文章编号:1000-5404(2005)02-0123-03

论著

三磷酸肌醇受体各亚型在大鼠气道平滑肌细胞中的表达以及在慢性哮喘中的作用

王 英[1],张睢扬[2],王希良[3],钱桂生[1] ([1]第三军医大学新桥医院呼吸内科研究所,重庆 400037;[2]第二炮兵总医院呼吸科,北京 100088;[3]北京军事医学科学院微生物流行病研究所,北京 100071)

提 要:目的 检测正常大鼠气道平滑肌细胞中三磷酸肌醇受体(Inositol 1,4,5 triphosphate receptors, IP_3R)各亚型的表达以及在慢性哮喘中的作用。**方法** 采用胶原酶消化法培养大鼠气道平滑肌细胞,RT-PCR 方法测定 IP_3R 亚型的表达,并将纯化的 PCR 产物与 pGEM-T 载体连接后进行 DNA 序列分析;卵蛋白致敏并激发大鼠制备慢性哮喘模型,RT-PCR 测定各受体 mRNA 表达水平的变化。**结果** 大鼠气道平滑肌细胞中 IP_3R 的 3 种亚型共表达,测序结果与 GenBank 中登录的序列完全一致;制备的慢性哮喘模型中,病理切片显示平滑肌层及粘膜层明显增厚,IP_3R1 的表达较对照组有明显的上调 $P<0.01$。**结论** 大鼠气道平滑肌细胞中 IP_3R 3 种亚型共表达,提示存在着复杂的细胞内钙调节机制;并且 IP_3R1 在慢性哮喘的发生过程中可能起了一定的作用。

关键词: Inositol 1,4,5-triphosphate;受体;气道平滑肌细胞;逆转录-聚合酶链式反应;大鼠
中图法分类号: R322.33; R392.11; R562.250.2 **文献标识码**: A

Expression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor in airway smooth muscle cells of rats and its roles in chronic asthma formation

WANG Ying[1], ZHANG Sui-yang[2], WANG Xi-liang[3], QIAN Gui-sheng[1] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Respiratory Diseases, General Hospital of Second Artillery of PLA, Beijing 100088; [3]Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences of PLA, Beijing 100071, China)

Abstract: Objective To detect the expression of inositol 1,4,5-triphosphate receptor (IP_3R) subtypes in normal rat airway smooth muscle cells (ASMCs) and changes during chronic asthma formation. **Methods** ASMCs were cultured by collagen enzyme digestion method. The expressions of subtypes of IP_3R were detected by RT-PCR and the purified PCR products were linked with pGEM-T vector for DNA sequencing. Chronic asthma model was established with egg albumin. The changes of IP_3Rs were detected by RT-PCR method. **Results** All subtypes of IP_3R were expressed in airway smooth muscle cells of normal rats. The expression of IP_3R1 in asthma groups increased obviously as compared with that in the control group ($P<0.01$). **Conclusion** Co-expression of three subtypes of IP_3R in ASMCs of normal rats indicate that there is complicated intercellular Ca^{2+} regulation mechanism in chronic asthma.

Key words: inositol 1,4,5-triphosphate; receptor; airway smooth muscle; reverse transcriptase-polymerase chain reaction; rat

关于哮喘气道重塑的发生机制,多年来一直是呼吸系统疾病领域的研究热点,但至今还没有完全阐明。研究证实气道平滑肌细胞(airway smooth muscle cells, ASMCs)增殖在气道重塑中起关键性作用[1],而各种生长因子(如 TGF-β、EGF 受体、PDGF、IGF、bFGF)以及炎症介质(如 ET、HT、TNF、LTD_4、P 物质等)的经常刺激均可以导致 ASMCs 增生,其中肌醇脂质信使系统中各环节关键酶的激活、三磷酸肌醇(inositol 1,4,5 triphosphate, IP_3)的增加在肌细胞增殖中起了重要作用[2,3],国内外学者[4,5]已探讨了 IP_3R 在血管平滑肌上的表达及其在心血管疾病中的重要的病理生理意义。但在气道平滑肌上是否表达,表达何种亚型,目前鲜有报道。本研究应用分子生物学技术检测 IP_3R 各亚型在正常大鼠气道平滑肌细胞上的表达,进行了 DNA 的序列分析,并制备了慢性哮喘的动物模型,探讨了各受体亚型在哮喘气道重塑过程中的变化,初步揭示了气道平滑肌上存在的复杂的钙调节系统,为进一步研究 IP_3R 在呼吸系统中的作用提供依据。

基金项目:全军"十五"攻关课题(01MA068)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01MA068)
作者简介:王 英(1968-),女,山东省东营市人,博士研究生,主治医师,主要从事呼吸内科疾病方面的研究,现在第二炮兵总医院呼吸科,发表论文 6 篇。电话:(010)66343378
通讯作者:钱桂生,电话:(023)68755603
收稿日期:2004-09-22;**修回日期**:2004-12-30

