文章编号:1000-5404(2014)21-2183-04

论著

瞬时感受器电位通道在人脑微血管内皮细胞机械牵张中的作用及其信号转导机制

孙彦龙[1],王志明[1],蒲九君[1],周 辉[1],唐寅斌[1],夏海龙[2],杨 刚[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院神经外科[1];400020 重庆,重庆市红十字会医院神经外科[2])

[摘要] **目的** 观察瞬时感受器电位(transient receptor potential,TRP)通道在人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells,HBMEC)机械牵张刺激中的作用,并对其信号转导入胞内的机制进行初步探讨。**方法** HBMEC体外培养,采用多功能小型生物撞击机给予机械牵张刺激,根据不同施加条件将细胞分为对照、单纯牵张、牵张+SKF-96365(非选择性TRP通道阻滞剂)、牵张+低分子量肝素(low molecular weight heparin,LMWH)、牵张+一氧化氮合酶抑制剂(N-nitro-l-arginine methyl ester,L-NAME)共5组。采用激光扫描共聚焦显微镜观察胞内游离Ca^{2+}分布情况,流式细胞仪检测牵张前后胞内Ca^{2+}荧光强度变化;Western blot检测牵张前后一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase,eNOS)蛋白表达情况。**结果** 流式细胞仪检测结果显示,单纯牵张组和牵张+LMWH组细胞内游离Ca^{2+}浓度较对照组显著升高($P<0.05$);牵张+SKF-96365组胞内Ca^{2+}浓度较单纯牵张组明显降低($P<0.05$)。Western blot检测结果显示,单纯牵张组细胞eNOS蛋白表达水平明显增高($P<0.05$);牵张+SKF-96365组和牵张+L-NAME组eNOS蛋白表达水平较单纯牵张组明显降低($P<0.05$)。**结论** HBMEC胞膜TRP通道可感知机械牵张刺激的激活,继而引起胞内游离钙离子浓度升高,其转导机制可能主要与胞外Ca^{2+}内流相关。

[关键词] 机械牵张刺激;瞬时感受器电位通道;钙离子内流
[中图法分类号] R322.12; R329.26; R329.27 [文献标志码] A

Effects of TRP channels on mechanical stretch of brain microvascular endothelial cells and its mechanism of signaling pathway

Sun Yanlong[1], Wang Zhiming[1], Pu Jiujun[1], Zhou Hui[1], Tang Yinbin[1], Xia Hailong[2], Yang Gang[1] ([1]Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Neurosurgery, Chongqing Red Cross Hospital, Chongqing, 400020, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the effects of transient receptor potential (TRP) channels on stretch-induced injury of human brain microvascular endothelial cells (HBMECs) and to explore its mechanism of signaling pathway. **Methods** After mechanical stretch by a mini-type multi-functional bio-impact machine, HBMECs were divided into a control group, a stretch group, a stretch + SKF-96365 group, a stretch + low-molecular-weight heparin (LMWH) group and a stretch + N-nitro-l-arginine methyl ester (L-NAME) group. The concentrations of free calcium ion in the cells before and after mechanical stretch were observed by confocal laser scanning microscopy and determined by flow cytometry. The expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein was detected by Western blotting. **Results** The concentration of free calcium ion detected by flow cytometry increased in the stretch group and stretch + LMWH group ($P<0.05$), and decreased in the stretch + SKF-96365 group ($P<0.05$). The expression of eNOS protein detected by Western blotting increased in the stretch group ($P<0.05$) and decreased in the stretch + SKF-96365 group and stretch + L-NAME group ($P<0.05$). **Conclusion** The activation of TRP channels in HBMECs induced by mechanical stretch increases the free calcium concentration and the expression of eNOS protein. The mechanism may involve the influx of extracellular calcium ions.

