

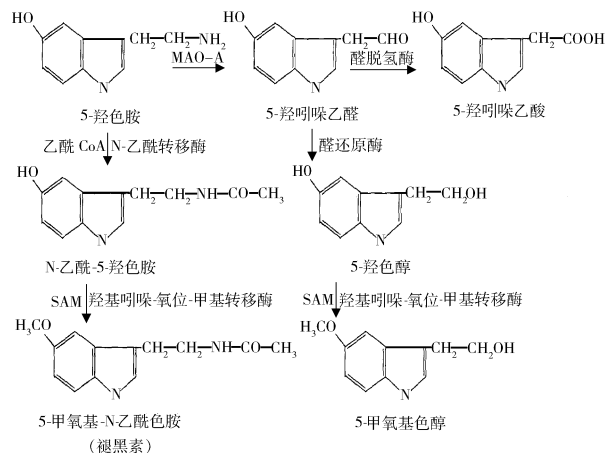


图4 5-HT在脑内的降解与褪黑激素的生成

表4中其他潜在生物标志物与PMS肝气逆证的关系有待于进一步研究。

本文利用代谢组学原理与技术,通过PMS肝气逆证模型大鼠尿液代谢图谱分析,力图探明与该病证密切相关的代谢模式,得到了PMS肝气逆证代谢轮廓图,为肝主疏泄理论提供代谢组学新证据。对于调肝方药干预该病证代谢水平上的靶成分及作用机制还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Tabassum S, Afridi B, Aman Z, *et al.* Premenstrual syndrome: frequency and severity in young college girls. *J Pak Med Assoc*, 2005, 55

- (12): 546 - 549
- 2 刘晓伟,张红梅,曲宏达,等。“怒伤气”大鼠行为观察与检测. *江苏中医药*, 2005, 26(3): 53 - 55
- 3 Nicholson JK, Timbrell JA, Sadler PJ. Proton NMR spectra of urine as indicators of renal damage: memory nephrotoxicity in rats. *Mol Pharmacol*, 1985, 27: 644
- 4 German JB, Bauman DE, Burrin DG, *et al.* Metabolomics in the opening decade of the 21st century: building the roads to individualized health. *J Nutr*, 2004, 134(10): 2729
- 5 徐文,林东海,刘孝昌. 代谢组学研究现状与展望. *药学报*, 2005, 40(9): 769 - 774
- 6 陈慧梅,刘志红. 代谢组学及其研究方法和应用. *肾脏病学与透析肾移植杂志*, 2005, 14(1): 54 - 59
- 7 Konradi C, Heckers S. Molecular aspects of glutamate dysregulation: implications for schizophrenia and its treatment. *Pharmacol Ther*, 2003, 97(2): 153 - 179
- 8 周璇,王雪琦. 谷氨酸能和γ-氨基丁酸能系统与情感障碍. *中国神经科学杂志*, 2003, 19(2): 130 - 133
- 9 Solanky KS, Bailey NJC, Beckwith Hall BM, *et al.* Application of biofluid H-1 nuclear magnetic resonance-based metabolomic techniques for the analysis of the biochemical effects of dietary isoflavones on human plasma profile. *Anal Biochem*, 2003, 323(2): 197 - 204
- 10 Abe Mitsushi, Masanori T. Detection of melatonin, its precursors and related enzyme activities in rabbit tears. *Experimental Eye Research*, 1999, 68(2): 255 - 262

(收稿: 2009 - 10 - 20)

(修回: 2009 - 12 - 03)