1 材料与方法

1.1 材料

Ⅳ型胶原酶，胰蛋白酶购自 Difco 公司；DMEM 购自 Gibco 公司；胎牛血清购自杭州四季青生物制品工程公司；Trizol™ 购自 Invitrogen 公司；PCR 试剂购自 TaKaRa 公司；逆转录酶（reverse transcriptase，M-MLV），寡脱氧胸苷酸引物（OligodT15）及 pGEM- T Vector 购自 Promega 公司；卵蛋白（Grade Ⅱ）购自 Sigma 公司；即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒及小鼠抗大鼠 α-smooth musle actin 购自武汉博士德生物工程公司。Wistar 大鼠 20 只，雄性，体质量 150～200 g，清洁级，由军事医学科学院实验动物中心提供。

1.2 大鼠气道平滑肌细胞的分离与培养

大鼠用 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后，脱臼致死，无菌取出气管，置于 DMEM 培养液中；仔细剥离气管内、外膜，剪碎剩余组织，0.2% Ⅳ型胶原酶，37 ℃消化 2 次，每次 30 min，其间吹打、振摇组织块各 1 次。100 目细胞筛过滤，用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液培养。第 4 至第 6 代的细胞用于实验。

1.3 气道平滑肌细胞的鉴定

倒置相差显微镜下观察细胞的形态，呈梭形，有较长的突起，细胞核位于细胞中央，排列成旋涡状、放射状或栅栏状。免疫酶细胞化学：参照即用型 SABC 免疫组化试剂盒说明，苏木精轻度复染，乙醇梯度脱水，二甲苯透明，中性树胶封片后，显微镜下观察照相。

1.4 RT-PCR 检测 ASMCs 的 IP_3R 亚型表达

根据 GenBank 中登录的大鼠 IP_3R 各亚型的 cDNA 序列，利用美国 Whitehead 生物医学研究所基因组研究中心提供的 Primer3 软件在线设计引物，IP_3R1：5′-CGGAGTAGGAGATGTGCTCAG-3′，5′-CATCTCTGCCACGTAGCTCTC-3′，扩增产物 358 bp；IP_3R2：5′-CTCTCTGGCCTCCAGATTCTT-3′，5′-GGTCCTAGTGTGTGCAGC-ATT-3′，扩增产物 262 bp；IP_3R3：5′-AGCACTACATTGTGGCTGTCC-3′，5′-AGAGAAAGTCCTGGGAGCAAG-3′，扩增产物 195 bp；PCR 内参选用大鼠 β-actin，引物序列如下：5′-CACGGCATTGTAAC-CAACTG-3′，5′-AGGGCAACATAGCACAGCTT-3′，扩增产物 446 bp。引物由上海生工生物工程公司合成。Trizol 法提取细胞总 RNA，以提取的总 RNA 为模板，Oligo(dT) 为引物，合成 cDNA 后，立即用于 PCR 反应。反应体系为：逆转录产物（cDNA）2 μl，上、下游引物各 2 μl（终浓度为 0.4 μmol/L），10 × PCR 缓冲液 5 μl（Mg^{2+} plus），10 mmol/L dNTP 4 μl，*Taq* 酶 2.5 U，加无菌水补足体积 50 μl，反应条件为 95 ℃，预变性 5 min；变性、退火及延伸条件分别是 94 ℃、1 min，58 ℃（IP_3R2 为 60 ℃；IP_3R3 为 62 ℃）、50 s，72 ℃、1 min，此循环进行 30 次。最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定（溴化乙锭染色），凝胶成像系统扫描。

1.5 RT-PCR 产物克隆及序列测定

将 RT-PCR 产物切胶回收纯化后，与 pGEM-T vector 连接，常规转化，蓝白斑筛选，菌落 PCR 及小提质粒双酶切鉴定。将含目的片段的质粒 DNA 送 TaKaRa 公司，采用 PE Cetus 公司生产的 ABI PRISM™ 377XL DNA Sequencer，以 T7 启动系列引物，Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaqDNA Polymerase，Fs 进行自动化测序。

1.6 大鼠哮喘模型的建立及大鼠气道平滑肌中各受体 mRNA 表达水平的变化

健康、雄性大鼠 20 只，按随机数字表法随机分为哮喘组与正常对照组。哮喘组大鼠分别于第 1、8 天腹腔注射 2% 卵蛋白与氢氧化铝凝胶的混悬液 1 ml 致敏，第 15 天起每日用 2% 卵蛋白生理盐水液雾化吸入以激发哮喘，每次 30 min，连续激发 10 d；对照组用生理盐水代替卵蛋白致敏及激发。末次激发后 2 组大鼠分别用 2% 戊巴比妥钠 1 ml 腹腔注射麻醉致死，75% 酒精消毒，无菌条件下迅速打开胸腔，取气管及右肺中叶，右肺中叶用 10% 甲醛固定后石蜡包埋做病理切片，并 HE 染色，观察激发哮喘后的病理改变。气管用 PBS 清洗后仔细剥离气管内外膜，将剩余的组织约 100 mg 立即用于总 RNA 的提取，步骤基本同 ASMC，RT-PCR 后，进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统扫描后进行条带的灰度值比较。

