

## 缺血再灌注对人肾小管上皮细胞钾离子通道特性的影响

陈昊<sup>1</sup>, 吴雄飞<sup>2</sup>

(1. 广州军区广州总医院泌尿外科, 广州 510010; 2. 第三军医大学西南医院泌尿中心肾科, 重庆 400038)

**[摘要]** 目的:应用缺氧模型模拟缺血再灌注损伤,观察缺血再灌注对人肾小管上皮细胞钾离子( $K^+$ )通道特性的影响。方法:取生长旺盛的人肾小管上皮细胞,进行同步处理后分正常组、缺氧组和氧损伤组3组( $n=15$ ),正常组细胞于无血清 RPMI 1640 培养液中常规培养,缺氧组和氧损伤组分别加入抗霉素 A 和  $H_2O_2$  制备化学缺氧模型和氧损伤模型,模拟缺血再灌注损伤。应用全细胞膜片钳技术记录3组肾小管上皮细胞膜钾离子通道特性。结果:3组肾小管上皮细胞膜  $K^+$  通道表达的  $K^+$  电流均具有电压依赖性,能被  $K^+$  通道阻断剂  $Ba^{2+}$  阻断;缺氧组和氧损伤组肾小管上皮细胞膜电压较正常对照组明显升高 ( $P<0.05$ ),值小于正常对照组 ( $P<0.05$ ),而缺氧组和氧损伤组之间无显著差异。结论:人肾小管上皮细胞膜上存在电压依赖性钾离子通道,缺血再灌注时其表达明显增加,活动明显增强。

**[关键词]** 膜片钳术;钾通道;缺氧;肾小管;上皮细胞

**[中图分类号]** R 692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)11-1242-04

## Influence of ischemia/reperfusion on characteristics of membrane potassium channels of human renal tubule epithelial cells

CHEN Hao<sup>1</sup>, WU Xiong-fei<sup>2</sup> (1. Department of Urology, Guangzhou General Hospital, PLA Guangzhou Military Area Command, Guangzhou 510010, China; 2. Department of Kidney, Center of Urology, South-west Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To observe the influence of ischemia/reperfusion (simulated by anoxia) on the characteristics of  $K^+$  channels in renal tubular epithelial cells. **Methods:** Healthy renal tubule epithelial cells were divided into normal control group (cultured in serum-free RPMI 1640 medium), anoxic group (treated with antimycin A + serum-free RPMI 1640 medium), and oxidative stress group ( $H_2O_2$  + serum-free RPMI 1640 medium) ( $n=15$ ). The whole-cell patch clamp technique was used to examine the characteristics of  $K^+$  channels in renal tubular epithelial cells. **Results:** The transmembrane  $K^+$  current in tubular epithelial cells was voltage-dependent and could be blocked by  $K^+$  channel blocker  $Ba^{2+}$ . The transmembrane potential levels in anoxic group and oxidative stress group were remarkably higher than that in normal control group ( $P<0.05$ ), while their time constants ( $\tau$ ) were smaller than that of normal control group ( $P<0.05$ ), with no significant difference between the former 2 groups. **Conclusion:** There are voltage-dependent  $K^+$  channels on tubular epithelial cells. Their expression increases obviously after ischemia-reperfusion and the activities of the channels also increase obviously.

**[KEY WORDS]** patch-clamp techniques; potassium channel; anoxia; kidney tubulars; epithelial cells

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11): 1242-1245]

钾离子( $K^+$ )通道是细胞膜上分布最广、类型最多的一类离子通道,发挥许多重要的生物功能<sup>[1]</sup>。人们已对肾脏离子通道进行了大量研究,对肾小管  $K^+$  通道活动的生物学特点、调控途径<sup>[2-4]</sup>、分子结构与生理功能<sup>[5]</sup>均有一定的了解。但有关肾小管上皮细胞在缺血再灌注条件下细胞膜  $K^+$  通道的研究,国内外均未见报道。我们应用全细胞膜片钳技术,用化学缺氧、氧化损伤模拟肾小管上皮细胞缺血再灌注,观察模拟缺血再灌注肾小管上皮细胞钾离子通道的改变,探讨其在肾缺血再灌注中的作用及机制。

