

低氧高二氧化碳对肺动脉平滑肌细胞TRPC1/4表达影响及其与细胞增殖、凋亡的关系

郑梦晓^{1,2} 赵美平¹ 张聪聪¹ 贾旭广³ Wu Yiming⁴ 陈锡文⁵ 王万铁^{1*}

(¹温州医科大学病理生理学教研室, 温州 325035; ²黄河科技学院医学院, 郑州 450063; ³四川省宜宾卫生学校内科教研室, 宜宾 644000; ⁴Division of Cardiovascular Medicine University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa 52242, USA; ⁵温州医科大学实验动物中心, 温州 325035)

摘要 该文旨在研究低氧高二氧化碳时C型瞬时受体电位通道1(transient receptor potential channel 1, TRPC1)和TRPC4的表达变化与肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡的关系。经免疫荧光鉴定后随机分为5组: 常氧对照组(N)、低氧高二氧化碳组(H)、溶剂二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)对照组(D)、TRPC1/4抑制剂SKF-96365组(S)和TRPC1/4激动剂环匹阿尼酸(cyclopiazonic acid, CPA)组(C)。N组置于常氧培养箱(21% O₂、5% CO₂、37 °C)中培养24 h, 其余4组放于低氧高二氧化碳培养箱(5% O₂、6% CO₂、37 °C)中培养24 h。采用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)分别检测TRPC1和TRPC4的mRNA和蛋白质水平; CCK-8法检测各组细胞增殖情况; 原位末端标记法(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)检测各组细胞凋亡指数(apoptotic index, AI); Fura 2-AM法检测细胞内钙离子浓度[Ca²⁺]_i。结果发现, H组TRPC1和TRPC4的mRNA和蛋白质水平以及细胞增殖和[Ca²⁺]_i均高于N组($P < 0.05$), 而凋亡指数低于N组($P < 0.05$)。与H组相比, S组TRPC1/4的mRNA和蛋白质水平以及细胞增殖和[Ca²⁺]_i均降低($P < 0.05$), 细胞凋亡增加($P < 0.05$); C组TRPC1的mRNA和蛋白质水平以及细胞增殖和[Ca²⁺]_i增加($P < 0.05$), 细胞凋亡率下降($P < 0.05$), 但C组TRPC4的mRNA和蛋白表达变化无统计学意义($P > 0.05$)。以上结果说明, 在低氧高二氧化碳情况下, TRPC1/4的mRNA和蛋白质水平以及[Ca²⁺]_i均增高, 细胞的增殖和凋亡与细胞内TRPC1的表达变化有关。

关键词 低氧高二氧化碳; TRPC; 肺动脉平滑肌细胞; 增殖; 凋亡

The Expression of TRPC1/4 and Its Relationship with Proliferation and Apoptosis of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells under Hypoxic and Hypercapnic Conditions

Zheng Mengxiao^{1,2}, Zhao Meiping¹, Zhang Congcong¹, Jia Xuguang³, Wu Yiming⁴, Chen Xiwen⁵, Wang Wantie^{1*}

(¹Department of Pathophysiology, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ²School of Medicine, Yellow River Technical College, Zhengzhou 450063, China; ³Department of Internal Medicine, Yibin Health School, Yibin 644000, China;

⁴Division of Cardiovascular Medicine University of Iowa Carver College of Medicine, Iowa City 52242, USA;

⁵Experimental Animal Center, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract This work was aimed to study the relationship between TRPC1/4 and pulmonary artery smooth

收稿日期: 2016-03-22 接受日期: 2016-08-01

浙江省科技计划项目(批准号: 2015C37121)和四川省宜宾市重点科技项目(批准号: 2015SF036)资助的课题

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

Received: March 22, 2016 Accepted: August 1, 2016

This work was supported by the Science and Technology Project of Zhejiang Province (Grant No.2015C37121) and the Key Science and Technology Project of Sichuan Province (Grant No.2015SF036)

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

网络出版时间: 2016-09-19 11:03:10 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160919.1103.002.html>

muscle cells (PASMCs) proliferation and apoptosis under hypoxic and hypercapnic conditions. Cellular purity was assessed by immunofluorescence staining for α -SMA under fluorescence microscopy. PASMCs were divided into 5 groups randomly: normoxic group (N), hypoxic and hypercapnic group (H), DMSO group (D), TRPC1/4 inhibitor SKF96365 group (S) and TRPC1/4 activator CPA group (C). N group was incubated under normoxia (5% CO₂, 21% O₂, 37 °C) for 24 h, and the others were incubated under hypoxic and hypercapnic (6% CO₂, 5% O₂, 37 °C) atmosphere for 24 h. TRPC1/4 mRNA levels were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). TRPC1/4 protein levels were detected by Western blot. The proliferation assay of PASMCs was performed by CCK-8 kit. The apoptosis of PASMCs was detected using the terminal deoxyribonucleotide transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay. [Ca²⁺]_i was measured in PASMCs using fura 2-AM fluorescence. The results showed that the expression of TRPC1/4 mRNA and proteins and [Ca²⁺]_i were upregulated under hypoxic and hypercapnic conditions. Hypoxia and hypercapnia promoted PASMCs proliferation and inhibited apoptosis. TRPC1/4 inhibitor SKF96365 reversed the effect of hypoxia and hypercapnia. CPA increased TRPC1 mRNA and protein levels, but neither TRPC4. The levels of TRPC1/4 mRNA and proteins and [Ca²⁺]_i were upregulated under hypoxic and hypercapnic conditions. TRPC1 has a relationship with PASMCs proliferation and apoptosis.

