

钙激活性氯离子通道在大鼠低氧高二氧化碳性 PASMCs中的表达及与MAPK通路的关系

黄林静^{1#} 黎关龙^{2#} 何金波¹ 马迎春¹ 陈丹¹ 应磊¹ 汪洋¹ 王万铁^{1*}

(¹温州医科大学基础医学院病理生理学教研室, 温州 325035;

²浙江省医学科学院卫生学研究所毒理学研究室, 杭州 310013)

摘要 采用酶消化法取雄性SD大鼠肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)进行原代培养, 采用小鼠抗大鼠SM α -actin免疫荧光细胞化学法进行细胞鉴定; 复制低氧高二氧化碳模型, 采用免疫印迹法检测钙激活性氯离子通道(calcium activated chloride channel, CLCA2)蛋白的表达; 采用半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术测定CLCA2 mRNA水平的表达。结果显示: 与正常组比较, 低氧高二氧化碳组PASMCs中CLCA2 mRNA和蛋白表达水平均明显上调($P < 0.01$); 与低氧高二氧化碳组比较, U0126组和SB203580组PASMCs中CLCA2 mRNA和蛋白表达水平均明显上调($P < 0.01$); 茴香霉素(Anisomycin)组PASMCs中CLCA2 mRNA和蛋白表达水平均显著下调($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$)。研究表明, 低氧高二氧化碳可上调大鼠PASMC中CLCA2 mRNA和蛋白的表达; ERK1/2通路抑制剂(U0126)、P38MAPK通路抑制剂(SB203580)均可上调PASMCs中CLCA2 mRNA和蛋白的表达; MAPK通路激活剂(Anisomycin)能下调PASMCs中CLCA2 mRNA和蛋白的表达。

关键词 低氧高二氧化碳; 钙激活性氯离子通道; P38MAPK; ERK1/2; 大鼠

The Expression of Calcium-activated Chloride Channel in PASMCs' under Hypoxic Hypercapnia State and the Relationship with MAPK Pathways

Huang Linjing^{1#}, Li Guanlong^{2#}, He Jinbo¹, Ma Yingchun¹, Chen Dan¹, Ying Lei¹, WangYang¹, Wang Wantie^{1*}

(¹Department of Pathophysiology Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

²Zhejiang Provincial Academy of Medical Sciences and Health Research Institute of Toxicology Laboratory, Hangzhou 310013, China)

Abstract We adopt an enzyme digestion to take the male SD rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) for cell primary culturing, taking immunofluorescence cytochemical method with mouse anti-rat the SM α -actin for cell identification. Then we set up a model of hypoxia and hypercapnia. Western blot is used to detect the protein expression of calcium-activated chloride channel (CLCA2); We Use semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to detecte the mRNA expression of CLCA2. The results demonstrated that compared with normal group, the expressions of CLCA2 mRNA and protein in PASMCs were significantly raised in hypoxia

收稿日期: 2013-05-22 接受日期: 2013-07-15

浙江省自然科学基金(批准号: Y2080760)和浙江省中医药重点学科建设项目(批准号: 2012-XK-A28)资助的课题
#并列第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-86689817, E-mail: wwt@wzmc.edu.cn

Received: May 22, 2013 Accepted: July 15, 2013

This work was supported by the Zhejiang Province Natural Science Foundation of China (Grant No.Y2080760) and the Foundation of Traditional Chinese Medicine of Zhejiang Province Key Discipline Construction Project (Grant No.2012-XK-A28)

#These author contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689817, E-mail: wwt@wzmc.edu.cn

网络出版时间: 2013-08-26 14:43 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130826.1443.004.html>

hypercapnia group ($P<0.01$); Contrast to the hypoxic hypercapnic group, CLCA2 mRNA and protein expressions in PASMCs were significantly raised in group U and group SB ($P<0.01$); the mRNA and protein expression in PASMCs were significantly decreased in group A ($P<0.05$ and $P<0.01$). The expression of CLCA2 in PASMCs could be raised under hypoxia and hypercapnia conditions; The expression of CLCA2 in PASMCs could be raised by both U0126 and SB203580; The expression of CLCA2 in PASMCs could be decreased by Anisomycin.

