

研究论文

TRPC1与Orai1的相互作用参与人脐静脉内皮细胞钙敏感受体介导的钙内流及一氧化氮生成

王腊梅¹, 唐娜¹, 钟华¹, 庞丽娟^{1,2}, 张春军¹, 何芳^{1,*}

新疆石河子大学医学院¹病理生理学教研室/新疆地方与民族高发病教育部重点实验室; ²病理学教研室, 石河子 832002

摘要: 本研究旨在探讨Ca²⁺感受蛋白经典瞬时感受器电位蛋白1 (canonical transient receptor potential channel 1, TRPC1)与钙释放激活钙通道调节分子1 (calcium release-activated calcium modulator 1, Orai1)的相互作用在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)钙敏感受体(Ca-sensing receptor, CaR)介导的Ca²⁺内流和一氧化氮(NO)生成中的作用。取2~3代HUVECs, 单独或联合用CaR激动剂精胺[Spermine, 激活钙库活化的钙通道(store-operated calcium channels, SOC)和受体活化的钙通道(receptor-operated calcium channels, ROC)]、ROC模拟剂12-O-十四烷酰佛波醇-13-乙酸酯(TPA)+CaR负性变构调节剂Calhex231 (阻断SOC, 激活ROC)、PKC抑制剂Ro31-8220 (激活SOC, 阻断ROC)以及经典型PKCs和PKC μ 抑制剂Go6976 (激活SOC, 阻断ROC)处理。用免疫荧光技术检测HUVECs中TRPC1和Orai1的蛋白表达、共定位; 用免疫共沉淀法检测TRPC1和Orai1之间的相互作用模式; 随后用TRPC1和Orai1干扰质粒联合转染HUVECs, 采用荧光探针同时检测HUVECs中[Ca²⁺]和NO生成的变化。结果显示, HUVECs中TRPC1和Orai1蛋白表达共定位于胞膜。与Spermine+Ca²⁺组相比, Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺组、Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺组和Go6976+Spermine+Ca²⁺组HUVECs中定位于胞浆中的TRPC1、Orai1蛋白表达均显著降低, 二者的结合也减少。免疫共沉淀结果显示, Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺组、Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺组和Go6976+Spermine+Ca²⁺组TRPC1/Orai1和Orai1/TRPC1相对比值百分数均明显低于对照组以及Spermine+Ca²⁺组(均 $P < 0.05$), 表明Orai1和TRPC1相互作用均减弱。联合转染质粒敲低TRPC1和Orai1显著降低Spermine+Ca²⁺组、Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺组、Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺组和Go6976+Spermine+Ca²⁺组的HUVECs中[Ca²⁺]和NO生成。以上结果提示, TRPC1与Orai1以二元复合物的形式激活SOC和ROC, 介导Ca²⁺内流及NO生成。

关键词: 经典瞬时感受器电位蛋白1; 钙释放激活钙通道调节分子1; 钙敏感受体; 钙离子; 一氧化氮

中图分类号: R363

Involvement of interaction between TRPC1 and Orai1 in calcium sensing receptor-mediated calcium influx and nitric oxide generation in human umbilical vein endothelial cells

WANG La-Mei¹, TANG Na¹, ZHONG Hua¹, PANG Li-Juan^{1,2}, ZHANG Chun-Jun¹, HE Fang^{1,*}

¹Department of Pathophysiology/Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education; ²Department of Pathology, Medical College of Shihezi University, Shihezi 832002, China

Abstract: The present study was to investigate the role of the interaction between canonical transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and calcium release-activated calcium modulator 1 (Orai1) in extracellular Ca²⁺-sensing receptor (CaR)-induced extracellular Ca²⁺ influx and nitric oxide (NO) production. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were incubated with CaR agonist Spermine [activating store-operated calcium channels (SOC) and receptor-operated calcium channels (ROC)] alone or in combination with the following reagents: CaR negative allosteric modulator Calhex231 plus ROC analogue TPA (activating ROC and blocking

Received 2017-09-22 Accepted 2017-12-12

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31160239 and 81160018).

*Corresponding author. Tel: +86-993-2057151; E-mail: fangf2002shz@126.com

SOC), Ro31-8220 (PKC inhibitor that activates SOC and blocks ROC) or Go6967 (PKCs and PKC μ inhibitor that activates SOC and blocks ROC). The protein expressions and co-localization of TRPC1 and Orai1 were determined using immunofluorescent staining. The interaction between TRPC1 and Orai1 was examined by co-immunoprecipitation. We silenced the expressions of their genes in the HUVECs by transfection of constructed TRPC1 and Orai1 shRNA plasmids. Intracellular Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i) was detected using Ca²⁺ indicator Fura-2/AM, and NO production was determined by DAF-FM staining. The results showed that TRPC1 and Orai1 protein expressions were co-located on the cell membrane of the HUVECs. Compared with Spermine+Ca²⁺ group, Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺, Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺ and Go6976+Spermine+Ca²⁺ groups exhibited down-regulated protein expressions of TRPC1 and Orai1 in cytoplasm and decreased co-localization on the cell membrane. Co-immunoprecipitation results showed that the interaction between TRPC1 and Orai1 was reduced by Calhex231 plus TPA, Ro31-8220 or Go6976 addition in the Spermine-stimulated HUVECs. Double knockdown of *Trpc1* and *Orai1* genes significantly decreased [Ca²⁺]_i level and NO production in all of the Spermine+Ca²⁺, Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺, Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺ and Go6976+Spermine+Ca²⁺ groups. These results suggest that TRPC1/Orai1 may form a complex that mediates Ca²⁺ influx and NO production via SOC and ROC activation.

Key words: canonical transient receptor potential channel 1; calcium release-activated calcium modulator 1; Ca²⁺-sensing receptor; Ca²⁺; nitric oxide

钙离子 (Ca²⁺) 是细胞内功能最广泛同时也是重要的第二信使, 在众多的细胞内信号通路及细胞的生理机能中发挥着重要作用。胞内钙信号介导了一系列细胞过程, 从细胞分化到程序性凋亡、从神经递质的释放到肌肉的收缩、从基因表达到突触可塑性, Ca²⁺ 都参与其中^[1]。研究显示, 人类多种疾病与 Ca²⁺ 稳态失调有关, 包括心血管疾病、糖尿病、阿尔茨海默病等。在生理条件下, 钙池操纵性钙通道 (store-operated calcium channels, SOC) 和受体操纵性钙通道 (receptor-operated calcium channels, ROC) 是非兴奋细胞介导外 Ca²⁺ 内流的重要通道, 参与多种钙通道介导的生理和病理生理过程, 对维持细胞内游离 Ca²⁺ 浓度 ([Ca²⁺]_i) 稳定具有重要作用。

钙库的排空可以激活胞外 Ca²⁺ 的内流, 这种钙内流的方式被称作钙池操纵性钙内流 (store-operated calcium entry, SOCE), 在传递细胞信息方面更为重要。近期本研究组在研究 SOCE 分子机制的过程中, 确定了经典瞬时感受器电位蛋白 1 (canonical transient receptor potential channel 1, TRPC1)、基质相互作用分子 1 (stromal interaction molecule 1, STIM1) 和钙释放激活钙通道调节分子 1 (calcium release-activated calcium modulator 1, Orai1) 均为参与人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 中钙敏感受体 (Ca-sensing receptor, CaR) 经 SOC 和 ROC 介导的 Ca²⁺ 内流和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 生成过程中的关键分子组件^[2,3], 而 SOC 与 ROC 二者之间是以协同的方式参与了此过程^[4,5]。值得关注的是, 不同细胞类型中作为组成 SOC 亚基 Orai1、TRPC1、STIM1 的关键分子组件