大电导钙敏感钾通道在人足月妊娠子宫平滑肌组织中的表达

戴 凌 沙金燕

摘 要 目的 了解大电导钙敏感钾通道(large-conductance calcium-sensitive potassium channel, BK_{Ca})蛋白在人足月妊娠未临产及临产子宫下段平滑肌组织中的表达情况,探讨BK_{Ca}在分娩启动中的作用。**方法** 采用Western blot分别测定人足月妊娠未临产及临产子宫下段平滑肌组织中BK_{Ca}蛋白α亚单位的表达。**结果** 人足月妊娠未临产子宫下段平滑肌组织中BK_{Ca}蛋白α亚单位的相对表达量为1.18 ± 0.20 (n = 9),足月妊娠临产子宫下段平滑肌组织中BK_{Ca}蛋白α亚单位的相对表达量为0.60 ± 0.08 (n = 11),二者统计学差异显著(P = 0.009)。**结论** 人足月妊娠未临产子宫下段平滑肌组织BK_{Ca}蛋白的表达高于临产子宫下段平滑肌组织,提示BK_{Ca}在宫缩发动中具有一定作用。

关键词 大电导钙敏感钾通道 妊娠 子宫平滑肌 分娩 Western印迹杂交

Expression of Large-Conductance Calcium-sensitive Potassium Channels in Human Term Myometrium. Dai Ling, Sha Jinyan. *Kunshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu 215300, China*

基金项目:国家自然科学基金(30571961)

作者单位:215300 江苏省昆山市中医医院(戴凌);200433 上海,第二军医大学附属长海医院(沙金燕)

Abstract Objective To investigate the expression of large - conductance calcium - sensitive potassium channel (BK_{Ca}) in myometrium. **Methods** The expression levels of BK_{Ca} α subunit protein in human myometrium tissues in term of non - labor (TNL) and term labor (TL) were measured by Western blot analysis. **Results** Relative abundance of BK_{Ca} channel α subunit protein was 1.18 ± 0.20 for TNL group ($n = 9$), and 0.60 ± 0.08 for TL group ($n = 11$). The statistic difference was significant ($P = 0.009$). **Conclusion** Expression of BK_{Ca} channel protein in lower segment myometrium of TNL group was higher than that of TL group. BK_{Ca} may play a certain role in modulating uterine function.

Key words Pregnant; Myometrium; Parturition; Large - conductance calcium - sensitive potassium channel; Western blot

大电导钙敏感钾通道 (large - conductance calcium - sensitive potassium channel, BK_{Ca}) 是一类可以使平滑肌静息的细胞膜上的大蛋白分子, 由形成孔道的 α 亚基和具有调节作用的 β 亚基组成。基础研究发现, 子宫平滑肌细胞中富含 BK_{Ca} 通道^[1]。

在未孕及妊娠子宫平滑肌细胞中, BK_{Ca} 通道是最主要的钾通道, 总外向钾电流的 80% 为 BK_{Ca} 电流^[2]。伴随着动作电位过程, 细胞质内游离钙离子增加。作为电压及细胞内钙离子的感受器, BK_{Ca} 通道被激活, 从而使钾离子外流, 使细胞膜在去极化后即刻复极化甚至超极化, 从而稳定细胞膜。^[3]。所以目前认为: BK_{Ca} 通道在平滑肌膜电位的维持和肌紧张的调节中起着重要的作用, 是平滑肌收缩的重要调控者。

为了解子宫平滑肌细胞膜 BK_{Ca} 的表达情况, 我们设计进行了此研究, 期望为控制子宫平滑肌的收缩提供一个靶点。

材料与方法

1. 标本来源: 选取长海医院 2006 年 4 月 ~ 2007 年 4 月, 初胎、单胎、足月未临产 (term non - labor, TNL) 9 例和足月临产 (term labor, TL) 11 例 (孕 37 ~ 42 周), 因臀位、头盆不称、羊水过少及胎儿窘迫等原因行择期或急诊子宫下段剖宫产孕妇, 年龄 23 ~ 36 岁, 在剖宫产术中于胎儿娩出后即剪取切口上缘近中线处少量肌条 (约 0.5 ~ 1.0 g), 即刻置于 10ml 离心管内 (冰浴中), 置 -80℃ 保存。待抽提蛋白。本研究得到长海医院医学伦理委员会的允许。各纳入研究患者均签署书面知情同意书。

