

内毒素/脂多糖及烧伤血清对豚鼠肠道平滑肌细胞离子通道的影响

郭力 王熙斌 杨艳 童庭辉

【摘要】 目的 观察内毒素/脂多糖(LPS)及烧伤血清对豚鼠结肠带平滑肌细胞钙激活钾通道(KCa)的影响,探讨烧伤后发生胃肠动力障碍的分子电生理机制。方法 用急性酶分离法获取单个健康豚鼠结肠带平滑肌细胞,在对称性高钾溶液中采用细胞膜片钳单通道记录技术,分别记录细胞贴附式膜片(电极位于细胞膜外面)和内面向外式膜片(电极位于细胞膜内面)上的电流。引出的电流信号经转换器转换,输入计算机,用离子通道计算机分析系统进行数据处理,并测定以下指标:(1)电流幅值(CA);(2)开放概率(PO);(3)开放时间(OT);(4)关闭时间(CT),以检测其特性并鉴定是否为KCa。确定为KCa后,向溶液中分别加入20、40、60、80、100 mg/L的LPS,观察LPS对两种膜片方式上KCa的影响。在浴液中分别加入正常血清和烧伤血清,观察血清对KCa的影响。结果 在对称性高钾溶液中,豚鼠结肠带平滑肌细胞内面向外式膜片上的KCa电导值为(271 ± 7) pS,是高电导的离子通道。随着膜去极化及细胞内Ca²⁺增加,通道PO增加,该通道可被细胞外低浓度的钾通道阻断剂四乙胺(TEA,1 mmol/L)所阻断,而膜内面较高浓度的TEA(40 mmol/L)对该通道无阻断作用,证实为KCa。当Ca²⁺为0 mol/L时,向溶液中分别加入20、40、60、80、100 mg/L的LPS,两种膜片方式KCa活性随LPS浓度的增加而增加。40 mg/L以上的LPS对KCa具有明显激活作用,通道PO显著增加(P < 0.05 或 0.01),用不含LPS的溶液灌流后亦不能回转。两种膜片方式下烧伤血清对KCa有激活作用,而正常血清无此作用。结论 LPS和烧伤血清可通过激活肠道平滑肌细胞KCa抑制肠道蠕动。

【关键词】 内毒素类; 血清; 离子通道; 肌细胞,平滑肌; 膜片钳技术



Influence of lipopolysaccharide and burn sera on ion channels in smooth muscle cells of colon of guinea pig GUO Li, WANG Xi-bin, YANG Yan, TONG Ting-hui. Department of Burns and Plastic Surgery, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the influence of lipopolysaccharide (LPS) and burn sera on potassium channels (KCa) in smooth muscle cells of colon of guinea pig so as to elucidate the molecular mechanism of gastrointestinal motility dysfunction after severe burns. Methods Single smooth muscle cells were isolated from the taenia coli of guinea pig with enzyme digestion. The standard patch clamp technique was employed to record the single KCa channel currents of smooth muscle cell after challenged by LPS and burn serum. Data were recorded and analyzed by Pclamp 6.04 software, and the probability of open (PO), mean open time (OT), mean close time (CT) and current amplitude (CA) were determined. Subsequently, LPS in the concentration of 20, 40, 60, 80 and 100 mg/L, respectively, and normal serum and burn serum in the concentration of 10% were respectively added into medium to examine the influence of the two clamps and sera on the KCa activity. Results In hyperkalemic solution, the KCa conductance of colonic smooth muscle cells of the guinea pig was (271 ± 7) pS, indicating it was an ionic channel with high conductivity. Subsequent to depolarization of the membrane, inner-cellular calcium level was increased, and channel PO was also increased, which could be blocked by 1mmol/L tetraethylammonium (TEA) outside the membrane chaff. As 40mmol/L TEA inside the membrane chaff did not show such effect, it was proved to be KCa current. The activity of the channel as determined with two kinds of clamps was increased in a dose dependent manner with LPS challenge when the concentration of calcium was 0 mol/L. The KCa activity and PO of the channel was increased obviously when the concentration of LPS was above 40 mg/L (P < 0.05 or 0.01), and it could not be reversed after irrigation with non-LPS medium. By using the two kinds of patch clamps, the KCa were activated by burn sera, but not normal sera. Conclusion Both LPS and burn sera can lead to inhibition of the gastrointestinal motility by activation of KCa channels.

