

研究论文

TRPV4通道介导慢性低氧肺高压大鼠肺微血管内皮通透性增加

焦海霞^{1,2,#}, 袁胜霞^{2,3,#}, 黄燕珍², 苏巧文^{2,4}, 何瑞岚^{1,2}, 吴枝娟^{1,2}, 林默君^{1,2,*}

福建医科大学¹基础医学院; ²心血管病离子通道信号调控福建省高校重点实验室, 福州 350112; ³中国人民解放军联勤保障部队第九〇〇医院, 福州 350102; ⁴福建医科大学附属泉州第一医院病理科, 泉州 362000

摘要: 本文旨在研究瞬时受体电位香草素受体4 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4)通道对慢性低氧肺高压(chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, CHPH)大鼠肺微血管内皮细胞(pulmonary microvascular endothelial cells, PMVECs)通透性的影响, 以阐明CHPH发生时血管内皮功能障碍的可能机制。Sprague-Dawley大鼠慢性低氧处理21天建立CHPH模型, 组织块贴壁法原代培养PMVECs, 采用FITC-葡聚糖法检测细胞通透系数, 透射电镜观察紧密连接(tight junction, TJ)结构, 实时荧光定量PCR和蛋白印迹法检测TRPV4和TJ相关蛋白Occludin、Claudin-5、ZO-1表达变化, TRPV4特异性激动剂GSK1016790A (GSK, 10 nmol/L)和抑制剂HC-067047 (HC, 1 μmol/L, 0.5 μmol/L)干预后观察PMVECs内Ca²⁺浓度变化及其对PMVECs通透性的影响。结果显示: 慢性低氧处理21天后成功建立CHPH大鼠模型, CHPH大鼠肺血管内皮间TJ结构破坏, PMVECs屏障功能降低, 细胞间通透性增高, TJ相关蛋白表达显著减少, TRPV4表达增高($P < 0.01$)。特异性激活TRPV4后CHPH大鼠PMVECs内Ca²⁺浓度显著增高, TRPV4特异性抑制剂HC对CHPH大鼠细胞Ca²⁺增高的抑制效应显著高于正常PMVECs, 并可以逆转CHPH大鼠PMVECs的通透性增高, 增加三种TJ相关蛋白表达($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。上述结果提示, TRPV4通道通过增加胞内Ca²⁺浓度, 引起CHPH大鼠PMVECs上TJ结构破坏、TJ相关蛋白表达下降, 诱发内皮功能障碍。

关键词: 肺高压; 肺微血管内皮细胞; 紧密连接; 钙离子; TRPV4

中图分类号: R331.3; R332

TRPV4 channel mediates the increase of pulmonary microvascular endothelial permeability in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension

JIAO Hai-Xia^{1,2,#}, YUAN Sheng-Xia^{2,3,#}, HUANG Yan-Zhen², SU Qiao-Wen^{2,4}, HE Rui-Lan^{1,2}, WU Zhi-Juan^{1,2}, LIN Mo-Jun^{1,2,*}

¹School of Basic Medical Sciences; ²The Key Laboratory of Fujian Province Universities on Ion Channel and Signal Transduction in Cardiovascular Diseases, Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China; ³The 900th Hospital of Joint Logistic Support Force, PLA, Fuzhou 350102, China; ⁴Department of Pathology, Affiliated Quanzhou First Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China

Abstract: The purpose of the present study was to investigate the effect of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channel on the permeability of pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs) in rats with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension (CHPH), so as to clarify the mechanism of vascular endothelial dysfunction during the occurrence of pulmonary hypertension (PH). CHPH rat model was established by exposure to chronic hypoxia (CH) for 21 days. Primary PMVECs were cultured by adherent tissue blocks at the edge of the lung. The permeability coefficient of primary cultured PMVECs was detected by fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran. The structure of tight junction (TJ) was observed by transmission electron microscope. The expression

Received 2020-11-29 Accepted 2021-03-22

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province, China (No. 2017J01528, 2017J01816, 2020J01616, 2021J01678).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-591-22862429; E-mail: mjlin@mail.fjmu.edu.cn

of TRPV4 and TJ-related proteins, such as, Occludin, Claudin-5, ZO-1 were examined by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blotting. The intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) in PMVECs and its effect on PMVECs permeability were observed after the intervention of TRPV4 specific agonist GSK1016790A (GSK, 10 nmol/L) and specific inhibitor HC-067047 (HC, 1 μ mol/L, 0.5 μ mol/L). The results showed that the CHPH model was successfully established in rats treated with CH for 21 days. In CHPH rats, the structure of TJ was destroyed, the function of PMVECs barrier was decreased, the intercellular permeability was increased, the expression of TJ-related proteins were significantly decreased and the expression of TRPV4 was significantly increased ($P < 0.01$). The amplitude of $[Ca^{2+}]_i$ in PMVECs of CHPH rats was significantly increased after activation of TRPV4. The inhibition ratio of HC on $[Ca^{2+}]_i$ in PMVECs of CHPH rats was significantly higher than that in normal PMVECs. TRPV4 specific inhibitor HC reversed the increase of PMVECs permeability and increased the expression of three TJ-related proteins in CHPH rats ($P < 0.01$, $P < 0.05$). These results suggest that TRPV4 channel can induce endothelial dysfunction by increasing the $[Ca^{2+}]_i$, resulting in the destruction of TJ structure and the decrease of TJ-related proteins expression on PMVECs in CHPH rats.

Key words: pulmonary hypertension; pulmonary microvascular endothelial cells; tight junction; Ca^{2+} ; TRPV4

肺高压 (pulmonary hypertension, PH) 是以肺动脉压力进行性增高, 导致右心衰竭甚至死亡的一组临床综合征, 其病理变化是肺小动脉闭塞性改变导致肺血管阻力进行性增加^[1]。因血管内皮与血液直接接触, 对缺氧、炎症、机械剪切力、药物、病毒等刺激尤为敏感, 内皮功能受损被认为是 PH 发生的始动因素^[2], 肺血管内皮的肌化和增生异常多起源于肺微血管内皮细胞 (pulmonary microvascular endothelial cells, PMVECs)^[3, 4], 而 PMVECs 功能受损会影响内皮屏障功能的完整性, 导致白细胞黏附、趋化、炎症物质的渗出, 进而加重 PH 病变^[5]。因此充分认识 PMVECs 屏障功能的调节及损伤修复机制, 对于 PH 的防治具有一定意义。

紧密连接 (tight junction, TJ) 是构成内皮屏障的主要结构基础, 而跨膜蛋白 Occludin、Claudin-5 和胞质附着蛋白 ZO-1 是影响 TJ 稳定性的三种主要 TJ 相关蛋白^[6]。 Ca^{2+} , 作为细胞内重要的第二信使, 是内皮屏障损伤过程中的关键调节因子^[7]。瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道超家族与细胞内 Ca^{2+} 稳态调控密切相关, TRPV4 是其中香草素受体 (transient receptor potential vanilloid, TRPV) 亚家族成员之一, 是 PMVECs 上主要的 Ca^{2+} 内流通道, 在调控血管内皮细胞通透性方面发挥重要作用^[8]。血管内皮细胞 TRPV4 通道被机械刺激激活, 引起肺血管通透性增加, 破坏血气屏障, 进而发生急性肺水肿^[9–11]。有报道显示, 在 PH 模型上, TRPV4 诱导的 Ca^{2+} 内流能够促进 PMVECs 异常迁移和增殖、线粒体分裂^[3, 12]。然而, TRPV4 对 PH 大鼠 PMVECs 内 Ca^{2+} 稳态与屏障功能调控的直接证据鲜有报道。本研究旨在检测 TRPV4 在慢性低氧肺高压 (chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, CHPH) 大鼠

