文章编号:1000-5404(2014)20-2071-06

论著

人气道上皮细胞感知冷刺激的受体机制

李敏超[1],何 叶[1],Juliy M. Perelman[2],Victor P. Kolosov[2],周向东[1] (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院呼吸内科[1];675000 Russia, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Blagoveschensk[2])

[摘要] **目的** 探讨温度感受器瞬时受体电位蛋白-8(transient receptor potential melastatin 8,TRPM8)在人气道上皮细胞感受冷刺激过程中发挥的作用及其机制。**方法** 用薄荷醇及冷空气(18 ℃)刺激人气道上皮16HBE细胞:①以TRPM8通道特异性拮抗剂BCTC、TRPM8 shRNA为干预手段,动态观察在薄荷醇、冷刺激作用下细胞内Ca^{2+}荧光强度变化来监测气道上皮细胞上TRPM8的功能;②以磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate,PIP2)荧光分子探针PLCδ1-PH-GFP转染细胞,通过动态观察各组细胞内PLCδ1-PH-GFP从细胞膜至细胞质的荧光转位变化来检测PIP2的动态变化来研究冷刺激作用下TRPM8的信号通路。**结果** ①细胞内相对钙离子浓度变化:薄荷醇组处理4 min后、冷刺激组处理6 min后分别为(5.80±0.34)、(5.02±0.36),明显高于对照组(1.04±0.12)、(1.03±0.08)($P<0.05$),1 mmol/L薄荷醇组+BCTC组、1 mmol/L薄荷醇组+转染TRPM8 shRNA组最高值分别为(2.68±0.19)、(1.08±0.16),明显低于1 mmol/L薄荷醇组,18 ℃+BCTC组、18 ℃+转染TRPM8 shRNA组最高值分别为(1.77±0.22)、(1.02±0.18),明显低于18 ℃组(均$P<0.05$);②PLCδ1-PH-GFP从细胞膜至细胞质的转位变化(Fm/Fc值):1 mmol/L薄荷醇组、冷刺激组最高值分别为(0.90±0.01)、(0.90±0.01),明显高于对照组最高值(1.01±0.02)($P<0.05$),细胞处理200 s时1 mmol/L薄荷醇+BCTC15 μmol/L组、1 mmol/L薄荷醇组+转染TRPM8 shRNA组分别为(0.86±0.03)、(0.89±0.02),明显低于1 mmol/L薄荷醇组(0.36±0.06)($P<0.05$),细胞处理220 s时18 ℃+BCTC15 μmol/L组、18 ℃+转染TRPM8 shRNA组分别为(0.82±0.02)、(0.93±0.01),明显低于18 ℃组(0.40±0.06)($P<0.05$)。**结论** TRPM8受体是人气道上皮细胞感受冷刺激的主要受体,并通过TRPM8→Ca^{2+}→PLC→PIP2信号通路引起气道黏液高分泌等反应。

[关键词] 气道上皮细胞;冷刺激;瞬时受体电位蛋白-8;Ca^{2+};PIP2
[中图法分类号] R322.3;R329.26;R394.2 [文献标志码] A

Cold-induced signal transduction mechanism in airway epithelial cells

Li Minchao[1], He Ye[1], Juliy M. Perelman[2], Victor P. Kolosov[2], Zhou Xiangdong[1] ([1]Department of Respiratory Diseases, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China; [2]Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Blagoveschensk, 675000, Russia)

[**Abstract**] **Objective** To explore the role of transient receptor potential melastatin 8 (TRPM8) receptor and related cold-induced signal transduction mechanism in airway epithelial cells. **Methods** The 16 HBE human airway epithelial cells were treated with cold temperature (18 ℃) and menthol. By means of Ca^{2+} imaging, we explored the function of TRPM8 when the cells were pretreated with TRPM8 channel antagonist BCTC and exon-18-specific TRPM8 shRNA. Hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) were characterized by means of spatiotemporal dynamics of phospholipase C (PLC) δ1-pleckstrin homology-green fluorescent protein (δ1-PH-GFP). **Results** The concentration of intercellular calcium in the menthol and cold air treatment group (5.80±0.34, 5.02±0.36) higher than that in the control group (0.94±0.12) ($P<0.05$). The intracellular calcium concentration was in the menthol + BCTC and menthol + TRPM8 shRNA groups (2.68±0.19, 1.08±0.16) than in the menthol treatment group ($P<0.05$). The intracellular calcium concentration in the cold air + BCTC and cold air + TRPM8 shRNA groups (1.77±0.22, 1.02±0.18) were lower than that in the cold air treatment group ($P<0.05$). The translocation of PLC δ1-PH-GFP from the membrane to the cytosol (Fm/Fc) in the menthol treatment group and cold air treatment group

[基金项目] 国家自然科学基金(81370111,81270102);重庆市自然科学基金(CSTC2012jjA10050),重庆市教委科学技术研究项目(KJ120301)
[通信作者] 周向东,E-mail:zxd999@263.net
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140910.1049.006.html(2014-09-10)

(0.90 ± 0.01, 0.90 ± 0.01) were higher than that in the control group (1.01 ± 0.02) ($P < 0.05$). Fm/Fc was lower in the menthol + BCTC group and TRPM8 shRNA + menthol group (0.86 ± 0.03, 0.89 ± 0.02) than in the menthol treatment group ($P < 0.05$), and also lower in the cold air + BCTC group and cold air + TRPM8 shRNA group (0.82 ± 0.02, 0.93 ± 0.01) than in the cold air treatment group ($P < 0.05$). **Conclusion** TRPM8 receptor is involved in the response to cold temperature in airway epithelial cells, and contributes to mucus hypersecretion through the TRPM8→Ca^{2+}→ PLC→PIP2 signaling pathway.

