

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01134

• 研究简报 •

TRPC 通道阻滞剂 SKF96365 调节人血管内皮细胞内游离钙离子浓度

TRPC blocker SKF96365 modulates intracellular calcium in human umbilical vein endothelial cells孙媛媛[△], 葛瑞良[△], 邹奇飞, 沈 锋*

第二军医大学东方肝胆外科医院综合治疗科, 上海 200438

[关键词] 钙离子; 瞬时受体电位通道; SKF; 血管内皮细胞生长因子

[中图分类号] R 979.1 [文献标志码] B [文章编号] 0258-879X(2008)09-1134-02

新生血管形成在肿瘤的形成与转移中起重要作用。通过干扰血管形成来抑制肿瘤已成为临床生物治疗策略^[1-2], 其中血管内皮细胞生长因子(VEGF)单克隆抗体贝伐单抗(bevacizumab, 商品名 Avastin), 已被美国食品药品监督管理局(FDA)批准为大肠癌肝转移的临床治疗一线用药^[3]。在 VEGF 的胞内信号转导过程中, Ca^{2+} 作为第二信使分子, 其浓度变化, 可以通过下游的信号途径使多种相关酶的活性改变, 促进内皮细胞的增殖与分化, 调节新生血管形成^[4-5]。为了明确一种新的钙通道蛋白瞬时受体电位通道 C 亚家族(TRP-canonical, TRPC)是否参与 VEGF 的调节过程, 本研究选用 TRPC3、6、7 通道的阻滞剂 SKF96365 观察其对血管内皮细胞内游离钙离子浓度的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 人脐静脉内皮细胞系(HUVEC)购自美国 ScienCell 公司, VEGF165 购自美国 R&D 公司, SKF96365、钙染料 Fura-2AM 购自美国 Sigma 公司, 活细胞工作站应用中科院神经科学所 Nikon TE2000E 系统。

1.2 HUVEC 培养及实验分组 HUVEC 培养液组成: 内皮细胞培养基(ECM)+5%胎牛血清+内皮细胞生长添加剂(ECGS)+青霉素/链霉素, 于 37℃、5%CO₂ 培养箱中生长。细胞传代时使用 0.15%胰酶-EDTA (Gibco), 实验时所用细胞均为第 3~8 代。HUVEC 种在培养皿中直径 10 mm 的圆玻片上, 上机实验时以细胞生长至未融合状态为宜。实验分为对照组、SKF 组(5 μmol/L)、VEGF 组(15 ng/ml)和 VEGF+SKF 组, 每组细胞上活细胞工作站检测前先去血清培养 12 h, 上机实验后以专用细胞外液冲洗至基线平稳。VEGF 组于基线平稳后 5 min 继以 VEGF 滴入 10 min, 再换用胞外液灌洗; VEGF+SKF 组则先以 5 μmol/L SKF 胞外液使基线平稳后 5 min 继以 VEGF 滴入 10 min, 再换以含 SKF 的胞外液灌洗 10 min。

1.3 活细胞内游离钙离子浓度检测 参照 Fura-2 荧光法进行测定, 主要步骤为: 将 HUVEC 细胞培养玻片以无血清的 MEM 培养液清洗后, 滴入终浓度为 5 μmol/L 的 Fura-2/AM 溶液, 37℃避光孵育 30 min, 洗去细胞外未负载的残余荧光染料。负载的活细胞于胞外液中室温放置 10 min 后上机检测。

参数设置: 340 nm 和 380 nm 两个激发光每间隔 6 s 交替激发 Fura-2, 测量 510 nm 左右的发射光, 记录到的 340 nm/380 nm 比值代表细胞内游离钙离子浓度, 连续记录胞内钙荧光强度变化曲线。预扫描时调节焦平面使图像清晰, 正式扫描 300 s 到基线平稳后, 选择形态完整、负载良好、完全贴壁的单个细胞经灌流装置缓慢灌流给药, 确保加药过程中细胞位置不动, 记录细胞内钙荧光强度值的变化并由计算机进行处理, 得到 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化(相对钙荧光强度值)的时间效应曲线。实验所测定染色条件和激光扫描参数在整个实验过程中不变, 每实验组先后测定 3 次, 图形均基本一致。

2 结果

对照组以胞外液灌洗至 15 min, 可以看到 HUVEC 内钙离子水平保持稳定, 340/380 比值维持在 0.9 左右。个别细胞可出现自发的钙信号, 显示 340/380 比值升高。500 s 时细胞 340/380 均值 0.90, 900 s 时细胞 340/380 均值 0.91。VEGF 组中, 前 5 min 胞外液冲洗时, 游离钙离子浓度稳定在基线水平, 换 15 ng/ml VEGF 给药刺激后 1 min, 细胞内钙离子浓度快速上升, 约 100 s 后到达最高值, 340/380 比值 2.8。后钙离子浓度缓慢下降, 未再出现新的钙离子高峰。换用胞外液灌洗 10 min 后仍明显高于基线水平, 900 s 时 340/380 比值 1.50。5 μmol/L 的 SKF 则显著改变 HUVEC 对 VEGF 的反应能力, VEGF+SKF 组中, 瞬间钙离子升高仍存在, 在 500 s 时 340/380 最大比值 2.45, 与 VEGF 组比较无统计学差异, 峰值过后钙离子浓度缓慢下降, 但是延迟

[收稿日期] 2008-05-08 [接受日期] 2008-07-02

[基金项目] 上海市科委基金项目(064119530), Supported by Foundation of Science and Technology Committee of Shanghai Municipal Government(064119530).

