

钙池操纵性钙通道的激活信号分子与肺动脉高压

刘青 综述, 林默君 审校

(福建医科大学生理学及病理生理学系, 福建省福州市 350004)

[关键词] 钙释放激活钙内流; 基质交感分子; Orai; 瞬时感受器电位

[摘要] 钙池操纵性钙通道是非兴奋细胞上 Ca^{2+} 内流的主要途径, 以钙释放激活钙离子流最为典型。目前发现, 由基质交感分子、Orai 和经典瞬时感受器电位亚家族等介导的钙池操纵性钙内流参与了多种生理及病理过程。文章通过介绍钙池操纵性钙内流复合体的分子组成及其相互作用模式, 以及钙池操纵性钙内流在肺动脉高压发病过程中的作用, 旨在为肺动脉高压的防治提供新的研究方向。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Pulmonary Artery Hypertension and Signaling Molecules in Activation of Store-Operated Calcium Channels

LIU Qing, and LIN Mo-Jun

(Department of Physiology and Pathophysiology, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004, China)

[KEY WORDS] Store-Operated Calcium Entry; Stromal Interaction Molecule; Orai; Transient Receptor Potential

[ABSTRACT] Calcium (Ca^{2+}) entry into non-excitabile cells is mainly carried by store-operated calcium channels (SOCC). The best characterized SOCC current is the Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} (ICRAC) current. Recently, store-operated calcium entry (SOCE) mediated by the STIM, Orai and TRPC involved in a variety of physiological and pathological processes. This paper describes the molecular elements of store-operated calcium inux complex (SOCIC), their interaction, as well as the role of SOCE in the pathogenesis of pulmonary artery hypertension (PAH), which aimed at providing new research directions about prevention and treatment of PAH.

胞内游离 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的稳定性是维持细胞分裂增殖、骨骼发育及心血管活动等生理过程的关键。现代医学研究发现, 细胞内钙超载会引起细胞兴奋-收缩脱耦联, 导致血管张力受损, 引发高血压、动脉硬化等心血管疾病。因此, 钙信号通路也成了目前心血管疾病研究的热点。真核细胞主要通过两种途径增加 $[\text{Ca}^{2+}]_i$: ① 内质网 (endoplasmic reticulum, ER)/肌浆网 (sarcoplasmic reticulum, SR) 钙池的释放; ② 各种钙通道介导的胞外 Ca^{2+} 内流。某些血管活性物质与细胞表面受体结合可以激活磷脂酶 C, 后者水解 4, 5-双磷酸磷脂酰肌醇 (4, 5-double phosphatidylinositol phosphate, PIP2) 产生的 1, 4, 5-三磷酸肌醇 (1, 4, 5-trisphosphate, IP3) 与 ER

上 IP3 受体结合可引起钙池释放, 伴随钙池的耗竭, 胞膜上的钙池操纵性钙通道 (store-operated calcium channel, SOCC) 开放, Ca^{2+} 内流。SOCC 介导的钙内流 (store-operated Ca^{2+} entry, SOCE) 在增加 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的同时也使得耗竭的钙池重新充盈^[1]。目前, 有关 SOCC 的分子组成及其激活作用机制被越来越多的研究者所关注。第一个被发现的 SOCC 是钙释放激活钙通道 (Ca^{2+} release-activated channels, CRAC), 非电压刺激可以打开 CRAC 产生一个内向的、高选择性的 Ca^{2+} 流, 称为钙释放激活钙离子流 (Ca^{2+} release-activated current, ICRAC), 利用膜片钳和荧光探针可以检测到细胞上的 ICRAC。

[收稿日期] 2011-07-20

[基金项目] 福建省自然科学基金 (C1010116) 和福建医科大学重大科研项目资助 (09ZD010)

[作者简介] 刘青, 硕士研究生, E-mail 为 liuqin337@163.com。通讯作者林默君, 博士, 教授, 博士研究生导师, 长期从事平滑肌细胞钙信号调控与肺动脉高压发病机制研究。