PMVECs 上的表达、功能变化, 及其对血管内皮通透性的影响, 探讨 PH 发生时血管内皮功能障碍的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 异硫氰酸标记的植物凝集素 (FITC-BSI, 货号 L2895)、TRPV4 特异性激动剂 GSK1016790A (GSK, 货号 G0798)、TRPV4 特异性抑制剂 HC-067047 (HC, 货号 SML0143)、葡聚糖 (货号 00891) 购自美国 Sigma 公司; RNA 抽提试剂 TRIzol (货号 15596-018)、Occludin 兔多克隆抗体 (货号 33-1500) 购自美国 Thermo 公司; ZO-1 兔多克隆抗体 (货号 PB0231) 购自美国 Boster 公司、CD31 鼠单克隆抗体 (货号 ab119339)、vWF 兔多克隆抗体 (货号 ab6994) 购自美国 Abcam 公司; 反转录试剂盒 (Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, 货号 04897030001)、qRT-PCR 试剂盒 [Roche FastStart Universal SYBR Green Master (Rox), 货号 04913914001] 购自德国 Roche 公司; RIPA 蛋白裂解液 (货号 P0013B) 购自上海碧云天生物技术有限公司; TRPV4 兔多克隆抗体 (货号 BA2876-2) 购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 CHPH 大鼠模型的建立 清洁级雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (200~220 g) 购自福建医科大学实验动物中心, 实验动物许可证号 SCXK(闽) 2012-0001, 实验动物伦理审查编号 2017-042, 置于常压、密封的有机玻璃箱内饲养。其中一组大鼠饲养箱内的氧分压降至 9.5%~10.5%, 作为慢性低氧 (chronic hypoxia, CH) 组, 另一组则予以正常氧浓度 (21%), 作为对照 (control, CON) 组, 大鼠常规饲养 21 天。

1.3 CHPH 大鼠模型的鉴定 大鼠行肝素化处理

5 min 后, 腹腔注射 20% 乌拉坦 (1 g/kg) 麻醉, 迅速经右颈外静脉行右心室插管术, 记录大鼠右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP)。剪开大鼠胸腔取出心脏及肺。沿房室交界处剪去左右心房及血管, 分离右心室 (right ventricle, RV) 与左心室 (left ventricle, LV)+ 室间隔 (interventricular septum, VS), 并用滤纸吸去多余水分, 分别称重, 计算 RV/(LV+VS), 即右心室质量指数 (right ventricular mass index, RVMI)。

1.4 大鼠 PMVECs 培养 麻醉大鼠, 75% 酒精浸泡消毒。打开腹腔, 暴露腹主动脉并放血处死大鼠。无菌环境下暴露心肺, 经右心室推注含双抗的 PBS, 冲洗肺叶变白。将肺组织移入 DMEM 培养液中, 剥除胸膜, 剪下边缘肺组织, 并剪成约 1 mm³ 大小的组织块, 接种到培养瓶内, 并倒置贴壁 30 min, 轻翻培养瓶, 向培养瓶内加入 3 mL DMEM (含 20% 胎牛血清, 100 U/mL 青链霉素), 置于培养箱中孵育, 60 h 内移除组织块, 换液继续培养^[13]。待细胞长满瓶壁的 85% 以上, 用 0.25% 胰酶消化 3 min, 以 1:2 的比例进行传代, 2~4 代以供实验需要。

1.5 免疫荧光染色鉴定细胞 细胞爬片并生长至合适密度后, 固定、封闭, 分别用内皮细胞标记物 CD31、vWF 一抗 4 °C 孵育过夜、二抗室温孵育 1 h, DAPI 复染 10 min 后封片, 加 40 μL 的抗荧光淬灭封闭液于载玻片中间, 荧光显微镜下观察。

1.6 FITC-BSI 结合试验鉴定细胞 细胞爬片, 95% 冷乙醇固定 10 min, 滴加与 PMVECs 特异性结合的 FITC-BSI, 室温避光孵育 30 min, DAPI 室温复染 5 min 后封片, 置荧光显微镜下观察拍照。

1.7 跨内皮细胞电阻 (transendothelial electrical resistance, TER) 检测 将电阻仪的两个电极分别置于 Transwell 上、下室, 测量小室基础电阻值后, 在特定时间检测跨大鼠 PMVECs 电阻值, 减去各自基础电阻值, 再除以 Transwell 小室底面积 (1.1 cm²) 即获得 TER (单位: Ω/cm²)。

1.8 FITC-葡聚糖法检测 PMVECs 的通透系数 (permeability coefficient of dextran, P_d) 含单层 PMVECs 的 Transwell 小室中加入无酚红、无血清 DMEM 配制的 FITC-葡聚糖, 下室加入含等摩尔、无 FITC 标记的葡聚糖, CO₂ 孵箱避光孵育 1 h, 分别从上、下室提取 0.3 mL 和 1.2 mL 样品, 荧光分光光度计检测荧光能量值 (激发光波长 494 nm, 发射光波长 520 nm), 根据标准曲线得出上、下室 FITC-葡聚糖浓度, 按公式计算大鼠 PMVECs 的 P_d 值, $P_d = F_{a \rightarrow b} / C_a \times 1/A \times 1/T$; 其中 F_{a→b} 是上室到下室的通量 (mol), C_a 是上室 FITC-葡聚糖浓度 (mol/mL), A 是 Transwell 小室表面积 (cm²), T 是时间间隔 (h)。

1.9 透射电镜检测 TJ 麻醉大鼠, 取肺动脉组织 1 mm³, 用 3% 戊二醛-1.5% 多聚甲醛浸泡固定, 1% 锇酸-1.5% 亚铁氰化钾后固定, 梯度酒精脱水, 环氧树脂 618 包埋, 超薄切片经醋酸铀、枸橼酸铅双重染色后, 在飞利浦 EM208 型透射电镜下观察并摄片。

1.10 实时荧光定量 PCR 使用 TRIzol 法提取细胞总 RNA, 经反转录获得 cDNA, 以 cDNA 为模板进行 PCR, 以 GAPDH 作为内参照。引物序列见表 1, 通过 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因相对表达量。

1.11 蛋白质印迹法 用含蛋白酶抑制剂的 RIPA

表 1. 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1. Oligonucleotide primers for real-time PCR

Gene		Oligonucleotide primers (5'-3')	Product (bp)
Claudin-5	Sense	TTGGAAGGGGCTGTGGAT	177
	Antisense	GGAAAAGTGAAGTCTGGACGC	
Occludin	Sense	GGACTGTTTCAGAGCTCCGTC	132
	Antisense	GTGAGCACTAGCAAGTTGGC	
ZO-1	Sense	ATCCCACAAGGAGCCATTCC	145
	Antisense	TCACAGTGTGGCAAGCGTAG	
TRPV4	Sense	AAGCCGATATAGGGCGACAG	217
	Antisense	GAAAGACCCCGATCTTGCCA	
GAPDH	Sense	ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	252
	Antisense	TTTGAGGGTGCAGCGAACTT	

