

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.16.001

文章编号: 1005-8982(2016)16-0001-05

论著

2 型糖尿病大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞大电导钙激活钾通道 α 、 β 1 亚基蛋白及 mRNA 表达水平变化*

段洪霞,葛李,崔传宝,吴知桂,陈美娟
(四川医科大学 药学院,四川 泸州 646000)

摘要:目的 探讨 2 型糖尿病(T2DM)大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞大电导钙激活钾通道(BKCa) α 、 β 1 亚基蛋白及 mRNA 表达水平变化,从分子水平阐明 T2DM 大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞膜 BKCa 通道活性改变的具体机制,为 T2DM 的综合治疗提供新靶点;为特异性针对此环节的药物研发提供实验依据。**方法** SD 大鼠高糖高脂饮食 1 个月后腹腔注射链脲菌素 STZ(25 mg/kg)建立 T2DM 大鼠模型。免疫印记法和实时定量聚合酶链式反应测定肠系膜动脉 BKCa 通道 α 和 β 1 亚基的蛋白和 mRNA 表达水平。**结果** ①免疫印记结果显示:模型组在第 8 周和第 12 周肠系膜动脉大电导钙激活钾通道 (BKCa) α 蛋白相对表达量分别为 (1.093 ± 0.251) 和 (0.921 ± 0.153) ,与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); β 1 蛋白相对表达量分别为 (0.334 ± 0.200) 和 (0.193 ± 0.310) ,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。②实时定量聚合酶链式反应结果显示,模型组在第 8 周和第 12 周肠系膜动脉 BKCa α 亚基 mRNA 的表达分别为 (1.15 ± 0.03) 和 (0.92 ± 0.04) ,与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); β 1 亚基 mRNA 的表达分别为 (0.47 ± 0.10) 和 (0.37 ± 0.12) ,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** T2DM 大鼠肠系膜动脉 BKCa β 1 亚基蛋白和 mRNA 表达在 8 周及 12 周明显降低。

关键词: 2 型糖尿病;大电导钙激活钾通道;肠系膜动脉; α 、 β 1 亚基
中图分类号: R-332;R587.1 **文献标识码:** A

Expression changes of α , β 1 subunit protein and mRNA of large-conductance calcium-activated potassium channels in mesenteric arterial smooth muscle cells of type 2 diabetes mellitus rats*

Hong-xia Duan, Li Ge, Chuan-bao Cui, Zhi-gui Wu, Mei-juan Chen
(College of Pharmacy, Sichuan Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

Abstract: Objective To explore the expression changes of α and β 1 subunit protein and mRNA of the large-conductance calcium-activated potassium channels (BK Ca) in mesenteric arterial smooth muscle cells of type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats, and to elucidate the specific mechanism of BK Ca channel activity in T2DM mesenteric arterial smooth muscle cells from the molecular level, and to provide new targets for the comprehensive treatment of T2DM and the experimental basis for the specific needle to the drug research and development. **Methods** After one-month high glucose and high fat diet, SD rats were treated with intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ 25 mg/kg) to establish a rat model of type 2 diabetes mellitus. Western blot and real-time PCR were used to detect α and β 1 subunit protein and mRNA expression levels. **Results** Western blot showed that α subunit protein expressions of mesenteric artery BK Ca channel in model group at 8 and 12 weeks were (1.093 ± 0.251) and (0.921 ± 0.153)

收稿日期:2016-03-25

* 基金项目:四川省教育厅重点项目基金(No:11ZA242)

[通信作者] 陈美娟, E-mail: chenmeijuan1969@sina.com

respectively, and had no statistical significance compared with the control group ($P > 0.05$). Expressions of $\beta 1$ subunit protein in model group at 8 and 12 weeks were (0.334 ± 0.200) and (0.193 ± 0.310) respectively. There was statistical significance compared with the control group ($P < 0.05$). Real-time quantitative PCR results showed that α subunit mRNA expressions of mesenteric artery BK Ca channel in model group at 8 and 12 weeks were (1.15 ± 0.03) and (0.92 ± 0.04) , and had no statistical significance compared with the control group ($P > 0.05$). Expressions of $\beta 1$ subunit mRNA were (0.47 ± 0.10) and (0.37 ± 0.12) , which were significantly reduced comparing with the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Expressions of $\beta 1$ subunit protein and mRNA of BK Ca channel in mesenteric artery are decreased significantly in T2DM rats at 8 and 12 weeks.