[**Key words**] mechanical stretch; transient receptor potential channel; influx of calcium

Supported by the Construction Project of National Clinical Key Specidities (2011-170) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2013jcyjA10079). Corresponding author: Yang Gang, Tel: 86-23-89011151, E-mail: yg_angcq@163.com

[基金项目] 国家临床重点专科建设项目(财社[2011]170号);重庆市科委自然科学基金(CSTC2013jcyjA10079)
[通信作者] 杨 刚,电话:(023)89011151,E-mail:yg_angcq@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140821.1328.006.html(2014-08-21)

下丘脑区病变合并高钠或低钠血症较为常见，研究认为下丘脑部位手术后水电解质失衡主要存在尿崩症、抗利尿激素分泌不当综合征（syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion，SIADH）和脑性盐耗综合征（cerebral salt-wasting syndrome，CSWS）3种类型[1]，SIADH多发生于术后7 d左右[2]，CSWS常见于蛛网膜下腔出血[3]。临床发现鞍区病变（垂体腺瘤、颅咽管瘤等）显微手术后1～2 d常出现具有自限性的水电解质失衡。这一临床现象的原因及病理生理性机制尚不清楚。鞍区手术过程中显微器械的操作可对富含丰富微血管的垂体柄造成持续牵拉刺激，由此可对微血管内皮细胞产生持续的牵张力。研究表明，神经元胞膜上表达的与渗透压相关的瞬时感受器电位（transient receptor potential，TRP）通道，激活开放后使胞内游离Ca^{2+}浓度升高，进一步激活NO-cGMP经典通路，从而调节下丘脑精氨酸加压素（arginine vasopressin，AVP）的合成与分泌[4-5]。大量研究证实NO可影响下丘脑AVP的合成及分泌[6-9]，继而影响肾脏对水的重吸收作用导致机体水电解质失衡；由此可见术中对下丘脑垂体区域微血管的机械牵张刺激与感知机械力的TRP通道激活产生后续生物学分子效应存在相互交联点。本研究以人脑微血管内皮细胞（human brain microvascular endothelial cells，HBMEC）作为研究对象，采用流式细胞仪和Western blot方法分别检测各组细胞牵张前后胞内游离Ca^{2+}浓度和一氧化氮合酶蛋白表达水平，以明确TRP通道在HBMEC机械牵张刺激中的作用及其机械信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

1.1.1 主要试剂 非选择性TRP通道阻滞剂SKF-96365、肌醇三磷酸（inositol triphosphate，IP3）受体竞争性拮抗剂低分子量肝素（low molecular weight heparin，LMWH）、噻唑蓝（MTT）、二甲基亚砜（DMSO）（Sigma，美国）；anti-eNOS抗体（ab66127，Abcam，美国），一氧化氮合酶（eNOS）抑制剂N-硝基-L-精氨酸甲酯（N-nitro-l-arginine methyl ester，L-NAME）、钙离子荧光探针Fluo-3/AM、抗α-tubulin抗体（碧云天生物技术研究所）。

1.1.2 细胞 HBMEC株（ScienCell，美国）。

1.1.3 仪器 多功能小型生物撞击机（第三军医大学大坪医院野战外科研究所）；自动酶标仪（奥地利Tecan）；激光扫描共聚焦显微镜（Leica，德国）；流式细胞仪（BD公司，美国）；包被Ⅰ型胶原的6孔硅胶弹性膜培养板（Flexcell，美国）。

1.2 方法

1.2.1 HBMEC培养 采用完全培养基（4.5 g/L葡萄糖，3.7 g/L碳酸氢钠，4 mmol/L谷氨酰胺，10%胎牛血清，100 μg/mL青霉素，100 μg/mL链霉素），于5% CO_2、37 ℃细胞培养箱内培养，3～4 d传代1次。

1.2.2 分组 HBMEC以5×10^5/孔接种在包被Ⅰ型胶原的6孔硅胶弹性膜培养板上，于5% CO_2、37 ℃细胞培养箱内培养，待细胞生长融合至70%～80%后，分为5组。①对照组：10%胎牛血清培养液，不予机械牵张刺激；②单纯牵张组：机械牵张+10%胎牛血清培养液；③牵张+SKF-96365组：机械牵张+SKF-96365（10 μmoL/L）+10%胎牛血清培养液；④牵张+LMWH组：机械牵张+低分子量肝素（10 μmoL/L）+10%胎牛血清培养液；⑤牵张+L-NAME组：机械牵张+L-NAME（100 μmoL/L）+10%胎牛血清培养液。

1.2.3 机械牵张 牵张装置为多功能小型生物撞击机，通过控制开闭电磁阀和撞击力的变化，来改变密闭容器内的压力，继而导致弹性膜上的培养细胞发生拉伸变化。吸除各组弹性膜培养板中的培养液，与撞击机牵张装置相连接，并保持密封。使用计算机将驱动压力设定为30 cmH_2O，弹性膜可拉伸约30%，维持30次/min的牵张频率，牵拉：松弛时程为1∶1。牵张20 min后立即在各孔中加入1 mL培养液，根据观测指标不同分别做相应处置。实验重复6次。