## 1 材料和方法

## 1.1 人近端肾小管上皮细胞 选用 HK-2 细胞(美

国 ATCC 公司,由西南医院肾科刘宏博士惠赠)。

1.2 试剂和仪器  $K_2ATP$ 、 $MgATP$ 、抗霉素 A 均为 Sigma 公司制品;30%过氧化氢购于重庆东试公司;HEPES、MOPS、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)为华美生物公司制品;NaCl、KCl、 $CaCl_2$ 、 $MgCl_2$ 、 $NaHCO_3$ 、 $NaH_2PO_4$ 等购于重庆北碚化学试剂厂。玻璃电极用软质玻璃毛细管(直径 1.6 mm,美国 Drummond scientific 公司)经微电极拉制仪(Narishige Japan)二步拉制而成。记录钾电流的细胞外液(mmol/L):NaCl 137.0、KCl 5.4、

[作者简介] 陈昊,硕士,主治医师。

E-mail: chhao2002@yahoo.com.cn

MgCl<sub>2</sub> 1.0、HEPES 10.0、glucose 10.0 (用 NaOH 调 pH 至 7.3);记录钾电流的电极内液 (mmol/L): KCl 140.0、MgCl<sub>2</sub> 0.5、EGTA 2.0、HEPES 5.0、K<sub>2</sub>ATP 4.0 (用 KOH 调 pH 至 7.2)。

1.3 化学缺氧、氧损伤模型建立 细胞于 50 ml 细胞培养瓶、10%胎牛血清(FCS)的 RPMI 1640 培养基中传代培养(含青霉素  $\times 10^4$  U/L,链霉素 100 mg/L,谷氨酰胺 2 mmol/L),每 2~3 d 换液 1 次,细胞趋于铺满瓶底时进行实验,实验前 24 h 换用无血清培养液以使细胞同步。实验分为正常组、缺氧组、氧损伤组 3 组,均以 Hanks 液冲洗瓶底 3 次后分别加入不同处理因素(正常组中加入无血清 RPMI 1640 培养液,缺氧组加入含 0.1  $\mu$ mol/L 抗霉素 A 的无血清无底物 RPMI 1640 培养液,氧损伤组加入含 0.1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的无血清 RPMI 1640 培养液),然后于 37  $^{\circ}$ C CO<sub>2</sub> 培养箱作用 2 h 后进行下一步实验。

1.4 膜片钳全细胞记录实验 采用标准膜片钳全细胞记录方法<sup>[6]</sup>。将贴附有细胞的盖玻片放入直径 35 mm 的培养皿内,加入 2 ml 经滤过的 K<sup>+</sup> 通道浸浴液,选用贴壁良好、呈梭形或椭圆形、细胞边界清楚、胞质均匀一致、整个细胞轮廓反光好的细胞,玻璃微电极充灌电极内液后(电极电阻为 2~5 M $\Omega$ ),给予适当负压吸引,使电极与细胞表面形成高阻抗封接(giga-seal),阻抗约 10~100 G $\Omega$ ;继续加大负压,吸破细胞膜,形成全细胞记录(whole cell recording)。用计算机运行 pClamp7.0 程序控制各种参数,通过 A/D、D/A 转换器与膜片钳放大器相连接,引出实验各组细胞膜 K<sup>+</sup> 电流,其后将含 K<sup>+</sup> 通道阻断剂 Ba<sup>2+</sup> 的细胞外液加到细胞周围,记录细胞膜 K<sup>+</sup> 电流变化情况。K<sup>+</sup> 通道电流经膜片钳放大器引入记忆示波器及 A/D、D/A 转换器,再输入电子计算机,应用 pClamp7.0 软件(美国 Axon 公司),保持相同钳制电压(-90 mV),在电流钳下计算正常和缺氧、氧化损伤肾小管上皮细胞膜电位和激活时间常数( )。

