DOI:10.16016/j.2097-0927.202211062

肠胶质细胞系 TRPV4 依赖性 Ca^{2+} 内流、ATP 释放与炎症因子表达

谭千山[1],陈 君[1],谢会超[1],李立奇[1],陈帅帅[1],董 辉[2],肖卫东[1] 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院:普通外科[1],消化科[2]

[摘要] **目的** 探讨瞬时感受器电位离子通道香草素受体4(transient receptor potential vanilloid 4,TRPV4)在调节肠胶质细胞外 Ca^{2+} 内流中的作用及其意义。**方法** 收集大鼠肠胶质细胞系 CRL-2690、大鼠肠上皮细胞系 IEC6 和人胚肾细胞系 HEK293T 样本,采用 RT-qPCR、Western blot 和免疫荧光方法检测 TRPV4 的 mRNA、蛋白表达与定位;将 CRL-2690 细胞依次分为 GSK 组与 GSK+HC 组,低渗组与低渗+HC 组,$GdCl_3$ 组与 $GdCl_3$+HC 组以及 $CaCl_2$ 组与 $CaCl_2$+HC 组,采用 Fura-2 荧光探针和单细胞荧光 Ca^{2+} 检测仪评估 CRL-2690 细胞中 TRPV4 通道活性。将 CRL-2690 细胞分为对照组、GSK 组与 GSK+HC 组,通过荧光素-荧光素酶实验测量细胞 ATP 的释放水平;采用 RT-qPCR 检测炎症相关基因 GFAP、IL-1β、IL-6、IL-10 的 mRNA 表达。**结果** 在大鼠肠胶质细胞系 CRL-2690 中检测到 TRPV4 mRNA 和蛋白表达;TRPV4 特异性激动剂 GSK1016790A 和低渗透压刺激明显增强了 CRL-2690 细胞内钙荧光强度,而 TRPV4 特异性抑制剂 HC067047 可抑制此作用(0.430 38±0.063 65 *vs* 0.004 23±0.005 78,$P<0.000\ 1$);钙敏感受体(calcium-sensing receptor,CaSR)激活诱导的外 Ca^{2+} 内流也可被 HC067047 所抑制($P<0.05$);功能上,激活 TRPV4 可促 ATP 释放、EGC 反应性增生标志物 GFAP 和炎症因子 IL-1β、IL-6 的表达,并抑制抗炎因子 IL-10 的表达,该作用可被 HC067047 所抑制($P<0.05$)。**结论** 激活 TRPV4 可引起肠胶质细胞外 Ca^{2+} 内流,并促进 ATP 释放与炎症因子表达,可能参与肠道炎症的发生。

[关键词] 肠胶质细胞;瞬时感受器电位离子通道香草素受体4;Ca^{2+} 信号;三磷酸腺苷;炎症
[中图法分类号] R322.45;R329.27;R392.3 [文献标志码] A

Transient receptor potential vanilloid 4-dependent calcium influx, ATP release and expression of inflammatory factors in enteric glial cells

TAN Qianshan[1], CHEN Jun[1], XIE Huichao[1], LI Liqi[1], CHEN Shuaishuai[1], DONG Hui[2], XIAO Weidong[1]
[1]Department of General Surgery, [2]Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and physiological significance of transient receptor potential vanilloid receptor 4 (TRPV4) in regulation of calcium influx in rat intestinal glial cells. **Methods** The expression of TRPV4 at mRNA and protein levels and its localization were detected by RT-qPCR, Western blotting and immunofluorescence assay in rat enteric glial cell line CRL-2690, rat intestinal epithelial cell line IEC6 and human embryonic kidney cell line HEK293T. The CRL-2690 cells were divided into GSK1016790A (GSK, TRPV4-specific agonist) group and GSK + HC067047 (HC, TRPV4-specific inhibitor) group, hypotonic group and hypotonic+HC group, $GdCl_3$ group and $GdCl_3$+HC group, and $CaCl_2$ group and $CaCl_2$+HC group, while the activity of TRPV4 channel was assessed by Fura-2 fluorescent probe and single-cell fluorescent calcium ion assay. CRL-2690 cells were also divided into control group, GSK group and GSK+HC group, and the level of cellular ATP release was measured by luciferin-luciferase assay, and the mRNA levels

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82270585;81770524);重庆英才计划(15014);陆军军医大学高新技术培育项目(CX2019JS212)
[通信作者] 肖卫东,E-mail:xiaoweidong@tmmu.edu.cn

2097-0927/Copyright © 2023, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

of inflammatory genes GFAP, IL-1β, IL-6 and IL-10 were detected by RT-qPCR. **Results** TRPV4 was expressed at mRNA and protein levels in rat intestinal glial cell line CRL-2690. GSK and low osmolarity stimulation significantly enhanced intracellular calcium fluorescence intensity in CRL-2690 cells, which was inhibited by HC (0.430 38±0.063 65 *vs* 0.004 23±0.005 78, $P<0.000\ 1$). Calcium-sensing receptor (CaSR) activation-induced Ca^{2+} influx was also inhibited by HC ($P<0.05$). Functionally, activation of TRPV4 promoted ATP release, expression of EGC reactive proliferation marker, GFAP, and inflammatory factors IL-1 β as well as IL-6, and inhibited the expression of anti-inflammatory factor IL-10 respectively. But all these effects were inhibited by HC treatment ($P<0.05$). **Conclusion** Activation of TRPV4 induces extracellular Ca^{2+} influx and promotes ATP release and expression of inflammatory cytokines in enteric glial cell, which may be closely involved in the underlying mechanisms of bowel inflammation.

