

ATP 敏感性钾通道在人类妊娠不同状态的子宫平滑肌的表达

Expression of ATP-sensitive potassium channel in human myometria at different labour states

胡蓉^{1,2}, 徐晨³, 高路³, 惠宁^{1*}, 倪鑫^{3*}

- 1. 第二军医大学长海医院妇产科, 上海 200433
- 2. 上海市嘉定区妇幼保健院, 上海 201800
- 3. 第二军医大学基础部生理学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨 ATP 敏感性钾通道(K_{ATP})亚基在人类 2 种不同功能状态下(临产和未临产)子宫平滑肌中的表达情况。

方法:实验分为足月临产组(TL 组)和足月未临产组(TNL 组),均 12 例。采用 RT-PCR 和实时定量聚合酶链反应(real-time PCR)检测了人类 2 种妊娠状态下子宫平滑肌 K_{ATP} 3 种亚基 mRNA 的表达,并用免疫组织化学法检测 K_{ATP} 3 种亚基蛋白表达情况。**结果:**Kir6.1、Kir6.2、SUR2B mRNA 在临产和未临产子宫平滑肌上均有表达,TNL 组 SUR2B mRNA 的含量高于 TL 组($P < 0.05$);3 种亚基的受体蛋白在人未临产和临产的子宫平滑肌细胞胞质中都有表达。**结论:**K_{ATP}在子宫平滑肌上有表达;在人类的妊娠子宫平滑肌上可能是通过 SUR2B 水平的改变起到调节平滑肌收缩的作用。

[关键词] ATP 敏感性钾通道;实时定量聚合酶链反应;免疫组织化学;妊娠;子宫平滑肌

[中图分类号] R 714.21 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)09-1084-03

ATP 敏感性钾通道(ATP-sensitive potassium channels, K_{ATP})最早发现于心肌细胞,随后又陆续在平滑肌细胞、胰腺 B 细胞等外周细胞发现了 K_{ATP} 的表达^[1]。K_{ATP}主要由 2 种不同类型的亚基组成,即功能性亚基 Kir6.1/Kir6.2 和调节性亚基 SUR1/SUR2。已有报道^[2-4]证实,在心肌、胰腺表达的 K_{ATP}亚基结构各不相同,并且功能也不尽相同。近年来,在大鼠和人类的子宫平滑肌中也陆续发现了钾离子通道的表达^[5-6],离子通道在调节子宫平滑肌的收缩过程中起着非常重要的作用^[7]。目前,对 K_{ATP}在人类子宫平滑肌分布表达的系统研究在国内还少见报道。本研究旨在通过荧光实时定量 PCR(real-time PCR)和免疫组织化学方法检测 K_{ATP}亚基 Kir6.1、Kir6.2、SUR2B 的 mRNA 和相关受体蛋白在人类妊娠不同状态的子宫平滑肌内的表达及可能存在的差异性,为进一步研究其在人类妊娠、分娩过程中所发挥的功能提供依据和基础。

1 材料和方法

1.1 标本的收集 所有标本均来自长海医院妇产科 2008 年 4—11 月产科住院患者。选择足月(孕周≥37 周)单胎妊娠、无妊娠合并症行子宫下段剖宫产的产妇,分为足月临产组(TL)和足月未临产组(TNL),每组各 12 例。孕妇年龄、孕产次及孕周等两组间差异无统计学意义。于剖宫产术中新生儿及胎盘娩出后、宫体注射催产素之前剪取子宫下段切

