

学者介绍

Author introduction

上海交通大学医学院



张翀
主任医师、博士生导师
博士

ZHANG Chong

M.D
Chief Physician,
Doctoral Supervisor

ORCID ID: 0000-0002-9353-5359

张翀 (1972—), 上海交通大学医学院附属新华医院肾脏内科副主任。2009年获上海交通大学医学院医学博士学位。作为访问学者, 曾先后赴美国埃默里大学(2007年)、俄勒冈健康与科学大学(2013—2014年)从事肾远曲小管钠氯共转运体的功能调控研究。现任华东肾脏病协作委员会委员、*J Am Soc Nephrol* 等国内外期刊的审稿专家。

- 长期从事各种原发性、继发性肾脏病, 特别是 IgA 肾病和狼疮性肾炎的诊治, 善于在肾脏病理的指导下进行肾脏病的诊断与治疗。主要科研方向为肾小管远曲小管离子转运与高血压。以第一作者或通信作者在 *J Clin Invest* 和 *Hypertension* 等期刊发表论文 20 余篇, 其中 SCI 收录 6 篇。研究得到国家自然科学基金面上项目等 6 个科研项目的支持。2007 年入选上海交通大学医学院百人计划。2016 年入选上海市教育委员会高峰高原学科建设计划。

ZHANG Chong born in 1972, deputy director of Department of Nephrology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine. He got his M.D from Shanghai Jiao Tong University School of Medicine in 2009. He worked as a visiting scholar in Emory University in 2007 and Oregon Health and Science University during 2013 and 2014, and did basic research mainly on the regulation of sodium chloride co-transporter in renal distal convoluted tubule. Currently, he is a member of Eastern China Kidney Disease Association, and serves as a reviewer of some international and Chinese medical journals, such as *J Am Soc Nephrol*.

- His major research interests are sodium reabsorption and

potassium excretion in distal nephron, and the relationship of its dysfunction with hypertension, especially the diagnosis and treatment of IgA nephropathy and lupus nephritis based on both clinical manifestations and renal pathologies. He has published more than 20 research papers in different journals as the first or corresponding author, including *J Clin Invest*, *Hypertension*, etc. He has been supported by 6 grants, such as General Program of National Natural Science Foundation of China. He was elected in “the 100-Talent Program of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine” in 2007 and enrolled into “Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support” in 2016.



论著·基础研究

细胞外钾对小鼠远端肾小管离子通道活性的影响

杨 阳, 张 娅, 郭 琴, 张 翊

上海交通大学医学院附属新华医院肾脏风湿免疫科, 上海 200092

[摘要] 目的·探索细胞外钾在短时间内浓度的变化对小鼠远端肾小管离子通道钠氯共转运体(sodium chloride co-transporter, NCC)、大电导钙激活钾通道(large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel, BK)活性的影响。**方法**·6只8~10周龄的无特定病原体动物(specific pathogen free, SPF)级C57BL/6小鼠取肾后获得肾片,并随机放入正常钾溶液、高钾溶液、氯化钡溶液和氯化铷溶液中进行孵育。通过蛋白质印迹法观察在不同浓度钾离子溶液及不同时间下,肾片NCC蛋白的表达丰度及磷酸化水平变化,以及经2种钾离子溶液孵育2 h后肾片BK中总蛋白和膜蛋白的表达变化。**结果**·与正常钾溶液相比,经高钾溶液孵育5、15、30 min后NCC磷酸化水平显著下降(均 $P<0.05$);而经氯化钡或氯化铷干预后,NCC磷酸化水平亦受到显著抑制(均 $P<0.05$)。经2种钾离子溶液处理2 h后,BK核心亚基 α 和 $\beta 4$ 的总蛋白表达间无明显变化,且BK α 亚基的膜蛋白表达间亦无显著差异。**结论**·细胞外高浓度的钾离子可直接下调NCC的磷酸化水平,且该下调可能是为下游离子通道的迅速排钾做准备。

[关键词] 远端小管通道; 钠氯共转运体; 大电导钙激活钾通道; 钾离子

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2019.09.008 **[中图分类号]** R692.6 **[文献标志码]** A

