

麻黄碱抑制支气管平滑肌细胞增殖的机制

景红娟 汪长东 甘露 阎旭 陈鹏 陈明洁 何光源*

(华中科技大学生命科学与技术学院, 分子生物物理教育部重点实验室, 中英联合实验室, 武汉 430074)

摘要 BK通道(large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel)是一种大电导、电压和钙离子依赖的钾通道, 存在于哺乳动物几乎所有的组织中。 $\beta 1$ 亚基是首次从平滑肌细胞中分离到的一种BK通道辅助亚基。麻黄作为一种 β 肾上腺素受体激动剂, 是一味治疗哮喘的常用中药。利用RT-PCR和膜片钳等技术, 研究麻黄治疗哮喘的作用机制。结果表明: 麻黄碱(ephedrine, Eph)作为麻黄的一种主要成分, 显著抑制支气管平滑肌细胞(bronchial smooth muscle cells, BSMCs)的增殖和BK通道 $\beta 1$ 亚基的表达, 但是对BK通道的电流没有显著影响。

关键词 麻黄碱; BK通道; 支气管平滑肌细胞; 细胞增殖

BK通道(large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel)是从果蝇(*Drosophila*)中克隆出来的大电导、电压和钙离子依赖的钾通道, 由单个基因(*Slo*, *KCNMA1*)编码^[1]。BK通道广泛存在于各种哺乳动物组织中如: 平滑肌、骨骼肌、神经、肝和分泌细胞中^[2]。尽管BK通道是单基因编码的, 但是其功能受调节亚基、转录拼接和代谢的调节, 使其能够在许多组织中行使不同的功能。BK通道的 $\beta 1$ 亚基是从平滑肌细胞分离出来的, 与卡律蝎毒素(charybdotoxin, ChTX)有高度的亲和力^[3]。最近, 在不同组织和器官中发现了 β 亚基的其他三种亚型($\beta 2$, $\beta 3$ 和 $\beta 4$)^[4-6]。这些辅助亚基通过改变通道的动力学特征、药理学特性和钙离子依赖性, 使BK通道能够行使多种多样的生理功能。

哮喘是一类由于黏液分泌过度和气道持续增生而引起的一类呼吸受阻的慢性疾病。麻黄作为一种中药制剂, 用来治疗哮喘已经有两千多年的历史。麻黄碱(ephedrine, Eph)是麻黄中含量最大的一类生物碱, 达到1%~2%^[7], 而且麻黄的生理功能主要是由Eph的生理功能决定的, 传统的观念认为Eph是作为一种 β 肾上腺素受体激动剂而起作用的。

到目前为止, 还没有文献报道Eph对离子通道的作用。本文从细胞增殖的角度, 从BK通道及其辅助亚基 $\beta 1$ 亚基入手, 探讨Eph抑制BSMCs作用的机制。

1 材料与方 法

1.1 支气管平滑肌细胞(BSMC)的获取及培养

取SPF级出生4天之内的Wistar大鼠(购自湖北省防疫站), 75%酒精消毒后使其窒息死亡, 用手术器

械剖开胸腔和咽喉将肺部和气管一起取出, 放在预冷的D-Hanks溶液中, 沿气管小心分离出气管及下游支气管, 纵向剪开气管, 剥去黏膜层、黏膜下层和浆膜层。肌层剪碎, 用0.25%胰蛋白酶, 38.5℃水浴消化2h左右。0.22 μ m微孔滤膜过滤后, 1000 r/min离心5 min后, 弃上清液。加入含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的DMEM/F12培养基(Gibco), 在37℃, 5%CO₂培养箱培养, 待用。