蛋白裂解液提取细胞总蛋白,BCA法进行蛋白定量,按每孔 20 μg 蛋白量上样,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转到硝酸纤维素膜。随后用含 5% (w/v) 脱脂奶粉的 PBS 于室温下封闭 2 h,与目标蛋白抗体 (1:500) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TTBS 漂洗,再用辣根过氧化物酶结合的二抗 (1:5 000) 室温下封闭 1 h,TTBS 漂洗,ECL 发光。

1.12 Fluo-3 荧光检测 PMVECs 内 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)

用可透膜的 Ca^{2+} 敏感的荧光染料 Fluo-3 AM 检测 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,室温下负载 30 min 后,用台氏液冲洗使胞内染料完全去酯化。启动实时细胞动态荧光强度系统,在 FeliX 32 软件中设置激发光波长为 488 nm,发射光波长为 510 nm,采样频率为 5 points/s,记录时间为 2 000 s,点击采样开始检测 Fluo-3 荧光变化 (F)。实验结束后,加入 Ca^{2+} 载体 A23187 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 Ca^{2+} (10 mmol/L) 作用于细胞以检测最

大荧光值 (Fmax),待荧光强度从最高点下降后加入 Mn^{2+} (10 mmol/L) 以检测背景荧光值 (Fbg)。经 FeliX 32 软件分析,用以下公式计算: $[\text{Ca}^{2+}]_i = \text{KD} \times (\text{F} - \text{Fbg}) / (\text{Fmax} - \text{F})$,其中 Fluo-3 的 KD 值为 1.1 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.13 统计学处理 所有数据均以 mean \pm SD 表示,采用 SPSS 11.5 软件进行统计学分析。组间比较采用 one-way ANOVA 分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。SigmaPlot 11.0 软件绘制统计图形。

2 结果

2.1 CHPH模型鉴定结果

大鼠在 CH 条件下饲养 21 天后,RVSP 从 CON 组的 (27.63 \pm 2.58) mmHg 增加到 CH 组的 (49.44 \pm 3.17) mmHg ($P < 0.01$,图 1A);而 CH 组体循环动脉压和心率均没有显著变化,表明 CH 可以导致右

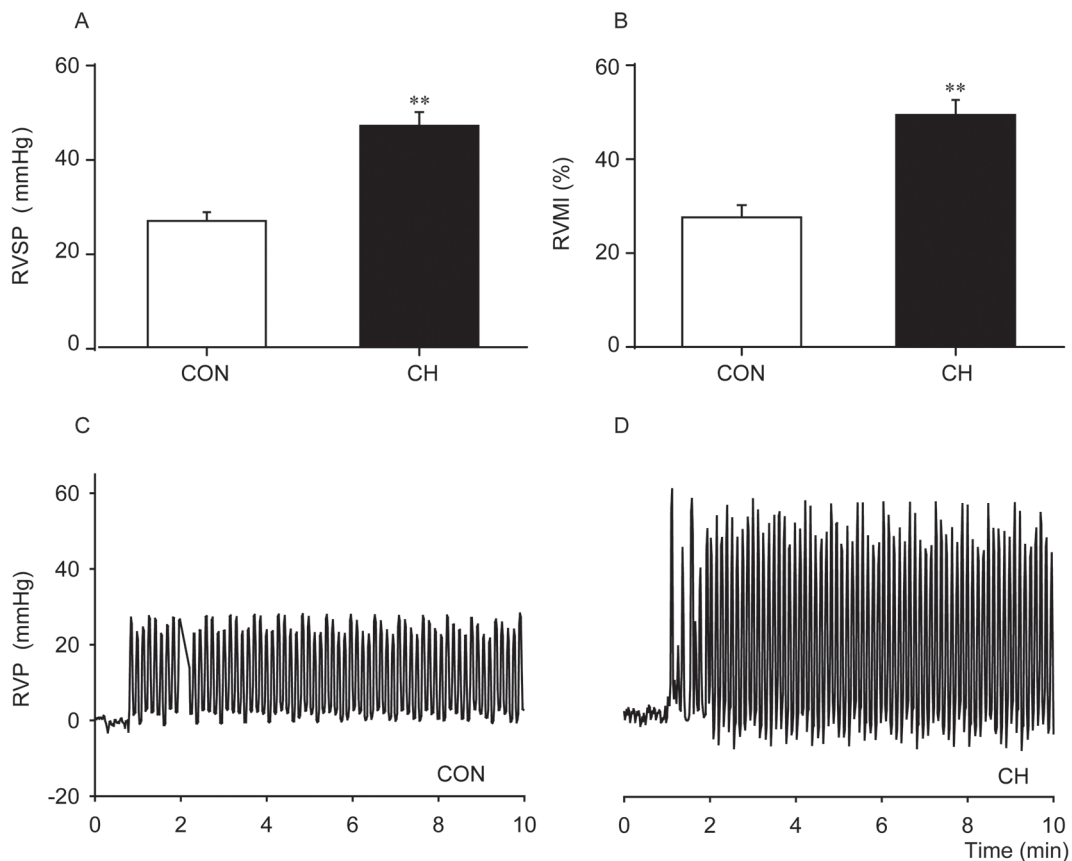


图 1. 低氧处理21天后肺高压大鼠模型鉴定

Fig. 1. Validation of pulmonary hypertension in rats treated by exposure to chronic hypoxia (CH) for 3 weeks. *A, B*: The average values of right ventricular systolic pressure (RVSP, *A*) and right ventricular mass index (RVMI, *B*) of control (CON) and CH rats. *C, D*: Representative tracings of right ventricular pressure (RVP) recorded from a CON rat (*C*) and a CH rat (*D*). Mean \pm SD, $n = 9$, ** $P < 0.01$ vs CON group.

心室内压增高。RVMI 从 CON 组的 (26.80 ± 1.82)% 增加至 (46.95 ± 2.90)% ($P < 0.01$, 图 1B), 表明 CH 组大鼠右心重构, 右心室肥大, 提示 CHPH 大鼠模型制备成功。

2.2 大鼠PMVECs的培养与鉴定

采用组织块贴壁法培养原代 PMVECs, 分别观察组织块贴壁第 2、3、8 天的细胞状态 (图 2A~C)。结果显示, 组织块贴壁第 2 天时, 就有少量形状不一的内皮细胞爬出, 并伴有血细胞 (图 2A); 组织块贴壁 3 天左右时, 大量的内皮细胞爬出, 血细胞数目减少 (图 2B); 8 天后, 内皮细胞汇合成单层, 呈典型的铺路石样生长 (图 2C)。CD31、vWF 的多克隆抗体免疫荧光染色鉴定培养细胞为血管内皮细胞 (图 2D、E), FITC-BSI 结合试验进一步鉴定培养的内皮细胞为 PMVECs (图 2F)。以上结果显示, 通过组织块贴壁法能成功、有效地培养出高纯度的 PMVECs。

2.3 CHPH大鼠PMVECs通透性增高

TER 监测 Transwell 小室内 PMVECs 的生长情况, 结果显示, 随着培养时间延长, CON 组与 CH

组电阻值持续升高, 且在培养的第 1~5 天 CON 组 TER 都显著高于 CH 组 (图 3A)。取培养第 5 天的 PMVECs 单层模型, 采用 FITC-葡聚糖法进行通透性实验, 结果显示 CH 组 PMVECs 的 P_d 值显著高于 CON 组 (CON = 16.3 ± 1.88 , CH = 26.2 ± 3.61 , $P < 0.01$, 图 3B), 以上结果提示, 在 PMVECs 构建的细胞单层模型中, CH 组大鼠肺微血管内皮通透性显著高于 CON 组。