Effect of extracellular potassium on the activity of distal renal tubule in mice

YANG Yang, ZHANG Ya, GUO Qin, ZHANG Chong

Department of Nephrology and Rheumatology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effect of extracellular potassium (K^+) concentration on the activities of sodium chloride co-transporter (NCC) and large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (BK) in distal renal tubule of mice. **Methods**·Six specific pathogen free (SPF) C57BL/6 mice aged 8 to 10 weeks were sacrificed, and the kidney slices were made with previously reported method. Then, these slices were incubated randomly in normal K^+ , high K^+ , BaCl_2 and RbCl solutions, respectively. The abundance and phosphorylation level of NCC in kidney slices at different K^+ concentrations and different time courses were detected by Western blotting. The overall and membrane expressions of BK in kidney slices were also detected after incubation with different K^+ solutions for 2 h. **Results**·Compared with normal K^+ solution, NCC phosphorylation level was significantly decreased after incubation with high K^+ solution for 5, 15, 30 min (all $P<0.05$), and NCC phosphorylation level was also decreased after intervention with K^+ channel inhibitor Ba^{2+} or Rb^+ (both $P<0.05$). After the treatment with high K^+ solution for 2 h, neither the overall cell expression of BK α subunit and $\beta 4$ subunit, nor membrane expression of BK α subunit was found significant changes compared with normal K^+ incubation. **Conclusion**·High K^+ can directly down-regulate NCC phosphorylation level, which may be preparation for kaliuresis of the downstream tubule of distal convoluted tubule.

[Key words] distal transporter; sodium chloride co-transporter (NCC); large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel (BK); potassium ion (K^+)

钾是人体中的重要微量元素。研究^[1]显示,血钾的正常范围是3.5~5.5 mmol/L,一旦升高至6.5 mmol/L则可能因为心律失常而危及生命。在日常生活中,钾的摄入量因饮食结构的多样性存在较大差异;而即使健康人摄入了大量的高钾饮食,其餐后的血钾水平也仅波动于一个较狭窄的范围(0.4~0.7 mmol/L)^[2]。由此推断,机体可能具备迅速调节血钾平衡的能力,其可根据钾的摄入精细调节钾的排泄及其细胞内外的转移,从而保持血钾水平的稳定。

大部分由肾小球自由滤过的钾离子可在近端小管和髓袢被重吸收,最终仅有约10%的钾离子到达远端肾小管,包括远曲小管(distal convoluted tubule, DCT)、连接管(connecting tubule, CNT)和集合管(collecting duct, CD),其均为肾脏泌钾的重要部位。DCT的管腔侧可特异表达钠氯共转运体(sodium chloride co-transporter, NCC),负责钠离子、氯离子的非生电性重吸收。DCT分为前段(DCT1)和后段(DCT2)。DCT2至下游的CNT和CD均可表达11 β -羟基类固醇脱氢酶2,阻止盐皮质

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81570634, 81770706); 上海市教育委员会高峰高原学科建设计划(20161418) (General Program of National Natural Science Foundation of China, 81570634, 81770706; Shanghai Municipal Education Commission—Gaofeng Clinical Medicine Grant Support, 20161418)。

[作者简介] 杨 阳(1984—),女,硕士生;电子信箱:aple007@163.com。

[通信作者] 张 翊,电子信箱:zhangchongzc@gmail.com。



激素受体与糖皮质激素相结合,因此DCT1下游的小管仅对醛固酮产生反应,被称为醛固酮敏感的远端肾单位(aldosterone sensitive distal nephron, ASDN)^[3]。ASDN的管腔侧可表达上皮细胞钠通道(epithelial sodium channel, ENaC)和肾外髓钾通道(renal outer medullary potassium channel, ROMK),其中ENaC负责钠离子的生电性重吸收,是ROMK泌钾的主要动力。以往的研究^[3]表明,醛固酮可激活ENaC实现对钠离子的重吸收,导致胞内电荷发生变化,进而激活了ROMK以促进钾的排泄。

细胞外钾离子浓度的升高,可使通过基底膜侧的内向整流钾离子通道Kir4.1外流的钾离子减少,还可使DCT部位肾小管上皮细胞基底膜去极化,从而导致氯离子通道介导的氯离子外流减少,而胞内氯离子浓度的升高则可抑制WNK激酶磷酸化,最终使NCC去磷酸化。既往研究^[4]证实,NCC的磷酸化水平代表其活性变化,磷酸化水平越高活性则越强。当发生低钾饮食时,胞外钾离子浓度有所降低,可使NCC发生磷酸化而被激活^[4-5]。由此可见,NCC不仅负责转运钠离子,还发挥了“钾感应器”的作用。有研究^[6-7]显示,在高钾饮食后0.5 h即可观察到尿钾排泄增加,而在此时醛固酮分泌的增加则刚刚开始,作为醛固酮作用靶点的ENaC更是在高钾饮食6 h后才被激活;因此,可以推测摄入的高浓度钾离子可能是通过某种不依赖醛固酮的途径诱导肾小管实现快速排钾。