[**Key words**] lung epithelial cells; cold air; transient receptor potential melastatin 8; Ca^{2+}; phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81370111, 81270102), the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2012jjA10050) and the Project of Scientific and Technological Research of Chongqing Municipal Education Commission (KJ120301). Corresponding author: Zhou Xiangdong, E-mail: zxd999@263.net

冷空气刺激是引起慢性气道炎症性疾病(如慢性阻塞性肺疾病、哮喘等)加重的一个重要环境因素[1-2],吸入冷空气可以使该类患者咳嗽、支气管痉挛、黏液分泌等症状加重。所以,研究人气道上皮细胞感受冷刺激的作用机制对于预防该类患者病情加重有很重要的意义。近年来,大量研究发现瞬时感受器电位(transient receptor potential,TRP)通道家族成员之一的TRPM8是一种温度觉感受器,分布于哺乳动物多种神经细胞膜以及非神经细胞膜上[3-5],可以被低温(小于25 ℃)及多种凉性化合物激活,又可以被化学合成物BCTC阻断[6]。国外研究表明,缺乏胞内N-末端的截短型TRPM8变异体在气道上皮细胞膜上亦有表达[7]。因此,我们推测冷空气可以通过激活气道上皮细胞TRPM8受体而引起慢性气道炎症患者症状加重。本实验通过监测冷空气、TRPM8激动剂及拮抗剂作用下细胞内Ca^{2+}浓度变化及细胞内磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate,PIP2)的动态变化来探讨人气道上皮细胞感受冷刺激的重要受体机制及相关信号通路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

正常人气道上皮16HBE细胞购自美国标准培养收集所;DMEM/Ham's F12培养液购自美国Gibco公司;胎牛血清购自美国HyClone公司;Fluo3-AM购自碧云天生物技术研究所;Effectene Transfection Reagent购自德国Qiagen公司;G418购自美国Invitrogen公司;左旋薄荷醇(L-menthol)购于上海晶纯试剂有限公司,用75%乙醇稀释至终浓度保存;TRPM8通道特异性阻断剂BCTC、exon-18-specific TRPM8 shRNA、scramble TRPM8 shRNA由Christopher A. Reilly教授(University of Utah, Salt Lake City)惠赠;pEGFP-N1载体购自美国CLONTECH公司;PLCδ1-PH-GFP由TamasBalla(Public Health Service, National Institute of Health, USA)和Ken Mackie(Indiana University, Bloomington)惠赠;脂质体2000购自美国Invitrogen公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 16HBE细胞置于6孔培养板培养,每孔5×10^5~6×10^5个细胞,加入2 mL DMEM/Ham's F12培养液(含10%胎牛血清),置于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱孵育,常规换液,当细胞融合达70%~80%时传代。

1.2.2 细胞的稳定转染 将细胞分组,按以下方法分别进行转染。

1.2.2.1 TRPM8 shRNA转染 用Effectene Transfection Reagent将TRPM8 shRNA、scramble TRPM8 shRNA质粒DNA按转染试剂:质粒=10:1的比例进行转染,37 ℃孵育24 h后将转染细胞用含G418(300 μg/mL)的培养液继续培养。常规换液,约2周后待对照细胞全部死亡时即得到G418抗性的16HBE细胞。挑取单个细胞克隆继续筛选扩增。

1.2.2.2 PLCδ1-PH-GFP转染 倾去细胞培养液,用无血清、无抗的1640培养液洗涤细胞,在培养皿中加入2 mL的1640培养液。将10 μL脂质体2000加入240 μL无血清、无抗1640培养液中,轻轻混匀,温浴5 min;将20 μL(约4 μg)PLCδ1-PH-GFP质粒、20 μL(约4.5 μg)pEGFP-N1载体质粒溶入230 μL无血清、无抗1640培养液中混匀。将配制好的脂质体与质粒轻轻混匀,置室温下20 min后将其加入培养皿中,置于37 ℃、5% CO_2、饱和湿度培养箱孵育培养4~6 h后吸弃培养液,换为普通1640液继续培养12~24 h备用。

