

网络出版时间: 2019-9-3 17:25 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190830.1433.002.html

◇基础医学研究◇

TRPC1/C4/C5 通道调节胸主动脉平滑肌收缩作用研究

陈良余^{1,2}, 毛雨^{1,2}, 周扬^{1,2}, 费亮^{1,2}, 王健^{1,2}, 周利民^{1,2}, 范涛涛³, 沈兵³

摘要 目的 研究胸主动脉平滑肌瞬时受体电位离子通道 (TRPC) 家族 C1/C4/C5 三个亚型与大电导钙激活钾通道 (BK_{Ca}) 蛋白相互作用差异, 阐明 TRPC1/C4/C5 通道在激动剂引起的胸主动脉平滑肌收缩中的作用。方法 采用瞬时转染小干扰 RNA (siRNA) 敲低昆明小鼠胸主动脉平滑肌组织中 TRPC1、TRPC4、TRPC5 蛋白表达并用免疫蛋白印迹实验检测其表达水平改变情况; 通过离体血管实验检测内皮素 1 引起的血管收缩改变; 采用免疫共沉淀实验检测 TRPC1/C4/C5 通道蛋白与 BK_{Ca} 蛋白相互作用情况。结果 瞬时转染特异性 TRPC1/C4/C5 siRNA 显著敲低昆明小鼠胸主动脉平滑肌中 TRPC1/C4/C5 蛋白表达; 在内皮素 1 引起的胸主动脉环收缩中, TRPC1 或 TRPC5 siRNA 处理组较对照组血管收缩显著增强, 但 TRPC4 siRNA 处理组较对照组血管收缩显著减弱; 免疫共沉淀结果显示, TRPC1 可以共沉淀 TRPC4、TRPC5 和 BK_{Ca}, 同时, TRPC4 可以共沉淀 TRPC1、TRPC5 可以共沉淀 TRPC1、BK_{Ca}, 但 TRPC4 不能共沉淀 BK_{Ca}。结论 TRPC1 可以与 TRPC4 或 TRPC5 蛋白在昆明小鼠胸主动脉平滑肌中组成异聚体通道, 并且 TRPC1-TRPC5 两种蛋白组成的异聚体通道和 BK_{Ca} 形成钙信号复合物调节血管平滑肌收缩。

关键词 大电导钙激活钾通道; 瞬时受体电位通道; 血管平滑肌; 内皮素 1; TRPC

中图分类号 Q 412

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)10-1501-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.10.001

大电导钙激活钾通道 (big-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, BK_{Ca}) 是电压门控的钾离子通道超家族成员之一, 表达于神经元细胞、分泌细胞以及

平滑肌等细胞^[1], 是调节钙离子进入细胞内的重要反馈机制^[2-5]。

已知包括机械力、氧化应激及细胞内信号分子等在内的多种因素可以调节经典瞬时受体电位离子通道 (transient receptor potential channel, subfamily C, TRPC) 的激活^[6]。TRPC1 是最早被克隆的哺乳类瞬时受体电位通道, 广泛参与钙依赖的细胞分泌和收缩过程; TRPC4 参与血管收缩、微血管通透等功能^[7]; TRPC5 参与血管收缩、血小板聚集和减压神经感受血压等功能^[8]。但 TRPC1、TRPC4、TRPC5 形成的异聚体通道对胸主动脉平滑肌收缩的影响尚未阐明^[9]。该研究通过检测 TRPC1/C4/C5 与 BK_{Ca} 相互作用, 阐明 TRPC1/C4/C5 通道在调节胸主动脉平滑肌收缩中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 内皮素 1 购于英国 Tocris Bioscience; TRPC1、TRPC4、TRPC5、BK_{Ca} 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; Protein A 磁珠购于 Millipore 公司; Goat-Anti-Rabbit IgG 二抗购自上海生工公司; 脂质体 3000 (Lipofectamine 3000) 购于美国 Invitrogen 公司; Krebs-Henseleit 生理缓冲液配方 (mmol/L): NaCl 118, CaCl₂ 2.5, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ · 7H₂O 1.2, NaHCO₃ 25.2 和 glucose 11.1; 高钾溶液为将 Krebs 生理缓冲液中的 NaCl 等摩尔替换为 KCl, 最终使 KCl 浓度为 60 mmol/L; DMT myograph 微血管张力记录系统 (model 610M, Danish Myo Technology) 购于丹麦 Aarhus 公司; TRPC1/C4/C5 小干扰 RNA (siRNA) 和对照 siRNA (scrambled siRNA) 购自江苏百奥迈科生物技术有限公司。