2.4 CHPH大鼠TJ结构破坏

透射电镜结果 (图 4) 显示, CH 组肺血管内皮细胞间 TJ 结构呈不同程度破坏, 间隙加宽, 提示 CH 组大鼠肺血管内皮细胞 TJ 结构破坏与肺血管内皮通透性增高关系密切。

2.5 PMVECs上TRPV4和TJ相关蛋白表达的变化

实时荧光定量 PCR 检测大鼠 PMVECs 上 TRPV4 和三种 TJ 相关蛋白 mRNA 表达水平, 以 GAPDH 为内参, 结果显示, CH 组大鼠 PMVECs 上 TRPV4 mRNA 表达量显著高于 CON 组 ($P < 0.01$, 图 5A)、三种 TJ 相关蛋白 Occludin、Claudin-5 和 ZO-1 mRNA 表达量均显著低于 CON 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,

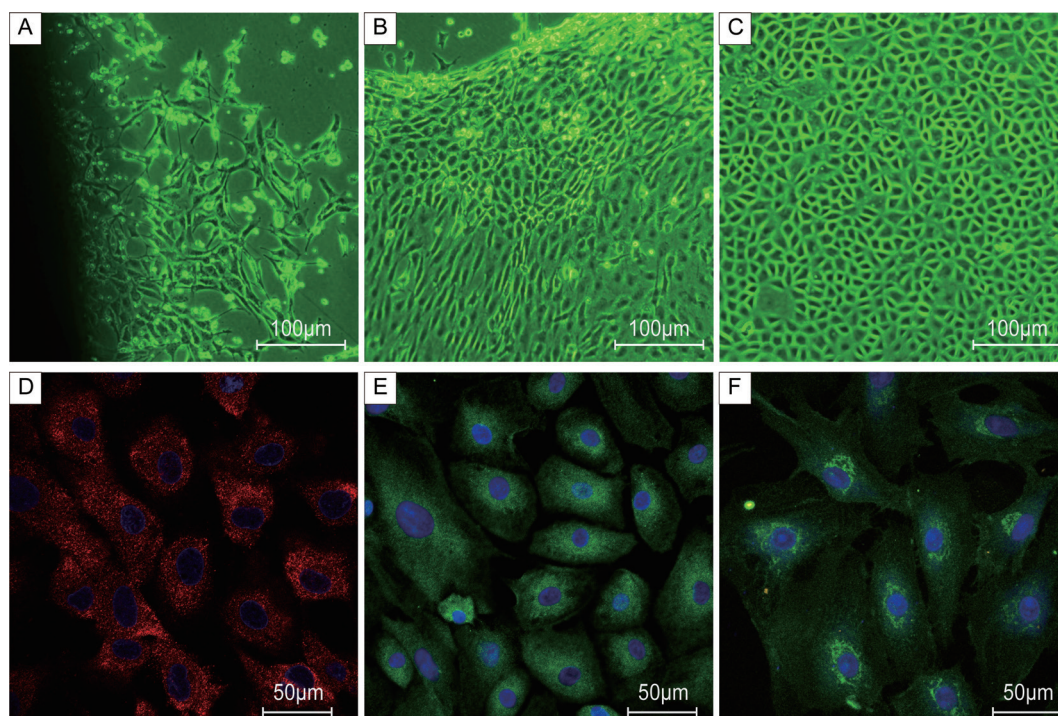


图 2 大鼠肺微血管内皮细胞的培养与鉴定

Fig. 2. The culture and identification of rat pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs). Primary PMVECs were cultured by adherent tissue blocks at the edge of the lung. A-C: The cell morphology cultured after 2 (A), 3 (B), and 8 days (C) of tissue block attachment. Scale bar, 100 μ m. D, E, and F: Cultured cells were identified by immunofluorescence staining of CD31 (D) and vWF (E) polyclonal antibodies as vascular endothelial cells, and by FITC-BSI binding assay as PMVECs (F). Scale bar, 50 μ m.

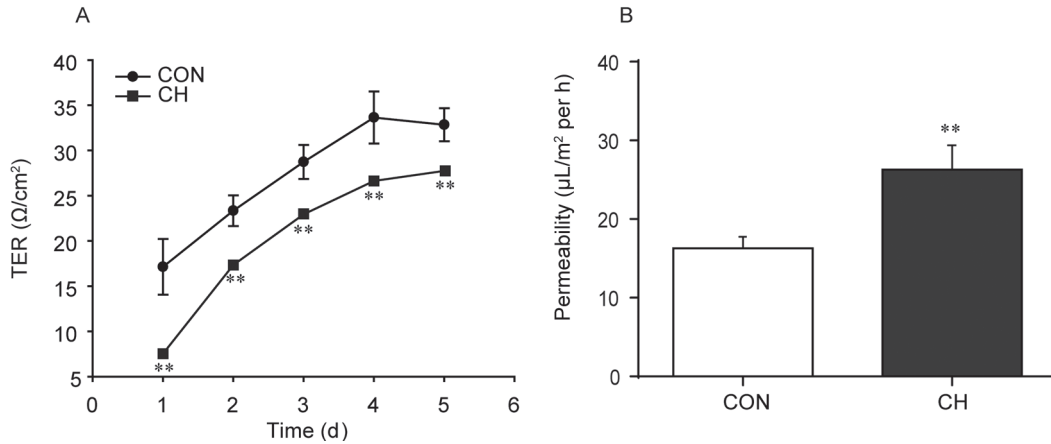


图 3. 大鼠肺微血管内皮细胞单层细胞模型的构建及通透性变化

Fig. 3. Construction of rat pulmonary microvascular endothelial cells (PMVECs) monolayer model and comparison of permeability. *A*: The transendothelial electrical resistance (TER) value of PMVECs monolayer model in control (CON) and chronic hypoxia (CH) groups. *B*: The tracer molecule (FITC) from the upper to the lower chamber during the last 1 hours of incubation was measured in CON and CH groups. Mean \pm SD, $n = 11-14$, ** $P < 0.01$ vs CON group.

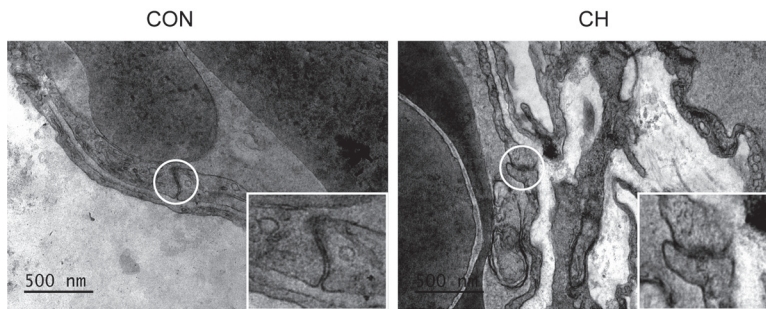


图 4. 电镜观察CHPH大鼠PMVECs上紧密连接(tight junction, TJ)结构变化

Fig. 4. Transmission electron microscopy (TEM) image of tight junctions (TJ) in PMVECs of control (CON) and chronic hypoxia (CH) groups. The tight connection position between PMVECs is shown in the white round frame; the white square is the enlargement of the TJ structure. TJ structure of CON group was completed, while the structure of CH group was destructed at various degrees. Scale bar, 500 nm.

