

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.28.004

文章编号: 1005-8982(2018)28-0021-07

慢性低氧状态对肾小球足细胞高通量钙激活钾通道表达和功能的影响*

张蕊, 张威, 刘国建, 鲍运霞

(哈尔滨医科大学附属第二医院 肾内科, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: **目的** 探讨慢性低氧对人肾小球足细胞高通量钙激活钾通道(BK通道)表达和功能的影响,及其在慢性肾脏病进展中的作用。**方法** 分化完全的条件永生性人类足细胞分别置于常氧(21% O₂)和低氧(10%或2% O₂)条件下培养6~48 h,采用实时聚合酶链反应(real-time PCR)和Western blot检测足细胞BK通道 α 、 β 3及 β 4亚基的表达;用电生理膜片钳技术记录全细胞模式下足细胞BK通道功能的变化。**结果** 电生理研究结果显示低氧环境(2% O₂ 24 h)中,足细胞BK通道在+80 mV电压刺激下的电流水平由(14.45±2.06) pS下降至(4.78±1.12) pS,差异有统计学意义($P < 0.05$),且通道激活的时间常数由(4.59±1.67)增加至(25.16±11.04) ($P < 0.05$);分子生物学研究提示在低氧条件(2% O₂ 24 h)下足细胞BK通道的 β 4亚基水平升高,且表现为时间依赖性和剂量依赖性。**结论** 慢性低氧通过上调 β 4亚基表达抑制BK通道活性。

关键词: 缺氧;足细胞;钙激活钾通道

中图分类号: R692.3

文献标识码: A

Influence of chronic hypoxia on expression and function of high-flux Ca²⁺-activated K⁺ channel in cultured human glomerular podocytes*

Rui Zhang, Wei Zhang, Guo-jian Liu, Yun-xia Bao

(Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: Objective To explore the influence of chronic hypoxia on expression and function of high-flux Ca²⁺-activated K⁺ channel (BK channel) in human glomerular podocytes, and to evaluate its roles in the progression of chronic kidney diseases (CKD). **Methods** A fully-differentiated and conditionally-immortalized human podocyte cell line was placed into the normoxic (21% O₂) or hypoxic (2% O₂ or 10% O₂) environment in a duration of 6 to 48 h. The expressions of α , β 3 and β 4 subunits of BK channels were detected with real-time PCR and Western blot. The changes of BK channel function in podocytes under whole-cell model were examined by the patch clamp technique. **Results** Exposure of podocytes to 2% O₂ for 24 h caused a significant reduction in currents at +80 mV from (14.45 ± 2.06) pS to (4.78 ± 1.12) pS ($P < 0.05$). Chronic hypoxia also caused a marked increase in the time constant for BK channel activation from (4.59 ± 1.67) to (25.16 ± 11.04) with significant difference ($P < 0.05$). The total expression of β 4 subunit of BK channel significantly increased in a time- and dose-dependent manner. **Conclusions** Chronic hypoxia inhibits BK channel current by upregulating β 4 subunit expression.

Keywords: hypoxia, podocyte, Ca²⁺-activated K⁺ channel

收稿日期: 2018-02-11

* 基金项目: 黑龙江省青年科学基金项目 (No: QC2013C114)

慢性低氧是各种肾脏疾病进展至终末期肾脏病 (end stage renal disease, ESRD) 的共同途径^[1-2]。以往的研究大多关注低氧引起的肾小管间质损害, 却较少提及肾小球的低氧性损伤。最近的研究表明肾小球足细胞的低氧性调节可能引起足细胞裂孔蛋白 CD2AP 等水平下降, 足细胞骨架蛋白 F-actin 重组, 并参与肾小球硬化的发展^[3-4]。足细胞是肾小球滤过屏障的关键组成部分, 能通过改变足突间裂隙膜的孔径调节肾小球滤过率, 足细胞损伤可引起肾小球滤过率下降和蛋白尿产生^[5-6]。已有研究证实, 低氧条件下足细胞内低氧诱导因子 (hypoxia induced transcription factor, HIFs) 水平升高, 通过调控足细胞重要功能基因的转录改变细胞的结构和功能^[4-7]。此结果提示慢性低氧可能通过足细胞调节机制参与肾小球损伤和硬化的发展^[7], 但是其具体机制尚不清楚。

高通量钙激活钾通道 (简称 BK 通道) 是最早发现的氧敏感性离子通道之一^[8-9], 在可兴奋性细胞中, BK 通道低氧性抑制引起细胞膜去极化, 激活电压依赖性钙通道, 导致大量 Ca^{2+} 内流, 引发细胞的低氧适应性改变, 从而参与多种组织细胞的低氧性调节^[10-12]。本研究组设想 BK 通道参与足细胞低氧的适应性调节。为证明这项假设, 笔者观察了低氧对人类足细胞 BK 通道表达和功能的影响, 同时对低氧状态下 BK 通道调节的可能机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 研究对象