和相互作用模式有所不同。Liao 等^[6] 研究显示 Orai/TRPC 的复合物以依赖或不依赖钙库耗竭的方式参与 Ca²⁺ 内流, 在 STIM1 的调节下 SOC 和 ROC 的分子组件 Orai1 和 TRPCs 存在功能上相互作用, 并推测 Orai1/TRPCs 组成的复合物可能在脂筏积聚介导 SOC, 而当该复合物定位于脂筏外时, 其介导 ROC。而 Jardin 等^[7] 在人血小板上发现 Orai1 在介导 TRPC1-STIM1 相互作用及 TRPC1 形成钙通道的激活模式 (依赖 SOC 或 ROC) 中发挥重要作用。然而 TRPC1 与 Orai1 在 CaR 介导钙内流及 NO 生成中的相互作用模式尚未见报道, 因此本研究拟在前期工作的基础上, 阐明 TRPC1 与 Orai1 在 CaR 介导的 Ca²⁺ 内流和 NO 生成中的相互作用模式, 有助于研究者以介导钙活动通路的各种机制为靶点进行药物筛选, 并为心血管疾病防治提供一条新途径。

1 材料与方法

1.1 标本来源 剖宫产胎儿的新鲜脐带取自华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科, 产妇及胎儿身体健康 (性别、体重不限、无污染), 营养状况良好。产妇及家属对实验均知情同意, 实验方案经医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂 胎牛血清 (FBS)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化液购自美国 Gibco 公司。培养基 ECM 购自美国 Sciencell 公司。G418 (遗传霉素) 购自中国 Biosharp 公司。去内毒素高纯度质粒抽提试剂盒购自美国 Omega 公司。Lipofectamine™ 2000 试剂盒、Fura-2/AM (Fura-2 荧光探针) 与 OPTI-MEM 培养基购自美国 Invitrogen 公司。BCA 蛋白浓度测

定试剂盒和 DAF-FM DA (NO 荧光探针) 购自碧云天生物技术研究。ECL 发光试剂盒购自美国 Thermo Biosharp 公司; 小鼠抗人 TRPC1 单克隆抗体和小鼠抗人 Orai1 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 羊抗小鼠 IgG 购自美国 Santa Cruz 公司; 精胺 (Spermine)、TPA、Ro31-8220、Go6976 购自美国 Sigma 公司, 二抗购自美国 Protein Tech 公司。其他生化试剂均为进口分装或国产分析纯。

1.3 主要仪器 FV300 Ca²⁺ 成像系统、FV300 激光共聚焦显微镜和 IX-70 倒置荧光显微镜购自日本 Olympus 公司; -80 °C 超低温冰箱购自 Nuaire 公司; 台式高速低温离心机购自 Sigma 公司; 二氧化碳培养箱购自 Thermo Electron 公司。

1.4 HUVECs 的培养 按文献^[8,9]的方法, 取健康孕产妇剖宫产胎儿的新鲜脐带, 用含 10% FBS 的 ECM 培养基 (添加 100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素混合液) 原代培养 HUVECs, 于 37 °C, 5% CO₂、饱和湿度的培养箱中培养, 待细胞生长至 90% 融合时进行常规传代。细胞转染时所用培养基中不加青霉素、链霉素混合液。

1.5 免疫荧光技术检测 HUVECs 中 TRPC1 与 Orai1 的蛋白表达 取 2~3 代 HUVECs, 分别与 CaR 激动剂精胺、ROC 模拟剂 TPA+CaR 负性变构调节剂 Calhex231、蛋白激酶 C (PKC) 抑制剂 Ro31-8220 及经典型 PKCs 和 PKC μ 抑制剂 Go6967 共孵育。实验分为: 空白对照组, 阴性对照组 (以 PBS 代替相应一抗孵育作为阴性对照组), 正常对照组 (Spermine+Ca²⁺ 组: 用含 2 mmol/L Ca²⁺ 的含钙液检测 1 min 后, 再用含 2 mmol/L Spermine + 2 mmol/L Ca²⁺ 的孵育液处理 20 min), Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺ 组 (用含 2 mmol/L Ca²⁺ 的含钙液检测 1 min 后, 再用含 1 μ mol/L Calhex231 + 100 nmol/L TPA + 2 mmol/L Spermine + 2 mmol/L Ca²⁺ 的孵育液处理 20 min), Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺ 组 (用含 2 mmol/L Ca²⁺ 的含钙液检测 1 min 后, 再用含 200 nmol/L Ro31-8220+2 mmol/L Spermine + 2 mmol/L Ca²⁺ 的孵育液处理 20 min), Go6976+Spermine+Ca²⁺ 组 (用含 2 mmol/L Ca²⁺ 的含钙液检测 1 min 后, 再用含 200 nmol/L Go6976 + 2 mmol/L Spermine + 2 mmol/L Ca²⁺ 的孵育液处理 20 min)。PBS 溶液冲洗细胞后, 4% 甲醛溶液固定 20 min, 0.5% Triton-PBS 透化 10~15 min, 封闭后轻甩去封闭液后, 滴加抗 TRPC1、Orai1 一抗 (均 1:30 稀释) 混合液, 4 °C 冰箱中用

湿盒孵育。次日用含 0.2% Triton 的 PBS 洗片 5 min 后滴加对应荧光标记的二抗混合液 (1:100 稀释), 避光室温孵育 1 h。洗片, 1 mg/L DAPI (1:500) 避光室温孵育 15 min 复染细胞核。洗片、滴加防淬灭剂后, 在激光共聚焦显微镜 (Olympus FV300, Sanyo, 日本) 下观察并记录 TRPC1 与 Orai1 的蛋白表达情况。

1.6 免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 法检测 HUVECs 中 TRPC1 与 Orai1 的相互作用

将 2~3 代 HUVECs 接种于放有圆形玻片的培养皿中, 待细胞达 85% 融合时, 加入方法 1.5 中不同药物孵育 20 min, 收集细胞按下列处理方法分组: input 组 (阳性对照组: 即为总蛋白组, 在进行免疫沉淀前, 取一部分断裂后的染色质做 input 对照, input 是断裂后的基因组 DNA, 需要与沉淀后的样品 DNA 一起经过逆转交联、DNA 纯化以及最后免疫印记方法检测), IgG 组 (阴性对照组, 用以排除其他抗体导致的非特异结合导致的沉淀, 按 1:50 加入非特异性鼠 IgG), Co-IP 组 [按方法 1.5 节进行处理后将细胞分为对照组 (细胞未经药物处理)、Spermine+Ca²⁺ 组、Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺ 组、Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺ 组、Go6976+Spermine+Ca²⁺ 组]。

用 Orai1 多克隆抗体沉淀 (正向): 预冷的 PBS 冲洗 HUVECs 2 遍, 加入裂解液充分裂解后, 12 000 r/min 离心 3~5 min, 取上清加入抗 Orai1 一抗 (1:800 稀释), 4 °C 摇床过夜。按 1:10 体积比加入 50% 的琼脂糖珠 (Protein G Agarose)(Santa Cruz 公司)(除 input 组外), 4 °C 混匀 10 min 后, 2 500 r/min、4 °C 离心 15 min, 吸除上清液 (不能吸掉 Protein G Agarose)。完成最后一次洗涤后, 去上清, 加入 SDS 蛋白上样缓冲液, 混匀煮沸 5 min, 12 000 r/min 离心 3 min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳, Co-IP 组用抗 TRPC1 一抗 (1:1 000 稀释) 进行 Western blot 分析。IgG 组按 1:50 加入非特异性鼠 IgG。