基金项目:四川省人事厅学术和技术带头人培养资金资助项目(4200321);四川省教育厅科研基金资助项目(2003C011)

作者单位:646000 四川泸州医学院附属医院整形烧伤科

2. LPS 对 KCa 的影响: (1) 细胞贴附式膜片上 LPS 对 KCa 的影响结果见表 1。 (2) 内面向外式膜片上 LPS 对 KCa 的影响结果见表 2。

表 1 细胞贴附式膜片上不同浓度的 LPS 及不含 LPS 溶液灌洗后对 KCa 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PO	CA(pA)	OT(ms)	CT(ms)
空白组	0.023 ± 0.014	7.7 ± 0.6	6 ± 3	872 ± 428
20 mg/L LPS 组	0.031 ± 0.013	7.5 ± 0.4	7 ± 5	696 ± 430
40 mg/L LPS 组	0.062 ± 0.034*	8.8 ± 0.6	6 ± 6	409 ± 271*
60 mg/L LPS 组	0.066 ± 0.047*	7.9 ± 1.5	9 ± 6	417 ± 229*
80 mg/L LPS 组	0.069 ± 0.045*	7.9 ± 0.9	8 ± 7	329 ± 175*
100 mg/L LPS 组	0.098 ± 0.024*	7.7 ± 0.6	10 ± 6	105 ± 82*
各组灌洗后	0.076 ± 0.051*	7.8 ± 1.4	9 ± 5	316 ± 166*

注:各组的细胞数均为 6 个;与空白组比较, * P < 0.05, # P < 0.01

表 2 内面向外式膜片上不同浓度的 LPS 及不含 LPS 溶液灌洗后对 KCa 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PO	CA(pA)	OT(ms)	CT(ms)
空白组	0.028 ± 0.017	8.0 ± 1.6	6 ± 3	515 ± 310
20 mg/L LPS 组	0.035 ± 0.012	8.4 ± 1.8	6 ± 5	326 ± 114
40 mg/L LPS 组	0.070 ± 0.041*	8.5 ± 1.4	8 ± 6	165 ± 69*
60 mg/L LPS 组	0.076 ± 0.038*	8.0 ± 1.4	8 ± 6	128 ± 117*
80 mg/L LPS 组	0.082 ± 0.055*	8.3 ± 1.4	10 ± 4*	126 ± 83*
100 mg/L LPS 组	0.126 ± 0.048*	8.2 ± 0.9	13 ± 7*	60 ± 55*
各组灌洗后	0.084 ± 0.057*	7.9 ± 1.3	12 ± 6*	154 ± 65*

注:各组的细胞数均为 8 个;与空白组比较, * P < 0.05, # P < 0.01

3. 血清对 KCa 的影响: 当 Ca²⁺ 为 0 mol/L 时, 向溶液中分别加入烧伤血清和正常血清, 在两种膜片方式上, 烧伤血清组通道中 PO 值均显著增加 (P < 0.05), 而正常血清组无显著改变。见表 3。

表 3 两种细胞膜片上烧伤血清和正常血清对 KCa 活性的 PO 值的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	细胞数 (个)	细胞膜片方式	
		细胞贴附式膜片	内面向外式膜片
空白组	6	0.010 ± 0.006	0.011 ± 0.007
正常血清组	6	0.014 ± 0.010	0.013 ± 0.008
烧伤血清组	6	0.024 ± 0.011*	0.031 ± 0.015*