2. 实验方法: (1) 主要试剂及仪器来源: 兔 BK_{Ca} α 亚单位抗体购自 Alomone labs; 山羊 actin 多克隆抗体, 羊抗鼠 IgG - HRP, 羊抗兔 IgG - HRP, 免疫印迹化学发光试剂 (ECL) 购自 Santa Cruz 公司, 硝酸纤维素膜 (NC 膜) 购自 sigma 公司。5 × 电泳缓冲液, 10 × 转膜缓冲液, 10 × TBS (pH7.6), 抗体稀释液, 组织蛋白裂解液。蛋白电泳仪: 上海西巴斯生物技术公司, 蛋白转膜仪: Bio - Rad 公司, FR - 200 紫外与可见分析装置及 SmartView 分析软件: 上海复日科技有限公司。(2) 子宫平滑肌总蛋白质的抽提与定量: 在含有子宫肌组织的 10ml 离心管内加入含有蛋白酶抑制剂的组织裂解液 500 μ l, 冰浴中匀浆器匀浆, 于 4℃ 10000g 离心 5min, 将上清移入 EP 管, -20℃ 保存。蛋白浓度测定采用 Bradford 法。(3) 蛋白质聚丙烯酰

胺凝胶电泳 (SDS - PAGE) 及 Western - blot 印迹杂交实验: 根据蛋白定量, 各实验组取等量的总蛋白 (100 μ g), 加入 4 × 上样缓冲液, 使后者稀释成 1 × 上样缓冲液, 95℃ 变性 5min, 进行 SDS - PAGE 电泳。actin 蛋白条带: 制胶、上样、电泳、电转膜、NC 膜染色、封闭、加一抗 [小鼠 β - actin 单克隆抗体 (1:1000)], 室温平摇 1h 后 4℃ 冰箱孵育过夜。加二抗 (1:1000 稀释的羊抗鼠 IgG - HRP), 室温振荡孵育 2h。加 ECL 发光底物、曝光、显影、定影, 将 X 线片冲净、晾干保存, 备蛋白条带密度扫描。 BK_{Ca} α 亚单位蛋白条带: 相同蛋白样本经电泳、电转膜、封闭。用新鲜抗体稀释液配制的兔源 Anti - K_{Ca} 1.1 (BK_{Ca}) (稀释度: 1:500) 为一抗, 阴性对照组: 1 μ g peptide / 1 μ g antibody 4℃ 共孵育 12h, 稀释度 1:1000。新鲜抗体稀释液配制的 1:1000 的羊抗兔 IgG - HRP 为二抗, 用同样方法显示 BK_{Ca} α 亚单位蛋白条带。(4) 密度扫描: 应用 FR - 200 紫外/可见光分析仪扫描 X 线片上的目的条带, 用 Smartview 软件进行密度定量分析。

3. 数据分析及统计学处理: 以 actin 为内参照, 将 BK_{Ca} 与 actin 蛋白密度的比值反映 BK_{Ca} 的蛋白的相对表达量。以 SPSS11.0 进行统计。建立数据库后, 统计、描述各组数据的均数、标准误并对数据进行方差齐性检验, 若数据呈正态分布且方差齐性, 则对其采用 one way ANOVA, 比较各组均数之间是否有差别。对于非正态分布或方差不齐的样本则采用非参数检验 (kruskal wallis test), $P < 0.05$ 为统计学差异显著。

结 果

采用 Western blot 的方法明确在临产和未临产子宫肌组织中都能表达大电导钙敏感钾通道 (BK_{Ca}) 蛋白 (图 1)。灰度扫描后, 用 β - actin 作为内参归一化后做统计学分析。结果显示: 未临产组子宫肌 BK_{Ca} α 亚单位蛋白 (1.18 ± 0.20) 表达高于临产组 (0.60 ± 0.08)。各组数据符合正态分布, 且方差齐性, 进行 ANOVA, $P = 0.009$, 差异显著, 即未临产组子宫肌 BK_{Ca} α 亚单位蛋白表达高于临产组 (图 2)。

