

网络出版时间:2016-5-9 15:43:10 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160509.1543.002.html>

◇基础医学研究◇

TRPV4-SK_{Ca} 在老年大鼠气管平滑肌中改变及对其收缩的影响

申永刚¹, 尹胜², 蒋森², 丁圣刚³, 吕正梅¹, 沈兵², 杜鹃²

摘要 目的 阐明瞬时受体电位离子通道家族(TRP)中香草素受体亚家族(TRPV)成员TRPV4和小电导钙激活钾通道3(SK3)复合物对老年大鼠气管平滑肌收缩的影响。方法

运用离体气管张力实验,观察高钾、卡巴胆碱对年轻、老年大鼠气管收缩的影响,以及瞬时受体电位离子通道TRPV4特异性激动剂和抑制剂对卡巴胆碱引起的气管收缩的影响;运用Western blot法检测TRPV4和SK3在年轻、老年大鼠气管平滑肌上表达量的变化。结果 与年轻大鼠比较,老年大鼠高钾引起的气管收缩没有显著改变,但卡巴胆碱引起的收缩显著增强,且TRPV4激动剂GSK引起的舒张反应显著降低;两组大鼠用TRPV4阻断剂HC或RN1734预处理后,GSK引起的舒张反应均被显著阻断;Western blot结果显示,与年轻大鼠比较,老年大鼠气管平滑肌组织TRPV4表达显著升高,SK3表达却显著降低。结论 TRPV4-SK3信号复合物在老年大鼠气管平滑肌表达改变可能与老年大鼠气管舒张效应减弱有密切关系。

关键词 瞬时受体电位离子通道香草素受体4;小电导钙激活钾通道;老年大鼠;气管平滑肌

中图分类号 Q 412

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)06-0765-04

支气管哮喘在临床常见、多发,是一种由多种细胞(如嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、平滑肌细胞等)参与的气道慢性炎症性疾病,主要特征有气道慢性炎症、气道高反应和气道重塑^[1]。其发病率、病死率在我国居高不下,且呈逐年上升趋势。尤其是老年性支气管哮喘,症状更严重,对平喘药物反应差,预后差,病死率高^[2]。而TRPV4是瞬时受体电位离子通道家族(transient receptor potential, TRP)中香

草素受体亚家族(transient receptor potential vanilloid, TRPV)成员之一,参与气管平滑肌收缩的调节^[3]。TRPV4在老年大鼠气管上的表达与作用的研究尚鲜有报道。该实验通过阐明TRPV4在老年大鼠气管平滑肌表达量的改变和对气管收缩功能的影响,探索老年支气管哮喘发病新机制和治疗的新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 卡巴胆碱(carbachol)、GSK1016790A(GSK)、HC067047(HC)和RN1734购自美国Sigma公司;抗TRPV4抗体、抗小电导钙激活钾通道三型(SK3)抗体和抗 β -tubulin抗体购自美国Santa Cruz公司;二抗羊抗兔IgG购自中国Biosharp公司;克氏液(NaCl 118 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、KCl 4.7 mmol/L、KH₂PO₄ 1.2 mmol/L、MgSO₄·7H₂O 1.2 mmol/L、NaHCO₃ 25.2 mmol/L、glucose 11.1 mmol/L);高钾溶液(NaCl 58 mmol/L、KCl 60 mmol/L、CaCl₂ 2.5 mmol/L、KH₂PO₄ 1.2 mmol/L、MgSO₄·7H₂O 1.2 mmol/L、NaHCO₃ 25.2 mmol/L、glucose 11.1 mmol/L)。

1.1.2 实验动物 昆明种老年大鼠22月龄,年轻大鼠3月龄(清洁级),由安徽医科大学实验动物中心提供。室温维持(22±1)°C,正常进食饮水。

1.2 方法

1.2.1 气管环的制备 用CO₂窒息法处死大鼠,立即解剖大鼠取出喉部以下的主支气管,并及时放入提前备好的通有混合气体(95% O₂、5% CO₂)的克氏液中。在解剖显微镜下,使用眼科剪和手术镊尽快轻柔地将气管外周结缔组织去除干净,再用粗糙的金属丝谨慎去除气管内皮,避免损伤气管。最后沿气管纵轴将其剪成长约2 mm的气管环。

1.2.2 离体气管张力实验 将气管环悬挂于张力换能器上并置于通有混合气体(95% O₂、5% CO₂)、含有5 ml克氏液的浴槽内;调节好BL-420S生物机能信号记录系统各项参数,并给予气管环1 g前负