Keywords hypoxia and hypercapnia; TRPC; PASMCs; proliferation; apoptosis

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一种预后不良的极度严重的疾病,以持续的肺动脉压力增高为特点,最终会导致右心衰竭,甚至死亡^[1]。PH的主要变化是肺血管收缩增强和肺血管结构重构,此变化与肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)的异常增殖密切相关。近年来研究表明,低氧可促进PASMCs的增殖,从而使肺动脉壁增厚,导致肺血管重构并增加肺血管抵抗,最终发展为PH^[2]。

Ca²⁺作为细胞内普遍存在的第二信使,在不同的细胞内参与多种生理过程的调节,包括分泌、基因转录、细胞增殖和凋亡^[3]。在PASMCs中存在的非电压依赖性钙通道(non-voltage-dependent Ca²⁺ channels, non-VDCC)有两种:由G蛋白偶联受体信号通路激活的受体操纵性钙通道(receptor-operated Ca²⁺ channels, ROCC)和由内质网/肌质网中Ca²⁺浓度下降或钙库耗竭所激活的钙库操纵性钙通道(store-operated Ca²⁺ channels, SOCC)^[4-5]。

C型瞬时受体电位(canonical transient receptor potential, TRPC)是一种6次跨膜蛋白,是组成ROCC和SOCC的分子基础^[6]。TRPC共有7个亚型(TRPC1-7),一般认为,TRPC1/4可以被内质网钙库的耗竭激活^[7]。PASMCs中主要表达的是TRPC1、TRPC3、TRPC4和TRPC6^[8-10]。因此,本文主要研究TRPC1和TRPC4的表达变化。

很多低氧性肺病往往伴随着二氧化碳的升高,

已有研究证明,动脉内CO₂分压和肺动脉压力有关系^[11]。目前,关于低氧时TRPC变化的研究很多,但对于低氧高二氧化碳时的研究很少。研究表明,在不同的肺动脉高压模型中TRPC1/4的表达有不同程度的增高,从而增加了ROCC和SOCC^[12-13]。以上结果说明,TRPC1/4在PH的发展中起着重要作用。本文旨在研究低氧高二氧化碳时TRPC1和TRPC4的表达变化与细胞增殖和凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 动物、试剂与药品

健康Sprague-Dawley(SD)雄性大鼠30只,SPF级,体重为200±20 g,由温州医科大学动物实验中心提供,动物许可证号:SCXK(浙)2010-0044。主要试剂和药品有:I型胶原酶(Biosharp公司)、胎牛血清(Gibco公司)、DMEM(dulbecco's modified eagle medium)高糖培养基(Gibco公司)、SKF-96365和CPA(Sigma公司)、逆转录试剂盒(天根生化科技有限公司)、BCA蛋白质定量试剂盒(Thermo公司)、兔抗大鼠TRPC1多克隆抗体(Sigma公司)、兔抗大鼠TRPC4多克隆抗体(Sigma公司)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔二抗(上海博蕴生物科技有限公司)、CCK-8试剂盒和Fura 2-AM(日本同仁化工)、TUNEL试剂盒(Roche公司)、 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)(宝生物工程大连有限公司)、异硫氰酸荧光

素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的荧光二抗(上海谱振生物有限公司)。

1.2 离体培养肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)

10%水合氯醛腹腔注射(0.33 mL/100 g)SD雄性大鼠,麻醉后,用酒精棉擦拭全身。迅速取出心肺,于超净台中轻柔分离2~3级肺动脉。剥离外膜,并尽量去除内膜。将平滑肌放入0.2%的胶原酶I中,剪成1 mm³大小的组织块,37 °C培养箱内静置30 min。离心后去除胶原酶I,加入含20%胎牛血清的培养液(含1% 100×青、链霉素),吹打使组织块悬浮,接种至培养瓶中。37 °C、5% CO₂培养箱中培养至第3 d见细胞贴壁后,将培养液加至3 mL继续培养,第6 d即可传代。生长良好的4~6代细胞用无血清DMEM饥饿培养24 h后,随机分为5组:常氧对照组(N)、低氧高二氧化碳组(H)、溶剂DMSO对照组(D)、TRPC1/4抑制剂30 μmol/L SKF-96365组(S)和TRPC1/4激动剂10 μmol/L CPA组(C)。N组置于21% O₂、5% CO₂常氧培养箱中培养24 h,其余4组放于5% O₂、6% CO₂低氧高二氧化碳培养箱培养24 h。

1.3 大鼠PASMCs鉴定—— α -SMA免疫荧光检测

PASMCs制成细胞悬液,吹打混匀后接种到铺有盖玻片的6孔板中,待细胞汇合达80%时进行实验^[14]。用PBS洗3次,4%甲醛溶液室温下固定后PBS清洗。1% BSA+0.3% Triton X-100配置的封闭液孵育1 h,弃去封闭液。取 α -SMA一抗,稀释后室温孵育1.5 h, PBS洗3次。荧光二抗稀释后,室温孵育1 h, PBS洗3次。DAPI室温下避光孵育5 min, PBS洗3次。50%甘油封片后于荧光显微镜下观察并拍片。

