

stim1 和 orai1 蛋白在哮喘大鼠支气管平滑肌中的表达

王 丽¹, 丁圣刚¹, 李忠强², 王亚亭¹

摘要 目的 研究基质交感分子 1 (stim1) 和钙离子释放激活钙离子通道蛋白 1 (orai1) 在哮喘气道平滑肌细胞中表达水平的变化。方法 选取 40 只清洁级 SD 大鼠随机分为对照组和哮喘组, 其中哮喘组用鸡卵清蛋白 (OVA) 激发制备大鼠哮喘模型 ($n = 20$), 对照组用生理盐水代替 ($n = 20$)。肺组织病理切片 HE 染色判断哮喘模型是否建立成功, 分析支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中的细胞总数及分类计数, 应用免疫组化技术及彩色病理图文分析系统测定 stim1 和 orai1 蛋白阳性细胞平均光密度值。结果 肺组织病理切片 HE 染色镜下观察呈现大量炎细胞浸润, 支气管黏膜肿胀, 支气管腔内可见黏液栓等, 证实哮喘模型建立成功。哮喘组中大鼠 BALF 中细胞总数、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞计数明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。哮喘组大鼠支气管平滑肌表达 orai1 蛋白阳性细胞平均光密度值明显高于

对照组 ($P < 0.05$)。哮喘组和对照组大鼠支气管平滑肌表达 stim1 蛋白阳性细胞的平均光密度值无明显差异 ($P > 0.05$)。结论 orai1 蛋白在哮喘大鼠气道平滑肌细胞中表达变化较 stim1 蛋白明显, 对支气管平滑肌调节作用可能更重要。

关键词 基质交感分子 1; orai1 蛋白; 哮喘; 平滑肌细胞

中图分类号 R 562.25

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)04-0430-04

钙库调控钙离子内流 (store operated calcium entry, SOCE) 在机体生理、病理活动中起着重要作用, 参与细胞的生长、迁移、增殖与分化, 同时与机体免疫细胞、炎症细胞以及结构细胞发挥作用有密切关系^[1-2]。钙离子释放激活钙离子通道蛋白 1 (calcium release-activated calcium channel protein 1, orai1) 和基质交感分子 1 (stromal interaction molecule 1, stim1) 是构成 SOCE 的重要分子, orai1 被公认为介导 SOCE 通道中 Ca^{2+} 内流的离子通道, stim1 被认为是胞内钙库 Ca^{2+} 的“传感器”, Ca^{2+} 敏感区是细胞内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 腔内的 EF-hand

2013-10-28 接收

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院儿科, 合肥 230022

²临沂市人民医院儿科, 临沂 276000

作者简介: 王 丽, 女, 硕士研究生;

王亚亭, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wangyating1348@126.com

Poly-L-arginine regulate inflammatory mediator production by airway epithelial cells NCI-H292 *in vitro*

Tang Wei, Fan Xiaoyun, Lu Zhaoshuang, et al

(Dept of Geriatric Pulmonology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** To study the effect of interleukin (IL)-6, IL-8, IL-13, Eotaxin epithelial cells NCI-H292 by poly-L-arginine (PLA). **Methods** NCI-H292 cells were divided into control group (culture solution), lipopolysaccharide (LPS) group (5 $\mu\text{g/ml}$), PLA group (Max = 40 $\mu\text{g/ml}$), LPS + PLA group and LPS + PLA + heparin group. The expressions of IL-6, IL-8, IL-13 and Eotaxin were determined by ELISA, and compared the differences among the groups. **Results** IL-6, IL-8 and Eotaxin levels in LPS + PLA group were significantly higher than other groups ($P < 0.05$); but there was no statistical significance among LPS group, PLA group and the control group ($P > 0.05$); and also no statistical significance on IL-13 among each group ($P > 0.05$); but heparin could reduce the levels of cytokines in LPS + PLA group ($P < 0.05$). **Conclusion** PLA can increase the expression of IL-6, IL-8, Eotaxin in NCI-H292 cells association with LPS, but heparin can inhibit the expression of cytokines; and there has no effect on IL-13.