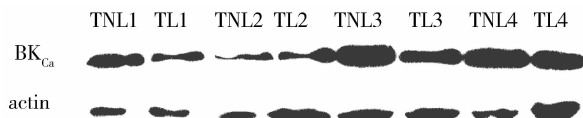


图 1 人足月妊娠子宫平滑肌组织 BK_{Ca} 蛋白的表达

TNL. 足月未临产; TL. 足月临产

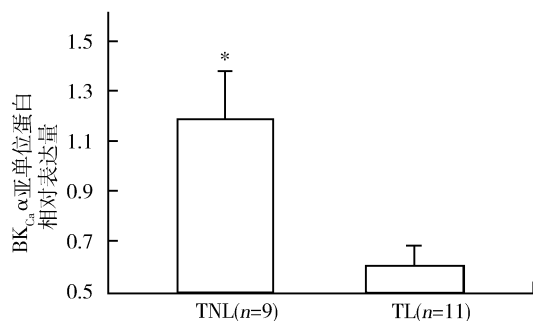


图2 人足月妊娠子宫肌组织 BK_{Ca} 蛋白的表达

* 与 TL 比较, $P < 0.01$

讨 论

1. BK_{Ca} 在子宫平滑肌细胞中的功能: 根据平滑肌收缩原理: 肌细胞先发生兴奋, 通过兴奋-收缩偶联而导致粗细肌丝滑行, 肌肉缩短。所以, 肌细胞兴奋性的高低影响子宫平滑肌的收缩性。

子宫肌兴奋性的高低主要与膜电位有关, 决定膜电位水平的主要因素是钾离子通道的数量和功能。除了钙敏感钾通道, 子宫平滑肌细胞还存在着多种钾离子通道, 如电压依赖的钾通道、ATP 敏感的钾通道等。妊娠子宫肌钾离子通道的种类和通道蛋白的表达量与未妊娠子宫相比有明显不同。BK_{Ca} 是人类妊娠子宫平滑肌细胞最主要的钾通道, 其电导大, 表达密度高, 它在调节子宫肌细胞膜静息电位和细胞兴奋性中发挥重要作用。

2. BK_{Ca} 与分娩启动的关系: 最初发现 BK_{Ca} 与分娩的关系是在 1993 年, Khan 报道: 临产后, 人类子宫肌的 BK_{Ca} 明显失去了钙依赖性和电压敏感性^[4]。在人类妊娠子宫肌的离体实验中, 使用 BK_{Ca} 通道的特异性激动剂 NS1619, 可引起强烈的舒张效应^[5]。特异性 BK_{Ca} 通道阻断剂 iberiotoxin 可增加子宫肌收缩的频率和强度, 提示 BK_{Ca} 在平滑肌细胞静息状态下是激活的, 对细胞和组织的功能有重要意义^[6]。Raheela 于 2001 年报道: 在妊娠的不同阶段, BK_{Ca} 通道通过改变其分布密度调节子宫平滑肌的张力^[7]。这提示: BK_{Ca} 在宫缩发动中具有一定作用。

在本研究中, 我们发现未临产子宫肌组织中 BK_{Ca} 蛋白表达高于临产子宫肌, 差异显著。这种量的改变在分娩发动中具有重要意义。足月未临产子宫肌的 BK_{Ca} 蛋白升高, 可提供一个有效地超极化电流, 使子宫处于兴奋抑制状态, 维持妊娠的继续。而在临产子宫肌, 该通道表达减少, 则使细胞易于兴奋, 触发子宫收缩。