1.2 MTT法

将上述培养的BSMCs(5~10代之内), 根据预试验结果, 消化后以 1×10^5 个/ml的密度, 每孔种100 μ l于96孔板中; 每孔加入Eph(由中国药品生物制品检定所提供)母液, 使其终浓度为600 μ g/ml, 对照组加入等量的PBS溶液。测量时, 待测孔和对照孔每孔分别加入10 μ l的MTT储液, 37℃培养箱中温育4h, 细胞内出现蓝紫色晶体; 用移液枪小心吸出上层溶液后, 每孔加入100 μ l二甲亚砜(DMSO), 吹打后置37℃培养箱5 min, 使细胞内的蓝紫色晶体完全溶解; 酶标仪以空白对照调零后, 在570 nm处测A值, 每天测3孔, 取平均值; 试验重复3次, 绘制细胞生长曲线; 因为细胞数量和570 nm处A值成正比, 所以Eph对BSMCs增殖的抑制率 = $A_{570}(\text{Eph})/A_{570}(\text{对照}) \times 100\%$ 。

1.3 RT-PCR

BSMCs(5~10代之内)的总RNA利用Trizol试剂盒(Invitrogen)提取。首先, 把上述提取的总RNA逆

收稿日期: 2008-02-25 接受日期: 2008-06-03

国家973预研资助项目(No.2005CCA1900)

*通讯作者。Tel: 027-87792271, Fax: 027-87792272, E-mail:

hegy@hust.edu.cn

转录为 cDNA; 接着以上述 cDNA 为模板, 以 $\beta 1$ 亚基的一对互补引物(5'-TACTCGAGATGGGGAAGAA-GCTGGTG-3'和5'-ATGGATCCCTTCTGAGCCGCC-AAGAT-3')进行 PCR 扩增。PCR 产物用 0.1% 琼脂糖凝胶电泳进行分析。另外, 用肌动蛋白作为内参, 其上游和下游引物分别为 5'-CAGGTCATCACTATCG-GCAA-3' 和 5'-CAAAGAAAGGGTGTAAAACGC-3', PCR 反应产物长度为 432 bp。

1.4 细胞培养和转染

HEK293 细胞用含有 10% FBS 的 DMEM 培养基 (Gibco), 在 37 °C 和 5% CO₂ 培养箱中培养。细胞以 1×10^5 个/ml 的密度接种在 24 孔板中, 培养过夜后, 用 Lipofectamine 2000 瞬时转染 0.8 μ g 3.1-mslo 和 0.8 μ g 3.1-EGFP 质粒。转染 4~6 h 后, 将转染细胞转移到 35 mm 的内含有小玻片的培养皿中, 用新鲜的培养基在 37 °C 下培养 18~24 h 后进行电生理试验。

1.5 电生理试验

试验采用外膜向外的试验记录模式, 利用 EPC-9 放大器 (HEKA, Lambrecht, Germany) 和 PULSE+PULSEFIT8.67 软件 (HEKA Electronics, Germany) 进行试验记录。增益为 0.5~2 mV/pA, 保持电压是 0 mV, 电极电阻为 2~3 M Ω 。

外膜向外模式的记录在 20~25 °C 时采用对称的钾溶液。电极内液为 10 μ mol/L Ca²⁺ 溶液 (mmol/L): KMes 160, HEDTA 5, HEPES 10, CaCl₂ 2.988。外液为不含青霉素和链霉素的 ND 96 溶液 (mmol/L): NaCl 96, KCl 2, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1, HEPES 10, Na pyruvate 2.5, NaOH 调节 pH 7.5。进行电流记录时, 灌流溶液为 160 K⁺ 溶液 (mmol/L): KMes 160, MgCl₂ 2, HEPES 10。电极液和灌流液都用 Mes 调节 pH 为 7.0。外液、电极液和灌流液的渗透压一般分别为 290~300 mOsm 和 305~315 mOsm (所有常规盐类均来自 Sigma)。

1.6 数据分析

数据分析利用 Clampfit 9.0.1.07 (Axon, USA), Igor Pro 4.09 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) 和 Sigmaplot 9.0。所用的数值都用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 Eph 抑制 BSMCs 增殖