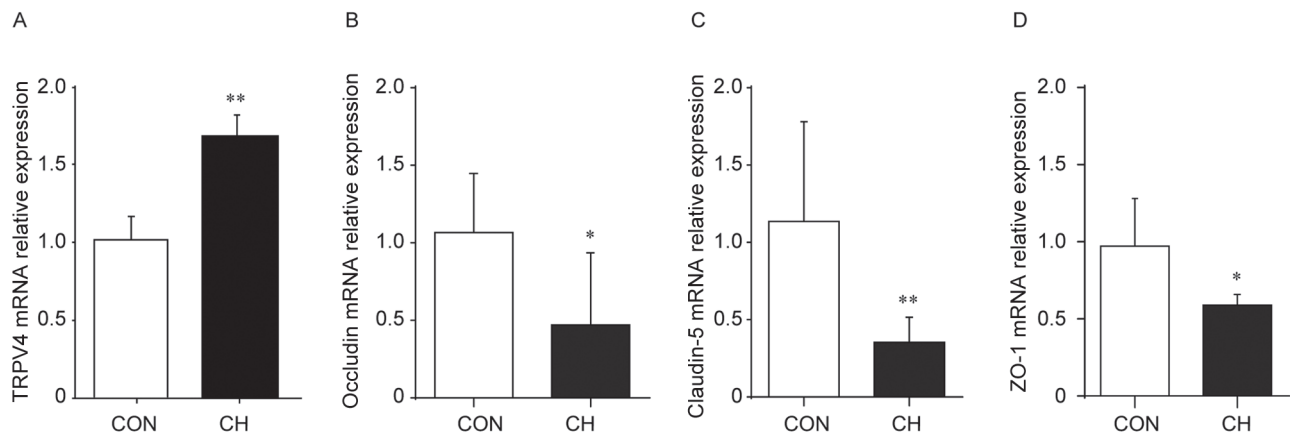


图 5. CHPH大鼠PMVECs上TRPV4和三种TJ相关蛋白Occludin、Claudin-5、ZO-1 mRNA表达变化

Fig. 5. The mRNA expression of TRPV4 (*A*) and TJ-related proteins Occludin (*B*), Claudin-5 (*C*), ZO-1 (*D*) in PMVECs of control (CON) and chronic hypoxia (CH) groups. Mean \pm SD, $n = 7$ each; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CON group.

图 5B、C、D)。

采用蛋白质印迹法检测 TRPV4 和 TJ 相关蛋白 Occludin、ZO-1 表达, 以 β -actin 为内参, 结果显示, 与 CON 组比较, CH 组大鼠 PMVECs 上 TRPV4 表达显著增高 ($P < 0.05$, 图 6A)、Occludin、ZO-1 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$, 图 6B、C), 以上结果提示肺血管内皮通透性增高与 TRPV4 表达升高、TJ 相关蛋白表达下降可能相关。

2.6 PMVECs 上 TRPV4 通道介导 $[Ca^{2+}]_i$ 增高

Fluo-3 荧光检测显示 CH 组大鼠 PMVECs $[Ca^{2+}]_i$ 水平较 CON 组显著增高 ($P < 0.05$, 图 7B)。TRPV4 特异性激动剂 GSK (10 nmol/L) 和不同剂量特异性抑制剂 HC (1 μ mol/L, 0.5 μ mol/L) 干预结果显示, GSK 可迅速上调 PMVECs 的 $[Ca^{2+}]_i$ 水平, 且 CH 组 $[Ca^{2+}]_i$ 增高幅度显著高于 CON 组 ($P < 0.01$, 图 7C、D、E); 0.5 μ mol/L HC 可小幅度拮抗 GSK 引起的 $[Ca^{2+}]_i$ 改变 ($P < 0.01$), 而 1 μ mol/L HC 几乎完全抑制 GSK 诱导增加的 Ca^{2+} 内流 ($P < 0.01$, 图 7C、D、E), 抑制率结果显示拮抗作用呈剂量依赖性增强, 0.5 μ mol/L HC 对 CON 和 CH 组的抑制率分别为 $(-51.66 \pm 4.45)\%$ 和 $(-74.15 \pm 4.93)\%$, 1 μ mol/L HC 对 CON 和 CH 组的分别为 $(-95.43 \pm 2.62)\%$ 和 $(-94.02 \pm 0.86)\%$ ($P < 0.01$, 图 7F), 以上结果提示 CHPH 大鼠 PMVECs $[Ca^{2+}]_i$ 的增高与 TRPV4 的功能活化密切相关, CHPH 大鼠 PMVECs 膜上 TRPV4 通道的功能显著上调。

2.7 TRPV4 功能与 PMVECs 通透性变化的关系

分别在 CON 和 CH 组 PMVECs 内加入 GSK (10

nmol/L) 和 HC (0.5 μ mol/L), 结果显示 10 nmol/L GSK 可诱导 CON 和 CH 组 P_d 值大幅度上升 ($P < 0.01$); 0.5 μ mol/L HC 可拮抗 GSK 诱导的高渗透性效应 ($P < 0.01$); 同时, HC 可逆转 CH 组 PMVECs 的通透性增高 (图 8), 提示活化 TRPV4 可显著增加肺微血管内皮的通透性。

2.8 TRPV4 功能与三种 TJ 相关蛋白 mRNA 表达的关系

分别在 CON 和 CH 组 PMVECs 内加入 GSK (10 nmol/L) 和 HC (0.5 μ mol/L), 实时荧光定量 PCR 检测三种 TJ 相关蛋白 mRNA 表达。如图 9 所示, 无论 CON 还是 CH 组加入 HC 抑制 TRPV4, 三种 TJ 相关蛋白 mRNA 表达都显著升高 ($n = 5 \sim 13$, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 其中 CH 组加入 HC 后, Occludin mRNA 表达 (2.29 ± 1.09) 显著高于无 HC 处理的 CON 组 (1.07 ± 0.38) ($P < 0.05$), CH 组加入 HC 后 Claudin-5 升高后为 1.10 ± 0.45 , 与 CON 组正常细胞的 (1.14 ± 0.64) 相比无显著差异 ($P > 0.05$), 提示 HC 逆转 CH 组 PMVECs 通透性增高与增强 TJ 蛋白表达密切相关。而加入 GSK 激活 TRPV4 通道后, CON 组 PMVECs 上 Occludin、Claudin-5、ZO-1 表达都显著降低 ($n = 5 \sim 13$, $P < 0.05$), 在 CH 组只有 ZO-1 表达显著降低 ($n = 8$, $P < 0.05$), 提示 GSK 诱导的 CON 组 P_d 值大幅度上升与三种 TJ 相关蛋白表达相关, 而在 CH 大鼠可能与 ZO-1 表达关系密切。