[**Key words**] enteric glial cells; transient receptor potential vanilloid 4; Ca^{2+} signal; adenosine triphosphate; inflammation

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (82270585, 81770524), the Chongqing Talent Program (15014) and the High-Tech Cultivation Program of Army Medical University (CX2019JS212). Corresponding author: XIAO Weidong, E-mail: xiaoweidong@tmmu.edu.cn

肠胶质细胞(enteric glial cell,EGC)作为肠神经系统(enteric nervous system,ENS)的关键组分之一,近年来在肠稳态调控中的作用备受研究者关注。脊椎动物ENS中的EGC与神经元均来源于胚胎发育过程中的神经嵴喙部[1-2],共同组成了相对独立于中枢神经的具有自主调节功能的肠神经系统[3]。现有研究表明,EGC一方面可协同神经元参与胃肠道运动调节,另一方面EGC在包括肠屏障结构与功能维持[4]、肠腔内营养成分吸收与肠黏膜分泌、肠道菌群与微生态调控、肠免疫功能维护中均发挥着重要作用[5];本课题组前期研究也显示,在肠缺血再灌注损伤刺激下,EGC可分泌GDNF上调肠上皮间紧密连接蛋白表达,增强肠屏障功能,发挥肠保护作用[6]。因此,进一步阐明EGC的分子与细胞调节通路对于深入了解生理与不同病理条件下肠稳态调控机制、发现新型干预靶点具有重要意义。

Ca^{2+}是介导EGC与肠神经元之间通讯的关键介质。近来有研究显示,EGC胞内Ca^{2+}流动可通过作用于肠神经元来激活肠道动力,而干预ENS中半通道蛋白connexin-43可改变EGC之间以及EGC-神经元之间Ca^{2+}流动以及ATP依赖性神经传导,抑制肠道蠕动[7],这也被认为可能是肠道炎症以及假性肠梗阻发生的重要机制[8-9]。但有关EGC Ca^{2+}与肠道炎症之间的调节机制仍有待进一步阐明。瞬时感受器电位离子通道香草素受体4(transient receptor potential vanilloid 4,TRPV4)是一种非选择性Ca^{2+}通道蛋白,其活化后介导Ca^{2+}内流,参与多种生理功能调控,同时能被包括机械刺激、热和内源性花生四烯酸代谢物(环氧二十三烷酸)在内的多种物理化学刺激以及炎症刺激激活,参与炎症反应[10-11]。目前研究已证实TRPV4在肠上皮细胞、肠巨噬细胞和肠神经元等细胞中的表达[12-14]。TRPV4的激活会导致细胞内Ca^{2+}浓度上升、趋化因子释放,从而导致结肠炎发病率以及上皮屏障通透性的增加[15-16],相关调控机制尚须进一步阐明。

目前有关TRPV4在EGC中表达及相关作用仍未见报道。EGC作为肠道免疫与肠屏障稳态的调节者,其对周围环境作出的反应可能与胞内Ca^{2+}信号密切相关,但目前尚不清楚TRPV4是否参与EGC的炎症调节功能。本研究利用体外EGC培养模型验证了TRPV4在EGC中的表达,使用TRPV4特异性激动剂及拮抗剂观察到了其对EGC细胞ATP释放、炎症相关基因GFAP、IL-1β、IL-6、IL-10表达及外钙内流的明显影响,提示EGC可能通过TRPV4-Ca^{2+}信号参与肠道炎症的进程。

1 材料与方法

1.1 试剂与耗材

TRPV4激动剂GSK1016790A、TRPV4拮抗剂HC067047和CaSR特异性激动剂$GdCl_3$购自MCE公司(美国);$CaCl_2$购自上海生工(中国);ATP检测试剂盒购自碧云天(中国);胎牛血清购自HyClone(美国);DMEM高糖培养基购自Gibco(美国);Furo-2/AM购自Invitrogen公司(美国);盖玻片购自鼎国昌盛(北京);12孔板购自Thermofisher公司(美国);实时定量RT-qPCR和反转录试剂盒购自TaKaRa公司(日本)。

1.2 细胞培养

大鼠肠胶质细胞系CRL-2690购自美国ATCC细胞库,培养于添加10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM高糖培养基中,置于5%CO_2的37 ℃细胞孵箱中培养。

1.3 单细胞荧光钙成像及离子浓度测定

将 CRL-2690 细胞适量接种到 12 孔爬片上,置于 5%CO_2 的 37 ℃细胞培养箱中培养 24 h。

1.3.1 激活 TRPV4 对肠胶质细胞内 Ca^{2+}信号的影响 准备 EGC 细胞爬片,并分为下列 2 组:①GSK(n=26);②GSK+HC(n=26);用生理盐溶液(PSS)漂洗细胞爬片,洗去爬片上残留的培养基,然后加载 Fura-2 乙酰氧基甲(acetoxymethyl,AM)[溶解于 0.01% F-127+0.1%DMSO 的正常生理盐溶液(PSS)中],37 ℃孵箱避光孵育 50 min,然后在 PSS 或 PSS+ HC067047 液中清洗至少 15 min。之后,将细胞爬片安装在徕卡 DMi8 显微镜载物台上的灌注室中,注入 PSS 或 PSS+HC067047 溶液 500 μL,圈选明亮且饱满的细胞,在室温(22 ℃)下使用增强型 CCD(ICCD200)相机记录加药前荧光基线变化,基线平稳后,在灌流室中加入 GSK1016790A (终浓度 0.5 nmol/L),使用 MetaFluor 成像系统连续监测 340、380 nm 激发波下细胞发出的 Fura-2 荧光比率,并记录下来以供后期分析。记录加药前后荧光比率的变化。

1.3.2 低渗 (Hypotonic)刺激对肠胶质细胞内 Ca^{2+}信号的影响 准备 EGC 细胞爬片,并分为下列 2 组:①低渗(n=35);②低渗+HC(n=29)。同上用 5 μmol/L Fura-2 乙酰氧甲酯(AM)PSS 溶液中避光孵育 50 min,孵育结束后用 PSS 清洗至少 15 min。如上述安装细胞爬片,灌流槽注入 PSS 溶液 500 μL,通过记录 F(340/380) 荧光比率来反映胞内 Ca^{2+}浓度的变化。基线平稳后,去掉 PSS 溶液并换为低渗液 500 μL (低渗液渗透压为 170 mOsm),继续观察待基线平稳,再将灌流槽中换为 PSS,记录 F(340/380) 荧光比率的变化。

1.3.3 细胞钙敏感受体 (Calcium sensitive receptor, CaSR)激活后外钙内流的 Ca^{2+}通道 准备 EGC 细胞爬片,并分为下列 4 组:①$GdCl_3$(n=9);②$GdCl_3$+HC(n=27);③$CaCl_2$(n=25);④$CaCl_2$+HC(n=30)。同上孵育细胞,用 PSS 或(PSS+HC067047 溶液)清洗 15 min,如上述安装细胞爬片,使用 CaSR 激动剂($GdCl_3$ 或 $CaCl_2$)刺激,记录 F(340/380) 荧光比率的变化。

