

小电导型钙激活钾通道在自发性高血压大鼠阴茎海绵体中的表达

廖 胜,高 飞,葛余正,于 鹏,赵 炎,吴 然,吴剑平,贾瑞鹏*

(南京医科大学附属南京医院泌尿外科,江苏 南京 210006)

[摘 要] 目的:探讨高血压对小电导型钙激活钾通道(SKCa)在大鼠阴茎海绵体中表达的影响及意义。方法:选用同龄雄性自发性高血压大鼠(SHR)及同系正常血压大鼠(WKY)各 8 只,10%利多卡因麻醉后连续检测海绵体内压(ICP)及平均动脉压(MAP),并用 5 V 电刺激海绵体神经(CN)记录 ICP/MAP 值变化。运用 Western blot 和逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术检测阴茎海绵体组织中 SKCa 蛋白和 mRNA 表达。结果:5 V 电刺激后 SHR 组 ICP/MAP 值显著低于 WKY 组 (0.31 ± 0.04 vs 0.76 ± 0.06),SKCa 蛋白和 mRNA 的表达在 SHR 组(0.18 ± 0.01 、 0.39 ± 0.01)较 WKY 组(0.49 ± 0.02 、 0.81 ± 0.08)明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。结论:高血压可以降低大鼠勃起功能,这可能与自发性高血压大鼠阴茎海绵体组织中 SKCa 表达下降密切相关。

[关键词] 自发性高血压大鼠;勃起功能障碍;阴茎海绵体;钾通道蛋白

[中图分类号] R544.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)10-1305-03

doi:10.7655/NYDXBNS20141002

SKCa in cavernous tissue of spontaneously hypertensive rats

Liao Sheng, Gao Fei, Ge Yuzheng, Yu Peng, Zhao Yan, Wu Ran, Wu Jianping, Jia Ruipeng*

(Department of Urinary, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] Objective: To validate the effect of hypertension on small conductance calcium-activated potassium channels in cavernous tissue of spontaneously hypertensive rats. **Methods:** Male spontaneously hypertensive rats(SHR) ($n = 8$) and normotensive Wistar Kyoto rats (WKY) ($n = 8$) were selected. A series of electric stimulation were utilized to the corpus cavernosum nerves of rats, the changes of ICP /MAP were observed repeatedly, and the expressions of SKCa protein and mRNA were assessed by Western blotting and RT-PCR. **Results:** Compared with the WKY group, ICP /MAP and the expression of SKCa gene mRNA and protein were significantly lower in the SHR group ($P < 0.05$), and the expression of SKCa protein and mRNA was significantly lower in the SHR group in comparison with that of the WKY group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Erectile dysfunction in hypertension is associated with the low expression of SKCa in the cavernous tissue of spontaneously hypertensive rats.

[Key words] spontaneously hypertensive rats; erectile dysfunction; corpus cavernosum penis; potassium channel protein

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(10): 1305-1307]

当前研究表明,内皮源性超级化因子(endothelium-derived hyperpolarizing factor, EDHF)作为最新发现的的阴茎海绵体舒张调节因子在阴茎勃起过程中起重要作用^[1]。阴茎勃起功能障碍(erectile dysfunction, ED)机制复杂,高血压可损伤 EDHF 通

路功能,使阴茎海绵体血管舒张功能受损,进而导致 ED 的发生。本研究意在观察自发性高血压大鼠阴茎海绵体中 EDHF 通路关键物质小电导型钙激活钾通道 (small conductance calcium-activated potassium channels, SKCa)蛋白的表达变化,进而研讨 SKCa 在高血压性 ED 机制中的相关意义。

[基金项目] 国家自然科学基金(81070597, 81370853);江苏省卫生厅科教兴卫工程领军人才与创新团队科研课题(LJ201107);江苏省六大人才高峰资助项目(2011-WS-093);江苏省科教兴卫工程重点学科开放课题(KF200942)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: urologist025@sohu.com

1 材料与方法

1.1 材料

10 周龄 SPF 级 SHR 及 WKY 大鼠各 8 只,体重(162.00 ± 7.14)g,购自南京医科大学附属南京医

院动物实验中心[SYXK(苏)2009-0015]。SKCa 多克隆抗体及全蛋白抽提试剂盒购自南京凯基生物公司,PCR 仪为美国 Eppendorf 公司产品,BL420 生物机能实验系统及压力转换器由南京医科大学生理教研室提供,BP-2000 大鼠无创血压仪由江苏省医药动物实验基地提供。实验大鼠在无特定病原体(specific pathogen-free,SPF)条件下,由南京医科大学附属南京医院动物实验中心用高压无菌的标准饲料及水饲养至 20 周。

1.2 方法

1.2.1 大鼠血压及体重测定

20 周时由笔者对所有大鼠血压及体重进行测定,WKY 组大鼠 (292.15 ± 13.75)g 与 SHR 组大鼠 (279.35 ± 8.05)g 体重无显著差异。血压由无创血压仪测量大鼠尾部动脉收缩压。