1.1.2 实验动物 清洁级昆明种雄性小鼠, 6 周龄, 体质量 20~25 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 正常进食饮水, 饲养室温维持 (22 ± 1) °C。

1.2 方法

1.2.1 血管环的制备 将小鼠用 CO₂ 窒息处死,

2019-07-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81570403); 安徽省“十三五”医疗卫生重点专科建设项目; 滁州市科技指导性计划项目 (编号: 201507)

作者单位: ¹安徽医科大学滁州临床学院心内科, 滁州 239000;²滁州市第一人民医院心内科, 滁州 239000;³安徽医科大学, 合肥 230032

作者简介: 陈良余, 男, 副主任医师, 硕士研究生;

沈兵, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者; E-mail: shenbing

@ahmu.edu.cn

迅速破开胸腔,小心取出胸主动脉,放入冰冷的 Krebs 缓冲液并通有混合气体(95% O₂ 和 5% CO₂)以维持溶液 pH 在 7.4。在解剖显微镜下,采用精密手术剪刀快速、仔细地剥去血管外脂肪等组织,再用粗糙的细竹签小心去除血管内皮层,然后将血管沿纵轴分段为 2 mm 长的血管环。

1.2.2 siRNA 转染 将各组胸主动脉环置于 12 孔细胞培养板中,每孔加入 0.9 ml DMEM 培养基。对照组:取两支无菌 EP 管,分别做好标记,其中一管加入 1.5 μl Lipofectamine 3000 和 50 μl OPTI-MEM 无血清培养基;另一管中加入 10 μl Scrambled siRNA 和 50 μl OPTI-MEM 无血清培养基;用移液枪分别混匀室温静置 5 min。随后将两管液体混合为一管,用移液枪充分混匀后室温静置 10 min;实验组将 Scrambled siRNA 替换为 TRPC1/4/5 siRNA。将 Lipofectamine 3000 包裹好的 siRNA 加入已提前放入一段小鼠胸主动脉的 12 孔板中,将细胞培养板放入细胞培养箱内继续孵育 24 h 后进行后续实验。

1.2.3 离体胸主动脉环张力实验 将两根细金属丝穿入血管环,把其中的一根金属丝固定在张力换能器上,另一根金属丝固定在可调节距离的螺杆上,在浴槽内注入 5 ml Krebs 液,通入持续的混合气体(95% O₂ 和 5% CO₂);调节张力换能器,将血管施加 500 mg 前负荷,运用 DMT myograph 微血管张力记录系统检测血管张力,在 Krebs 液中平衡 60 min,每隔 15 min 更换一次新鲜的 Krebs 液,待血管张力基线稳定后,加入 60 mmol/L 高钾溶液预激血管,待收缩达峰值后,用 Krebs 冲洗 3 次,再平衡后累积浓度加入 10⁻⁹ ~ 10⁻⁷ mol/L 内皮素 1,分析张力变化曲线并进行统计分析。

1.2.4 免疫共沉淀 将 siRNA 处理后的胸主动脉在冰上研磨、裂解,转入 1.5 ml 离心管中,置于冰上 30 ~ 60 min 4 °C 离心后取上清液。不同样品中分别加入抗 TRPC1/C4/C5 的抗体和不同的互沉淀抗体进行免疫共沉淀,4 °C 混合 2 h 后分别加入预处理好的 50 μl protein A 磁珠过夜;第 2 天将样品置于磁力架上吸附弃上清液。再用缓冲液清洗沉淀 3 次,加入 5 × 上样缓冲液 50 μl 并煮沸,收集上清液后进行后续的 Western blot 实验。