1.2.3 MTT法检测冷刺激、薄荷醇及BCTC对细胞活性的影响 按参考文献[8]方法进行。

1.2.4 激光共聚焦测量细胞内钙离子浓度 在35 mm×12 mm聚苯乙烯培养皿中培养的细胞达到70%~80%融合时,去除培养液,细胞与含3 μmol/L Fluo3-AM的PBS于37 ℃共孵育45 min进行荧光探针装载,随后用改良的Krebs-Ringer buffer(120 mmol/L NaCl, 4.7 mmol/L KCl, 1.2 mmol/L $CaCl_2$, 0.7 mmol/L $MgSO_4$, 10 mmol/L glucose, 10 mmol/L Na-Hepes, pH=7.4)清洗3次,将培养皿放入Incubator S中,在37 ℃或18 ℃(冷刺激组)继续培养。细胞分组处理并动态观察细胞内钙浓度变化:①不同浓度薄荷醇(0、100、250、500 μmol/L, 1、2.5、5 mmol/L)处理4 min;②1 mmol/L薄荷醇组:1 mmol/L薄荷醇+BCTC(5、10、15、30、60 μmol/L)、1 mmol/L薄荷醇+TRPM8 shRNA、1 mmol/L薄荷醇+scramble TRPM8 shRNA分别处理8 min;③冷刺激组:18 ℃+BCTC(5、10、15、30、60 μmol/L)、18 ℃+TRPM8 shRNA、18 ℃+scramble TRPM8 shRNA分别处理10 min。用488 nm氩离子激光器激发Fluo3-AM的荧光,发射波长为525~530 nm范围。采用按每10秒间隔连续扫描的方法记录荧光的变化,在整个扫描记录过程中激光强度、针孔、增益与补偿的设置保持不变。结果存入硬盘,下机用激光共聚

焦自带的 Quant Report 软件对细胞荧光强度进行分析,每个视野随机选3~4 个细胞进行荧光强度测定后取其均值。各时点细胞内相对钙离子浓度 = 各时点药物或冷刺激后平均荧光强度值/药物或冷刺激前平均荧光强度值。

1.2.5 激光共聚焦扫描显微镜检测细胞内 PLCδ1-PH-GFP 转位变化情况 在 35 mm × 12 mm 聚苯乙烯培养皿中培养 12~24 h 的细胞用改良的 Krebs-Ringer buffer 清洗 3 次,将培养皿放入 Incubator S 中,在 37 ℃或 18 ℃(冷刺激组)继续培养。细胞分组处理并动态观察细胞内外 GFP 荧光强度:①对照组:pEGFP-N1 载体转染细胞 + 1 mmol/L 薄荷醇组、pEGFP-N1 载体转染细胞 + 18 ℃组;②实验组:用 PLCδ1-PH-GFP 转染细胞,其中又分为:1 mmol/L 薄荷醇组、1 mmol/L 薄荷醇 + BCTC 15 μmol/L 组、1 mmol/L 薄荷醇 + TRPM8 shRNA 组、18 ℃刺激组、18 ℃ + BCTC 15 μmol/L 组、18 ℃ + TRPM8 shRNA 组。各组细胞置激光共聚焦扫描显微镜下动态观察 8 min。用 488 nm 氩离子激光器激发 GFP 的荧光,发射波长为 525~530 nm 范围。荧光强度分析同 1.2.4。按照选定的细胞膜和细胞质区域计算各时点细胞内平均膜(Fm)/质荧光强度(Fc)比率,并以处理前 Fm/Fc 比率进行标准化。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,根据方差齐性与否分别采用参数检验和非参数检验,即齐性资料用单因素方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用 LSD-t 检验,非齐性资料用秩和检验。

2 结果

2.1 不同浓度薄荷醇、BCTC 及冷刺激对细胞活力的影响

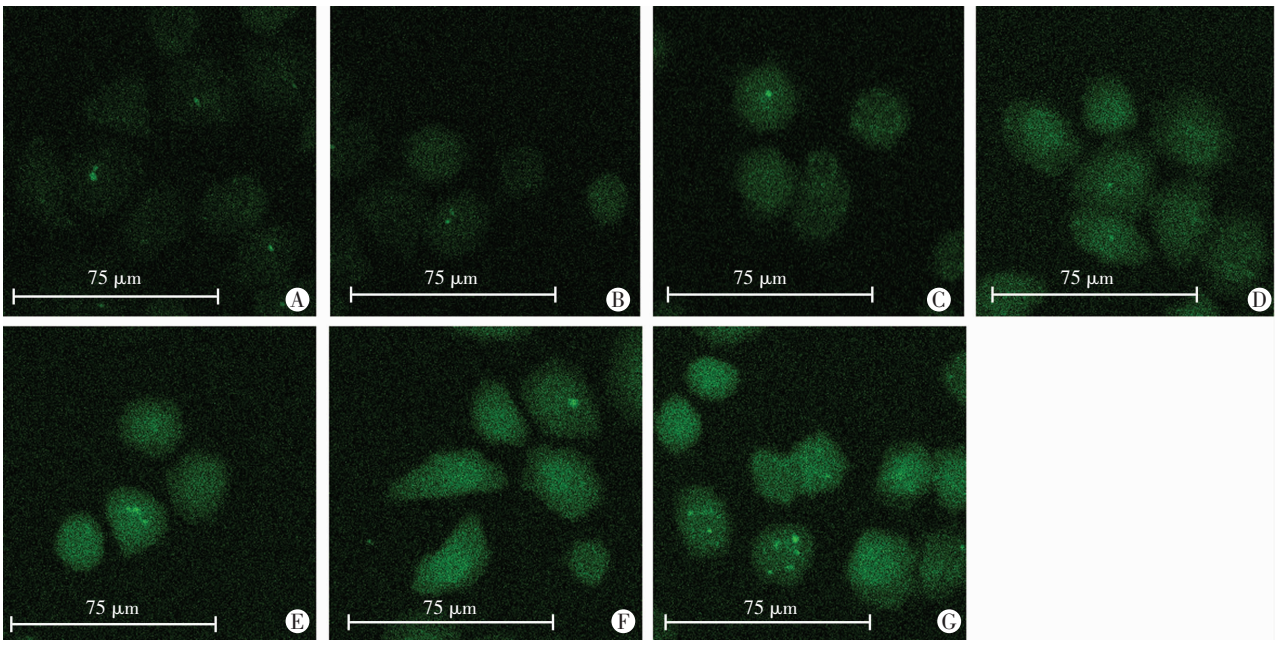
细胞经不同浓度的薄荷醇(100、250、500 μmol/L、1、2.5、5 mmol/L)处理后,各浓度组在各时间点的细胞增殖活力与对照组比较无明显变化。细胞经不同浓度 BCTC(5、10、15、30、60 μmol/L)处理后,各浓度组在 8 h 内各时间点的细胞增殖活力与对照组比较无明显变化,浓度为 30 μmol/L BCTC 从第 12 小时开始,D(570)值开始显著降低[分别为(0.353 ± 0.011)、(0.440 ± 0.013)、(0.784 ± 0.008),$P < 0.05$];浓度为 60 μmol/L BCTC 亦从第 12 小时开始,D(570)值显著降低[分别为(0.399 ± 0.009)、(0.437 ± 0.011)、(0.776 ± 0.016),$P < 0.05$]。因 30、60 μmol/L BCTC 对细胞的活力有抑制作用,在下一步实验中选择 5、10、15 μmol/L BCTC 来进一步研究其对 TRPM8 通道的阻断作用。在各时间点,18 ℃ 的冷刺激对细胞的增殖活力没有显著性影响。