1.2.4 机械牵张对HBMEC活性的影响 将细胞按5×10^5/孔接种于弹性膜培养板，5% CO_2、37 ℃细胞培养箱内培养，待细胞生长融合至70%～80%后，分为6组：空白对照组（无细胞生长，仅有培养基），阴性对照组（不予机械牵张刺激，仅加DMSO），牵张强度分别为10、20、30、40 cmH_2O的机械牵张组4组。根据各组不同牵张强度分别施予机械牵张刺激20 min，待牵张结束后，加入完全培养基并细胞计数，以1×10^4/mL将细胞悬液200 μL/孔接种于96孔酶标仪培养板内，置于5% CO_2、37 ℃培养箱内培养24 h，吸除96孔板培养基，避光操作滴加200 μL/孔培养基（无血清）+20 μL/孔MTT液（5 mg/mL），培养箱内孵育4 h，吸除培养基及MTT液，滴加150 μL/孔DMSO，室温下应用振荡器震荡10 min，于自动酶标仪上492 nm波长处测定光密度值[D(492)]，重复实验3次。按公式计算细胞生存率。细胞生存率=[实验组D(492)值－空白对照组D(492)值]/[阴性对照组D(492)值－空白对照组D(492)值]×100%。

1.2.5 激光扫描共聚焦显微镜观察胞内Ca^{2+}荧光情况 待牵张作用结束后，立即消化对照组和单纯牵张组弹性膜上的细胞，离心弃上清，D-Hanks液漂洗2次，于每份样本中加入5 μmoL/L的Ca^{2+}荧光探针Fluo-3/AM，培养箱中避光孵育40 min，离心，D-Hanks液漂洗2次，重悬于激光共聚焦培养小皿，于激光扫描共聚焦显微镜下观察2组细胞胞内Ca^{2+}荧光情况并摄像。

1.2.6 流式细胞仪检测细胞内游离Ca^{2+}浓度 待牵张作用结束后，立即消化对照组、单纯牵张组、牵张+SKF-96365组和牵张+LMWH组弹性膜上的细胞，离心弃上清，D-Hanks液漂洗2次，4%多聚甲醛固定15 min，离心，于每份样本中加入5 μmoL/L的Ca^{2+}荧光探针Fluo-3/AM，培养箱中避光孵育40 min，离心，D-Hanks液漂洗2次，于流式细胞仪上488 nm激光波长下检测细胞内游离Ca^{2+}浓度，以胞内Ca^{2+}的相对荧光强度代表其浓度。

1.2.7 Western blot检测eNOS蛋白表达 待牵张作用结束后，立即消化对照组、单纯牵张组、牵张+SKF-96365组、牵张+

L-NAME 组弹性膜上的细胞，离心弃上清，培养液重悬，接种于普通无菌 6 孔板，待细胞生长 24 h 后，加入细胞裂解液，细胞刮取细胞，4 ℃ 12 000 r/min 离心 25 min，取上清液，加入上样缓冲液强力混匀，煮沸 5 min 使蛋白变性，BCA 法测定蛋白浓度并标化；十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，电转至硝酸纤维膜，封闭液室温封闭 1 h，分别加入抗 eNOS 抗体（1∶500）、抗 α-tubulin 抗体（1∶1 000，内参）置于 4 ℃ 孵育过夜；山羊抗兔 IgG（H + L）、山羊抗小鼠 IgG（H + L）37 ℃孵育 1 h；按 1∶1 配制 A、B 发光液，凝胶成像仪与 Quantity One 软件照相显影，分析结果。采用 α-tubulin 为内参照。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 Tukey test 检验。

2 结果

2.1 机械牵张对 HBMEC 细胞活性的影响

较低强度的机械牵张刺激对细胞无明显损伤，但随着机械牵张刺激强度的增加，细胞出现水肿，贴壁能力下降，进一步增加机械牵张刺激强度，可见细胞的细胞质疏松，空泡明显增多，有不同程度的细胞死亡；当机械牵张刺激强度达到 40 cmH_2O 时，细胞生存率显著下降（表 1）；因此，后续研究采用 30 cmH_2O 作为 HBMEC 细胞的机械牵张刺激强度。