3 讨论

本研究利用 CHPH 大鼠模型研究 TRPV4 通道对 PMVECs 通透性的影响。结果显示 CHPH 大鼠

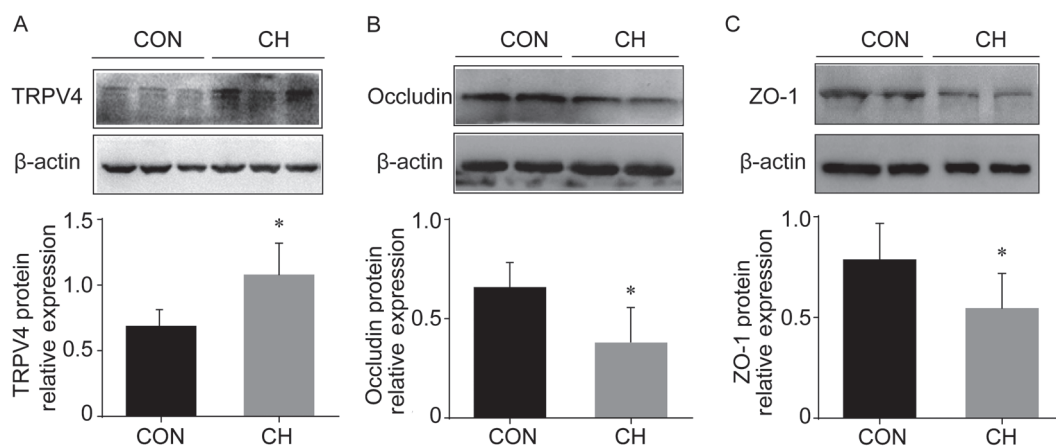


图 6. CHPH 大鼠 PMVECs 上 TRPV4 和 Occludin、ZO-1 表达变化

Fig. 6. Representative immunoblots showing the expression of TRPV4 (A) and TJ-related proteins Occludin (B) and ZO-1 (C) in PMVECs of control (CON) and chronic hypoxia (CH) groups. Mean \pm SD, $n = 7$ each; * $P < 0.05$ vs CON group.

PMVECs 通透性增高伴随 TJ 结构破坏, 同时 TRPV4 通道蛋白表达升高、TJ 相关蛋白 Occludin、Claudin-5、ZO-1 表达下降。特异激活 TRPV4, CH 组 $[Ca^{2+}]_i$ 增

大幅度显著高于 CON 组, 两组 PMVECs 通透性进一步升高, CON 组三种 TJ 相关蛋白 mRNA 表达下降, CH 组 ZO-1 表达降低。抑制 TRPV4 能够增强

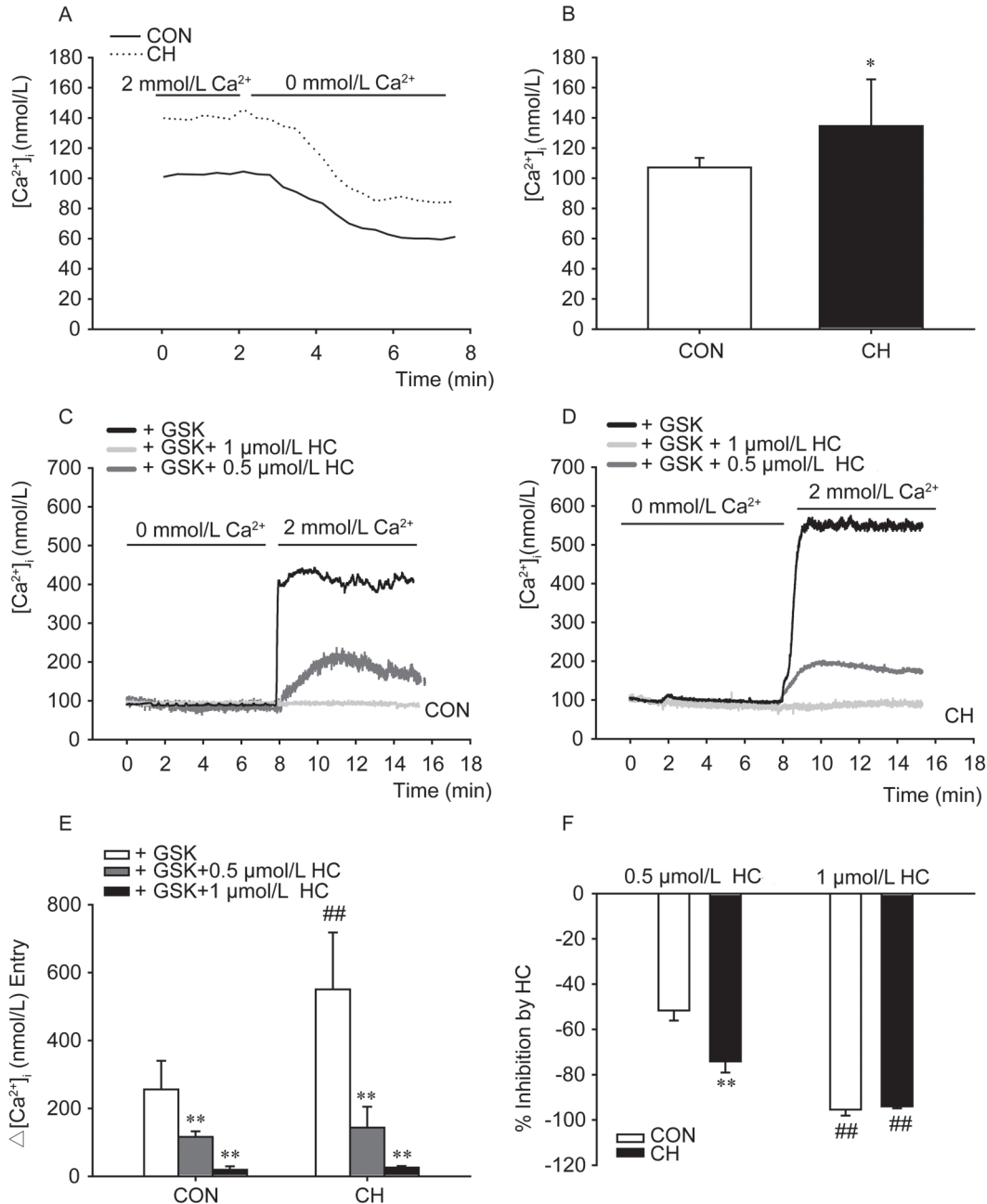


图 7. TRPV4介导CHPH大鼠PMVECs $[Ca^{2+}]_i$ 显著升高

Fig. 7. $[Ca^{2+}]_i$ of PMVECs in CHPH rats was significantly increased by TRPV4 specific activation. Representative tracings (A) and the average change (B) of the sustained plateau of 2 mmol/L Ca^{2+} solution in control (CON) and chronic hypoxia (CH) cells (mean \pm SD, $n = 16$, * $P < 0.05$ vs CON group). Representative tracings of GSK (with or without different doses of HC) induced cation entry in PMVECs of CON (C) and CH rats (D), reaching its maximum level within 1 min and sustained for over 8 min. Summary bar graph showing statistically significant difference change in peak Ca^{2+} transients elicited by GSK (with or without different doses of HC) in CON and CH cells (E) (mean \pm SD, $n = 8$, ## $P < 0.01$ vs CON group, ** $P < 0.01$ vs GSK-induced). Response inhibition (%) by HC (0.5 μ mol/L or 1 μ mol/L) compared with GSK-induced Ca^{2+} increase (F) (mean \pm SD, $n = 7$, ** $P < 0.01$ vs CON group, ## $P < 0.01$, 0.5 μ mol/L vs 1 μ mol/L). GSK: GSK1016790A; HC: HC-067047.