2.2 不同浓度薄荷醇处理细胞 4 min 时细胞内钙离子浓度水平

不同浓度薄荷醇(100、250、500 μmol/L、1、2.5、5 mmol/L)处理 4 min 后,细胞内的相对钙离子浓度较对照组(0 mmol/L 薄荷醇)显著性升高($P < 0.05$)。但高浓度的薄荷醇(2.5、5 mmol/L)升高细胞内钙离子浓度的作用并不优于 1 mmol/L 薄荷醇($P > 0.05$,图 1、2),所以在后续的实验中选择 1 mmol/L 薄荷醇作为刺激浓度。

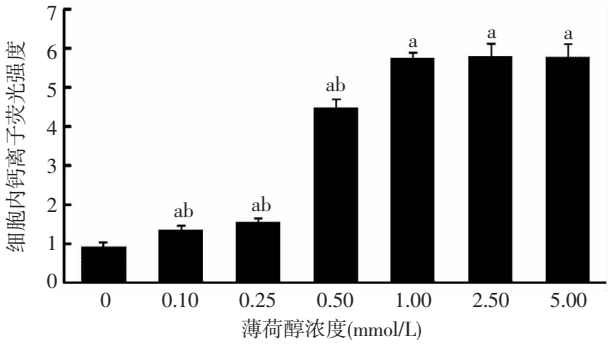
2.3 1 mmol/L 薄荷醇、BCTC 及 TRPM8 shRNA 对细胞内钙离子浓度的影响

1 mmol/L 薄荷醇在处理细胞 0.5~8 min 的各个时相点细胞内的钙离子浓度均显著高于对照组,其中从 0.5~4 min 时间段细胞内的钙离子浓度呈明显上升趋势,4 min 后出现平台期(表 1)。1 mmol/L 薄荷醇处理细胞 4 min 时,5、10、15 μmol/L BCTC 可显著抑制薄荷醇所诱导的钙离子内流,但 15 μmol/L BCTC 的抑制作用明显强于 5、10 μmol/L BCTC($P < 0.05$)。TRPM8 shRNA 的转染可显著阻断 1 mmol/L 薄荷醇所诱导的细胞内钙离子浓度升高($P < 0.05$),而 scramble TRPM8 shRNA 则对 1 mmol/L 薄荷醇所诱导的细胞内钙离子浓度没有显著影响($P > 0.05$,表 1)。



A:对照组;B:100 μmol/L 薄荷醇组;C:250 μmol/L 薄荷醇组;D:500 μmol/L 薄荷醇组;E:1 mmol/L 薄荷醇组;F:2.5 mmol/L 薄荷醇组;G:5 mmol/L 薄荷醇组

图 1 激光共聚焦扫描显微镜观察不同浓度组薄荷醇刺激细胞 4 min 后细胞内的钙离子成像



a:$P<0.05$,与0 mmol/L薄荷醇比较; b:$P<0.05$,与1 mmol/L薄荷醇比较

图2 人气道上皮细胞经不同薄荷醇浓度处理4 min后细胞内钙离子荧光强度

2.4 冷刺激、BCTC及TRPM8 shRNA对细胞内钙离子浓度的影响

18 ℃在处理细胞0.5~8 min的各个时相点细胞内的钙离子浓度均显著高于未处理对照组,其中从0.5~6 min时间段细胞内的钙离子浓度呈明显渐进上升趋势,6 min后出现平台期(表2)。冷刺激处理细胞6 min时,5、10、15 μmol/L BCTC可显著抑制冷刺激所诱导的钙离子内流,但15 μmol/L BCTC的抑制作用明显强于5、10 μmol/L BCTC($P<0.05$)。TRPM8 shRNA的转染可显著阻断冷刺激所诱导的细胞内钙离子浓度升高($P<0.05$),而scramble TRPM8 shRNA则对冷刺激所诱导的细胞内钙离子浓度没有显著影响($P>0.05$,表2)。鉴于15 μmol/L BCTC对1 mmol/L薄荷醇及冷刺激所诱导的细胞内钙离子浓度升高的抑制作用显著强于5、10 μmol/L BCTC,所以在后续的实验中选择15 μmol/L作为最终的实验浓度。

