

# TRPC1/STIM1 复合体调节人脐静脉内皮细胞钙池操纵性钙通道和受体操纵性钙通道介导的钙内流和 NO 生成

王腊梅, 胡清华, 钟华, 唐娜, 孙志萍, 何芳

(新疆地方病与民族高发病教育部重点实验室 石河子大学医学院病理生理学教研室, 新疆石河子市 832002)

[关键词] 瞬时受体电位通道 1; 基质交联分子 1; 钙池操纵性钙通道; 受体操纵性钙通道; 一氧化氮; 人脐静脉内皮细胞

[摘要] **目的** 研究瞬时受体电位通道 1(TRPC1)/基质交联分子 1(STIM1)复合体在人脐静脉内皮细胞(HUVEC)钙池操纵性钙通道(SOCC)和受体操纵性钙通道(ROCC)介导的钙内流和 NO 生成中的作用。**方法** 取 2~3 代 HUVEC, 将构建的 TRPC1 和 STIM1 干扰质粒分别转染 HUVEC, 观察细胞转染效果的同时采用 real-time PCR 和 Western blot 检测 TRPC1、STIM1 mRNA 和蛋白的表达。将细胞分别与钙感受体(CaR)激动剂精胺、ROCC 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 $\mu$  抑制剂 Go6967 孵育后, 用荧光探针 Fura-2/AM 及 DAF-FM 负载方法同步检测  $[Ca^{2+}]_i$  和 NO 生成的变化; 随后用 TRPC1 和 STIM1 干扰质粒同时转染 HUVEC, 与精胺孵育后检测  $[Ca^{2+}]_i$  和 NO 生成, 免疫共沉淀法检测 TRPC1 和 STIM1 的相互作用。**结果** 与 Control 组相比, TRPC1 转染组和 STIM1 转染组 TRPC1、STIM1 mRNA 和蛋白表达均明显降低 ( $P < 0.05$ ); 在四种不同处理作用下, TRPC1 转染组和 STIM1 转染组  $[Ca^{2+}]_i$   $\Delta$ ratio 值和 NO 净荧光强度值均明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 Control 组、TRPC1 转染组及 STIM1 转染组相比, TRPC1 和 STIM1 共转染组  $[Ca^{2+}]_i$   $\Delta$ ratio 值和 NO 净荧光强度值均明显降低 ( $P < 0.05$ ); TRPC1 与 STIM1 相互作用形成复合体, 且在 CaR 激动剂的刺激下作用增强。**结论** TRPC1/STIM1 复合体共同调节 CaR 经 SOCC 和 ROCC 激活介导的钙内流和 NO 生成。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## TRPC1/STIM1 regulates $Ca^{2+}$ entry and NO generation mediated by human umbilical vein endothelial cell store-and receptor-operated calcium channels

WANG La-Mei, HU Qing-Hua, ZHONG Hua, TANG Na, SUN Zhi-Ping, HE Fang

(Ministry of Education Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases and Centre of Medical Functional Experiments & Department of Pathophysiology, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China)

[KEY WORDS] Transient receptor potential channel 1; Stromal interaction molecule 1; Store-operated calcium channel; Receptor-operated calcium channel; Nitric oxide; Human umbilical vein endothelial cells

[ABSTRACT] **Aim** To study the function of TRPC1/STIM1 in  $Ca^{2+}$  entry and nitric oxide (NO) generation mediated by store-operated calcium channel (SOCC) and receptor-operated calcium channel (ROCC) in human umbilical vein endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells were collected and cultured to the second~third passage. The constructed TRPC1 and STIM1 interference plasmids were transfected into human umbilical vein endothelial cells respectively, and the transfection efficiency was observed. The expressions of TRPC1 and STIM1 mRNA and protein were detected by real-time PCR and Western blot. The cells were incubated with CaR agonist spermine, CaR negative allosteric modulator Calhex231 and ROCC analogue TPA, protein kinase C (PKC) inhibitor Ro31-8220, PKCs and PKC $\mu$  inhibitor Go6967. Intracellular  $Ca^{2+}$  concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) was detected using the fluorescence  $Ca^{2+}$  indicator Fura-2/AM, the production of NO was determined by DAF-FM of every group in HUVEC. The constructed TRPC1 and STIM1 interference plasmids were simultaneously transfected with human umbilical vein endothelial cells and incubated with CaR ag-

[收稿日期] 2016-11-15

[修回日期] 2017-02-23

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(31160239;81160018)

[作者简介] 王腊梅, 硕士, 实验师, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail 为 375770358@qq.com。通讯作者何芳, 博士, 教授, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail 为 fangf2002shz@126.com。

onists to detect  $[Ca^{2+}]_i$  and NO production, and the interaction between STIM1 and TRPC1 was examined by co-immunoprecipitation. **Results** Compared with the control group, the expression of TRPC1 and STIM1 mRNA and protein in TRPC1 transfection group and STIM1 transfection group decreased obviously ( $P < 0.05$ ). In four different treatment under the action of factors, the  $[Ca^{2+}]_i$  and the net NO fluorescence intensity ratio values of TRPC1 transfection group and STIM1 transfection group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Compared with control group, TRPC1 transfection group and STIM1 transfection group, the  $[Ca^{2+}]_i$  and the net NO fluorescence intensity ratio values of co-transfection group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). TRPC1 and STIM1 interact to form a complex, and in the stimulation of CaR agonists under enhanced interaction. **Conclusion** TRPC1, STIM1 are components of SOCC and ROCC in  $Ca^{2+}$  entry and NO generation in human umbilical vein endothelial cells.

