

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.41.007

[http://www.crter.org]

孙华灵, 石丽君, 李 丽, 刘晓东. 衰老大鼠动脉超微结构及平滑肌钾通道反应性变化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(41):7228-7234.

## 衰老大鼠动脉超微结构及平滑肌钾通道反应性变化\*\*\*

孙华灵, 石丽君, 李 丽, 刘晓东(北京体育大学运动生理教研室, 北京市 100084)

### 文章亮点:

1 K<sup>+</sup>通道是调节细胞兴奋性和血管张力的重要离子通道, 但对 K<sup>+</sup>通道在机体衰老过程中的作用机制鲜有报道。

2 实验的特点在于通过观察 2 月龄年轻大鼠和 19 月龄老年大鼠分别给予不同的药物刺激, 分析衰老对大鼠动脉超微结构和平滑肌钾通道反应性的影响。

3 实验结果提示, 衰老可引起大鼠动脉超微结构发生改变, 血管舒张能力下降, 推断钙激活钾通道和电压依赖性钾通道可能在衰老诱导的血管舒张能力下降中起着重要作用。

### 关键词:

组织构建; 血管组织构建; 衰老; 胸主动脉; 动脉; 超微结构; 钾通道; 阻断剂; 国家自然科学基金

### 主题词:

年龄因素; 衰老; 动脉; 钾通道; 钾通道阻滞剂; 离子通道; 钾通道, 钙激活; 内皮细胞

### 基金资助:

国家自然科学基金(31071033)\*; 教育部新世纪优秀人才培养资助(NCET-11-0850)\*; 北京市自然科学基金(5132017)\*

### 摘要

背景: K<sup>+</sup>通道是调节血管平滑肌的收缩性与舒张性的主要离子通道, 与血管张力息息相关, 但对 K<sup>+</sup>通道在机体衰老过程中的作用鲜有报道。

目的: 观察衰老对大鼠动脉超微结构和平滑肌钾通道反应性的影响及可能的作用机制。

方法: 健康雄性 Wistar 大鼠 16 只, 19 月龄设为老年组(n=8), 2 月龄设为青年组(n=8)。两组各随机抽取 6 只大鼠进行胸主动脉血管环张力测定, 分别给予钙激活钾通道特异性阻断剂 TEA、电压依赖性钾通道特异性阻断剂 4-AP、ATP 敏感性钾通道特异性阻断剂 glibenclamide、内向整流钾通道的特异性阻断剂 BaCl<sub>2</sub> 等药物刺激, 观察各阻断剂引起的动脉反应性变化。余下每组 2 只, 取胸主动脉以透射电镜观察动脉超微结构的变化。

结果与结论: 与青年组大鼠比较, 老年组胸主动脉内皮细胞和平滑肌细胞等结构发生衰老性变化; KCl 诱发大鼠胸主动脉达到最大收缩张力后恢复基础张力所需时间, 老年组明显长于青年组; 4 种阻断剂均诱发血管张力增加, 且 TEA 和 4-AP 诱发的胸主动脉收缩反应, 老年组显著低于青年组; glibenclamide 和 BaCl<sub>2</sub> 诱发的血管收缩两组间无显著性差异。说明衰老可引起大鼠动脉超微结构发生改变, 血管舒张能力下降, 其中平滑肌钾通道尤其是钙激活钾通道和电压依赖性钾通道功能下降可能是其重要机制之一。

## Changes of arterial ultrastructure and reaction of potassium channels in smooth muscle in aged rats

Sun Hua-ling, Shi Li-jun, Li Li, Liu Xiao-dong (Department of Sport Physiology, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Potassium channel is the main ion channel to regulate vascular smooth muscle contraction and relaxation, and closely related with vascular tone. However, the reports about the mechanism of potassium channels in the body's aging process are rare.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of aging on the arterial ultrastructure and smooth muscle potassium channel reaction, and then to explore the possible mechanisms.

**METHODS:** Sixteen healthy male Wistar rats were collected, 19-month-old rats were assigned to the old group (n=8), 2-month-old rats were used as young group (n=8). The thoracic arteries were isolated and cut into rings to conduct contractility measurement in six rats of each group. The thoracic arteries were stimulated with specific calcium-activated potassium channel blocker tetraethylammonium, specific voltage-dependent potassium channel blocker 4-aminopyridine, specific ATP-sensitive potassium channel blocker glibenclamide, and specific inward rectifier potassium channel blocker BaCl<sub>2</sub>, and then the arterial contractile response to the blockers were observed. The thoracic arteries of the remaining two rats in each group were taken to observe the arterial ultrastructure changes under electron microscope.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Compared with the young group, the ultrastructures of the thoracic aortic endothelial cells and smooth muscle cells were changed in the old group; KCl induced the maximum thoracic