2.5 TRPM8受体激活对PLCδ1-PH-GFP转位变化的影响

16HBE细胞表达PLCδ1-PH-GFP作为PLCδ1-PH-GFP组,表达pEGFP-N1载体的细胞作为对照组。结果显示,对照组细胞给予薄荷醇或冷刺激处理前后,GFP的绿色荧光未见转位变化,均持续呈细胞质与胞膜非特异性分布(Fm/Fc值与未处理对照组比较,P值均>0.05,表3、图3)。在PLCδ1-PH-GFP组,薄荷醇及冷刺激处理前,可见绿色荧光在胞膜上浓集,而在细胞质呈低亮度及不均匀分布;给予薄荷醇或冷刺激处理后,胞膜的绿色荧光渐降低同时细胞质荧光渐变亮,其动力学特征为:在给予薄荷醇处理60 s后即出现明显的绿色荧光转位(Fm/Fc值与未处理对照组比较,$P<0.05$),在60~200 s期间呈持续绿色荧光转位,并于给药200 s后出现转位的停滞状态;在给予冷刺激处理60 s后即出现明显的绿色荧光转位(Fm/Fc值与未处理对照组比较,$P<0.05$),在60~220 s期间呈持续绿色荧光转位,继之进入转位的停滞状态(表3)。BCTC及TRPM8 shRNA对绿色荧光的转位有显著的抑制作用,其中在薄荷醇+BCTC、薄荷醇+TRPM8 shRNA处理细胞200 s时,其Fm/Fc值与薄荷醇组比较差异有统计学意义($P<0.05$);18 ℃+BCTC、18 ℃+TRPM8 shRNA处理细胞220 s时,其Fm/Fc值与冷刺激组比较差异有统计学意义($P<0.05$,表3)。

表1 人气道上皮细胞经1 mmol/L薄荷醇、BCTC及TRPM8 shRNA处理后细胞内钙离子荧光强度的动态变化($n=5,\bar{x}\pm s$)

组别	0.5 min	1 min	2 min	4 min	6 min	8 min
0 mmol/L薄荷醇	1.02±0.08	1.06±0.10	1.03±0.10	1.04±0.12	1.03±0.08	1.04±0.10
1 mmol/L薄荷醇	2.24±0.13[a]	2.87±0.12[a]	4.47±0.35[a]	5.73±0.18[a]	5.82±0.32[a]	5.76±0.25[a]
1 mmol/L薄荷醇+BCTC 5 μmol/L	2.22±0.14[a]	2.24±0.15[a]	2.25±0.14[a]	2.68±0.19[a]	2.57±0.22[a]	2.30±0.20[a]
1 mmol/L薄荷醇+BCTC 10 μmol/L	2.00±0.10[a]	1.76±0.2[a]	1.70±0.18[a]	2.26±0.23[a]	1.84±0.17[a]	2.33±0.24[a]
1 mmol/L薄荷醇+BCTC 15 μmol/L	1.28±0.10[a]	1.08±0.14	0.95±0.12	1.23±0.17[a]	0.67±0.09[a]	1.20±0.18[a]
1 mmol/L薄荷醇+TRPM8 shRNA	1.12±0.05[a]	1.08±0.10	1.18±0.15	1.08±0.16	1.12±0.12	1.08±0.07
1 mmol/L薄荷醇+scramble TRPM8 shRNA	2.38±0.12[a]	2.80±0.31[a]	4.38±0.39[a]	5.55±0.25[a]	5.77±0.44[a]	5.68±0.35[a]

a:$P<0.05$,与0 mmol/L薄荷醇组比较

表2 人气道上皮细胞经冷刺激、BCTC及TRPM8 shRNA处理后细胞内钙离子荧光强度的动态变化($n=5,\bar{x}\pm s$)