Keywords: type 2 diabetes mellitus; large-conductance calcium-activated potassium channels; mesenteric artery; α , $\beta 1$ subunit

2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的血管并发症是本病致残致死的主要原因,作为血管张力的最终执行者及各种生化因子的最终作用靶点的血管平滑肌在众多的生化机制(氧化应激、慢性炎症、糖基化终产物损害、醛糖还原酶等)作用下,是否发生变化还尚未可知,血管平滑肌上的大电导钙激活钾通道(large-conductance calcium-activated potassium channels, BKCa)是血管张力调节的关键负反馈器,叶春玲等^[1]发现,1 型糖尿病小鼠胸主动脉 BKCa 关闭时间缩短;李尚俭等^[2]报道,胰岛素抵抗大鼠胸主动脉血管平滑肌 BKCa $\beta 1$ 亚单位蛋白和 mRNA 表达降低。但有关 T2DM 大鼠肠系膜血管平滑肌 BKCa 是否存在异常的研究尚鲜有报道,本课题组前期研究^[3]发现,T2DM 大鼠血管反应性存在变化,并与血管平滑肌上 BKCa 可能存在相关性,本研究采用免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术探讨 T2DM 大鼠不同病程阻力血管(肠系膜动脉)平滑肌上 BKCa α 、 $\beta 1$ 亚基蛋白及 mRNA 表达是否存在异常,以期为 T2DM 的综合治疗提供新靶点,为特异性针对此环节的药物研发提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象 成年 SD 大鼠,雄性,体重 180 ~ 200 g,购自成都达硕动物有限公司;实验动物使用许可证号:SCXKC 川 22008-23。

1.1.2 主要实验试剂 链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ),总 RNA 提取试剂 TRIzol(美国 Invitrogen 公司),逆转录试剂盒 Reverse Transcription System(成都博瑞克生物公司),小鼠抗人 Actin 单抗(美国 Santa Cruz 公司),兔抗人 KCNMA1(BKCa α)多抗,批号:Lot#A1455,兔抗人 KCNMB1($\beta 1$)(英国 Ab-

cam 公司),荧光定量 PCR 试剂(日本 Takara 公司),批号:Lot No.1131801,膜蛋白提取试剂盒(上海碧云天生物研究所),聚氰基丙烯酸酯正丁酯(bicinchoninic acid, BCA)蛋白测定试剂盒(上海碧云天生物研究所),Taq 酶 PCR 试剂(北京 TIANGEN 生物公司),批号:K9104 琼脂糖(美国进口分装公司),RIPA 裂解液(上海碧云天生物研究所),蛋白预染 Marker(美国 Fermentas 公司),增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)发光液(美国 millipore 公司)批号:Lot No.1131801。

1.1.3 主要实验仪器 BIORAD 电泳仪、电转仪(美国 BIORAD 生物公司),ABI 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),血糖监测仪,ND-100 核酸蛋白检测仪(美国 Nanodrop 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立^[4] 将大鼠随机分成对照组 10 只、模型组 40 只,模型组大鼠喂养高糖高脂饲料(10%猪油、2.5%胆固醇、20%蔗糖、1%胆酸盐和 66.5%的普通饲料)4 周,腹腔注射 STZ(25 mg/kg)1 次,1 周后以空腹血糖 ≥ 7.0 mmol/L,餐后 2 h 血糖 ≥ 11.0 mmol/L 且伴有胰岛素敏感性降低者($P < 0.05$)为成模指标,筛选出成模鼠 20 只继续高脂高糖饲养至 12 周,对照组大鼠普通饲料喂养 12 周,腹腔注射同体积柠檬酸缓冲液。

1.2.2 标本的采集 于 8 周、12 周对照组、模型组大鼠分批腹腔注射 1%戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉,开腹取肠系膜动脉,分离血管周围的结缔组织及脂肪,然后放入 RNA 保存液, -80°C 冰箱保存。

1.2.3 免疫印迹法测定 α 和 $\beta 1$ 亚基蛋白表达量 取大鼠肠系膜动脉, RIPA 法冰上匀浆、消化, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集上清液, BCA 法蛋白定量。等量的蛋白(15 L)经 SDS-PAGE 电泳分离后,电转印到硝酸纤维素膜上,用含 50 g/L 脱脂奶粉的三乙醇胺