孙华灵★, 女, 1989 年生, 江苏省南京市人, 汉族, 北京体育大学在读硕士, 主要从事运动与心脑血管功能调控方面的研究。365046121@qq.com

通讯作者: 石丽君, 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 北京体育大学运动生理教研室, 北京市 100084

l\_j\_shi72@163.com

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2013)41-07228-07

收稿日期: 2013-04-05

修回日期: 2013-07-20

(201304201/D·C)

Sun Hua-ling★, Studying for master's degree, Department of Sport Physiology, Beijing Sport University, Beijing 100084, China  
365046121@qq.com

Corresponding author: Shi Li-jun, Doctor, Professor, Master's supervisor, Department of Sport Physiology, Beijing Sport University, Beijing 100084, China  
l\_j\_shi72@163.com

Received: 2013-04-05

Accepted: 2013-07-20

aortic contractile tension, and then recovered to the baseline tension, and the recovery time in the old group was significantly longer than that in the young group; all the four kinds of blockers could increase vascular tone, and the tetraethylammonium and 4-aminopyridine induced thoracic aortic contractile response in the old group was significantly lower than that in the young group; there was no significant difference in vasoconstriction induced by glibenclamide and BaCl<sub>2</sub>. Aging can induce arterial ultrastructure changes and declination of vasodilatation capacity, which may partly due to the decreasing of the potassium channels function in smooth muscle cells, especially the calcium-activated potassium channel and inward rectifier potassium channel.

**Subject headings:** age factors; aging; arteries; potassium channels; potassium channel blockers; ion channels; potassium channels, calcium-activated; endothelial cells

**Funding:** National Natural Science Foundation of China, No. 31071033\*; New Century Excellent Personnel Training Project of Ministry of Education, No. NCET-11-0850\*; Natural Science Foundation of Beijing, No. 5132017\*

Sun HL, Shi LJ, Li L, Liu XD. Changes of arterial ultrastructure and reaction of potassium channels in smooth muscle in aged rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(41):7228-7234.

## 0 引言 Introduction

中国早在上世纪末就已进入老龄化社会, 老龄人口比例逐年增长。增龄引起的血管老化是人类心血管疾病发病率居高不下的主要原因<sup>[1]</sup>, 因此血管老化的研究日益受到重视。血管老化改变着各种心血管疾病的病理生理机制, 从而改变疾病发生的阈值、严重程度和预后<sup>[2]</sup>。研究衰老对心血管系统结构与功能的影响, 分析其发生机制对延缓血管衰老、改善血管功能具有重要意义。

血管老化涉及结构和功能的改变, 二者都可提高心血管疾病的发病率。结构的变化发生在血管的不同部位, 如内皮细胞、平滑肌细胞和胶原结缔组织<sup>[3-4]</sup>。其中, 平滑肌细胞是动脉管壁的重要组成成分, 也是其弹性的主要来源, 衰老会使血管平滑肌细胞凋亡、纤维沉积, 从而引起血管平滑肌收缩性下降、血管顺应性下降<sup>[5]</sup>, 进一步促进心血管疾病的发生。

衰老所引起的血管功能障碍包括内皮舒血管物质的生成减少或生物利用度下降, 缩血管物质的生成增加或血管其敏感性上升, 这些因素都在血管老化的发生发展中起着重要作用。

研究表明, 血管平滑肌细胞上的钾离子通道是诱发血管舒张的重要因素, 至今已有4类得以鉴别, 即电压依赖性钾通道、钙激活钾通道、内向整流钾通道和ATP敏感性钾通道<sup>[6]</sup>。它们在调节平滑肌细胞膜电位及血管张力方面各自具有独特的重要功能, 钾通道功能缺陷可导致血管收缩或痉挛并损害动脉的舒张能力<sup>[7-8]</sup>。而衰老引起的血管老化是否与钾通道的功能变化相关是值得探讨的问题, 因此, 研究平滑肌钾通道在增龄过程中的功能变化具有重要的临床意义。

实验采用透射电镜对大鼠主动脉的超微结构进行观察, 并结合体外去内皮胸主动脉血管环实验, 探讨衰老对大鼠动脉结构的影响及平滑肌钾通道反应性的影响, 进而分析衰老诱发血管功能下降的可能机制。

## 1 材料和方法 Materials and methods

**设计:** 随机对照, 动物实验。

**时间及地点:** 体外血管张力测定实验于2012年3至8月在北京体育大学运动生理教研完成, 透射电镜部分由首都医科大学形态研究测试室协助完成。

**材料:**

**实验动物:** 健康雄性Wistar大鼠16只, 8只19月龄, 8只2月龄, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 许可证号: SCXK-(军)2006-009。分笼饲养, 国家标准啮齿类动物饲料喂养, 自由饮食, 饮水, 自然光照, 温度为21-25 °C, 湿度为40%-70%。实验中动物的处置符合中华人民共和国科学技术部颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》的相关要求。

**衰老大鼠动脉超微结构及平滑肌钾通道反应性变化实验的试剂及仪器:**

试剂及仪器	来源
JEOL JEM-1230 透射电镜	日本电子株式会社
HV-4 离体组织器官恒温灌流系统、BL-420S 生物信号采集分析系统	成都泰盟科技有限公司
戊巴比妥钠、TEA、4-AP、glibenclamide、BaCl <sub>2</sub>	美国 Sigma 公司