在DCT中除了ROMK,还有一种排钾通道——大电导钙激活钾通道(large conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, BK,由*Slo1*基因编码)。BK是一种由电导、钙、小管流量激活的排钾通道,由α和β亚基组成。尽管有诸多证据均提示BK参与了高钾饮食后的排钾过程,但在肾脏排钾的过程探索中BK始终被作为ROMK的“配角”进行研究,且激活该通道的作用机制也尚未被阐明。研究^[8]表明,BK的排钾过程并不依赖于醛固酮,且BK是远端肾小管管腔侧除ROMK以外唯一被发现的排钾通道;由此我们推测,BK可能是在高钾饮食后的早期与NCC协同介

导肾脏的排钾过程,从而使机体在由醛固酮介导的ROMK激活之前发挥作用,以维持血钾的稳定。为进一步排除体内实验中激素水平变化对排钾通道的影响,本研究采取离体处理肾脏切片(肾片)的方法,将肾片置于不同浓度的钾离子溶液中进行培养,通过蛋白质印迹法(Western blotting)检测相关通道蛋白的表达及磷酸化水平的变化,以期为排钾机制的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8~10周龄无特定病原体动物(specific pathogen free, SPF)级健康C57/BL6小鼠(野生型)6只[由上海交通大学医学院附属新华医院动物中心提供,动物生产许可证:SYXK(沪)2018-0038],雌、雄小鼠的比例为1:1,体质量为22~27 g。该小鼠由上海交通大学医学院附属新华医院动物中心按SPF级饲养于标准笼中,使用许可证:SYXK(沪)2018-0038。小鼠饲以标准饲料,自由进食,饮水。本研究经上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会审核批准。

1.1.2 实验试剂、药品及仪器 氯化钾粉末、氯化铝粉末(美国Sigma公司),蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(美国Roche公司),MinuteTM质膜蛋白分离试剂盒(美国Invent公司),β-actin小鼠源单克隆抗体(美国Santacruz公司),NCC磷酸化(pNCC)兔抗体(美国Phosphosolutions公司),NCC兔抗体(由美国俄勒冈健康与科学大学肾脏病与高血压科David Ellison教授惠赠),Cadherin抗体(美国Abcam公司),BK抗体(以色列Alomone Lab公司),HRP标记山羊抗小鼠抗体、HRP标记驴抗兔抗体(广州康臣药业有限公司),聚偏氟乙烯膜(美国Millipore公司)等。

实验中涉及多种溶液的配置,具体见表1所示。溶液均为现配现用,即配好后置于冰上并持续通入混合气体(95% O₂、5% CO₂)0.5 h以上,方可使用。

表1 溶液配制表
Tab 1 Solution preparation

溶液名称	溶质成分/(mmol/L)								
	NaCl	NaHCO ₃	KCl	NaH ₂ PO ₄	CaCl ₂	MgCl ₂	葡萄糖	BaCl ₂	RbCl
切片溶液	98.5	35	3	1	2.5	1.8	25	0	0
高钾溶液	91.5	25	10	1	2.5	1.8	25	0	0
低钾溶液	100.5	25	1	1	2.5	1.8	25	0	0
正常钾溶液	98.5	25	3	1	2.5	1.8	25	0	0
氯化钡溶液	96.5	25	3	1	2.5	1.8	25	5	0
氯化铷溶液	98.5	25	1	1	2.5	1.8	25	0	10



眼科剪、弯镊、直镊、头皮针、刀片、振动切片机(美国 Vibratome Leica 公司), 电泳仪、转膜槽、发光仪(美国 Bio-Rad 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 肾片的制备 小鼠经异氟烷吸入麻醉后被固定于粘鼠板上, 逐层分离皮肤及皮下组织。用剪刀打开胸腔、腹腔并剪开右心房, 用镊子固定心脏后, 将持续通气($95\% O_2$ 、 $5\% CO_2$) 0.5 h 以上的 $0\text{ }^\circ\text{C}$ 切片溶液注射其中。进一步打开小鼠腹腔, 取出两侧肾脏并去除肾包膜后置于上述切片溶液中, 平衡3 min 后用胶水将其固定于组织振动切片机上, 于低温下切片获得厚度为 $300\text{ }\mu\text{m}$ 的肾片。将上述肾片移至持续通气($95\% O_2$ 、 $5\% CO_2$) 0.5 h 以上的 $32\text{ }^\circ\text{C}$ 正常钾溶液中, 预孵育40 min, 以恢复肾片经切割产生的机械性损伤。