1.2.5 Western blot 将免疫共沉淀收集的蛋白采用 SDS-PAGE 电泳,再以 0.2 A 恒流将蛋白转入 PVDF 膜,用 5% 脱脂牛奶室温封闭膜 1 h 后 4 °C 孵育一抗。第 2 天以 PBST 洗膜 3 次,再将含有蛋白的 PVDF 膜室温孵育辣根过氧化物标记的二抗 1 h,

PBST 再漂洗 3 次,在化学发光检测仪上采集图像。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组之间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TRPC1/C4/C5 siRNA 分别敲低其蛋白表达

将对照 siRNA(Scrambled siRNA)和 TRPC1/C4/C5 siRNA 分别处理的胸主动脉组织予以蛋白电泳检测,结果显示 TRPC1/C4/C5 siRNA 分别显著抑制了 TRPC1/C4/C5 蛋白的表达,见图 1。Scrambled siRNA vs TRPC1 siRNA: (124.61 ± 18.20) % vs (91.34 ± 23.26) %, Scrambled siRNA vs TRPC4 siRNA: (148.90 ± 20.56) % vs (99.92 ± 14.12) %, Scrambled siRNA vs TRPC5 siRNA: (182.72 ± 13.11) % vs (141.76 ± 17.83) %。

2.2 TRPC1/C4/C5 siRNA 对高钾引起的胸主动脉收缩的影响

将对照 siRNA(scrambled siRNA)和 TRPC1/C4/C5 siRNA 分别处理的胸主动脉环在 Krebs 缓冲液平衡稳定后,采用高钾溶液收缩血管,结果显示,对照组和处理组血管收缩差异无显著性, Scrambled siRNA vs TRPC1 siRNA: (5.07 ± 0.68) vs (5.07 ± 0.72) mN, Scrambled siRNA vs TRPC4 siRNA: (4.55 ± 0.58) vs (4.69 ± 1.05) mN, Scrambled siRNA vs TRPC5 siRNA: (5.03 ± 0.64) vs (5.32 ± 0.49) mN。

2.3 TRPC1/C4/C5 siRNA 对内皮素 1 引起的胸主动脉收缩的影响

将对照 siRNA(Scrambled siRNA)和 TRPC1/C4/C5 siRNA 分别处理的胸主动脉环在 Krebs 缓冲液平衡稳定后,采用内皮素 1 收缩血管。结果见图 2 所示,内皮素 1 引起的血管收缩效应在转染 TRPC1/C5 siRNA 血管中显著增强,而在转染 TRPC4 siRNA 血管中显著减弱。

2.4 TRPC1/C4/C5 与 BK_{Ca} 蛋白的相互作用

已知平滑肌细胞内钙内流受细胞膜上 BK_{Ca} 蛋白的负反馈调节,TRPC 通道可以介导细胞内钙离子内流,并调节 BK_{Ca} 的活动。为了进一步检测 TRPC1、TRPC4 及 TRPC5 蛋白与 BK_{Ca} 之间的相互关系,本研究借助免疫共沉淀实验进行验证。结果显示 TRPC1、TRPC5 蛋白与 BK_{Ca} 存在相互作用(图 3A、C),而 TRPC4 蛋白与 BK_{Ca} 之间不存在相互作用(图 3A、C),并且 TRPC1 与 TRPC4、TRPC5 存在相互作用(图 3)。

