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　实验用溶液与仪器设备

1.1.1　实验用溶液　　肾脏组织冲洗、灌流溶液(mmol/L): NaCl 110、KCl 5、$MgCl_2$ 1、HEPES 5、葡萄糖 5, pH 7.4。膜片钳实验用肾小管组织浴液与电极充灌液 (mmol/L): KCl 140、$MgCl_2$ 1.5、HEPES 10, pH 7.4。盐桥液: KCl 1 mol/L、琼脂 1 g/L, pH 7.4。

1.1.2　仪器设备　　XTL-3 连续变倍体视显微镜(重庆光学仪器厂, 7~30 倍)、微电极拉制器(PP-83, 日本成茂)、微电极抛光仪(改制)、膜片钳放大器(CEZ-2200, 日本光电)、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(Digidata 1200, 美国), pCLAMP6.0 软件(美国 Axon)、摄像仪(PIH-712, 重庆光学仪器厂)。

1.2　肾小管分离

Wistar 大鼠 10 只, 180~220 g, 由本校实验动物中心提供。断头处死动物, 迅速摘取肾脏, 去除肾脏包膜。将肾脏沿冠状面切成约 2 mm 厚的切片, 用灌流液进行清洗后, 将肾脏切片孵育在通有 95% O_2 和 5% CO_2 的灌流液中。参照 Burg 等[7] 方法, 在连续变倍体视显微镜(7~30 倍放大)监视下, 用不锈钢细针从肾脏组织切片中分离出肾单位或肾小管。从与肾小球相延续部位确定近曲小管。整个过程在 20~22 ℃室温下完成。

1.3　膜片钳实验

按照 Hamill 等[8] 膜片钳单通道实验技术记录肾小管细胞基侧膜上钾离子通道活动。玻璃微管电极采用外径 1.6 mm 的 GG-17 玻璃微吸管, 在微电极控制器上经二次拉制成尖端开口直径 1 μm 的微管电极, 再经微电极抛光器上进行热抛光。充灌后的微管电极阻值为 3~8 MΩ。微管电极与肾小管细胞基侧膜以 cell-attached 形式形成高阻封接。实验由 pCLAMP6.0.1 膜片钳实验软件中 Fatchex 程序进行 gap-free 连续采样。实验在室温下(20~22 ℃)进行。

1.4　统计学处理

实验数据处理用 pCLAMP 软件包中 Fetchan 与 pstat 程序进行。用 Gaussian 与 Exponential 方式对通道的电流幅值直方图及通道的开放与关闭时间分布直方图进行拟合, 对各拟合分别在 Marquardt-LSQ (Least squares)、Simplex-LSQ 及 Simple-MLE(Maximum likelihood)的不同指数水平进行比较, 用 ViewResiduals 进行拟合优度检验, 并进行统计学分析。

2　结果

2.1　通道活动记录

在分离出的肾单位中, 从与肾小球相延续部位确定近曲小管。待肾小管沉入平皿底部时, 电极可以接触到上侧管壁的基侧膜而形成高阻抗封接。在形成的 cell-attached 膜片中很容易观察到基侧膜上钾离子通道活动, 所观察的 94 个封接膜片中有 76 个膜片观察到通道自发性开放活动, 阳性结果占 81%, 而且在多数膜片中可见 2 个以上通道同时开放的情况, 见图 1。

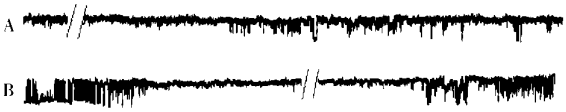


图 1　通道自发性开放电流

Fig 1　The channel current occurs spontaneously

2.2　通道激活

在一些无自发性通道开放活动的膜片中, 当电极进一步压向肾小管时可激活通道开放, 见图 2A。将有通道开放活动的 cell-attached 膜片拉制成 inside-out 膜片后, 通道活动很快减弱、消失, 即出现 run-down 现象。而此时进一步增大电极内吸引负压, 如封接能稳定未被破坏, 可以见到通道活动再次出现, 见图 2B。图 2 中所示为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 40 mV 时的实验记录。