由于肾小球足细胞为终末分化细胞, 只有分化完全后才能行使正常生理功能, 因此本研究组选择条件永生性人类足细胞系作为研究对象。此类细胞系特殊转入了温度敏感性基因, 在 33℃ 培养时处于增殖状态, 转入 37℃ 培养后无需改变培养基成分即停止增殖并开始分化。继续培养 11 ~ 14 d 足细胞可达完全分化, 具有类似人类足细胞的生理结构和功能。

1.2 实验材料

RPMI 1640 (美国 HyClone 公司), 胰岛素、转铁蛋白及亚硒酸钠混合液 (insulin, transferrin and sodium selenite, ITS) (美国 Sigma 公司), 10% FBS (美国 HyClone 公司)。cDNA 转录试剂盒 (美国 ABI 公司), SYBR Green PCR Master Mix 体系 (美国 ABI 公司), ABI PRISM 7500 系统 (美国 ABI 公司)。BCA 蛋白

测定试剂盒 (美国 Pierce 公司), BK 通道 α 、 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 亚基抗体 (英国 Abcam 公司) 或 actin 抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG 的荧光二抗 (美国 Invitrogen 公司), Odyssey infrared 成像系统 (美国 Li-COR 公司)。电生理实验的所有试剂 (美国 Sigma 公司), 倒置显微镜 (日本 Nikon 公司), 电极拉制仪 P-97 (美国 Sutter 公司), Axo-patch 200B 系统 (美国 Axon 公司), Digidata 1440A interface 系统 (美国 Axon 公司), pClamp 10.2 软件 (美国 Axon 公司), Graphpad prism 5 软件 (美国 GraphPad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养、低氧处理及实验分组 条件永生性人类足细胞系增殖及分化所需培养基成分包括 RPMI 1640, ITS 和 10% FBS, 其中 ITS 能够促进足细胞的增殖及分化, 为培养所必需。可根据实验设计将分化完全的足细胞分为 3 组, 分别置于正常氧气浓度 (21% O_2) 和低氧条件 (10% 或 2% O_2) 的孵箱中进行培养^[8, 13-15]。正常氧浓度孵箱内气体成分为 21% O_2 , 5% CO_2 , 其余由 N_2 补充。低氧孵箱内气体成分为 10% 或 2% O_2 , 5% CO_2 , 其余由 N_2 补充。在培养的第 6、12、24 和 48 h 逐步取出各组细胞, 分别进行 PCR 检测, Western blot 检测和膜片钳实验, 测定各组细胞 BK 通道 α 、 $\beta 3$ 及 $\beta 4$ 亚基基因和蛋白的表达水平, 同时记录 BK 通道开放电流, 比较各组细胞在常氧和低氧条件培养不同时间点 BK 通道表达和功能状态, 观察低氧条件对足细胞 BK 通道表达和功能的影响, 从而为慢性肾脏病引起的肾小球缺氧状态和足细胞缺氧性 BK 通道功能调节提供理论依据。另取两组常氧浓度培养并分化完全的足细胞, 分别加入二甲基烯丙基氧甘氨酸 (DMOG, 1 mmol/L) 或氯化钴 ($CoCl_2$, 100 μ mol/L), 制作化学缺氧模型, 测定 BK 通道亚基和蛋白表达水平, 记录通道电流, 比较其与常氧对照组细胞 BK 通道功能和表达的不同。另取两组常氧培养的足细胞, 在放入低氧孵箱前分别向培养液中加入还原剂谷胱甘肽乙酯 (GSH, 1 mmol/L) 或过氧化氢酶 (Catalase, 200 u/ml), 比较其与低氧培养组细胞 BK 通道亚基表达和功能的不同, 分析其是否参与氧化应激机制。

1.3.2 Real-time PCR 将 10 μ l 的反应混合物放入逆转录系统中。这个过程所使用的 RNA 总量为 0.5 mg, 并应用高效能 cDNA 逆转录试剂盒进行 cDNA 的初始合成。所有的 real-time PCR 实验都应用 SYBR Green

PCR Master Mix 体系, 并在 ABI PRISM 7500 系统中完成。BK 通道蛋白基因的引物序列如下, KCNMA1 正向引物: 5'-AACCCGCCCTATGAGTTTG-3', 反向引物: 5'-GGATGGGATGGAGTGAACAG-3'; KCNMB3 正向引物: 5'-GAGAGGACCGAGCCGTGAT-3', 反向引物: 5'-CACCACCTAGCAGAGTCAGTGAAG-3'; KCNMB4 正向引物: 5'-GCGTTCTCATTGTGGTCC-3', 反向引物: 5'-TTCCAGTTGTGCCTGTTTC-3'。扩增后的成分由 ABI Prism genetic analyzer 进行分析。