口上缘平滑肌条,置入液氮,-80℃保存。所得标本均经患者知情同意。

1.2 RT-PCR 反应 (1)子宫平滑肌组织总 RNA 的提取按 Invitrogen 公司 TRIzol 试剂说明书操作。(2)取上述提取的总 RNA 为模板,按以下体系进行反转录,总体积为 25 μl: Oligo(dT)₁₈ 1 μl,总 RNA 2 μl,70℃反应 5 min,立即冰浴 5 min;然后加入 5×扩增缓冲液 5 μl,10 mmol/L dNTPs 1.25 μl,RNA 酶抑制剂 0.625 μl,M-MLV 1 μl,DEPC 水补足 25 μl。42℃反应 60 min,72℃反应 10 min,反转录产物置于 4℃保存。(3)引物设计及温度梯度 PCR,所用引物见表 1。取适量以上合成的 cDNA 为模板,按以下体系进行 PCR 反应,总体积 25 μl:10×扩增缓冲液 2.5 μl,25 mmol/L MgCl₂ 1 μl,10 mmol/L dNTPs 0.5 μl,5 μmol/L 引物(上下游混合) 1 μl,cDNA 产物 1 μl,Taq 酶 0.2 μl,去离子水(ddH₂O)补足 25 μl。94℃ 5 min,94℃ 15 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环,最后 72℃ 5 min。使用 ddH₂O 代替 cDNA 作为相应的阴性对照。(4)取 RT-PCR 产物 8 μl,用 1.2%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

1.3 荧光实时定量 PCR 从每个所测样本中取 2 μl cDNA 混合后,取 5 μl 混合物按倍比梯度稀释,共 4 个梯度,做成 5 管不同浓度梯度,作为相对已知浓度的 cDNA,在实时定量 PCR 中分别作为 GAPDH 和 K_{ATP} 的标准品。

反应体系:2×Taq PCR master Mix 10 μl,10 mmol/L

[收稿日期] 2009-02-18 **[接受日期]** 2009-06-01

[基金项目] 国家自然科学基金(30571961,30811120433)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30571961,30811120433)。

[作者简介] 胡蓉,硕士生。E-mail: xiaohuliyanzhou@163.com

* 通讯作者(Corresponding authors)。Tel:021-81873592,E-mail: huin1956@yahoo.com.cn; Tel:021-81870978,E-mail: nxljq2003@yahoo.com.cn

dNTPs 1 μ l, cDNA 1 μ l, 5 mmol/L 引物 1 μ l, 10 \times SYBR-Green 0.2 μ l, ddH₂O 补足至 25 μ l. 95 $^{\circ}$ C 热启动 5 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60~62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环。

表 1 RT-PCR 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)	退火温度 θ / $^{\circ}$ C	GenBank No.
Kir6.1	TTC CAC TGA AGT GGC CAA GGG CCC TTG GCC ACT TCA GTG GAA	211	60	NC_000012
Kir6.2	GGC AGG GTT GGG GGC TCC CTA TAG GGA GCC CCC AAC CCT GCC	207	62	NC_000011
SUR2B	AGT AAA CCA TAT AAG AAG AAA TTT CTT CTT ATA TGG TTT ACT	241	60	NC_000012
GAPDH	AAC GGA TTT GGT CGT ATT GGG AAG ATG GTG ATG GGA TT	208	60	NG_007073

应用 Rotor-gene 6 软件进行相对定量分析, 绘制标准曲线, 以该标准曲线相对定量样本 cDNA 浓度, 用 K_{ATP} 与 GAPDH 的相对 cDNA 浓度比值反映不同处理因素下子宫平滑肌细胞 K_{ATP} mRNA 表达量。

1.4 免疫组织化学染色 取留存的子宫平滑肌标本约 1 cm \times 1 cm \times 1 cm, 10% 中性缓冲甲醛固定约 24 h; 固定好的组织经流水冲洗, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋; 石蜡包埋切片厚约 5 μ m, 经常规二甲苯脱蜡和乙醇置换后, 蒸馏水洗 5 min, 再 PBS 洗 5 min \times 3 次。将切片置于 pH 6.0 的柠檬酸缓冲液中, 微波修复 3 min。所用抗 Kir6.1、抗 Kir6.2 和抗 SUR2B 一抗均购自 DaKo 公司, 浓度均为 1:50, 并用正常羊血清抗体作为阴性对照。结果以胞质棕黄色颗粒状沉积为阳性, 背景无色, 胞核苏木精衬染为紫蓝色。