F(340/380) 荧光比率即胞内 Ca^{2+}浓度的变化。ΔF(340/380)为添加药物后所有细胞 F(340/380)最大值减去加药前 F(340/380)基线值。PSS 溶液包含(mmol/L):140 Na^+、5 K^+、2 Ca^{2+}、147 Cl^-、10 HEPES 和 10 葡萄糖,pH=7.4;低渗溶液包含(mmol/L):70 Na^+、5 K^+、2 Ca^{2+}、77 Cl^-、10 HEPES 和 10 葡萄糖,pH=7.4。

1.4 RNA 提取和实时定量 PCR(RT-qPCR)

使用 RNAiso Plus 试剂(Cat. No. 9109, Takara, Japan)提取各细胞的总 RNA。使用 PrimeScript RT 聚合酶(Cat. No. R050A, TaKaRa, Japan)合成 cDNA。然后,将每个 cDNA 扩增 50 ng 作为模板,使用 Step One Plus 设备(Art. No. 272008342, Life Technologies, USA)和 SYBR® Premix Ex *Taq* Ⅱ试剂盒(Cat. No. RR820A, TaKaRa, Japan)进行 RT-qPCR。所有样品均为一式 3 份,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)作为内参基因。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量方法对数据进行量化,对内参基因 GAPDH 表达进行归一化,并以 TRPV4 与 GAPDH mRNA 水平的比率表示。引物设计见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列与片段长度

引物	序列(5′→3′)	片段长度/bp
GAPDH(Rat)	上游: CAAGGCTGTGGGCAAGGTCAT 下游: GCCTGCTTCACCACCTTCTTG	153
GAPDH(Human)	上游: AACGGATTTGGTCGTATTGGG 下游: CCTGGAAGATGGTGATGGGATT	211
TRPV4(Rat)	上游:CAGCAAGATCGAGAACCGCCAT 下游:CGAACTTACGCCACTTGTCCCT	80
TRPV4(Human)	上游: :CTACGGCACCTATCGTCACC 下游: TTAGGCGTTTCTTGTGGGTCA	215
GFAP(Rat)	上游:AGAGGAAGGTTGAGTCGCTGGAG 下游: AGAGCCGCTGTGAGGTCTGG	145
IL-1β(Rat)	上游: AATCTCACAGCAGCATCTCGACAAG 下游: TCCACGGGCAAGACATAGGTAGC	98
IL-6(Rat)	上游: ACTTCCAGCCAGTTGCCTTCTTG 下游: TGGTCTGTTGTGGGTGGTATCCTC	110
IL-10(Rat)	上游: CTGCATAGAAGCCTACGTGACACTC 下游: ACGAGGTTTTCCAAGGAGTTGCTC	137

1.5 Western blot 分析

全细胞裂解物在变性 10%或 12%的 SDS-PAGE 胶上分离,并转移到聚偏氟乙烯膜(Polyvinylidene fluoride, PVDF)上(Cat. No. ISEQ00010, Millipore, USA)。室温下将 PVDF 膜置于含 5%牛血清白蛋白的 TBST 封闭液中封闭 60 min,之后用特异性一抗于 4 ℃恒温孵育过夜:抗 TRPV4(Cat. No. ab39260,abcam)和抗 GAPDH(Cat. No. 5174S,Cell Signaling Technology),所有一抗稀释比例为 1∶1 000。用 TBST 冲洗 3 遍,每遍 10 min,在室温下将 PVDF 膜与 HRP 结合的抗兔(Cat. No. 7074P2,Cell Signaling Technology)二抗孵育 60 min。增强化学发光液(Cat. No. 34094, Thermo, USA)用于检测免疫反应条带。

1.6 免疫荧光检测

将细胞接种于 35 mm 培养皿的盖玻片上,在室温

下用4%多聚甲醛固定 15 min。用 PBS 清洗 3 次,每次 5 min。细胞在室温下用山羊血清封闭 60 min,然后用抗 TRPV4(Cat. No. ab39260,abcam)抗体或 GFAP(Cat. No. sc-33673,SANTA CRUZ)在 4 ℃下孵育过夜。细胞在 PBS 中洗涤 3 次后,用 Dylight 488(Cat. No. BS10017, bioworld)或 Alexa Fluor 647(Cat. No. A0468,碧云天)标记的二抗在室温下孵育 60 min。最后,用 DAPI(Cat. No. C0021,Solarbio)对细胞核染色 10 min。在共聚焦显微镜(ZEISS 880,德国)上捕捉图像。

1.7　ATP 检测

通过荧光素-荧光素酶测定法(ATP 检测试剂盒,S0026,碧云天)和酶标仪(VarioskanFlash, Thermo Scientific,USA),按照试剂盒说明书进行。各组细胞处理 24 h 后,取细胞培养液 20 μL,用于后续的测定。

1.8　统计学分析

应用 GraphPad Prism 8.0 绘图软件进行数据统计、分析和图片制作,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。2 组之间的比较采用独立样本 t 检验,多组之间比较则采用单因素方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