1.2.2 NCC 和 BK 蛋白的检测 将处理好的肾片分别置于正常钾溶液、高钾溶液、氯化钡溶液和氯化铷溶液中进行孵育, 按文献^[9]记载的方法全程保持持续通气($95\% O_2$ 、 $5\% CO_2$)。孵育完毕后, 肾片置于预冷的EP管中称量并记录质量, 按肾片与裂解液以1:10的质量比向肾片加入预冷的组织裂解液。经充分裂解、匀浆后, 于 $16\ 000\times g$ 离心20 min 收集上清液, 即为所需。经BCA蛋白定量后, 取 $40\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白样品与 $5\times$ SDS蛋白上样缓冲液混合进行变性处理, 即 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 加热30 min 后于 $11\ 180\times g$ 离心1 min, 收集上清液。经5%浓缩胶和8%分离胶电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上。分别用含5%脱脂牛奶的封闭液及含5%牛血清白蛋白的封闭液对非磷酸化蛋白及磷酸化蛋白进行封闭。加入一抗(NCC抗体、pNCC抗体、BK抗体、Cadherin抗体、 β -actin的工作

浓度分别为1:10 000、1:2 000、1:200、1:1、1:1 000)于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 摇床过夜。洗膜3次(每次10 min)后, 加入二抗(HRP标记山羊抗小鼠抗体的工作浓度为1:5 000), 于常温下摇床孵育45 min。再次洗膜3次, 经显色液显色后进行成像。通过Image J软件对蛋白条带进行半定量。NCC 磷酸化程度以pNCC蛋白浓度值除以总NCC蛋白浓度值计算。

1.2.3 膜蛋白的提取 应用MinuteTM质膜蛋白分离试剂盒提取肾片总膜蛋白。先将试剂盒中的实验用管进行预冷并将肾片置于离心管柱上, 加入Buffer A反复扭转进行研磨, 再加入适量Buffer A进行吹打并于冰上孵育, 孵育后弃去柱子, 重悬细胞。通过差速离心和密度离心分离细胞蛋白, 即加入Buffer B重悬后离心取上清, 再次离心后保留沉淀并进行溶解。

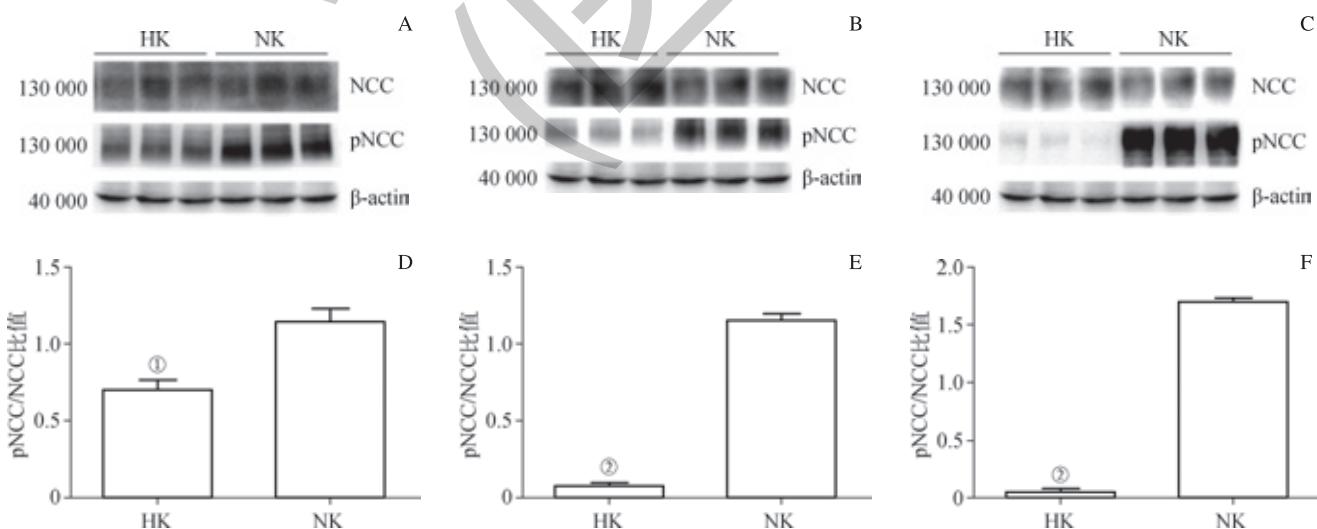
1.3 统计学分析

采用Graphpad Prism 8.0软件对研究数据进行统计学分析。两两比较采用独立样本非配对t检验, 采用单因素方差分析进行多组间的比较。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肾片经不同浓度钾离子溶液孵育后 NCC 磷酸化水平的变化

