

网络出版时间:2026-02-12 10:34:20 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260409.1610.011

◇基础医学研究◇

# 滁菊总黄酮对大鼠大脑中动脉VSMC的BK<sub>Ca</sub>通道的电流及蛋白表达的影响

李钰雯<sup>1</sup>,王潇<sup>1</sup>,吴森<sup>1</sup>,陈硕<sup>2</sup>,陈志武<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>安徽医科大学药学科学学院,合肥 230032;<sup>2</sup>安徽中医药大学中医学院,合肥 230012)

**摘要** 目的 探究滁菊总黄酮(TFCC)舒张脑血管及硫化氢(H<sub>2</sub>S)机制与大鼠大脑中动脉血管平滑肌细胞(VSMCs)上的大电导钙激活钾通道(BK<sub>Ca</sub>)通道的关系,并测定TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs中的BK<sub>Ca</sub>通道 $\alpha$ 蛋白表达的影响。方法 主要采用急性消化的方法分离大鼠大脑中动脉VSMCs;全细胞膜片钳的方法来检测BK<sub>Ca</sub>通道电流的大小;采用原代组织贴壁法培养大鼠大脑中动脉VSMCs,以及采用Western blot方法来测定蛋白含量的表达。结果 全细胞膜片钳实验中,H<sub>2</sub>S供体NaHS(100  $\mu$ mol/L)及内源性H<sub>2</sub>S均可增强BK<sub>Ca</sub>通道电流;TFCC(30、90和270 mg/L)同样可以激活BK<sub>Ca</sub>通道,并且呈现出一定浓度依赖性。在阻断了内源性H<sub>2</sub>S生成后,TFCC(270 mg/L)对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道仍具有激活作用。在Western blot实验中,各组细胞中均有BK<sub>Ca</sub>通道蛋白中 $\alpha$ 亚基的表达,但TFCC(30、90和270 mg/L)及抑制剂IBTX组均不影响其通道蛋白含量的表达。结论 TFCC可以通过促进内源性H<sub>2</sub>S的生成来促进BK<sub>Ca</sub>通道的开放,也可以直接激活BK<sub>Ca</sub>通道,从而起到舒张脑血管的作用。但TFCC对BK<sub>Ca</sub>通道蛋白的表达无明显影响。

**关键词** 滁菊总黄酮;大电导钙激活钾通道;血管平滑肌细胞;硫化氢;全细胞膜片钳;Western blot

**中图分类号** R 285.5

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2026)03-0387-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.001

缺血性脑卒中作为高致残率、高病死率的脑血管疾病<sup>[1]</sup>,其病理机制尚未完全阐明,临床治疗存在局限性,因此,寻找和开发新的治疗缺血性脑卒中药物十分重要。滁菊总黄酮(total flavonoids of chuzhou chrysanthemum, TFCC)是从中药滁菊提取的黄酮类活性成分,包含槲皮素、木犀草素等化合物<sup>[2]</sup>。TFCC具有抗大鼠缺血性脑损伤作用,该课题组研究<sup>[3]</sup>表明TFCC可通过舒张大鼠脑血管来保护大鼠缺血性脑损伤,但尚不清楚TFCC舒张大鼠脑血管的确切机制。大电导钙激活钾通道(large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>, BK<sub>Ca</sub>)通道又被称为K<sub>Ca</sub>1.1通道,在血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)中表达尤其高,在平滑肌细胞膜电位稳定中起主要作用,其激活可诱导平滑肌细

胞和血管的舒张<sup>[4]</sup>。内源性H<sub>2</sub>S是一种气体信号分子,在神经和心血管系统生理和病理过程中发挥重要作用<sup>[5-6]</sup>。内源性H<sub>2</sub>S作为一种血管活性物质,它可通过BK<sub>Ca</sub>通道介导血管平滑肌细胞的舒张和随后的血管舒张<sup>[7]</sup>。课题组前期研究<sup>[8]</sup>表明杜鹃花总黄酮可促进大鼠脑血管H<sub>2</sub>S的生成,因此,本课题拟研究TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs上BK<sub>Ca</sub>通道的电流及 $\alpha$ 蛋白表达的影响,并探究TFCC对BK<sub>Ca</sub>通道的调控作用与内源性H<sub>2</sub>S的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 普通SD大鼠雌雄各半,6~7周龄,体质量(220 $\pm$ 20)g,均购自安徽医科大学实验动物中心。动物生产许可证号:SCXK(皖)2022-001;动物伦理号:LLSC20220998。大鼠饲养于(23 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C且相对湿度在55%~60%的SPF级动物实验室,实行12 h光照和12 h黑暗循环,所有实验动物均可自由获得水和食物。

**1.1.2 主要试剂** 伊比利亚蝎毒素(iberiotoxin, IBTX)(货号:I275380)购自上海Aladdin生化科技有

2025-12-19 接收

基金项目:安徽省高校自然科学研究重点项目(编号:2023AH050842);抗炎免疫药物教育部重点实验室(安徽医科大学)开放课题资助项目(编号:KFJJ-2023-06)

作者简介:李钰雯,女,硕士研究生;

陈志武,男,博士,教授,博士生导师,通信作者,E-mail:ChenZhiWu@ahmu.edu.cn

限公司;NaHS(货号:161527)购自美国Sigma公司;胰酶细胞消化液(货号:C0201)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0012S)、凝胶配置试剂盒(货号:P0012A)和青霉素-链霉素溶液(货号:C0222)均购自上海碧云天生物技术有限公司;DMEM/F12 1:1液体培养基(货号:BL305A)和Western一抗稀释液(货号:BL506 A)购自江苏Biosharp公司;K<sub>Ca</sub>1.1通道激活剂NS 1619(货号:GC12547)购自上海宏叶生物科技有限公司;II型胶原蛋白酶(货号:2275MG100)购自德国BioFroxx公司;L-半胱氨酸(L-Cysteine, L-Cys)(货号:L804954)购自上海麦克林生化科技有限公司;β-肌动蛋白(beta-actin, β-actin)(货号:AF7018)、大电导钙激活钾通道蛋白α1抗体(calcium-activated potassium channel subunit alpha-1 antibody, KCNMA1)(货号:DF857)、超敏ECL发光试剂盒(货号:180-501)、肌动蛋白α抗体(anti-alpha smooth muscle actin, Anti-alpha-SMA)(货号:AF 1032)和蛋白分子质量marker(货号:KF 8007)均购自美国Affinity公司。