Key words hypoxia hypercapnia; calcium-activated chloride channels; P38MAPK; ERK1/2; rat

Clapp等^[1]发现,在阻力性肺动脉上存在钙激活氯离子通道(calcium activated chloride channel, CLCA2),且其在调控血管张力和收缩性方面起着相当重要的作用^[2-3]。以往研究表明,P38丝裂原活化蛋白激酶(P38 mitogen activated protein kinase, P38 MAPK)抑制剂-SB203580、细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase1/2, ERK1/2)抑制剂(U0126)均能减弱低氧高二氧化碳引起的肺动脉收缩反应^[4]。而目前关于CLCA2功能及其表达上下游信号通路研究的文献报道相对较少。本实验利用细胞培养方法观察了CLCA2在大鼠低氧高二氧化碳性肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)中mRNA和蛋白表达的变化,并探讨其与丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)信号通路的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF级标准健康雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠14只,体重(body weight, BW)为 220 ± 30 g,由温州医科大学实验动物中心提供[SCXK(浙)2010-0101号]。

1.2 试剂及仪器

SB203580(美国, Sigma公司); U0126(美国, Sigma公司); 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO, 上海生工生物技术有限公司); 茴香霉素(Anisomycin, 美国Sigma公司); 10%十二烷基磺酸钠(sodium dodecyl sulfonate, SDS, 碧云天生物技术有限公司); 四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED, 碧云天生物技术有限公司); 其余试剂为国产分析纯。

低氧CO₂/N₂培养箱(Herareus公司, 美国); 恒温二氧化碳培养箱(Thermo Forma公司, 美国)超净工作台(SW-CJ(Air-Tech公司, 苏州净化设备厂); 显微外科用显微镜(Olympus公司, 日本); 生物倒置相差显微镜XDS-1B(重庆光学仪器设备厂); 722N分

光光度计(上海精密科学仪器有限公司); Olympus CX21FS1型普通光学显微镜(日本); 蛋白电泳转移系统(Bio-Rad公司); EXL-808酶标仪(USA); 凝胶定量软件Quantity One(Bio-Rad公司); Image-pro plus 5.0彩色图像分析系统(美国Media Cybernetics公司); PCR仪(Thermo Hybaid公司, 美国); Gel Documentation System(BioScience 620)。

1.3 方法

1.3.1 酶消化法提取PASMCs 用5% 0.33 mL/100 g水合氯醛腹腔麻醉SD大鼠后,放入预先配好的75%酒精中浸泡5 min。在超净平台内,迅速剖开大鼠胸腔,剪断腹主动脉将心腔血液排尽,取出心肺组织,放入盛有4 °C PBS平衡盐缓冲液的培养皿中,清洗残留的血液,取出左叶肺和右肺中最大的肺叶。在解剖显微镜直视下分离肺动脉与周围组织,保留3~4级动脉(直径300~700 μm),并置于含青霉素和链霉素的PBS平衡盐缓冲液中漂洗4~6次。用显微剪沿动脉外侧纵向剪开。将动脉内膜朝上,沿着表面用弯头显微镊自上而下刮除内膜,尽量将内皮细胞除尽,留中膜平滑肌层,将平滑肌剪成1 mm³大小的组织块,装入15 mL无菌离心管中,1 000 r/min离心3 min。将组织块,放入4 °C HBSS中静置30 min,无钙HBSS中室温20 min。组织块转入消化酶中,置37 °C、5% CO₂培养箱内静置消化15 min,可见组织块松软、边缘发毛。吸出消化酶,加入培养基5 mL,室温3 min。玻璃滴管吹打,可见液体中有絮状物。静置片刻吸出细胞悬液收集于离心管中。原消化酶加回组织块中,37 °C、5% CO₂培养箱中继续消化5 min,按上述步骤收集细胞。再重复5 min消化操作1~2次。以 2×10^5 细胞/mL的密度种植于培养瓶中,加入含20%胎牛血清的高糖培养基置于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。

1.3.2 PASMCs的传代培养 当细胞生长达培养瓶(培养皿)80%~90%左右时,吸去培养液,用2~3 mL磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)清

洗培养瓶2次, 然后用0.25%胰蛋白酶消化细胞, 时间为0.5~2 min, 反复吹打使贴壁细胞脱落, 离心、吹打, 制成单细胞悬液。取10~30 μL 计数, 将适宜密度的单细胞悬液分置于3~4个培养瓶, 加适量含15%胎牛血清的高糖培养基, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。细胞传代至第2代时可冻存。