注:与空白组比较, * P < 0.05

讨 论

胃肠道平滑肌细胞的舒缩活动与细胞内 Ca²⁺ 密切相关, 且主要是在动作电位产生时从细胞外移入细胞内的^[4,5]。钾通道在调节细胞膜电位的过程中, 通过负反馈影响钙通道的活动来控制 Ca²⁺ 内流, 在调控平滑肌舒缩活动中起关键作用^[6]。钾通道的种类很多, 在胃肠道平滑肌中, 常见的有 KCa、延迟整流钾通道、腺苷三磷酸敏感钾通道、内向整流钾通道等。KCa 对肠道平滑肌的静息膜电位、慢波电位、峰电位等电位活动均有重要影响。本实验记录到的豚鼠结肠带平滑肌细胞的通道电导值为

(271 ± 7)pS, 属于大电导钾通道, 又具有明显的电压依赖性和钙敏感性、浓度依赖性, 这反映了 KCa 的最基本特性——由膜去极化及细胞内 Ca²⁺ 浓度升高而激活。该通道可被细胞外 1 mmol/L 的 TEA 所阻断, 而在细胞内 TEA 达 40 mmol/L 仍未观察到明显的阻断作用。这与 Carl 等^[1] 的研究一致, 也证明了此通道为大电导的 KCa。

目前烧伤后肠动力障碍形成的机制尚不完全清楚, 其具体的机制并不是单一的, 有神经、体液等多种因素参与。基于临床的观察和一些实验研究, 可以认为来自肠道的 LPS 可能作用于平滑肌使之麻痹。利用膜片钳方法对单个细胞进行实验, 避开了其他干扰因素, 结果证实 LPS 对豚鼠结肠带平滑肌细胞 KCa 具有激活作用。在细胞贴附式膜片模式下, LPS 主要是通过缩短平均 CT 而提高通道的 PO, 从而增加通道的活性; 在内面向外式膜片模式下, LPS 通过增加通道平均 OT、缩短通道平均 CT 而提高通道的 PO, 从而使得通道的活性增加, 表明在细胞内外 LPS 作用方式不同, 在细胞内直接激活, 在细胞外可能通过第二信使间接激活。LPS 对 KCa 的激活作用具有浓度依赖性、不可逆性, 可能与其具有脂溶性、能与细胞膜较稳定地结合有关, 与临床上观察到的长时间肠扩张现象相对应^[7]。因而可以推测, LPS 对通道活性的影响可能是通过与细胞膜比较稳定的化学结合而实现的。将烧伤后 12 h 的豚鼠血清加入溶液中, 在两种膜片上对 KCa 均有激活作用, 而正常血清对 KCa 活性无影响, 推测烧伤后内毒素血症可通过激活 KCa 而对肠道的蠕动功能产生抑制作用。

参 考 文 献

- Carl E, Sanders KM. Ca²⁺-activated K⁺ channels of canine colonic myocytes. Am J Physiol, 1989, 257:470 - 480.
- Obara K, Yabu H. Dual effect of phosphatase inhibitors on calcium channels in intestinal smooth muscle cells. Am J Physiol, 1993, 264: 296 - 301.
- 杨艳, 曾晓荣, 刘智飞, 等. 酶分离猪冠脉平滑肌细胞钙激活钾通道全细胞记录电学特性研究. 泸州医学院学报, 2003, 26: 473 - 477.
- Hartshorne DJ. Biochemistry of the contractile process in smooth muscle. In: Johuson LR, ed. Physiology of the gastrointestinal tract. 2nd ed. New York: Raven Press, 1987. 423 - 440.
- 陈哲宇, 齐清会. 多器官功能不全综合征大鼠结肠运动功能变化和机制的研究. 中华实验外科杂志, 2004, 21: 341 - 342.
- 周吕, 柯美云, 主编. 胃肠动力学-基础与临床. 北京: 科学出版社, 1999. 21 - 24, 342 - 345.
- 陈德昌, 景炳文, 杨建东, 等. 大黄对胃肠动力学影响的基础和临床研究. 中国危重病急救医学, 1997, 9: 411 - 413, 446.

(收稿日期: 2005 - 05 - 12)

(本文编辑: 张红)