Key words asthma; poly-L-arginine; interleukin-6; interleukin-8; interleukin-13; Eotaxin; heparin

结构。支气管哮喘的发生、发展与机体慢性炎症和长期免疫应答反应有密切关系。该研究旨在探讨 orai1 蛋白在哮喘大鼠气道平滑肌细胞中表达变化,以期证实构成 SOCE 的 orai1 和 stim1 与支气管哮喘的发生、发展存在的联系。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠 40 只,清洁级,雄性,体重 100~130 g,购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 主要试剂与仪器 鸡卵清蛋白(OVA)购自美国 Sigma 公司;氢氧化铝粉购自上海凌峰化学试剂有限公司;orai1 和 stim1 一抗抗体购自美国 Abcam 公司;羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 大鼠哮喘模型的建立 参照文献^[3]方法,取清洁级 SD 大鼠 40 只,随机分为对照组和哮喘组。哮喘组于第 1、8、15 天分别腹腔注射 10% OVA 溶液 1 ml(含 100 mg OVA 和 100 mg 氢氧化铝)进行致敏,对照组用生理盐水代替腹腔注射;哮喘组于第 16 天起雾化吸入含有 1% OVA 生理盐水 1 ml,每次 30 min,共 7 d,激发哮喘,使其出现打喷嚏、喘息、呼吸急促或呼吸困难等表现;对照组用生理盐水代替雾化吸入,吸入时间相同。

1.3.2 标本的留取 最后一次雾化吸入后 24 h 内,用 3% 戊巴比妥(0.3 ml/100 g)腹腔注射进行麻醉,麻醉后行开胸手术,分离周围组织,充分暴露左右主支气管,结扎右肺主支气管,并切取右肺叶,置于装有 4% 多聚甲醛溶液中充分浸未备用。

1.3.3 支气管肺泡灌洗液(BALF)的留取 左肺予以生理盐水 3 ml 灌洗,重复进行 3 次,每次灌洗时间持续 30 s,将回抽的灌洗液放入离心管,经 4℃ 1 000 r/min 离心 10 min,离心后弃去上清液,将沉淀细胞用 Hanks 液洗涤离心 2 次,弃去上清液,加入 Hanks 液吹打混匀制成细胞悬液,细胞悬液涂片经 HE 染色后用改良牛氏血细胞计数板做细胞计数。

1.3.4 石蜡切片 HE 染色 将浸入 4% 甲醛溶液固定的新鲜肺组织,24 h 后制作蜡块,后用切片机连续切片,厚度为 5 μm。常规用脱蜡、乙醇梯度脱水,行 HE 染色,光镜下观察肺脏组织病变情况。

1.3.5 石蜡切片免疫组化 将肺组织切片放在 90℃ 恒温箱中烘烤 10 min 后,常规用脱蜡、乙醇梯度脱水,PBS 冲洗后分别应用 orai1 和 stim1 蛋白免疫

组化试剂盒,羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体作为标记二抗,依次按步骤选取比较完整的支气管,显微镜下观察计数表达 orai1 和 stim1 蛋白的阳性细胞,并随机选取 5 个高倍视野,进行彩色病理图文分析系统测定 orai1 和 stim1 蛋白阳性细胞平均光密度值。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用两独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 大鼠肺部组织形态学观察 行 HE 染色后,镜下观察哮喘组大鼠肺脏组织,表现为支气管黏膜肿胀,内膜皱襞增多,部分上皮细胞破坏、脱落,杯状细胞增生,平滑肌层增厚,管壁增厚,管腔狭窄,黏液分泌增多,可见黏液栓形成,管壁周围见大量炎症细胞浸润;对照组则未见上述炎性改变,仅有少许炎症细胞浸润,支气管腔内少许分泌物。见图 1。