用抗 TRPC1 单克隆抗体沉淀 (反向): 裂解细胞得到的上清用抗 TRPC1 一抗 (1:1 000 稀释) 孵育, 再与 Protein G Agarose 混合, 方法同正向免疫共沉淀, Co-IP 组用抗 Orai1 一抗 (1:800 稀释) 进行 Western blot 分析。IgG 组按 1:50 加入非特异性鼠 IgG。以上每组实验重复 3 次。以各处理组正向 TRPC1/Orai1 或反向 Orai1/TRPC1 与 Control 组的

正向 TRPC1/Orai1 或反向 Orai1/TRPC1 的相对比值的百分数表示 TRPC1 与 Orai1 相互作用的强弱。

1.7 HUVECs 的基因转染和药物处理 重组质粒由本实验室前期构建并保存, 基因转染步骤参照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书进行。结合文献^[10]的方法, 取对数生长期的 HUVECs, 待细胞融合至 85% 时, 将 TRPC1 shRNA 与 Orai1 shRNA 联合转染至 HUVECs 中。细胞分为联合转染 TRPC1 shRNA+Orai1 shRNA 组(转染组), Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1 组(空质粒组)和对照组(Control 组, 用不含质粒的 OPTI-MEM 培养基与 Lipofectamine™ 2000 的混合液)。同时采用 G418 逐步筛选获得稳定克隆。将联合转染 48 h 后的 HUVECs 接种于放有圆形玻片的小培养皿中, 待细胞融合至 85% 以上, 分别加入以下四种不同药物进行分组处理。

CaR 激动剂精胺: 实验组(shTRPC1+shOrai1+Spermine+Ca²⁺组)、对照组(Spermine+Ca²⁺组)、空质粒组(Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1+Spermine+Ca²⁺组); ROC 模拟剂 TPA+CaR 负性变构调节剂 Calhex231: 转染组(shTRPC1+shOrai1+Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺组)、对照组(Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺组)、空质粒组(Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1+Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺组); PKC 抑制剂 Ro31-8220: 转染组(shTRPC1+shOrai1+Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺组)、对照组(Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺组)、空质粒组(Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1+Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺组); 经典型 PKCs 和 PKC μ 抑制剂 Go6976: 转染组(shTRPC1+shOrai1+Go6976+Spermine+Ca²⁺组)、对照组(Go6976+Spermine+Ca²⁺组)、空质粒组(Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1+Go6976+Spermine+Ca²⁺组)。

1.8 HUVECs 中 [Ca²⁺]_i 测定 依据参考文献方法^[8], 将 Fura-2/AM 与含钙液以 1:499 的比例混合后加入方法 1.5 各药物处理组的 HUVECs 中, 37 °C 孵育细胞后并去酯化处理。利用 340 nm 和 380 nm 波长的激发光激发 Ca²⁺ 荧光探针 Fura-2/AM 发射荧光。用 CCD 拍摄荧光的动态变化并通过钙荧光成像系统 IPA software 进行分析, 得出两激发光的荧光强度比值的变化(即 Δ ratio)反映 [Ca²⁺]_i。

1.9 HUVECs 中 NO 的荧光测定 依据参考文献方法^[8], 将按 1:2 000 比例加入 NO 荧光探针稀释液稀释后的 DAF-FM DA 加入方法 1.5 各药物处理

组的 HUVECs 中, 37 °C 孵育后室温避光条件下, 实时、逐时间点检测刺激前后细胞层面荧光的强弱, 并通过软件进行分析。用 NO 相对荧光强度(relative fluorescence unit, RFU) 来代表 NO 的生成量。计算公式: NO 的含量 = (测定孔曲线最高 RFU - 最低 RFU) - (空白孔曲线最高 RFU - 最低 RFU)。以上每组实验重复 3 次。

1.10 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。每组数据用 mean \pm SEM 描述, 两组以上均数比较采用单因素方差分析, 方差齐时组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD法), 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HUVECs 中 TRPC1 与 Orai1 的蛋白表达

免疫荧光染色结果显示, 正常对照组(Spermine+Ca²⁺组) HUVEC 中 TRPC1 和 Orai1 蛋白均有表达, 二者共定位于胞膜(图 1)。Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺组、Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺组和 Go6976+Spermine+Ca²⁺组 HUVECs 中定位于胞膜中的 TRPC1、Orai1 均减少, 二者结合也减少(见图 1)。

2.2 HUVECs 中 TRPC1 与 Orai1 的相互作用

Co-IP 结果显示, Calhex231+TPA+Spermine+Ca²⁺组(21.11% \pm 3.58%、23.26% \pm 4.49%)、Ro31-8220+Spermine+Ca²⁺组(19.36% \pm 5.55%、21.15% \pm 4.29%)和 Go6976+Spermine+Ca²⁺组(22.93% \pm 2.38%、30.38% \pm 3.25%)的 TRPC1/Orai1 和反向 Orai1/TRPC1 百分数均明显低于对照组(100% \pm 2.83%、100% \pm 2.82%)以及 Spermine+Ca²⁺组(120.57% \pm 2.62%、111.03% \pm 4.03%)(均 $P < 0.05$), 提示 Calhex231+TPA、Ro31-8220 或 Go6976 药物刺激导致 TRPC1 与 Orai1 相互作用减弱(图 2)。

2.3 联合转染 TRPC1 与 Orai1 干扰质粒对 HUVECs 中 [Ca²⁺]_i 和 NO 的生成的影响

2.3.1 联合转染 TRPC1 与 Orai1 干扰质粒对 CaR 激动剂精胺诱导的 HUVECs 中 [Ca²⁺]_i 和 NO 生成的影响

转染组 [Ca²⁺]_i HUVECs Δ ratio 值为 4.02 \pm 0.02, NO 净荧光强度值为 74.53 \pm 7.53, 均明显低于对照组(分别为 7.12 \pm 0.08、883.98 \pm 19.64)和空质粒组(分别为 7.09 \pm 0.05、831.66 \pm 10.28)(均 $P < 0.05$)(图 3), 而空质粒组与对照组相比无显著差异。表明同时沉默 TRPC1 和 Orai1 基因使 CaR 经 SOC 和 ROC 介导的 Ca²⁺ 内流和 NO 生成减少。