**1.1.3 主要仪器** 膜片钳系统1550数模转换器购自美国Molecular Devices公司;1-HL-U夹持器Holder和700B双电极放大器购自美国Molecular Devices公司;MP-285/R电动微操纵器、P 97程控水平电极拉制仪购自美国Sutter公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 实验分组及处理** 全细胞膜片钳实验中将急性分离的VSMCs随机分为以下几个组别:① control组和IBTX组;② control组、NaHS组和NaHS+IBTX组;③ control组、TFCC 3.3 mg/L组、TFCC 10 mg/L组、TFCC 30 mg/L组、TFCC 90 mg/L组、TFCC 270 mg/L组<sup>[9]</sup>、NS 1619组和TFCC 270 mg/L+IBTX组;④ control组、L-Cys组、PPG组、L-Cys+PPG组和L-Cys+IBTX组;⑤ control组、TFCC 270 mg/L+PPG组、TFCC 270 mg/L+PPG+IBTX组。在Western blot实验中,给药满12 h后观察control组、TFCC 30 mg/L组、TFCC 90 mg/L组、TFCC 270 mg/L组和IBTX组中BK<sub>Ca</sub>通道蛋白含量的变化。

**1.2.2 大鼠大脑中动脉平滑肌细胞的急性分离** 选择体质量在(220±20)g的SD大鼠,并用三溴乙醇将其麻醉。大鼠脑组织取出后,于冰上操作分离大脑中动脉,彻底去除血管外周附着组织。放入0.5 mL的细胞消化液(其中称取胶原酶II 0.01 g,木瓜蛋白酶papain 0.046 g,牛血清蛋白BSA 0.024

g和DTT 0.008 8 g溶于5 mL无钙PSS溶液)中,用剪刀剪碎,在37 °C的水浴中消化30~40 min,然后吸出上清液,加入1 mL BSA溶液于离心管中,在冰上静置10 min后吸去上清液。最后用1 mL无钙PSS缓冲液洗2~3次,吸去上清液后加入0.5 mL的无钙PSS,最后在4 °C冰箱放置1~2 h。

**1.2.3 全细胞膜片钳实验** 取一皿细胞,静置40~50 min后,用细胞溶液[含NaCl 140 mmol/L, KCl 5 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.2 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, D(+)-Glucose 10 mmol/L, 用NaOH调pH值7.35~7.45]孵育5 min后开始实验。选取入液后电极阻抗为2~6 MΩ的电极,封接破膜后,待细胞形成全细胞模式,记录VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流数据。其中Ag/AgCl银丝引导的电流信号经膜片钳放大器放大后,通过Clampfit 10.5软件进行数据处理,其中整个实验过程温度控制在(23±2)°C。

## 1.2.4 原代大鼠大脑中动脉平滑肌细胞的培养

取3只或者4只体质量在(220±20)g的普通SD大鼠,雌雄不限。用三溴乙醇将其麻醉,然后用生理盐水对大鼠进行灌流。过程中尽量保持无菌操作,75%乙醇喷洒表面以及器械。用高压过的手术器械剥离大鼠大脑,放入冰的含有PBS和双抗的溶液里,在超净台里剥离大鼠大脑中动脉血管组织,放入培养皿中。随后取一只离心管,把血管移至离心管中,用小剪刀将血管剪碎,然后平铺在T25培养瓶底部,静置4~6 h后,待血管组织贴壁牢固后再把T25培养瓶翻个面,并置于37 °C、含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养4~5 d,然后每隔48 h换1次液。

**1.2.5 Western blot 实验** 当培养瓶中长出血管平滑肌细胞后,经过一次传代到6孔板里,在细胞给药12 h后进行Western blot实验。裂解液(PMSF:RIPA=1:100)每孔打入200 μL,在冰上裂解30 min。离心机预冷4 °C,12 000 r/min,离心20 min。将上清液吸出,转移至另一组EP管内。留10 μL用于测出蛋白浓度。然后用BCA蛋白含量试剂盒测出蛋白浓度。剩下的蛋白上清液中加入蛋白缓冲液(上清液:缓冲液=1:4)。蛋白质在100 °C、5 min煮变性,-20 °C冻存。实验前首先需要配胶、上样、电泳、转膜、封闭、孵育抗体和显影。其中Maxik alpha抗体(1:2 000)和β-肌动蛋白抗体的比例为1:3 000。

**1.3 统计学处理** 实验数据以均数±标准差( $\bar{x}±s$ )表示且所有数据均n=5,使用GraphPad Prism 9.0统计软件进行分析,两组之间均数比较采用t检验,多

组均数的比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行两两比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 H<sub>2</sub>S对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流的影响

**2.1.1** 大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道的电流鉴定 BK<sub>Ca</sub>通道电流属于电压依赖性通道电流。本实验中BK<sub>Ca</sub>通道电流测定的钳制电压设定为-60 mV,测试电压从-60 mV开始以10 mV为一个单位跃迁到+90 mV,时间间隔为500 ms,设定的测定程序如图1A所示。在玻璃微电极中灌入BK<sub>Ca</sub>通道电极填充液(mmol/L:含K-glutamine 105,KCl 35,MgCl<sub>2</sub> 1,CaCl<sub>2</sub> 2.1,Na<sub>2</sub>ATP 5,EGTA 5.1,HEPES 10,用5% KOH调节pH值7.35~7.45)后,当电压达到+90 mV时,从大鼠大脑中动脉VSMCs中引出一呈电压依赖性的外向电流[电流密度:(36.95±2.39) PA/PF],并被BK<sub>Ca</sub>通道特异性抑制剂IBTX(100 nmol/L)显著抑制[电流密度:(21.76±2.15) PA/PF, $P<0.01$ ],IBTX是一种高度的特异性抑制剂,它可通过与BK<sub>Ca</sub>通道结合,明显抑制BK<sub>Ca</sub>通道的开放,从而阻断其功能。如图1B所示,表明引出的电流符合BK<sub>Ca</sub>通道电流为外向电流和电压依赖性的特征,并被特异性抑制剂IBTX阻断,因此,本研究在大鼠大脑中动脉VSMCs上记录到的外向电流为BK<sub>Ca</sub>通道电流。

**2.1.2** 外源性H<sub>2</sub>S对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流的增加作用 为了探究外源性H<sub>2</sub>S对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道的影响,实验结果如图1C所示,当电压达到+90 mV时,与control组[电流密度:(34.26±1.04) PA/PF]比较,H<sub>2</sub>S供体NaHS(100 μmol/L)可以明显增加大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流[电流密度:(60.70±2.04) PA/PF, $P<0.001$ ],但可被加入BK<sub>Ca</sub>通道特异性抑制剂IBTX(100 nmol/L)明显抑制[电流密度:(42.67±1.96) PA/PF, $P<0.01$ ]。结果表明外源性H<sub>2</sub>S可以激活BK<sub>Ca</sub>通道,增加BK<sub>Ca</sub>通道电流。