1.5 统计学处理 用 SPSS 软件对所有测定值进行平均值、标准差计算, 组间比较采用 *t* 检验, 并对组内数据进行多重比较分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-PCR 对子宫平滑肌 K_{ATP} 3 种亚基的测定 结果显示: K_{ATP} 通道的 3 种亚基(Kir6.1、Kir6.2 及 SUR2B) mRNA 在 TNL 组和 TL 组均有表达(图 1)。

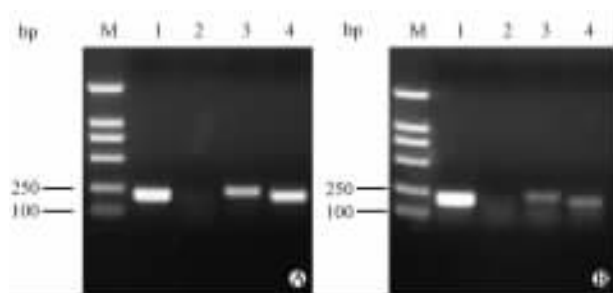


图 1 K_{ATP} 3 种亚基的 RT-PCR

产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳

A: 足月未临产(TNL)组; B: 足月临产(TL)组。M: DL2000 marker; 1: Kir6.1 RT-PCR 产物(211 bp); 2: 空白对照组; 3: SUR2B RT-PCR 产物(241 bp); 4: Kir6.2 RT-PCR 产物(207 bp)

2.2 通过实时定量 PCR 对子宫平滑肌 K_{ATP} 亚基 mRNA 含量的测定 TNL 组与 TL 组相比, SUR2B mRNA 的含量高于 TL 组($P < 0.05$); Kir6.2 mRNA 的含量也高于 TL 组, 但差异无统计学意义($P = 0.060$); 而 2 组 Kir6.1 差别无统计

学意义($P = 0.875$, 表 2)。

2.3 免疫组织化学染色对子宫平滑肌 K_{ATP} 亚基蛋白表达的测定 免疫组织化学方法观察了 3 种亚基的受体蛋白在 TNL 组和 TL 组中的表达和分布情况, 发现 Kir6.1、Kir6.2 和 SUR2B 在两组的子宫平滑肌细胞胞质中都有表达, 呈棕黄色颗粒分布(图 2)。

表 2 K_{ATP} 通道 3 种亚基在 TNL 组和 TL 组的表达

($n = 12, \bar{x} \pm s$)

亚基	TNL 组	TL 组
SUR2B/GAPDH	27.64 \pm 5.11*	4.68 \pm 0.75
Kir6.1/GAPDH	1.73 \pm 0.66	2.17 \pm 0.42
Kir6.2/GAPDH	8.71 \pm 1.81	1.25 \pm 0.51