**Krebs 液成分 (mmol/L):** 131.5 mmol/L NaCl, 5 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 11.2 mmol/L glucose, 13.5 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, and 0.025 mmol/L EDTA, 持续充氧(体积分数95%O<sub>2</sub>-体积分数5%CO<sub>2</sub>), pH7.4。

**实验方法:**

**分组:** 实验动物分为两组, 19月龄大鼠设为老年组( $n=8$ ); 2月龄大鼠设为青年组( $n=8$ )。老年组和青年组各选取6只大鼠进行胸主动脉血管环张力测定, 余下各组2只, 取胸主动脉进行透射电镜观察。

**体外血管环制备:** 大鼠以戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔麻醉后断头处死, 迅速打开胸腔取胸主动脉置于4 °C

Krebs液中, 剔除血管周围脂肪和血管分支, 并用平头针来回穿插去除内皮以避免内皮介导反应, 制成长4 mm血管环。用2个三角形挂钩从管腔穿过, 水平悬挂在HV-4离体组织器官恒温灌流系统的浴槽内, 下方固定, 上方连与张力换能器, 浸入37 °C的Kreb浴液中, 并通以体积分数95%O<sub>2</sub>-体积分数5%CO<sub>2</sub>, 平衡1 h, 使血管基础张力维持在0.8 g左右。

大鼠胸主动脉血管环张力测定: 血管张力稳定后, 用120 mmol/L KCl刺激血管收缩, 以净收缩幅度作为100%最大收缩张力; 之后给予10<sup>-5</sup> mol/L的去甲肾上腺素(NE)诱发血管收缩后, 加入10<sup>-3</sup> mol/L的乙酰胆碱(ACh)使血管舒张, 舒张幅度若超过20%, 则说明内皮未能去除干净, 则此血管不再用于以下实验。待血管张力稳定后, 加入钙激活钾通道特异性阻断剂TEA(tetraethylammonium, 5×10<sup>-3</sup> mol/L)、电压依赖性钾通道特异性阻断剂4-AP(4-Aminopyridine, 5×10<sup>-3</sup> mol/L)、ATP敏感性钾通道特异性阻断剂glibenclamide(10<sup>-3</sup> mol/L)、内向整流钾通道特异性阻断剂BaCl<sub>2</sub>(10<sup>-3</sup> mol/L), 记录血管收缩引起的张力变化。

透射电镜取材与标本制备: 大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉后断头处死, 立即剪开胸腹腔, 分离胸主动脉, 迅速置入3%的戊二醛固定液中, 并在固定液中分离周围组织, 洗净血液, 剖开动脉。取材时需注意动作迅速, 在1 min之内浸入固定液, 以维持细胞结构的生前状态; 动脉的分离须在0-4 °C的低温条件下进行, 以防止细胞自溶, 破坏酶的活性。

组织标本在固定液中固定12 h以上, 保存于在4 °C冰箱, 并定期取出摇晃。固定过夜后, 以0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液冲洗3次, 每次至少10 min; 冲洗完毕, 仍置于0.1 mol/L的磷酸盐缓冲液中, 4 °C条件下保存备用。

组织经过脱水, 包埋, 切片, 染色等处理制备成透射电镜标本, 采用JEOL JEM-1230(日本)透射电镜进行观察。

主要观察指标: 体外胸主动脉血管环收缩张力变化与透射电镜下动脉超微结构的改变。

统计学分析: 所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 17.0、GraphPad Prism5进行数据统计分析, 采用单因素方差分析(ANOVA)以及独立样本 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义,  $P < 0.01$ 为差异有非常显著性意义。

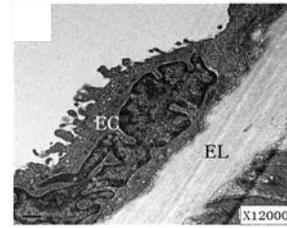
## 2 结果 Results

### 2.1 电镜下胸主动脉的衰老改变

#### 2.1.1 透射电镜观察两组大鼠内皮细胞变化

青年组: 胸主动脉内皮细胞形态正常, 内皮细胞呈椭圆形, 核部胞体稍隆起, 细胞表面有丰富的微绒毛, 见图1。此外, 青年组胸主动脉内膜层内皮细胞, 基底

膜, 内弹性膜界限清晰整齐。内皮细胞与内弹性膜伴行, 维持着血管内膜的完整性与连贯性。



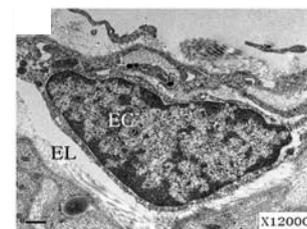
EC: 内皮细胞; EL: 内弹性膜。

注: 胸主动脉内皮细胞形态正常, 内皮细胞呈椭圆形, 核部胞体稍隆起, 细胞表面有丰富的微绒毛。

图1 青年组大鼠(2月龄)胸主动脉内皮细胞的观察(透射电镜, ×12 000)