将肾片分别置于正常钾溶液及高钾溶液中孵育5、15、30 min 后, 采用Western blotting检测NCC蛋白的表达丰度和磷酸化水平的变化。结果显示, 与正常钾溶液相比, 经高钾溶液孵育5 min 后NCC的磷酸化水平有所下降($P=0.008$), 且延长观察时间发现, 经高钾溶液孵育后NCC的磷酸化水平下降显著(均 $P=0.000$), 而NCC蛋白的表达则无较大差异(图1)。



注: A、D. 孵育5 min; B、E. 孵育15 min; C、F. 孵育30 min。HK 为高钾溶液, NK 为正常钾溶液。^① $P=0.008$, ^② $P=0.000$, 与正常钾溶液比较

图1 肾片分别于正常钾溶液和高钾溶液孵育不同时间后, NCC蛋白表达丰度及磷酸化水平的变化

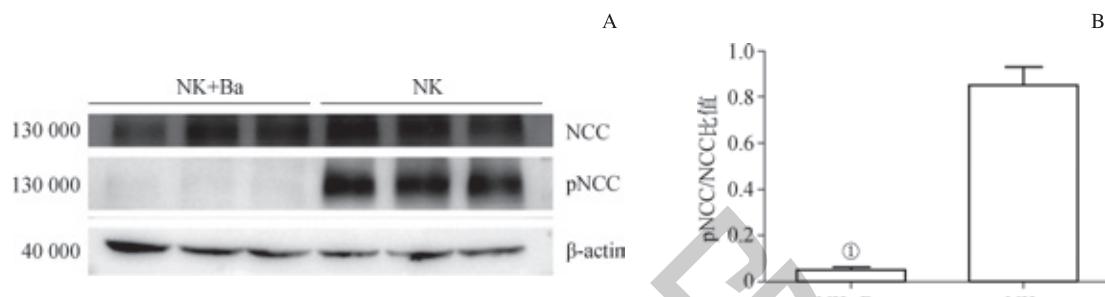
Fig 1 Changes of abundance and phosphorylation level of NCC in kidney slices incubated with normal or high K⁺ solution at different time courses



2.2 肾片经氯化钡和氯化铷孵育后 NCC 磷酸化水平的变化

将小鼠肾片随机置入正常钾溶液和经氯化钡干预的正常钾溶液中孵育 1 h 后发现, 后者溶液中肾片 NCC 的磷酸化水平显著降低 ($P=0.000$), 而 NCC 蛋白的表达水平

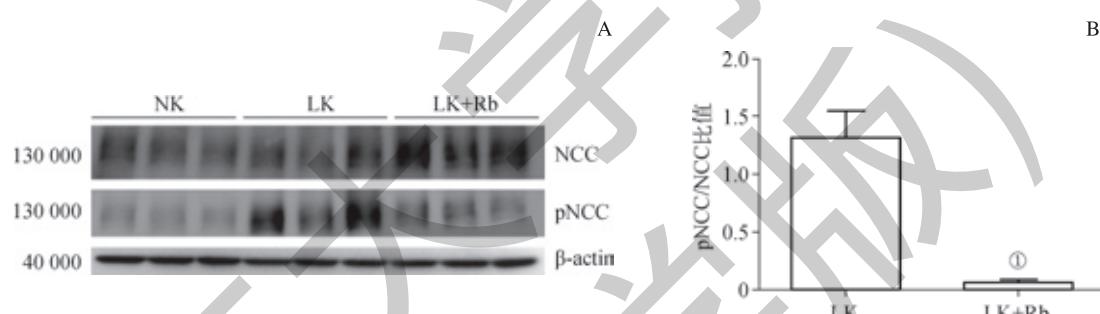
间差异无统计学意义(图 2)。同样地, 随机将小鼠肾片置入正常钾溶液、低钾溶液和低钾氯化铷溶液中孵育 1 h 后发现, 经氯化铷溶液干预的肾片 NCC 的磷酸化水平亦显著降低 ($P=0.007$) (图 3)。



注: A. NCC 蛋白表达丰度及磷酸化水平的蛋白条带; B. 蛋白的半定量统计。NK 为正常钾溶液, Ba 为 BaCl_2 溶液。^① $P=0.000$, 与正常钾溶液比较

图 2 经正常钾溶液和氯化钡干预的正常钾溶液孵育肾片 1 h 后, NCC 蛋白表达丰度及磷酸化水平的变化

Fig 2 Changes of abundance and phosphorylation level of NCC in kidney slices after incubated with normal K^+ solution with and without BaCl_2 for 1 h