1.3.3 Western blot 分化完全的足细胞用冰 PBS 液冲洗后, 经 3 000 r/min 离心 10 min, 放入含有 1% 蛋白酶抑制剂的溶液中用于蛋白提取。细胞裂解产物需在冰上培养 15 min, 之后以 13 500 r/min 离心 15 min。用 BCA 蛋白测定试剂盒对总蛋白含量进行定量分析。随后蛋白样本需进行 10% SDS PAGE 凝胶电泳, 分离后的蛋白质转至硝酸纤维素膜上。转膜后将硝酸纤维素膜在室温下用 5% 脱脂奶封闭 2 h, 随后选择合适的一抗进行孵育: BK 通道 α 、 $\beta 3$ 和 $\beta 4$ 亚基抗体 (1 : 200) 或 actin 抗体 (1 : 500)。冲洗后将硝酸纤维素膜与羊抗兔 IgG 或羊抗鼠 IgG 的荧光二抗 (1 : 10 000) 进行培养。最后使用 Odyssey infrared 成像系统对条带吸光度进行分析。

1.3.4 电生理记录 BK 通道电流以全细胞模式进行膜片钳记录, 微电极使用毛细硅硼玻璃管在电极控制仪 P-97 上控制完成, 所有实验均在室温 (20 ~ 22°C) 下进行。在全细胞记录模式下, 细胞内液成分为 15 mmol/L KCl, 130 mmol/L K aspartate, 1 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Hepes 及 5.76 mmol/L CaCl₂ (游离 Ca²⁺ 浓度 200 nmol/L); 用 KOH 调节 pH 值至 7.2。标准浴液成分包括 145 mmol/L NaCl, 4.5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 2 mmol/L CaCl₂ 及 10 mmol/L Hepes; 用 NaOH 调节 pH 值至 7.4。传代在 5 ~ 15 代之间的完全分化足细胞用于检测。细胞的钳制电压设定为 -60 mV, 记录电压在 -80 ~ +80 mV 之间波动时通道电流的变化。每 20 mV 记录 1 次, 每次记录时间为 700 ms。电流由 Axo-patch 200B 系统放大并经 1 kHz 频率滤波后, 通过 Digidata 1440A interface 系统进行在线记录。最后应用 pClamp 10.2 软件获取数据并进行分析。电导率数据以 G/Gmax 表示且符合 Boltzmann 方程。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0、Photoshop 及 Graphpad prism 5 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间的比较采用单因素方差分析, 两组比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BK 通道电流的确定

通道的反转电位约为 -60 mV, 接近 K⁺ 平衡电位 (细胞内外的 K⁺ 浓度分别为 145.0 和 4.5 mmol/L)。将细胞内 Ca²⁺ 浓度由 200 nmol/L 提高至 5 μ mol/L 时, 通道的外向电流水平明显增加 (见图 1A)。在细胞外液中加入非选择性 K⁺ 通道阻断剂 TEA (5 mmol/L) 后, +80 mV 电压下的电流水平下降至 41%; 加入选择性 BK 通道阻断剂 Penitrem A (100 nmol/L)^[6] 后, 通道电流下降至 29% (见图 1B)。由此证实诱发的通道电流完全由 BK 通道开放所引起。见表 1 ~ 3。

2.2 慢性低氧对足细胞 BK 通道电流的抑制

低氧条件 (2% O₂ 24 h) 下, 足细胞 BK 通道在 +80 mV 电压刺激下的电流水平由 (14.45 \pm 2.06) pS 下降至 (4.78 \pm 1.12) pS, 差异有统计学意义 (*P* < 0.05), 且足细胞的活性无明显变化。见图 2A、2B 及表 4。

2.3 慢性低氧上调足细胞 BK 通道 $\beta 4$ 亚基 mRNA 及蛋白表达对 α 和 $\beta 3$ 亚基表达的影响

低氧条件 (2% O₂ 24 h) 下足细胞 BK 通道 $\beta 4$ 亚基 mRNA (B4) 水平升高, 而 α 和 $\beta 3$ 亚基 mRNA (A1 和 B3) 表达无明显变化 (见图 3A)。 $\beta 4$ 亚基 mRNA 自低氧 6 h 起开始升高, 低氧 12 ~ 24 h 达峰值, 在低氧 48 h 时有所下降。与基因表达情况类似, 低氧条件下 (2% O₂ 24 h) BK 通道 $\beta 4$ 亚基表达增加 (见图 3B 和表 5)。

2.4 氧化应激反应参与低氧诱导的 BK 通道 $\beta 4$ 亚基表达上调

细胞培养液中加入 DMOG (1 mmol/L) 或 CoCl₂ (100 μ mol/L) 孵育 24 h 并未明显改变 BK 通道 $\beta 4$ 亚基 mRNA 的表达 (见图 4A)。低氧条件下细胞外液中加入还原剂谷胱甘肽乙酯 (GSH, 1 mmol/L) 或过氧化氢酶 (Catalase, 200 u/ml) 明显降低低氧引起的 $\beta 4$ 亚基 mRNA 水平升高。见图 4B 和表 6、7。