Figure 1 Structure changes of thoracic aorta endothelial cells of 2-month-old rats in the young group (Transmission electron microscope, ×12 000)

老年组: 胸主动脉内皮细胞失去正常形态, 内皮细胞细胞核偏向一侧, 表面微绒毛结构基本消失, 细胞隆起突向内弹性膜, 引起内弹性膜弯曲成驼峰状, 细胞核内染色质凝聚、周边化, 核外物质含量明显减少, 细胞膜某些部位断裂, 使内膜失去连贯性, 见图2。此外, 在对老年组胸主动脉内膜层观察中, 可见部分内皮细胞从基底膜上完全脱落, 胞质裂解, 内弹性膜变薄或褶皱, 与基底层和平滑肌层相互移行, 界限不明, 并有胶原纤维增生至内膜层。



EC: 内皮细胞; EL: 内弹性膜。

注: 内皮细胞细胞核偏向一侧, 表面微绒毛结构基本消失, 细胞膜某些部位断裂, 使内膜失去连贯性。

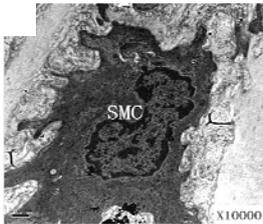
图2 老年组大鼠(19月龄)胸主动脉内皮细胞的衰老变化(透射电镜, ×12 000)

Figure 2 Structure changes of thoracic aorta endothelial cells of 19-month-old rats in the old group (Transmission electron microscope, ×12 000)

#### 2.1.2 透射电镜观察两组大鼠平滑肌细胞形态

青年组: 胸主动脉平滑肌细胞表面光滑、胞浆丰富、核形状规则, 核仁明显, 染色质分布均匀, 见图3。此外, 青年组胸主动脉平滑肌层中, 平滑肌细胞平行紧密

排列, 细胞间质少, 细胞之间充填有少量的胶原纤维。



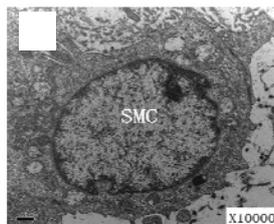
SMC: 平滑肌细胞。

注: 平滑肌细胞表面光滑、胞浆丰富、核形状规则, 核仁明显, 染色质分布均匀。

图3 青年组大鼠(2月龄)胸主动脉平滑肌细胞的观察(透射电镜,  $\times 10\ 000$ )

Figure 3 Observation of thoracic aorta smooth muscle cells of 2-month-old rats in the young group (Transmission electron microscope,  $\times 10\ 000$ )

**老年组:** 胸主动脉平滑肌细胞核大而畸形且偏向一侧, 核仁内染色质分解, 凝聚呈块状, 胞浆减少, 细胞质溶解而呈现细胞外空晕, 细胞器几乎完全崩解散落于细胞外, 胞质中可见细胞器脱落而形成的空腔, 见图4。此外, 老年组胸主动脉平滑肌层中, 平滑肌细胞变形, 突起和分叉增多, 出现局灶性坏死。细胞间质增加, 细胞间胶原纤维大量增生束状, 使细胞间隙增宽。



SMC: 平滑肌细胞。

注: 平滑肌细胞表面光滑、胞浆丰富、核形状规则, 核仁明显, 染色质分布均匀。

图4 老年组大鼠(19月龄)胸主动脉平滑肌细胞的衰老变化(TEM $\times 10\ 000$ )

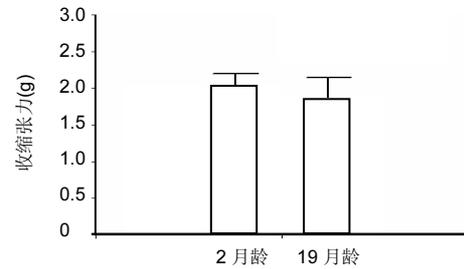
Figure 4 Observation of thoracic aorta smooth muscle cells of 19-month-old rats in the old group (Transmission electron microscope,  $\times 10\ 000$ )

## 2.2 衰老对大鼠胸主动脉平滑肌钾通道反应性的影响

### 2.2.1 衰老对大鼠胸主动脉KCl诱发收缩的影响

120 mmol/L KCl可诱发胸主动脉收缩, 老年组最大收缩张力为(1.8 $\pm$ 0.3) g, 与青年对照组(2.0 $\pm$ 0.2) g相比, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 见图5。在KCl诱发血管张力达到峰值后, 用Krebs液进行冲洗, 血管张力逐渐恢复