1.3.3 PASCs的冻存和复苏 (1)冻存: 由于实验中经常使用第4~5代细胞, 而大鼠细胞多次传代会引起异化, 生物学性状发生改变, 所以需将细胞早期细胞进行冻存。冻存步骤: 细胞在第2代时, 选择对数生长期细胞, 在冻存前1 d换培养液。用胰蛋白酶根据传代方法将单层生长细胞消化下来, 1 000 r/min离心5 min, 加入配制好的冻存培养液(含20% FBS、10% DMSO的DMEM培养液), 冻存液中细胞的最终密度为(5~10) $\times 10^6/\text{mL}$, 然后依次4, -20, -70 $^{\circ}\text{C}$, 液氮保存。冻存须确保密封。(2)复苏: 复苏细胞应快速融化, 与冻存的要求相反。将冻存管投入37 $^{\circ}\text{C}$ 温水中, 轻轻摇动, 使其尽快融化后用酒精消毒, 将液体移入无菌离心管, 加入十倍培养液, 1 000 r/min离心5 min, 弃上清液, 加入1 mL液体吹打, 接种细胞密度宜为5 $\times 10^5/\text{mL}$, 次日观察并换液培养。

1.3.4 PASCs存活率的测定 取消化传代的细胞悬液9滴, 加入0.4%台盼蓝液1滴, 混匀后3 min内吸取1滴于计数板上, 静置3 min, 在显微镜下观察。若细胞核染色, 则为不正常细胞或死亡细胞; 若未着色, 则为存活细胞。

1.3.5 差异贴壁法纯化细胞 细胞传至3代后, 按传代方法消化, 吹打细胞, 然后使细胞在第1瓶中贴壁15 min, 光镜下可见部分细胞贴壁; 后将第1瓶中培养基移入第2瓶中, 使细胞再次贴壁15 min, 光镜下又可见大部分细胞贴壁; 最后再将第2瓶中培养基移入第3瓶中, 再使细胞贴壁, 后将3瓶均补齐培养基。继续培养1~2 d后, 光镜下观察, 第1瓶中以较大长梭形细胞为主, 为成纤维细胞; 第2瓶为混和细胞; 第3瓶中为较纯的梭形平滑肌细胞; 取第2瓶细胞继续培养。也可重复纯化几次, 获得较纯的平滑肌细胞^[5]。

1.3.6 PASCs的鉴定 倒置相差显微镜下观察细胞形态并摄片; 激光共聚焦免疫荧光染色法分别检测PI(激发光波长488 nm, 发射光峰值630 nm)标记的细胞核及FITC(激发光波长488 nm, 发射光峰值525 nm)标记的平滑肌 α -actin抗体。

1.3.7 实验分组 取第4~5代生长良好的对数生长期PASCs, 制成细胞悬液, 按2 $\times 10^5$ 细胞/mL的密度接种于10 cm培养皿中, 加入含15%胎牛血清的高糖培养基, 置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中进行培养, 待融合成单层细胞时(约80%铺满)换成无血清培养基饥饿24 h, 同步后进行药物干预(30 min内完成加药操作)。(1)正常组(N): DMEM 5% CO_2 , 21% O_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$, 48 h; (2)低氧高二氧化碳组(H): DMEM 6% CO_2 , 1% O_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$, 48 h; (3)DMSO对照组(D): 0.05% DMSO, 6% CO_2 , 1% O_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$, 48 h; (4)U0126干预组(U): 10 $\mu\text{mol/L}$ U0126, 6% CO_2 , 1% O_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$, 48 h; (5)SB203580干预组(SB): 10 $\mu\text{mol/L}$ SB203580, 6% CO_2 , 1% O_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$, 48 h; (6)Anisomycin干预组(A): 10 $\mu\text{mol/L}$ Anisomycin, 6% CO_2 , 1% O_2 , 37 $^{\circ}\text{C}$, 48 h。以上每组6皿细胞。