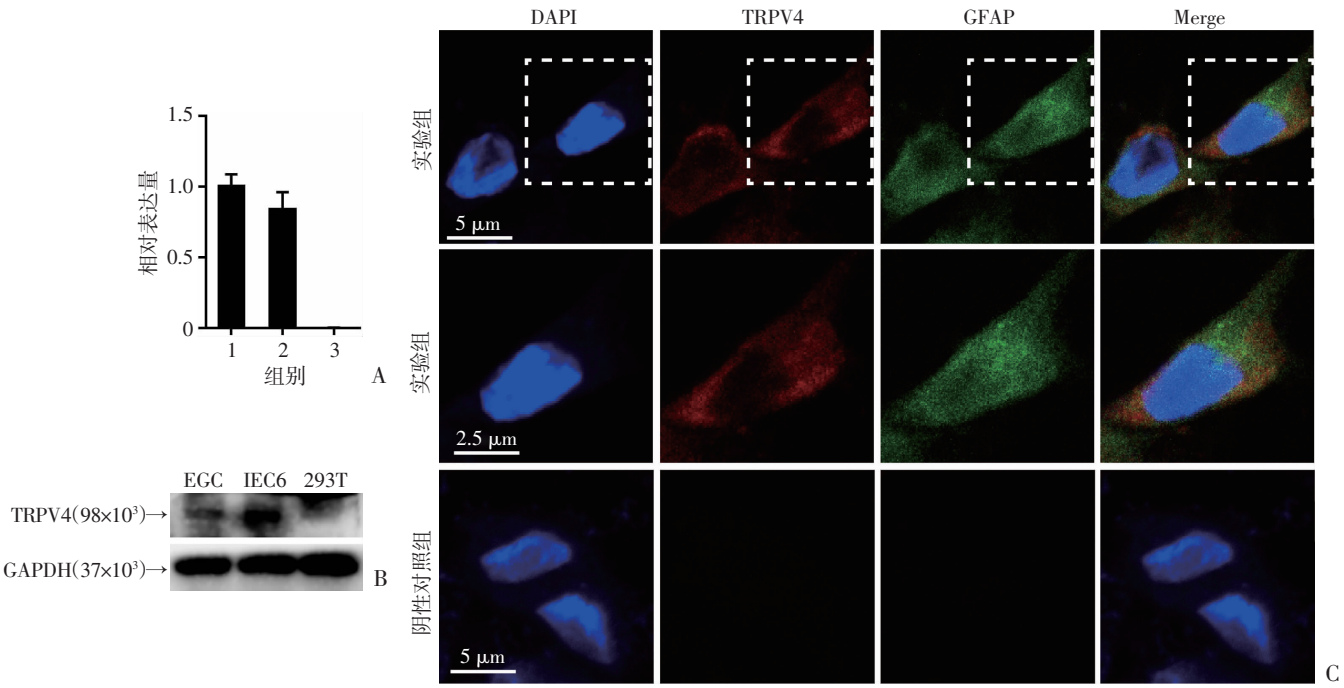
2　结果

2.1　TRPV4 在大鼠 EGC 细胞中的表达

首先检测 TRPV4 在大鼠肠胶质细胞系 CRL-2690、大鼠小肠上皮细胞系 IEC6(TRPV4 阳性对照细胞)以及人胚肾细胞系 HEK293T(TRPV4 阴性对照细胞)中的表达水平。RT-qPCR(图 1A)和 Western blot(图 1B)结果显示,TRPV4 在大鼠胶质细胞系 CRL-2690 和阳性对照细胞系 IEC6 均有表达,而在阴性对照细胞系 HEK293T 不表达。免疫荧光检测结果(图 1C)显示,TRPV4 在大鼠胶质细胞系 CRL-2690 与 EGC 标记蛋白 GFAP 存在细胞质内的阳性染色分布与共定位表达,进一步证实了 TRPV4 在大鼠胶质细胞系 CRL-2690 的表达。

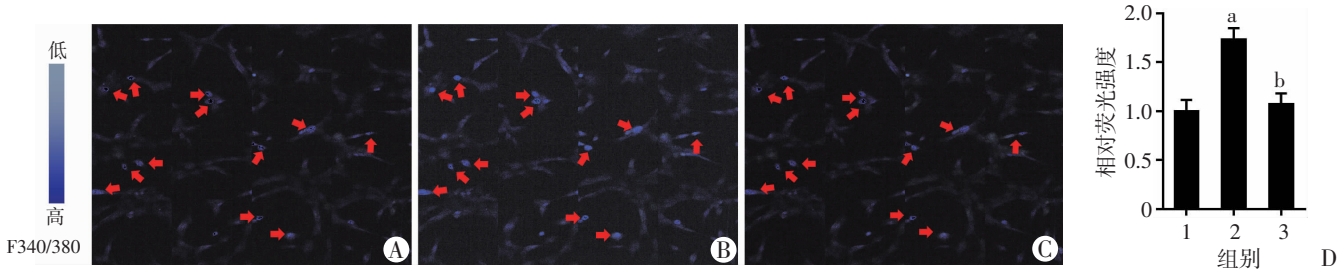
2.2　TRPV4 活性变化可引起 EGC 细胞内钙荧光信号

CRL-2690 细胞未进行药物处理时,F340/380 基线值较低,荧光呈灰色(图 2A);细胞加入 TRPV4 激动剂 GSK1016790A(GSK,0.5 nmol/L)后,F340/380 比值呈明显升高,荧光强度增加,荧光呈蓝色(图 2B);细胞加入 TRPV4 特异性抑制剂 HC067047(3 μmol/L)后,F340/380 荧光比率下降,荧光呈灰色,部分呈淡蓝色(图 2C)。以上结果显示(图 2D),细胞静息状态时,大鼠肠胶质细胞 CRL-2690 细胞质中 Ca^{2+} 浓度较低,而加药刺激细胞 TRPV4 活化后,细胞内 Ca^{2+} 浓度快速上升,反之抑制 TRPV4 活性则会抑制这一现象。



A、B: RT-qPCR 和 Western blot 分析 TRPV4 在 CRL-2690、IEC6 及 HEK293T 中的 mRNA 和蛋白水平　1: CRL-2690;2: IEC6;3: HEK293T;C:免疫荧光染色分析 TRPV4(红色)和 GFAP(绿色)蛋白在 CRL-2690 细胞中的表达与共定位　细胞核被 DAPI 染成蓝色

图 1　肠胶质细胞系 CRL-2690 中 TRPV4 的表达($n=3$)



A:对照组;B:GSK 组;C:GSK+HC 组;箭头示荧光变化;D:比较 3 组荧光强度变化　1:对照组;2: GSK 组;3: GSK+HC 组;a:$P<0.000\ 1$,与对照组比较;b: $P<0.000\ 1$,与 GSK 组比较

图 2　荧光钙成像观察加药处理前后 CRL-2690 细胞内 Ca^{2+}信号荧光强度变化($n=13$)