(A) In the minority cell-attached patches, with no spontaneous channel activity, the channel current occurs when the microelectrode is pressed into the cell further; (B) When the cell-attached patch is conversed into the inside-out configuration, channel activity typically begins to decline and then disappears. Sucking the pipette with a negative pressure, the channel current occurs again if the giga ohm seal is not broken. The currents are recorded under Vpip = 40 mV in the symmetry solution

图 2　通道的激活

Fig 2　Activation of the channel

2.3　通道活动的电压依赖性

通道电流的幅值以及通道开放时间随钳制电压的变化而变化。在钳制电压为负值时, 通道电流表现为外向电流, 同时表现出内向整流的特性, 外向电流的弦电导为(5.6±0.3) pS (钳制电压为 −40~−60 mV, n=5)。在钳制电压为正值(膜处于超极化状态)时, 通道电流表现为内向电流, 通道电流幅值随钳制电压的升高而增加, 内向电流的斜率电导为(28.2±1.7) pS(钳制电压为 40~80 mV, n=6)。同时, 通道开放程度也随钳制电压的升高而增加, 且表现出通道多重开放。

2.4　通道活动动力学特性

对通道的开放与关闭活动的统计分析表明, 通道开放时间和关闭时间的分布均服从双指数函数形式。通道开放的两个时间常数分别为 0.524 ms 与 5.087 ms, 通道关闭的两个时间常数分别为 1.029 ms 与 16.500 ms。

3　讨论

3.1　近曲小管细胞基侧膜片钳制

尽管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生物学特点、调控途径[9~11] 、分子结构与生理功能[12,13] 均有一定的了解。但是, 由于肾小管上皮细胞具有极性, 分离或培养的单个肾小管细胞在进行膜片钳实验时, 基侧膜由于贴附培养皿而使电极不易接近[3,4], 因此, 在现有的对肾小管细胞离子通道的研究资料中大多数是对小管细胞顶侧膜上离子通道的研究, 而对基侧膜上离子通道的研究较少, 尤其是对哺乳动物肾小管细胞基侧膜上离子通道活动的生理学特性尚待深入探讨。本实验在体视显微镜下机

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

械分离肾小管，该实验技术最早是由 Burg 等[7] 报道的，之后，该技术得到较为广泛的应用，主要是用于肾小管微灌流实验，探讨肾小管对物质的转运功能，对人们了解肾功能曾起到十分重要的作用，但是，随着研究的深入，新的研究方法相继出现，分离肾单位的实验方法已少被应用。然而，该方法在对肾小管基侧膜研究中显示出很大的优势，分离的肾小管沉入平皿底部时，对侧管壁的基侧膜暴露在操作野，电极容易贴附，从而形成高阻抗封接。

3.2 近曲小管细胞基侧膜钾离子通道激活特性

本实验系统中，电极充灌液与细胞浴液为相同浓度的钾溶液，即实验是在对称性钾溶液中进行，避免了细胞静息电位对通道活动的影响。实验记录到的是以钾离子为载体的离子通道，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。在实验所记录的膜片中有 81%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基侧膜上分布密度较高。对一些无通道自发开放的 cell-attached 膜片加压后可观察到电导相同的通道电流，表明该通道具有牵张敏感性。而当 cell-attached 膜片拉制成 inside-out 膜片时，通道活动很快减弱、消失，该 run-down 现象的出现提示：该通道开放活动的维持需要细胞内某些物质的调控，当形成 inside-out 膜片时细胞内物质的浓度迅速减少，使通道活动不足以维持。但是，具体的调控途径尚有待于进一步研究。而对 inside-out 膜片增加吸引负压，在某些膜片上又可引发通道电流，也支持该通道具有牵张敏感性。但对近曲小管细胞基侧膜上钾离子通道的牵张敏感性和化学敏感性双重激活特性之间的关系尚需进一步研究。