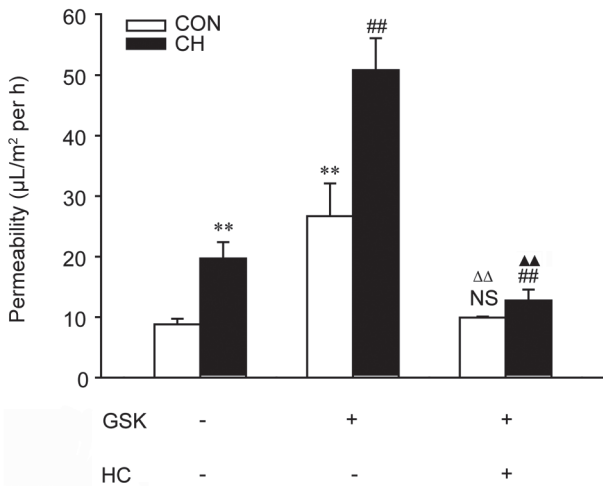


图 8. GSK和HC对CHPH大鼠PMVECs单层膜通透性的影响
Fig. 8. The effect of GSK and HC on the permeability of PMVECs monolayers in normoxic (CON) and chronic hypoxic (CH) rats. TRPV4 stimulation by GSK rapidly and dramatically increased the permeability of PMVECs in CON and CH groups, and HC antagonized this change induced by GSK. Mean ± SD, $n = 18$, ** $P < 0.01$ vs CON without GSK and HC, ## $P < 0.01$ vs CH without GSK and HC, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs CON with GSK, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs CH with GSK, NS: $P > 0.05$ vs CON without GSK and HC. GSK: GSK1016790A; HC: HC-067047.

TJ 相关蛋白 mRNA 表达, 逆转 CH 组 PMVECs 的通透性增高。上述结果提示, CHPH 大鼠 PMVECs 通透性升高与 TRPV4 介导 Ca^{2+} 内流增强、TJ 蛋白表达降低密切相关。

肺血管阻力 (pulmonary vascular resistance, PVR) 与肺动脉管腔半径 (r) 四次方呈反比, 它们之间关系为: $PVR \propto 1/r^4$ 。肺微血管内皮作为血管和血液之间进行物质交换的通透性屏障, 对维护肺组织微环境稳定具有重要意义。临床资料显示, 无论是成人还是婴儿 PH 患者, 其突出的病理特点都有远端肺小血管异常肌化、肺微血管发生丛状病变的闭塞性改变^[4]。实验研究也观察到 PH 模型上 PMVECs 迁移、增殖功能增强^[12]。以上研究皆提示阐述 PMVECs 的损伤变化是探讨 PH 发病机制的重要靶点。本研究利用组织块法培养 PMVECs, 该方法操作简单, 细胞损伤小, 动物经放血处死, 接种 60 h 内去除组织块, 以最大限度减少血细胞和成纤维细胞污染, 经 FITC-BSI 特异性检测, 鉴定为 PMVECs。

有学者在人 PMVECs 观察到, 沉默骨形态形成蛋白受体 II (bone morphogenetic protein receptor II, BMPRII) 基因, 细胞黏附能力增强, 损伤内皮屏障,

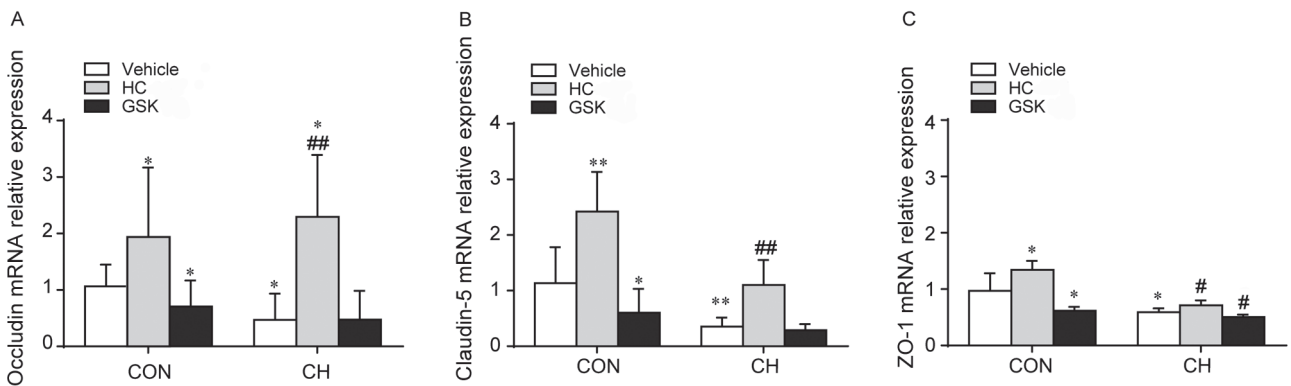


图 9. GSK和HC对CHPH大鼠PMVECs上Occludin、Claudin-5 and ZO-1 mRNA表达的影响
Fig. 9. The effect of GSK and HC on the expression of Occludin, Claudin-5 and ZO-1 mRNA of PMVECs in normoxic (CON) and chronic hypoxic (CH) rats. Mean ± SD, $n = 5-13$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.05$ vs CON with vehicle, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs CH with vehicle. GSK: GSK1016790A; HC: HC-067047.

触发 PH 发生^[5]。但该研究没有探讨 PMVECs 通透性变化的直接原因。Occludin、Claudin-5、ZO-1 是构成 TJ 的主要成分蛋白, 胞质附着蛋白 ZO-1 将 Occludin 和 Claudin-5 连接到肌动蛋白细胞骨架上, 这些蛋白相互作用共同维持 TJ 形态和功能。本实验显示 CHPH 大鼠 PMVECs 间 TJ 结构破坏, 三种

TJ 相关蛋白表达下降, 进一步明确了 PH 的发生通过细胞旁通路变化引起 PMVECs 屏障功能受损。

在 TRPV 及 TRPM 家族 14 个成员中, TRPV4 是 CHPH 大鼠肺动脉平滑肌唯一上调的亚型^[14]。同时, 缺氧引发的 PH 在 *Trpv4*^{-/-} 小鼠中也出现发病延迟及病情减轻。这些均提示 TRPV4 在 CHPH

中的核心地位。肺动脉内皮细胞和 PMVECs 胚胎来源不同, 存在表型差异, 研究显示在肺动脉及肺泡外血管内皮上, TRPC1/4 通过激活钙池操纵性 Ca^{2+} 通道 (store-operated calcium channel, SOCC) 增加 Ca^{2+} 内流, 进而引起血管内皮通透性增大^[15]。而在人和大鼠的 PMVECs 上都大量表达 TRPV4, 在多种肺损伤模型上检测到 PMVECs 通透性变化与 TRPV4 直接相关^[16]。在 PH 模型 PMVECs 上, 也发现活化的 TRPV4 参与了内皮-间充质转化和线粒体功能障碍, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成增多^[3,12]。炎症反应、氧化应激、ROS 是损伤内皮屏障功能的关键因素^[5,17]。本研究进一步证实 CHPH 大鼠 PMVECs 上 TRPV4 表达和功能皆上调, HC 特异性抑制 TRPV4 后, 通过上调三种 TJ 相关蛋白表达, 逆转 CH 引起的 PMVECs 通透性增高, 为 PH 发生时 TRPV4 介导 PMVECs 通透性变化提供了直接证据。