1.3.8 蛋白免疫印迹法检测PASCs CLCA2的蛋白含量 从 CO_2 培养箱及三气培养箱中取出各组细胞, 用预冷的PBS清洗3次, 每次1 min, 用滤纸吸干。各皿细胞中加入含1 mmol/L PMSF的细胞裂解液100 μL 。匀浆充分裂解后12 000 r/min, 离心20 min, 吸取上清, 用BCA法测定蛋白浓度后10%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白然后转移到PVDF膜上, 5%脱脂奶粉室温封闭1 h。取5% BSA稀释的兔抗鼠Clca多克隆抗体(1:1 000)或内参 β -actin(1:10 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育过夜, 约16 h。次日, TBST洗膜后加辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(1:50 000), 室温孵育1 h。洗膜后ECL发光将PVDF膜用保鲜膜包好放入暗盒内, 暗室中用X胶片感光、显影液中显影、定影液中定影。Quantity One凝胶软件分析系统分析CLCA2灰度值, 以目的蛋白CLCA2条带灰度值和 β -actin灰度值比值相对A值(Ratio A Value)代表CLCA2表达的含量^[6]。

1.3.9 RT-PCR法检测PASCs CLCA2的mRNA表达 取细胞, 采用Trizol试剂盒提取总RNA, 再使用分光光度计在260/280 nm处检测总RNA的质量和纯度之后, 使用cDNA合成试剂盒将mRNA反转录成cDNA。cDNA采用相应特异性引物进行PCR扩增, 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, 引物序列如下: CLCA2引物上游序列: 5'-AGA CAA TCC CTA CAC CCT TCA A-3', 下游序列: 5'-TGT CGG TAG AAC ACC TTG TCA C-3', 233 bp; β -actin引物上游序列: 5'-GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC-3', 下

游序列: 5'-TCG GGG GAT CGG AAC CGC TCA-3', 400 bp。β-actin共扩增, PCR反应过程参数如下: 扩增条件为: 95 °C 6 min; 95 °C 30 s; 55 °C 30 s; 72 °C 1 min; 72 °C 10 min; 共38个循环。取PCR反应产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳用PDQuest凝胶照相分析仪紫外灯观察照相, 用gelpro analyze分析软件分析测定吸光度值(D), 以CLCA2扩增带与β-actin扩增带的D值之比(Relative D Value)作为CLCA2 mRNA的相对表达量。实验重复6次^[6]。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料均进行正态性检验, 以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)形式表示。多组样本均数比较进行方差齐性检验, 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 方差齐性者两两比较采用LSD法, 方差不齐者进行Dunnet't检验; 均以 $P<0.05$ 为有统计学意义, $P>0.05$ 为无统计学意义。

2 结果

2.1 原代培养大鼠PASCs的培养和鉴定

2.1.1 细胞形态学生长特点 平滑肌细胞原代培养72 h, 此时细胞已经贴壁成长梭形, 换液后生长繁殖加快, 间隙变小, 成束的平滑肌细胞平行排列, 部分细胞可多层重叠。培养到第5 d后, 细胞密度低时常交织网状, 密度高时则呈旋涡状或者栅栏状, 呈典型的“峰-谷”状生长。镜下显示细胞呈梭形, 具有长短不等的数个突起, 彼此融合, 边界不清, 折光性好, 细胞核位于细胞中央, 呈卵圆形, 多为3~5个。传代培养的细胞生长规律与原代培养相似, 传代后第2

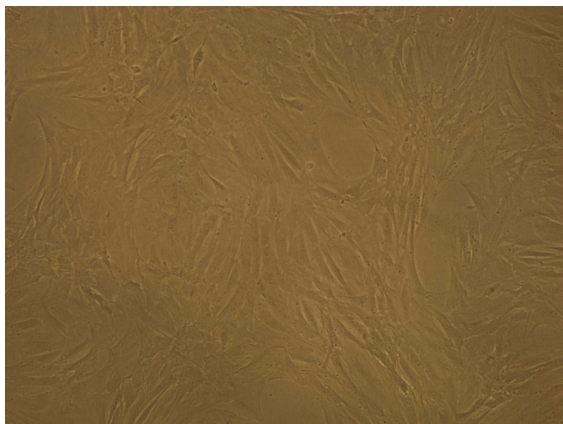


图1 大鼠原代培养肺动脉平滑肌细胞(100×)
Fig.1 Rat PASCs by primary culturing (100×)

表1 6组PASCs上CLCA2 mRNA表达变化的比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)
Table 1 Change of CLCA2 mRNA expression in all groups ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别 Groups	CLCA2 mRNA
N	1.041±0.039
H	1.213±0.013**
D	1.221±0.038**
U	1.283±0.013** $\Delta\Delta\Delta$
SB	1.281±0.034** $\Delta\Delta\Delta$
A	1.041±0.041 $\Delta\Delta\Delta$