1.7 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠气道平滑肌细胞的鉴定

大鼠 ASMC α-actin 染色结果如图 1 所示，α-actin 主要分布在细胞质中。

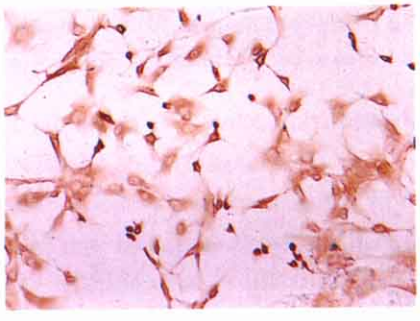
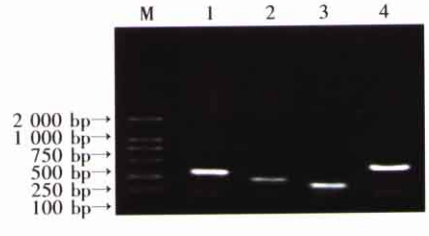


图 1 大鼠 ASMC α-actin 免疫组织化学鉴定 （SABC × 200）

Fig 1 Immunohistochemical staining of α-actin in rat airway smooth muscle cells （SABC × 200）

2.2 IP_3R 各亚型 mRNA 在正常大鼠 ASMC 中的表达

以来源于大鼠 ASMCs 的总 RNA 为模板，分别采用 IP_3R1、IP_3R2、IP_3R3 的特异性寡核苷酸引物，进行各自的 RT-PCR 扩增，发现 IP_3R 3 种亚型在气道平滑肌上均有表达，长度分别为 358、262、195 bp，与设计引物的理论值一致。测序证实与 GenBank 中大鼠相应的受体序列一致，见图 2。



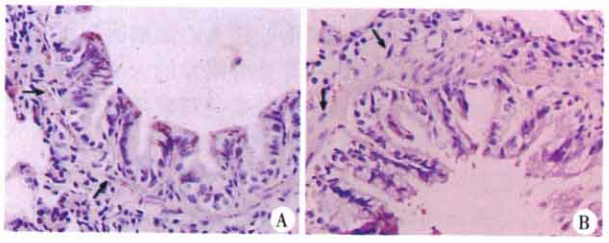
M：DNA marker DL2000；1：IP_3R1；2：IP_3R2；3：IP_3R3；4：β-actin

图 2 正常大鼠 ASMCs 中 IP_3R1-3 mRNA 的表达

Fig 2 mRNA expression of IP_3R1-3 in ASMCs of normal rats (RT-PCR)

2.3　大鼠哮喘模型的建立及各受体 mRNA 表达水平的变化

哮喘组大鼠在 2% 卵蛋白雾化吸入 5 min 后均相继出现不同程度的周身瘙痒，呼吸加深加快、少动、弓背、上肢缩抬、咳嗽等症状。病理结果显示哮喘大鼠气道平滑肌层及基底膜等明显增厚，官腔狭窄，气道发生重塑，见图 3。RT-PCR 结果显示 IP_3R1 mRNA 水平明显上调（$P<0.01$）。结果见表 1。



A: Smooth muscle layer and basal membrane of normal rats (arrow); B: Thickened smooth muscle layer and basal membrane of asthma rats (arrow)

图 3　正常及哮喘大鼠右肺中叶切片　(HE × 200)

Fig 3　Sections of middle lobe of the right lung of normal and asthma rats　(HE × 200)

表 1　两组大鼠 ASM 中 IP_3R1-3 mRNA 的相对表达量（$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　IP_3R1-3 mRNA expression in ASM in the two groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	IP_3R1/β-actin	IP_3R2/β-actin	IP_3R3/β-actin
Control	10	0.525 ± 0.028	0.3891 ± 0.034	0.379 ± 0.045
Asthma	10	0.624 ± 0.129 *	0.407 ± 0.069	0.383 ± 0.115