3. 展望: 随着离子通道研究技术的进步, 特别是膜片钳技术的发展与运用, 人们发现许多疾病在其发病学的某一环节或某一阶段与离子通道功能障碍有关。各种离子通道均影响子宫肌细胞内的游离 Ca²⁺, 因而通过控制离子通道的活性可以调节子宫肌的收缩, 如前所述: 抑制 BK_{Ca} 的活性可以促进 Ca²⁺ 内流, 加强子宫肌收缩。但目前钾通道激动药和阻滞药多为有机物 (如 TEA), 对钾通道亚型的选择性较差, 而对通道亚型选择性相对较高的多为毒素 (如蜂毒明肽等), 所以只能作为钾通道研究的工具药使用, 限制了它们在临床上的使用。令人鼓舞的是, 目前有研究发现: 多种影响子宫肌收缩的因素是与 BK_{Ca} 偶联的。

Helen 应用全细胞膜片钳技术, 检测到选择性 β_3 肾上腺素受体激动剂 BRL37344 可使子宫肌细胞膜的 BK_{Ca} 通道开放增加; 同时, Helen 进行了离体肌条等长张力实验, 发现 BRL37344 对肌条具有舒张作用, 并呈浓度依赖性; 而以选择性 BK_{Ca} 阻滞剂 IBTX 将子宫肌条预孵育后, BRL37344 的舒张效应减弱。该实验提示: β_3 受体与 BK_{Ca} 功能上偶联, 二者共同调节子宫平滑肌的舒张^[8]。另外一个子宫肌条收缩实验中, 给予钾通道阻断剂 IbTX 可以阻断人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotrophin, hCG) 对子宫肌的舒张作用, 提示 hCG 通过激活 BK_{Ca} 通道发挥作用, BK_{Ca} 活化后, K⁺ 外流, 膜超极化, 使电压门控钙通道失活, 细胞内钙下降, 引起肌细胞舒张^[9]。因而, 我们可以通过控制与 BK_{Ca} 偶联的因素来控制子宫收缩。

进一步研究 BK_{Ca} 在妊娠子宫中的变化及其影响因素将有助于揭示分娩启动发生的机制, 为临床控制妊娠和分娩提供方法, 以减少早产、产后出血等子宫收缩功能紊乱疾病, 减少围生儿病死率, 提高围生医学质量及生殖健康水平。

参考文献

- 1 Zhou XB, Schlossmann J, Hofmann F, *et al.* Regulation of stably expressed and native BK channels from human myometrium by cGMP- and cAMP- dependent protein kinase. *Pflügers Archiv*, 1998, 436: 725-734
- 2 Zhou XB, Wang GX, Bernd H, *et al.* Pregnancy switches adrenergic signal transduction in rat and human uterine myocytes as probed by BK_{Ca} channel activity. *Journal of Physiology*, 2000, 524 (2): 339-352
- 3 林琳, 郑永芳, 屈金河, 等. 肿瘤坏死因子- α 激活 ECV304 钙激活钾通道及 G 蛋白的增强效应. *中国医学科学院学报*, 2000, 22 (3):

232 - 236

- 4 Khan RN, Smith SK, Morrison JJ, *et al.* Properties of large conductance K⁺ - channels in human myometrium during pregnancy and labour. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1993, 251:9 - 15
- 5 Khan RN, Smith SK, Ashford ML. Contribution of calcium - sensitive potassium channels to NS1619 - induced relaxation in human pregnant myometrium. *Hum Reprod*, 1998, 13:208 - 213
- 6 Helen CD, Diarmaid DH, Nandini R, *et al.* Human Chorionic Gonadotrophin Relaxation of Human Pregnant Myometrium and Activation of the BK_{Ca} Channel. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003, 88, (9):4310 - 4315
- 7 Raheela NK, Balwir MB, Sabaratnam A, *et al.* Potassium channels in

the human myometrium. *Experimental Physiology*, 2001, 86 (2):255 - 264

- 8 Helen C, Doheny, Caoimhe M, *et al.* Functional coupling of 3 - adrenoceptors and large conductance calcium - activated potassium channels in human uterine myocytes. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90 (10):5786 - 5796
- 9 Helen CD, Diarmaid DH, Nandini R, *et al.* Human Chorionic Gonadotrophin Relaxation of Human Pregnant Myometrium and Activation of the BK_{Ca} Channel [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2003, 88, (9):4310 - 4315