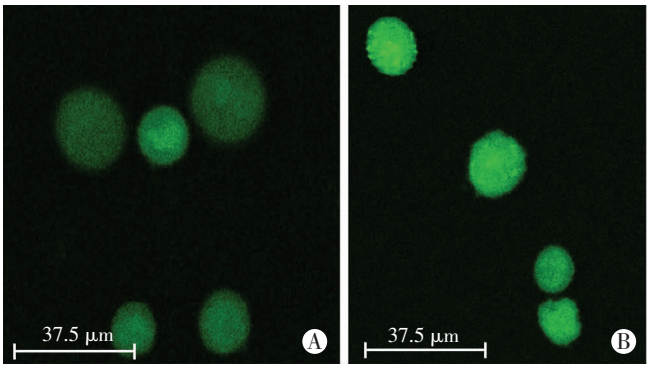
表 1 MTT 测定机械牵张刺激对 HBMEC 细胞活性的影响

组别		D(492)值	生存率(%)
空白对照组		0.115 ± 0.006	—
阴性对照组		0.822 ± 0.014	100
机械牵张组	10 cmH_2O	0.781 ± 0.019	94
	20 cmH_2O	0.758 ± 0.025	91
	30 cmH_2O	0.723 ± 0.029	86
	40 cmH_2O	0.489 ± 0.058	53

2.2 机械牵张刺激对 HBMEC 胞内 Ca^{2+} 浓度的影响

2.2.1 激光扫描共聚焦显微镜观测细胞内 Ca^{2+} 荧光强度

可见绿色荧光均匀分布于细胞内；细胞机械牵张刺激后与牵张前相比较，绿色荧光明显增强（图 1）。

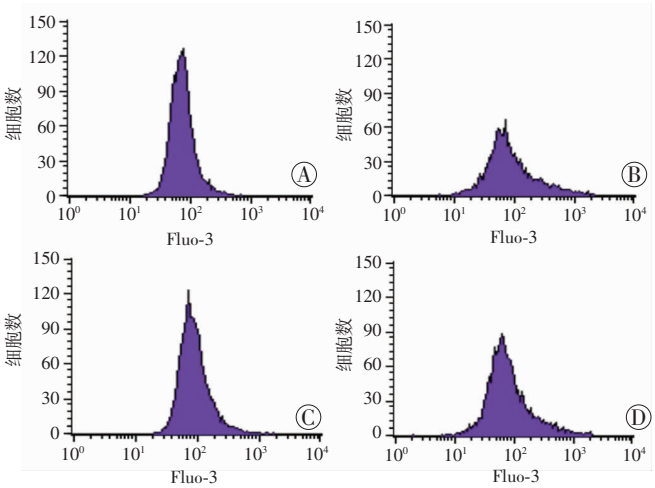


A：牵张前；B：牵张后

图 1 激光共聚焦显微镜观察细胞机械牵张前后胞内 Ca^{2+} 荧光强度

2.2.2 流式细胞仪检测细胞内 Ca^{2+} 相对荧光强度

对细胞施予机械牵张刺激后，胞内游离 Ca^{2+} 相对荧光强度（103.86 ± 7.05）较对照组（73.15 ± 8.20）明显增高（$P < 0.05$）；使用非选择性 TRP 通道阻滞剂 SKF-96365 阻断通道的激活，胞内游离 Ca^{2+} 相对荧光强度（79.12 ± 8.98）较单纯牵张组明显降低（$P < 0.05$）。当使用 IP3 受体拮抗剂 LMWH 作用于细胞时，牵张刺激后可见胞内 Ca^{2+} 相对荧光强度较对照组明显升高［（97.53 ± 8.06），$P < 0.05$，图 2］。