1.2.2 大鼠阴茎海绵体内压(ICP)和平均动脉压(MAP)测量

根据 Albersen 等^[2]的方法,10%利多卡因(10 mg/kg)麻醉大鼠后仰卧固定在实验台,常规消毒后暴露左颈总动脉,用充满肝素的 25 G 针头穿刺,另一端连接压力转换器记录 MAP;再沿正中切口暴露膀胱及前列腺,于前列腺背侧外上方分离出海绵体神经(CN),将一端连接电刺激仪的银制双极电极置 CN 周围。另外将充满 100 U/ml 肝素的 25 G 针头于阴茎海绵体上斜 45°刺入,另一端连接压力转换器。刺激参数 1 ms、16 Hz、5 V、持续 30 s。分别测量记录正常情况及 5 V 刺激 CN 时的 ICP/MAP。测量完毕用 10%利多卡因处死大鼠取阴茎海绵体,去除阴茎头、皮肤及尿道海绵体后分别保存于-80℃冰箱备用。

1.2.3 Western blot 检测 SKCa

取 200 mg 海绵体组织提取其总蛋白。BAC 法进行蛋白浓度测定后,将 60 μ g 总蛋白与缓冲液混合后,100℃加热 6 min,5 000 g 离心 6 min 后用电泳分离蛋白,再转移至 PVDF 膜与封闭液孵育 2 h。加一抗摇床振荡孵育 1 h,4℃过夜。加二抗室温下振荡孵育 2 h。加发光底物后显影。以 GAPDH 为内参照,相同实验重复 3 次。

1.2.4 RT-PCR 检测 SKCa mRNA

常规方法用 1 ml TRIzol 溶解 50 mg 组织提取总 RNA,逆转录成 cDNA。所有引物由南京凯基生物公司设计合成(表 1)。扩增采用预变性 95℃ 2 min;PCR 反应 95℃ 30 s、56℃ 30 s、72℃ 1 min、40 个循环。扩增后电泳及紫外摄像。以 GAPDH 为内参校准基因, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 作为目的基因的表达式进行分析。实验

重复 3 次。

表 1 GAPDH、SKCa 基因引物序列

Table 1 Sequence primers of GAPDH and SKCa gene		
基因名称	引物序列(5'~3')	产物大小(bp)
Rat-GAPDH	F:GGCCTTCCGTGTTCTTACC	103
	R:CGCCTGCTTCACCACTTC	
Rat-SKCa	F:CATCACGTTCTTCCATTG	150
	R:TCTGCTTTGTTGAGTTCGAG	

1.3 统计学方法

应用 SPSS17.0 软件对所有试验数据行 *t* 检验,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

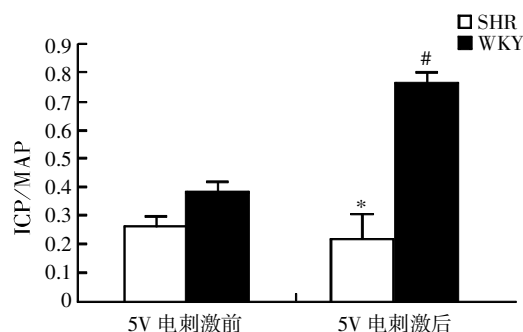
2 结果

2.1 自发性高血压大鼠模型的建立

所有 SHR 大鼠尾部动脉收缩压均高于 190 mmHg,所有 WKY 大鼠尾部动脉收缩压均低于 140 mmHg。SHR 大鼠性情暴躁、侵袭性强,血压高于 WKY 组大鼠[(198.00 \pm 7.79)mmHg vs (124.26 \pm 4.58)mmHg, $P < 0.05$, $n = 8$]。

2.2 大鼠阴茎海绵体 ICP 和 MAP 测量结果

麻醉后两组大鼠 ICP/MAP 值无显著差异($P > 0.05$),5 V 电刺激后两组 ICP/MAP 值差异显著($P < 0.05$,图 1)。



与 WKY 组比较,* $P < 0.05$;与 5V 电刺激前比较,# $P < 0.05$ 。

图 1 电刺激前后两组大鼠 ICP/MAP 值

Figure 1 Comparison of the ICP/MAP before and after electrostimulation of cavernous nerves between the two groups

2.3 Western blot 及 RT-PCR 检测结果

两组大鼠海绵体组织 SKCa mRNA 及蛋白表达结果见表 2。检测结果显示,高血压降低 SKCa mRNA 及蛋白表达。SHR 组大鼠 SKCa mRNA 及蛋白均显著低于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

阴茎勃起过程复杂,血管内皮组织由于其阴茎

表 2 SHR 组和 WKY 组大鼠阴茎海绵体 SKCa mRNA 及蛋白表达比较

Table 2 Comparison of the mRNA and protein expressions of SKCa between the SHR and WKY groups

组别	SKCa ^(2-ΔΔCT) (mRNA)	SKCa/GAPDH(蛋白)
WKY(n=8)	0.81 ± 0.08	0.49 ± 0.03
SHR(n=8)	0.39 ± 0.01 *	0.18 ± 0.01 *