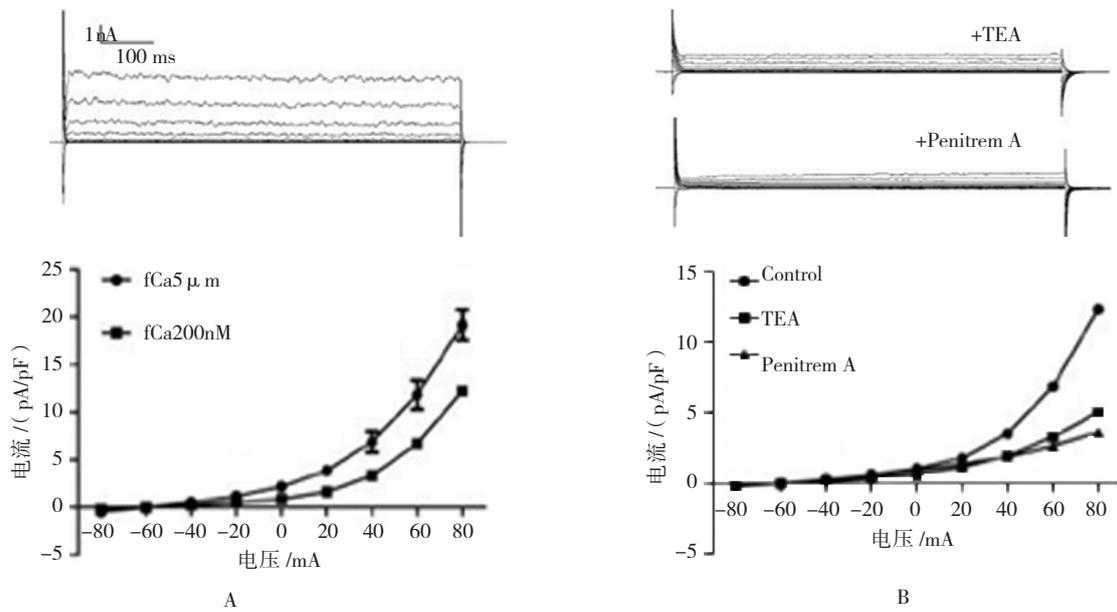


图 1 人类肾小球足细胞 BK 通道电流的记录

表 1 不同游离钙浓度对 BK 通道电流的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 电压值 | 电流值 | | t 值 | P 值 |
|--------|----------------|----------------|-------|-------|
| | 游离钙 200 nmol/L | 游离钙 5 μmol/L | | |
| -80 mV | -0.225 ± 0.132 | -0.204 ± 0.200 | 0.288 | 0.776 |
| -60 mV | 0.005 ± 0.054 | -0.015 ± 0.087 | 0.663 | 0.515 |
| -40 mV | 0.253 ± 0.136 | 0.470 ± 0.173 | 3.155 | 0.005 |
| -20 mV | 0.536 ± 0.272 | 1.039 ± 0.408 | 3.385 | 0.003 |
| 0 mV | 0.937 ± 0.422 | 1.749 ± 0.647 | 3.480 | 0.003 |
| 20 mV | 1.686 ± 0.574 | 3.291 ± 1.393 | 3.787 | 0.001 |
| 40 mV | 3.369 ± 0.777 | 6.166 ± 3.064 | 3.288 | 0.004 |
| 60 mV | 6.685 ± 0.976 | 11.838 ± 4.025 | 4.635 | 0.000 |
| 80 mV | 12.171 ± 1.464 | 19.168 ± 4.279 | 5.613 | 0.000 |

表 2 TEA 对 BK 通道电流的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 电压值 | 电流值 | | t 值 | P 值 |
|--------|----------------|----------------|--------|-------|
| | 对照组 | TEA 组 | | |
| -80 mV | -0.211 ± 0.130 | -0.175 ± 0.104 | 0.543 | 0.597 |
| -60 mV | 0.028 ± 0.047 | -0.018 ± 0.035 | 1.886 | 0.084 |
| -40 mV | 0.286 ± 0.143 | 0.110 ± 0.071 | 2.542 | 0.026 |
| -20 mV | 0.586 ± 0.278 | 0.350 ± 0.110 | 1.797 | 0.098 |
| 0 mV | 1.000 ± 0.396 | 0.581 ± 0.179 | 2.216 | 0.047 |
| 20 mV | 1.787 ± 0.428 | 1.115 ± 0.167 | 3.325 | 0.006 |
| 40 mV | 3.527 ± 0.427 | 1.939 ± 0.299 | 7.319 | 0.000 |
| 60 mV | 6.873 ± 0.607 | 3.285 ± 0.352 | 12.010 | 0.000 |
| 80 mV | 12.380 ± 1.139 | 5.041 ± 0.372 | 13.788 | 0.000 |