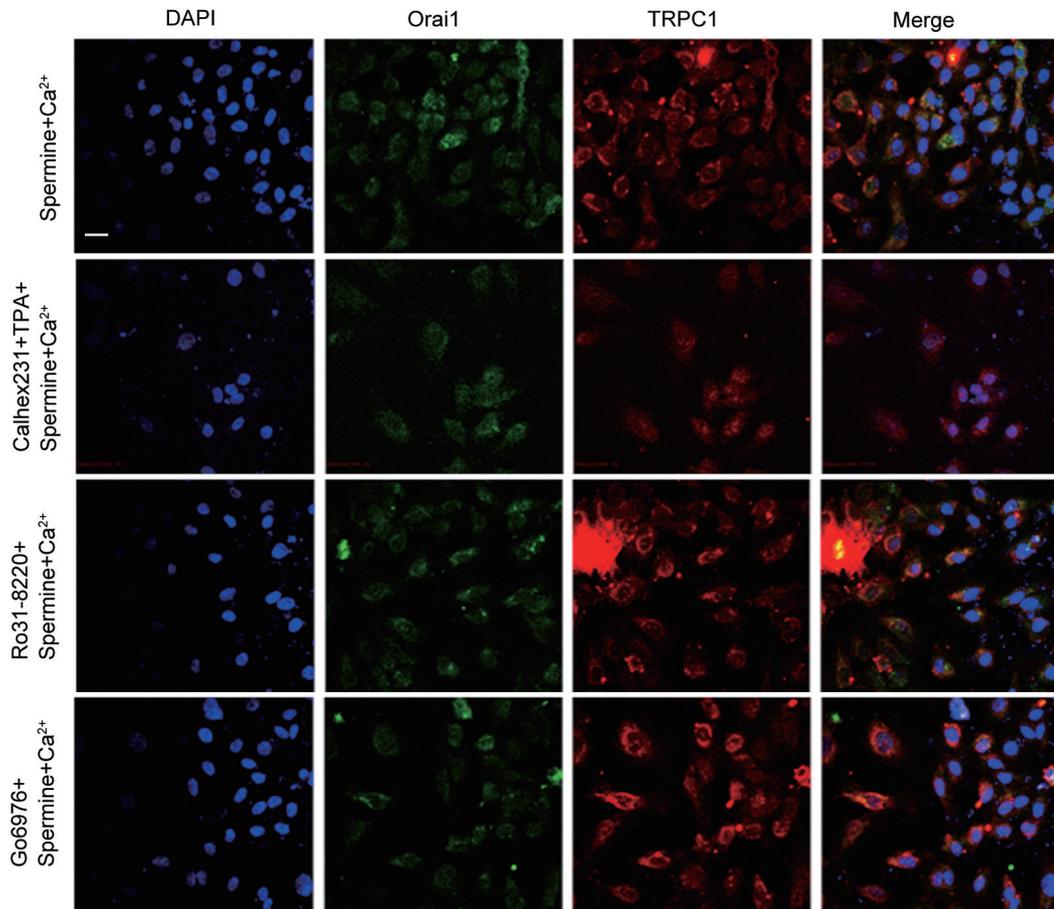


图 1. 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中经典瞬时感受器电位蛋白1 (TRPC1)与钙释放激活钙通道调节分子1 (Orai1)蛋白表达情况
Fig. 1. Protein expressions of canonical transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and calcium release-activated calcium modulator 1 (Orai1) in the human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) detected by immunocytochemical staining. Scale bar, 50 μm .

2.3.2 联合转染TRPC1与Orai1干扰质粒对ROC模拟剂TPA+CaR负性变构调节剂Calhex231诱导的HUVECs中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和NO生成的影响

转染组 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ HUVECs Δratio 值为 1.88 ± 0.07 , NO 净荧光强度值为 29.15 ± 5.98 , 均明显低于对照组 (分别为 4.62 ± 0.02 、 180.68 ± 17.26) 和空质粒组 (分别为 4.28 ± 0.01 、 171.96 ± 18.13) (均 $P < 0.05$) (图 4), 而空质粒组与对照组相比无显著差异。表明同时沉默 TRPC1 和 Orai1 基因能够使 CaR 经 ROC 介导的 Ca^{2+} 内流和 NO 生成减少。

2.3.3 联合转染TRPC1与Orai1干扰质粒对PKC抑制剂Ro31-8220诱导的HUVECs中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和NO生成的影响

转染组 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ HUVECs Δratio 值为 2.89 ± 0.03 , NO 净荧光强度值为 30.11 ± 4.43 , 均明显低于对照组 (分别为 5.58 ± 0.04 、 196.96 ± 7.67) 和空质粒组 (5.85 ± 0.02 、 199.65 ± 6.65) (均 $P < 0.05$) (图 5), 而

空质粒组与对照组相比无显著差异。表明同时沉默 TRPC1 和 Orai1 基因能够使 CaR 经 SOC 介导的 Ca^{2+} 内流和 NO 生成减少。

2.3.4 联合转染TRPC1与Orai1干扰质粒对经典型PKCs和PKC μ 抑制剂Go6976诱导的HUVECs中 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和NO生成的影响

转染组 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ HUVECs Δratio 值为 3.05 ± 0.06 , NO 净荧光强度值为 36.58 ± 6.98 , 均明显低于对照组 (分别为 5.94 ± 0.06 、 201.99 ± 8.63) 和空质粒组 (分别为 5.86 ± 0.02 、 197.99 ± 4.55) (均 $P < 0.05$) (图 6), 而空质粒组与对照组相比无显著差异。表明同时沉默 TRPC1 和 Orai1 基因能够使 CaR 经 SOC 介导的 Ca^{2+} 内流和 NO 生成减少。