*：$P<0.01$，*vs* control

3　讨论

众所周知，胞内钙离子浓度的改变是细胞生理功能的重要物质基础，也是多种受体激活的信息传递过程的中心环节。细胞内 Ca^{2+} 主要贮存于内质网（ER）/肌浆网（SR）内，目前已知 ER/SR 有 2 类钙库，即 IP3 敏感和 IP3 不敏感钙库，分别通过 IP3 受体（IP_3R）和 ryanodine 受体（RyR）通道释放 Ca^{2+}。换言之，众多的细胞活动，无一不受胞内两大 Ca^{2+} 通道家族——IP_3R 和 RyR 的控制。目前已经确认的 IP_3R 有 3 种亚型[6]，即 IP_3R1、IP_3R2、IP_3R3，广泛存在于多种组织中，为同源四聚体，其分子构型分为跨膜片段和内质网腔内部的通道区、胞浆内的 IP_3R 结合区和中间部分的包括磷酸化位点和 ATP 结合位点的调节区。IP3 与特异性位点结合后可引起 Ca^{2+} 通道开放，PKA 磷酸化 IP_3R 可调节 IP3 介导的 Ca^{2+} 动员，参与一系列的生理和病理过程[7]。最新的研究表明[8]细胞核膜上也存在这一受体。IP_3R 数目和结构的变化可能会影响到细胞内 Ca^{2+} 信号的幅度和频率，而 Ca^{2+} 信号频率和幅度的差异是 Ca^{2+} 特异调控细胞内不同生理过程的内在机制[9]。

本研究采用胶原酶消化法成功的培养了大鼠气道平滑肌细胞，并利用平滑肌特有的 α-actin 抗体进行了鉴定，其纯度大于 90%，利用 RT-PCR 技术以 ASMCs 总 RNA 为模板，扩增得到了 IP_3R 3 种亚型的片段，并将测序结果在 GenBank 上进行 BLAST 同源性检索，可见目的片段与 GenBank 中登录的大鼠 IP_3Rs 的序列一致，结果提示在大鼠气道平滑肌中存在着三磷酸肌醇受体/钙通道（IP_3Rs），而且是 3 个亚型共同表达，提示气道平滑肌细胞中存在着复杂的细胞内钙调节机制。传统认为支气管哮喘是一种可逆性的呼吸道疾病。因此，一般只是针对哮喘症状进行控制和治疗，包括缓解支气管痉挛和消除炎症。然而，随着支气管哮喘发病机制和病理生理的研究进展，现在人们发现过去对哮喘的认识并不完全准确。大量的研究表明[10]许多哮喘患者呼吸功能的恶化有加速的现象。目前人们已经认识到哮喘的发生不仅存在气道炎症，而且还存在气道的结构变异，也就是气道重塑。本研究用国内外学者普遍采用的卵蛋白作为过敏原致敏并激发制备的慢性哮喘大鼠模型，病理切片显示在哮喘反复发作的过程中，气道结构发生了明显的改变。RT-PC 方法测定气道平滑肌中 IP_3R1 的表达有明显的上调，与对照组大鼠比 $P<0.01$，表明 IP_3R1 可能参与了哮喘气道重塑的发生过程，其具体的机制还需要进一步的探讨。本文的结果对研究呼吸道疾病，尤其是对慢性哮喘气道重塑的发病机制研究奠定了一定的基础。

参考文献：

[1] Hogg J C. Pathology of asthma[J]. J Allergy Clin Immunol, 1993, 92(1 Pt 1): 1 - 5.

[2] Redington A E, Roche W R, Madden J, *et al*. Basic fibroblast growth factor in asthma: measurement in bronchoalveolar lavage fluid basally and following allergen challenge[J]. J Allergy Clin Immunol, 2001, 107(2): 384 - 387.

[3] Kizawa Y, Ohuchi N, Saito K, *et al*. Effects of endothelin-1 and nitric oxide on proliferation of cultured guinea pig bronchial smooth muscle cells[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2001, 128(4): 495 - 501.

[4] Moschella M C, Marks A R. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor expression in cardiac myocytes[J]. J Cell Biol, 1993, 120(5): 1137 - 1146.

[5] Go L O, Moschella M C, Watras J, *et al*. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure [J]. J Clin Invest, 1995, 95(2): 888 - 894.

[6] Fill M. Mechanisms that turn-off intracellular calcium release channels[J]. Front Biosci, 2003, 8: d46 - 54.

[7] Hamada K, Miyata T, Mayanagi K, *et al*. Two-state conformational changes in inositol 1,4,5-triphosphate receptor regulated by calcium[J]. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21115 - 21118.

[8] Guihard G, Proteau S, Rousseau E. Does the nuclear envelope contain two types of ligand-gated Ca^{2+} release channels? [J]. FEBS Lett, 1997, 414 (1): 89 - 94.

[9] Dolmetsch R E, Lewis R S, Goodnow C C, *et al*. Differential activation of transcription factors induced by Ca^{2+} response amplitude and duration[J]. Nature, 1997, 386(6627): 855 - 858.

[10] Lange P, Parner J, Vestbo J, *et al*. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma[J]. N Engl J Med, 1998, 339(17): 1194 - 1200.

（编辑　薛国文）