注: A. NCC 蛋白表达丰度及磷酸化水平的蛋白条带; B. 蛋白的半定量统计。NK 为正常钾溶液, LK 为低钾溶液, Rb 为 RbCl 溶液。^① $P=0.007$, 与低钾溶液比较

图 3 经正常钾溶液、低钾溶液和低钾氯化铷溶液孵育肾片 1 h 后, NCC 蛋白表达丰度及磷酸化水平的变化

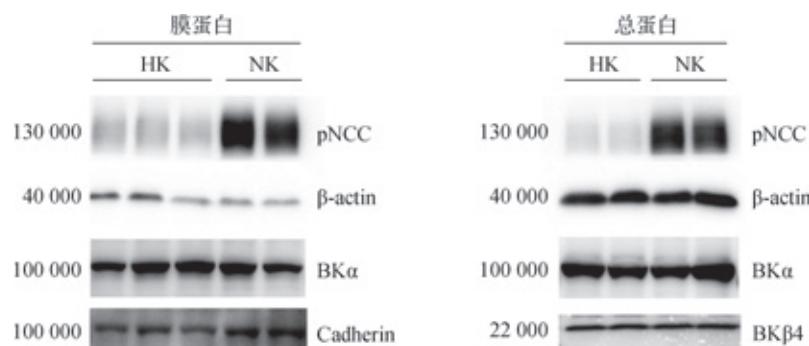
Fig 3 Changes of abundance and phosphorylation level of NCC in kidney slices after incubated with normal K^+ solution, low K^+ solution with and without RbCl for 1 h

2.3 肾片经正常钾溶液和高钾溶液孵育后 BK 的变化

根据 2.1 部分的结果发现, 高钾溶液中 NCC 的磷酸化水平呈现出迅速而显著的下调, 说明 NCC 重吸收钠离子的能力有所下降, 那么下游肾小管排钾情况如何变化? 本研究选择正常钾溶液和高钾溶液孵育肾片 2 h 后, 通过 Western blotting 检测 $\text{BK}\alpha$ 亚基的总蛋白变化, 结果显示该总蛋白在上述 2 种溶液中的表达差异无统计学意义。考虑到 BK 需要表达于细胞膜上才能较好地发挥作用, 本研究进一步采用 Western blotting 分别检测于不同浓度钾离子

溶液干预时, 总蛋白和膜蛋白样本中 pNCC 水平和 $\beta\text{-actin}$ 水平的比值 (pNCC/ $\beta\text{-actin}$) 的变化。结果显示该比值在膜蛋白中显著高于总蛋白, 继而说明膜蛋白提取成功; 同时, 以 Cadherin 作为膜蛋白的内参, 本研究还发现肾片中 $\text{BK}\alpha$ 亚基的膜表达水平间基本无差异。考虑到 BK 通道由 α 亚基和 β 亚基构成, 且肾片中 BK 的表达以 $\beta 4$ 亚基为主, 本研究针对 $\beta 4$ 进行检测发现, 于不同浓度的钾离子溶液处理 2 h 后, BK 的 $\beta 4$ 亚基的总蛋白丰度间无明显变化 (图 4)。





注: HK 为高钾溶液, NK 为正常钾溶液

图 4 经正常钾溶液和高钾溶液孵育肾片 2 h 后, 总蛋白和膜蛋白中 pNCC、BK α 亚基和 β 4 亚基的表达变化

Fig 4 Changes of overall cell expression and membrane expression of pNCC, BK α subunit and β 4 subunit in kidney slices after incubation with normal or high K $^{+}$ solution for 2 h

3 讨论

为排除体内激素等对肾脏排钾的影响, 本研究采用不同浓度的钾离子溶液于体外孵育肾片发现, 在高钾溶液中肾片的 NCC 磷酸化水平有所下降, 且随着孵育时间的增加下降程度更加显著。考虑到以往文献^[10]报道, 小鼠的正常血钾上限高于人类, 10 mmol/L(本研究所用)仍为小鼠的血钾生理高限。基于阳离子钡和铷可通过改变细胞膜上钾离子通道的活性使钾离子不易渗透到细胞外, 同时还可降低钠钾泵的活性使氯离子不易被排出导致胞内呈现高氯环境而抑制 NCC 的活性, 本研究采用氯化钡和氯化铷干预来模拟高钾环境。结果显示, 经氯化钡和氯化铷干预后 NCC 的磷酸化水平显著下降, 从而进一步证实了高钾下调 pNCC 是通过细胞内外钾、氯等离子的浓度变化所致; 此外上述结果还表明, NCC 不仅可参与血钠水平的调控, 还能够感受血钾水平的变化并随之发生功能改变。有研究^[11]已证实, NCC 的失活可使流经下游 CNT 和 CD 的钠离子增多, 从而利于 ROMK 和 BK 的排钾作用。