**2.1.3** 内源性H<sub>2</sub>S对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流的影响 为了进一步探究内源性H<sub>2</sub>S对BK<sub>Ca</sub>通道电流的影响,该实验观察了H<sub>2</sub>S合成酶CSE底物L-Cys和抑制剂PPG对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道的作用。如图2所示,当电压达到+90 mV时,与control组比较,L-Cys(100 nmol/L)

可显著增加大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流[电流密度:(49.75±2.17) PA/PF, $P<0.01$ ],并且可被BK<sub>Ca</sub>通道阻断剂IBTX(100 nmol/L)明显减弱[电流密度:(37.04±1.54) PA/PF, $P<0.01$ ];PPG(100 nmol/L)对BK<sub>Ca</sub>通道电流虽然没有明显的影响[电流密度:(32.84±1.28) PA/PF, $P=0.77$ ],但可显著地减弱L-Cys增大BK<sub>Ca</sub>通道电流作用[电流密度:(34.61±2.72) PA/PF, $P=0.0001$ ]。结果提示内源性H<sub>2</sub>S可明显增加BK<sub>Ca</sub>通道电流。

### 2.2 TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流的影响及与内源性H<sub>2</sub>S的关系

**2.2.1** TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流的影响 结果如图3所示,当电压达到+90 mV时,与control组[电流密度:(34.23±1.85) PA/PF]比较,TFCC 30[电流密度:(40.16±2.23) PA/PF, $P=0.002$ , $P<0.01$ ]、90[电流密度:(44.80±1.45) PA/PF, $P<0.01$ ]和270 mg/L[电流密度:(51.18±0.67) PA/PF, $P<0.01$ ]可明显地增强大鼠大脑中动脉VSMCs中引出的外向电流,且TFCC 30、90和270 mg/L组浓度增大之间差异有统计学意义( $F=61.12$ , $P<0.01$ ),其中以270 mg/L TFCC的增强作用最为明显,并且被BK<sub>Ca</sub>通道阻断剂IBTX(100 nmol/L)显著地减弱[电流密度:(41.69±1.63) PA/PF, $P<0.01$ ];BK<sub>Ca</sub>通道开放剂NS 1619(10 μmol/L)也有着类似地增强大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流的作用。结果表明TFCC可显著地增强大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流,它与NS 1619一样有着类似地增强大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流的作用。

**2.2.2** TFCC对增强大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流与内源性H<sub>2</sub>S的关系 当电压达到+90 mV时,结果显示,TFCC 270 mg/L[电流密度:(53.10±1.27) PA/PF]对BK<sub>Ca</sub>通道电流的增强可被H<sub>2</sub>S合酶CSE特异性抑制剂PPG(100 nmol/L)明显减弱[电流密度:(44.69±1.50) PA/PF, $P<0.05$ ],提示TFCC可通过内源性H<sub>2</sub>S增强大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流。本研究还观察到PPG没有完全取消TFCC对BK<sub>Ca</sub>通道电流的增强作用,与control组[电流密度:(32.63±1.72) PA/PF]相比,剩余的电流仍有显著地增大[电流密度:(44.69±1.50) PA/PF, $P<0.05$ ],可被加用IBTX进一步减弱[电流密度:(36.19±0.98) PA/PF, $P<0.05$ ],提示TFCC可能对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电