与 WKY 组比较, *P < 0.05。

血管收缩和舒张方面的调节功能在阴茎勃起过程中发挥重要作用^[3]。作为新发现的第 3 种血管舒张因子,EDHF 在阴茎勃起过程的作用引起了广泛的关注。尽管在大血管的舒张作用不如一氧化氮(NO),但相关研究证实 EDHF 在阻力血管及小血管中的作用显著^[4]。Brøndum 等^[5]认为 II 型糖尿病大鼠肠系膜小动脉的内皮功能障碍主要是 EDHF 通路主导的血管舒张作用降低,其通过对实验大鼠使用 EDHF 通路关键物质 SK3 的激活剂,发现能有效恢复大鼠肠系膜小动脉的血管舒张。

临床流行病学调查认为高血压是 ED 发生的重要病因,诸多研究显示高血压性 ED 的发病率在 35%~89%不等^[67],但高血压 ED 的相关机制至今仍不明。有研究者认为高血压病引起的血管外周阻力升高导致了多种血管性并发症,而 EDHF 通路是小血管舒张的重要调节机制^[89]。Dong 等^[10]通过对比 WKY 大鼠,发现 SHR 大鼠眼睫状动脉中 EDHF 通路介导的血管舒张功能明显下降,这可能与高血压使 EDHF 通路受损有关。而通过上调 SHR 大鼠肠系膜小血管中等电导钙激活钾通道(IKCa)和 SKCa 的表达,大鼠肠系膜血管舒张功能有明显改善^[11],这进一步提示 EDHF 通路与血管舒张的密切关系。另有研究证实糖尿病 ED 大鼠阴茎海绵体中 SKCa 和 IKCa 的表达显著降低^[12],目前尚无高血压 ED 与 EDHF 通路的相关性研究。

鉴于 EDHF 通路在血管舒张调节作用中的重要性及其他前期研究成果,本文提出高血压大鼠阴茎海绵体组织中 EDHF 通路关键物质 SKCa 对海绵体组织中正常血管舒张效应有重要影响,高血压性 ED 的发生与海绵体组织中 SKCa 低表达有关。本研究检测 SKCa mRNA 和蛋白在 SHR 组及 WKY 组大鼠阴茎海绵体组织中的表达变化,观察到 SHR 大鼠勃起功能降低,且 SKCa mRNA 和蛋白表达显著低于 WKY 组,证实高血压降低 SKCa 表达,而 SKCa 低表达导致高血压性 ED。高血压通过哪种机制下调 SKCa,增强 EDHF 通路功能能否改善勃起功能,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Angulo J, Cuevas P, Fernández A, et al. Calcium dobesilate potentiates endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation of human penile resistance arteries[J]. Br J Pharmacol, 2003, 139(4): 854-862
- [2] Albersen M, Fandel TM, Zhang H, et al. Pentoxifylline promotes recovery of erectile function in a rat model of postprostatectomy erectile dysfunction[J]. Eur Urol, 2011, 59(2): 286-296
- [3] Andersson KE. Mechanisms of penile erection and basis for pharmacological treatment of erectile dysfunction[J]. Pharmacol Rev, 2011, 63(4): 811-859
- [4] Idris-Khodja N, Di Marco P, Farhat M, et al. Grape-Derived polyphenols prevent doxorubicin-induced blunted EDH-mediated relaxations in the rat mesenteric artery: Role of ROS and angiotensin II [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 516017
- [5] Brøndum E, Kold-Petersen H, Simonsen U, et al. NS309 restores EDHF-type relaxation in mesenteric small arteries from type 2 diabetic ZDF rats[J]. Br J Pharmacol, 2010, 159(1): 154-165
- [6] Javaroni V, Neves MF. Erectile dysfunction and hypertension: impact on cardiovascular risk and treatment[J]. Int J Hypertens, 2012, 2012: 627278
- [7] 宋巧凤, 张 茹, 姚艳敏, 等. 丹红注射液对高血压患者血管内皮功能、炎症指标及勃起功能变化的影响[J]. 山东医药, 2008, 48(32): 98-99
- [8] Dal-Ros S, Bronner C, Schott C, et al. Angiotensin II-induced hypertension is associated with a selective inhibition of endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses in the rat mesenteric artery[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2009, 328(2): 478-486
- [9] Wölfl SE, Schmidt VJ, Hoyer J, et al. Prominent role of KCa3.1 in endothelium-derived hyperpolarizing factor-type dilations and conducted responses in the microcirculation *in vivo*[J]. Cardiovasc Res, 2009, 82(3): 476-483
- [10] Dong Y, Watabe H, Cui J, et al. Reduced effects of endothelium-derived hyperpolarizing factor in ocular ciliary arteries from spontaneous hypertensive rats[J]. Exp Eye Res, 2010, 90(2): 324-329
- [11] Giachini FR, Carneiro FS, Lima W, et al. Upregulation of intermediate calcium-activated potassium channels counterbalance the impaired endothelium-dependent vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats[J]. Transl Res, 2009, 154(4): 183-193
- [12] Zhu JH, Jia RP, Xu LW, et al. Reduced expression of SK3 and IK1 channel proteins in the cavernous tissue of diabetic rats[J]. Asian J Androl, 2010, 12(4): 599-604

[收稿日期] 2014-05-06