表 3 Penitrem A 对 BK 通道电流的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 电压值 | 电流值 | | t 值 | P 值 |
|--------|----------------|----------------|--------|-------|
| | 对照组 | Penitrem A 组 | | |
| -80 mV | -0.211 ± 0.130 | -0.258 ± 0.181 | 0.527 | 0.609 |
| -60 mV | 0.028 ± 0.047 | -0.002 ± 0.046 | 1.055 | 0.314 |
| -40 mV | 0.286 ± 0.143 | 0.280 ± 0.135 | 0.073 | 0.943 |
| -20 mV | 0.586 ± 0.278 | 0.561 ± 0.183 | 0.165 | 0.872 |
| 0 mV | 1.000 ± 0.396 | 0.903 ± 0.287 | 0.439 | 0.669 |
| 20 mV | 1.787 ± 0.428 | 1.333 ± 0.404 | 1.793 | 0.100 |
| 40 mV | 3.527 ± 0.427 | 1.896 ± 0.544 | 5.874 | 0.000 |
| 60 mV | 6.873 ± 0.607 | 2.642 ± 0.684 | 11.197 | 0.000 |
| 80 mV | 12.380 ± 1.139 | 3.619 ± 0.709 | 14.027 | 0.000 |

表 4 低氧对足细胞 BK 通道电流的影响 ($\bar{x} \pm s$)

| 电压值 | 电流值 | | t 值 | P 值 |
|--------|----------------|----------------|--------|-------|
| | 常氧浓度 | 低氧浓度 | | |
| -80 mV | -0.277 ± 0.203 | -0.088 ± 0.042 | 2.403 | 0.028 |
| -60 mV | 0.114 ± 0.189 | 0.103 ± 0.145 | 0.130 | 0.896 |
| -40 mV | 0.520 ± 0.560 | 0.030 ± 0.047 | 2.283 | 0.036 |
| -20 mV | 0.990 ± 0.876 | 0.002 ± 0.002 | 2.948 | 0.009 |
| 0 mV | 1.532 ± 1.222 | 0.169 ± 0.186 | 2.897 | 0.010 |
| 20 mV | 2.571 ± 1.598 | 0.690 ± 0.578 | 2.972 | 0.009 |
| 40 mV | 4.629 ± 1.793 | 1.441 ± 1.099 | 4.234 | 0.001 |
| 60 mV | 8.135 ± 1.899 | 2.091 ± 1.355 | 7.359 | 0.000 |
| 80 mV | 13.807 ± 2.272 | 3.504 ± 1.591 | 10.530 | 0.000 |