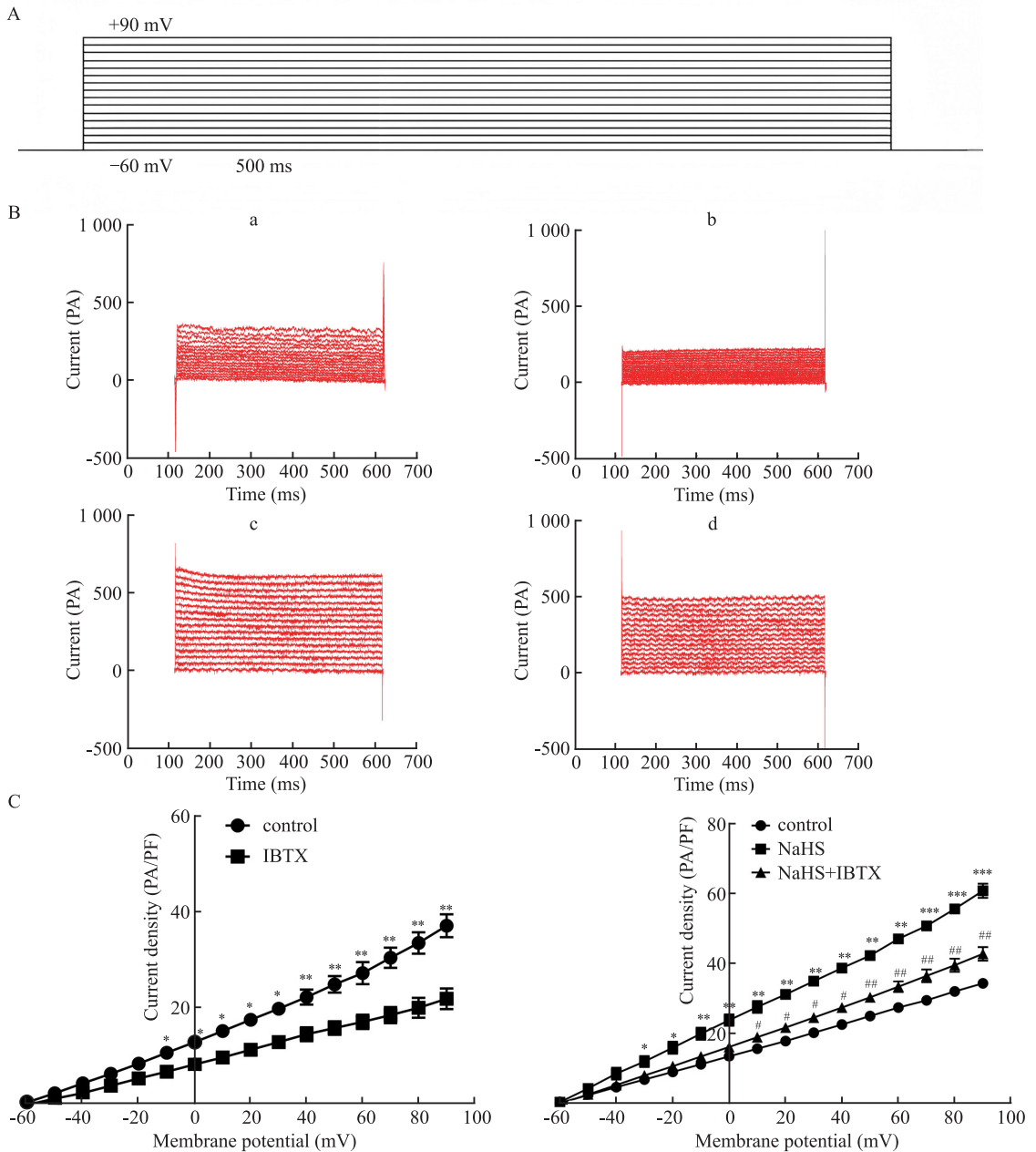


图1 外源性H<sub>2</sub>S对大鼠大脑中动脉VSMCs的BKCa通道电流的增强作用

Fig. 1 Enhanced effect of exogenous H<sub>2</sub>S on BK<sub>Ca</sub> channel currents in rat middle cerebral artery VSMCs

A: Protocol program settings for BK<sub>Ca</sub> channel; B: Original current diagram of each group; C: Statistical chart showing the relationship between current and voltage in each group; a: control group; b: IBTX group; c: NaHS group; d: NaHS+IBTX group; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs control group; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs NaHS group.

流还有直接的激活作用。见图4。

### 2.3 TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道蛋白的影响

**2.3.1 平滑肌细胞的鉴定** 在培养的第5~6天后,显微镜下观察到血管组织附近开始出现少量呈梭型或长条形细胞。15 d后发现细胞密集排列,形成类似于山峰的形态。20 d左右可以开始传代,传代后的细胞在显微镜下呈现三角形、长梭形或方形

的形态。该实验采用免疫荧光技术对传代培养的细胞进行VSMCs表型鉴定。图5A的荧光显微观察显示,DAPI染色显示细胞核呈蓝色荧光,同时细胞质可见抗α-SMA抗体标记的绿色荧光信号,表明原代培养细胞质中存在血管平滑肌细胞标志物α-SMA,结果证实所培养细胞为大鼠大脑中动脉的血管平滑肌细胞。

### 2.3.2 TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通

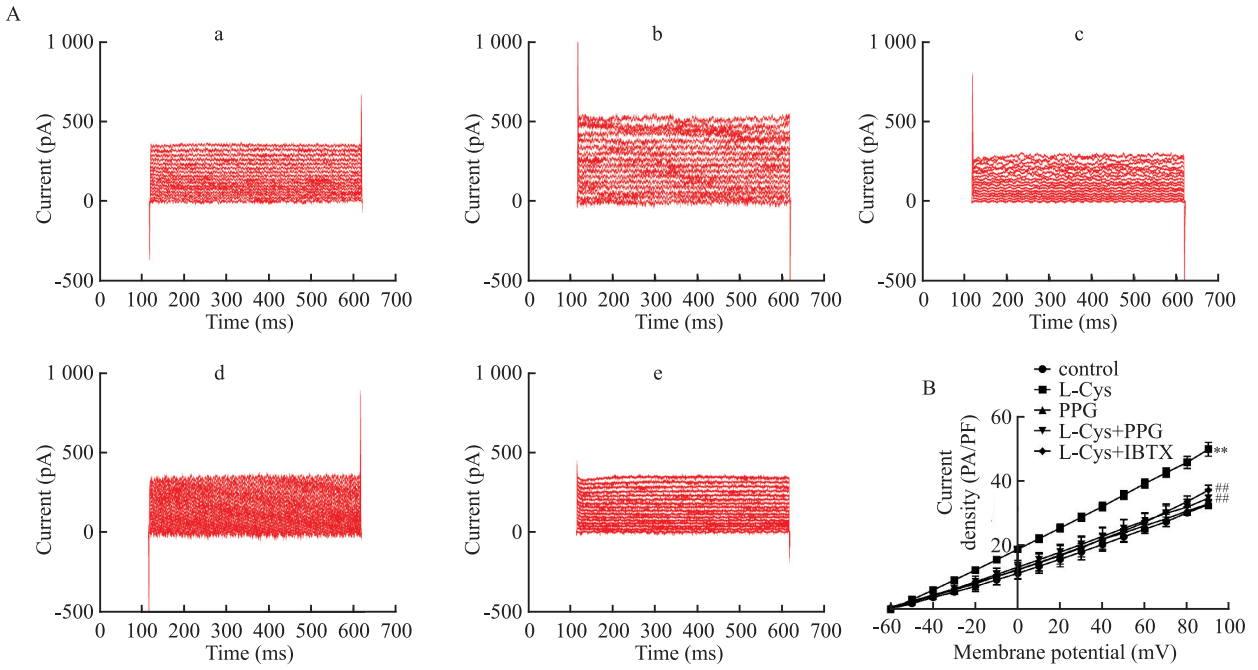


图2 内源性H<sub>2</sub>S对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道的影响

Fig. 2 The effects of endogenous H<sub>2</sub>S on BK<sub>Ca</sub> channels in rat middle cerebral artery VSMCs

A: Original current diagram of each group; B: Statistical chart showing the relationship between current and voltage in each group; a: control group; b: L-Cys group; c: PPG group; d: L-Cys+PPG group; e: L-Cys+IBTX group; \*\**P* < 0.01 vs control group; ##*P* < 0.01 vs L-Cys group.