从 Wistar 乳鼠分离得到的 BSMCs (5~10 代之内), 与 600 μ g/ml Eph 共培养, 研究 Eph 对 BSMCs 增殖的影响。研究表明, Eph 作用 24 和 48 h 后, 抑制率分别为 (25.9 \pm 0.43)% ($P < 0.05$), (40.7 \pm 0.35)% ($P < 0.01$)。

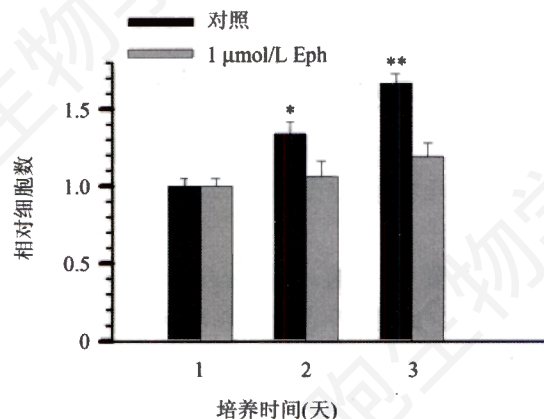


图 1 Eph 对 BSMCs 增殖的影响

* 代表差异显著 ($P < 0.05$), ** 代表差异极其显著 ($P < 0.01$)。

从图 1 可以看出, Eph 抑制 BSMCs 的增殖, 而且作用时间越长, 抑制效果越明显。

2.2 Eph 对 BK 通道电流的影响

为了进一步研究 Eph 抑制 BSMCs 增殖的机制, 我们探讨了 Eph 对 BK 通道 α 亚基电流的影响。试验结果表明, Eph 对仅有 α 亚基形成的 BK 通道电流影响不大 (图 2a)。而且, 对其 IV 曲线也没有明显影响 (图 2b)。即 Eph 不改变单独由 α 亚基形成的 BK 通道的激活和去激活。

2.3 Eph 降低了 BSMCs 中 BK 通道 $\beta 1$ 亚基的表达

上面的结果说明, Eph 对单独由 α 亚基形成的 BK 通道电流影响不大。接着我们进一步研究了 Eph 对 BSMCs 中 BK 通道 $\beta 1$ 亚基表达量的影响。一些研究表明, $\beta 1$ 亚基基因含有 4 个外显子, 3 个内显子, cDNA 长度为 576 bp [2]。图 3 结果表明, Eph 在药物处理初期, 如 Eph 处理 8 h 之内, 对 $\beta 1$ 亚基表达的抑制效果不明显; Eph 处理 16 h 时, 抑制效果就很显著了; 而且随着作用时间的延长, 到 Eph 处理 32 h 时, 抑制效果越来越明显 (图 3)。

3 讨论

气道平滑肌细胞能够增殖、迁移、分泌物质如化学增殖素、细胞因子、细胞外基质和生长因子等, 重要的是, 能够根据亚型的改变如从收缩亚型到增殖/合成亚型, 行使不同的功能 [8]。气道重组是哮喘中观察到的一种病理现象, 以黏液腺肥大、表皮下细胞纤维化和气道平滑肌细胞增殖为特征。另外, 哮喘中增加的平滑肌主要是大的气管和支气管。也就是说, 能够抑制 BSMCs 增殖的物质就可以用来治