1 钙池操纵性钙通道复合体

胞膜和内质网相互作用调控钙内流的理论早已被学术界所公认:钙池释放能够开放胞膜上的 SOCC 引起胞外 Ca^{2+} 内流,钙池饱和后,SOCC 关闭失活。这一过程中所涉及到的一个关键环节是胞内钙池耗竭与质膜通道间的信号传递。

借助高通量 RNAi 技术发现,SOCE 的启动与内质网上的基质交感分子 1 (stromal interacting molecule, STIM1) 和胞膜上的 Orai 蛋白密切相关:ER 上的 STIM1 可以感受钙池耗竭的信号并传递至胞膜,胞膜上的 Orai 蛋白接收该信号后聚合形成 CRAC;另一方面,活化的 STIM1 在 ER 上发生位移,形成孔道,通过静电作用与 Orai 通道耦合形成高分子复合体通道,介导 SOCE。相关研究还指出,经典瞬时感受器电位 1 (canonical transient receptor potential 1, TRPC1) 蛋白、钙泵 (sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA) 和微管结合蛋白 (microtubule end binding protein, EB1) 等也参与了 SOCE, 它们与 STIM、Orai 蛋白一起被称为钙池操纵钙内流复合体 (store-operated calcium influx complex, SOCIC)。其中,有关 TRPC1、STIM1 和 Orai 在 SOCE 中的作用是当前研究的焦点。

1.1 基质交感分子蛋白

基质交感分子蛋白是位于内质网上的单次跨膜蛋白,其家族包括 STIM1 和 STIM2 两个成员。STIM 的 N 端朝向内质网,临近的结构包含一个称为 EF-hand 的内在 Ca^{2+} 结合部位和 SAM 结构域;其 C 端游离于胞浆中,与两个卷曲螺旋 CC1、CC2 及一个富含脯氨酸的区域相邻 (图 1A)。以往研究发现,STIM1 和 STIM2 都能够感受钙池中 Ca^{2+} 浓度改变的情况,而细胞上的 STIM1 基因或蛋白表达异常会影响 SOCE 的发生,由此推测,SOCE 的发生主要是由 STIM1 所调控^[2]。

1.1.1 基质交感分子 1 接收并传递钙池释放的信号 基质交感分子 1 (STIM1) 主要分布于内质网上,是一个多结构域的单次跨膜蛋白。该蛋白依赖 N 端接收钙池释放的信号,并借助 C 端与胞膜上的 SOCC/CRAC 相互作用。STIM1 N 端的结构——“EF-hand”和 SAM 是重要的 Ca^{2+} 感受装置。EF-hand 是 Ca^{2+} 结合位点^[3-5],在钙池充盈的状态下,结合有 Ca^{2+} 的 EF-hand 与 SAM 形成稳定的“EF-SAM”紧密结构,此时的 STIM1 呈现“失活态”;钙池释放时,EF-hand 与 Ca^{2+} 解离,“EF-SAM”因疏水残基暴露而形成不稳定结构,此时,散布于内质网膜

(endoplasmic reticulum membrane, EM) 上的 STIM1 蛋白发生位移,在 ER 近胞膜 (plasma membrane, PM) 处组装成四聚体孔道,与此同时,STIM1 借助 CC 结构域与胞膜上的 SOCC/CRAC 相互作用,引起胞外 Ca^{2+} 内流直至钙池饱和,之后,STIM1 又重新与 Ca^{2+} 结合,SOCC/CRAC 失活。

静息状态下,胞膜上也分布有少量 STIM1。钙池耗竭可以使胞膜上的 STIM1 蛋白表达上调,但 SOCE 主要是由 ER 上的 STIM1,而非 PM 上的 STIM1 介导产生的^[6]。

1.1.2 基质交感分子 2 作为 STIM 家族的另一个成员,基质交感分子 2 (STIM2) 在结构上与 STIM1 非常相似,不同的是,STIM2 只存在于 ER 上,其表达水平往往低于 STIM1。虽然同属于一个蛋白家族,两者的功能也不尽相同。利用基因敲低技术使 STIM2 表达水平下调,胞浆和内质网的基础 Ca^{2+} 水平均降低;反之,STIM2 过表达时,基础 Ca^{2+} 浓度增加。而改变 STIM1 的表达水平对于基础 Ca^{2+} 浓度却几乎没有影响^[7]。