1.4 RT-PCR检测细胞TRPC1/4 mRNA水平

用Trizol裂解细胞提取细胞总RNA,紫外分光光度计测RNA浓度。取2 μg总RNA逆转录成cDNA。PCR反应体系共25 μL,其中cDNA和上、下游引物各1 μL。TRPC1上游引物序列为5'-AGG CCA CAG AGT GCA GAC A-3',下游引物序列为5'-AAG CGC ATA ATC CCA TTG TAG-3'; TRPC4上游引物序列为5'-GCG TGC TGC TGA TAA CTT GA-3',下游引物序列为5'-TGC GTT GGC TGA CTG TAT TG-3'; β -actin上游引物序列为5'-CGT TGA CAT CCG TAA AGA C-3',下游引物序列为5'-TGG AAG GTG GAC AGT GAG-3'。TRPC1和内参 β -actin的反应条件为94 °C预变性6 min,94 °C变性1 min,59 °C退火1 min,72 °C延伸1 min,重复30个循环。TRPC4反应条件为95 °C预变性15 min,

94 °C变性15 s,62 °C退火20 s,72 °C延伸20 s,循环次数为45个。配制1.5%的琼脂糖凝胶电泳约30 min后,用UV-800全自动凝胶成像分析系统曝光成像。Quantity One软件分析电泳条带灰度值,用目的基因与 β -actin基因灰度值之比表示目的基因的表达水平。

1.5 Western blot检测细胞TRPC1和TRPC4蛋白质水平

苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)和RAPI的比例为1:100配置成裂解液,使细胞充分裂解。低温12 000 r/min离心20 min后,吸取上清。用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。电泳结束后按分子量大小进行转膜,1 kDa转膜1 min。用一抗稀释液稀释一抗(TRPC1/4为1:500,内参为1:5 000),采用反铺法4 °C静置孵育过夜。TBST洗膜后,用HRP标记的山羊抗兔二抗室温孵育1 h,TRPC1和内参所用二抗比例为1:50 000,TRPC4所用二抗比例为1:20 000。洗膜后滴加化学发光检测试剂,暗室中用X胶片感光1 min,显影2 min,定影30 s即可。扫描底片,Quantity One软件分析条带灰度值,用目的蛋白与 β -actin蛋白质灰度值之比表示目的蛋白质水平。

1.6 CCK-8法检测细胞增殖情况

取4~6代PASMCs制成细胞悬液,密度约为2.5×10³/mL。吹打混匀加入96孔板,每孔200 μL,约5 000个细胞。每组设置6个复孔,实验孔周围加一圈PBS以防实验孔培养液蒸发过快。待细胞生长状态良好换无血清DMEM饥饿培养24 h, PBS洗3次,加药造模。取出96孔板,去净培养液,加入110 μL CCK-8混合液。放入37 °C培养箱30 min,用酶标仪450 nm处测吸光度(D),每隔30 min测量一次,记录D值。

1.7 TUNEL法检测细胞凋亡指数

用TUNEL试剂盒检测细胞凋亡指数。处理好的细胞用PBS清洗,4%多聚甲醛固定,曲拉通破膜(阳性对照:破膜后加入100 μL DNase I反应液,37 °C水浴30 min)。用胎牛血清和小牛血清白蛋白溶液封闭后,滴加反应液50 μL(阴性对照:此步骤不加TdT),置湿盒内避光孵育60 min。3% H₂O₂甲醇溶液孵育10 min以阻断内源性过氧化物酶。滴加POD 50 μL,置湿盒内37 °C水浴30 min。DAB显色后自来水冲洗终止反应。滴加苏木精复染30 s。逆浓度梯度乙醇脱水后用二甲苯透明,待其干燥后中性树胶封片。

显微镜下观察细胞核被染成棕褐色者为阳性细胞。随机选出5个视野, 凋亡指数(apoptotic index, AI)=视野内的阳性细胞数/视野内总细胞数 \times 100%。

1.8 Fura 2-AM双波长法检测细胞内钙离子浓度

造模结束的细胞用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗3次。胰酶消化悬浮细胞, 离心后去上清, PBS洗3次以彻底去除胰酶和培养液。加入200 μ L浓度为5 μ mol/L的Fura 2-AM工作液, 置于37 $^{\circ}$ C培养箱孵育40 min。去除Fura 2-AM工作液, PBS清洗以彻底去除Fura 2-AM工作液。最后, 每管加入200 μ L的PBS吹打混匀, 转移到黑色96孔酶标板中, 用酶标仪检测。设定发射波长为510 nm, 激发波长为340 nm和380 nm, 此时测得的F340/F380荧光强度比值为R。然后加入Triton X-100破膜10 min, 使Fura 2-AM与Ca²⁺结合达到饱和状态, 此时用酶标仪测得的F340/F380荧光强度比值为R_{max}。再加入Ca²⁺螯合剂EGTA(ethylene glycol tetraacetic acid)充分反应10 min, 以螯合所有的Ca²⁺, 此时用酶标仪测得的F340/F380荧光强度比值为R_{min}。细胞内钙离子浓度的计算公式为: $[Ca^{2+}]_i = Kd[(R-R_{min})/(R_{max}-R)]$

(F_{min}/F_{max})。式中的Kd为Fura 2-AM与Ca²⁺结合反应的解离常数, 细胞内环境下为224 nmol/L。F_{min}和F_{max}分别为Ca²⁺被完全螯合和Ca²⁺饱和时, 激发波长为380 nm时测得的荧光强度值。

1.9 统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计分析, 计量资料进行正态性检验, 数据用均数 \pm 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Dunnett's T3检验, 以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 α -SMA免疫荧光检测鉴定大鼠PASMCs

大鼠PASMCs原代培养4 d后, 可见有大量长梭形细胞从组织块爬出贴壁生长。普通光学显微镜下显示细胞呈长梭形或多角形, 细胞核呈卵圆形位于中央, 细胞具有长短不等的伪足(图1)。孵育荧光抗体后于荧光镜下可见胞质内发绿色荧光的是FITC标记的 α -SMA, α -SMA与细胞长轴平行且呈纤维细