缓冲盐水溶液室温封闭 1 h。然后分别用兔抗大鼠 Kca1.1 抗体、兔抗大鼠 sol-1 抗体、兔抗大鼠 β -actin 抗体 4℃ 孵育过夜。过氧化物酶标记抗兔二抗,室温孵育 1 h。ECL 试剂盒化学荧光显像。以 β -actin 为内参,计算蛋白的相对表达量。

1.2.4 实时定量 PCR 测定 α 和 β 1 亚单位 mRNA 的表达 取出冷冻保存于 -80℃ 冰箱中大鼠肠系膜动脉,Trizol 法提取总 RNA,逆转录成 cDNA,然后用 SYB Rgreen 法进行 PCR 反应,GAPDH 为内参照。实时定量 PCR 扩增仪检测。扩增参数:95℃ 预变性 10 s;95℃ 变性 5 s、60℃ 退火 15 s、72℃ 拉伸 15 s,进 45 个循环。以 GAPDH 为参照基因,计算模型组与对照组的相对基因拷贝数。相对基因拷贝数用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表达。采用软件 Beacon Designer 7.0 设计 α 和 β 1 亚单位的 PCR 引物,保证相关引物的 GC 含量 40%~60%, T_m 值在 55~65℃,且引物自身不存在连续 4 个碱基以上的互补序列以及正反向引物间尽量避免出现互补序列。见表 1。

表 1 α 和 β 1 亚单位的 mRNA 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')	产物长度 /bp	温度 /℃
KCNMA1/F	TCAACATCCCCAGCTGGAAC	242	60
KCNMA1/R	GAAGGACAGACCCACGAAGG		
KCNMB1/F	TGACCATGTTTGGGCATGGA	187	60
KCNMB1/R	CCACAGGAGGCAACAGTCAT		
GAPDH/F	ATGCTGGCGCTGAGTACGTC	263	60
GAPDH/R	GGTCATGAGTCCTCCACGATA		

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 T2DM 大鼠空腹血糖、餐后 2 h 血糖、空腹血糖胰岛素测定结果

腹腔注射 STZ 8 周、12 周测定空腹血糖、餐后 2 h

血糖、血糖胰岛素,与对照组比较明显升高,血糖胰岛素敏感指数明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 T2DM 大鼠血糖和血糖胰岛素敏感指数 (ISI) 的变化 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	FBG/ (mmol/L)	PBG(2 h)/ (mmol/L)	FIns/ (μ U/ml)	-ln/ (FBG \times FIns)
对照组	4.56 \pm 0.24	6.21 \pm 0.43	28.23 \pm 3.54	-4.78 \pm 0.12
模型组(8 周)	10.47 \pm 0.81 [†]	16.32 \pm 0.17 [†]	72.04 \pm 9.21 [†]	-7.88 \pm 0.17 [†]
模型组(12 周)	11.14 \pm 0.37 [†]	19.28 \pm 0.56 [†]	78.32 \pm 10.12 [†]	-8.76 \pm 0.10 [†]

注:† 与对照组比较, $P < 0.05$

2.2 T2DM 大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞 BKCa α 、 β 1 亚基蛋白的表达

免疫印迹结果,在 8 周和 12 周模型组大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞 BKCa α 蛋白相对表达量分别为 (1.093 \pm 0.251) 和 (0.921 \pm 0.153),分别与对照组作两样本均数的 t 检验, t 值分别为 1.172 和 1.633,查 t 界值表 $P > 0.1$,与对照组比较差异无统计学意义; β 1 亚基蛋白相对表达量分别为 (0.334 \pm 0.200) 和 (0.193 \pm 0.310),分别与对照组作两样本均数的 t 检验, t 值分别为 10.530 和 8.232,查 t 界值表 $P < 0.01$,与对照组比较差异有统计学意义。见图 1~4。

2.3 T2DM 大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞 BKCa α 、 β 1 亚基 mRNA 在血管中的表达

实时定量 PCR 结果显示,在 8、12 周模型组大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞 BKCa α 亚基 mRNA 的表达分别为 (1.15 \pm 0.13) 和 (0.92 \pm 0.14),分别与对照组作两样本均数的 t 检验, t 值分别为 1.9464 和 1.807,查 t 界值表 $P > 0.05$,与对照组比较差异无统计学意义; β 1 亚单位 mRNA 的表达分别为 (0.47 \pm 0.10) 和 (0.37 \pm 0.12),分别与对照组作两样本均数的 t 检验, t 值分别为 16.772,16.623,查 t 界值表 $P < 0.01$,与对照组比较差异有统计学意义,见图 5~6。