尽管如此,ER 上的 STIM1 和 STIM2 都可以被钙池释放所激活并发生转位。当 STIM2 的“EF-hand”发生突变,它对 ER 中的 Ca^{2+} 浓度改变亦不再敏感。虽然 STIM2 也参与了 SOCC 的激活,但其主要功能还是调控胞浆和 ER 中的基础 Ca^{2+} 浓度^[2]。

1.2 Orai 蛋白

另一个介导 SOCC/CRAC 的关键蛋白是 Orai (希腊神话中,Orai 意为天堂的守门人)。Orai 是一个由 4 个跨膜片段 (M1-4) 构成的胞膜蛋白 (图 1B),其家族成员包括 Orai1、Orai2 和 Orai3^[8]。静息状态下,Orai 往往以二聚体形式存在。

Orai 的发现起源于家族性重症联合免疫缺陷 (familial severe combined immunodeficiency, SCID) 综合征的研究。在 SCID 患者的细胞上通过基因定位发现其 CRAC 功能受损;采用 RNAi 技术抑制 Orai 蛋白的表达,CRAC 的形成也被抑制。据此,学者们推断 Orai 是构成 CRAC 通道的亚基。

尽管 Orai 家族的三个成员均可以形成同源或异源的四聚体通道,但 CRAC 的功能主要是由 Orai1 所承担的,该蛋白的缺失将严重影响通道功能的发挥^[8]。此外,虽然 Orai1、Orai2 和 Orai3 在序列上高度同源,但它们所表现出的功能特点有着很明显的区别。Orai 蛋白形成的通道均属于高度 Ca^{2+} 选择性通道,但是相比 Orai1 和 Orai2, Orai3 构成的 CRAC 介导的内向电流较微弱。交联分析发现,CRAC 休眠时,Orai 蛋白多以二聚体的形式存在,钙

池释放的过程中,STIM1 蛋白一方面在 ER 上发生移位,另一方面引起 PM 上的 Orai 蛋白二聚体形成四聚体的 CRAC^[9]。

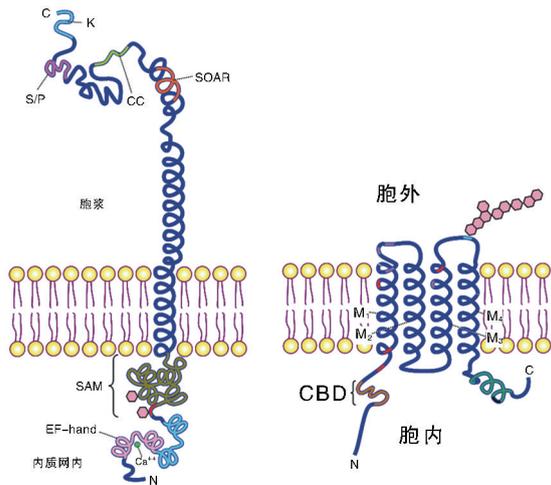


图 1. STIM 和 Orai1 结构示意图 左为 STIM, N 端位于内质网内,邻近的结构为 EF-hand 和 SAM,EF-hand 可以与 Ca^{2+} 结合; C 端的主要结构有 SOAR (STIM/ Orai 作用域)、CC (卷曲螺旋区域)、S/P (富含丝/脯氨酸的区域) 和 K (多聚赖氨酸区)。右为 Orai 蛋白, Orai 由四个跨膜片段 (M1~4) 组成, N、C 端均位于胞内。CBD 为钙调蛋白结合域。

Figure 1. Structure sketch map of STIM and Orai1

1.3 基质交感分子 1 与 Orai1 相互作用

STIM1 和 Orai1 各自的功能已经相当明确,但两者又是如何激活 CRAC 引起钙离子内流的呢? 为此,各个实验小组又设计、开展了更深入的研究。

1.3.1 基质交感分子 1、Orai1 的相互作用结构域

STIM1 的羧基端是激活 CRAC 的主要结构,但如果 STIM1 只表达位于胞浆的 447 个氨基酸片段,其功能的发挥也会受到一定限制。研究发现,位于 STIM1 蛋白 C 端上的第 342 至 448 位氨基酸区域是激活 CRAC 的关键结构,因而称为 CRAC 活化结构域 (CRAC channel activation domain, CAD) 或 STIM/Orai 作用域 (STIM/Orai activating region, SOAR)^[10]。同样,在 Orai1 蛋白上也存在相应的区域与 STIM1 发生相互作用,该结构位于 Orai1 蛋白的第 272 至 291 位氨基酸^[11]。