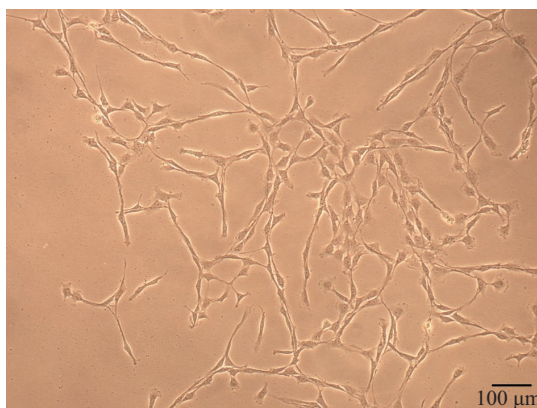


图1 原代大鼠肺动脉平滑肌细胞

Fig.1 Primary rat PASMCs

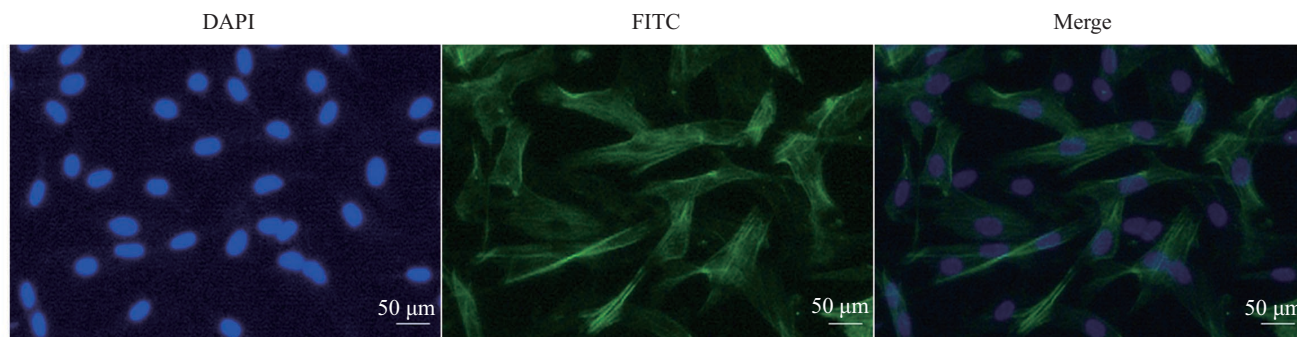


图2 大鼠肺动脉平滑肌细胞免疫荧光图

Fig.2 Immunofluorescence staining of rat PASMCs

丝状;发蓝色荧光的是DAPI标记的细胞核,位于细胞中央呈卵圆形(图2),即可鉴定为PASMCs,约99%的细胞为PASMCs。

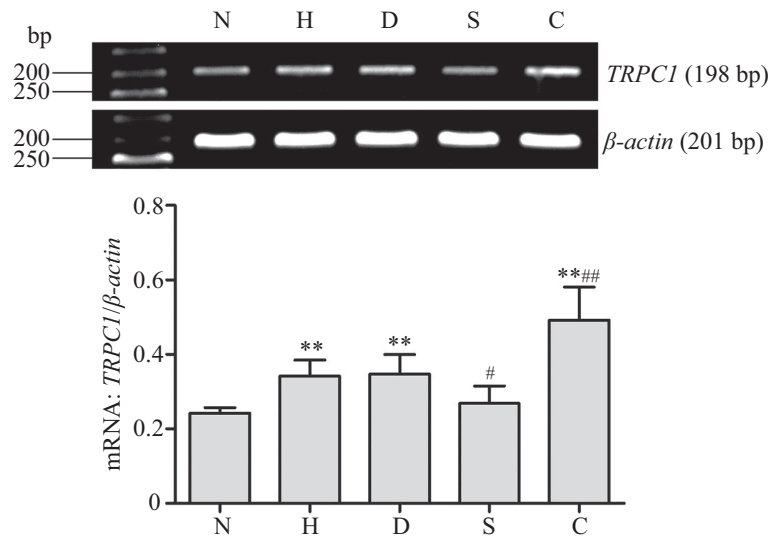
2.2 低氧高二氧化碳对PASMCs中TRPC1/4 mRNA表达水平的影响

低氧高二氧化碳时TRPC1/4 mRNA水平均明显增高($P<0.01$ 、 $P<0.05$)。SKF-96365可使低氧高二氧化碳时TRPC1/4 mRNA水平降低($P<0.05$)。CPA

可促进TRPC1 mRNA的表达($P<0.01$),但对TRPC4无明显影响($P>0.05$)(图3和图4)。

2.3 低氧高二氧化碳对PASMCs中TRPC1/4蛋白质水平的影响

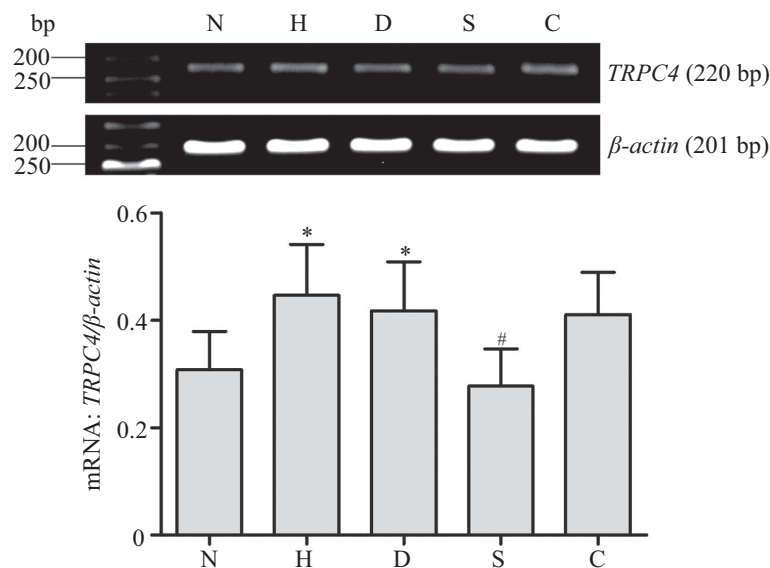
在低氧高二氧化碳条件下,TRPC1/4蛋白质水平明显增高($P<0.05$);使用抑制剂SKF-96365后TRPC1/4蛋白质水平明显降低($P<0.05$ 、 $P<0.01$);C组TRPC1蛋白质水平明显增高($P<0.01$),但TRPC4