血钾须维持在一个相对狭窄的范围内, 而其较高的浓度导致的高钾血症将会引起心律失常、神经肌肉功能紊乱等的发生, 严重者甚至危及生命。机体钾平衡的维持涉及钾的排泄、细胞内外的转移等诸多方面。人体中 90% 以上的钾通过肾脏排泄, 因此在血钾稳定的维持中肾脏发挥了较为重要的作用。肾远端小管管腔是钾离子分泌的重要部位, 主要由主细胞及闰细胞构成, 目前仅发现 ROMK 和 BK 共 2 种泌钾通道^[12], 即钾离子需先通过钠钾泵进入细胞, 再由顶端膜上的钾离子分泌通道排出, 从而实现对钾离子的分泌^[13]。研究普遍认为, 血钾浓度的升高可使 NCC 去磷酸化, 继而导致 DCT 段肾小管管腔内对钠的重吸收下降, 同时可使下游小管上 ENaC 对钠的生电性重吸

收增加, 最终激活 ENaC 和 ROMK 以实现对钾离子的分泌。然而, 有研究^[6]则报道, 醛固酮是在尿钾排泄增加后开始升高, 而 ROMK 的活性受到醛固酮的调控, 因此使得 ROMK 在急性排钾过程中受到限制。尽管如此, 机体仍能维持血钾在相对狭窄的范围内波动, 提示高钾饮食后早期可能存在 ROMK 以外的快速排钾途径。

BK 同样能够发挥排钾作用。研究^[14]显示, 在高钾饮食的状态下 BK 的表达显著增强; 且在 BK α 亚基基因被敲除的小鼠中, 进行高钾饮食后发现尿钾排泄显著减少。Carrizoza-Gaytán 等^[15]发现, 高钾饮食可通过激活闰细胞上的 BK 实现快速排钾。虽然多数研究认为 BK 可协同 ROMK 参与排钾, 并非主要的排钾通道, 但在急性高钾情况下 ROMK 的活性并未在尿钾增加之前发生显著的变化。另外, 由于高钾环境下 NCC 的活性有所下降, 导致钠的重吸收减少, 而流入小管下游的小管液增加。以往研究提示钾离子的分泌主要由主细胞承担, 但近年来的研究^[16]则发现闰细胞也参与其中并发挥作用, 即该细胞上的 BK 在肾小管流率增加时可介导分泌钾离子, 而 BK 是否会在急性高钾下发挥主要分泌钾离子的作用(不受醛固酮调节), 是本研究的重点内容。

BK 的 α 亚基存在通道活性, β 亚基为调节亚基, 且根据 β 亚基分布的不同可分为不同亚型^[8]。BK 的氨基端是 α 亚基和 β 亚基的结合区域, 其中 α 亚基可以被多种蛋白激酶激活, β 亚基则负责调控钙离子和电压门控以改变通道的活性, 实现对孔道失活及门控活性的调节^[17]。本研究对肾片抽提的总蛋白中 BK α 亚基和 β 4 亚基的检测发现, 在不同的钾离子浓度孵育下其表达均无显著差异; 究其原因, 可能是肾片经高钾溶液处理时间较短未能检测出蛋白丰度的变化。随后, 本研究对 BK 的 α 亚基的膜表达进行检测, 结果显示膜蛋白提纯效果较好, 但膜蛋白上



BK 的 α 亚基表达也无显著差异。虽然通过上述实验, 我们并没有发现高钾溶液处理前后在总蛋白和膜蛋白中 BK 表达丰度的差异, 但并不能排除 BK 蛋白经过其他特定的蛋白修饰如磷酸化、乙酰化等发挥即时效应^[18]。虽然本研究未发现 BK 蛋白丰度的变化, 但有关小鼠血钾浓度会影响 NCC 的活性, 进而调节钠离子的转运导致远端小管中小管液流量发生变化, 从而影响 BK 活性的效应已被证实^[18], 只是该效应尚无法在离体肾片研究中得到体现。BK 仅表达于远端肾小管的狭小区域, 而肾片中混杂有较多肾髓质以及皮质的无关组织使得 BK 表达的变化不易被检测, 或许可通过微切割技术获取远端肾组织单位实现对 BK 表达的分析。待研究条件成熟后, 本课题组拟通过在体外静滴不同浓度的钾离子检测肾小管的流量变化以及采