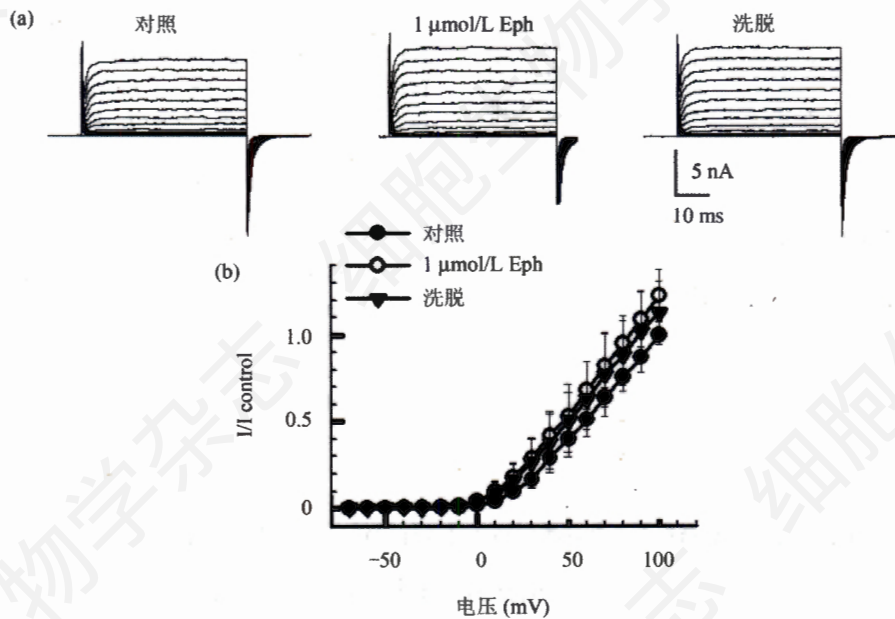


图2 Eph对BK通道电流和IV曲线的影响

a: 在单独表达 α 亚基的HEK293细胞上记录到的BK电流, 刺激电压从-80 mV去极化到100 mV, 再复极化到-70 mV, 每次增加10 mV; b: BK通道的IV曲线($n=5$)。

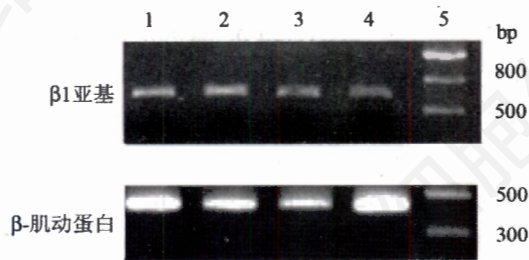


图3 Eph抑制BK通道 $\beta 1$ 亚基的表达

1: PBS溶液处理; 2、3、4分别是Eph处理8、16和32 h后的结果; 5: DNA marker。

疗哮喘。从本文中, 我们发现: Eph能够通过抑制BSMCs增殖(图1), 从而达到治疗哮喘的目的。

到目前为止, 在肺部的平滑肌细胞中, 共发现三类钾通道: 电压依赖钾通道(K_v), 钙激活钾通道(K_{Ca})和ATP敏感的钾通道(K_{ATP})。在这些钾通道中, BK通道存在于大部分细胞中。该通道在去极化时激活, 而且受胞内钙离子浓度的调节。本文研究表明, Eph对单独由 α 亚基形成的BK通道没有影响(图2)。

然而, 共表达 $\alpha+\beta 1$ 亚基形成的BK通道与单独表达 α 亚基形成的通道相比, 更容易激活且具有更慢的动力学特性。 $\beta 1$ 首次在牛的BSMCs中发现^[9], 在平滑肌细胞中有关键的生理作用。Pluznick等^[10,11]的研究表明: BK- $\beta 1^{-/-}$ 老鼠与正常的老鼠($\beta 1^{+/+}$)相比, 体

重和肝重没有明显变化, 但是平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)显著升高。这些老鼠有正常的听力和耳蜗结构, $\beta 1$ 亚基通过改变通道上钙离子结合位点的敏感性, 从而增加BK通道对钙离子的敏感性^[12]。另外, 离子通道功能的改变在控制几种细胞类型的增殖中起关键作用^[13], 包括脉管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs), 通过增加胞内的钙离子信号来影响细胞周期。例如, 体外培养的VSMCs中, 通过上调受体/第二信使控制的TRP(transient receptor potential)通道, 使胞内钙离子信号增加^[14]。我们的研究表明, Eph能够抑制BK通道 $\beta 1$ 亚基的表达(图3)。缺少 $\beta 1$ 亚基的BK通道钙离子的敏感性显著降低, 故通道的开放几率很低, 很难检测到电流^[15]。一些研究表明, 在各种不同的细胞类型中, 细胞超极化是细胞增殖必需的^[16]。因此, 尽管哮喘患者的BSMCs细胞中胞内钙离子浓度可能升高, 但是Eph通过抑制 $\beta 1$ 亚基的表达(图3), 减弱BK通道对胞内钙离子的敏感性, 从而间接降低BSMCs中的BK电流, 减缓膜的复极化以致减少超极化来抑制BSMCs的增殖。