** $P<0.01$,与N组比较;# $P<0.05$,## $P<0.01$,与H组比较。

** $P<0.01$ vs N group;# $P<0.05$,## $P<0.01$ vs H group.

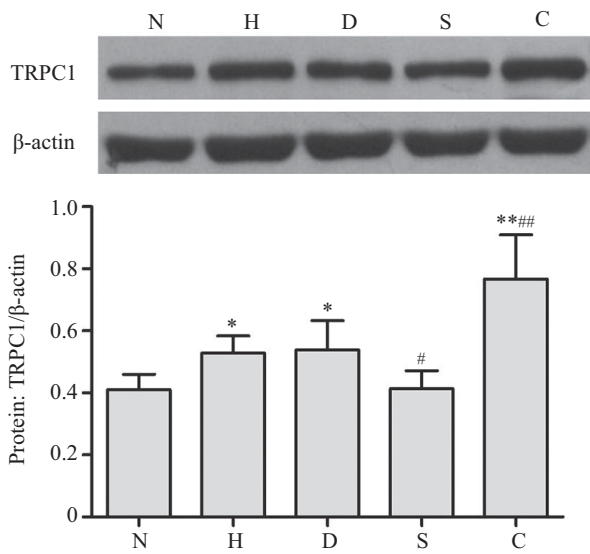
图3 各组TRPC1 mRNA水平
Fig.3 TRPC1 mRNA level in each group



* $P<0.05$,与N组比较;# $P<0.05$,与H组比较。

* $P<0.05$ vs N group;# $P<0.05$ vs H group.

图4 各组TRPC4 mRNA水平
Fig.4 TRPC4 mRNA level in each group

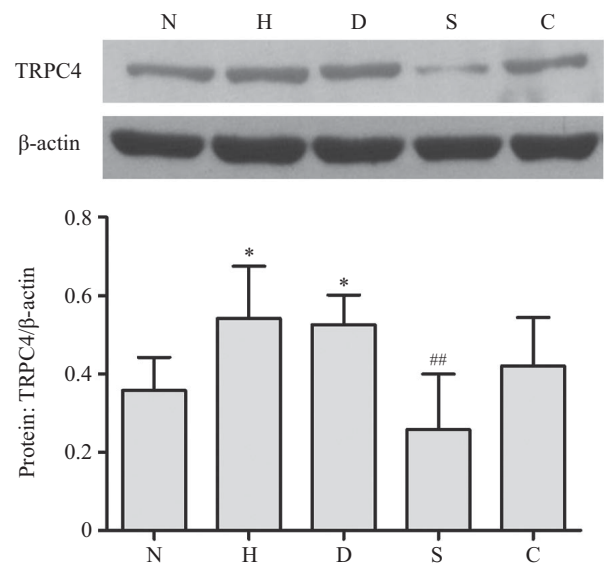


* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与N组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与H组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs N group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs H group.

图5 各组TRPC1蛋白质水平

Fig.5 TRPC1 protein level in each group

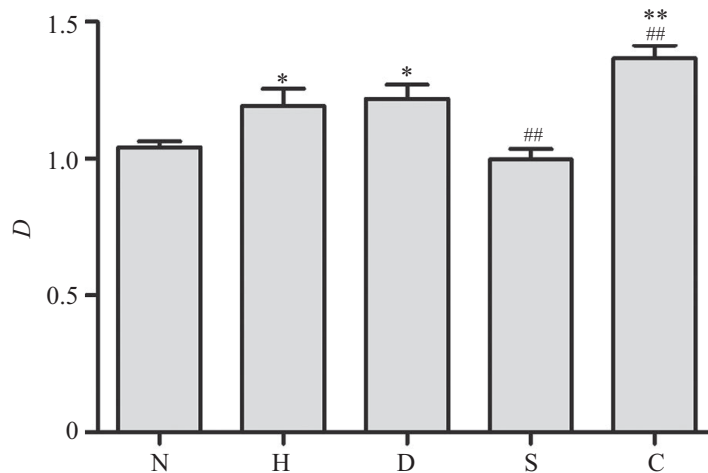


* $P < 0.05$, 与N组比较; ## $P < 0.01$, 与H组比较。

* $P < 0.05$ vs N group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs H group.

图6 各组TRPC4蛋白质水平

Fig.6 TRPC4 protein level in each group



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与N组比较; ## $P < 0.01$, 与H组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs N group; ## $P < 0.01$ vs H group.