TL: 足月临产; TNL: 足月未临产; * $P < 0.05$ 与 TL 组比较

3 讨论

人类子宫平滑肌细胞膜上存在着一系列的收缩相关蛋白, 这些蛋白在孕期大部分时间使子宫保持松弛状态, 分娩发动后即触发强烈的宫缩将胎儿娩出^[8]。这些收缩蛋白中就包括钾离子通道蛋白。临产后, 钾离子通道的分布和功能的变化使细胞容易去极化, 引起钙内流而导致收缩。而钾离子通道的激活剂可以使钾通道开放, 降低细胞兴奋性, 推迟分娩时间。K_{ATP} 就是其中的一种, 它的开闭直接受到胞内 ATP/ADP 的影响, 被认为是一种与细胞代谢状态密切相关的配体门控型离子通道。通过兴奋 K_{ATP} 能显著增加 K_{ATP} 的电流, 引起膜超极化, 促使平滑肌细胞舒张。K_{ATP} 是由 α 和 β 亚基按 1:1 比例, 以四聚体模式组成的八聚体复合物。 α 亚基是内向整流钾通道(inward rectifier K⁺ channel, Kir), β 亚基是磺酰脲类受体(sulfonylurea receptor, SUR)。Kir 包括 Kir6.1 和 Kir6.2, 4 个 Kir 构成孔道区域。SUR 决定 K_{ATP} 的功能和对代谢应激的敏感性。SUR 可以分为 SUR1、SUR2 两种亚基, SUR2 又分为 SUR2A、SUR2B、SUR2C 3 种亚基。 α 和 β 亚基分别单独表达时不能形成功能性的离子通道, 只有同时表达, 才能形成功能性通道。目前已发现至少 3 种组织类型的 K_{ATP} 亚基: Kir6.2/SUR2A 主要分布在心肌和骨骼肌, Kir6.2/SUR1 分布在胰腺, Kir6.1 或 Kir6.2/SUR2B 主要分布在平滑肌。不同组织的 K_{ATP} 的分布和功能均不相同^[9]。K_{ATP} 与细胞兴奋性和收缩的降低有密切关系, 但是它在人类子宫平滑肌中的具体生理作用还不是很清楚^[10]。本研究显示, 在人类临产和未临产子宫平滑肌中, Kir6.1、

Kir6.2和SUR2B 3种亚基均有表达。TL组中SUR2B含量与TNL组相比明显下降。免疫组织化学染色结果清楚地显示了在人类临产和未临产子宫平滑肌中,Kir6.1、Kir6.2和

SUR2B亚基蛋白均有表达,但是由于这些蛋白表达于细胞质中,且呈弥散阳性,我们无法测定其临产和未临产状态下3种亚型蛋白表达有无差异。

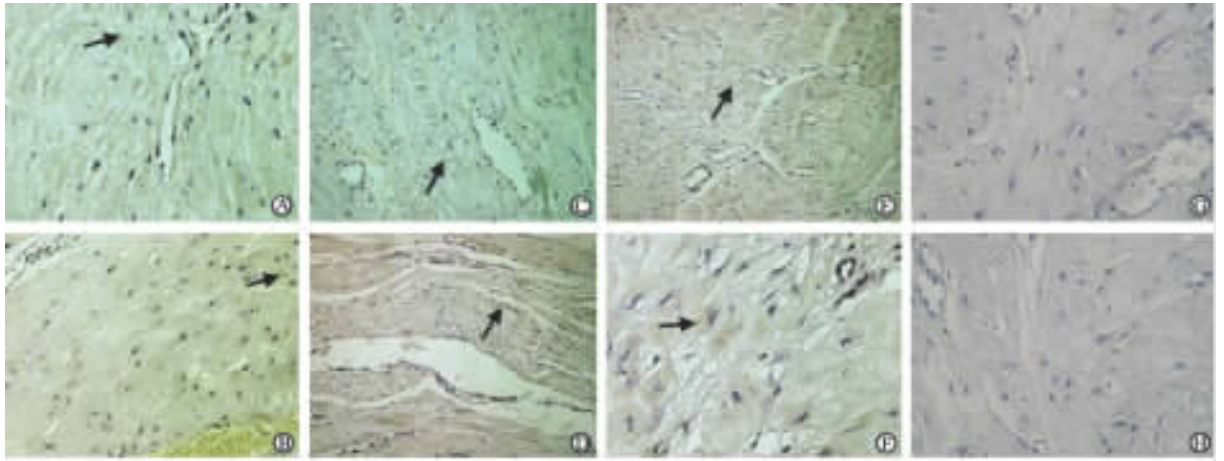


图2 Kir6.1、Kir6.2、SUR2B蛋白在未临产和临产子宫平滑肌中的表达

A,C,E: TNL组中Kir6.1、Kir6.2和SUR2B蛋白的表达; B,D,F: TL组中Kir6.1、Kir6.2和SUR2B蛋白的表达; G,H: 阴性对照;箭头指示阳性表达。Original magnification: ×400