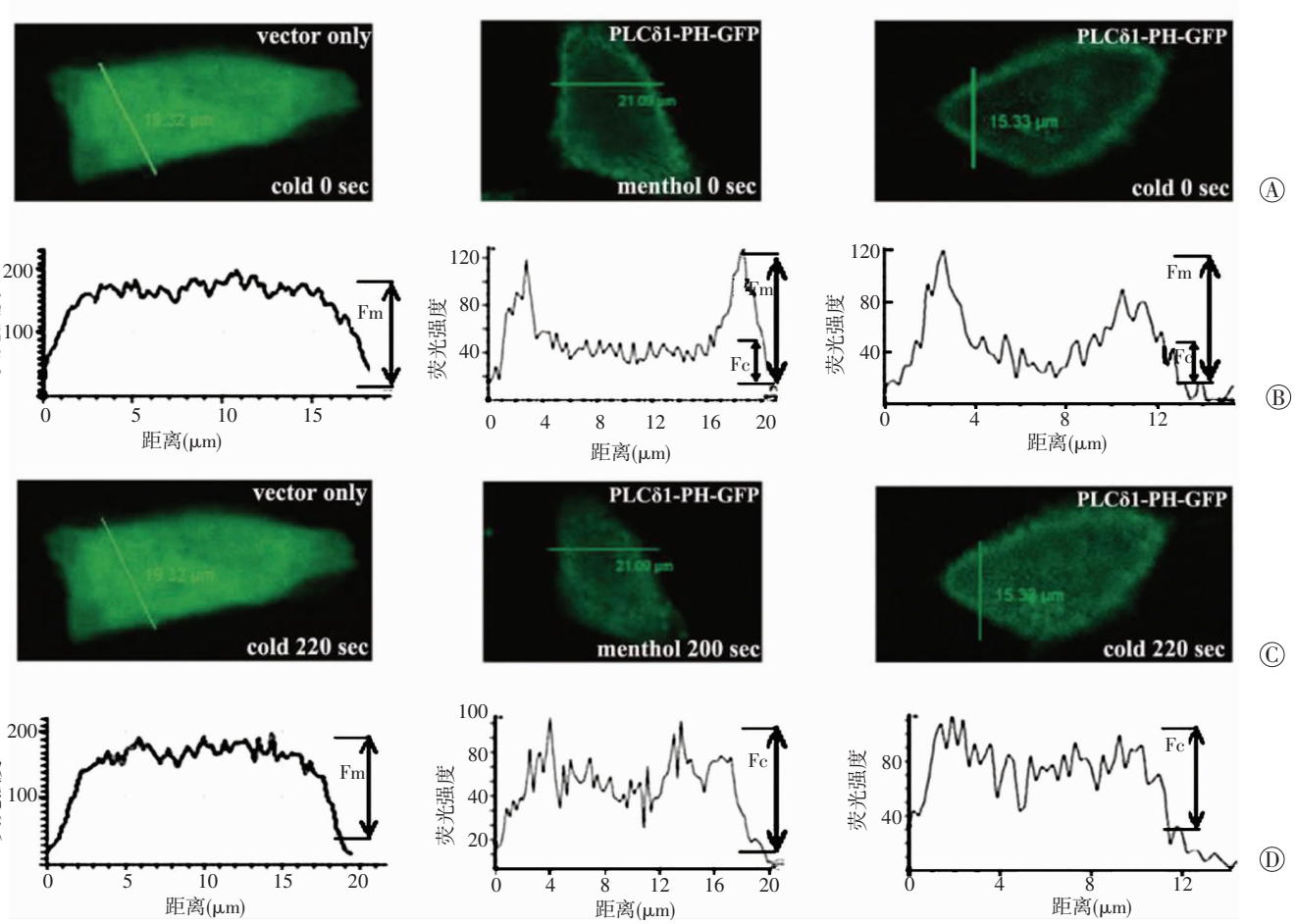
组别	0.5 min	1 min	2 min	4 min	6 min	8 min	10 min
未处理对照组	1.02±0.08	1.06±0.10	1.03±0.10	1.04±0.12	1.03±0.08	1.04±0.10	1.03±0.12
18 ℃	2.30±0.20[a]	3.18±0.29[a]	3.32±0.29[a]	3.94±0.30[a]	5.02±0.36[a]	4.98±0.34[a]	4.97±0.24[a]
18 ℃+BCTC 5 mol/L	1.52±0.12[a]	1.44±0.18[a]	1.55±0.20[a]	1.52±0.24[a]	1.77±0.22[a]	2.46±0.20[a]	2.70±0.18[a]
18 ℃+BCTC 10 mol/L	1.44±0.20[a]	1.35±0.18[a]	1.50±0.18[a]	1.80±0.18[a]	1.70±0.23[a]	1.90±0.27[a]	2.10±0.25[a]
18 ℃+BCTC 15 mol/L	1.10±0.16	1.22±0.18[a]	1.10±0.20	1.08±0.20	1.18±0.20	1.80±0.25[a]	1.60±0.20[a]
18 ℃+TRPM8 shRNA	0.82±0.12[a]	1.00±0.15	0.98±0.18	0.98±0.10	1.02±0.20	1.21±0.20[a]	1.00±0.10
18 ℃+scamble TRPM8 shRNA	2.12±0.28[a]	3.01±0.27[a]	3.18±0.32[a]	3.90±0.35[a]	4.66±0.31[a]	4.62±0.14[a]	4.63±0.32[a]

a:$P<0.05$,与未处理对照组比较

表3 PLCδ1-PH-GFP转染的人气道上皮细胞经薄荷醇、冷刺激、BCTC、TRPM8 shRNA分组处理后Fm/Fc值动态变化($n=3,\bar{x}\pm s$)