** $P<0.01$ vs group N; $\Delta\Delta P<0.01$ vs group H; $\Delta\Delta\Delta P<0.01$ vs group D.

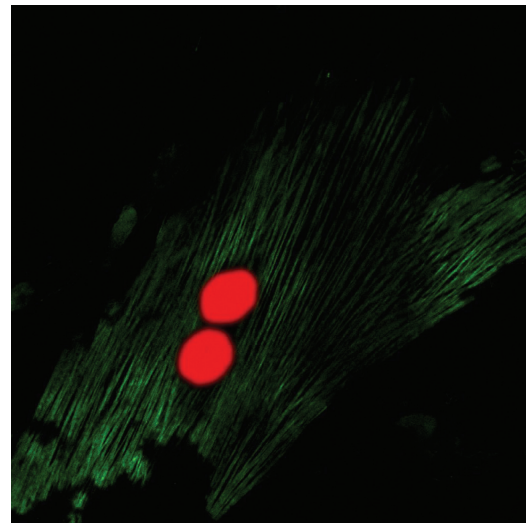


图2 大鼠肺动脉平滑肌细胞免疫荧光鉴定(400×)
Fig.2 Immunobiochemical identification of rat PASCs (400×)

日生长繁殖活跃, 4~6天后生长进入平台期, 可以进行下次传代, 连续培养多代仍可保持较好状态(图1)。

2.1.2 免疫细胞荧光法鉴定PASCs 培养第4~5代的细胞经小鼠抗大鼠α-actin单克隆抗体孵育, FITC、DAPI双染色后激光共聚焦显微镜下观察, 约99%呈阳性反应。高倍镜下可见胞浆内FITC标记的平滑肌α-actin发绿色荧光、与细胞长轴平行呈纤维细丝状, 此为平滑肌α-肌动蛋白, 仅平滑肌细胞呈阳性反应; DAPI标记的细胞核呈红色荧光, 卵圆形居中(图2)。

2.1.3 台盼蓝染色结果 镜下共计数2 600个细胞, 其中71个阳性细胞, 阴性率为97.3%, 说明消化法传代细胞存活率高。经冻存复苏后阴性率达87.2%, 说明冻存复苏后的细胞存活率仍较高。

2.2 各组PASCs上CLCA2 mRNA表达的变化

2.2.1 低氧高二氧化碳对PASCs上CLCA2 mRNA

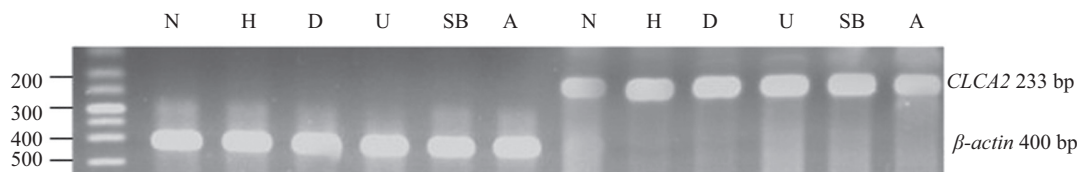


图3 各组PASCs上CLCA2 mRNA的表达
Fig.3 The expression of CLCA2 mRNA in all groups

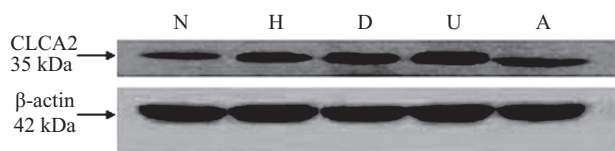


图4 各组PASCs上CLCA2蛋白的表达
Fig.4 The expression of CLCA2 protein in all groups

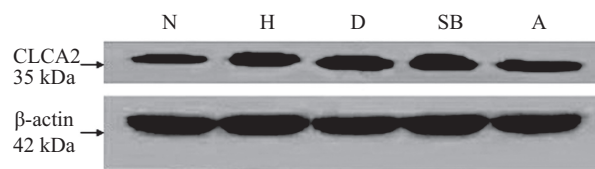


图5 各组PASCs CLCA2蛋白的表达
Fig.5 The expression of CLCA2 protein in all groups

表2 6组PASCs上CLCA2蛋白表达变化的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Change of CLCA2 protein expression in all groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Groups	CLCA2 protein
N	0.474±0.014
H	0.529±0.024**
D	0.532±0.010**
U	0.568±0.010** $\Delta\Delta\Delta$
SB	0.567±0.003** $\Delta\Delta\Delta$
A	0.501±0.034* $\Delta\Delta$

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs group N; $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ vs group H; $\Delta\Delta\Delta P<0.01$ vs group D.