TRPV4 激活后, 破坏 PMVECs 屏障功能的作用靶点尚不明确。有研究报道, TRPV4 激活引起钙池释放增加, 影响细胞通透性^[18]。本研究结果显示, TRPV4 促进胞外 Ca^{2+} 内流增加, 这一结果与在其他 PMVECs 中的研究结果类似^[15,16], 提示由于细胞的异质性, TRPV4 可以通过不同途径调控细胞 Ca^{2+} 稳态。TRPV4 激活的 Ca^{2+} 内流可分别引起大电导或小电导 Ca^{2+} 激活 K^+ 通道开放, 进而影响 TJ 结构^[19,20]。

本研究结果显示, 特异性激活 TRPV4, 在 CH 组仅 ZO-1 表达显著降低, 进一步说明胞质附着蛋白 ZO-1 在调控 TJ 结构中的关键作用。ZO-1 属于鸟苷酸激酶蛋白家族成员, 作为支架蛋白, 连接 TJ 中跨膜蛋白与细胞骨架, 是影响 TJ 结构和功能的重要成分, 其表达在调节细胞渗透性中发挥关键作用, 其功能受磷酸化调控。如 Ca^{2+} 内流激活 PKC δ 介导 ZO-1 和 Occludin 解离, 调节血脑屏障通透性^[21], 也有文献报道 PKC α /RhoA/MLC2 通路参与 TRPV4 对 TJ 功能的调控^[22]。在 PH 发生时, PMVECs 上 TRPV4 激活如何影响 TJ 相关蛋白的表达或分布, 值得进一步探讨。

综上所述, 本研究结果表明 CHPH 发生时, TRPV4 在调控 PMVECs 通透性中发挥重要作用, 其机制与细胞内高 Ca^{2+} 引起 TJ 结构破坏、Occludin、Claudin-5、ZO-1 表达下降密切相关。以上研究揭示了 PMVECs 屏障功能的调节机制, 为其在 PH 防

治中的应用提供了实验依据。

参考文献

- 1 Hoette S, Jardim C, Soaza RD. Diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: an update. *J Bras Pneumol* 2010; 36 (6): 795–811.
- 2 Rosenberg HC, Rabinovitch M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1988; 255(2): H1484–H1491.
- 3 Suresh K, Servinsky L, Jiang H, Bigham Z, Zaldumbide J, Huetsch JC, Kliment C, Acoba MG, Kirsch BJ, Claypool SM, Le A, Damarla M, Shimoda LA. Regulation of mitochondrial fragmentation in microvascular endothelial cells isolated from the SU5416/hypoxia model of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2019; 317(5): L639–L652.
- 4 Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2012; 122(12): 4306–4313.
- 5 Tielemans B, Stoian L, Gijsbers R, Michiels A, Wagenaar A, Farre Marti R, Belge C, Delcroix M, Quarck R. Cytokines trigger disruption of endothelium barrier function and p38 MAP kinase activation in BMPR2-silenced human lung microvascular endothelial cells. *Pulm Circ* 2019; 9(4): 2045894019883607.
- 6 Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(3): 588–600.
- 7 Vandenbroucke E, Mehta D, Minshall R, Malik AB. Regulation of endothelial junctional permeability. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1123: 134–145.
- 8 Bihari S, Dixon DL, Lawrence MD, De Bellis D, Bonder CS, Dimasi DP, Bersten AD. Fluid-induced lung injury-role of TRPV4 channels. *Pflugers Arch* 2017; 469(9): 1121–1134.
- 9 Alvarez DF, King JA, Weber D, Addison E, Liedtke W, Townsley MI. Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury. *Circ Res* 2006; 99(9): 988–995.
- 10 Hamanaka K, Jian MY, Weber DS, Alvarez DF, Townsley MI, Al-Mehdi AB, King JA, Liedtke W, Parker JC. TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293(4): L923–L932.
- 11 Thorneloe KS, Cheung M, Bao W, Alsaid H, Lenhard S, Jian MY, Costell M, Maniscalco-Hauk K, Krawiec JA, Olzinski A, Gordon E, Lozinskaya I, Elefante L, Qin P, Matasic DS, James C, Tunstead J, Donovan B, Kallal L, Waszkiewicz A,

- Vaidya K, Davenport EA, Larkin J, Burgert M, Casillas LN, Marquis RW, Ye G, Eidam HS, Goodman KB, Toomey JR, Roethke TJ, Jucker BM, Schnackenberg CG, Townsley MI, Lepore JJ, Willette RN. An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure. *Sci Transl Med* 2012; 4(159): I59ra148.
- 12 Suresh K, Servinsky L, Jiang H, Bigham Z, Yun X, Kliment C, Huetsch J, Damarla M, Shimoda LA. Reactive oxygen species induced Ca^{2+} influx via TRPV4 and microvascular endothelial dysfunction in the SU5416/hypoxia model of pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2018; 314(5): L893–L907.
- 13 Chen SF, Fei X, Li SH. A new simple method for isolation of microvascular endothelial cells avoiding both chemical and mechanical injuries. *Microvasc Res* 1995; 50(1): 119–128.
- 14 Xia Y, Fu Z, Hu J, Huang C, Paudel O, Cai S, Liedtke W, Sham JS. TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 2013; 305(7): C704–C715.
- 15 Villalta PC, Townsley MI. Transient receptor potential channels and regulation of lung endothelial permeability. *Pulm Circ* 2013; 3(4): 802–815.
- 16 Townsley MI, King JA, Alvarez DF. Ca^{2+} channels and pulmonary endothelial permeability: insights from study of intact lung and chronic pulmonary hypertension. *Microcirculation* 2006; 13(8): 725–739.
- 17 Luan Z, Hu B, Wu L, Jin S, Ma X, Zhang J, Wang A. Unfractionated heparin alleviates human lung endothelial barrier dysfunction induced by high mobility group box 1 through regulation of P38-GSK3beta-snail signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* 2018; 46(5): 1907–1918.
- 18 Phuong TTT, Redmon SN, Yarishkin O, Winter JM, Li DY, Križaj D. Calcium influx through TRPV4 channels modulates the adherens contacts between retinal microvascular endothelial cells. *J Physiol* 2017; 595(22): 6869–6885.
- 19 Mukaiyama M, Yamasaki Y, Usui T, Nagumo Y. Transient receptor potential V4 channel stimulation induces reversible epithelial cell permeability in MDCK cell monolayers. *FEBS Lett* 2019; 593(16): 2250–2260.
- 20 Reiter B, Kraft R, Günzel D, Zeissig S, Schulzke JD, Fromm M, Harteneck C. TRPV4-mediated regulation of epithelial permeability. *FASEB J* 2006; 20(11): 1802–1812.
- 21 Liao WH, Hsiao MY, Kung Y, Liu HL, Béra JC, Inserra C, Chen WS. TRPV4 promotes acoustic wave-mediated BBB opening via Ca^{2+} /PKC-delta pathway. *J Adv Res* 2020; 26: 15–28.
- 22 Zhao H, Zhang K, Tang R, Meng H, Zou Y, Wu P, Hu R, Liu X, Feng H, Chen Y. TRPV4 blockade preserves the blood-brain barrier by inhibiting stress fiber formation in a rat model of intracerebral hemorrhage. *Front Mol Neurosci* 2018; 11: 97.