3 讨论

心脑血管疾病已成为危害人类健康和致死的主要因素, 发病率呈现逐年上升趋势。随着研究的逐

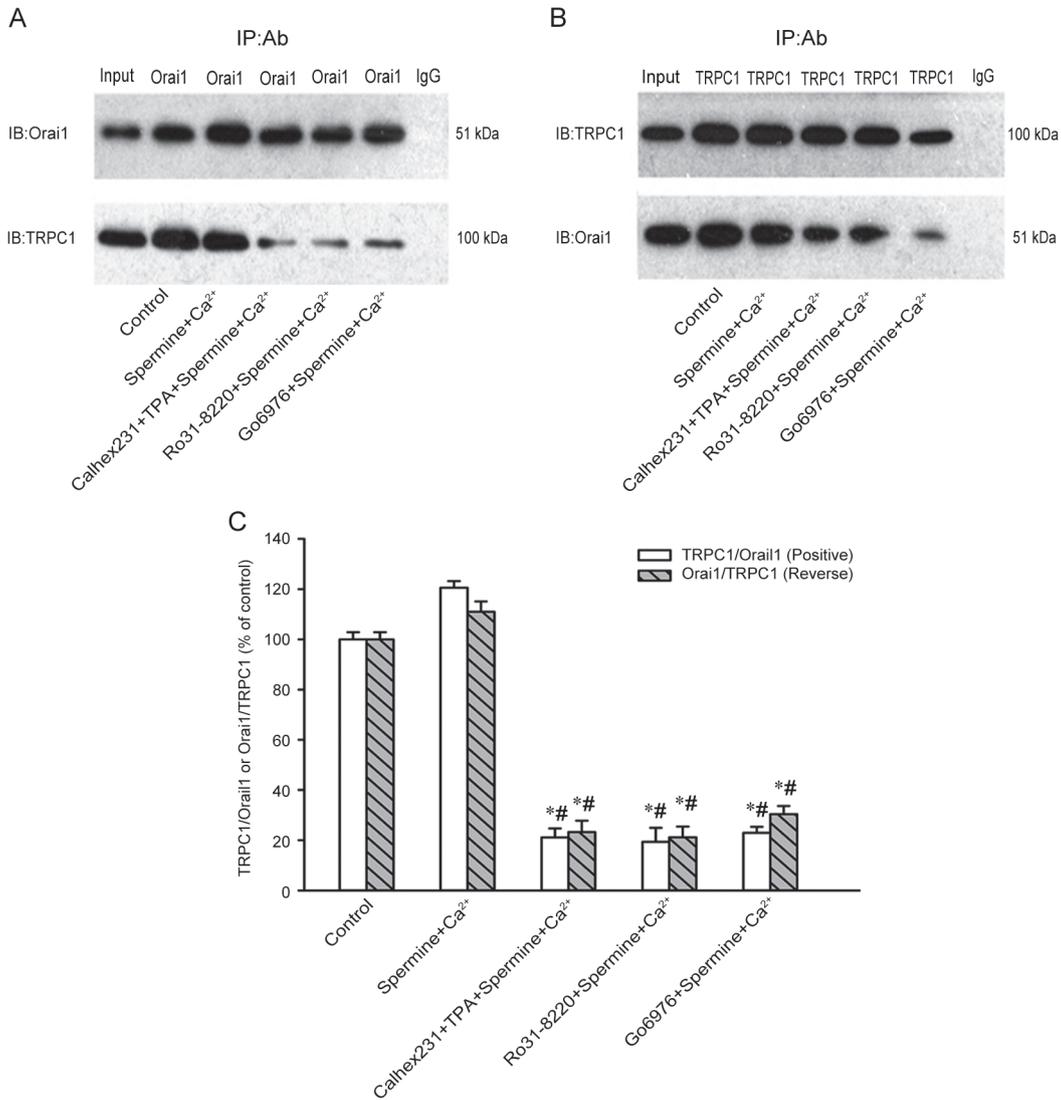


图 2. 人脐静脉内皮细胞(HUVECs)中经典瞬时感受器电位蛋白1 (TRPC1)与钙释放激活钙通道调节分子1 (Orai1)相互作用
 Fig. 2. The interaction between canonical transient receptor potential channel 1 (TRPC1) and calcium release-activated calcium modulator 1 (Orai1) examined by co-immunoprecipitation. *A*: Positive Co-IP. Orai1 was used as A resistance. *B*: Reverse Co-IP. TRPC1 was used as A resistance. *C*: Statistical result. Mean ± SEM, *n* = 3. **P* < 0.05 vs Control group; #*P* < 0.05 vs Spermine+Ca²⁺ group.

渐深入，人们发现 TRPC 与 Orai 生物学作用在心脑血管疾病的发生、发展中发挥重要作用。本研究组前期研究证实：CaR 在介导 HUVECs 中 Ca²⁺ 内流、eNOS 活性和 NO 生成中发挥重要作用^[4]。Ziegelstein 等^[8]在人主动脉血管内皮细胞的研究证实，在 CaR 激动剂精胺的刺激下，通过 IP₃ 和 Ryanodine 受体敏感的钙池释放，可引起 [Ca²⁺]_i 增加和 NO 生成，在此过程中可能有外 Ca²⁺ 内流的参与，且外 Ca²⁺ 内流涉及的钙通道相关蛋白 TRPC1、Orai1 作为关键分子组件参与了 CaR 激活，引发持续 Ca²⁺ 内流和 NO 生成等相关心血管疾病的发生、发展机制，

然而 TRPC1 与 Orai1 二者之间相互作用模式尚未阐明，因此在这一领域的研究工作也显得尤为重要。本研究在上述研究结果的基础上，首先选取 2~3 代 HUVECs 随机分别与 SOC 或 (和) ROC 的激活剂或阻断剂孵育构建不同细胞模型，结果显示 TRPC1 与 Orai1 蛋白二者相互作用共定位于细胞膜。经 Calhex231+TPA+ 精胺 +Ca²⁺、Ro31-8220+ 精胺 +Ca²⁺、Go6976+ 精胺 +Ca²⁺ 刺激后，TRPC1、Orai1 在胞膜中的定位均减少、相互作用减弱。我们认为 SOC 和 (或) ROC 的激动剂或阻断剂影响 TRPC1 和 Orai1 在同一 C 端区域内的共定位，可能在 TRPC1

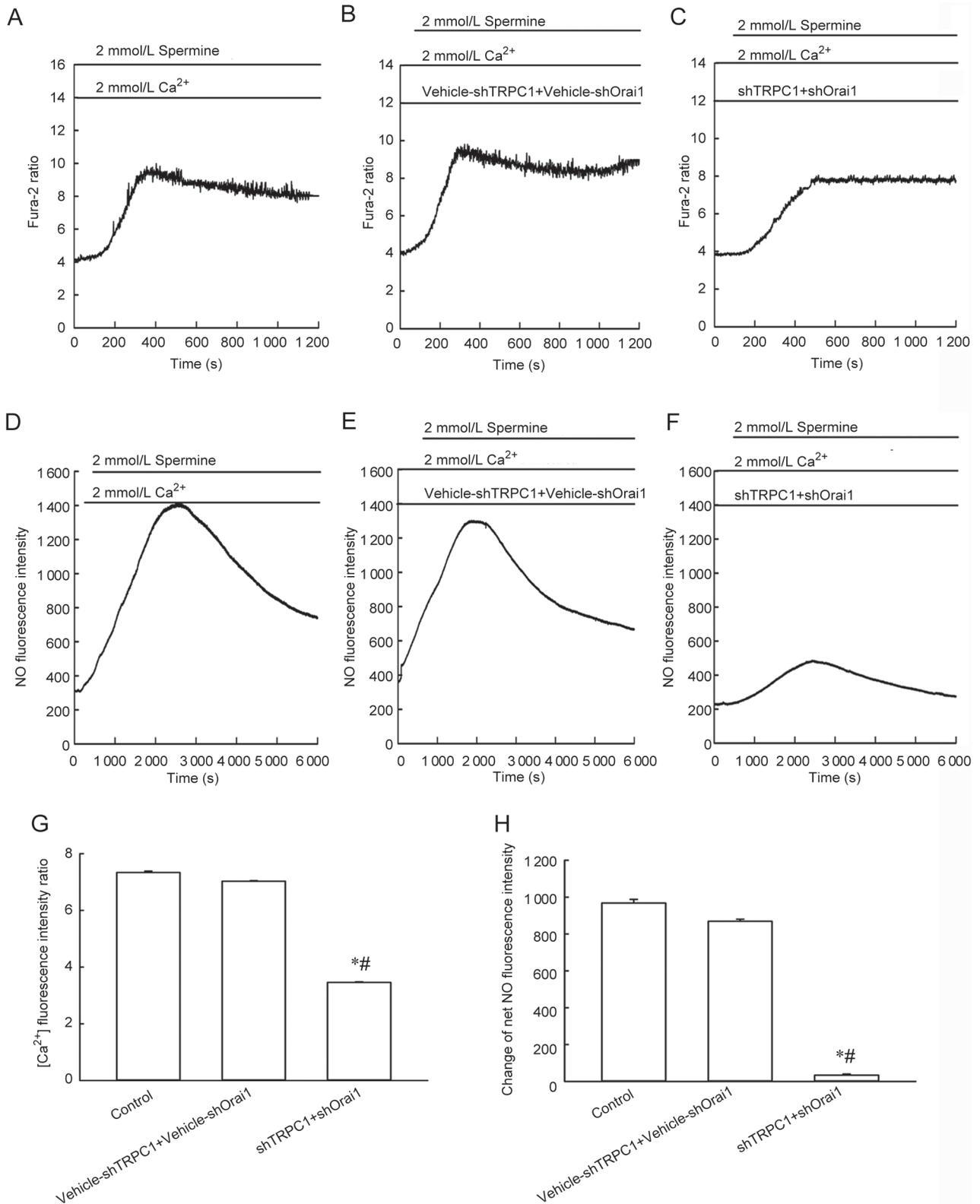


图 3. 精胺预处理HUVECs后TRPC1与Orai1联合干扰组中Ca²⁺和NO荧光强度动态变化

Fig. 3. The dynamic changes of intracellular calcium fluorescence intensity ratio (A-C) and NO fluorescence intensity (D-F) after spermine treatment in TRPC1 and Orai1 shRNA double transfected HUVECs. A and D: Control group; B and E: Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1 group; C and F: shTRPC1+shOrai1 group. G and H: Statistical results. Mean ± SEM, n = 3. *P < 0.05 vs Control group; #P < 0.05 vs Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1 group.