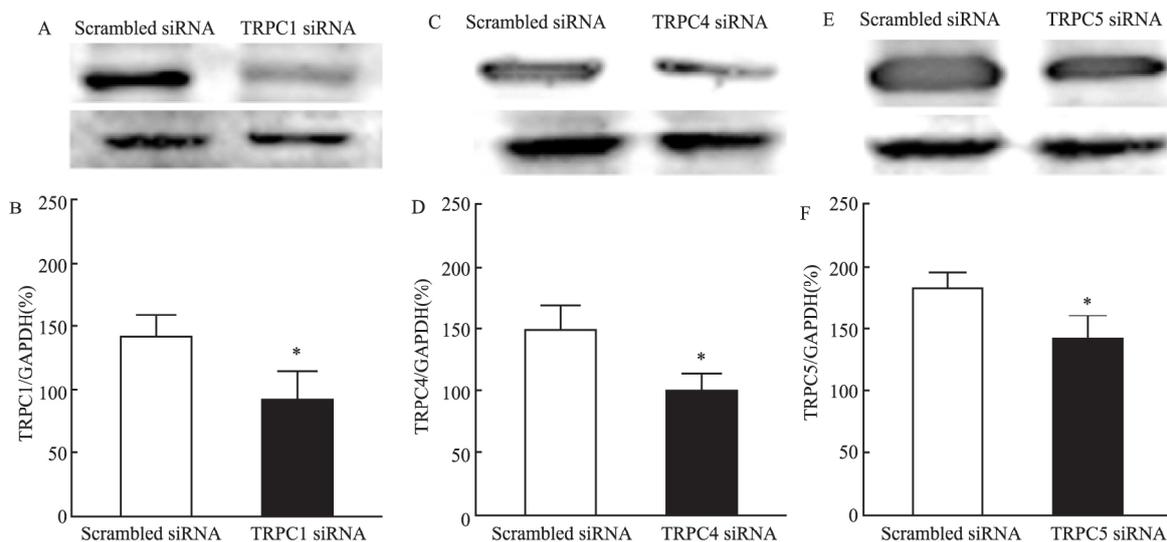


图1 TRPC1/C4/C5 siRNA 对蛋白表达的影响

A、B: TRPC1 蛋白表达水平; C、D: TRPC4 蛋白表达水平; E、F: TRPC5 蛋白表达水平; 与 Scrambled siRNA 组比较: * $P < 0.05$