表达的影响 与N组相比, H组CLCA2 mRNA表达量显著增加($P<0.01$)(表1和图3)。

2.2.2 低氧高二氧化碳条件下U0126和SB203580对PASCs上CLCA2 mRNA表达的影响 与N组比较, H组、D组、U组及SB组CLCA2 mRNA表达均明显上调($P<0.01$), A组CLCA2 mRNA表达无差异($P>0.05$); 与H组比较, D组CLCA2 mRNA表达略微上调, 但无统计学意义($P>0.05$), U组和SB组CLCA2 mRNA表达均明显上调($P<0.01$), A组CLCA2 mRNA表达显著下调($P<0.01$); 与D组比较, U组和SB组CLCA2 mRNA表达显著上调($P<0.01$), A组CLCA2 mRNA表达明显下调($P<0.01$)(表1、图3)。

2.3 各组PASCs上CLCA2蛋白表达的变化

2.3.1 低氧高二氧化碳对CLCA2蛋白表达的影响 与N组相比, H组CLCA2蛋白的表达显著明显上调($P<0.01$)(表2、图4和图5)。

2.3.2 低氧高二氧化碳条件下U0126和SB203580对PASCs上CLCA2蛋白表达的影响 与N组比较, H组、D组、U组及SB组CLCA2蛋白表达均明显上调($P<0.01$), A组CLCA2蛋白表达轻微上调($P<0.05$); 与H组比较, D组CLCA2蛋白表达略微上调, 但无统计学意义($P>0.05$), U组和SB组CLCA2蛋白表达均明显上调($P<0.01$), A组CLCA2蛋白表达显著下调($P<0.01$); 与D组比较, U组和SB组CLCA2蛋白表达显著上调($P<0.01$), A组CLCA2 mRNA表达明显下调($P<0.01$)(表2、图4和图5)。

3 讨论

孔春初等^[7]研究发现, 在低氧所致肺动脉高压大鼠肺组织p-ERK表达随低氧时间延长呈动态变化, 且较正常组表达明显增强, 随着低氧高二氧化碳进展, 磷酸化ERK表达变化主要见于肺小动脉壁, 且主要表达在肺小动脉中膜(平滑肌细胞)和内膜(内皮细胞)。Seko等^[8]也证实缺氧可激活丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MAPKKK), 即有活性的Raf-1蛋白。Raf-1又可相继激活丝裂原活化蛋白激酶激酶(MAPKK)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和S6激酶, MAPK和S6激酶又可分别激活丝裂原活化蛋白(MAP)和核糖体蛋白S6, MAPK和S6激酶都可使体内转录因子如c-fos、c-jun等磷酸化而调节其活性, 从而影响基因的表达, 引起细胞增殖和生长反应。

肺血管重塑是慢性低氧高二氧化碳性肺动脉高压主要的血管变化特征和难以逆转的重要因素, 在低氧、高碳酸等各种刺激因子作用下, 主要是

PASMCs增殖和胶原等细胞外基质在管壁大量沉积而形成。本室先前研究^[9]显示,低氧高二氧化碳能够引起ERK1/2和P38MAPK通路的活化,引发肺血管重塑,最后形成大鼠肺动脉高压。许多研究表明^[10-11],一些由低氧激活的促细胞增殖的因子如VEGF都能直接或间接激活MAPK途径,参与细胞骨架的形成和细胞迁移的过程,促进血管内皮细胞分裂、增殖。Gorin等^[12]也发现,在VSMC的迁移和增殖调控过程中,AngII、FAK活性与ERK1/2的活性密切相关。AngII通过MAPK途径刺激VSMC增殖^[13]。Fan等^[14]证实,低氧时人脐静脉内皮细胞的ERK1/2磷酸化水平增高、VEGF的合成增加,这些变化可被PD98059所抑制。Zou等^[15]证实,ERK1/2的特异阻断剂U0126可完全抑滞Ox-LDL诱导的VSMC的增殖。本研究发现在低氧高二氧化碳条件下,PASMCs上CLCA2 mRNA和蛋白的表达量明显高于常氧条件下的表达量($P<0.01$)。表明低氧高二氧化碳可上调大鼠PASMCs上CLCA2 mRNA和蛋白的表达,其机制可能是低氧高二氧化碳引起PASMCs膜通透性增加和 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高激活CLCA2,氯离子大量外流,引起细胞膜去极化,继而开放电压依赖性钙通道,使细胞外 Ca^{2+} 大量内流,细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 进一步升高, Ca^{2+} 与胞浆内的钙调素结合使肌球蛋白轻链激酶磷酸化,进而引发平滑肌细胞收缩、增殖^[16]。