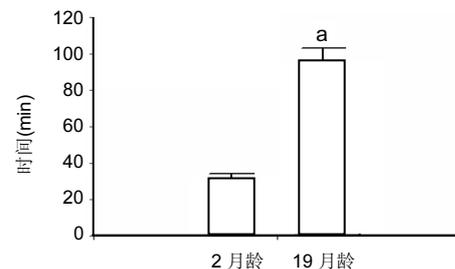
至基线水平。实验发现, 此恢复基础张力所需时间, 老年组为(94.0 $\pm$ 9.2) min, 显著长于青年组(29.3 $\pm$ 4.9) min ( $P < 0.01$ ), 提示衰老使血管的舒张能力下降, 见图6。



注: 青年组大鼠胸主动脉最大收缩张力高于老年组, 但统计学差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

图5 青年及老年大鼠在120 mmol/L KCl诱发下胸主动脉产生的最大收缩张力

Figure 5 Maximum tension of thoracic aorta induced by 120 mmol/L KCl in rats of the young group and the old group



与青年组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

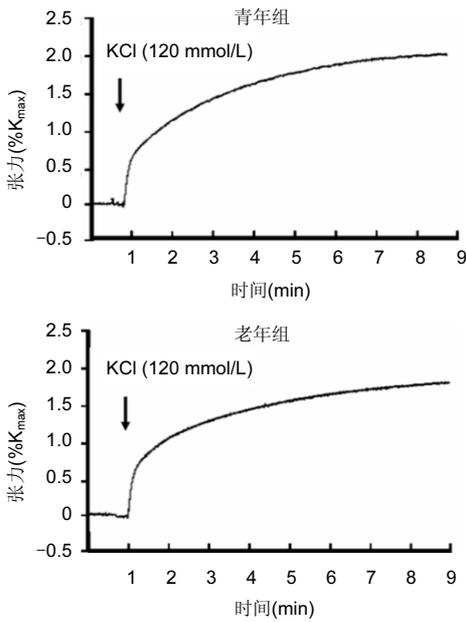
注: 青年组大鼠胸主动脉恢复基础张力所需时间显著少于老年组。

图6 青年及老年大鼠胸主动脉产生最大收缩张力后恢复基础张力所需的时间

Figure 6 Recovery time to baseline tension after production of the maximum contractile tension in rats of the young group and the old group

### 2.2.2 衰老对钾通道阻断剂诱发的胸主动脉收缩反应的影响

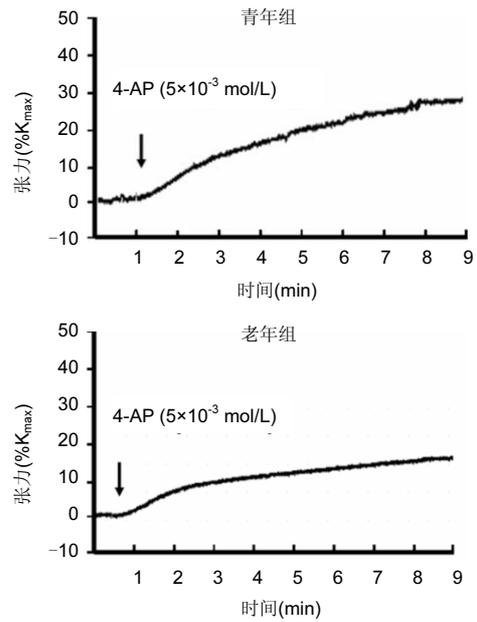
老年组大鼠与青年组大鼠KCl诱发的最大收缩张力差异无显著性意义, 见图7。钙激活钾通道特异性阻断剂TEA( $5 \times 10^{-3}$  mol/L)可诱发大鼠胸主动脉收缩<sup>[9]</sup>, 与青年对照组(21.3 $\pm$ 2.4)%相比, 老年组大鼠胸主动脉收缩反应明显降低(13.6 $\pm$ 2.1)% ( $P < 0.05$ ), 见图8。电压依赖性钾通道特异性阻断剂4-AP( $5 \times 10^{-3}$  mol/L)可阻断大鼠胸主动脉平滑肌细胞上的电压依赖性钾通道, 从而导致血管收缩。与青年组(30.2 $\pm$ 3.5)%比较, 老年组大鼠胸主动脉收缩反应明显降低(18.5 $\pm$ 2.6)% ( $P < 0.05$ ), 见图9。



注: 老年组大鼠与青年组大鼠 KCl (120 mmol/L) 诱发的最大收缩张力差异无显著性意义。

图 7 比较 2 月龄青年大鼠及 19 月龄老年大鼠对 KCl 诱发的胸主动脉收缩的影响

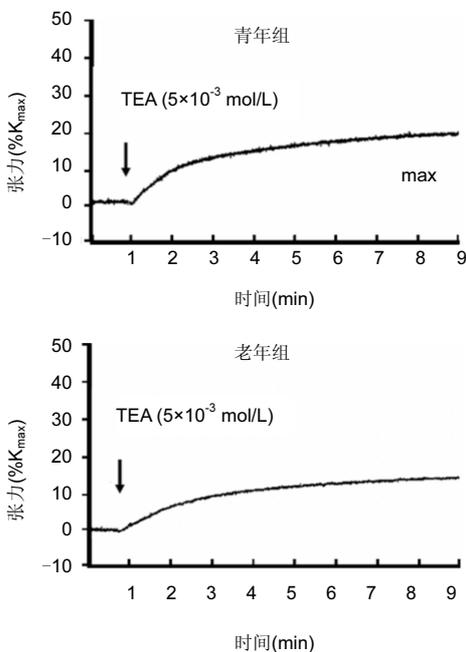
Figure 7 Effect of 2-month-old young rats and 19-month-old old rats on KCl-induced contraction of thoracic aorta