[作者简介] 孙媛媛, 硕士生, 住院医师, E-mail: shmilymxj@hotmail.com; 葛瑞良, 博士生, 主治医师, E-mail: geruiliang@yahoo.com.cn

[△]共同第一作者(Co-first authors).

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070805, E-mail: shenfengdfgd@yahoo.com.cn

期中胞内游离钙离子水平较 VEGF 组明显下降,900 s 时 340/380 比值为 1.09。仅以 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 SKF 灌洗,可以看到 HUVEC 内钙离子水平保持稳定,340/380 比值维持在 0.85 左右。500 s 时细胞 340/380 均值 0.86,900 s 时细胞 340/380 均值 0.84。

3 讨 论

TRP 离子通道是一种跨膜蛋白质,被激活时允许包括钙离子在内的阳离子进行跨膜运输。哺乳动物 TRP 通道蛋白包括几个关联的蛋白家族:TRPC、TRPV、TRPM、TRPP、TRPN 及 TRPML,其中每个家族又有许多亚型。TRP 通道蛋白的作用非常广泛,既可调节多细胞生物的传感性信号转导,又能在单个细胞层次上发挥信号转导作用,被认为是调节细胞内钙离子稳态的重要离子通道^[6-7]。

TRPC 是 TRP 家族的主要成员之一,在哺乳动物机体内有非常广泛的表达。TRPC 可被胞内钙离子浓度激活,亦可被 G 蛋白偶联受体或酶联受体 RTK(receptor tyrosine kinase)介导的 PLC 信号通路激活,被认为是最可能的钙库操纵性钙通道和受体操纵性钙通道的分子基础。TRPC 包括 7 个亚型,即 TRPC1-7,各亚型的分布与功能有所差别。TRPC 对于调节细胞内钙离子水平起到了重要的作用,以往对 TRPC 通道蛋白的研究多集中在神经系统,现已开始向其他系统或脏器拓展。

TRPC 通道在血管内皮细胞中的研究也得到了充分的重视。应用 RT-PCR 的方法,Paria 等^[8]证实人脐静脉内皮细胞表达 TRPC1、3、4、6、7。但在同一细胞系中,Köhler 等^[9]却未检测到 TRPC4、6 的表达,这可能与细胞的培养状态、PCR 条件有关,并且都只是检测了 mRNA 的水平,有待于蛋白水平的进一步检测。

钙离子的升高既有胞内钙库的释放,又需要胞外钙的内流。现有研究表明,在血管内皮细胞中,TRPC 通道参与了胞内钙离子浓度的调控:Köhler 等^[9]证实了人肠系膜动脉内皮细胞表达 TRPC1 和 TRPC3,并且 TRPC1 的激活伴随了 Ca^{2+} 浓度变化。Kamouchi 等^[10]在牛的肺动脉内皮细胞中过表达了 TRPC3,以 ATP 刺激,发现了明显的钙离子内流。TRPC4 基因敲除小鼠模型的血管内皮细胞中,ATP 刺激的钙内流大为减弱^[11]。

细胞内 Ca^{2+} 可从细胞外经细胞膜上的钙离子通道流入,也可从细胞内肌浆网等钙池释放,两种途径互相促进。本实验中,VEGF 引起的快速钙离子升高,已有研究提示由胞内钙库释放引起,而被 SKF 降低的延迟期钙离子浓度,符

合 TRPC 通道的电流性质。基于此,我们推测:TRPC 可能参与 VEGF 信号作用途径,并通过调控钙离子浓度来影响内皮细胞增殖、成管,在 VEGF 刺激新生血管形成过程中起到了重要的作用。

本结果为进一步深入研究 TRPC 通道的功能提供了实验室依据,但是 VEGF 引起的延迟期 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高,是由 TRPC 的某一亚型单独介导还是多个亚型同时参与,值得进一步探讨。

[参 考 文 献]

[1] Jain R K. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy[J]. Science, 2005, 307: 58-62.

[2] Steeg P S. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges[J]. Nat Med, 2006, 12: 895-904.

[3] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 350: 2335-2342.

[4] Lee E H, Kim do H, Allen P D. Interplay between intra- and extracellular calcium ions[J]. Mol Cells, 2006, 21: 315-329.

[5] Faehling M, Kroll J, Föhr K J, Fellbrich G, Mayr U, Trischler G, et al. Essential role of calcium in vascular endothelial growth factor A-induced signaling: mechanism of the antiangiogenic effect of carboxyamidotriazole[J]. FASEB J, 2002, 16: 1805-1807.

[6] Huang C L. The transient receptor potential superfamily of ion channels[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15: 1690-1699.

[7] Minke B, Cook B. TRP channel proteins and signal transduction[J]. Physiol Rev, 2002, 82: 429-472.

[8] Paria B C, Malik A B, Kwiatek A M, Rahman A, May M J, Ghosh S, et al. Tumor necrosis factor- α induces nuclear factor- κ B-dependent TRPC1 expression in endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2003, 278: 37195-37203.

[9] Köhler R, Brakemeier S, Kühn M, Degenhardt C, Buhr H, Pries A, et al. Expression of ryanodine receptor type 3 and TRP channels in endothelial cells: comparison of *in situ* and cultured human endothelial cells[J]. Cardiovasc Res, 2001, 51: 160-168.

[10] Kamouchi M, Philipp S, Flockerzi V, Wissenbach U, Mamin A, Raeymaekers L, et al. Properties of heterologously expressed hTRP3 channels in bovine pulmonary artery endothelial cells[J]. J Physiol, 1999, 518 Pt 2: 345-358.

[11] Freichel M, Philipp S, Cavalié A, Flockerzi V. TRPC4 and TRPC4-deficient mice[J]. Novartis Found Symp, 2004, 258: 189-199.

[本文编辑] 贾泽军