3.3 与其他相关研究结果的比较

文献[3,4]资料中对肾脏近曲小管钾离子通道的研究多数是针对两栖动物，如蛙、蟾蜍、斑点美西螈、Necturus 等，也有部分是对哺乳动物近曲小管的研究，但主要是针对肾小管细胞顶侧膜离子通道，而对基侧膜上离子通道研究相对较少。

已有的研究资料中可将肾脏的钾离子通道大体分为大电导(100 pS 左右)、中电导(30～60 pS)、小电导(30 pS 以内)3种[9,10]。本实验测定的大鼠近曲小管基侧膜钾离子通道电导为 28.2 pS，属于小电导钾离子通道，与我们以前对大鼠肾脏组织切片中的研究结果一致[14]。对通道的开放与关闭活动的统计分析表明，通道开放时间和关闭时间的分布均服从双指数函数形式，这与多数类型的钾离子通道动力学模式有差别，大多数类型钾离子通道的关闭时间分布服从双指数函数，而开放时间分布则服从单指数函数[9,10]。但是，文献[3,4]中对斑点美西螈肾小管细胞基侧膜钾离子通道活动的动力学模式分析表明其开放时间与关闭时间均符合双指数函数分布，与本实验结果一致。这可能是肾小管细胞基侧膜钾离子通道与其他类型细胞相区别的特性之一。就时间常数而言，本研究结果中，通道开放时间常数分别为 0.524 ms 与 5.087 ms，通道关闭的两个时间常数分别为 1.029 ms 与 16.500 ms，较文献[3,4]报道的斑点美西螈肾小管细胞基侧膜钾离子通道活动的时间常数略小，可能是实验系统差异的结果，也不排除是动物种属差异的可能。

参考文献：

[1] Giebisch G. Physiological roles of renal potassium channels[J]. Semin Nephrol, 1999, 19(5): 458－471.

[2] Satlin L M. Regulation of potassium transport in the maturing kidney[J]. Nephrol, 1999, 19(2): 155－165.

[3] Mauerer U R, Boulpaep E L, Segal A S. 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.

[4] Mauerer U R, Boulpaep E L, Segal A S. Regulation of an inwardly rectifying ATP-sensitive K^+ channel in the basolateral membrane of renal proximal tubule[J]. J Gen Physiol, 1998, 111(1): 161－180.

[5] Wang W, Lerea K M, Chan M. *et al*. Protein tyrosine kinase regulates the number of renal secretory K^+ channels[J]. Am J Physiol, 2000, 278(2): 165－171.

[6] Woda C B, Bragin A, Kleyman T R, *et al*. Flow-dependent K^+ secretion in the cortical collecting duct is mediated by a maxi-K channel[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2001, 280(5): F786－793.

[7] Burg M, Gerntham J, Abramow M, *et al*. Preparation and study of fragments of single rabbit nephrons[J]. Am J Physiol, 1965, 210(6): 1293－1298.

[8] Hamill O P, Marty A, Neher E, *et al*. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membran patches[J]. Pfluger Archiv, 1981, 391(1): 85－100.

[9] Malnic G, Muto S, Giebisch G. Regulation of potassium excretion[A]. In: Seldin D W, Giebisch G. The kidney: physiology and pathophysiology[M]. Volume Ⅱ. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins press, 2000. 1575－1613.

[10] Giebisch G, Malnic G, Berliner R W. Control of renal potassium excretion[A]. In: Brenner B M. The kidney[M]. Volume Ⅰ. Philadelphia: Saunders WB Company press, 2000. 417－454.

[11] Ecelbarger C A, Kim G H, Knepper M A, *et al*. Regulation of potassium channel Kir 1.1 (ROMK) abundance in the thick ascending limb of Henle's loop[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(1): 10－18.

[12] 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.

[13] Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 279(5): F793－801.

[14] 叶本兰, 万子兵, 萧家思. 大鼠肾脏切片膜片钳实验技术[J]. 中国应用生理学杂志, 2000, 16(3 增刊): 158.

(编辑 陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net