注: 与青年组比较, 老年组大鼠胸主动脉收缩反应明显降低。

图 9 比较 2 月龄青年大鼠及 19 月龄老年大鼠对 4-AP 诱发的胸主动脉收缩的影响

Figure 9 Effect of 2-month-old young rats and 19-month-old old rats on 4-aminopyridine-induced contraction of thoracic aorta

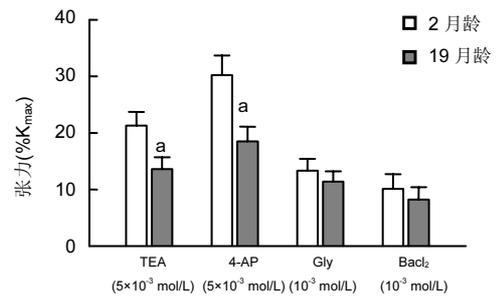


注: 与青年组比较, 老年组大鼠胸主动脉收缩反应明显降低。

图 8 比较 2 月龄青年大鼠及 19 月龄老年大鼠对 TEA 诱发的胸主动脉收缩的影响

Figure 8 Effect of 2-month-old young rats and 19-month-old old rats on tetraethylammonium-induced contraction of thoracic aorta

ATP 敏感性钾通道特异性阻断剂 glibenclamide ( $10^{-3}$  mol/L) 与内向整流钾通道的特异性阻断剂  $BaCl_2$  ( $10^{-3}$  mol/L) 也可诱发大鼠主动脉收缩, 与青年组相比, 老年组收缩反应均略有下降, 但差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ), 见图 10。



与青年组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

注: TEA 及 4-AP 钾通道阻断剂可明显降低老年组大鼠胸主动脉收缩反应。

图 10 比较 2 月龄青年大鼠和 19 月龄老年大鼠 TEA、4-AP、glibenclamide、 $BaCl_2$  四种钾通道阻断剂诱发胸主动脉的张力

Figure 10 Effects of 2-month-old young rats and 19-month-old old rats on thoracic aorta contractile tension induced by tetraethylammonium, 4-aminopyridine, glibenclamide, and  $BaCl_2$

### 3 讨论 Discussion

实验采用透射电镜对大鼠胸主动脉的超微结构进行观测, 对比老年组大鼠与青年组大鼠的差异, 分析衰老对血管结构造成的影响, 并结合离体去内皮胸主动脉血管环实验, 观察衰老对大鼠血管平滑肌钾通道反应性的影响, 以探讨平滑肌钾通道在衰老诱发的血管功能下降中的作用。

实验观察中发现, 老年组大鼠部分内皮细胞失去正常形态, 甚至从基底膜上完全脱失。正常情况下, 内皮细胞应附着于基底膜上, 与基底膜一起构成物质进出血管的通透性屏障, 从而有效阻止血液中高分子物质和脂蛋白进入动脉壁<sup>[10]</sup>。内皮细胞的脱失使内皮失去完整性, 通透性升高, 血浆中高分子物质易于侵入血管壁, 通过中层的流出亦受阻, 最终在内膜下积聚<sup>[11]</sup>; 存在于内膜的脂质和血小板释放因子进一步刺激中膜平滑肌细胞向内膜迁移、增生<sup>[12]</sup>, 并产生大量的胶原纤维, 使血管弹性下降。在机体衰老过程中, 依赖环氧化酶的内皮源性缩血管因子活性增强<sup>[13]</sup>, 引起内皮依赖性血管扩张能力下降。因此, 衰老引起的内皮功能障碍, 使血管舒张能力下降, 对血压的调节功能亦减退。另外, 观察可见衰老大鼠动脉内弹性膜弯曲, 内皮细胞向内弹性膜伸入。该现象产生的机制可能是由于血流压力的增加, 促使内皮细胞挤入窗孔增大的内弹性膜<sup>[14]</sup>。窗孔增大时, 内膜屏障作用也随之减弱或消失<sup>[15]</sup>, 这种变化使增生的平滑肌细胞和胶原纤维更容易进入内膜, 内弹性膜的弹性随之下降, 调节血压改变时管径大小的能力减弱。老年大鼠动脉内皮细胞的变性、凋亡、脱失, 都可能造成内皮依赖性血管舒张功能下降。因此, 可以说衰老是一种损害内皮细胞功能的独立危险因素, 同时, 内皮细胞结构损害和功能障碍是衰老过程中血管功能下降的始动环节。