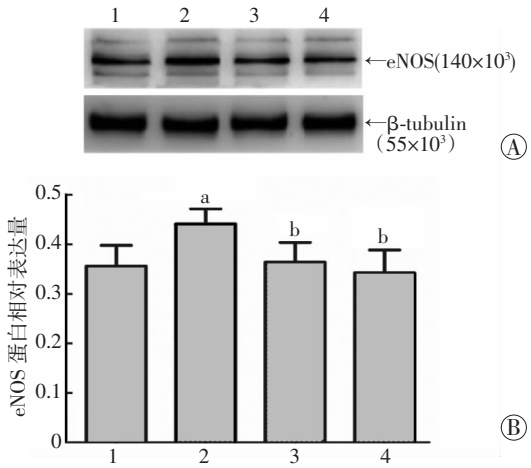


A：对照组；B：单纯牵张组；C：牵张 + SKF-96365 组；D：牵张 + LMWH 组

图 2 流式细胞仪检测各组细胞内 Ca^{2+} 相对荧光强度

2.3 机械牵张刺激对 HBMEC 胞质 eNOS 蛋白表达的影响

Western blot 检测结果显示，单纯牵张组细胞 eNOS 蛋白相对表达水平较对照组明显升高（$P < 0.05$）。使用 TRP 通道阻滞剂 SKF-96365 阻断细胞 TRP 通道的激活，细胞 eNOS 蛋白相对表达水平较单纯牵张组明显降低（$P < 0.05$）。使用一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 作用于细胞后，eNOS 蛋白表达水平较单纯牵张组明显降低（$P < 0.05$，图 3）。



A：Western blot 检测结果；B：定量分析结果；1：对照组；2：单纯牵张组；3：牵张 + SKF-96365 组；4：牵张 + L-NAME 组；a：$P < 0.05$，与对照组比较；b：$P < 0.05$，与单纯牵张组比较

图 3 Western blot 检测细胞牵张前后 eNOS 蛋白的表达

3 讨论

TRP 超家族中，TRPV、TRPC、TRPM 亚家族成员具有机械门控属性，可感受胞膜表面应力如拉伸力变化，

实现胞外机械信号向胞内的转导,调节胞内 Ca^{2+} 浓度,参与机械应力所致的多种生理病理过程,研究证实多种 TRP 通道蛋白表达于脑微血管内皮细胞[10-11]。

传统观点认为,经典通路胞内 Ca^{2+} 浓度升高致 NOS 表达增加所产生的 NO 作为一种神经递质或神经调质存在。NO 对 AVP 释放的作用已有广泛研究,可刺激或抑制:有实验研究显示 NO 可减少 AVP 释放[6];NOS 抑制剂 L-NAME 导致 AVP 释放增加[7]或减少[4];脑室内注射 NO 前体可引起 AVP 释放增加[8]。有研究把 NO 影响 AVP 分泌的矛盾效应归因于 NO 这一介质产生量的不同[9],但此研究结果并未获得广泛认可。NO 对 AVP 分泌影响研究结果不一,由此我们猜想可能这正预示着鞍区手术术后可出现高钠血症或低钠血症两种表现。

我们采用多功能小型生物撞击机作为细胞的机械牵张刺激来源,其原理为:用一定的正压使弹性膜发生拉伸变化,造成弹性膜上培养的细胞受到机械牵张刺激。此机械牵张模型可以精确地控制牵张力的大小、牵张频率及时间。本实验中以 30 cmH_2O 压力施加于人脑微血管内皮细胞,获得了 30% 机械牵张变形。

本实验结果显示,对 HBMEC 施予机械牵张刺激,胞内游离 Ca^{2+} 浓度明显增加,SKF-96365 作为非选择性 TRP 通道阻滞剂可阻断 TRP 通道的激活[10,12]。本实验中 SKF-96365 对 TRP 通道的阻断作用抑制了机械牵张刺激引起的胞内游离 Ca^{2+} 浓度的增加,表明 HBMEC 的 TRP 通道可感知机械牵张刺激激活,并参与机械信号转导过程,将机械信号转化为生物学信号引起胞内游离 Ca^{2+} 浓度增加,因此可明确 TRP 通道为 HBEMC 感知胞外机械牵张信号的关键中介。Ca^{2+} 为参与胞外机械牵张信号向胞内转导的最重要因子,胞内游离 Ca^{2+} 浓度的升高可由胞外 Ca^{2+} 内流,也可由胞内钙库释放,机械牵张信号转导入胞内机制到底如何?本研究采用可自由通过细胞膜发挥作用的 LMWH 来拮抗内质网 IP3 受体的激活[13],继而影响 Ca^{2+} 通道开放、钙库释放。本实验结果显示,使用 LMWH 并未阻断机械牵张刺激引起的 HBMEC 胞内游离 Ca^{2+} 浓度的升高,表明了胞内增多的游离 Ca^{2+} 主要来源于胞外。HBMEC 胞膜 TRP 通道感知机械牵张刺激并激活,引起胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高,其机械信号转导机制可能主要与胞外 Ca^{2+} 内流有关。本研究采用 eNOS 蛋白表达作为检测指标,对 HBMEC 细胞施予机械牵张刺激,细胞 eNOS 蛋白表达水平增高,使用 TRP 通道阻滞剂 SKF-96365 后阻断了机械牵张刺激引起的 eNOS 蛋白表达增多效应,L-NAME 作为 eNOS 表达的阻断剂[14]同样阻断了机械牵张刺激引起的 eNOS 蛋白表达增多效应,这表明 eNOS 作为 HBMEC 胞膜 TRP 通道激活后下游通路的一种信号分子存在。