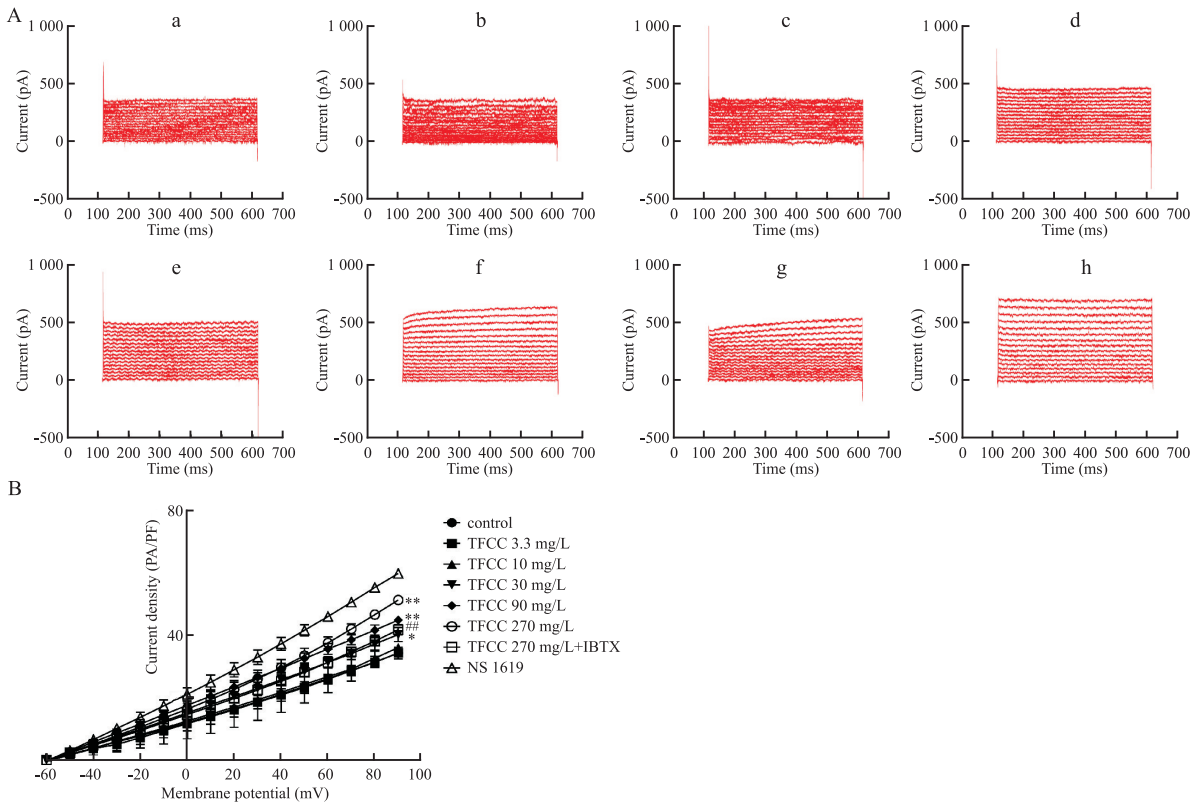


图3 TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流的影响

Fig. 3 The effects of TFCC on BK<sub>Ca</sub> channel currents in rat middle cerebral artery VSMCs

A: Original current diagram of each group; B: Statistical chart showing the relationship between current and voltage in each group; a: control group; b: TFCC 3.3 mg/L group; c: TFCC 10 mg/L group; d: TFCC 30 mg/L group; e: TFCC 90 mg/L group; f: TFCC 270 mg/L group; g: TFCC 270 mg/L+IBTX group; h: NS 1619 group; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs control group; ##*P* < 0.01 vs TFCC 270 mg/L group.

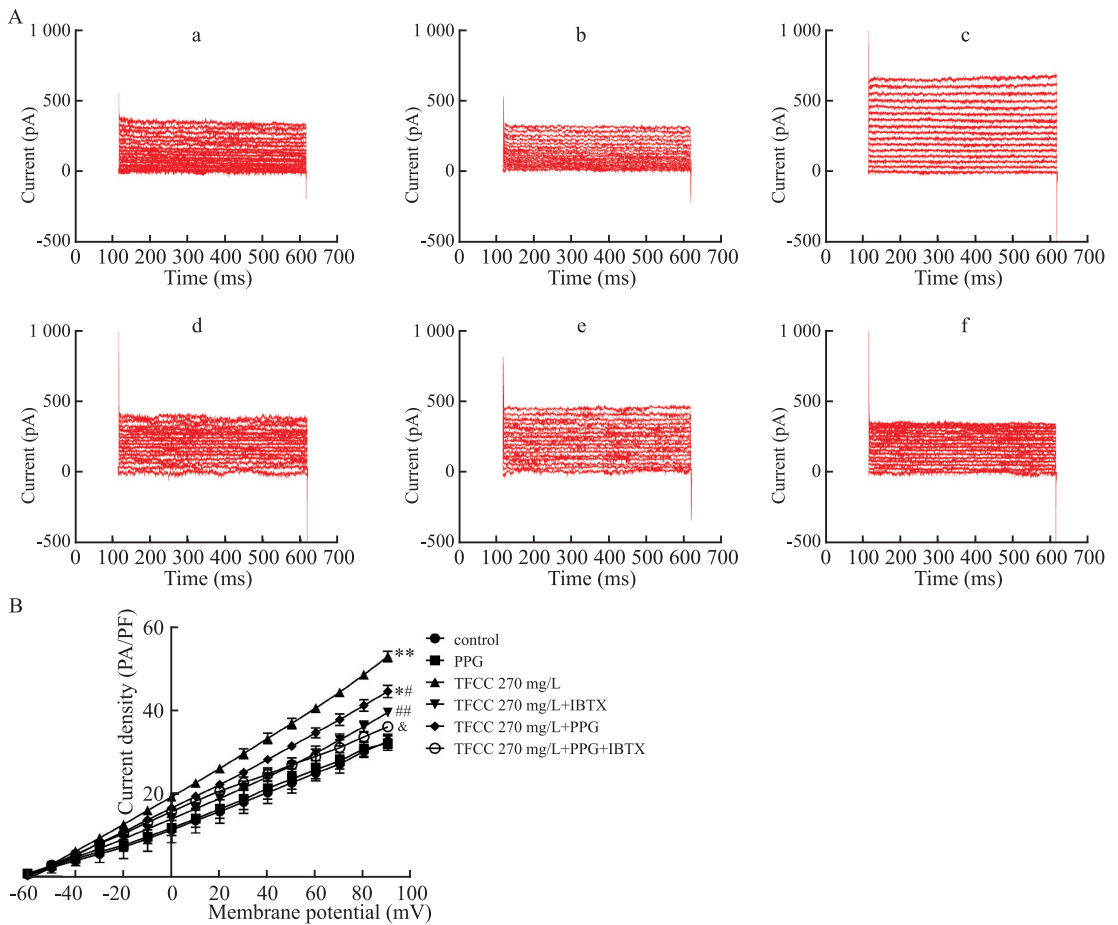


图4 TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道电流的影响及与内源性H<sub>2</sub>S的关系

Fig. 4 The effects of TFCC on BK<sub>Ca</sub> channel currents in rat middle cerebral artery VSMC and its relationship with endogenous H<sub>2</sub>S

A: Original current diagram of each group; B: Statistical chart showing the relationship between current and voltage in each group; a: control group; b: PPG group; c: TFCC 270 mg/L group; d: TFCC 270 mg/L+IBTX group; e: TFCC 270 mg/L+PPG group; f: TFCC 270 mg/L+PPG+IBTX group; \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs control group; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01 vs TFCC 270 mg/L group; &*P* < 0.05 vs TFCC 270 mg/L+PPG group.