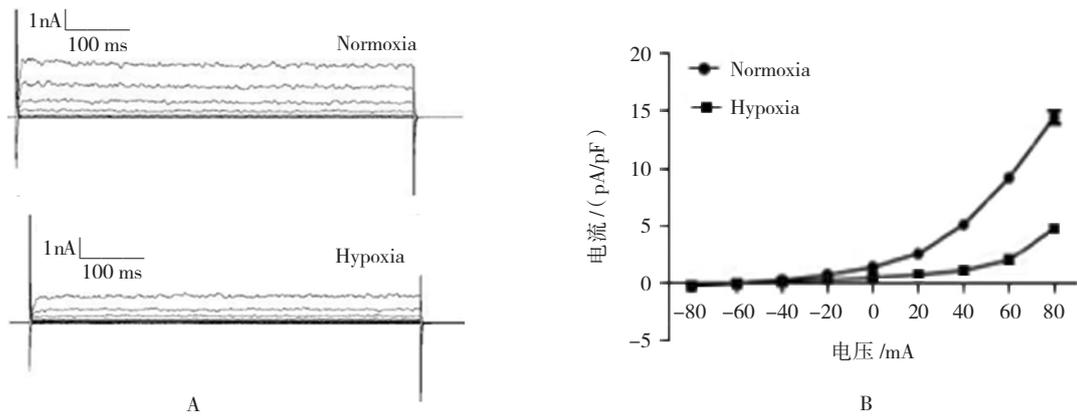


图 2 慢性缺氧抑制人类肾小球足细胞 BK 通道电流

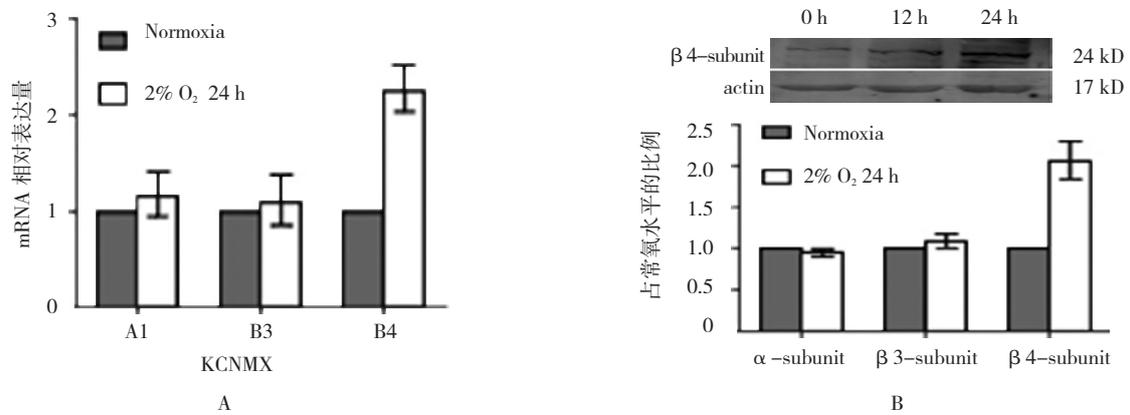


图 3 慢性缺氧对 BK 通道亚基 mRNA 和蛋白表达的影响

表 5 慢性缺氧对 BK 通道亚基 mRNA 和蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s$)

| mRNA 和亚基 | 表达量 | | t 值 | P 值 |
|-------------|----------------|----------------|-------|-------|
| | 常氧浓度 | 低氧浓度 | | |
| KCNMA1 | 1.445 ± 0.527 | 0.944 ± 0.606 | 1.248 | 0.259 |
| KCNMB3 | 1.075 ± 0.406 | 1.146 ± 0.373 | 0.257 | 0.806 |
| KCNMB4 | 1.447 ± 0.692 | 4.137 ± 1.359 | 3.529 | 0.012 |
| α-subunit | 3.900 ± 1.271 | 4.109 ± 1.132 | 0.245 | 0.815 |
| β 3-subunit | 13.286 ± 1.553 | 13.846 ± 0.907 | 0.622 | 0.557 |
| β 4-subunit | 6.511 ± 1.459 | 11.497 ± 2.188 | 3.791 | 0.009 |

表 6 DMOG 和 CoCl₂ 对 β 4 亚基 mRNA 表达的影响
($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | mRNA 表达量 | F 值 | P 值 |
|---------------------|---------------|-------|-------|
| 常氧对照组 | 7.274 ± 0.335 | | |
| DMOG 组 | 7.420 ± 0.342 | 0.415 | 0.678 |
| CoCl ₂ 组 | 7.178 ± 0.307 | | |

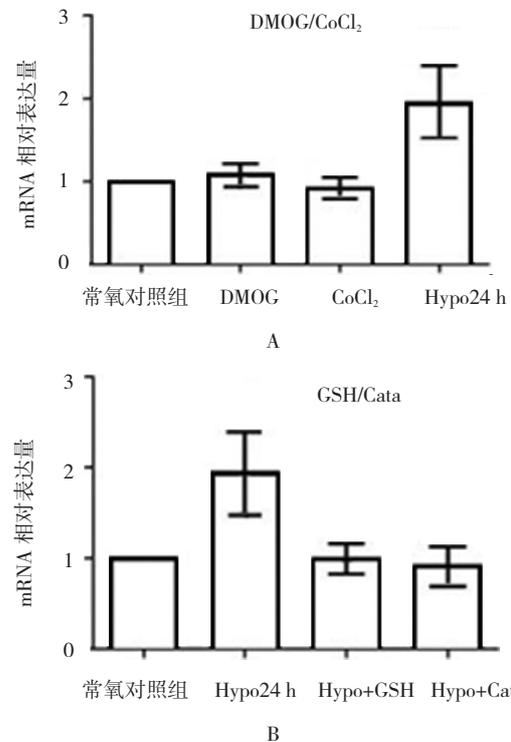


图 4 氧化应激反应参与缺氧诱导的 β 4 亚基 mRNA 表达上调

表 7 GSH 和 Cata 对 $\beta 4$ 亚基 mRNA 低氧性上调的影响
($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | mRNA 表达量 | F 值 | P 值 |
|-------------|-------------------|-------|-------|
| 常氧对照组 | 7.754 \pm 0.475 | | |
| Hypo+GSH 组 | 7.803 \pm 0.415 | 0.047 | 0.954 |
| Hypo+Cata 组 | 7.637 \pm 0.998 | | |

3 讨论

足细胞低氧性损伤在肾小球疾病的进展中具有重要作用^[6]。BK 通道被认为是参与低氧反应的关键角色。大多数组织中 BK 通道表现为低氧性功能抑制,如颈动脉体、动脉平滑肌细胞、中枢神经元和心肌细胞等。在这些组织细胞中,缺氧性 BK 通道抑制引起细胞膜去极化,从而激活电压依赖式钙通道,继而导致大量 Ca^{2+} 内流,引发细胞的缺氧适应性改变。本研究表明在肾小球足细胞中,低氧可引起 BK 通道功能抑制,电流水平明显降低。