综上所述,本研究明确了人脑微血管内皮细胞胞膜 TRP 通道可感知机械牵张刺激,进而导致胞内游离 Ca^{2+} 浓度升高,其实现胞外机械信号向胞内转导的机制主要与胞外 Ca^{2+} 内流相关。

参考文献:

[1] Yuan W. Managing the patient with transsphenoidal pituitary tumor resection[J]. J Neurosci Nurs, 2013, 45(2): 101-107.

[2] Park S J, Shin J L. Inflammation and hyponatremia: an underrecognized condition? [J]. Korean J Pediatr, 2013, 56(12): 519-522.

[3] Audibert G, Hoche J, Baumann A, *et al*. Water and electrolytes disorders after brain injury: mechanism and treatment[J]. Ann Fr Anesth Reanim, 2012, 31(6): e109-e115.

[4] Aguila F A, Oliveira-Pelegrin G R, Yao S T, *et al*. Anteroventral third ventricle (AV3V) lesion affects hypothalamic neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression following water deprivation[J]. Brain Res Bull, 2011, 86(3/4): 239-245.

[5] Oliveira-Pelegrin G R, Aguila F A, Basso P J, *et al*. Role of central NO-cGMP pathway in vasopressin and oxytocin gene expression during sepsis[J]. Peptides, 2010, 31(10): 1847-1852.

[6] Rossi N F, Beierwaltes W H. Nitric oxide modulation of ET(B) receptor-induced vasopressin release by rat and mouse hypothalamo-neurohypophyseal explants[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006, 290(5): R1208-R1215.

[7] Oliveira-Pelegrin G R, de-Azevedo S V, Yao S T, *et al*. Central NOS inhibition differentially affects vasopressin gene expression in hypothalamic nuclei in septic rats[J]. J Neuroimmunol, 2010, 227(1/2): 80-86.

[8] Stern J E, Filosa J A. Bidirectional neuro-glial signaling modalities in the hypothalamus: role in neurohumoral regulation[J]. Auton Neurosci, 2013, 175(1/2): 51-60.

[9] Correa P B, Pancoto J A, de-Oliveira-Pelegrin G R, *et al*. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis[J]. J Neuroimmunol, 2007, 183(1/2): 17-25.

[10] Berrout J, Jin M, O'Neil R G. Critical role of TRPP2 and TRPC1 channels in stretch-induced injury of blood-brain barrier endothelial cells[J]. Brain Res, 2012, 1436: 1-12.

[11] Balbuena P, Li W, Rzigalinski B A, *et al*. Malathion/oxon and lead acetate increase gene expression and protein levels of transient receptor potential canonical channel subunits TRPC1 and TRPC4 in rat endothelial cells of the blood-brain barrier[J]. Int J Toxicol, 2012, 31(3): 238-249.

[12] Guilbert A, Dhennin-Duthille I, Hiani Y E, *et al*. Expression of TRPC6 channils in human epithelial breast cancer cells[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 125.

[13] Mazak K, Beecher C N, Kraszni M, *et al*. The interaction of enoxaparin and fondaparinux with calcium[J]. Carbohydr Res, 2014, 384: 13-19.

[14] Lisi L, Tramutola A, Navarra P, *et al*. Antiretroviral agents increase NO production in gp120/IFNγ-stimulated cultures of rat microglia *via* an arginase-dependent mechanism[J]. J Neuroimmunol, 2014, 266(1/2): 24-32.

(**收稿**:2014-02-13;**修回**:2014-05-06)

(编辑 王小寒)