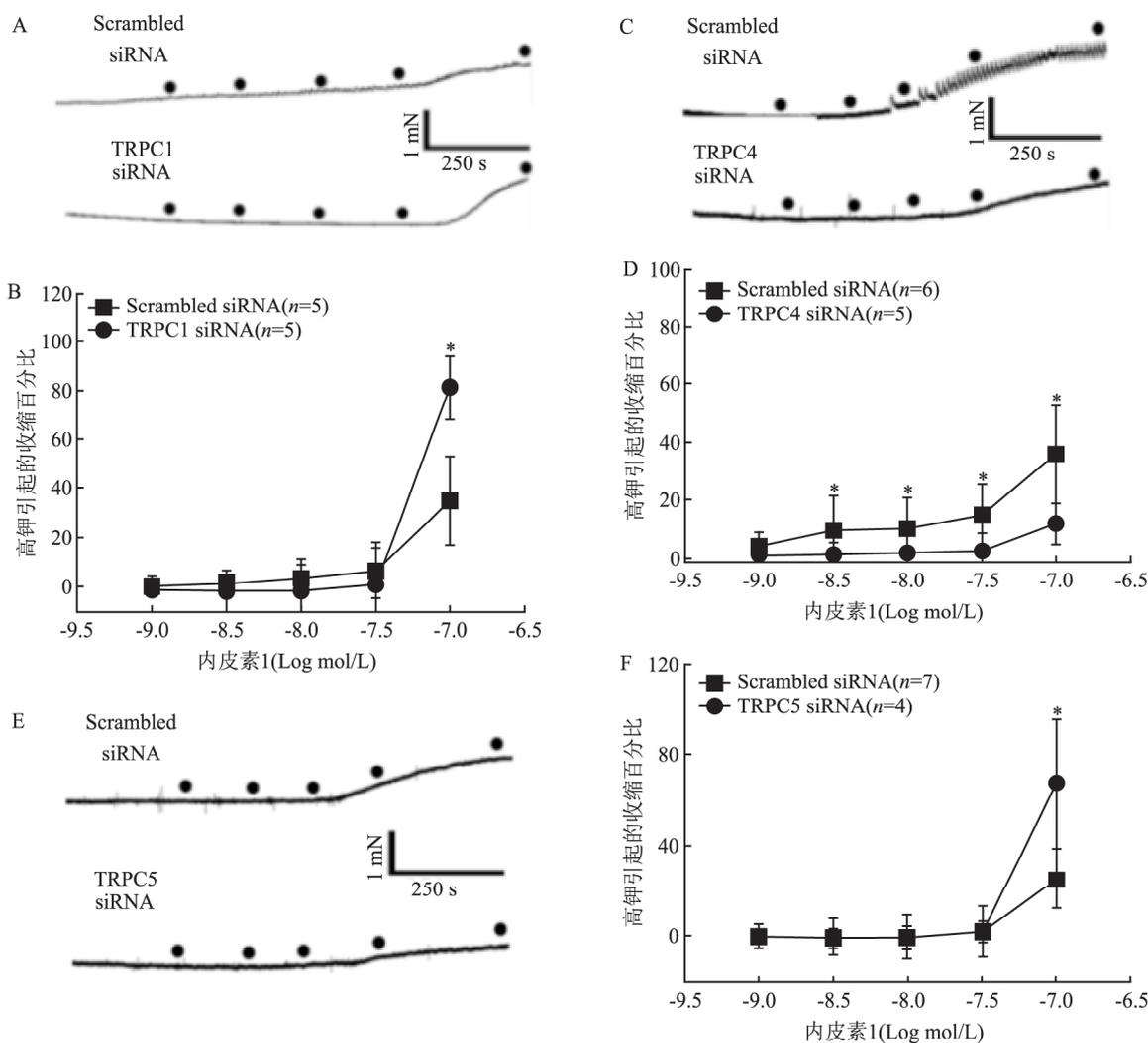


图2 TRPC1/C4/C5 siRNA 对内皮素1引起的小鼠胸主动脉收缩的影响

A、B: TRPC1 和 Scrambled siRNA; C、D: TRPC4 和 Scrambled siRNA; E、F: TRPC5 和 Scrambled siRNA 组; 与 Scrambled siRNA 组比较: * $P < 0.05$