图7 各组细胞增殖情况的柱状图

Fig.7 Bar graph showing PASMCS proliferation in each group

蛋白水平无明显变化($P > 0.05$)(图5和图6)。

2.4 低氧高二氧化碳对PASMCS细胞增殖的影响

低氧高二氧化碳可促进PASMCS的增殖($P < 0.05$); 使用TRPC1/4抑制剂SKF-96365后, PASMCS增殖明显被抑制($P < 0.01$), C组细胞增殖增加($P < 0.01$)(图7)。

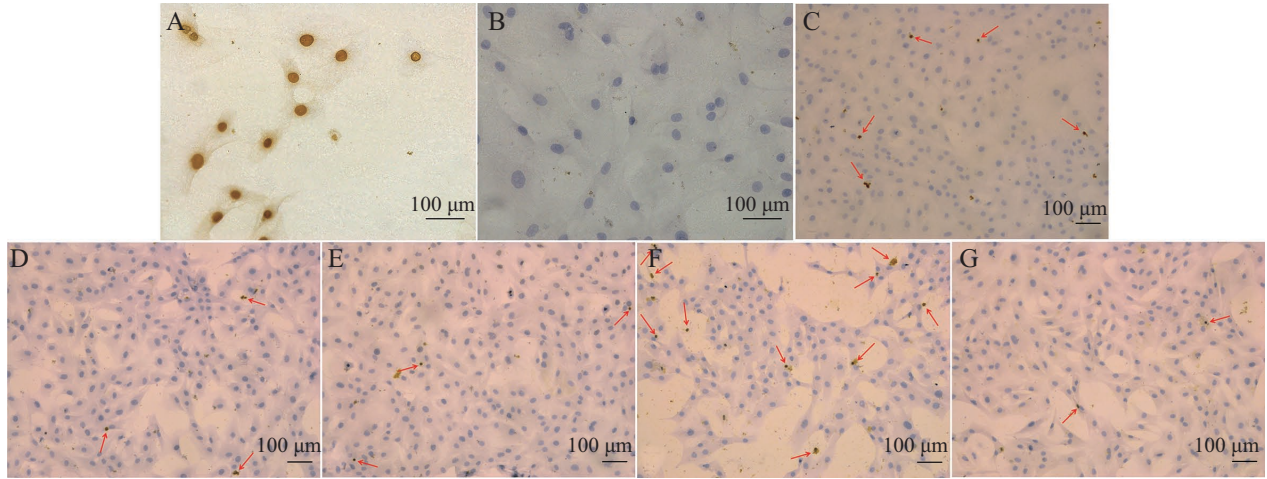
2.5 低氧高二氧化碳对各组细胞凋亡的影响

阳性对照组可见所有细胞核被染成黄褐色(图

8A), 阴性对照组所有细胞核均染成蓝色(图8B)。与N组相比, H组和D组PASMCS凋亡减少($P < 0.05$); H组和D组相比, 细胞增殖变化没有统计学意义($P > 0.05$); 较之H组, S组PASMCS凋亡明显增加($P < 0.01$), C组细胞凋亡减少($P < 0.01$)(图8C~图8G, 图9)。

2.6 细胞内钙离子浓度

用Fura 2-AM孵育细胞后, 于荧光显微镜下可见PASMCS胞质内游离钙离子发出绿色荧光, 细胞

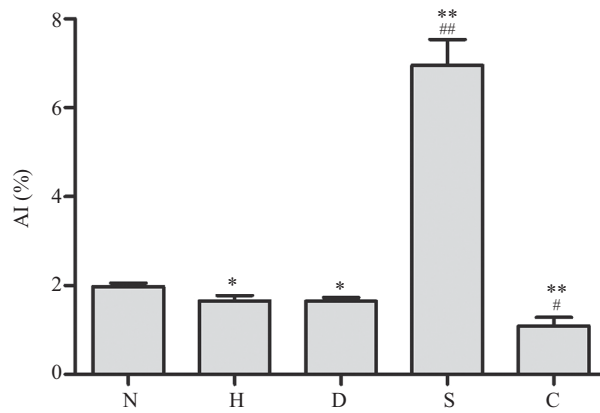


A: 阳性对照组, 均为凋亡细胞; B: 阴性对照组; C: 常氧对照组; D: 低氧高二氧化碳组; E: DMSO对照组; F: TRPC1/4抑制剂SKF-96365组; G: TRPC1/4激动剂CPA组。红色箭头所示处为凋亡细胞。

A: the positive control group; B: the negative control group; C: normoxia group; D: hypoxia and hypercapnia group; E: DMSO control group; F: TRPC1/4 inhibitor SKF-96365 group; G: TRPC1/4 activator CPA group. Red arrowheads indicate apoptotic cells.

图8 各组细胞凋亡的比较

Fig.8 PASMCs cell apoptosis in each group



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与N组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与H组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs N group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs H group.

图9 各组细胞凋亡的柱状图

Fig.9 Bar graph showing PASMCs cell apoptosis in each group

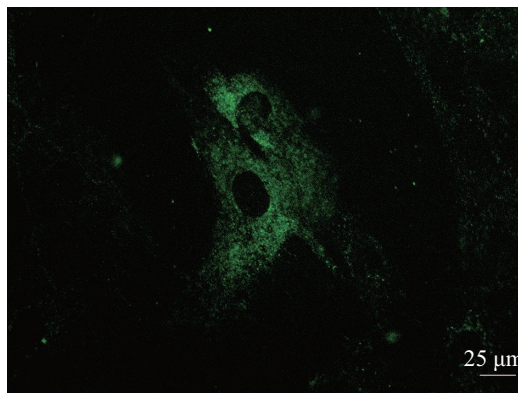
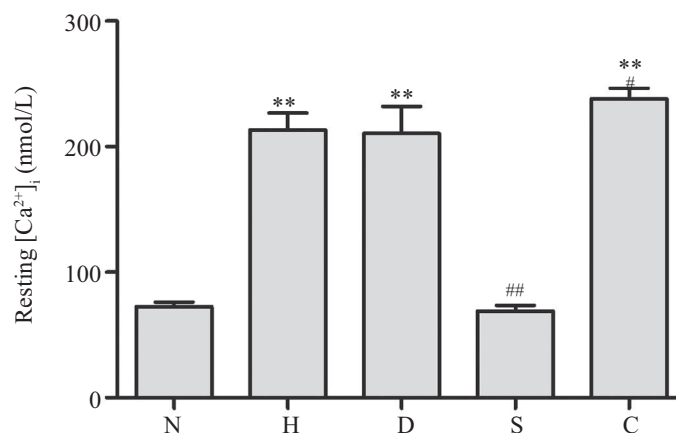