道蛋白表达的影响 上述实验探究了TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道的电流影响,本研究还采用了Western blot法检测TFCC对BK<sub>Ca</sub>通道中最重要的α亚基蛋白表达的影响。结果如图5B、5C所示,各组中均有BK<sub>Ca</sub>通道的α亚基蛋白的表达。但与control组相比,各剂量TFCC组及IBTX组中的BK<sub>Ca</sub>通道蛋白表达含量差异无统计学意义。

### 3 讨论

缺血性脑卒中是临床上常见的一种疾病<sup>[10]</sup>,原因为脑血管管腔病理性狭窄或完全闭塞,引发脑血流供应的减少,甚至停止<sup>[11]</sup>,因此,促进缺血后的脑血管舒张有助于脑损伤的恢复。TFCC具有一定的扩张脑血管的作用<sup>[12-13]</sup>。然而对TFCC扩张脑血管的机制仍有待深入研究。VSMCs中的BK<sub>Ca</sub>通道开放可导致细胞内的K<sup>+</sup>外流,使VSMCs超极化和随后

的舒张。因此,BK<sub>Ca</sub>通道的开放是诱导血管舒张的一种重要的离子通道。为探讨TFCC舒张脑血管的机制,本实验研究了TFCC对与血管张力密切相关BK<sub>Ca</sub>通道的作用,并探讨了内源性H<sub>2</sub>S在TFCC促进BK<sub>Ca</sub>通道开放中的作用。

BK<sub>Ca</sub>通道是一种钙离子依赖性钾通道,主要存在于VSMCs及内皮细胞中,本实验通过Western blot法在大鼠大脑中动脉VSMCs也检测到了BK<sub>Ca</sub>通道蛋白的表达。CSE是血管组织中一种主要的H<sub>2</sub>S生成酶,可催化L-Cys生成H<sub>2</sub>S。CSE不仅分布在血管的内皮细胞中<sup>[14]</sup>,也分布在VSMCs中<sup>[15]</sup>。本实验不仅表明外源性H<sub>2</sub>S可增强大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>电流,促进BK<sub>Ca</sub>的开放,还表明CSE底物L-Cys可显著地增强大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>电流,但可被CSE的特异性抑制剂PPG明显地减弱,表明VSMCs中CSE生成的H<sub>2</sub>S,即内源性的H<sub>2</sub>S也可促进

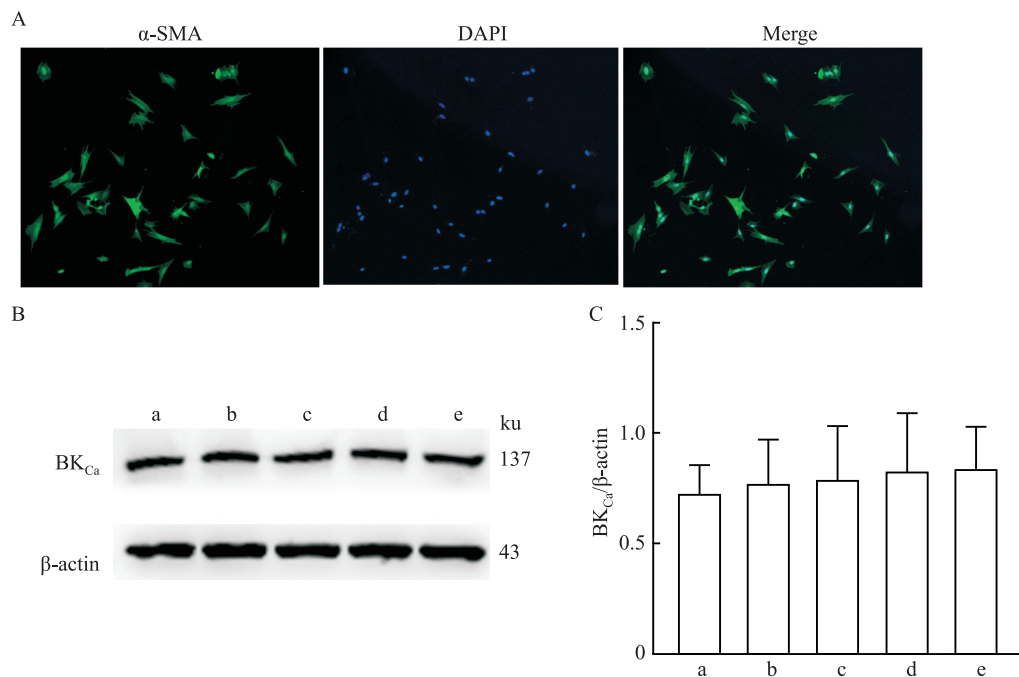


图5 TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs的BK<sub>Ca</sub>通道α蛋白表达的影响

Fig. 5 The effects of TFCC on BK<sub>Ca</sub> channel α protein expression in rat middle cerebral artery VSMCs

A: Identification of primary cultured rat middle cerebral artery VSMCs (immunofluorescence method ×100); B: Bands of BK<sub>Ca</sub> protein and β-actin protein; C: Statistical chart showing Western blot result; a: control group; b: TFCC 30 mg/L group; c: TFCC 90 mg/L group; d: TFCC 270 mg/L group; e: IBTX group.

大鼠大脑中动脉VSMCs中的BK<sub>Ca</sub>开放。

本实验结果显示,TFCC(30、90、270 mg/L)可以增强大鼠大脑中动脉VSMCs中BK<sub>Ca</sub>通道电流,这种增强作用呈一定的浓度依赖性,表明TFCC可以促进BK<sub>Ca</sub>通道的开放,这至少是TFCC舒张大鼠脑血管作用的机制之一。