观察中还发现, 青年组的平滑肌细胞排列紧密, 其间只有少量的胶原纤维, 而老年组的细胞间隙增大, 胶原纤维与基质增生<sup>[16]</sup>, 因此老年组的平滑肌所占比例下降。平滑肌的减少, 基质中某些成分如氨基葡聚糖等可与低密度脂蛋白相互作用促进其沉积<sup>[17]</sup>, 会促使动脉管壁的弹性减弱, 胶原纤维与基质的增生又进一步导致管壁的硬度增加<sup>[18]</sup>, 这些变化都会促使某些心血管疾病的发生。

许多研究都表明血管平滑肌细胞与伴随衰老出现的血管功能改变息息相关, 衰老可导致血管平滑肌钾通道密度减少<sup>[19]</sup>。钾通道是细胞膜电位的主要调控装置, 是动脉张力及直径的主要调节因素<sup>[20]</sup>, 它广泛分布于血管平滑肌, 钾通道开放后钾外流, 引起膜超极化并关闭电压依赖性钙通道, 减少钙内流, 导致血管扩张, 在维

持动脉舒张功能上起着重要作用。

为进一步探讨衰老对平滑肌钾通道反应性的影响, 实验又进行了体外血管环张力测定。TEA虽然为非特异性钾通道阻断剂, 但是在毫摩尔(mmol/L)级主要阻断钙激活钾通道<sup>[9]</sup>, 实验中作者选用 $5 \times 10^{-3}$  mol/L, 因此可认为它主要对钙激活钾通道起阻断作用。其他阻断剂4-AP, glibenclamide, BaCl<sub>2</sub>分别相对选择性阻断电压依赖性钾通道, ATP敏感性钾通道和内向整流钾通道<sup>[21]</sup>。实验结果显示, 分别加入TEA、4-AP、glibenclamide和BaCl<sub>2</sub>后, 均可诱发血管收缩, 但只有TEA和4-AP诱发的血管收缩反应在老年组显著低于青年组, 而glibenclamide和BaCl<sub>2</sub>诱发的血管收缩反应, 两组间无显著性差异。由此可以推断, 钙激活钾通道和电压依赖性钾通道可能在衰老诱导的血管舒张能力下降中起着重要作用。

大量研究表明, 钙激活钾通道广泛分布于血管平滑肌上<sup>[22]</sup>, 其主要生理作用是调节肌源性紧张<sup>[23]</sup>, 即当血管内压力升高, 细胞膜去极化时, 胞内钙内流增加, 激活钙激活钾通道, 引起钾外流增加, 通过负反馈调节使膜去极化程度降低, 血管收缩作用减弱。有报道, 在兔正常动脉平滑肌细胞中, NO可以直接激活B钙激活钾通道, 使血管平滑肌舒张, 降低血压, 但在兔动脉粥样硬化平滑肌细胞中钙激活钾通道对NO的敏感性明显降低, 血管平滑肌舒张能力下降<sup>[24]</sup>; 在F344鼠的冠状动脉, 老年鼠(28-30月龄)B钙激活钾通道数目及通道β1亚基的表达较青年鼠(三四月龄)显著减少<sup>[25]</sup>, 钙激活钾通道β1亚基的基因损伤可导致血管舒张受损, 并且通过抑制B钙激活钾通道的激活导致慢性高血压。另外, 电压依赖性钾通道在血管平滑肌上的生理作用主要是通过超极化机制拮抗细胞兴奋性、形成细胞静息膜电位; 在动脉张力的调节中亦起负反馈调节作用<sup>[26]</sup>。当细胞膜去极化时, 电压依赖性钾通道开放, 钾外流, 使细胞膜复极化, 细胞膜恢复静息状态。以往的体内和体外实验发现, 电压依赖性钾通道受细胞内钙和缩血管物质的影响, 成为脑血管痉挛及脑中风的致病因素之一<sup>[27]</sup>; Martens等<sup>[28]</sup>研究发现自发性高血压大鼠动脉的电压依赖性钾通道电流显著少于对照组, 且这些改变与高血压形成有关, 因此认为电压依赖性钾通道在血管舒缩功能方面也起到重要作用。虽然关于血管平滑肌钙激活钾通道和电压依赖性钾通道的增龄变化的机制目前尚未明确, 但实验研究的确从功能上证实了这两种钾通道在血管老化的病理生理过程中可能起着重要作用。

衰老可引起大鼠动脉超微结构发生改变, 血管舒张能力下降, 其中平滑肌钾通道尤其是钙激活钾通道和电压依赖性钾通道功能下降可能是其重要机制之一。

作者贡献: 实验由第一作者和通讯作者进行实验设计, 实

验实施为第一、四作者, 实验评估为第三作者, 资料收集为第四作者, 第一作者成文, 通讯作者审核, 第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理要求:** 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