组别	0 s	60 s	100 s	160 s	200 s	220 s	260 s
载体+1 mmol/L薄荷醇	0.10±0.01	0.98±0.01	1.00±0.01	1.01±0.02	0.99±0.01	0.98±0.01	1.02±0.02
1 mmol/L薄荷醇	0.10±0.01	0.90±0.01[a]	0.82±0.03[a]	0.58±0.04[a]	0.36±0.06[a]	0.36±0.07[a]	0.33±0.07[a]
1 mmol/L薄荷醇+BCTC 15 μmol/L	0.10±0.01	0.97±0.01[b]	0.92±0.02[ab]	0.85±0.04[ab]	0.86±0.03[ab]	0.82±0.04[ab]	0.80±0.04[ab]
1 mmol/L薄荷醇+TRPM8 shRNA	0.10±0.01	0.95±0.01[a]	0.96±0.04[b]	0.90±0.03[ab]	0.89±0.02[ab]	0.87±0.02[ab]	0.88±0.04[ab]
载体+18 ℃	0.10±0.01	1.01±0.01	0.97±0.02	0.99±0.11	1.03±0.01	1.00±0.00	0.99±0.01
18 ℃	0.10±0.01	0.90±0.01[a]	0.85±0.03[a]	0.68±0.04[a]	0.49±0.05[a]	0.40±0.06[a]	0.38±0.04[a]
18 ℃+BCTC 15 μmol/L	0.10±0.01	0.97±0.02[c]	0.89±0.02[a]	0.84±0.02[ac]	0.83±0.02[ac]	0.84±0.02[ac]	0.83±0.02[ac]
18 ℃+TRPM8 shRNA	0.10±0.01	0.98±0.01[c]	0.96±0.02[ac]	0.95±0.02[ac]	0.92±0.01[ac]	0.93±0.01[ac]	0.91±0.02[ac]

a:$P<0.05$,与未处理对照组(薄荷醇及冷刺激处理0 s时);b:$P<0.05$,与1 mmol/L薄荷醇组比较;c:$P<0.05$,与18 ℃组比较



A、C：细胞分别转染 pEGFP-N1 vector 及 PLCδ1-PH-GFP 于处理前、后的荧光分布激光共聚焦成像；B、D：分别为 A、C 对应转染 pEGFP-N1 vector 及 PLCδ1-PH-GFP 于处理前、后的线上荧光强度变化

图 3　激光共聚焦扫描显微镜检测薄荷醇及冷刺激诱导 PLCδ1-PH-GFP 从细胞膜至细胞质的转位

3　讨论

TRP 蛋白是细胞膜及细胞器膜上的重要非选择性阳离子通道，具有 6 个跨膜结构域，通过形成功能性同聚或异聚四聚体而发挥作用，其 N 末端和 C 末端均在胞内[9]。TRPM 的 C-末端存在一个 TRP 结构域（TRP domain），在 TRPM 家族中高度保守，TRP 结构域参与调节 TRPM 通道的功能[10]。Sabnis 等[3]发现人肺上皮细胞、正常人支气管上皮细胞（NHBE）和 BEAS-2B 表达的 TRPM8 变异体为 N-末端的截短型，TM2 缺失，保留了重要的功能结构。关于 TRPM8 结构与功能的关系，相关研究表明[11]：位于 TRPM8 的 TM4 和 TM4-5 交联子内的残基与冷觉有关，TRPM8 变异体保留了 TM4 和 TM4-5 交联子，故拥有感知冷的能力。此外，诱变作用证实：TM2 内的 Y745 残基，C 末端 TRP 结构域中的 Y1005 和 L1009 残基[12]，TM4 和 TM4-5 交联子内的 H845、R851、R862 残基为薄荷醇活化 TRPM8 的重要残基[13]。由此我们可以推测 TRPM8 变异体为具有功能的四聚体结构，具有与 TRPM8 相同的特性。

TRPM8 作为 TRP 家族的一员，是一种非选择性阳离子通道[14]，其激活后主要引起细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高。本实验显示，薄荷醇、冷空气作用于人气道上皮细胞可以引起细胞内 Ca^{2+} 浓度呈时间相关性的明显升高，该激动效应可以被 TRPM8 受体拮抗剂 BCTC、TRPM8 shRNA 阻断。因此，在人气道上皮细胞上表达的 TRPM8 受体异构体为有功能的受体蛋白。

TRPM8 作为一种冷敏感受体[15]其激活后可引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高，进而激活下游 PKC 信号通路，导致白细胞介素（IL）-6、IL-8、肿瘤坏死因子-α 的表达及生成增多[16]。Ca^{2+} 可以活化磷脂酶 C（phospholipase，PLC），活化的 PLC 使 PIP2 降解为三磷酸肌醇（inositol triphosphate，IP3）和二酰甘油（diacylglycerol，DAG），IP3 及 DAG 可作为某些第二信使的前体。其中 IP3 作用于内质网上受体，引起细胞内钙库释放钙，

使细胞内 Ca^{2+} 浓度进一步升高。而留在细胞膜上的DAG作为蛋白激酶C(protein kinase C,PKC)的上游信号因子,可次第激活PKC,活化的PKC可以通过磷酸化作用激活富含丙氨酸的豆蔻酰化蛋白激酶C的作用底物(myristoylated alanine-rich C kinase substrate,MARCKS),激活的MARCKS转至细胞质内与肌动蛋白及肌球蛋白的连接在形成收缩装置,使颗粒移向细胞顶膜并准备分泌,即通过胞吐作用产生黏液分泌等反应[17]。我们已经通过基因突变技术证实TRPM8及MARCKS在冷激诱导气道上皮细胞内MUC5AC的分泌过程中有重要作用[18]。