用电生理技术测定肾小管通道活性, 来进一步探讨相关领域的研究。目前, 鲜少有关于编码 BK 基因 *Slo1* 的相关报道。究竟 BK 通道可以发挥哪些作用, 本课题组将在后续进行深入的分析。

综上所述, 本研究采用的肾片孵育技术(离体实验)能够有效排除体内激素等相关调控作用, 同时还能够模拟短时间内的体内环境, 尽可能保持肾组织的生理活性, 因此是研究短时间内钾离子直接参与调控 NCC 以及其他排钾相关通道活性的重要手段。本研究发现, 高钾可迅速使 NCC 磷酸化水平下调而失活, 但 BK 的表达没有明显变化。未来我们将继续该领域研究, 以探索 BK 的磷酸化或构象变化在高钾环境下快速排钾过程中发挥的作用。

参·考·文·献

- [1] Penton D, Czogalla J, Loffing J. Dietary potassium and the renal control of salt balance and blood pressure[J]. *Pflugers Arch*, 2015, 467(3): 513-530.
- [2] Ellison DH, Terker AS, Gamba G. Potassium and its discontents: new insight, new treatments[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(4): 981-989.
- [3] Rossier BC, Staub O, Hummler E. Genetic dissection of sodium and potassium transport along the aldosterone-sensitive distal nephron: importance in the control of blood pressure and hypertension[J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(13): 1929-1941.
- [4] Wu P, Gao ZX, Su XT, et al. Kir4.1/Kir5.1 activity is essential for dietary sodium intake-induced modulation of Na-Cl cotransporter[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2019, 30(2): 216-227.
- [5] Terker AS, Zhang C, Erspamer KJ, et al. Unique chloride-sensing properties of WNK4 permit the distal nephron to modulate potassium homeostasis[J]. *Kidney Int*, 2016, 89(1): 127-134.
- [6] Sorensen MV, Grossmann S, Roesinger M, et al. Rapid dephosphorylation of the renal sodium chloride cotransporter in response to oral potassium intake in mice[J]. *Kidney Int*, 2013, 83(5): 811-824.
- [7] Todkar A, Picard N, Loffing-Cueni D, et al. Mechanisms of renal control of potassium homeostasis in complete aldosterone deficiency[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(2): 425-438.
- [8] Wang Z, Subramanya AR, Satlin LM, et al. Regulation of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels by WNK4 kinase[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305(8): C846-C853.
- [9] Penton D, Czogalla J, Wengi A, et al. Extracellular K^+ rapidly controls NaCl cotransporter phosphorylation in the native distal convoluted tubule by Cl^- -dependent and independent mechanisms[J]. *J Physiol*, 2016, 594(21): 6319-6331.
- [10] Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, et al. Renal physiology of the mouse[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278(3): F339-F351.
- [11] Xu C, Lu A, Wang H, et al. (Pro)Renin receptor regulates potassium homeostasis through a local mechanism[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313(3): F641-F656.
- [12] Wang ZJ, Sun P, Xing W, et al. Decrease in dietary K intake stimulates the generation of superoxide anions in the kidney and inhibits K secretory channels in the CCD[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298(6): F1515-F1522.
- [13] Liu W, Schreck C, Coleman RA, et al. Role of NKCC in BK channel-mediated net K^+ secretion in the CCD[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 301(5): F1088-F1097.
- [14] Wen D, Cornelius RJ, Sansom SC. Interacting influence of diuretics and diet on BK channel-regulated K homeostasis[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2014, 15: 28-32.
- [15] Carrisoza-Gaytan R, Wang L, Schreck C, et al. The mechanosensitive BK α/β 1 channel localizes to cilia of principal cells in rabbit cortical collecting duct (CCD)[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 312(1): F143-F156.
- [16] Woda CB, Miyawaki N, Ramalakshmi S, et al. Ontogeny of flow-stimulated potassium secretion in rabbit cortical collecting duct: functional and molecular aspects[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 285(4): F629-F639.
- [17] Cornelius RJ, Wen D, Hatcher LI, et al. Bicarbonate promotes BK- α/β 4-mediated K excretion in the renal distal nephron[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 303(11): F1563-F1571.
- [18] Zhou X, Wulfsen I, Korth M, et al. Palmitoylation and membrane association of the stress axis regulated insert (STREX) controls BK channel regulation by protein kinase C[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(38): 32161-32171.

[收稿日期] 2019-02-12

[本文编辑] 邢宇洋