**学术术语:** 钙激活钾通道—广泛分布于血管平滑肌上, 其主要生理作用是调节肌源性紧张, 当血管内压力升高, 细胞膜去极化时, 胞内钙内流增加, 激活钙激活钾通道, 引起钾外流增加, 通过负反馈调节使膜去极化程度降低, 血管收缩作用减弱。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] 励建安. 老年心血管病康复进展[J]. 实用老年医学, 2006;20(2): 212.
- [2] Lakatta EG, Levy D. Arterial and cardiac aging major shareholders in cardio vascular disease enterprises part I: aging arteries: a "setup" for vascular disease. *Circulation*, 2003, 107(2): 139-146.
- [3] 杨静, 雷燕. 细胞衰老与血管老化的关系及其研究进展[J]. 中国中西医结合杂志. 2009;29(4)369-374.
- [4] Toda N. Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation. *Pharmacol Ther*. 2012;133(2):159-176.
- [5] Moore A, Mangoni AA, Lyons D, et al. The cardiovascular system in the ageing patient. *Clin Pharmacol*, 2003;56(3): 254-260.
- [6] Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1995;268(4): 799-822.
- [7] 罗兴林, 李秀琴. 血管平滑肌钾离子通道的增龄变化及其研究[J]. 国外医学心血管疾病分册, 2003,30(5): 274.
- [8] Meera P, Wallner M, Toro L, et al. A Calcium switch for the functional coupling between  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of Maxi K<sup>+</sup> channel. *FEBS Lett*. 1996;382(1): 84-89.
- [9] Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, et al. Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tumulus*. *J Biol Chem*, 1990;265(2): 183-190.
- [10] Ferrari AU, Radaelli A, Centola M. Aging and the cardiovascular system. *J Appl Physiol*. 2003;95(3): 2591-2597.
- [11] Lu H, Yuan H, Chen S, et al. Senescent endothelial dysfunction is attributed to the up-regulation of sphingosine-1-phosphate receptor-2 in aged rats. *J Mol Cell Biochem*. 2012;63(2): 217-224.
- [12] Stobodan V. Perforating Branches of the Middle cerebral Artery. *J Stroke*. 1985;16(5): 1022-1029.
- [13] Belmin J, Corman B, Merval R, et al Age-related changes in Endothelial permeability and distribution volume of albumin in rat aorta. *J Physiol Am*. 1993;264(3): 679-685.
- [14] 李丹, 李玉洁, 杨庆, 等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志. 2012;22(8):92-98.
- [15] 李磊, 戴敏. 动脉粥样硬化血管内皮分泌功能失调与平滑肌细胞增殖[J]. 中国药理学通报, 2010, 16(02):192-197.
- [16] Vander Loo B, Labugger R, Skeper JN, et al. Enhanced peroxy nitrite formation is associated with vascular aging. *Exp Med*. 2000;192(12): 1731-1744.
- [17] Isabelle Joris, Guido Majno. Cellular breakdown within the arterial wall: An ultrastructural study of the coronary artery in young and aging rats. *Virchows Arch Path Histol*. 1974;364(1): 111-127.
- [18] Gerrity RG, Cliff WJ. The aortic tunica intima in young and aging rats. *Exp Mol Pathol*. 1972;16(2): 382-402.
- [19] Maruyama Y. Aging and arterial-cardiac interactions in the elderly. *J Cardiology*. 2012; 155(1):14-19.
- [20] Yildiz O. Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1100(2): 353-360.
- [21] 金肆, 王迪浔, 孙秉庸. K<sup>+</sup>通道在正常与慢性低氧大鼠低氧性肺血管收缩反应中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(9): 821-824.
- [22] Hirst GD, Edwards FR. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol Rev*. 1989; 69(2): 546-604.
- [23] Sargent CA, Grover GJ, Antonaccio MJ, et al. The cardioprotective, vasorelaxant and electrophysiological profile of the large conductance calcium-activated potassium channel opener NS-004. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993;266(3): 1422-1429.
- [24] 戴闻, 刘远厚, 曾晓荣, 等. 动脉粥样硬化兔血管平滑肌细胞大电导钙激活钾通道NO直接激活研究[J]. 现代临床医学, 2007, 33(6): 403-406.
- [25] Kazuhide N, Mansoureh E, Rong L, et al. Functional and molecular evidence of MaxiK channel  $\beta$ 1 subunit decrease with coronary artery ageing in the rat. *J Physiol*. 2004;15(559): 849-862.
- [26] Leblanc N, Wan X, Leung PM. Physiological role of Ca<sup>2+</sup>-activated and voltage-dependent K<sup>+</sup> currents in rabbit coronary myocytes. *J Physiol Am*. 1994;266(6):1523-1537.
- [27] Faraci FM, Heistad DD. Regulation of the cerebral circulation: role of endothelium and potassium channels. *Physiol Rev*. 1998;78(1): 53-89.
- [28] Martens JR, Gelband CH. Alterations in rat interlobular artery membrane potential and K<sup>+</sup> channels in genetic and nongenetic hypertension. *J Circ Res*. 1996;79(2): 295-301.