该课题组前期研究表明TFCC可促进大鼠脑血管中H<sub>2</sub>S的生成,而本文进一步观察了内源性H<sub>2</sub>S在TFCC促进BK<sub>Ca</sub>通道开放中的作用。实验结果显示,H<sub>2</sub>S合酶CSE的抑制剂PPG后对大鼠大脑中动脉VSMCs中的BK<sub>Ca</sub>通道电流无明显的影响,但可显著地减弱270 mg/L TFCC对BK<sub>Ca</sub>通道电流的增加作用,提示大鼠大脑中动脉VSMCs中CSE生成的H<sub>2</sub>S参与了TFCC促进BK<sub>Ca</sub>通道开放作用。该研究还表明PPG没有完全取消TFCC对BK<sub>Ca</sub>通道电流的增加作用,剩余的电流与control组相比,仍有明显的增加,且可被BK<sub>Ca</sub>通道特异性抑制剂IBTX进一步减弱,说明TFCC还有不依赖于内源性H<sub>2</sub>S的直接激活BK<sub>Ca</sub>通道作用。因此,该结果表明TFCC不仅可通过大鼠大脑中动脉VSMCs中的内源性H<sub>2</sub>S促进BK<sub>Ca</sub>通道的开放,对BK<sub>Ca</sub>通道还有直接的激活作用。

细胞膜上的离子通道功能强弱不仅取决于其

活性,即通道的开放,也受到其数量的影响。BK<sub>Ca</sub>通道主要由α亚基和β亚基组成,其主要以四聚体的形态和辅助性β亚基按照1:1的比例存在于血管平滑肌细胞上<sup>[16]</sup>。因此,本文检测了TFCC对大鼠大脑中动脉VSMCs中BK<sub>Ca</sub>通道主要亚基α蛋白表达的影响,结果表明TFCC对BK<sub>Ca</sub>通道蛋白表达无明显的影响。提示TFCC可能对蛋白的空间结构造成了改变,改变了其通透性,但对BK<sub>Ca</sub>通道的α蛋白的表达没有造成影响。

综上所述,TFCC不仅可通过大鼠大脑中动脉VSMCs中的内源性H<sub>2</sub>S促进BK<sub>Ca</sub>通道的开放,还有直接激活BK<sub>Ca</sub>通道作用,但其对大鼠大脑中动脉VSMCs中BK<sub>Ca</sub>通道的α蛋白的表达量无明显影响。

#### 参考文献

- [1] Virani S S, Alonso A, Benjamin E J, et al. Heart disease and stroke statistics-2020 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2020, 141 (9): e139-596. doi: 10.1161/CIR.0000000000000757.
- [2] Hu J, Ma W, Li N, et al. Antioxidant and anti-inflammatory flavonoids from the flowers of chuju, a medical cultivar of *Chrysanthemum morifolium* Ramat [J]. *J Mex Chem Soc*, 2018, 61 (4): 282-9. doi:10.29356/jmcs.v61i4.458.
- [3] 樊开宇,王冰,梅晓乐,等. 滁菊总黄酮对大鼠脑缺血再灌

- 注损伤的保护作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(1): 9-12. doi:10.12092/j.issn.1009-2501.2017.01.002.
- [3] Fan K Y, Wang B, Mei X L, et al. Protective effects of total flavonoids of Chuzhou *Chrysanthemum* against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2017, 22(1): 9-12. doi:10.12092/j.issn.1009-2501.2017.01.002.
- [4] Sancho M, Kyle B D. The large-conductance, calcium-activated potassium channel: a big key regulator of cell physiology [J]. *Front Physiol*, 2021, 12: 750615. doi: 10.3389/fphys.2021.750615.
- [5] Hsu C N, Tain Y L. Preventing developmental origins of cardiovascular disease: hydrogen sulfide as a potential target? [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(2): 247. doi:10.3390/antiox10020247.
- [6] Zhao H, Yang Y, Liu H, et al. The role of hydrogen sulfide targeting autophagy in the pathological processes of the nervous system [J]. *Metabolites*, 2022, 12(9): 879. doi:10.3390/metabo12090879.
- [7] Yang N, Liu Y, Li T, et al. Role of hydrogen sulfide in chronic diseases [J]. *DNA Cell Biol*, 2020, 39(2): 187-96. doi: 10.1089/dna.2019.5067.
- [8] 韩 军. 映山红花总黄酮对脑缺血再灌注大鼠脑血管舒张作用的EDHF/H<sub>2</sub>S机制[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [8] Han J. The mechanism of endothelium-derived hyperpolarizing factor/hydrogen sulphide for the cerebral vasodilation to total flavones of rhododendron flower in cerebral ischemia-reperfusion rat [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2012.
- [9] 柳小龙. 杜鹃花总黄酮促进神经源性CBS生成H<sub>2</sub>S保护大鼠神经细胞H/R损伤并通过VEGFR<sub>2</sub>舒张脑血管[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2024. doi:10.26921/d.cnki.ganyu.2024.001171.
- [9] Liu X L. *Rhododendron* total flavonoids promote neurogenic CBS production and H<sub>2</sub>S to protect rat nerve cells from H/R injury and to relax cerebral blood vessels through VEGFR<sub>2</sub> [D]. Hefei: Anhui Medical University, 2024. doi: 10.26921/d.cnki.ganyu.2024.001171.
- [10] Feske S K. Ischemic stroke [J]. *Am J Med*, 2021, 134(12): 1457-64. doi:10.1016/j.amjmed.2021.07.027.
- [11] Deng G, Xiao J, Yu H, et al. Predictors of futile recanalization after endovascular treatment in acute ischemic stroke: a meta-analysis [J]. *J Neurointerv Surg*, 2022, 14(9): 881-5. doi: 10.1136/neurintsurg-2021-017963.
- [12] Kanazawa T, Kurano T, Ibaraki H, et al. Therapeutic effects in a transient middle cerebral artery occlusion rat model by nose-to-brain delivery of anti-TNF- $\alpha$  siRNA with cell-penetrating peptide-modified polymer micelles [J]. *Pharmaceutics*, 2019, 11(9): 478. doi:10.3390/pharmaceutics11090478.
- [13] Gu C, Zhang Q, Li Y, et al. The PI3K/AKT pathway-the potential key mechanisms of traditional Chinese medicine for stroke [J]. *Front Med*, 2022, 9: 900809. doi: 10.3389/fmed.2022.900809.
- [14] Xia H, Li Z, Sharp T E 3rd, et al. Endothelial cell cystathionine  $\gamma$ -lyase expression level modulates exercise capacity, vascular function, and myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(19): e017544. doi: 10.1161/JAHA.120.017544.
- [15] Lv B, Chen S, Tang C, et al. Hydrogen sulfide and vascular regulation - an update [J]. *J Adv Res*, 2021, 27: 85-97. doi: 10.1016/j.jare.2020.05.007.
- [16] Van N T H, Kim W K, Nam J H. Challenges in the therapeutic targeting of K<sub>Ca</sub> channels: from basic physiology to clinical applications [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(5): 2965. doi: 10.3390/ijms25052965.