图10 PASMCs细胞内钙离子荧光染色

Fig.10 Fluorescence staining of PASMCs intracellular Ca^{2+}



** $P < 0.01$, 与N组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与H组比较。

** $P < 0.01$ vs N group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs H group.

图11 各组PSMCs细胞钙离子浓度柱状图

Fig.11 Bar graph showing PSMCs intracellular Ca^{2+} concentration in each group

核内钙离子不发荧光,说明此方法检测的是胞质内游离钙离子,而不包括细胞核内的钙离子(图10)。与常氧组相比,低氧高二氧化碳条件下细胞内钙离子浓度明显增加($P < 0.01$)。D组和H组细胞内钙离子浓度变化没有统计学差异($P > 0.05$)。TRPC1/4抑制剂SKF-96365使低氧高二氧化碳时细胞内钙离子浓度明显降低($P < 0.01$)。TRPC1/4激动剂CPA能够使细胞内钙离子浓度增高,明显高于H组($P < 0.05$) (图11)。

3 讨论

尽管以往有研究表明,PSMCs中不表达TRPC4^[15],但本研究发现,TRPC4是有表达的,这和王建等^[16]的研究结果也是一致的。但我们同时也发现,检测TRPC4 mRNA时,循环次数达到40个循环时才有明显的条带;检测TRPC4蛋白质时,需要增加二抗的浓度,才能得到明显的蛋白条带,说明TRPC4基因表达量相对较少。

钙离子作为第二信使,在细胞内发挥着多种作用。胞内钙离子浓度增加可以激发和促进细胞周期,能够使转录因子磷酸化从而促进基因的转录,最终引起PSMCs的增殖。在PSMCs中,一般认为TRPC1和TRPC4构成SOCC^[17-18]。结合本实验结果说明,低氧高二氧化碳情况能够增加TRPC的表达,促进钙离子内流,使PSMCs增殖增加,从而引起肺动脉高压。即低氧高二氧化碳能够通过TRPC-SOCC/ROCC- $[Ca^{2+}]_i$ 通路使PSMCs增殖增

加。

已有研究表明,在低氧小鼠模型中,基因敲除TRPC1能够降低右心室收缩压、动脉的肌化数量以及右心室和肺的重量,从而降低肺动脉重构和PH^[19]。TRPC1和胞内钙离子浓度的降低能够增加Kv1.5,从而减少PSMCs的增殖并促进其凋亡^[20]。基因敲除TRPC1可减轻低氧诱导的PSMCs的迁移,说明TRPC1在低氧诱导的PSMCs的增殖和迁移发挥着重要的作用^[21]。以上实验结果均说明,TRPC1参与了肺血管的重构。在本实验中,我们使用了TRPC1/4的共同抑制剂SKF-96365^[22],结果发现,SKF-96365能够同时降低TRPC1/4基因和蛋白的表达,并抑制PSMCs的增殖促进其凋亡。

TRPC1/4可被钙库耗竭激活,也可用CPA和毒胡萝卜素激活^[23]。本研究发现,CPA可以通过促进TRPC1的表达,使PSMCs增殖增加,而凋亡率降低,说明TRPC1参与了低氧高二氧化碳时PSMCs增殖和凋亡的调节。同时也发现,CPA组TRPC4的表达无明显变化,可能是因为TRPC4翻译后修饰,如泛素化。以往有研究表明,慢性低氧时,PSMCs中TRPC1 mRNA和蛋白质水平会增加,而TRPC4无变化^[13]。但本研究发现,不但TRPC1在低氧高二氧化碳时有所增加,而且TRPC4也有所增加。在野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠中,TRPC1和TRPC4表达均增高^[24];在成骨蛋白4诱导的肺动脉高压模型中,TRPC1/4表达也都有增高^[13]。这说明,在不同的肺动脉高压模型中,TRPC的表达变化并不完全一致,可能是因为不同诱

导因子的作用机制不同。但也有研究表明, TRPC4灭活能够降低恶性肺动脉高压相关的死亡率^[25], 说明TRPC4与肺动脉高压的发生可能也存在着一定的关系。

综上所述, 在低氧高二氧化碳大鼠PASMCS模型中, TRPC1/4的表达都明显增加, 且PASMCS增殖增加和凋亡率减少, 当使用TRPC1/4抑制剂后, PASMCS的增殖被抑制, 而使用TRPC1激动剂后增殖增加, 说明TRPC1在低氧高二氧化碳PASMCS增殖和凋亡中发挥着关键作用, 阻止PASMCS中TRPC蛋白质水平是治疗肺动脉高压的一个新的、有效的下游治疗靶点。

参考文献 (References)