Clapp等^[1]发现,80%平滑肌细胞在主肺动脉上可诱发出钙激活性氯电流(Ca^{2+} -activated CL currents, $I_{cl(ca)}$),而只有43%平滑肌细胞在小血管(直径200~400 μm)可诱发出这种电流,其可能的原因是钙激活性氯离子通道(calcium activated chloride channel, CLCA2)存在不同的亚型,并在肺动脉树上分布不均衡,也可能是不同部位的肺动脉平滑肌细胞内钙储库的数量不同或对 Ca^{2+} 浓度的敏感性不同。杨朝等^[16]发现,CLCA2在生理状态下参与了苯福林(phenylephrine PE)引起的肺动脉收缩。Greenwood等^[17]观察到,在兔门静脉平滑肌细胞外液低渗透压时细胞肿胀并诱发一内向性电流,这一电流可以被DIDS、Tamoxifen和IAA-94所阻断,表明兔门静脉平滑肌细胞膜在静息时有氯离子电流,其可以使细胞膜去极化。本实验显示,使用U0126及SB203580后,PASMCs中CLCA2 mRNA和蛋白表达水平明显上调,显著高于低氧高二氧化碳组($P<0.01$);应用Anisomycin后PASMCs中CLCA2

mRNA和蛋白表达水平均显著下调,明显低于低氧高二氧化碳组($P<0.05$ 和 $P<0.01$)。提示ERK1/2通路抑制剂(U0126)、P38MAPK通路抑制剂(SB203580)可上调PASMCs上CLCA2 mRNA和蛋白的表达;MAPK通路激活剂(Anisomycin)能下调PASMCs中CLCA2 mRNA和蛋白的表达。从以上结果中得出,MAPK可能是CLCA2的上游分子并可调控其表达水平。

参考文献 (References)

- 1 Clapp LH, Turner JL, Kozlowski RZ. Ca^{2+} -activated Cl-currents in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol* 1996; 270(5 Pt 2): H1577-84.
- 2 Matchkov VV. Mechanisms of cellular synchronization in the vascular wall. *Mechanisms of vasomotion*. *Dan Med Bull* 2010; 57(10): B4191.
- 3 Forrest AS, Angermann JE, Raghunathan R, Lachendro C, Greenwood IA, Leblanc N. Intricate interaction between store-operated calcium entry and calcium-activated chloride channels in pulmonary artery smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol* 2010; 661: 31-55.
- 4 朱阿楠, 王万铁, 林丽娜, 王方岩, 吴成云, 金立达, 等. MAPK通路抑制剂对低氧高二氧化碳性肺动脉收缩的影响. *中国病理生理生理杂志*(Zhu Anan, Wang Wantie, Lin Lina, Wang Fangyan, Wu Chengyun, Jin Lida, *et al.* Effect of MAPK inhibition on the hypoxia hypercapnia-induced pulmonary vasoconstriction. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2008; 24(8): 1538-42.
- 5 李悦梅, 冯大明, 万载阳, 王双, 沈丹彤, 赵桂玲, 等. 组织块法培养大鼠肠系膜小动脉的平滑肌细胞. *南华大学学报(医学版)*(Li Yue mei, Feng Daming, Wan Zaiyang, Wang Shuang, Shen Dantong, Zhao Guiling, *et al.* The method of culturing the smooth muscle cells from tissue pieces of cremasteric arterioles of rat. *Journal of Nanhua University-Medical Edition*) 2003; 31(3): 251-3.
- 6 李丹, 张艳华, 陈少杰, 虞旭光, 林向东, 唐兰兰, 等. 大鼠肾缺血-再灌注后JNK mRNA及蛋白表达的变化及银杏达莫注射液干预作用. *中国中西医结合肾病杂志*(Li Dan, Zhang Yanhua, Chen Shaojie, Yu Xuguang, Lin Xiangdong, Tang Lanlan, *et al.* Effect of injection of ginkgo biloba extract and dipyridamole on JNK activation in rats with renal ischemia reperfusion injury. *Chinese Journal of Integrated Traditional And Western Nephrology*) 2011; 12(4): 303-7.
- 7 孔春初, 戴爱国. 慢性阻塞性肺疾病患者肺部丝裂原活化蛋白激酶、蛋白激酶B和缺氧诱导因子1 α 的表达. *中华结核和呼吸杂志*(Kong Chunchu, Dai Aiguo. Expression of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase and hypoxia-inducible factor-1 α in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chinese Journal of Tuberculosis And Respiratory Diseases*) 2006; 29(6): 372-5.
- 8 Seko Y, Tobe K, Ueki K, Kadowaki T, Yazaki Y. Hypoxia and hypoxia/reoxygenation activate Raf-1, mitogen-activated protein kinase kinase, mitogen-activated protein kinases, and S6 kinase in cultured rat cardiac myocytes. *Circ Res* 1996; 78(1): 82-90.
- 9 朱阿楠, 王园园, 王淑君, 金可可, 汪洋, 王万铁. ERK通路和