2.3　化学刺激 TRPV4 增加 EGC 细胞内 Ca^{2+}信号

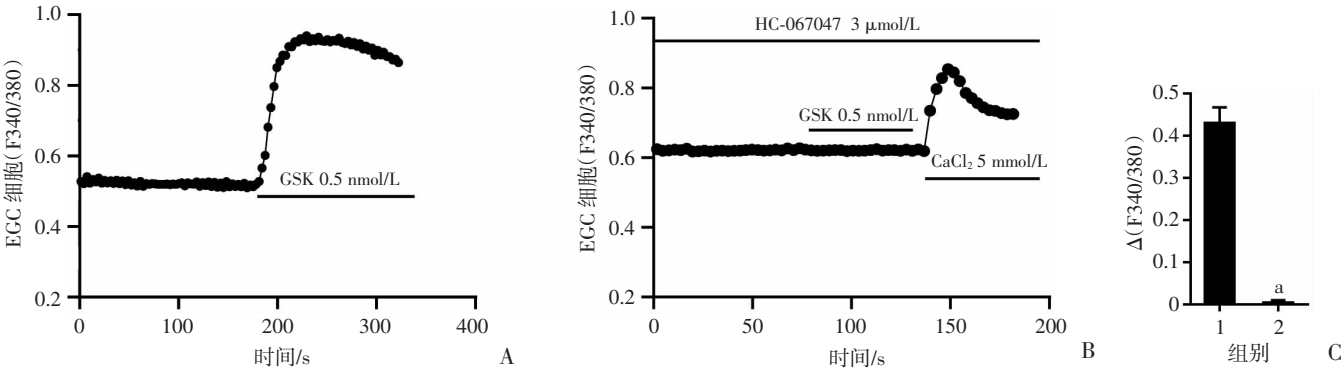
为了进一步确认 CRL-2690 细胞中 TRPV4 的 Ca^{2+}调节功能,使用单细胞荧光 Ca^{2+}成像系统检测了 TRPV4 特异性激动剂 GSK 刺激 CRL-2690 细胞后胞内的 Ca^{2+}信号变化。结果显示,GSK 能增强其胞内 Ca^{2+}信号,而这种反应能被 HC067047 所抑制[(0.430 38±0.063 65) *vs* (0.004 23±0.005 78),$P<0.000\ 1$,图 3],表明肠胶质细胞内 Ca^{2+}信号对 GSK 的反应是 TRPV4 特异性的。

2.4　低渗刺激 TRPV4 增加 EGC 细胞内 Ca^{2+}信号

为了确认物理刺激对 CRL-2690 细胞的 Ca^{2+}信号的影响以及 TRPV4 在其中的作用,使用单细胞荧光 Ca^{2+}成像系统检测了低渗透压刺激(hyposmolality, Hypo)对 CRL-2690 胞内 Ca^{2+}信号的影响。结果显示,低渗刺激也能促进其胞内 Ca^{2+}信号上升,而该反应亦能被 HC067047 部分阻断[(0.030 57±0.015 89) *vs* (0.020 67±0.006 91),$P<0.000\ 1$,图 4]。这表明,肠胶质细胞内 Ca^{2+}信号对物理刺激的反应也是 TRPV4 特异性的。

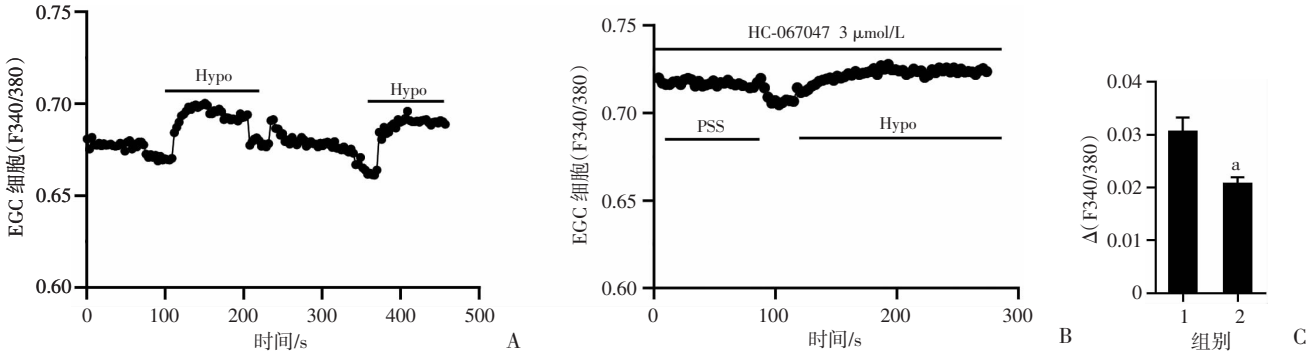
2.5　TRPV4 介导 CaSR 诱导的 EGC 细胞外 Ca^{2+}内流

已知钙敏感受体 CaSR 为 TRPV4 的上游调控蛋白。为了验证 CRL-2690 细胞中,TRPV4 是否参与 CaSR 介导的细胞外 Ca^{2+}内流,使用单细胞荧光 Ca^{2+}成像系统检测了 CaSR 特异性激动剂 $GdCl_3$(图 5A~C)及高细胞外 Ca^{2+}浓度(图 5D~F)刺激 CRL-2690 细胞后,胞内 Ca^{2+}信号的变化。结果显示,两种刺激均可诱导细胞内 Ca^{2+}信号上升,而该作用能被 HC067047 部分阻断。这表明,在 CRL-2690 细胞中 TRPV4 通道参与了 CaSR 诱导的细胞外 Ca^{2+}内流。



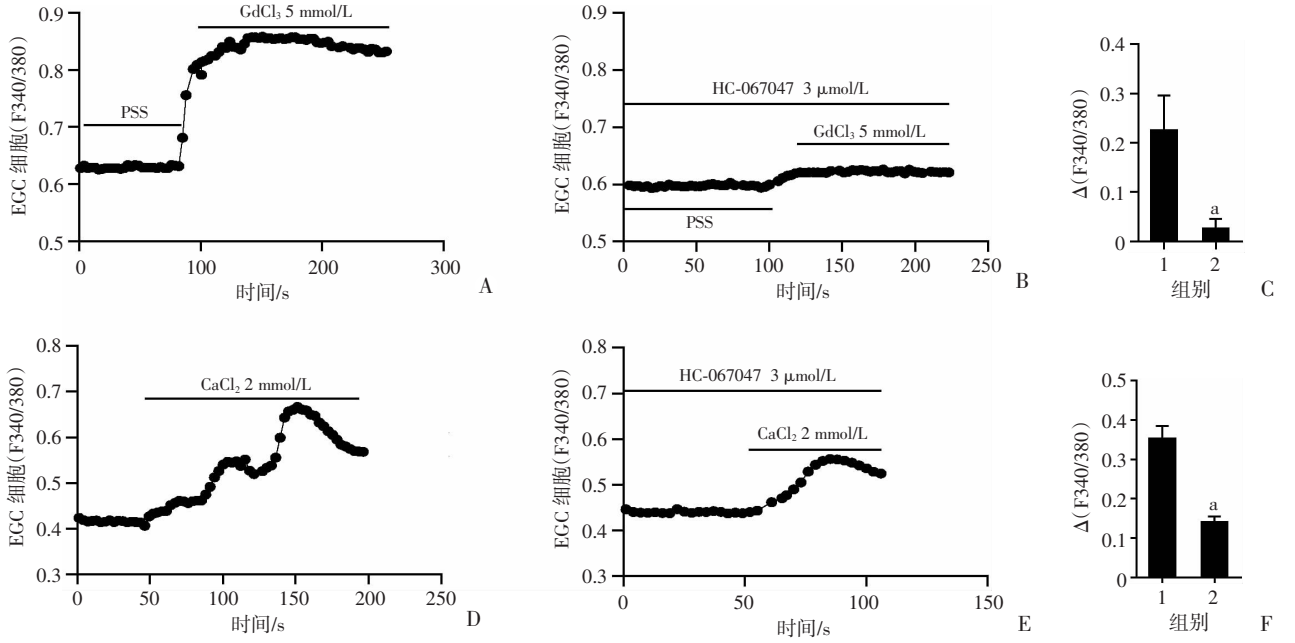
A: GSK 诱导 Ca^{2+}信号变化;B:HC 预处理后 GSK 诱导 Ca^{2+}信号变化;C:比较 2 组 Ca^{2+}信号变化　1: GSK 组;2:GSK+HC 组　a:$P<0.000\ 1$,与 GSK 组比较

