

◇基础医学研究◇

14 ,15-EET 通过 TRPV4-SK_{Ca} 复合物调节气管平滑肌收缩机制研究张洁¹ 沈兵¹ 桑大成¹ 杜鹃¹, 丁圣刚²

摘要 目的 探讨花生四烯酸细胞色素 P450(CYP) 表氧化酶代谢产物 14,15-环氧化二十碳三烯酸(14,15-EET) 对小鼠气管平滑肌收缩功能的影响及其机制。方法 采用离体气管实验, 通过运用特异性钙激活钾通道阻断剂和瞬时受体电位离子通道 4(TRPV4) 通道阻断剂, 观察 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的影响; 采用免疫共沉淀实验检测 TRPV4 通道蛋白与小电导钙激活钾通道(SK_{Ca}) 蛋白在小鼠气管平滑肌组织中的相互作用。结果 与对照组相比, 300 nmol/L 14,15-EET 预处理小鼠气管后, 卡巴胆碱引起的收缩显著减弱; 大、中电导钙激活钾通道阻断剂 IbTX 和 TRAM34 没有显著影响 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的抑制效应; 而 SK_{Ca} 阻断剂 Apamin 和 TRPV4 通道阻断剂 RN-1734 都分别显著阻断了 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的抑制作用。免疫共沉淀结果显示 TRPV4 通道蛋白和 SK_{Ca} 通道蛋白可以彼此相互共沉淀。结论 在小鼠气管平滑肌中, 14,15-EET 通过 TRPV4-SK_{Ca} 钙信号复合物调节气管平滑肌的收缩。

关键词 钙激活钾通道; 瞬时受体电位离子通道 4; 14,15-EET; 气管平滑肌

中图分类号 Q 412

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0565-04

支气管哮喘是由多种炎症因子参与的慢性气道炎症, 因其患病率和死亡率的逐年上升, 已成为严重威胁公众健康的一种主要慢性病。环氧化二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acid, EETs)作为花生四烯酸的衍生物, 可以使气管平滑肌舒张并减弱气管平滑肌细胞对 Ca²⁺ 的敏感性^[1], 但其作用靶点还未完全阐明。该研究通过阐明 EETs 同分异构体中 14,15-EET 对激动剂引起的气管平滑肌收缩的作用及其机制, 揭示气管平滑肌中瞬时受体电位离子通道 4(transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 与小电导钙激活钾通道(small conductance Ca²⁺-ac-

2015-02-02 收稿

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81371284)

作者单位: ¹安徽医科大学基础医学院生理学教研室, 合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院儿科, 合肥 230022

作者简介: 张洁, 女, 硕士研究生;

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

tivated K⁺-channel SK_{Ca}) 所形成的钙信号复合物在调节气管张力中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂与仪器 14,15-EET 购自英国 Abcam Biochemicals 公司; 卡巴胆碱、RN-1734、TRAM34、Apamin 等均购自美国 Sigma 公司; TRPV4、SK_{Ca} 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 二抗 Goat-Anti-Rabbit IgG 购自合肥志宏生物有限公司; Protein A Magnetic Beads 购自美国 Millipore 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 和 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 和 glucose 11.1 mmol/L)。

1.1.2 实验动物 昆明种雄性小鼠, 清洁级, 6 周龄 20~25 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供。正常进饮水, 室温维持(22±1)℃。

1.2 方法

1.2.1 气管环的制备 用 CO₂ 噎息法处死小鼠, 迅速取出喉部以下的主支气管, 放入备好的克氏(K-H)液并通有混合气体(95% O₂ 和 5% CO₂)保持 pH 在 7.40±0.05。在解剖显微镜下用精密手术剪和手术镊快速、轻柔地去除气管外周结缔组织, 用粗糙的金属丝小心去除气管内皮, 然后沿纵轴将气管剪成长约 2 mm 气管环。