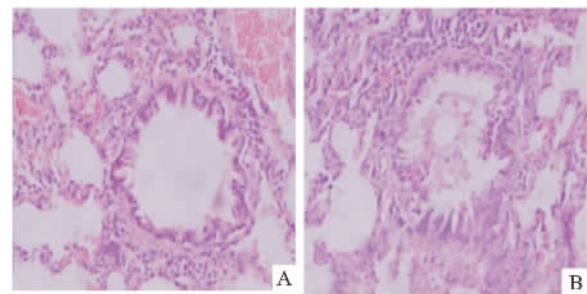


图1 两组大鼠肺部组织表达 HE ×200

A: 对照组; B: 哮喘组

2.2 支气管 BALF 涂片 HE 染色细胞计数 两组大鼠 BALF 中均含有中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞等,与对照组比较,哮喘组大鼠 BALF 中细胞总数、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞计数明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表1 两组大鼠 BALF 中细胞计数及分类($n=20, \bar{x} \pm s$)

项目	哮喘组	对照组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
细胞总数($\times 10^6/L$)	110.70 ± 27.56	50.00 ± 19.77	0.581	0.000
中性粒细胞($\times 10^6/L$)	28.80 ± 5.07	5.50 ± 2.64	3.403	0.000
嗜酸性粒细胞($\times 10^6/L$)	7.80 ± 2.25	1.60 ± 1.08	4.033	0.000

2.3 支气管平滑肌 orai1 和 stim1 表达 与对照组相比,哮喘组大鼠支气管平滑肌细胞及其周围组织均有 orai1 蛋白阳性细胞表达,呈棕黄色颗粒,支气管平滑肌细胞平均光密度值明显升高($0.099 \pm$

0.025 vs 0.072 ± 0.014, $P < 0.05$); 哮喘组大鼠支气管平滑肌细胞及其周围组织均有 stim1 蛋白阳性细胞的表达, 呈棕黄色颗粒, 支气管平滑肌细胞的平均光密度值与对照组比较差异无统计学意义 (0.093 ± 0.025 vs 0.088 ± 0.017, $P > 0.05$)。见图 2。

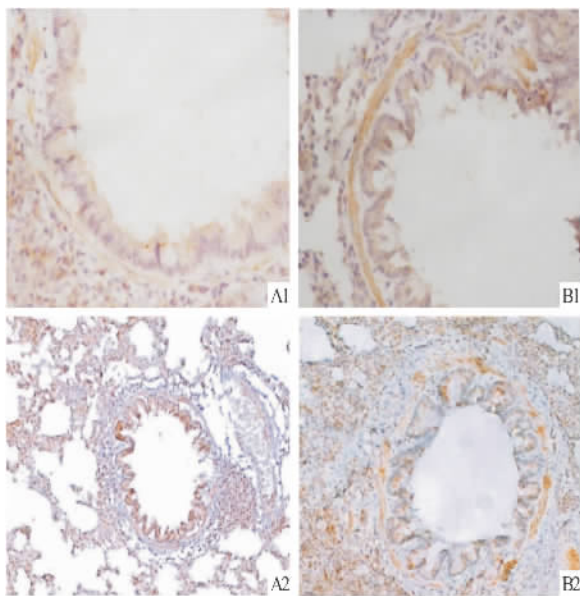


图 2 orai1、stim1 蛋白免疫组化检测

A: 对照组; B: 哮喘组; 1: orai1 SP × 400; 2: stim1 SP × 200

3 讨论

气道平滑肌细胞是哮喘发作时气道结构变化的主要效应细胞, 被认为是气道高反应性的结构基础, 同时中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、气道上皮细胞等多种细胞和细胞组分也参与哮喘的慢性炎症反应。Baryshnikov et al^[4] 利用 siRNA 法敲除大鼠血管平滑肌细胞及人主动脉血管平滑肌细胞中的 stim1 和 (或) orai1 蛋白降低细胞的 SOCE 活性, 明显抑制平滑肌细胞的增殖及细胞外 Ca^{2+} 内流, 进而使中性粒细胞的炎症反应活性降低, 肥大细胞脱颗粒及释放炎症介质减少, 淋巴细胞克隆分化减弱^[5-8]。