2016-02-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371284)

作者单位:安徽医科大学基础医学院¹组织学与胚胎学教研室、²生理学教研室,合肥 230032³安徽医科大学第一附属医院儿科,合肥 230022

作者简介:申永刚,男,硕士研究生;

吕正梅,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:lvzm99@126.com;

沈兵,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:shenbing@ahmu.edu.cn

荷。测定张力信号之前,需要先在克氏液中平衡 40 ~ 60 min,每隔 15 min 更换 1 次克氏液。待基线趋于稳定后,用 60 mmol/L 的高钾溶液收缩气管。收缩气管后,用克氏液冲洗 3 次,每次 3 min,然后再休息 30 min。之后加入累积浓度的卡巴胆碱,观察收缩效应;或用 1 μmol/L 卡巴胆碱预收缩 5 min 后,加入不同浓度舒张剂,观察量效关系。

1.2.3 Western blot 实验 将气管组织在冰上研磨,采用适当蛋白裂解液提取蛋白样品,然后 4 °C 离心取上清液,进行 SDS-PAGE 电泳,再在 200 mA 恒流下将蛋白从胶转移到硝酸纤维素膜上,经 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,分别与特异性抗体:抗 TRPV4、SK3 和 β-tubulin 内参孵育过夜,第 2 天洗去一抗后再和酶标二抗结合,经过漂洗后加入特异性化学发光底物显色液,再曝光并采集图像。

1.3 统计学处理 运用 Sigma plot 12.5 软件分析数据,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行 *t* 检验或多因素方差分析。

2 结果

2.1 年龄对高钾溶液引起的气管收缩的影响 大鼠气管环经 60 mmol/L 高钾激动达最大收缩,见图 1 老年和年轻两组大鼠气管环收缩反应差异无统计学意义($t = 0.505, P > 0.05$)。

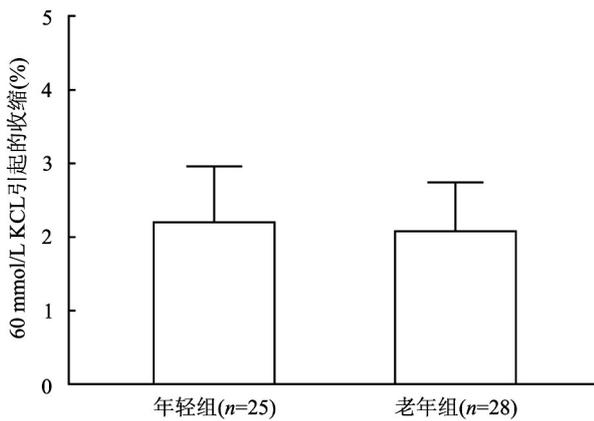


图1 年龄对高钾溶液引起的大鼠气管收缩的影响

2.2 年龄对卡巴胆碱引起的气管收缩的影响 待气管平衡稳定后,依次按浓度梯度,累积加入 $3 \times 10^{-7.5} \sim 3 \times 10^{-5}$ mol/L 卡巴胆碱,气管收缩逐次增强,见图 2,与年轻大鼠比较,老年大鼠对卡巴胆碱的收缩反应显著增强($F = 5.082, P < 0.05$)。

2.3 年龄对 TRPV4 通道激动剂 GSK 引起的气管舒张影响 用 1 μmol/L 卡巴胆碱预收缩大鼠气管

环后,按浓度梯度($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-8}$ mol/L)累积加入 GSK,见图 3。GSK 引起的老年大鼠气管舒张显著降低($F = 4.636, P < 0.05$)。