1.2.2 离体气管张力实验 参照朱金行等^[2]的实验方法, 将分离干净的气管环悬挂于张力换能器上, 并置于含有 5 ml K-H 液的浴槽内, 通入含 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体; 调节张力换能器, 给予气管环 500 mg 前负荷, 运用 BL-420S 生物机能实验系统检测气管张力信号, 在 K-H 液中平衡 40~60 min, 且每隔 15 min 更换一次 K-H 液, 待气管张力基线趋于稳定后, 加入 60 mmol/L 的高钾溶液激动气管, 收缩达峰值后, 用 K-H 液洗 3 min × 4 次, 反复激动 2

次后分两组,一组为对照组不做任何处理,另一组加入300 nmol/L 14,15-EET作为实验组;重复上述相同处理方法后分组,一组加入300 nmol/L 14,15-EET作为对照组,另一组加入IbTX阻断剂和300 nmol/L 14,15-EET预处理10 min(TRAM34、Apamin、RN-1734阻断剂方法同IbTX),然后加入不同浓度的卡巴胆碱,观察量效关系。

1.2.3 免疫共沉淀 从小鼠气管组织中提取蛋白进行免疫共沉淀实验。新鲜离体气管去掉脂肪、结缔组织,称重后加入适当体积的裂解液,冰上研磨裂解转入1.5 ml EP管中,置于冰上30~60 min 4℃,3 000 r/min离心5 min后取上清液。两个样品中分别加入抗TRPV4的抗体和抗SK_{Ca}抗体(抗SK3)进行免疫沉淀,4℃震荡2 h后分别加入预处理好的50 μl Protein A Magnetic Beads过夜;次日,于冰盒磁力架上吸附后弃上清液。清洗沉淀3次后加入50 μl 5×上样缓冲液煮沸,收集上清液后进行Western blot实验。

1.2.4 Western blot法 蛋白样品行SDS-PAGE电泳后以0.2 A恒流转膜,随后用5%脱脂牛奶封闭1 h 4℃孵育一抗过夜。次日,以PBST洗膜5 min×3次,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育1 h,PBST漂洗5 min×3次,显色。

1.3 统计学处理 实验所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并运用Sigma Plot 12.5软件进行多因素方差分析。

2 结果

2.1 14,15-EET对小鼠气管张力的影响 卡巴胆碱可以浓度依赖地引起小鼠气管环收缩(10^{-10} ~ 10^{-3} mol/L),与对照组相比,300 nmol/L 14,15-EET预处理使卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩显著减弱($P < 0.05$),见图1。

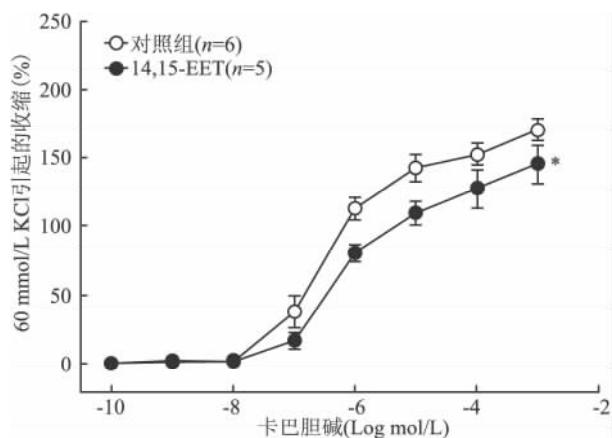


图1 14,15-EET对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的影响
与对照组比较:^{*} $P < 0.05$

2.2 3种Ca²⁺激活钾通道阻断剂对14,15-EET引起的气管舒张的影响 大、中电导钙激活钾通道阻断剂50 μmol/L IbTX和10 μmol/L TRAM 34没有显著影响300 nmol/L 14,15-EET对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的抑制效应;而SK_{Ca}阻断剂1 μmol/L Apamin显著阻断了14,15-EET对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的抑制作用($P < 0.05$),见图2。