1.3.2 基质交感分子 1、Orai1 参与钙池操纵性钙通道的激活

当外来刺激作用于膜受体引起钙池释放, Ca^{2+} 从 EF-hand 上脱落激活 STIM1 蛋白,多个活化的 STIM1 蛋白在内质网上发生位移,借助羧基端的 CC1 结构聚合形成四聚体孔道。STIM1 在内质网上四聚体化的过程称为“成孔”(puncta)。“成

孔”后的 STIM1 蛋白暴露出 CAD 结构域,借助静电作用吸引胞膜上的 Orai 二聚体结合形成四聚体并与之耦合,这样,在内质网和胞膜之间就形成了一个由 STIM1 和 Orai1 组装而成的离子通道,胞外 Ca^{2+} 经此通道内流补偿钙池中流失的 Ca^{2+} ,同时引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增加 (图 2)。有人认为,胞膜上的 Orai1 还可能与 TRPC 形成 SOCC 介导钙内流。

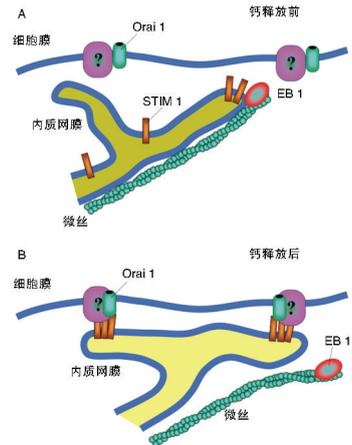


图 2. STIM 和 Orai 蛋白相互作用示意图 A 为钙池释放前, STIM1 散在分布于内质网上; B 为钙池释放后, STIM1 在内质网上发生位移,形成四聚体通道,激活并连接胞膜上的 Orai 通道引起钙内流。

Figure 2. Interaction of STIM with Orai protein

1.4 经典瞬时感受器电位家族与基质交感分子/Orai 的相互作用

除 Orai 外,钙池耗竭还可以引起胞膜上的经典瞬时感受器电位 (canonical transient receptor potential, TRPC) 聚合形成 SOCC。关于 TRPC 的功能及其与 Orai、STIM 的关系尚未明确,多篇文献提出了同一个问题——TRPC 功能的发挥是否需要 Orai 和 STIM 的介入?

TRPC 由 7 个成员 (TRPC1-7) 组成,目前发现,几乎所有的血管平滑肌细胞上都存在 TRPC1^[12],而它可能与 TRPC3/4/5/7 共同参与 SOCE。但是,TRPC 通道不是 CRAC,其区别在于:CRAC 是高选择性钙通道,而 TRPC 通道则属于非选择性钙通道。在某些情况下,钙池的耗竭可以激活 TRPC 通道。随着 STIM 和 Orai 蛋白的发现,许多研究小组开始关注 TRPC 与 STIM 和/或 Orai 蛋白三者之间功能上的联系。

Muallem 实验室的研究发现,活化的 STIM1 借助 ERM、S/P 等结构域^[13] 激活 TRPC1/4,进而调控 TRPC3/6 的功能^[14]。另一项研究发现,同种细胞上的 TRPC 通道与 Orai 构成的 CRAC 在功能上是独立的。说明 STIM1 能分别激活 TRPC 和 Orai,但后两

者没有功能上的联系。

此外,某些学者认为 SOCE 是 TRPC1、Orai1 和 STIM1 三者共同作用的结果。同时降低 HEK293 细胞上 TRPC1 和 Orai1 两者的表达,SOCE 下调;Orai1 的低表达会抑制 TRPC1 介导的 SOCE^[15,16];细胞内的 STIM1 和 TRPC1 发生共表达可以增强 SOCE,单表达 TRPC1 则无此现象。