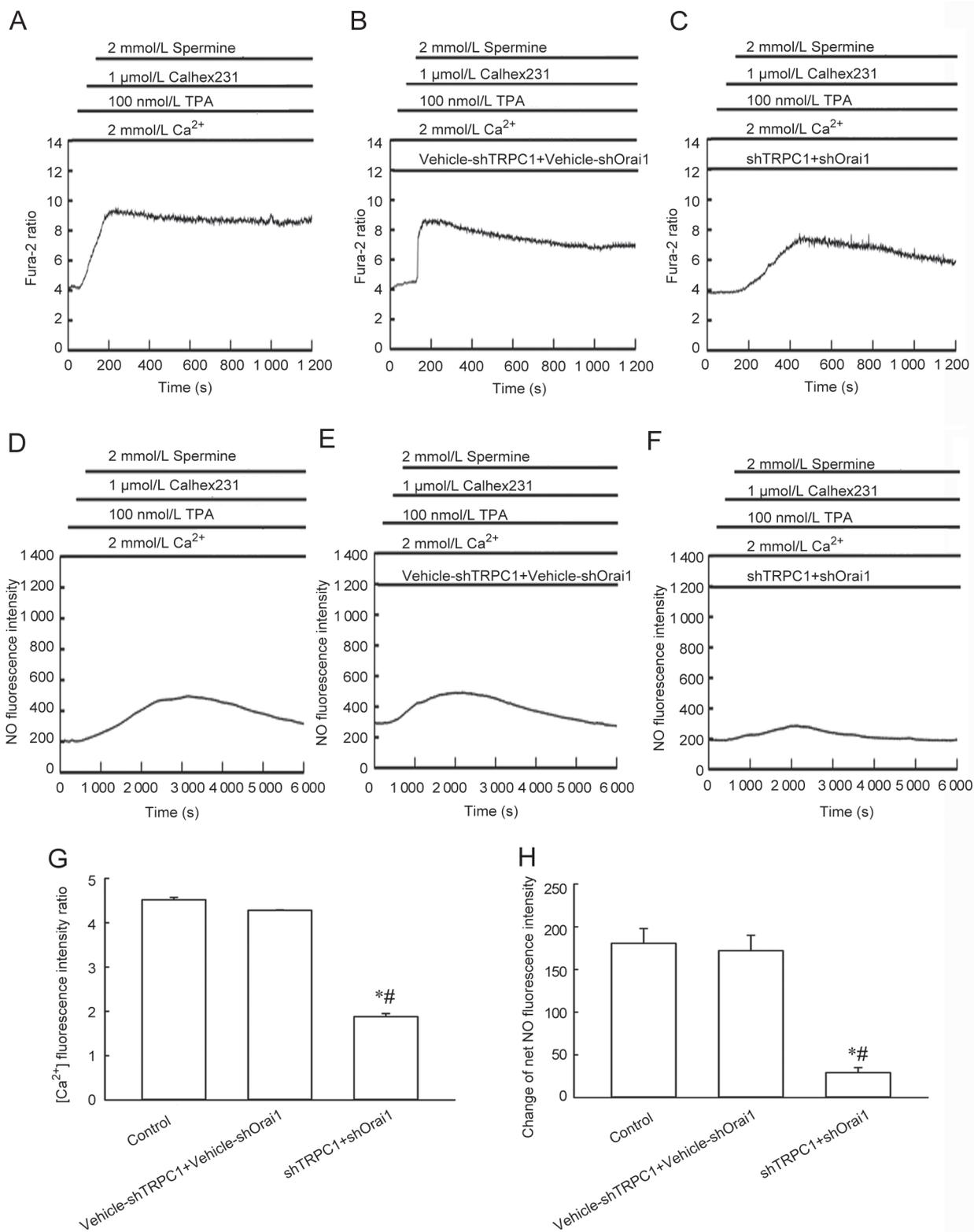


图 4. TPA+Calhex231 预处理 HUVECs 后 TRPC1 与 Orai1 联合干扰组中 Ca^{2+} 和 NO 荧光强度动态变化

Fig. 4. The dynamic changes of intracellular calcium fluorescence intensity ratio (A–C) and NO fluorescence intensity (D–F) after Calhex231 and TPA treatment in TRPC1 and Orai1 shRNA double transfected HUVECs. A and D: Control group; B and E: Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1 group; C and F: shTRPC1+shOrai1 group. G and H: Statistical results. Mean \pm SEM, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1 group.