另外, 非增殖型的VSMCs主要表达由 $K_{Ca1.1}$ 编码的BK通道^[17]。BK通道通过膜超极化缓冲去极化和钙通道开放所形成的钙离子内流, 在VSMCs的舒张中起关键作用。近年的研究表明, 增殖的VSMCs,

BK通道的表达量下降,而代替为由 $K_{Ca}3.1$ 基因编码的中电导钙激活的钾通道(IK_{Ca})^[18]。因此,Eph是否影响 IK_{Ca} 和BK通道 α 亚基的表达量还有待试验的进一步验证。

参考文献(References)

- [1] Adelman JP *et al.* *Neuron*, 1992, **9**: 209
- [2] Jiang Z *et al.* *Genomics*, 1999, **55**: 57
- [3] Knaus HG *et al.* *J Biol Chem*, 1994, **269**: 17274
- [4] Uebele VN *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 23211
- [5] Wallner M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 4137
- [6] Brenner R *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 6453
- [7] Haller CA *et al.* *Clin Pharmacol Ther*, 2002, **71**: 421
- [8] Hirst SJ. *Respir Physiol Neurobiol*, 2003, **137**: 309
- [9] Knaus HG *et al.* *J Biol Chem*, 1994, **269**: 17274
- [10] Pluznick JL *et al.* *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, **284**: F1274
- [11] Pluznick JL *et al.* *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, **288**: F846
- [12] Cox DH *et al.* *J Gen Physiol*, 2000, **116**: 411
- [13] Nilius B *et al.* *Physiol Rev*, 2001, **81**: 1415
- [14] Golovina VA *et al.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, **280**: H746
- [15] Brenner R *et al.* *Nature*, 2000, **407**: 870
- [16] MacFarlane SN *et al.* *J Neurosci*, 2000, **20**: 5245
- [17] Atkinson NS *et al.* *Science*, 1991, **253**: 551
- [18] Kohler R *et al.* *Circulation*, 2003, **108**: 1119

Mechanism of Ephedrine Inhibiting Proliferation of Bronchial Smooth Muscle Cells

Hong-Juan Jing, Chang-Dong Wang, Lu Gan, Xu Yan, Peng Chen, Guang-Yuan He*

(Key Laboratory of Molecular Physics, Ministry of Education, China-UK HUST-RRes Genetic Engineering and Genomics Joint Laboratory, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract BK channel is a kind of big conductance, voltage and Ca^{2+} -activated potassium channel which exists in almost all tissues in mammal. The $\beta 1$ subunit was first detected as an ancillary subunit of BK channel in smooth muscle cells and had significant influence on the biophysical properties of BK channel. Mahuang, as a β -adrenergic receptor agonist, is a Chinese traditional medicine treated as asthma. In this paper, RT-PCR and patch clamp were used to approach the mechanism of Mahuang treated on asthma. The finding results showed: Ephedrine which was the most components of Mahuang suppressed the proliferation of bronchial smooth muscle cells (BSMCs) and restrained the expression of $\beta 1$ subunit of BSMCs. But, ephedrine had little effect on the current amplitude of BK channel.

Key words ephedrine; BK channel; bronchial smooth muscle cell; cell proliferation

Received: February 25, 2008 Accepted: June 3, 2008

The work was supported by the National Basic Special Pre-research (973 Program) of China (No.2005CCA1900)

* Corresponding author. Tel: 86-27-87792271, Fax: 86-27-87792272, E-mail: hegy@hust.edu.cn