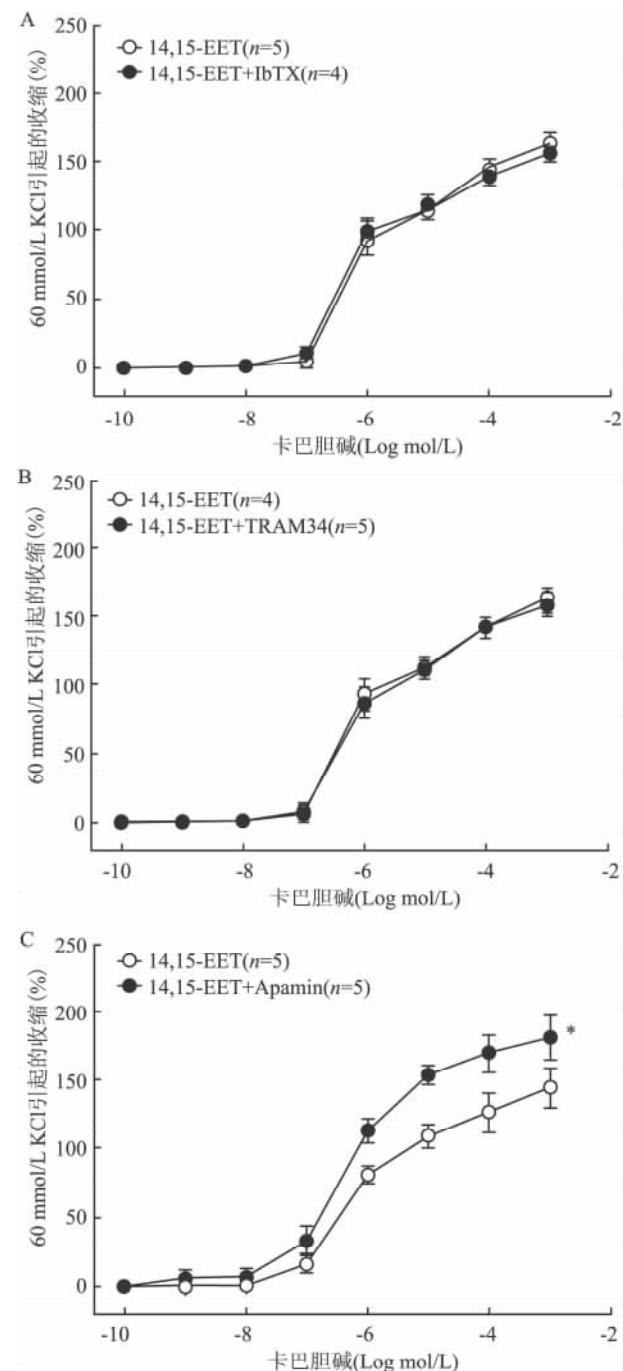


图2 通道抑制剂对14,15-EET抑制卡巴胆碱引起的小鼠气管的收缩效应

A:大电导钙激活钾通道阻断剂; B:中电导钙激活钾通道阻断剂; C: SK_{Ca}通道阻断剂;与14,15-EET组比较:^{*} $P < 0.05$

2.3 TRPV4 通道阻断剂对 14,15-EET 引起的气管舒张的影响 TRPV4 通道阻断剂 20 μmol/L RN-1734 + 14,15-EET 处理组与 14,15-EET 组相比, 明显减弱了 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的抑制效应($P < 0.05$), 见图 3。

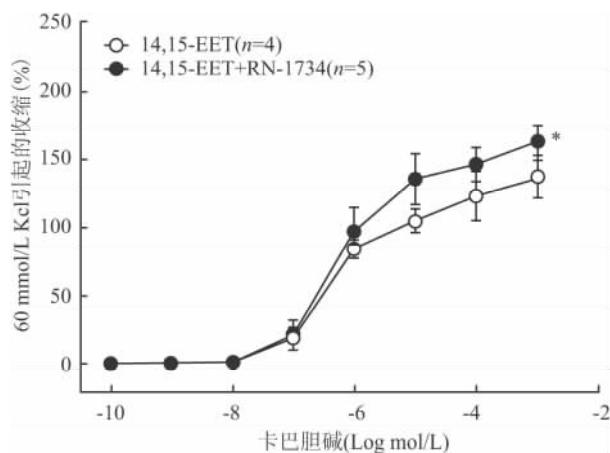


图 3 TRPV4 阻断剂 RN-1734 对 14,15-EET 抑制卡巴胆碱引起的小鼠气管的收缩效应
与 14,15-EET 组比较: * $P < 0.05$