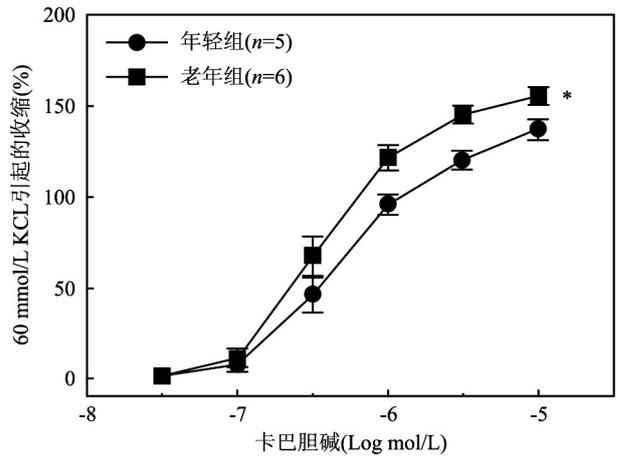


图2 年龄对卡巴胆碱引起的大鼠气管收缩的影响与年轻组比较: * $P < 0.05$

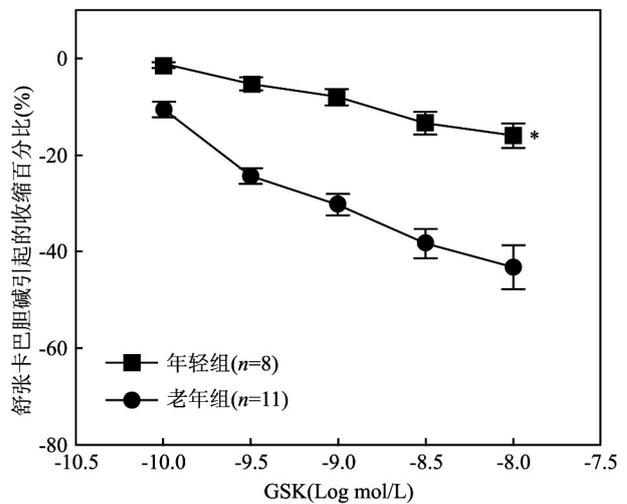


图3 年龄对 TRPV4 激动剂 GSK 引起的大鼠气管舒张影响与年轻组比较: * $P < 0.05$

2.4 TRPV4 通道阻断剂对 GSK 引起的气管舒张效应的影响 将气管环预先分别用 10 μmol/L HC (图 4A) 或 10 μmol/L RN1734 (图 4B) 处理 20 min 后,用 1 μmol/L 卡巴胆碱引起气管收缩,再按照浓度梯度($1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-8}$ mol/L)累积加入 GSK 引起气管舒张,结果显示 GSK 引起的气管舒张被 HC ($F = 0.474, P > 0.05$) 和 RN1734 ($F = 0.142, P > 0.05$) 显著阻断。

2.5 TRPV4 和 SK_{Ca} 通道蛋白表达变化 将气管组织取出后,抽提平滑肌组织蛋白,采用 Western blot 法检测 TRPV4 和 SK_{Ca} 通道蛋白含量,结果显示

老年大鼠气管平滑肌组织 TRPV4 通道蛋白表达显著升高 ($t = -2.639, P < 0.05$), 而 SK_{Ca} 通道第三亚型 (SK3) 显著降低 ($t = 4.676, P < 0.05$)。见图 5。