图 3　单细胞荧光 Ca^{2+}成像检测 TRPV4 特异性激动剂 GSK 刺激 CRL-2690 细胞后胞内 Ca^{2+}信号变化($n=26$)



A:低渗诱导 Ca^{2+} 信号变化 ($n=35$);B:HC 预处理后低渗诱导 Ca^{2+} 信号变化($n=29$);C:低渗组与低渗+HC 组 Ca^{2+} 信号变化比较　1:低渗组;2:低渗+HC 组;a:$P<0.000\ 1$,与 GSK 组比较

图 4　单细胞荧光 Ca^{2+} 成像检测低渗透压刺激 CRL-2690 细胞后细胞内 Ca^{2+} 信号变化



A:$GdCl_3$ 诱导 Ca^{2+} 信号变化($n=9$);B:HC 预处理后 $GdCl_3$ 诱导 Ca^{2+} 信号变化($n=27$);C:2 组 Ca^{2+} 信号变化比较　1:$GdCl_3$ 组;2:$GdCl_3$+HC 组;a:$P<0.000\ 1$,与 $GdCl_3$ 组比较;D:$CaCl_2$ 诱导 Ca^{2+} 信号变化($n=25$);E:HC 预处理后 $CaCl_2$ 诱导 Ca^{2+} 信号变化($n=30$);F:2 组 Ca^{2+} 信号变化比较　1:$CaCl_2$ 组;2:$CaCl_2$+HC 组;a:$P<0.000\ 1$,与 $CaCl_2$ 组比较

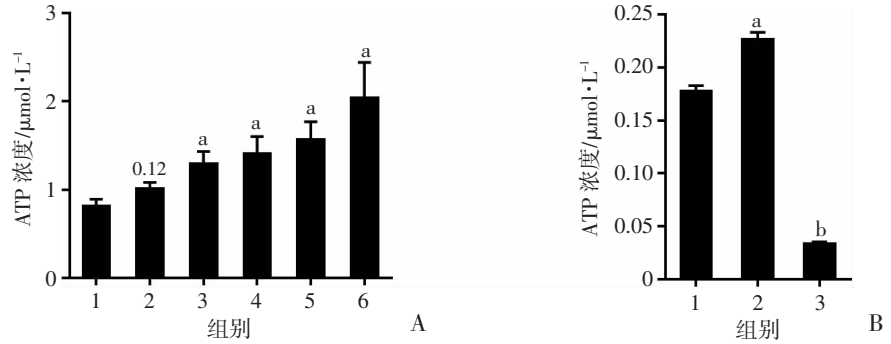
图 5　单细胞荧光 Ca^{2+} 成像检测激活 CaSR 后 CRL-2690 胞内 Ca^{2+} 信号变化

2.6　TRPV4 激动剂诱导 EGC 细胞 ATP 释放

已知 ATP 是 EGC 参与肠神经系统炎症反应的一种关键介质。为了观察在 CRL-2690 细胞中激活 TRPV4 能否促进 ATP 释放,使用荧光素-荧光素酶法检测 GSK(0.5 μmol/L)处理不同时间后,培养基中 ATP 的含量(图 6A)。EGC 的 ATP 释放浓度与 GSK 处理时长正相关。TRPV4 抑制剂 HC067047(5 μmol/L)明显降低了 GSK 诱导的 ATP 释放(图 6B)。这些结果表明,TRPV4 通道的激活是导致 EGC 释放 ATP 的可能重要机制之一。

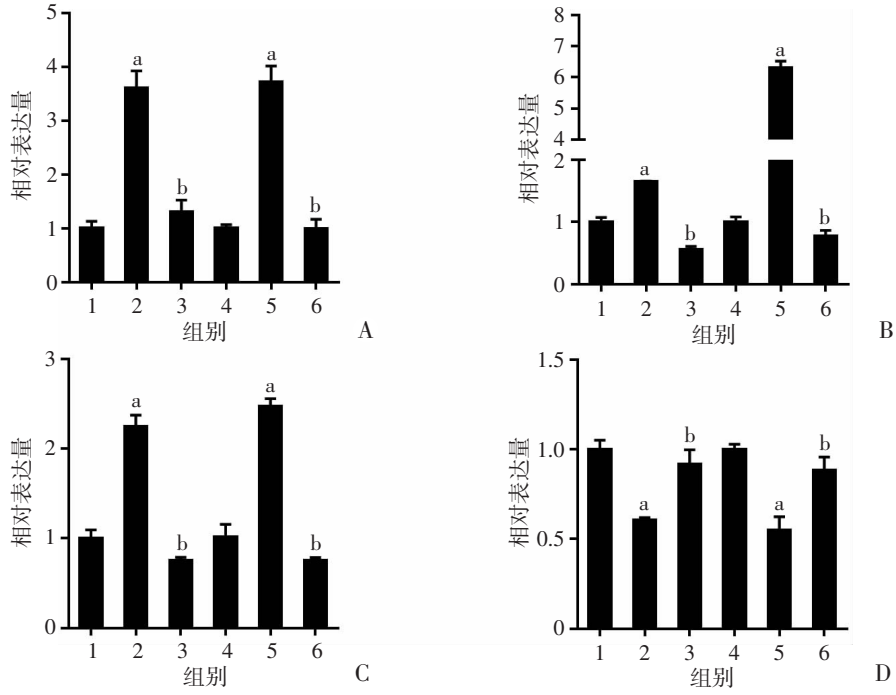
2.7　TRPV4 激动剂促进 EGC 细胞炎症因子表达

为了进一步确定 TRPV4 是否参与肠胶质细胞对炎症的调控,通过 GSK 刺激 CRL-2690 细胞 24、48 h 后,RT-qPCR 检测 EGC 反应性增生标记物 GFAP、促炎因子 IL-1β 和 IL-6 以及抗炎因子 IL-10 mRNA 表达变化。结果显示,GSK 刺激 24、48 h 后可显著上调 GFAP、IL-1β 和 IL-6 表达,而下调 IL-10 表达;而该作用能被 HC067047 阻断(图 7)。表明 TRPV4 通道活化可能是 EGC 参与肠道炎症反应的重要机制。