BK 通道主要由成孔 α 亚基和调节性 β 亚基构成。目前为止已经克隆出哺乳动物 BK 通道的 4 种 β 亚基, $\beta 1 \sim \beta 4$ 亚基分别由相应的 KCNMB 1~4 所编码。人类足细胞 BK 通道由 α 、 $\beta 3$ 及 $\beta 4$ 亚基组成。本研究分子生物学结果表明慢性缺氧环境可以引起足细胞 BK 通道 $\beta 4$ 亚基 mRNA 和蛋白表达水平上调,而对 BK 通道的成孔 α 亚基和调节性 $\beta 3$ 亚基的表达无明显影响,提示低氧可能通过上调 $\beta 4$ 亚基表达抑制足细胞 BK 通道功能。此结果与脑组织中的 BK 通道低氧性调节类似^[17]。神经元的 $\beta 4$ 亚基被认为是 BK 通道的“下调因子”,可以使通道激活电压向去极化方向移动,减慢 BK 通道的激活动力学过程。同样在心肌细胞和动脉平滑肌细胞中 β 亚基也参与了低氧诱导的 BK 通道活性抑制^[17-19]。因此,研究结果提示低氧通过上调 $\beta 4$ 亚基表达抑制足细胞 BK 通道功能。同时本研究组还发现用还原剂 GSH 和 Catalase 预处理的足细胞显著降低低氧诱导的 BK 通道 $\beta 4$ 亚基表达上调,提示 ROS 激活参与了足细胞 BK 通道 β 亚基表达的低氧性调节。以上数据提示慢性缺氧对 $\beta 4$ 亚基表达的影响至少发生在转录水平^[20]。几乎所有的细胞类型对于慢性缺氧(数小时至数天)的适应性反应都依赖于影响多种基因表达水平的转录机制。然而对于影响 BK 通道重塑过程(包括亚基的翻译、装配、转运,以及以上过程的组合形式)的多种机制还不清楚。

虽然本研究组的结果表明低氧对 α 亚基表达无明显影响,但是许多其他研究提示 α 亚基参与 BK 通道的低氧性调节。BK 通道 α 亚基的羧基端上具有血红素结合保守序列,可以与血红素直接结合^[21-22]。另外, BK 通道 α 亚基与血红素加氧酶 2 (HO-2) 相关联,HO-2 使血红素在有氧条件下与 NADPH 细胞色素 P450 还原酶结合产生一氧化碳 NO。NO 可以直接提高原位和重组 BK 通道的活性。而低氧条件降低了 NO 的有效性,从而导致通道关闭。因此 HO-2 被认为是 BK 通道的酶联氧感受器^[20, 23]。与酶联机制不同, BK 通道也可以被细胞内 Ca^{2+} 浓度的瞬间变化(Ca^{2+} 火花)激活。 Ca^{2+} 火花可以使肌浆网内的 Ca^{2+} 浓度以微摩尔的级别增加,从而迅速达到激活 BK 通道的水平^[24]。对脑动脉平滑肌细胞^[25]和稳定表达 BK 通道 α 亚基和 β 亚基的 HEK293 细胞^[26]进行内面向外式膜片钳记录发现,在不添加任何酶类底物的情况下,缺氧以细胞内 Ca^{2+} 依赖的模式抑制 BK 通道活性。这些数据提示缺氧通过非膜限制机制减少 Ca^{2+} 火花和 BK 通道的有效耦联,进而引起 BK 通道活性抑制。但是也有人提出 BK 通道对氧浓度敏感性的保持是由于在通道蛋白羧基端的压力调节性外显子中有一段高度保守的富含半胱氨酸的序列^[10]。本研究中低氧对足细胞 BK 通道 α 亚基表达无明显影响,可能与笔者检测的通道蛋白为细胞总蛋白有关。因此本研究组将进一步测定细胞膜 BK 通道 α 亚基的表达,从而明确其在足细胞缺氧性调节中的作用。

参 考 文 献:

- [1] MIMURA I, NANGAKU M. The suffocating kidney: tubulointerstitial hypoxia in end-stage renal disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6(11): 667-678.
- [2] OW C P, ABDELKADER A, HILLIARD L M, et al. Determinants of renal tissue hypoxia in a rat model of polycystic kidney disease[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2014, 307(10): R1207-1215.
- [3] NARITA I, SHIMADA M, YAMABE H, et al. NF-kappaB-dependent increase in tissue factor expression is responsible for hypoxic podocyte injury[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2016, 20(5): 679-688.
- [4] NEUSSER M A, LINDENMEYER M T, MOLL A G, et al. Human nephrosclerosis triggers a hypoxia-related glomerulopathy[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(2): 594-607.
- [5] GRAHAMMER F, BENZING T, and HUBER T B. New insights into mechanisms of glomerular injury and repair from the 10th International Podocyte Conference 2014[J]. *Kidney Int*, 2015,