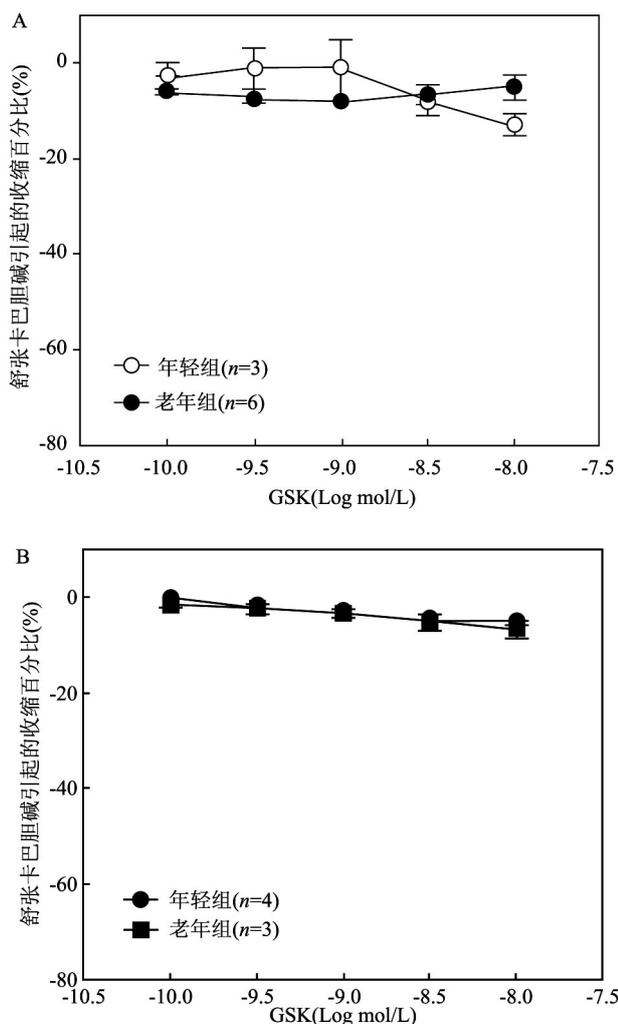


图4 TRPV4 通道阻断剂 HC 和 RN1734 对 GSK 引起的大鼠气管舒张影响
A: HC; B: RN1734

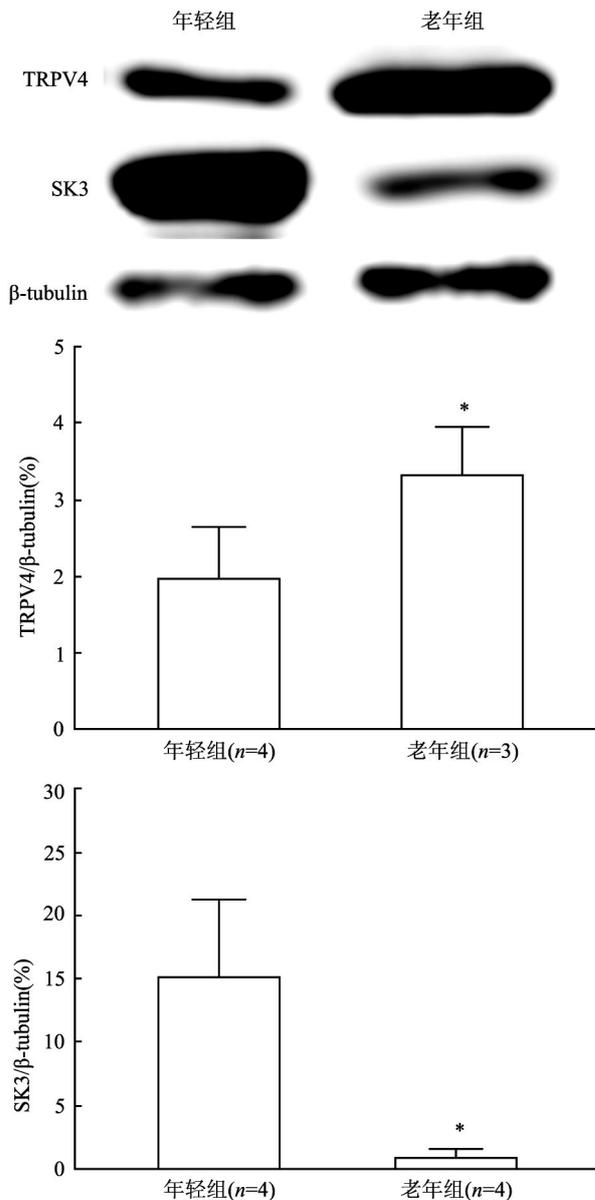


图5 气管平滑肌细胞 TRPV4 和 SK3 通道蛋白表达变化
与年轻组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

TRPV4 属于非选择性阳离子通道,在多种组织、器官上均有表达,可以将生物体内外环境中的机械力、热、低渗、剪切力、佛波醇酯衍生物、花生四烯酸等多种理化刺激转化成钙信号,参与机体的多种生理和病理过程^[4-5]。小电导钙激活钾通道 (SK_{Ca}) 是一种钾离子选择性离子通道,对钙离子高度敏感而对电压没有依赖特性。哺乳动物 SK_{Ca} 家族包括 SK1、SK2 和 SK3 三种亚型,其中 SK3 在多种器官的平滑肌上表达,参与其收缩功能的调节,SK3 高表达可引起子宫、支气管和膀胱等平滑肌收缩功能减弱^[6]。

支气管哮喘,简称哮喘,是临床常见病、多发病,在老年患者中,症状更重,预后更差。哮喘作为老年人的常见疾病之一,高达 50% 的病死率,但长期以来缺乏足够的认识。临床上对老年性哮喘的治疗常常忽视了随着年龄变化而出现的生理结构与功能、药物代谢及耐受性的改变,使得疗效不理想^[7]。因此,寻找老年人气管的结构和功能改变,探索新的治疗方法已成为重要的研究课题。

气管平滑肌的收缩在哮喘的发病中起着重要作用,其机制与许多离子通道蛋白密切相关。本课题组前期研究^[8-10]显示 TRPV4-SK_{Ca} 在气管平滑肌上形成复合物,负反馈调节气管收缩,通过 TRPV4 和