A:GSK 0.5 μmol/L 处理后细胞外 ATP 浓度变化($n=3$)　1:对照组;2: 5 min 组;3: 10 min 组;4: 20 min 组;5: 30 min 组;6: 40 min 组;a:$P<0.05$, 与对照组比较;B:HC 预处理后,GSK 0.5 μmol/L 处理 40 min 后细胞外 ATP 浓度变化($n=4$)　1:对照组;2:GSK 组;3: GSK+HC 组; a:$P<0.005$, 与对照组比较;b:$P<0.0001$, 与 GSK 组比较

图 6　荧光素酶法测定 GSK 激活 TRPV4 后 CRL-2690 胞外 ATP 浓度变化



1:24 h 对照组;2:24 h GSK 组;3:24 h GSK+HC 组;4:48 h 对照组;5:48 h GSK 组;6:48 h GSK+HC 组
A:EGC 反应性增生标记物 GFAP mRNA 的表达　a:$P<0.005$,与对照组比较;b:$P<0.005$,与 GSK 组比较;B:促炎因子 IL-1β mRNA 的表达　a:$P<0.0005$,与对照组比较;b:$P<0.0001$,与 GSK 组比较;C:促炎因子 IL-6 mRNA 的表达　a:$P<0.005$,与对照组比较;b:$P<0.0005$,与 GSK 组比较;D:抗炎因子 IL-10 mRNA 的表达　a:$P<0.005$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 GSK 组比较

图 7　RT-qPCR 检测 GSK 激活 TRPV4 后 CRL-2690 细胞炎症因子表达变化($n=3$)

3　讨论

TRPV4 是一种定位于细胞质膜上的非选择性阳离子通道,对 Ca^{2+} 具有通透性,可被物理和化学刺激激活,从而促进胞外 Ca^{2+} 内流或通过触发钙诱导的钙释放机制(calcium induced calcium release,CICR)引起内质网上内部存储 Ca^{2+} 释放,产生重复的 Ca^{2+} 振荡,导致许多来自该通道活化后的生理与病理反应[17]。本研究率先验证了大鼠 EGC 中丰富的 TRPV4 表达,显示 TRPV4 是 EGC 的重要钙信号通道与机械感受器。激活 CaSR 可诱导 EGC 胞内 Ca^{2+} 信号增强,而抑制 TRPV4 通道活性可显著降低 CaSR 引起的外 Ca^{2+} 内

流,提示可能存在 CaSR- TRPV4-Ca^{2+}信号通路。这些发现表明,TRPV4 可能介导 EGC 的 Ca^{2+}反应,参与 EGC 对肠道炎症的调节。

目前研究显示 EGC 在外界环境变化时存在着不同的功能状态,故而“激活”(activated)、“反应性”(reactivated)和“胶质病”(gliopathy)等术语常被用来描述肠胶质细胞的不同状态,这也反映了 EGC 在参与肠稳态维持中的复杂角色[18]。有研究认为,“激活”是一个正常的生理过程,下游效应通常被认为是有益的,可以调节肠道反射和/或维持体内平衡;“反应性”胶质增生通常是有害的,表现出促炎功能;“胶质病”是指肠神经胶质的功能严重失调或适应不良反应和/或存活[18]。Ca^{2+}信号通路已被证实参与了 EGC 的炎症调节机制,ATP 则是 EGC 促进肠道炎症的重要介质,但其调节机制仍需阐明[19]。作为一种重要的非选择性 Ca^{2+}通道蛋白,之前的研究已证明激活 TRPV4 可通过自分泌或旁分泌途径刺激细胞 ATP 释放 。在胆管细胞纤毛中,TRPV4 激活通过顶端 ATP 释放诱导碳酸氢盐的分泌[20]。肾髓质的升肢粗段内渗透压的下降通过 TRPV4 的激活刺激 ATP 释放[21]。小鼠和大鼠胃上皮中激活 TRPV4,有助于 ATP 释放与胃排空[22]。人类肺部成纤维细胞中激活 TRPV4,可促进 ATP 被释放到细胞外空间[23]。ATP 释放与嘌呤能信号传导在“反应性”EGC 胶质增生引起的肠道炎症反应中发挥重要作用[24]。因此,我们推测 TRPV4 可能参与 EGC 的 ATP 产生与释放。结果显示,TRPV4 激动剂 GSK 可显著刺激 EGC 释放 ATP,干预 TRPV4 活性则可抑制 ATP 的释放,表明 TRPV4 的活化确实可以促进 EGC 释放 ATP,这可能是 EGC 由激活状态转向反应状态的一个重要环节;同时,激活 TRPV4 可引起 EGC 反应性增生标记物 GFAP 表达上调,进一步证明 TRPV4 的活化可能参与 EGC 转向反应状态的过程。

反应性 EGC 增生与炎症性肠病发生关系密切,EGC 可通过包括腺苷 2B 受体(A2BR)、IL-1β、TLR4 等多个信号分子参与炎症进程[25]。本研究结果显示,TRPV4 激动剂 GSK 可显著上调促炎因子 IL-1β 和 IL-6 表达,而下调抗炎因子 IL-10 的表达,该作用能被 HC067047 阻断。这表明 TRPV4 通道的激活可诱导炎症因子表达,介导 EGC 对肠道炎症进程的调控。总之,EGC 细胞中 TRPV4 通道的激活,可能通过促进 ATP 释放与炎症因子的表达共同影响细胞状态转变,从而参与肠道炎症调节。本研究结果为临床肠道炎症性疾病治疗提供新的研究思路。

参考文献:

[1] NAGY N, GOLDSTEIN A M. Enteric nervous system development: a crest cell's journey from neural tube to colon [J]. Semin Cell Dev Biol, 2017, 66: 94-106. DOI: 10.1016/j.semcdb.2017.01.006.