1.5 统计学处理 本实验获得的全部数据均用 pClamp8(Axon Ins, USA) 进行分析处理,用 Excel 电子表格进行统计,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,计数资料采用  $\chi^2$  检验,计量资料采用 *t* 检验和方差分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 全细胞膜片钳记录的肾小管上皮细胞膜 K<sup>+</sup> 离子电流特性 培养的肾小管上皮细胞细胞较容易形成全细胞记录,平均静息电位(RMP)为(-42.56  $\pm$  7.35) mV (*n* = 15);串联阻抗(R<sub>s</sub>)为(11.58  $\pm$  2.98) M $\Omega$ ,膜电容(R<sub>c</sub>)为(10.51  $\pm$  1.88) pF。对 3 组肾小管上皮细胞通过记录电极给予一系列由超极化到去极化的跃阶电流(-100 ~ +100 pA, step = 20, 时长 100 或 200 ms)刺激,得到电压-电流曲线;分别引出 15 例肾小管上皮细胞膜钾离子膜电位图(图 1),随着测试电流的增大,钾离子膜电位也增加,肾小管上皮细胞钾离子电流具有电压依赖性,经 Clampfit 处理后,可以描出电流-电压关系曲线(I-V 曲线)(图 2),并获得在不同刺激电流下对应的钾离子膜电位值。结果表明:在跃阶电流 -100 ~ +100 pA 时,正常肾小管上皮细胞膜电位值为(-130.32  $\pm$  11.21) ~ (75.26  $\pm$  9.53) mV,缺氧组肾小管上皮细胞膜电位值为(-210.28  $\pm$  15.62) ~ (150.36  $\pm$  11.12) mV,氧化损伤组肾小管上皮细胞膜电位值为(-190.22  $\pm$  21.98) ~ (147.25  $\pm$  11.32) mV,正常组分别和缺氧组、氧化损伤组比较差异有显著性(*P* < 0.05),而后两者之间差异无统计学意义。

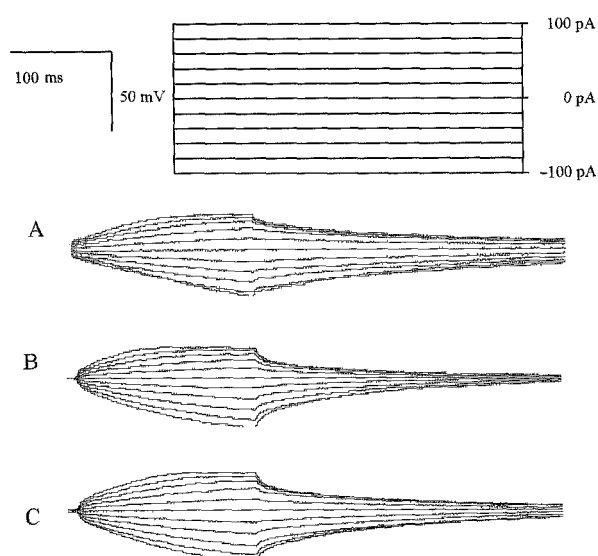


图 1 肾小管上皮细胞膜钾离子膜电位图

Fig 1 Membrane potentials in tubular epithelial cells

A: Control group; B: Anoxia group; C: Oxidative stress group

记录到缺氧组、氧化损伤组和正常组膜 K<sup>+</sup> 膜电位后,用加药装置将含 K<sup>+</sup> 通道阻断剂 Ba<sup>2+</sup> 的细胞外液加到细胞周围, K<sup>+</sup> 通道阻断剂能使跨膜 K<sup>+</sup> 膜电位明显降低 (P < 0.05)

2.2.3 组肾小管上皮细胞的激活时间常数(τ) 用 Clampfit 程序对电流激活时间过程进行拟合,证实可用单指数进行拟合,记录到缺氧、氧化损伤组和正常组肾小管上皮细胞在不同跃阶电流下激活膜电位曲线的时间常数 τ 值(表 1)。3 组间比较差异显著 (P < 0.05)。缺氧组、氧化损伤组 τ 值明显小于正常组 (P < 0.05);缺氧组和氧化损伤组之间差异无显著性。

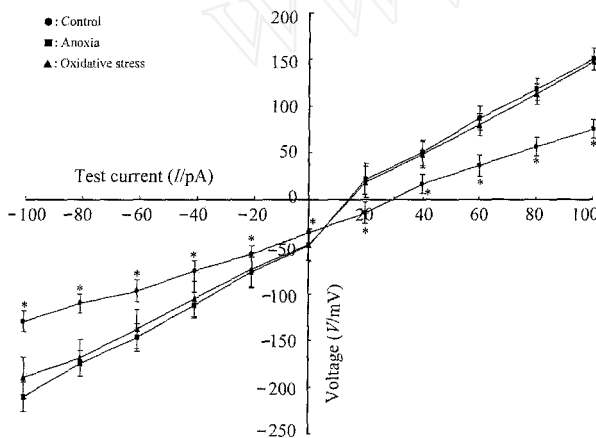


图 2 肾小管上皮细胞膜电位的电流-电压关系曲线(I-V曲线)