## The effect of Chuju total flavonoids on the current and protein expression of BK<sub>Ca</sub> channels in rat middle cerebral artery VSMC

Li Yuwen<sup>1</sup>, Wang Xiao<sup>1</sup>, Wu Miao<sup>1</sup>, Chen Shuo<sup>2</sup>, Chen Zhiwu<sup>1</sup>

<sup>(1)</sup> College of Pharmaceutical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>(2)</sup> School of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012)

**Abstract Objective** To investigate the relationship between the vasodilation and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) mechanism of total flavonoids of chrysanthemum (TFCC) and the large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK<sub>Ca</sub>) channels on vascular smooth muscle cells (VSMCs) of the middle cerebral artery in rats. In addition, this study will also investigate the effect of TFCC on the expression of BK<sub>Ca</sub> channel alpha protein in rat middle cerebral artery VSMCs.

**Methods** The primary method employed was acute digestion to isolate VSMCs from the middle cerebral artery of rats; whole-cell patch-clamp techniques were used to measure BK<sub>Ca</sub> channel currents; primary tissue adherence culture was utilized to cultivate VSMCs from the middle cerebral artery of rats; Western blot were employed to determine protein expression levels. **Results** In whole-cell patch-clamp experiments, both the H<sub>2</sub>S donor NaHS (100  $\mu$ mol/L) and endogenous H<sub>2</sub>S enhanced BK<sub>Ca</sub> channel currents. TFCC (30, 90, and 270 mg/L) also activated BK<sub>Ca</sub> channels and exhibited a certain concentration-dependent effect. Even after blocking endogenous H<sub>2</sub>S

网络出版时间:2026-02-09 08:29:54 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260408.1015.002

# 瑞马唑仑调控HIF-1 $\alpha$ /NLRP3通路抑制细胞焦亡减轻大鼠肺缺血再灌注损伤的作用机制

赵利芳<sup>1</sup>,杨建功<sup>1</sup>,李明勇<sup>1</sup>,邵坤<sup>1</sup>,申长立<sup>1</sup>,李佳婕<sup>1</sup>,朱虹<sup>1</sup>,曲良超<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>新乡市中心医院麻醉与围术期医学科,新乡 453000; <sup>2</sup>南昌大学第一附属医院麻醉科,南昌 330000)

**摘要** 目的 探讨瑞马唑仑(RMZL)调控缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )/NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)通路抑制细胞焦亡减轻大鼠肺缺血再灌注损伤(LIRI)的作用机制。方法 大鼠随机分成对照组、LIRI组、RMZL低剂量组、RMZL中剂量组、RMZL高剂量组、RMZL高剂量+HIF-1 $\alpha$ 激活剂二甲基乙二硫氨基乙酸(DMOG)组,每组18只。对照组大鼠仅游离左肺门,不进行缺血再灌注处理。除对照组外,其他组大鼠均需构建LIRI模型。LIRI组大鼠在构建LIRI模型前15 min腹腔注射等量的生理盐水;对照组大鼠在游离左肺门前15 min腹腔注射等量的生理盐水;其他组大鼠在构建LIRI模型前15 min腹腔注射对应剂量的药物。检测大鼠肺湿/干重比值;HE染色检测肺组织病理;免疫荧光染色检测肺组织消素D(GSDMD)与NLRP3双阳性细胞的相对荧光强度;ELISA检测肺组织白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-18水平;Western blot检测肺组织HIF-1 $\alpha$ 、NLRP3、活化的半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶1(Cleaved caspase-1)、消素D-N端片段(GSDMD-N)蛋白表达。结果 与对照组相比,LIRI组大鼠肺泡结构紊乱,肺泡间隔增厚,且有大量炎性细胞浸润,肺湿/干重比值、肺组织GSDMD与NLRP3双阳性细胞的相对荧光强度、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平及HIF-1 $\alpha$ 、NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N蛋白表达升高( $P<0.05$ );与LIRI组相比,RMZL低、中、高剂量组大鼠肺泡间隔增厚及炎性细胞浸润程度改善,肺湿/干重比值、肺组织GSDMD与NLRP3双阳性细胞的相对荧光强度、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平及HIF-1 $\alpha$ 、NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N蛋白表达降低,且RMZL高剂量组趋势最明显( $P<0.05$ );与RMZL高剂量组相比,RMZL高剂量+DMOG组大鼠肺泡间隔增厚,炎性细胞浸润增多,肺湿/干重比值、肺组织GSDMD与NLRP3双阳性细胞的相对荧光强度、IL-1 $\beta$ 、IL-18水平及HIF-1 $\alpha$ 、NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N蛋白表达升高( $P<0.05$ )。结论 RMZL可能通过抑制HIF-1 $\alpha$ /NLRP3通路抑制LIRI大鼠细胞焦亡。

**关键词** 瑞马唑仑;肺缺血再灌注损伤;焦亡;炎症;HIF-1 $\alpha$ /NLRP3通路

中图分类号 R 655.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2026)03-0395-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.002

2025-12-09 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82260382)

作者简介:赵利芳,女,副主任医师;

曲良超,男,主任医师,通信作者,E-mail: 381841456@qq.

com

肺缺血再灌注损伤(lung ischemia-reperfusion injury, LIRI)是肺移植、体外循环、肺栓塞、取栓等外科手术后常见的并发症。尽管医疗条件有所改善,但LIRI的发生率及临床病死率仍然较高<sup>[1]</sup>。研究表明,LIRI的复杂过程涉及许多机制,包括细胞焦

production, TFCC (270 mg/L) still activated BK<sub>Ca</sub> channels in VSMCs of the middle cerebral artery in rats. In Western blot experiments, the  $\alpha$ -subunit of BK<sub>Ca</sub> channel proteins was expressed in all groups of cells, but TFCC (30, 90, and 270 mg/L) and inhibitor IBTX group did not affect the expression of channel protein content. **Conclusion** TFCC can promote the opening of BK<sub>Ca</sub> channels by promoting the generation of endogenous H<sub>2</sub>S, or directly activate BK<sub>Ca</sub> channels, thereby playing a role in relaxing cerebral blood vessels. However, TFCC had no significant effect on the expression of BK<sub>Ca</sub> channel proteins.

**Key words** Chuju total flavonoids; large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>; vascular smooth muscle cells; hydrogen sulfide; whole cell patch clamp; Western blot

**Fund programs** Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. 2023AH050842); Open Project of Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, at Anhui Medical University (No. KFJJ-2023-06)

**Corresponding author** Chen Zhiwu, E-mail: ChenZhiWu@ahmu.edu.cn