2.4 TRPV4 蛋白和 SK_{Ca} 通道相互作用 将小鼠气管平滑肌组织裂解后, 提取蛋白, 上样分别为小鼠气管平滑肌裂解液、洗脱液、免疫共沉淀 IP 产物, 实验结果显示, TRPV4 蛋白和 SK_{Ca} 通道蛋白第三亚型 SK3 可以彼此相互共沉淀。见图 4。

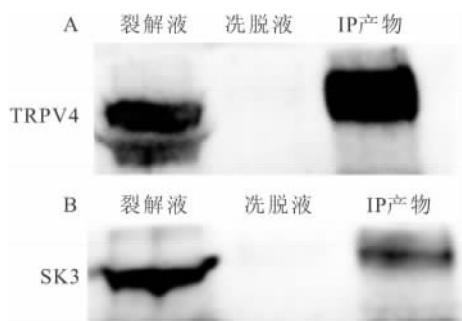


图 4 TRPV4 蛋白和第三亚型 SK_{Ca} 通道蛋白 (SK3)
存在物理上的相互作用

A: SK3 沉淀 TRPV4; B: TRPV4 沉淀 SK3

3 讨论

钙激活钾通道属于钾通道家族中的一个分支。根据其电导大小可分为大电导钙激活钾通道、中电导钙激活钾通道和 SK_{Ca} 通道。SK_{Ca} 通道广泛存在于

哺乳动物组织中, 如平滑肌、骨骼肌、肾脏及内分泌细胞等^[3]。TRPV4 通道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成员, 属于非选择性阳离子通道, 对 Ca²⁺ 具有一定的通透性。在生物体许多组织、器官中均有表达, 可以感受低渗引起的细胞膨胀、机体温度变化以及佛波醇酯衍生物、细胞内外 Ca²⁺ 浓度、花生四烯酸等的理化刺激, 参与调节体内渗透压、机械刺激、温度、血管张力以及气管平滑肌的收缩, 维持机体内环境的稳定, 对机体许多生理功能的正常完成有重要作用。

EETs 有多种同分异构体, 如 5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET 和 14,15-EET^[4]。目前研究认为 EETs 有舒张血管、调节脏器局部血流和抗炎等多种功能^[5-6], 还可作为第二信使在某些细胞信号转导过程中发挥重要作用^[7]。有研究^[8]显示 EETs 能直接激活内皮细胞中的 TRPV4 通道调节血管平滑肌张力。然而, EETs 引起平滑肌舒张的分子机制尚不十分清楚。在大鼠肠系膜动脉内皮细胞中, TRPV4 和 SK_{Ca} 可以形成钙信号复合物, 通过 TRPV4 调节 SK_{Ca} 打开并引起血管平滑肌细胞超极化, 从而引起血管舒张^[9]。

气管平滑肌的收缩效应在调节呼吸系统疾病中起着重要作用。EETs 作为花生四烯酸的衍生物, 在哺乳动物的肺部、心脏和内皮细胞中都有表达^[6,10-11], 在气管上皮细胞中被称为超极化因子起到舒张气管和抗炎的作用^[6]。虽然 EETs 相关研究日益受到重视, 但其对气管平滑肌功能的作用还未完全阐明。平滑肌的收缩是一个复杂的生理过程, 有多种机制参与调节。有研究^[9]报道在血管内皮细胞中, TRPV4-SK_{Ca} 可形成钙信号复合物调节血管平滑肌的收缩。本研究中的免疫共沉淀实验结果显示, TRPV4 和 SK_{Ca} 在气管平滑肌也可以形成钙信号复合物, 而且气管张力实验表明, 预先加入 14,15-EET 处理后比对照组对卡巴胆碱的收缩反应显著减弱。这是由于 14,15-EET 可以激活细胞膜上 TRPV4 通道, 介导 Ca²⁺ 内流, 导致局部 Ca²⁺ 浓度迅速升高, 进而激活与其相互作用的 SK_{Ca} 通道产生外向钾电流并导致细胞膜超极化, 反馈性抑制电压依赖钙通道, 使 Ca²⁺ 内流减少、细胞内 Ca²⁺ 浓度降低, 抑制气管平滑肌的收缩, 最终引起气管舒张。因此, 充分认识 EETs 对 TRPV4-SK_{Ca} 复合物在气管平滑肌细胞上