- 87(5): 885-893.
- [6] CELLESI F, LI M, and RASTALDI M P. Podocyte injury and repair mechanisms[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2015, 24(3): 239-244.
- [7] BAUMANN B, HAYASHIDA T, LIANG X, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha promotes glomerulosclerosis and regulates COL1A2 expression through interactions with Smad3[J]. *Kidney Int*, 2016, 90(4): 797-808.
- [8] LIU H, MOCZYDLOWSKI E, and HADDAD G G. O₂ deprivation inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channels via cytosolic factors in mice neocortical neurons[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(5): 577-588.
- [9] RIESCO-FAGUNDO A M, PEREZ-GARCIA M T, GONZALEZ C, et al. O₂ modulates large-conductance Ca²⁺-dependent K⁺ channels of rat chemoreceptor cells by a membrane-restricted and CO₂-sensitive mechanism[J]. *Circ Res*, 2001, 89(5): 430-436.
- [10] MCCARTNEY C E, MCCLAFFERTY H, HUIBANT J M, et al. A cysteine-rich motif confers hypoxia sensitivity to mammalian large conductance voltage- and Ca-activated K (BK) channel alpha-subunits[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(49): 17870-17876.
- [11] 吴曙辉, 刘丹, 阎勇, 等. 大电导钙激活钾通道参与缺氧致前庭内侧核神经元兴奋性异常 [J]. *听力学及言语疾病杂志*, 2017, 25(1): 44-48.
- [12] 朱艳, 侯晓钰, 傅晓冬. 重度子痫前期胎盘小动脉血管平滑肌细胞 BKCa 通道的改变 [J]. *泸州医学院学报*, 2016, 39(5): 471-475.
- [13] HARVEY T W, ENGEL J E, and CHADE A R. Vascular endothelial growth factor and podocyte protection in chronic hypoxia: Effects of endothelin-a receptor antagonism[J]. *Am J Nephrol*, 2016, 43(2): 74-84.
- [14] 梁立峰, 张惠莉, 罗朋立, 等. 低氧、高糖对肾小球内皮细胞膜表面多糖-蛋白复合物厚度影响的分析 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2015, 23(12): 1103-1105.
- [15] 王妍君, 罗朋立. 低氧环境下小鼠肾小球内皮细胞通透性的变化及其机制 [J]. *山东医药*, 2016, 56(31): 31-33.
- [16] KNAUS H G, MCMANUS O B, LEE S H, et al. Tremorgenic indole alkaloids potently inhibit smooth muscle high-conductance calcium-activated potassium channels[J]. *Biochemistry*, 1994, 33(19): 5819-5828.
- [17] CASTILLO K, CONTRERAS G F, PUPO A, et al. Molecular mechanism underlying beta1 regulation in voltage- and calcium-activated potassium (BK) channels[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(15): 4809-4814.
- [18] BAUTISTA L, CASTRO M J, LOPEZ-BARNEO J, et al. Hypoxia inducible factor-2 alpha stabilization and maxi-K⁺ channel beta1-subunit gene repression by hypoxia in cardiac myocytes: role in preconditioning[J]. *Circ Res*, 2009, 104(12): 1364-1372.
- [19] NAVARRO-ANTOLIN J, LEVITSKY K L, CALDERON E, et al. Decreased expression of maxi-K⁺ channel beta1-subunit and altered vasoregulation in hypoxia[J]. *Circulation*, 2005, 112(9): 1309-1315.
- [20] CORNFIELD D N. Developmental regulation of oxygen sensing and ion channels in the pulmonary vasculature[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2010, 661: 201-220.
- [21] TANG X D, XU R, REYNOLDS M F, et al. Haem can bind to and inhibit mammalian calcium-dependent Slo1 BK channels[J]. *Nature*, 2003, 425(6957): 531-535.
- [22] SAHOO N, HOSHI T, HEINEMANN S H. Oxidative modulation of voltage-gated potassium channels[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(6): 933-952.
- [23] KEMP P J, TELEZHUKIN V, WILKINSON W J, et al. Enzyme-linked oxygen sensing by potassium channels[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2009, 1177: 112-118.
- [24] KHAVANDI K, BAYLIE R L, SUGDEN S A, et al. Pressure-induced oxidative activation of PKG enables vasoregulation by Ca²⁺ sparks and BK channels[J]. *Sci Signal*, 2016, 9(449): ra100.
- [25] ZHAO G, ADEBIYI A, XI Q, et al. Hypoxia reduces KCa channel activity by inducing Ca²⁺ spark uncoupling in cerebral artery smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(6): C2122-2128.
- [26] LEWIS A, PEERS C, ASHFORD M L, et al. Hypoxia inhibits human recombinant large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ (maxi-K) channels by a mechanism which is membrane delimited and Ca²⁺ sensitive[J]. *J Physiol*, 2002, 540(3): 771-780.

(张西倩 编辑)