Fig 2 I-V curve of membrane potentials in tubular epithelial cells

\* P < 0.05 vs oxidative stress group or anoxia group; n = 15,  $\bar{x} \pm s$

表 1 电流钳下激活电压的时间常数

Tab 1 Time constant(τ) of activating potential in 3 groups (n = 15,  $\bar{x} \pm s$ )

Test current (I/pA)	(τ/ms)		
	Control	Anoxia	Oxidative stress
-100	99.01 ± 3.30	37.56 ± 1.29 *	43.84 ± 1.58 *
-80	100.35 ± 3.52	53.19 ± 1.81 *	57.91 ± 2.37 *
-60	85.70 ± 2.73	51.94 ± 4.70 *	65.98 ± 2.66 *
-40	96.48 ± 3.37	67.16 ± 3.81 *	62.27 ± 3.07 *
-20	134.79 ± 6.36	80.59 ± 4.12 *	70.67 ± 2.96 *
0	131.55 ± 30.56	80.64 ± 15.52 *	69.59 ± 15.91 *
+20	124.28 ± 5.39	68.91 ± 4.01 *	57.02 ± 2.73 *
+40	89.39 ± 3.22	44.39 ± 2.51 *	39.38 ± 1.92 *
+60	42.91 ± 1.20	16.92 ± 1.36 *	12.86 ± 1.00 *
+80	24.91 ± 0.97	14.67 ± 1.05 *	12.92 ± 2.01 *
+100	12.99 ± 0.91	4.93 ± 0.10 *	2.94 ± 1.41 *

\* P < 0.05 vs control group

### 3 讨论

缺血再灌注损伤是移植肾功能恢复延迟 (delayed graft function, DGF) 的一个重要原因,如何防治 DGF 仍是目前的研究热点,全面深入阐明其机制将对肾移植后急性肾功能衰竭和 DGF 防治有重要的理论意义。国外文献研究表明<sup>[7]</sup>: K<sup>+</sup> 通道的激活是缺氧的早期反应,从而导致了肾缺血性损伤。大量实验证实: K<sup>+</sup> 通道普遍存在于动物细胞,具有多种生理功能。在肾脏上皮细胞, K<sup>+</sup> 通道主要作用包括:维持膜电压及 K<sup>+</sup> 的分泌、再循环和调节细胞体积。缺血后功能和结构进行性改变导致能量代谢失衡和细胞内环境稳定性发生改变。到目前为止,已通过许多方法包括膜片钳技术、cDNA 克隆和免疫组化在分子水平对肾脏 K<sup>+</sup> 通道进行研究,并通过体外模拟缺氧、氧损伤模型观察损伤后细胞电生理、病理变化,但缺乏对单个细胞离子通道通透性改变与缺血再灌注损伤关系的研究。越来越多的研究<sup>[8,9]</sup>表明 K<sup>+</sup> 通道在缺血再灌注损伤中的重要作用,其中涉及临床的包括防治或减轻心肌、神经缺血损伤,而在肾脏缺血再灌注损伤方面未见报道。本研究以人肾小管上皮细胞为研究对象,应用膜片钳技术,在模拟缺血再灌注损伤环境下,观察肾小管上皮细胞离子流变化,探讨缺血再灌注损伤的可能机制及其临床意义。