- 1 Wang G, Liu X, Meng L, Liu S, Wang L, Li J, *et al.* Up-regulated lipocalin-2 in pulmonary hypertension involving in pulmonary artery SMC resistance to apoptosis. *Int J Biol Sci* 2014; 10(7): 798-806.
- 2 Mao SZ, Fan XF, Xue F, Chen R, Chen XY, Yuan GS, *et al.* Intermedin modulates hypoxic pulmonary vascular remodeling by inhibiting pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Pulm Pharmacol Ther* 2014; 27(1): 1-9.
- 3 Wang Y, Lu W, Yang K, Wang Y, Zhang J, Jia J, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits pulmonary hypertension targeting store-operated calcium entry. *J Mol Med* 2015; 93(3): 327-42.
- 4 Yamamura A, Yamamura H, Zeifman A, Yuan JX. Activity of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels contributes to regulating receptor- and store-operated Ca entry in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Pulm Circ* 2011; 1(2): 269-79.
- 5 Jiang HN, Zeng B, Zhang Y, Daskoulidou N, Fan H, Qu JM, *et al.* Involvement of TRPC channels in lung cancer cell differentiation and the correlation analysis in human non-small cell lung cancer. *PLoS One* 2013; 8(6): e67637.
- 6 Ariano P, Dalmazzo S, Owsianik G, Nilius B, Lovisollo D. TRPC channels are involved in calcium-dependent migration and proliferation in immortalized GnRH neurons. *Cell Calcium* 2011; 49(6): 387-94.
- 7 Villalta PC, Townsley MI. Transient receptor potential channels and regulation of lung endothelial permeability. *Pulm Circ* 2013; 3(4): 802-15.
- 8 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.
- 9 Zhang Y, Lu W, Yang K, Xu L, Lai N, Tian L, *et al.* Bone morphogenetic protein 2 decreases TRPC expression, store-operated Ca²⁺ entry, and basal [Ca²⁺]_i in rat distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 304(9): C833-43.
- 10 Ikeda K, Nakajima T, Yamamoto Y, Takano N, Tanaka T, Kikuchi H, *et al.* Roles of transient receptor potential canonical (TRPC) channels and reverse-mode Na⁺/Ca²⁺ exchanger on cell proliferation in human cardiac fibroblasts: Effects of transforming growth factor β1. *Cell Calcium* 2013; 54(3): 213-25.
- 11 Ooi H, Cadogan E, Sweeney M, Howell K, O'Regan RG, McLoughlin P. Chronic hypercapnia inhibits hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278(2): H331-8.
- 12 Li X, Lu W, Fu X, Zhang Y, Yang K, Zhong N, *et al.* BMP4 increases canonical transient receptor potential protein expression by activating p38 MAPK and ERK1/2 signaling pathways in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 49(2): 212-20.
- 13 Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2006; 98(12): 1528-37.
- 14 Xu D, Niu W, Luo Y, Zhang B, Liu M, Dong H, *et al.* Endogenous estrogen attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension by inhibiting pulmonary arterial vasoconstriction and pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation. *Int J Med Sci* 2013; 10(6): 771-81.
- 15 Lin MJ, Leung GP, Zhang WM, Yang XR, YiP KP, Tse CM, *et al.* Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: A novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circ Res* 2004; 95(5): 496-505.
- 16 Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, *et al.* Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(38): 13861-6.
- 17 Lu W, Ran P, Zhang D, Lai N, Zhong N, Wang J. Bone morphogenetic protein 4 enhances canonical transient receptor potential expression, store-operated Ca²⁺ entry, and basal [Ca²⁺]_i in rat distal pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 299(6): C1370-8.
- 18 Sundivakkam PC, Freichel M, Singh V, Yuan JP, Vogel SM, Flockerzi V, *et al.* The Ca²⁺ sensor stromal interaction molecule 1 (STIM1) is necessary and sufficient for the store-operated Ca²⁺ entry function of transient receptor potential canonical (TRPC) 1 and 4 channels in endothelial cells. *Mol Pharmacol* 2012; 81(4): 510-26.
- 19 Sun CK, Zhen YY, Lu HI, Sung PH, Chang LT, Tsai TH, *et al.* Reducing TRPC1 expression through liposome-mediated siRNA delivery markedly attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in a murine model. *Stem Cells Int* 2014; 2014: 316214.
- 20 Dai F, Mao Z, Xia J, Zhu S, Wu Z. Fluoxetine protects against big endothelin-1 induced anti-apoptosis by rescuing Kv1.5 channels in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Yonsei Med J* 2012; 53(4): 842-8.
- 21 Wang J, Jiang Q, Wan L, Yang K, Zhang Y, Chen Y, *et al.* Sodium tanshinone IIA sulfonate inhibits canonical transient receptor potential expression in pulmonary arterial smooth muscle from pulmonary hypertensive rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013; 48(1): 125-34.
- 22 Maier T, Follmann M, Hessler G, Kleemann HW, Hachtel S, Fuchs B, *et al.* Discovery and pharmacological characterization

- of a novel potent inhibitor of diacylglycerol-sensitive TRPC cation channels. *Br J Pharmacol* 2015; 172(14): 3650-60.
- 23 Yang XR, Lin MJ, Sham JS. Physiological functions of transient receptor potential channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol* 2010; 661: 109-22.
- 24 Liu XR, Zhang MF, Yang N, Liu Q, Wang RX, Cao YN, *et al.* Enhanced store-operated Ca^{2+} entry and TRPC channel expression in pulmonary arteries of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Cell Physiol* 2012; 302(1): C77-87.
- 25 Alzoubi A, Almalouf P, Toba M, O'Neill K, Qian X, Francis M, *et al.* TRPC4 inactivation confers a survival benefit in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol* 2013; 183(6): 1779-88.