(收稿:2009 - 10 - 10)

血管紧张素转移酶基因多态性与脑卒中的关系

李 峰 窦会东 肖占森 赵润田 陈 廓 陶晓明 孙玉晶 侯淑琴 邱长春

摘 要 **目的** 探讨血管紧张素转换酶 (ACE) 基因插入/缺失 (I/D) 多态性与北京房山地区汉族人群脑卒中的易感相关性。**方法** 采用聚合酶链反应 (PCR) 方法分析 63 例脑出血患者、713 例脑梗死患者和 235 例正常对照组 ACE 基因的插入/缺失多态性, 观察 DD、ID、II 基因型频率及其等位 D、I 基因频率, 以及其与血糖、血脂水平的联系。**结果** 房山地区汉族人群脑出血组、脑梗死组和正常对照组相比较, 3 组的 DD、ID、II 基因型频率和 D、I 等位基因频率无显著性差异。ID、II 基因型的脑出血患者和脑梗死患者的血糖水平显著高于正常对照组 ($P < 0.01$), DD 基因型脑梗死患者的血糖水平也高于正常对照组 ($P < 0.05$)。DD 基因型脑梗死患者的三酰甘油水平、ID 型脑出血患者的总胆固醇水平均高于正常对照组, 差异有统计学意义 (分别为 $P < 0.01$, $P < 0.05$)。**结论** ACE 基因插入/缺失多态性不是脑出血和脑梗死的独立危险因素。但可能影响人血糖、三酰甘油和总胆固醇的水平。

关键词 脑出血 脑梗死 血管紧张素转换酶 基因 多态性

Association Between Angiotensin - converting Enzyme and Stroke. Li Feng, Dou Huidong, Xiao Zhansen, Zhao Runtian, Chen Kuo, Tao Xiaoming, Sun Yujing, Hou Shuqin, Qiu Changchun. Key National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences/Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract Objective To investigate the correlation between ACE gene polymorphisms and stroke of Han nationality people in Fangshan district of Beijing. **Methods** The Insertion/Deletion (ID) polymorphisms of ACE gene were detected in 63 patients with cerebral hemorrhage, and 713 patients with cerebral infarction and 235 health control by polymerase chain reaction (PCR). We observed the frequencies of genotype of deletion homozygote (DD), insertion homozygote (II) and insertion/deletion heterozygote (ID) and the alleles of D and I. Also we analyzed the association among I/D polymorphisms of ACE gene with serum glucose (GLU), triglyceride (TG), cholesterol (TC) levels. **Results** There was no significant difference in the frequencies of both genotypes of DD, ID, II and alleles of D and I in three groups. The serum GLU levels in patients carrying ID, II genotype were higher than those in healthy control ($P < 0.01$), so were the cerebral infarction patients with DD genotype ($P < 0.01$). As compared to healthy control, the TG levels of cerebral infarction patients with DD genotype and the TC levels of cerebral hemorrhage patients with ID genotype were both higher ($P < 0.01$, $P < 0.05$, respectively). **Conclusion** ACE gene polymorphisms (I/D) is not an independent risk factor for stroke of Han nationality in Fangshan. But it might have association with the serum glucose, triglyceride and cholesterol levels.

Key words Cerebral hemorrhage; Cerebral infarction; ACE; Gene; Polymorphism

基金项目:国家自然科学基金(30393130);美国中华医学基金(CMB:96 - 657);北京市自然科学基金重点项目(7001004)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院(李峰、陈廓、陶晓明、孙玉晶、邱长春);北京市房山第一医院(窦会东、肖占森、赵润田、侯淑琴);李峰、窦会东为并列第一作者

通讯作者:邱长春,电子邮箱:qiucc712@IBMS.PUMC.cn