图 1 8 周、12 周肠系膜动脉平滑肌细胞 BKCa α 蛋白的图像表达

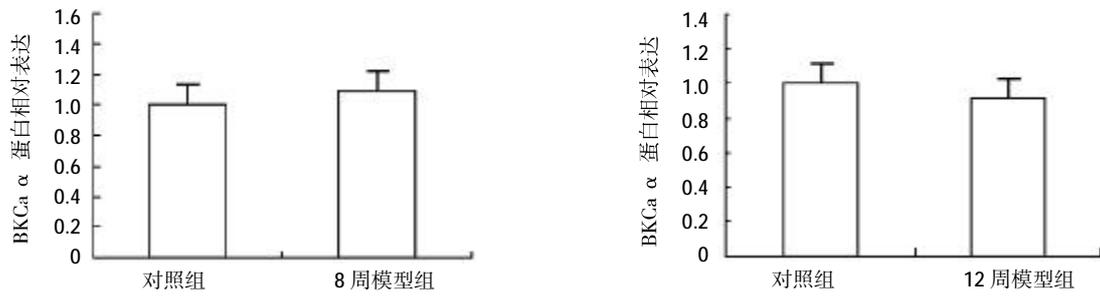


图 2 8周、12周肠系膜动脉平滑肌细胞 BKCa α 蛋白的直方图表达

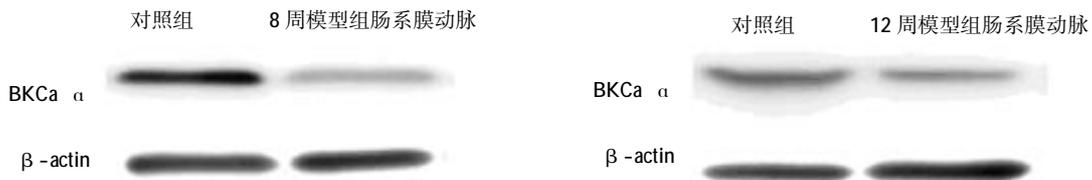


图 3 8周、12周肠系膜动脉平滑肌细胞 BKCa β 1 蛋白的图像表达



图 4 8周、12周肠系膜动脉平滑肌细胞 BKCa β 1 蛋白的直方图表达

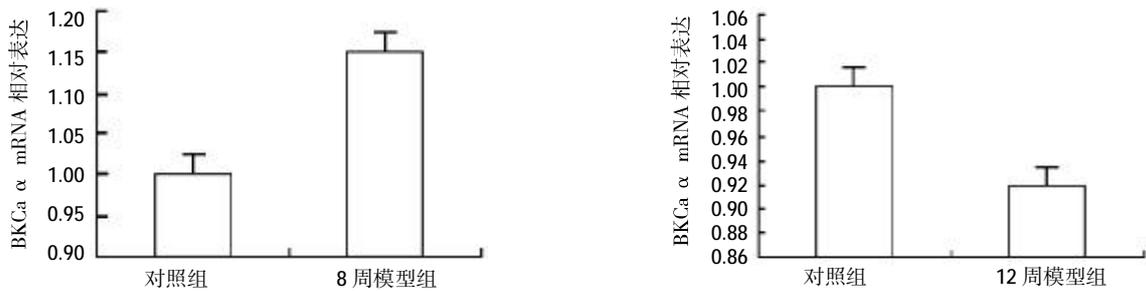


图 5 8周、12周肠系膜动脉平滑肌细胞 BKCa α mRNA 的表达变化

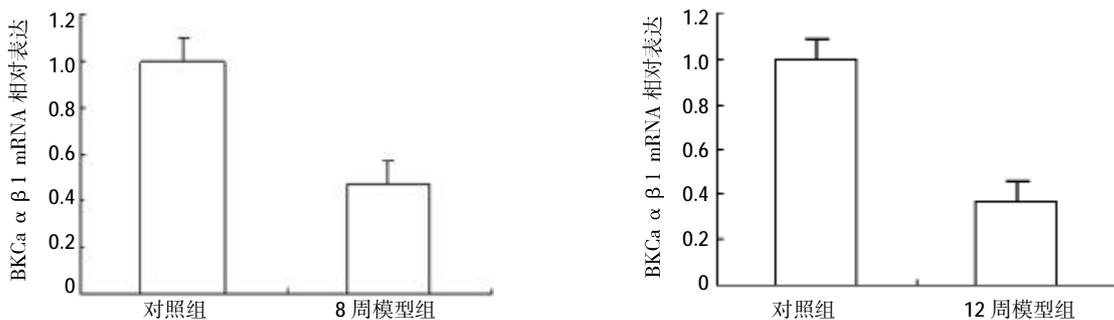


图 6 8周和 12周肠系膜动脉平滑肌细胞BKCa β 1 mRNA 的表达变化

3 讨论

糖尿病是心脑血管疾病的独立危险因素,其血管病变主要累及心、脑和外周血管,导致动脉粥样硬化、高血压等疾病,糖尿病患者发生相关血管意外事件的风险是非糖尿病人群的 2~4 倍^[5],可见 2 型糖尿病是一种以血管病变为主要致死致残病因的疾病。

血管平滑肌 BKCa 由孔道形成蛋白 α 亚基和辅助蛋白 β 亚基组成,现已鉴别的 β 亚基有 β 1- β 4 个家族成员,其中 β 1 亚基主要分布于动脉平滑肌中。生理条件下,BKCa 持续激活可以使细胞膜超极化,抑制电压依赖性钙离子通道的活性,从而导致钙内流减少,对抗平滑肌收缩,阻断 BKCa 可以使平滑肌收缩。所以 BKCa 通道是调控血管紧张度的主要离子通道,其通道活性的改变将影响血管的舒缩功能,血管的舒缩异常与通道功能缺陷有关。近年来有关糖尿病与 BKCa 通道的相关性研究已受到关注^[6]。

WANG 等^[7]发现,T2DM 大鼠脑血管平滑肌 BKCa 活性降低,与其 β 1 亚基的表达下调有关。本研究主要运用免疫印迹法和实时定量 PCR 技术力图从分子水平阐明 T2DM 大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞上 BKCa 通道是否存在异常,实时定量 PCR 结果表明 β 1 亚基 mRNA 在 T2DM 大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞中表达明显降低,而 α 亚基 mRNA 表达无明显变化;免疫印迹结果显示,在 T2DM 大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞上 BKCa 通道的 β 1 亚基蛋白表这两种实验技术所得到的结果是一致,即在 T2DM 大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞上 BKCa 通道 β 1 亚基发生基