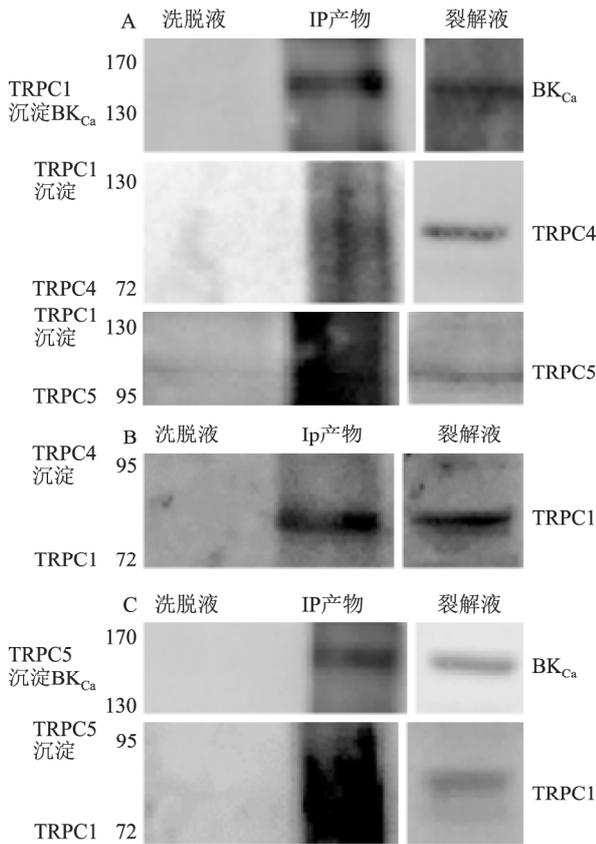


图3 TRPC1、TRPC4、TRPC5 和 BK_{Ca} 蛋白相互作用

裂解液: 小鼠胸主动脉平滑肌细胞裂解液; IP 产物: 免疫共沉淀产物

3 讨论

钙离子是细胞体内重要的第二信使^[3],参与调控有机体内众多生物学过程,同时细胞内许多生理功能如肌肉收缩、激素分泌、细胞增殖、基因表达等^[10-14]的调节也与钙离子紧密相关。电压依赖的钙通道(voltage-dependent Ca²⁺ channel, VDCC)是钙通道之一,其介导的细胞外钙内流能够调节平滑肌细胞的收缩,但VDCC的激活又与细胞膜电位的变化紧密相关。此外,当细胞受到刺激后,细胞内钙离子浓度显著增加,BK_{Ca}可通过负反馈的方式调节细胞膜电位并调节VDCC的活动。根据前期实验结果,已知TRPC1、BK_{Ca}蛋白形成的信号复合物以负反馈的方式调节激动剂介导的血管平滑肌收缩^[15]。同时,TRPC1、TRPC4、TRPC5蛋白通常会聚集在一起,在细胞膜上形成复合通道,从而介导受体激活引起的钙内流。

为了进一步确认TRPC1/C4/C5三种钙通道蛋白之间的关系,本研究借助免疫共沉淀实验,检测其两两之间的相互作用。实验结果表明TRPC1可以

共沉淀TRPC4、TRPC5蛋白,表明TRPC1可与TRPC4、TRPC5之间存在相互作用,并形成异聚体通道;另一方面,TRPC1和TRPC5可以共沉淀BK_{Ca},但TRPC4不能共沉淀BK_{Ca},说明TRPC1和TRPC5可以和BK_{Ca}形成信号复合物,但TRPC4不能与BK_{Ca}形成信号复合物。为了进一步深入探讨这两种信号系统对血管功能的影响,本研究采用内皮素诱导胸主动脉收缩,并检测TRPC1-TRPC4和TRPC1-TRPC5通道在内皮素1引起的胸主动脉收缩中的作用。同时,本研究通过瞬时转染TRPC1、TRPC4、TRPC5特异性siRNA分别抑制TRPC1/C4/C5蛋白的表达,结果表明,特异性敲低TRPC1/C5蛋白后内皮素1引起的血管收缩显著增强,而特异性敲低TRPC4蛋白表达后内皮素1引起的血管收缩显著抑制。

由此推测内皮素激动其受体后,激活了下游的TRPC1-TRPC5蛋白形成异聚体通道并介导细胞外钙离子内流,进而激活与之相互作用的BK_{Ca}通道,BK_{Ca}通道随后介导细胞内K⁺外流,使细胞膜超极化并抑制VDCC,从而负反馈抑制内皮素1引起的血管平滑肌收缩。特异性siRNA敲低TRPC1或TRPC5蛋白表达,使得细胞膜上TRPC1-TRPC5异聚体通道表达减少,导致BK_{Ca}通道激活受阻,从而使VDCC活性增强而介导更多的外钙内流,使血管收缩增强。另一方面,TRPC4不能与BK_{Ca}形成信号复合物,说明TRPC1-TRPC4异聚体通道介导的钙内流不能激活BK_{Ca}通道并形成负反馈调节机制,而相反作为受体依赖的钙通道介导钙内流增强平滑肌收缩。当TRPC4被敲低后,TRPC1-TRPC4异聚体通道介导的钙内流将减弱,而TRPC1-TRPC5异聚体通道介导的钙内流可以激活BK_{Ca}并引起细胞膜超极化,抑制VDCC,最终导致血管收缩减弱。

参考文献

- [1] Contreras G F, Castillo K, Enrique N, et al. A BK (Slo1) channel journey from molecule to physiology [J]. *Channels (Austin, Tex.)*, 2013, 7(6): 442-58.
- [2] Jaggar J H, Porter V A, Lederer W J, et al. Calcium sparks in smooth muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000, 278(2): C235-56.
- [3] Imaizumi Y, Ohi Y, Yamamura H, et al. Ca²⁺ spark as a regulator of ion channel activity [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1999, 80(1): 1-8.
- [4] Berridge M J, Bootman M D, Roderick H L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(7): 517-29.