Sawada等^[5]通过RNA印迹在大鼠的离体子宫肌上观察到:Kir6.1的mRNA表达水平在未孕时上升,在分娩前下降,Kir6.1和SUR2的含量在怀孕期间上调,在临产前下调,表明 K_{ATP} 的含量在孕晚期时是下降的。Curley等^[6]报道在人类未孕子宫平滑肌上,Kir6.1、SUR2B、SUR1的表达含量明显高于妊娠子宫平滑肌;在孕晚期的时候,Kir6.1和SUR2B的表达水平降低,远远低于非孕时。本研究发现,TL组中,SUR2B和Kir6.2表达含量明显下降,低于未临产时,Kir6.1的变化则不明显。因此我们推测,在人类的妊娠子宫平滑肌上,主要是通过SUR2B和Kir6.2水平的改变从而而影响 K_{ATP} 通道的敏感性及功能,起到调节平滑肌收缩的作用。Kir6.2和SUR2B的表达水平在妊娠期间上调,起到抑制宫缩、静息子宫的作用,当临产时其含量下降,对宫缩的抑制作用减弱,从而启动分娩。

本实验结果提示,妊娠不同状态的子宫平滑肌中 K_{ATP} 通道的变化和平滑肌兴奋性改变之间有重要的联系。 K_{ATP} 通道的这种特点可能对于预防早产具有重要作用^[11]。有研究发现,由ATP敏感性钾通道开放剂吡那地尔所产生的宫缩抑制作用在临产组要明显强于早产组,这提示了子宫肌层中 K_{ATP} 的上调产生的逐渐增强的抑制作用对于维持子宫静息具有重要作用。 K_{ATP} 对子宫肌收缩抑制作用的减弱可能是分娩发动的一个必要因素^[12]。在我们的研究中显示,临产后SUR2B和Kir6.2的表达下调,SUR2B和Kir6.2也许可以作为深入研究宫缩抑制剂的一个靶点。

[参考文献]

[1] Noma A. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscles[J]. Nature,1983,305:147-148.
 [2] Aguilar-Bryan L, Bryan J. Molecular biology of adenosine

triphosphate-sensitive potassium channels [J]. Endocr Rev, 1999,20:101-135.
 [3] 朱庆磊,汪海,肖文彬. ATP敏感性钾通道分子结构和功能的组织特异性研究进展[J]. 中国药理学通报,2001,17:121-127.
 [4] 任亚军,佟晓永,王晓良. ATP敏感钾通道亚单位在大鼠组织中的表达[J]. 中国药理学通报,2000,16:148-150.
 [5] Sawada K, Morishige K, Hashimoto K, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y, et al. Gestational change of K^+ channel opener effect is correlated with the expression of uterine K_{ATP} channel subunits[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol,2005,122:49-56.
 [6] Curley M, Cairn M T, Friel A M, McMeel O M, Morrison J J, Smith T J. Expression of mRNA transcripts for ATP-sensitive potassium channels in human myometrium[J]. Mol Hum Reprod,2002,8:941-945.
 [7] Wray S. Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation[J]. Am J Physiol,1993,264(1 Pt 1):C1-C18.
 [8] Roger S. Parturition[J]. N Engl J Med,2007,356:271-283.
 [9] 段燕红,陈付学. ATP敏感钾通道的结构、功能及其调制[J]. 医学分子生物学杂志,2007,4:54-58.
 [10] Khan R N, Matharoo-Ball B, Arulkumaran S, Ashford M L. Potassium channels in the human myometrium[J]. Exp Physiol, 2001,86:255-264.
 [11] Aguilar-Bryan L, Clement J P 4th, Gonzalez G, Kunjilwar K, Babenko A, Bryan J. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels[J]. Physiol Rev,1998,78:227-245.
 [12] Longo M, Jain V, Vedernikov Y P, Hankins G D, Garfield R E, Saade G R. Effects of L-type Ca^{2+} -channel blockade, K_{ATP} -channel opening and nitric oxide on human uterine contractility in relation to gestational age and labour[J]. Mol Hum Reprod, 2003,9:159-164.