的作用机制对呼吸系统疾病的防治具有重要意义。

参考文献

- [1] Morin C ,Rousseau E. Effects of 5-oxo-EET and 14,15-EET on reactivity and Ca^{2+} sensitivity in guinea pig bronchi [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2007; 82(1-4): 30-41.
- [2] 朱金行, 祝延, 柯道平, 等. Orai1 和 STIM1 在衰老大鼠平滑肌细胞中的变化及对血管收缩的调节作用 [J]. 安徽医科大学学报 2012; 47(2): 122-6.
- [3] Lee R J ,Foskett J K. Ca^{2+} signaling and fluid secretion by secretory cells of the airway epithelium [J]. Cell Calcium 2014; 55(6): 325-36.
- [4] Roman R J. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function [J]. Physiol Rev 2002; 82(1): 131-85.
- [5] Quillay J ,Fulton D ,McGiff J C ,et al. Hyperpolarizing factors [J]. Biochem Pharmacol 1997; 54(10): 1059-70.
- [6] Node K ,Huo Y ,Ruan X ,et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids [J]. Science, 1999; 285(5431): 1276-9.
- [7] Chen J K ,Wang D W ,Falck J R ,et al. Transfection of an active cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase indicates that 14,15-epoxyeicosatrienoic acid functions as an intracellular second messenger in response to epidermal growth factor [J]. J Biol Chem, 1999; 274(8): 4764-9.
- [8] Vriens J ,Owsianik G ,Fisslthaler B ,et al. Modulation of the Ca^{2+} -permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium [J]. Circ Res 2005; 97(9): 908-15.
- [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] Wu S ,Moomaw C R ,Tomer K B ,et al. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart [J]. J Biol Chem 1996; 271(7): 3460-8.
- [11] Morin C ,Sirois M ,Echave V ,et al. Epoxyeicosatrienoic acid relaxing effects involve Ca^{2+} -activated K^+ channel activation and CPI-17 dephosphorylation in human bronchi [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007; 36(5): 633-41.

14,15-epoxyeicosatrienoic acid regulates airway smooth muscle contraction through TRPV4-SK_{Ca} signal complex

Zhang Jie ,Shen Bing ,Sang Dacheng ,et al

(Dept of Physiology ,College of Basic Medicine ,Anhui Medical University ,Hefei 230032)

Abstract Objective To provide a mechanistic insight into how 14,15-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) which is a product of cytochrome P450 epoxygenase regulates mouse airway smooth muscle contraction. **Methods** Isolated mouse tracheal tension was measured *in vitro*. Mouse tracheal rings were treated by Ca^{2+} -activated K^+ channel blockers or transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channel blocker. The changes of relaxation caused by 14,15-EET in tracheal rings were recorded after the tracheal rings were contracted by carbachol in concentration-dependent fashion. Co-immunoprecipitation was used to examine the physical interaction between TRPV4 and SK_{Ca} in airway smooth muscle. **Results** Tracheal tension measurement showed that compared with the control group, carbachol-induced contraction in 300 nmol/L 14,15-EET pretreatment group was significantly reduced. BK-Ca and IKCa blockers did not affect the effect of 14,15-EET on carbachol-induced tracheal contraction. However, SK_{Ca} and TRPV4 blockers notably inhibited the effect of 14,15-EET on carbachol-induced tracheal contraction, respectively. **Conclusion** 14,15-EET regulates airway smooth muscle contraction via TRPV4-SK_{Ca} signal complex.

Key words Ca^{2+} -activated K^+ channel; transient receptor potential vanilloid 4; 14,15-EET; airway smooth muscle