本研究应用全细胞膜片钳记录方式,记录到电流后分别加入 K<sup>+</sup> 通道阻断剂 Ba<sup>2+</sup> 到细胞周围,可基本阻断跨膜 K<sup>+</sup> 电流,说明本实验记录到的跨膜电流为 K<sup>+</sup> 通道所产生的 K<sup>+</sup> 电流,同时观测到正常组、缺氧、氧化损伤组肾小管上皮细胞膜 K<sup>+</sup> 电流具有电压依赖性。在相同电流钳状态下,对 3 组肾小管上皮细胞通过记录电极给予一系列由超极化到去极化的跃阶电流 (-100 ~ +100 pA, step = 20, 时长 100 或 200 ms) 刺激,在超极化过程中,缺氧、氧化损伤组较正常组肾小管上皮细胞膜电位绝对值增加 (P < 0.05),去极化过程中,缺氧、氧化损伤组肾小管上皮细胞膜电位值显著大于正常组 (P < 0.05),这说明缺氧、氧化损伤肾小管上皮细胞膜钾离子通道电流表达增强。缺氧、氧化损伤组 τ 值明显低于正常组肾小管上皮细胞 τ 值 (P < 0.05),这说明缺氧、氧化损伤肾小管上皮细胞钾离子通道的 K<sup>+</sup> 电流较正常肾小管上皮细胞达到最大膜电位值所需要

时间更短,  $K^+$  通道开放速度更快, 活动增强。

有关缺血再灌注损伤后钾离子通道异常增高的原因迄今尚未明了, 大部分结果是基于对可兴奋性细胞如心肌细胞、神经细胞研究得出<sup>[8,9]</sup>。本研究认为缺氧、氧化损伤等因素可引起细胞膜离子通道传导增加, 钾通道活性增高。  $K^+$  通道增加和开放, 细胞内外离子的分布平衡失调, 胞外  $K^+$  堆积, 从而使胞内外钾离子的浓度梯度减小, 细胞膜的静息电位降低, 导致细胞兴奋性提高, 使细胞膜处于超极化状态或者过度去极化状态, 导致非电压敏感性钙释放激活钙通道开放, 使  $Ca^{2+}$  迅速进入细胞, 钙离子超载有利于与  $Ca^{2+}$  相关的信号转导, 引起细胞膜电位的改变, 参与了组织缺血再灌注损伤。

综上所述, 肾小管上皮细胞膜钾离子通道的异常表达及离子流变化可能是缺血再灌注肾病理变化的基础, 具体机制有待进行更深入的研究加以证实。

#### [参考文献]

- [1] Gebisch G. Physiological roles of renal potassium channels[J]. Semin Nephrol, 1999, 19: 458-471.
- [2] Malnic G, Muto S, Gebisch G. Regulation of potassium excretion[M]// Seldin DW, Gebisch G. The kidney: physiology

and pathophysiology. Volume . Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins Press, 2000:1575-1613.

- [3] Gebisch G, Malnic G, Berliner RW. Control of renal potassium excretion[M]// Brenner BM. The kidney. Volume . Philadelphia: Saunders WB Company Press, 2000:417-454.
- [4] Ecelbarger CA, Kim GH, Knepper MA, 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: 10-18.
- [5] Lesage F, Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2000, 279: F793-F801.
- [6] Hamill OP, Marty A, Neher E, et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches[J]. Pflugers Arch, 1981, 391: 85-100.
- [7] Reeves WB, Shah SV. Activation of potassium channels contributes to hypoxic injury in proximal tubules[J]. J Clin Invest, 1994, 94: 2289-2294.
- [8] Liu D, Slevin JR, Lu C, et al. Involvement of mitochondrial  $K^+$  release and cellular efflux in ischemic and apoptotic neuronal death[J]. J Neurochem, 2003, 86: 966-979.
- [9] Steensrud T, Nordhaug D, Elvenes OP, et al. Superior myocardial protection with nicorandil cardioplegia[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2003, 23: 670-677.

[收稿日期] 2006-07-12

[修回日期] 2006-10-28

[本文编辑] 孙 岩

## 《临床实习指导》已出版

本书由尹忠诚、刘彦群主编, 突破了以往实习手册的编写框架, 突出作为实习教科书和必备参考书的编写目的, 除了包括常见疾病诊疗技术外, 增加了临床诊断思维、医学科研、医学研究生考试、国家执业医师资格考试以及毕业生就业指导等方面的基础知识。此外, 本书还突出了双语特色, 除编入英文医疗文件的书写范例外, 在各个主要章节增加了专业英语词汇。本书主要供医学院校带教老师临床教学和学生临床实习阶段使用。同时, 对住院医师及进修医师临床工作也具有一定的参考价值。

由第二军医大学出版社出版、发行, ISBN 7-81060-449-X, 定价: 86.00 元。

订购电话: 021-65493093, 地址: 上海市翔殷路 800 号 第二军医大学出版社发行科, 邮编: 200433