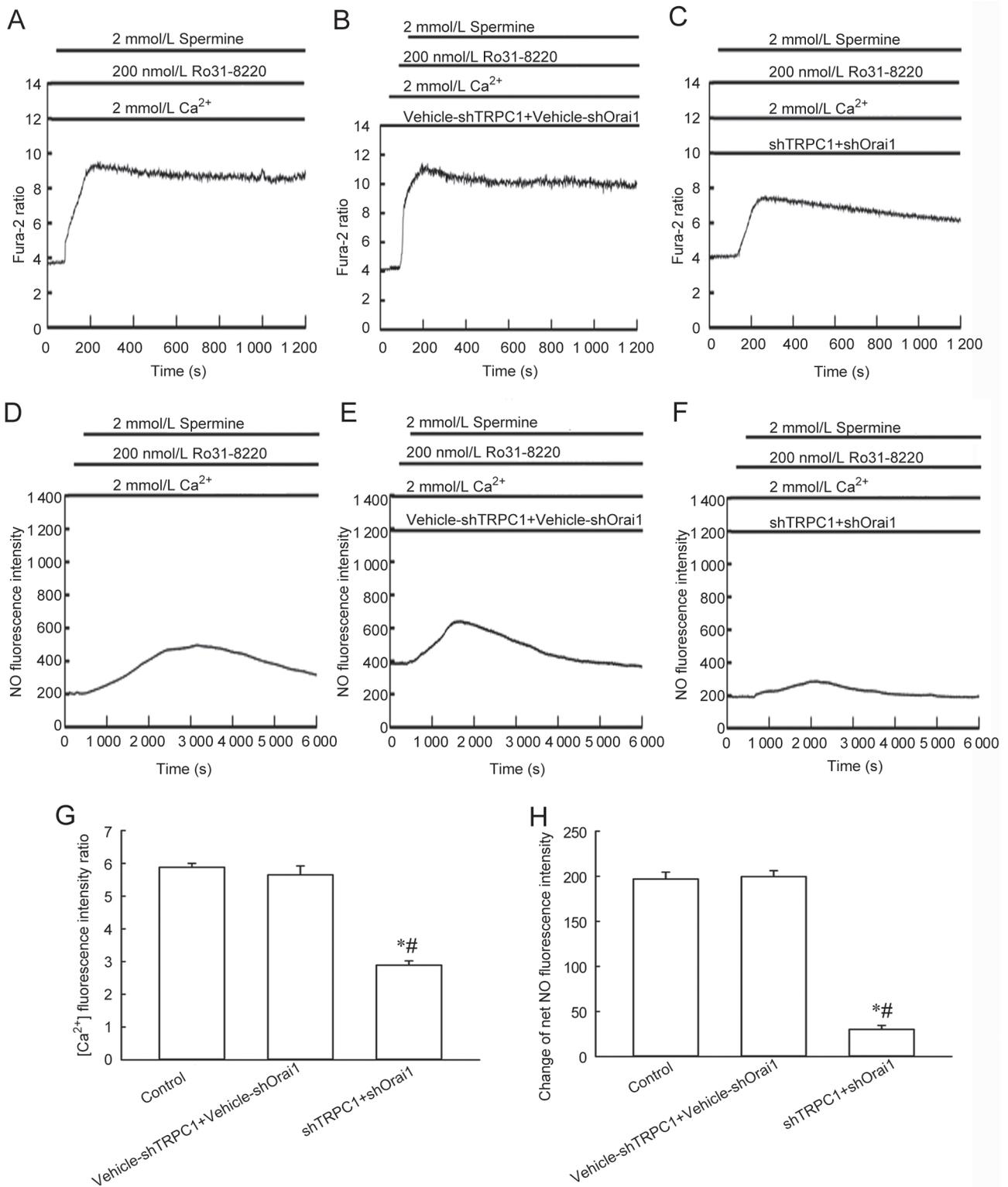


图 5. Ro31-8220预处理HUVECs后TRPC1与Orai1联合干扰组中Ca²⁺和NO荧光强度动态变化

Fig. 5. The dynamic changes of intracellular calcium fluorescence intensity ratio (A–C) and NO fluorescence intensity (D–F) after Ro31-8220 treatment in TRPC1 and Orai1 shRNA double transfected HUVECs. A and D: Control group; B and E: Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1 group; C and F: shTRPC1+shOrai1 group. G and H: Statistical results. Mean ± SEM, n = 3. *P < 0.05 vs Control group; #P < 0.05 vs Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1 group.

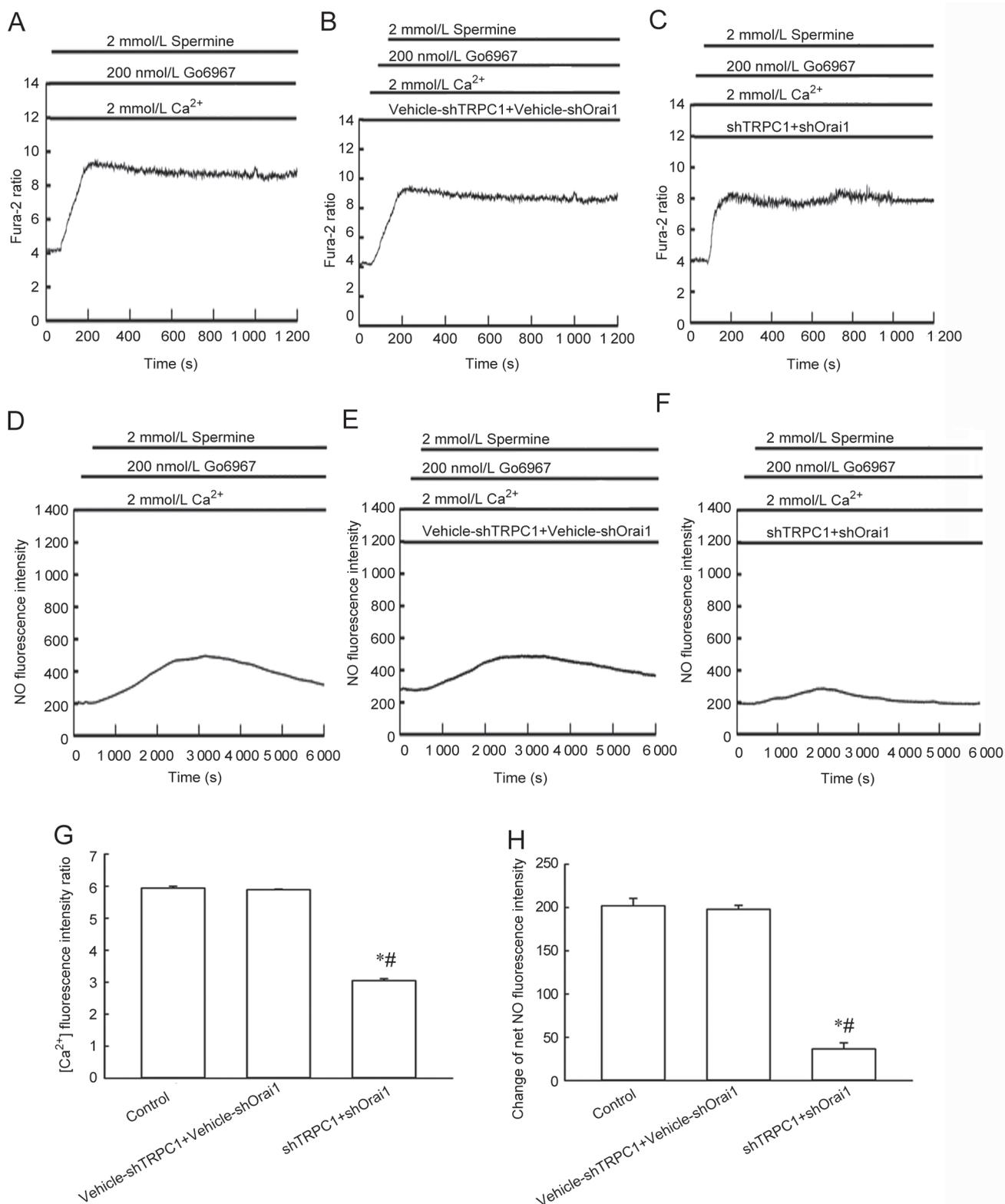


图 6. Go6967预处理HUVECs后TRPC1与Orai1联合干扰组中Ca²⁺和NO荧光强度动态变化

Fig. 6. The dynamic changes of intracellular calcium fluorescence intensity ratio (A–C) and NO fluorescence intensity (D–F) after Go6967 treatment in TRPC1 and Orai1 shRNA double transfected HUVECs. A and D: Control group; B and E: Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1 group; C and F: shTRPC1+shOrai1 group. G and H: Statistical results. Mean ± SEM, n = 3. *P < 0.05 vs Control group; #P < 0.05 vs Vehicle-shTRPC1+Vehicle-shOrai1 group.