- 三七总皂苷干预在低氧高二氧化碳性肺动脉高压中的作用. 中国病理生理杂志(Zhu Anan, Wang Yuanyuan, Wang Shujun, Jin Keke, Wang Yang, Wang Wantie. Roles of ERK pathway and Panax notoginsenoside treatment in hypoxic hypercapnia pulmonary hypertension in rats. Chinese Journal of Pathophysiology 2011; 27(9): 1796-801.
- 10 Zhong YY, Zhang HF, Zhong JX, Bai L, Lu XH. Topical dihydroartemisinin inhibits suture-induced neovascularization in rat corneas through ERK1/2 and p38 pathways. Int J Ophthalmol 2011; 4(2): 150-5.
- 11 Ferrari G, Terushkin V, Wolff MJ, Zhang X, Valacca C, Poggio P. TGF- β 1 induces endothelial cell apoptosis by shifting VEGF activation of p38(MAPK) from the prosurvival p38 β to proapoptotic p38 α . Mol Cancer Res 2012; 10(5): 605-14.
- 12 Gorin Y, Ricono JM, Wagner B. Angiogenesis H 2 induced ERK1/2 activation and protein synthesis are redox dependent in glomerular mesangial cells. Biochem 2004; 38(1): 231-9.
- 13 Nakai K, Kawato T, Morita T, Iinuma T, Kamio N, Zhao N, *et al.* Angiotensin II induces the production of MMP-3 and MMP-13 through the MAPK signaling pathways via the AT(1) receptor in osteoblasts. Biochimie 2013; 95(4): 922-33.
- 14 Fan B, Wang YX, Yao T, Zhu YC. p38 Mitogen-activated protein kinase Mediates hypoxia-induced vascular endothelial growth factor release in human endothelial cells. Sheng Li Xue Bao 2005; 57(1): 13-20.
- 15 Zou J, Li Y, Fan HQ, Wang JG. Effects of dihydropyridine calcium channel blockers on oxidized low-density lipoprotein induced proliferation and oxidative stress of vascular smooth muscle cells. BMC Res Notes 2012; 6(5): 168.
- 16 杨朝, 张珍祥, 徐永键, 叶涛, 李亚清. 钙激活氯离子通道对大鼠肺动脉张力的调节作用. 中国应用生理学杂志(Yang Zhao, Zhang Zhenxiang, Xu Yongjian, Ye Tao, Li Yaqing. Role of calcium-activated chloride channels in the regulation of pulmonary vascular tone in rats. Chinese Journal of Applied Physiology) 2006; 22(2): 215-8.
- 17 Greenwood IA, Large WA. Properties of a Cl⁻ current activated by cell swelling in rabbit portal vein vascular smooth muscle cells. Am J Physiol 1998; 275(5 Pt 2): H1524-32.