[2] RAO M, GERSHON M D. Enteric nervous system development: what could possibly go wrong? [J]. Nat Rev Neurosci, 2018, 19(9): 552-565. DOI: 10.1038/s41583-018-0041-0.

[3] LIU C, YANG J. Enteric glial cells in immunological disorders of the gut [J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 895871. DOI: 10.3389/fncel.2022.895871.

[4] XIAO W D, CHEN W, SUN L H, *et al*. The protective effect of enteric glial cells on intestinal epithelial barrier function is enhanced by inhibiting inducible nitric oxide synthase activity under lipopolysaccharide stimulation[J]. Mol Cell Neurosci, 2011, 46(2): 527-534. DOI: 10.1016/j.mcn.2010.12.007.

[5] 肖卫东,彭科,杨桦. 肠胶质细胞在肠稳态调控中的作用机制与研究展望[J]. 世界华人消化杂志,2016,24(25):3657-3665. DOI:10.11569/wcjd.v24.i25.3657.
XIAO W D, PENG K, YANG H. Enteric glial cells: an emerging key player in intestinal homeostasis modulation under physiological and pathological conditions [J]. World Chin J Dig, 2016, 24(25): 3657-3665. DOI: 10.11569/wcjd.v24.i25.3657.

[6] XIAO W D, WANG W S, CHEN W, *et al*. GDNF is involved in the barrier-inducing effect of enteric glial cells on intestinal epithelial cells under acute ischemia reperfusion stimulation[J]. Mol Neurobiol, 2014, 50(2): 274-289. DOI: 10.1007/s12035-014-8730-9.

[7] MCCLAIN J, GRUBIŠIC V, FRIED D, *et al*. Ca^{2+} responses in enteric glia are mediated by connexin-43 hemichannels and modulate colonic transit in mice[J]. Gastroenterology, 2014, 146(2): 497-507.e1. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.061.

[8] AHMADZAI M M, MCCLAIN J L, DHARSHIKA C, *et al*. LPAR1 regulates enteric nervous system function through glial signaling and contributes to chronic intestinal pseudo-obstruction[J]. J Clin Invest, 2022, 132(4): e149464. DOI: 10.1172/JCI149464.

[9] NEUNLIST M, ROLLI-DERKINDEREN M, LATORRE R, *et al*. Enteric glial cells: recent developments and future directions[J]. Gastroenterology, 2014, 147(6): 1230-1237. DOI: 10.1053/j.gastro.2014.09.040.

[10] KEMÉNY K K, DUCZA E. Physiological cooperation between aquaporin 5 and TRPV4[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(19): 11634. DOI: 10.3390/ijms231911634.

[11] WATANABE H, VRIENS J, PRENEN J, *et al*. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels[J]. Nature, 2003, 424(6947): 434-438. DOI: 10.1038/nature01807.

[12] MIHARA H, BOUDAKA A, SUGIYAMA T, *et al*. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)-dependent calcium influx and ATP release in mouse oesophageal keratinocytes[J]. J Physiol, 2011, 589(Pt 14): 3471-3482. DOI: 10.1113/jphysiol.2011.207829.

[13] LUO J L, QIAN A H, OETJEN L K, *et al*. TRPV4 channel signaling in macrophages promotes gastrointestinal motility via direct effects on smooth muscle cells[J]. Immunity, 2018, 49(1): 107-119.e4. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.021.

[14] FICHNA J, POOLE D P, VELDHUIS N, *et al*. Transient receptor potential vanilloid 4 inhibits mouse colonic motility by activating NO-dependent enteric neurotransmission[J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93(12): 1297-1309. DOI: 10.1007/s00109-015-1336-5.

[15] FICHNA J, MOKROWIECKA A, CYGANKIEWICZ A I, *et al*. Transient receptor potential vanilloid 4 blockade protects against experimental colitis in mice: a new strategy for inflammatory bowel diseases treatment? [J]. Neurogastroenterol Motil, 2012, 24(11): e557-e560. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2012.01999.x.

[16] VERGNOLLE N. TRPV4: new therapeutic target for inflammatory bowel diseases[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 89(2): 157-161. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.01.005.

[17] WHITE J P M, CIBELLI M, URBAN L, *et al*. TRPV4: molecular conductor of a diverse orchestra[J]. Physiol Rev, 2016, 96(3): 911-973. DOI: 10.1152/physrev.00016.2015.

[18] SEGUELLA L, GULBRANSEN B D. Enteric glial biology, intercellular signalling and roles in gastrointestinal disease[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2021, 18(8): 571-587. DOI: 10.1038/s41575-021-00423-7.

[19] LILLI N L, QUÉNÉHERVÉ L, HADDARA S, *et al*. Glioplasticity in irritable bowel syndrome[J]. Neurogastroenterol Motil, 2018, 30(4): e13232. DOI: 10.1111/nmo.13232.

[20] GRADILONE S A, MASYUK A I, SPLINTER P L, *et al*. Cholangiocyte cilia express TRPV4 and detect changes in luminal tonicity inducing bicarbonate secretion[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(48): 19138-19143. DOI: 10.1073/pnas.0705964104.

[21] SILVA G B, GARVIN J L. TRPV4 mediates hypotonicity-induced ATP release by the thick ascending limb[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295(4): F1090-F1095. DOI: 10.1152/ajprenal.90365.2008.

[22] MIHARA H, SUZUKI N, BOUDAKA A A, *et al*. Transient receptor potential vanilloid 4-dependent calcium influx and ATP release in mouse and rat gastric epithelia[J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(24): 5512-5519. DOI: 10.3748/wjg.v22.i24.5512.

[23] RAHMAN M, SUN R, MUKHERJEE S, *et al*. TRPV4 stimulation releases ATP *via* pannexin channels in human pulmonary fibroblasts[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2018, 59(1): 87-95. DOI: 10.1165/rcmb.2017-0413OC.

[24] MAZZOTTA E, VILLALOBOS E, KALFF JC, et al. A novel P2X2-dependent purinergic mechanism of enteric gliosis in intestinal inflammation[J]. EMBO Mol Med, 2021, 13(1): e12724. DOI: 10.15252/emmm.202012724.

[25] D'ANTONGIOVANNI V, BENVENUTI L, FORNAI M, *et al*. Glial A_{2B} adenosine receptors modulate abnormal tachykininergic responses and prevent enteric inflammation associated with high fat diet-induced obesity[J]. Cells, 2020, 9(5): 1245. DOI: 10.3390/cells9051245.

(收稿:2022-11-09;修回:2022-12-22)

(编辑 栾 嘉)