尽管大量研究结果支持 TRPC 与 STIM 和/或 Orai 存在功能上的联系,但学术界对此观点仍持保留态度^[17];平滑肌细胞上的 STIM1 的低表达不会影响 TRPC6 的功能;在 mβCD 干扰 TRPC3 活化的前提下,STIM1 蛋白“成孔”和 ICRCAC 不受影响。

2 钙池操纵性钙通道复合体与肺动脉高压

人类和动物的 PASMCM 能够表达多种参与钙信号转导的蛋白、激酶和转录因子,胞浆 Ca²⁺ 增加的同时,核内的 Ca²⁺ 浓度也相应升高,并引起一系列能够影响细胞增殖的核内事件发生^[18]。

缺氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPV)大鼠的肺血管张力和 PASMCM 内的 Ca²⁺ 水平显著高于正常大鼠,其肺动脉组织及其平滑肌细胞的 STIM1、TRPC(1\4\6)表达增加^[19],SOCE 增加^[20];血管重塑是 HPV 的典型病变之一,其发生主要与 CRAC 介导的钙内流有关。以上证据表明,STIM1、Orai1 和 TRPC 介导的 SOCE 增加可能是引起肺血管病变及其平滑肌细胞增殖的关键^[21]。

Brueggemann 等^[22]人利用抗体抑制、反义 RNA 和小干扰 RNA 等多项技术证实,存在于多种血管平滑肌细胞上的 TRPC 是 SOCC 的重要组成部分^[23,24]。Ng 等运用免疫共沉淀发现,钙池耗竭时的 PASMCM 能够同时表达 STIM1 和 TRPC1,且后者的表达水平上调;STIM1 的过表达可以增加 SOCE,此时用抗体抑制 TRPC1 的表达,SOCE 的增加也被抑制。另有研究表明,HEK293 细胞和小鼠 PASMCM 上的 STIM1 可以调控由 TRPC1 构成的 SOCC;人类的唾液腺和大隐静脉细胞上,TRPC1 可以与 STIM1 和 Orai 共同介导 SOCE^[16]。这些发现均证明 STIM1 和 TRPC1 共同介导 PASMCM 上的 SOCE。

Potier 等^[21]学者发现,降低某血管平滑肌细胞上 STIM1 和 Orai1 的表达可以抑制细胞的增殖和迁移,而 STIM2、Orai2 和 Orai3 的改变却不会对细胞产生任何影响。因此,STIM1 和 Orai1 介导的 SOCE 可能在一定程度上参与了肺动脉高压血管结构重塑的病理过程。

Michael 等发现,原发性肺动脉高压(idiopathic pulmonary arterial hypertension, IPAH)患者 PASMCM 上的 SOCE 较正常者明显增加,并且该细胞内的 STIM2 表达显著上调,采用 siRNA 干扰 STIM2 的表达后,SOCE 和细胞增殖程度也相应下调。由此推测,IPAH 发生过程中 PASMCM 改变是由 STIM2 主导的。

3 结 语

近年来的研究发现并揭示了介导 SOCC/CRAC 的信号分子及其激活机制,这些发现将为预防和治疗肺动脉高压提供重要的靶点和信息,但目前学术界无法证明 SOCE 与该病的真正联系,亟待对 SOCC 的组成分子特性作进一步的研究来确证。

[参考文献]