因和蛋白水平的明显下调($P < 0.05$),而 α 亚基在基因和蛋白水平无明显变化($P > 0.05$)。这提示作为血管平滑肌细胞舒缩功能的重要调节因素,BKCa 通道的功能与 β 1 亚基密切相关, β 1 亚基的低表达可能是导致 T2DM 血管并发症的一个重要基础。

总之,随着对糖尿病及其离子通道功能异常认识的深入,人们可能对糖尿病血管病变的机制有更新的认识,这将为预防糖尿病的心血管并发症提供新的策略和方法,为糖尿病的综合治疗提供新的靶点,为特异性针对此环节的药物治疗提供实验依据。

参 考 文 献:

- [1] 叶春玲,袁振宇,沈兵. 糖尿病小鼠胸主动脉环对血管收缩剂和内皮依赖性舒张剂反应的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(4): 788-792.
- [2] 李尚俭,艾文婷,梁磊,等. 胰岛素抵抗对大鼠血管平滑肌细胞 BKCa 功能的影响[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2011, 32(2): 145-150.
- [3] 张敏敏. 2 型糖尿病大鼠血管反应性与血管平滑肌上 BKCa 的相关性研究[D]. 四川: 泸州医学院, 2011.
- [4] 陈嘉,张永斌,桑传兰,等. SD 大鼠 2 型糖尿病模型的建立及相关指标的测定[J]. 动物医学进展, 2012, 6: 91-95.
- [5] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2013 年版)[J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2015, 3: 26-89.
- [6] 吴宾,陶凌,易甫. 糖尿病对冠状动脉平滑肌细胞大电导钙激活钾通道的影响[J]. 国际心血管病杂志, 2015, 4: 245-247.
- [7] WANG Y, ZHANG H T, SU X L, et al, Experimental diabetes mellitus down-regulates large-conductance Ca^{2+} activated K^{+} channels in cerebral artery smooth muscle and alters functional conductance[J]. Curr Neurovasc Res, 2010, 7(2): 75-84.

(张蕾 编辑)