有研究^[9]表明 orai1 和 stim1 两种蛋白是构成 SOCE 通路的重要组成部分, 在细胞静息状态下 stim1 和 orai1 蛋白分别均匀地分布在内质网膜和细胞膜上, 胞外激动剂作用于 G 蛋白偶联受体 (G protein-linked receptor, GPCR) 活化磷脂酶 C (phospholipase C, PLC) 产生三磷酸肌醇 (inositol triphosphate, IP3), IP3 与细胞内钙库 IP3 受体 (IP3 receptor,

IP3R) 结合, 使钙库开放, 钙库迅速释放 Ca^{2+} 流入胞质, 并出现钙库损耗状态, stim1 蛋白感受钙库的充盈状态, stim1 蛋白在内质网膜上重新排列, 在靠近细胞膜的内质网膜上聚集^[10-11], 将细胞内钙库耗竭信号, 传递给位于细胞膜上的 orai1 蛋白, orai1 蛋白活化且表达增多, 形成功能性钙离子通道, 促使胞外 Ca^{2+} 内流。

哺乳动物细胞中还有两个 orai1 的同源蛋白: orai2、orai3, 在 HEK293 细胞研究^[12]显示所有的 orai 蛋白都能增加 SOCE, 其中 orai1 功效最强, 且是构成 SOCE 通道的重要组成部分, 介导 Ca^{2+} 的内流。本研究结果显示哮喘组支气管平滑肌细胞内表达 orai1 蛋白的阳性细胞平均光密度值明显高于对照组, 提示在哮喘发作时, 气道平滑肌细胞经过 G 蛋白偶联受体信号转导途径, 使钙库开放, 并出现钙库耗竭, stim1 作为胞内钙库 Ca^{2+} 的“传感器”, 介导 Ca^{2+} 内流的离子通道开放, 胞外 Ca^{2+} 流入胞内, 填充胞内钙库, 以维持气道平滑肌细胞内外钙离子平衡及其收缩功能。利用 RNA 干扰技术沉默 orai1 蛋白后可显著抑制毒胡萝卜素或环匹阿尼酸清空钙库引起的 Ca^{2+} 内流, 从而抑制平滑肌 Ca^{2+} 内流, 充分证实这一观点^[9]。

stim1 被证明是细胞内 Ca^{2+} 的传感器, 检测细胞内 Ca^{2+} 含量。目前已发现 stim 分子有 stim1 和 stim2 两种亚型^[13-14]。stim1 在 SOCE 通道活性中有重要作用, 钙库排空之前 stim1 定位在内质网膜上, 随胞内钙库排空, stim1 在靠近细胞膜的内质网膜上以“斑”状重新聚集^[14-15], Ca^{2+} 敏感区 EF-hand 结构域的基因突变, 可能会降低其与 Ca^{2+} 的亲合力, 使 stim1 蛋白对未排空的钙库敏感, 导致 SOC 非钙库调控的激活^[4]。本研究结果显示哮喘组支气管平滑肌细胞表达 stim1 蛋白阳性细胞平均光密度值与对照组比较无明显差异, 然而 Potier et al^[1] 在研究细胞生长过程中发现, 在哮喘大鼠的气道平滑肌细胞中 stim1 的表达较对照组大鼠的表达增多, 所以 stim1 蛋白在气道平滑肌细胞中作用机制仍需进一步探讨。