- [1] Várnai P, Hunyady L, Balla T. STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry [J]. Trends Pharmacol Sci, 2009, 30(3): 118-128.
- [2] Brandman O, Liou J, Park WS, et al. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels [J]. Cell, 2007, 131(7): 1327-339.
- [3] Deng X, Wang Y, Zhou Y, et al. STIM and Orai: dynamic intermembrane coupling to control cellular calcium signals [J]. J Biol Chem, 2009, 284(34): 22501-505.
- [4] Hogan PG, Lewis RS, Rao A. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAI [J]. Annu Rev Immunol, 2010, 28: 491-533.
- [5] Smyth JT, Hwang SY, Tomita T, et al. Activation and regulation of store-operated calcium entry [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(10): 2337-349.
- [6] Stathopoulos PB, Zheng L, Li GY, et al. Structural and mechanistic insights into STIM1-mediated initiation of store-operated calcium entry [J]. Cell, 2008, 135(1): 110-122.
- [7] Oh-Hora M, Yamashita M, Hogan PG, et al. Dual functions for the endoplasmic reticulum calcium sensors STIM1 and STIM2 in T cell activation and tolerance [J]. Nat Immunol, 2008, 9(4): 432-443.
- [8] Ji W, Xu P, Li Z, et al. Functional stoichiometry of the unitary calcium-release-activated calcium channel [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105(36): 13668-673.
- [9] Muik M, Frischauf I, Derler I, et al. Dynamic coupling of the putative coiled-coil domain of ORAI1 with STIM1 mediates ORAI1 channel activation [J]. J Biol Chem, 2008,

- 283(12): 8 014-022.
- [10] Park CY, Hoover PJ, Mullins FM, et al. STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1 [J]. *Cell*, 2009, 136(5): 876-890.
- [11] 刘晓如, 林默君. 瞬时感受器电位超家族与血管平滑肌功能[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(8): 659-661.
- [12] Calloway N, Vig M, Kinet JP, et al. Molecular clustering of STIM1 with Orai1/CRACM1 at the plasma membrane depends dynamically on depletion of Ca^{2+} stores and on electrostatic interactions [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(1): 389-399.
- [13] Huang GN, Zeng W, Kim JY, et al. STIM1 carboxyl-terminus activates native SOC, I(crac) and TRPC1 channels [J]. *Nat Cell Biol*, 2006, 8(9): 1 003-010.
- [14] Yuan JP, Zeng W, Huang GN, et al. STIM1 heteromultimerizes TRPC channels to determine their function as store-operated channels [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(6): 636-645.
- [15] Cheng KT, Liu X, Ong HL, et al. Functional requirement for Orai1 in store-operated TRPC1-STIM1 channels [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(19): 12 935-940.
- [16] Ong HL, Cheng KT, Liu X, et al. Dynamic assembly of TRPC1-STIM1-Orai1 ternary complex is involved in store-operated calcium influx. Evidence for similarities in store-operated and calcium release-activated calcium channel components [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(12): 9 105-116.
- [17] DeHaven WI, Jones BF, Petranka JG, et al. TRPC channels function independently of STIM1 and Orai1 [J]. *J Physiol*, 2009, 587(Pt 10): 2 275-298.
- [18] Song MY, Makino A, Yuan JX. STIM2 contributes to enhanced store-operated Ca entry in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension [J]. *Pulm Circ*, 2011, 1(1): 84-94.
- [19] 张明芳, 刘晓如, 杨娜, 等. TRPC6 介导肺动脉高压大鼠肺动脉张力和肺动脉平滑肌细胞 Ca^{2+} 浓度的升高[J]. *生理学报*, 2010, 62(1): 55-62.
- [20] Lu W, Wang J, Shimoda LA, et al. Differences in STIM1 and TRPC expression in proximal and distal pulmonary arterial smooth muscle are associated with differences in Ca^{2+} responses to hypoxia [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(1): L104-113.
- [21] Potier M, Gonzalez JC, Motiani RK, et al. Evidence for STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium influx through ICRAC in vascular smooth muscle cells: role in proliferation and migration [J]. *FASEB J*, 2009, 23(8): 2 425-437.
- [22] Brueggemann LI, Markun DR, Henderson KK, et al. Pharmacological and electrophysiological characterization of store-operated currents and capacitative Ca^{2+} entry in vascular smooth muscle cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 317(2): 488-499.
- [23] Leung FP, Yung LM, Yao X, et al. Store-operated calcium entry in vascular smooth muscle [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(5): 846-857.
- [24] Albert AP, Saleh SN, Peppiatt-Wildman CM, et al. Multiple activation mechanisms of store-operated TRPC channels in smooth muscle cells [J]. *J Physiol*, 2007, 583(Pt 1): 25-36.
- (此文编辑 许雪梅)