SK_{Ca}相互作用,经TRPV4进入气管平滑肌细胞的钙离子迅速激活SK_{Ca}通道,钾离子通过SK_{Ca}通道外流,导致细胞膜超极化,从而反馈性抑制电压依赖钙通道,抑制激动剂引起的Ca²⁺内流和气管平滑肌收缩,最终导致气管舒张。在本研究的气管张力实验中,与年轻大鼠比较,老年大鼠卡巴胆碱引起的收缩反应显著增强,对TRPV4激动剂GSK引起的舒张效应显著降低,而用TRPV4阻断剂预处理后,两组大鼠GSK引起的舒张作用都被显著阻断。结果提示,老年大鼠TRPV4介导的气管平滑肌舒张效应显著减弱。而且,Western blot结果显示老年大鼠气管平滑肌TRPV4表达显著增强,而SK3表达却显著降低。由此推测,TRPV4介导的气管平滑肌舒张效应减弱可能是由于其下游信号SK3表达降低所致,而TRPV4表达增强则可能是代偿的结果。因此,TRPV4-SK_{Ca}信号复合物表达的改变对老年性哮喘发病有重要意义。

综上所述,SK3在老年大鼠气管平滑肌上表达显著减少,导致了TRPV4介导的气管舒张显著降低。此发现可为老年性哮喘的发病提供新的理论依据。

参考文献

[1] 蒋宝安,屈斌,郝辉,等. 支气管哮喘的发病机制及药物治疗研究进展[J]. 中国当代医药, 2015, 22(13): 35-7, 41.

[2] 卢晏民. 82例老年支气管哮喘的临床分析[J]. 中国实用医药, 2011, 6(25): 103-4.

[3] Jia Y, Wang X, Varty L, et al. Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287(2): L272-8.

[4] 李孝琼,陈莉,王昌梅. TRPV4对HeLa细胞增殖的作用[J]. 中华临床医师杂志:电子版, 2013, 7(7): 2954-6.

[5] 王艳琴,岳寿伟,郝淑燕. TRPV4离子通道和机械敏感性[J]. 中国康复医学杂志, 2007, 22(6): 559-61.

[6] 杨微微,汤玉蓉,王云,等. α受体依赖的雌二醇对大鼠结肠平滑肌细胞SK3表达的影响[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(30): 2367-71.

[7] 李有香. 老年哮喘研究的新进展[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(13): 2592-4.

[8] Jin M, Berrouit J, Che L, et al. Hypotonicity-induced TRPV4 function in renal collecting duct cells: modulation by progressive cross-talk with Ca²⁺-activated K⁺ channels[J]. *Cell Calcium*, 2012, 51(2): 131-9.

[9] Ma X, Du J, Zhang P, et al. Functional role of TRPV4-KCa2.3 signaling in vascular endothelial cells in normal and streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Hypertension*, 2013, 62(1): 134-9.

[10] 张洁,沈兵,桑大成,等. 14,15-EET通过TRPV4-SK_{Ca}复合物调节气管平滑肌收缩机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(5): 565-8.

Change of TRPV4-SK_{Ca} expression and effect on contractile function in aged airway smooth muscle

Shen Yonggang¹, Yin Sheng², Jiang Sen², et al

(¹Dept of Histology and Embryology, ²Dept of Physiology,

College of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the functional role of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)-small conductance Ca²⁺ activated potassium channel 3 (SK3) in the contraction of aged rat airway smooth muscle. **Methods** We used tracheal tension measurement to observe the effect of high K⁺ solution and carbachol on the tracheal contraction and the effect of TRPV4 channel agonist (GSK) and antagonist (HC and RN1734) on carbachol-induced tracheal contraction. Western blot was used to examine the expression level of TRPV4 and SK3. **Results** Compared with the young rats, high K⁺ solution-induced contraction did not change in the aged rat tracheal rings. However, carbachol-induced contraction was significantly increased. The relaxation induced by GSK was notably reduced in the aged rat tracheal rings. On the other hand, TRPV4 antagonist HC and RN1734 significantly inhibited GSK-induced relaxation. Western blot data showed that the expression level of TRPV4 was markedly increased; but SK3 expression was significantly decreased in the aged rat airway smooth muscle. **Conclusion** The change of the expression level of TRPV4-SK3 complex may be the reason for the reduction of tracheal relaxation.

Key words transient receptor potential vanilloid 4; small conductance Ca²⁺ activated potassium channel; aged rat; airway smooth muscle