综上所述, stim1 和 orai1 蛋白作为 SOCE 通路的重要组成部分, 在哮喘气道平滑肌细胞中表达水平的变化, 可能对气道平滑肌收缩功能起到重要作用, 且 orai1 蛋白对支气管平滑肌调节作用更重要, SOCE 通道可能参与哮喘的发生、发展, 其作用机制仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Potier M, Gonzalez J C, Motiani R K, et al. Evidence for stim1- and orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: Role in proliferation and migration [J]. *FASEB J*, 2009, 23(8): 2425–37.
- [2] Yang S, Zhang J J, Huang X Y. orai1 and stim1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis [J]. *Cancer Cell*, 2009, 15(2): 124–34.
- [3] Irifune K, Yokoyama A, Sakai K, et al. Adoptive transfer of T-helper cell type 1 clones attenuates an asthmatic phenotype in mice [J]. *Eur Respir J*, 2005, 25(4): 653–9.
- [4] Baryshnikov S G, Pulina M V, Zulian A, et al. orai1, a critical component of store-operated Ca^{2+} entry, is functionally associated with $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and plasma membrane Ca^{2+} pump in proliferating human arterial myocytes [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 297(5): C1103–12.
- [5] Yamabayashi C, Koya T, Kagamu H, et al. A novel prostacyclin agonist protects to airway hyperresponsiveness and remodeling in mice [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(2): 170–7.
- [6] Stevens P T, Kicie A, Sutanto E N, et al. Dysregulated repair in asthmatic paediatric airway epithelial cells: the role of plasminogen activator inhibitor-1 [J]. *Clin Exp Allergy*, 2008, 38(12): 1901–10.
- [7] Srikanth S, Gwack Y. orai1, stim1 and their associating partners [J]. *J Physiol*, 2012, 590(17): 4169–77.
- [8] 黎艳红, 刘毅. 基质相互作用分子 1 在炎症免疫细胞中的作用 [J]. *中华风湿病杂志*, 2010, 14(9): 634–6.
- [9] 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): 122–5.
- [10] Chen Y T, Chen Y F, Chiu W T, et al. The ER Ca^{2+} sensor stim1 regulates actomyosin contractility of migratory cell [J]. *Cell Sci*, 2013, 126(5): 1260–7.
- [11] Feske S, Picard C, Fischer A. Immunodeficiency due to mutations in orai1 and stim1 [J]. *Clin Immunol*, 2010, 135(2): 169–82.
- [12] Yang B, Gwozdz T, Dutko-Gwozdz J, et al. orai1 and Ca^{2+} -independent phospholipase A2 are required for store-operated Ca^{2+} current, Ca^{2+} entry, and proliferation of primary vascular smooth cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302(5): C748–56.
- [13] Xiao B, Coste B, Mathur J, et al. Temperature-dependent stim1 activation induces Ca^{2+} influx and modulates gene expression [J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(6): 351–8.
- [14] Kiviluoto S, Decuyper J P, De Smedt H, et al. stim1 as a key regulator for Ca^{2+} homeostasis in skeletal-muscle development and function [J]. *Skelet Muscle*, 2011, 1(1): 16.

The expression of stim1 and orai1 protein in asthmatic rats airway smooth muscle cells

Wang Li¹, Ding Shenggang¹, Li Zhongqiang², et al

(¹ Dept of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

² Dept of Pediatrics, Linyi City People's Hospital, Linyi 276000)

Abstract Objective To investigate the changes of stim1 and orai1 protein in the level of expression in asthmatic airway smooth muscle cells. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into normal control group and asthma group, and asthma model was established by OVA sensitization in rats. HE staining of lung tissue to determine whether the asthma model successfully established. Cell counting and classification were obtained in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats, immunohistochemical detection and color graphic analysis system was used to measure the expression of stim1 and orai1 protein positive cells mean optical density value. **Results** The lung tissue pathological section HE staining showed inflammatory cell infiltration, bronchial mucosal edema, bronchial visible mucus, confirmed the asthma model was established successfully. Compared with the normal control group, the total number of cells, neutrophils count, eosinophils count in BALF sediment of the asthma group were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). The expression of orai1 protein positive cells mean optical density value of asthma group was significantly higher than the normal control group ($P < 0.05$). Asthma group and normal control group had no significant difference in expression the stim1 protein positive cells in the average optical density value ($P > 0.05$). **Conclusion** Orai1 proteins may play an important role in the contraction of asthma rat airway smooth muscle cells.

Key words stim1; orai1; asthma; airway smooth muscle cells