本实验借助于荧光融合蛋白(PLCδ1-PH-GFP)的PH结构域能选择性地结合PIP2[19],作为荧光探针详细地观察了在薄荷醇或冷刺激作用于细胞后,PIP2在细胞膜及细胞质内分布的时间-空间动力学特征,并在此基础上系统地比较了TRPM8特异性阻断剂BCTC及TRPM8 shRNA对PIP2分布的动态影响。本实验结果显示,PLCδ1-PH-GFP组薄荷醇及冷刺激处理前,可见绿色荧光在胞膜上浓集,而在细胞质呈低亮度及不均匀分布;给予薄荷醇或冷刺激处理后,胞膜的绿色荧光渐降低同时细胞质荧光渐变亮,并分别于给药200 s、冷刺激220 s后达转位高峰,继之进入转位的停滞状态。而TRPM8受体阻断剂BCTC及TRPM8 shRNA对绿色荧光的转位有显著的抑制作用。

本研究结果证实:TRPM8是人气道上皮细胞感受冷刺激的主要受体,其被冷刺激激活后可引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高及PIP2的水解,并通过TRPM8→Ca^{2+}→PLC→PIP2信号通路来实现气道上皮细胞对冷刺激的应答,从而引起气道炎症因子的生成增多、气道黏液的高水平分泌,最终加重了慢性炎症性疾病的症状。

参考文献:

[1] Seys S F, Daenen M, Dilissen E, *et al*. Effects of high altitude and cold air exposure on airway inflammation in patients with asthma[J]. Thorax, 2013, 68(10): 906-913.

[2] Donaldson G C, Goldring J J, Wedzicha J A. Influence of season on exacerbation characteristics in patients with COPD[J]. Chest, 2012, 141(1): 94-100.

[3] Sarria I, Ling J, Xu G Y, *et al*. Sensory discrimination between innocuous and noxious cold by TRPM8-expressing DRG neurons of rats[J]. Mol Pain, 2012, 8: 79.

[4] Almaraz L, Manenschijn J A, de-la-Pena E, *et al*. TRPM8[J]. Handb Exp Pharmacol, 2014, 222: 547-579.

[5] Grace M S, Dubuis E, Birrell M A, *et al*. Pre-clinical studies in cough research: role of Transient Receptor Potential (TRP) channels[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2013, 26(5): 498-507.

[6] Yudin Y, Rohacs T. Regulation of TRPM8 channel activity[J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 352(1/2): 68-74.

[7] Sabnis A S, Shadid M, Yost G S, *et al*. Human lung epithelial cells express a functional cold-sensing TRPM8 variant[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2008, 39(4): 466-474.

[8] 邬海桥, 李琪, 周向东. 茶黄素和表皮生长因子受体对气道黏液分泌的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2009, 32(1): 27-32.

[9] Grace M S, Baxter M, Dubuis E, *et al*. Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(10): 2593-2607.

[10] Kuhn F J, Witschas K, Kuhn C, *et al*. Contribution of the S5-pore-S6 domain to the gating characteristics of the cation channels TRPM2 and TRPM8[J]. J Biol Chem, 2010, 285(35): 26806-26814.

[11] Voets T, Owsianik G, Janssens A, *et al*. TRPM8 voltage sensor mutants reveal a mechanism for integrating thermal and chemical stimuli[J]. Nat Chem Biol, 2007, 3(3): 174-182.

[12] Montell C. A mint of mutations in TRPM8 leads to cool results[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(4): 466-468.

[13] Bandell M, Dubin A E, Petrus M J, *et al*. High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol[J]. Nat Neurosci, 2006, 9(4): 493-500.

[14] DeFalco J, Duncton M A, Emerling D. TRPM8 biology and medicinal chemistry[J]. Curr Top Med Chem, 2011, 11(17): 2237-2252.

[15] Daniels R L, Takashima Y, McKemy D D. Activity of the neuronal cold sensor TRPM8 is regulated by phospholipase C via the phospholipid phosphoinositol 4,5-bisphosphate[J]. J Biol Chem, 2009, 284(3): 1570-1582.

[16] 李敏超, Perelman J M, Kolosov V P, 等. 瞬时受体电位M8离子通道对冷刺激诱导气道上皮细胞炎症反应的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(10): 757-761.

[17] Lampe W R, Park J, Fang S, *et al*. Calpain and MARCKS protein regulation of airway mucin secretion[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2012, 25(6): 427-431.

[18] 李敏超, 尤列·皮尔曼, 周向东. MARCKS磷酸化对冷刺激诱导人气道上皮细胞MUC5AC分泌的影响[J]. 中南大学学报:医学版, 2012, 37(5): 447-452.

[19] Mulet X, Rosivatz E, Ho K K, *et al*. Spatial localization of PtdInsP2 in phase-separated giant unilamellar vesicles with a fluorescent PLC-delta 1 PH domain[J]. Methods Mol Biol, 2009, 462: 135-144.

(**收稿**:2014-03-25;**修回**:2014-07-18)

(编辑 栾 嘉)