和 Orai1 共同或者各自受到刺激启动信号级联反应时,二者相互结合形成复合物而发挥效应,以快速、准确地调节 TRPC1 和 Orai1 的相关生物学功能。

大量文献证实在不同的细胞中,TRPC、STIM 和 Orai 三者形成二元或三元复合物调节 SOC 或 ROC 介导的生理和病理生理功能。如在血小板和人胚肾(细胞)HEK293 中,STIM1 与 TRPC1 结合并形成 TRPC1-STIM1-Orai1 复合物,Orai1 在介导 TRPC1-STIM1 相互作用及 TRPC1 形成钙通道的激活模式中是必需的^[11]。为了阐明 TRPC1 与 Orai1 在 HUVECs 中 CaR 介导 Ca^{2+} 内流及 NO 生成中的作用,本研究使用质粒转染技术将特异性的 TRPC1 shRNA 和 Orai1 shRNA 联合转染到 HUVECs 中,同时以精胺作为配体激活 CaR (激活 SOC 和 ROC 通路),在细胞外含 Ca^{2+} 的情况下观察 TRPC1 与 Orai1 对 HUVECs 中 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 生成的影响。结果证实 HUVECs 中沉默 TRPC1 与 Orai1 对 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 生成均有下调作用。

目前 TRPC1 仍被认为是最可能的构成 SOC 和 ROC 的分子基础。在唾液腺、平滑肌细胞、DT40、血小板、内皮细胞等中均证实 TRPC1 由细胞内钙池耗竭激活,其中在 HUVECs 中由 TRPC1 与 TRPC3 异源二聚体构成 SOC^[12]。TRPC1 敲除只能部分抑制 SOC 介导的 Ca^{2+} 内流和 SOC 电流,而 Orai1 敲除则能完全抑制^[13]。这些结果证实了 SOC 的多样性,而不同的 SOC 均与 Orai1、TRPC1、STIM1 有关。为了证明 TRPC1 与 Orai1 作为 SOC 的重要组成部分参与了 CaR 介导的外钙内流和 NO 生成,本研究在 TRPC1 shRNA 和 Orai1 shRNA 联合转染 HUVECs 的基础上,用 Ro31-8220 和 Go6976 处理细胞,结果表明 Ca^{2+} 内流和 NO 生成可被 PKC 抑制剂抑制, SOC 参与了 Ca^{2+} 内流和 NO 生成,且在 HUVECs 中沉默 TRPC1 与 Orai1 后对 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 生成均有抑制作用,提示 TRPC1 与 Orai1 复合物作为 SOC 关键组件参与调节了 CaR 介导的钙内流和 NO 生成。

与 SOC 不同,ROC 作为另一种非选择性阳离子通道,其激活不依赖 Ca^{2+} 库耗竭,而是依赖于磷脂肌醇信号途径,对 Ca^{2+} 缺乏选择性^[14],其在血管内皮细胞介导的生物学功能中的作用研究甚少。本研究使用 CaR 负性变构调节剂 Calhex231+PKC 激活剂 TPA 处理细胞,随后加入精胺刺激,结果证实 ROC 参与了 Ca^{2+} 内流和 NO 生成,且沉默

TRPC1 与 Orai1 对 HUVECs $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 生成均有抑制作用,提示 TRPC1 与 Orai1 复合物作为 ROC 关键组件参与调节了 CaR 介导的钙内流和 NO 生成。

综上所述,本研究结果提示钙离子通道蛋白 TRPC1 与 Orai1 二者以复合物的形式经 SOC 和 ROC 激活介导钙内流及 NO 生成的活动机制,这为深入阐述 CaR 对血管系统疾病,如高血压、冠状动脉粥样硬化、心力衰竭、心肌缺血、心肌梗死及血脂、凝血纤溶系统的病理作用和机制提供理论依据。在临床应用上,研究者可以针对 CaR、TRPC1 与 Orai1 的功能、调节机制及寡聚化模式进行靶向干预,无疑将进一步明确 TRPC1、Orai1 与 CaR 在心血管疾病发生和发展中的重要作用和意义,为临床疾病的治疗提供新的思路和方法。

* * *

致谢:衷心感谢华中科技大学同济医学院病理生理学系/卫生部呼吸疾病重点实验室提供实验条件和技术指导。

参考文献

- 1 Petersen O, Michalak M, Verkhatsky A. Calcium signaling: Past, present and future. *Cell Calcium* 2005; 38(3-4): 161-169.
- 2 Wang LM (王腊梅), Hu QH, Zhong H, Tang N, Sun ZP, He F. TRPC1/STIM1 regulates Ca^{2+} entry and NO generation mediated by human umbilical vein endothelial cells store-operates Ca^{2+} channels and receptor-operated Ca^{2+} channels. *Chin J Arteriosclerosis* (中国动脉硬化杂志) 2017; 25(8): 764-772 (in Chinese with English abstract).
- 3 Wang LM (王腊梅), Hu QH, Zhong H, Tang Na, Sun ZP, He F. TRPC1/Orai1 regulates Ca^{2+} entry and NO generation mediated by human umbilical vein endothelial cells store-operates Ca^{2+} channels and receptor-operated Ca^{2+} channels. *Basic Clin Med* (基础医学与临床) 2017; 37(5): 696-704 (in Chinese with English abstract).
- 4 Wang ZH (王振焕), Hu QH, Zhong H, Deng FM, Chen XY, Sun ZP, He F. Role of caveolin-1 in extracellular Ca^{2+} -sensing receptor-mediated NO generation in human umbilical vein endothelial cells. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志) 2011; 27(5): 934-938 (in Chinese with English abstract).
- 5 Liang X (梁霄), Luo XL, Zhong H, Hu QH, He F. Extracellular Ca^{2+} influx and NO generation are inhibited by small interference RNA targeting extracellular Ca^{2+} -sensing receptor in human umbilical vein endothelial cells. *Acta Physiol Sin*

- (生理学报) 2012; 64(3): 289–295 (in Chinese with English abstract).
- 6 Liao Y, Plummer NW, George MD, JoelZhu MX, Birbaumer L. A role for Orai in TRPC-mediated Ca^{2+} entry suggests that a TRPC:Orai complex may mediate store and receptor operated Ca^{2+} entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(9): 3202–3206.
 - 7 Jardin I, Lopez JJ, Salido GM, Rosado JA. Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming Ca^{2+} channels. *J Biol Chem* 2008; 283(37): 25296–25304.
 - 8 Ziegelstein RC, Xiong Y, He C, Hu Q. Expression of a functional extracellular calcium-sensing receptor in human aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342(1): 153–163.
 - 9 Chen YL (陈玉龙), Jia M. The effect of cigarette smoke extracts on protein S-nitrosylation in human umbilical vein endothelial cells and its mechanism. *Chin J Arteriosclerosis (中国动脉硬化杂志)* 2016; 24(9): 889–892 (in Chinese with English abstract).
 - 10 Wang LM (王腊梅), Zhong H, Zhao H, Wang J, Pang LJ, Sun ZP, He F. Orai3 participates in CaR-mediated Ca^{2+} entry and NO generation in human umbilical vein endothelial cells. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)* 2014; 30(1): 1–10 (in Chinese with English abstract).
 - 11 Cheng KT, Liu XB, Ong HL, Ambudkar IS. Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels. *J Biol Chem* 2008; 283(19): 12935–12940.
 - 12 Ambudkar IS, Ong HL, Liu XB, Bandyopadhyay B, Cheng KT. TRPC1: the link between functionally distinct store-operated calcium channels. *Cell Calcium* 2007; 42(2): 213–223.
 - 13 Ong HL, Cheng KT, Liu X, Bandyopadhyay BC, Paria BC, Soboloff J, Pani B, Gwack Y, Srikanth S, Singh BB, Gill DL, Ambudkar IS. Dynamic assembly of TRPC1/STIM1/Orai1 ternary complex is involved in store operated calcium influx: Evidence for similarities in SOC and CRAC channel components. *J Biol Chem* 2007; 282(12): 9105–9116.
 - 14 Putney JW. Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev* 2009; 231(1): 10–22.