- [5] Hoshi T, Pantazis A, Olcese R. Transduction of voltage and Ca^{2+} signals by Slo1 BK channels [J]. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 2013, 28(3): 172–89.
- [6] 殷欣, 孙轶华. 瞬时受体电位 C 通道研究进展 [J]. *检验医学*, 2013, 28(6): 544–7.
- [7] 潘雯, 张仰明, 吕伟, 等. 瞬时感受器电位 C4 离子通道及其调节剂的研究进展 [J]. *生命的化学*, 2015, 35(4): 483–9.
- [8] Lau O C, Shen B, Wong C O, et al. TRPC5 channels participate in pressure-sensing in aortic baroreceptors [J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 11947.
- [9] 濮江沁, 张代民. 大电导钙激活钾通道调节血管平滑肌的研究进展 [J]. *中华高血压杂志*, 2016, 24(1): 26–9.
- [10] Feske S. Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2011, 1238: 74–90.
- [11] Redondo P C, Rosado J A. Store-operated calcium entry: unveiling the calcium handling signalplex [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2015, 316: 183–226.
- [12] Roos J, DiGregorio P J, Yeromin A V, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca^{2+} channel function [J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(3): 435–45.
- [13] Zhang S L, Yu Y, Roos J, et al. STIM1 is a Ca^{2+} sensor that activates CRAC channels and migrates from the Ca^{2+} store to the plasma membrane [J]. *Nature*, 2005, 437(7060): 902–5.
- [14] Feske S, Gwack Y, Prakriya M, et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 179–85.
- [15] Kwan H Y, Shen B, Ma X, et al. TRPC1 associates with BK_{Ca} channel to form a signal complex in vascular smooth muscle cells [J]. *Circ Res*, 2009, 104(5): 670–8.

Effects of TRPC1/C4/C5 channel on the contraction of smooth muscle of thoracic artery

Chen Liangyu^{1,2}, Mao Yu^{1,2}, Zhou Yang^{1,2}, et al

(¹Dept of Cardiology, The Clinical College of Anhui Medical University, Chuzhou 239000;

²Dept of Cardiology, The First People's Hospital of Chuzhou, Chuzhou 239000)

Abstract Objective To study the different interactions between the three C1/C4/C5 subtypes of the TRPC family and the big conductance Ca^{2+} -activated potassium channel (BK_{Ca}) proteins in thoracic aortic smooth muscle, and to elucidate the role of TRPC1/C4/C5 channel in the agonist-induced contraction of thoracic aortic smooth muscle.

Methods Transient transfection of small interference RNA (siRNA) was used to knockdown TRPC1, TRPC4, TRPC5 expressions in smooth muscle tissue of thoracic aorta of Kunming mice. The expression levels were detected by Western blot. The vasoconstriction induced by endothelin 1 was detected by an isolated blood vessel tension measurement. The interaction between TRPC1/C4/C5 channel protein and BK_{Ca} protein was detected by immunoprecipitation. **Results** TRPC1/C4/C5 siRNA transfection significantly decreased TRPC1/C4/C5 protein expression in thoracic aortic smooth muscle of Kunming mice. In the endothelin-1-induced contraction of the thoracic aortic ring, the vasoconstriction was significantly increased in the TRPC1 or TRPC5 siRNA treatment group compared to the control group, but the vasoconstriction was significantly decreased in the TRPC4 siRNA treatment group compared to the control group. The results of immunoprecipitation showed that TRPC1 co-precipitated TRPC4, TRPC5 and BK_{Ca} ; TRPC4 co-precipitated TRPC1; TRPC5 co-precipitated TRPC1, BK_{Ca} ; but TRPC4 did not co-precipitate BK_{Ca} . **Conclusion** In mouse thoracic aortic smooth muscle, TRPC1 can form heteropolymer channels with TRPC4 or TRPC5. TRPC1-TRPC5 heteropolymer channels interact with BK_{Ca} to form Ca^{2+} signal complex to regulate vascular smooth muscle contraction.

Key words big-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel; transient receptor potential channel; vascular smooth muscle; endothelin 1; TRPC