钙离子( $Ca^{2+}$ )是细胞内最普遍、最重要的信号转导成分,而且在细胞内外维持一定的浓度差。细胞内钙离子浓度(intracellular  $Ca^{2+}$  concentration,  $[Ca^{2+}]_i$ )的升高主要通过胞内  $Ca^{2+}$  释放和胞外钙内流两大途径,而胞外钙内流在传递细胞信息方面更为重要。血管内皮细胞持续钙内流是释放舒张因子如一氧化氮(nitric oxide, NO)以维持血管内环境稳定和抵御心血管疾病的基础防线,血管内皮功能障碍是多种心血管疾病的共同病理机制。在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)中精胺可通过激活钙感受体(Ca-sensing receptor, CaR)而引起  $[Ca^{2+}]_i$  升高及 NO 生成。钙池操纵性钙通道(store-operated calcium channel, SOCC)和受体操纵性钙通道(receptor-operated calcium channel, ROCC)以协同的方式参与了此过程<sup>[1-2]</sup>。研究表明瞬时受体电位通道(transient receptor potential channel, TRPC)、肌浆网钙泵和微管结合蛋白 EB1 等参与了 SOCC 介导的钙池操纵钙内流,它们与基质交联分子(stromal interaction molecule, STIM)、钙释放激活钙通道调节分子形成钙池操纵钙内流复合体<sup>[3]</sup>。TRPC1 与 Orai1、STIM1 作为 SOCC 主要构成成分,在人体中与其一起作为一个整体,对疾病的发生发展产生作用。本研究拟进一步明确 TRPC1 和 STIM1 的作用及其是否参与了 CaR 经 SOCC 和 ROCC 介导的钙内流和 NO 生成,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 材料和方法

### 1.1 实验材料

取正常孕产妇剖宫产胎儿的新鲜脐带,性别、体重不限(来自华中科技大学同济医学院附属同济医院,该研究经伦理道德委员会批准和个人知情同意)。

### 1.2 主要试剂

ECM 培养基购自武汉博士德生物工程有限公司,来源于美国 Sciencell 公司;蛋白酶抑制剂购自 Calbiochem 公司;鼠抗人 TRPC1 多克隆抗体购自 Abcam 公司;兔抗人 STIM1 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司;鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自 Santa Cruze 公司;二抗购自 Protein Tech 公司;ECL 发光试剂盒购自 Thermo 公司;逆转录试剂盒、real time RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司;Lipofectamine<sup>TM</sup>2000、OPTI-MEM、Fura-2/AM 购自 Invitrogen 公司;DAF-FM DA(NO 荧光探针)购自 Beyotime 公司;G418 购自 Biosharp 公司;去内毒素高纯度质粒抽提试剂盒购自 Omega 公司;shRNA 购自上海吉凯基因化学技术有限公司;引物由友名生物技术有限公司合成;其余均为国产分析纯试剂。 $Ca^{2+}$  成像系统 FV300、倒置荧光显微镜 IX-70、激光共聚焦显微镜 FV300(日本 Olympus 公司)。

### 1.3 HUVEC 的培养与鉴定

按文献[1,4]的方法将 HUVEC 培养在含有 10% 胎牛血清的 ECM 培养基中,添加 100 mg/L 青霉素、100 mg/L 链霉素(用于转染的细胞培养基中不加双抗),于 37℃、5%  $CO_2$  条件下培养,待细胞生长至 90% 汇合时传代。用细胞内 VIII 因子相关抗原进行免疫细胞化学染色,鉴定 HUVEC,取增殖状态良好的细胞用于实验。

### 1.4 基因的 shRNA 构建及转染

基因的 shRNA 由上海吉凯基因化学技术有限公司构建,细胞生长至 70%~90% 时,按照 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 试剂盒操作说明书完成转染。实验分为未转染组即空白对照组(Control 组)、空质粒组(Scrambled 组)和特异性质粒转染组即实验组。

### 1.5 real-time PCR 检测 HUVEC 中 TRPC1、STIM1 mRNA 的表达

定量引物由友名生物技术有限公司设计合成。TRPC1 的上游引物为 5'-TTG TGG AGG TGG AAT

TCA GG-3', 下游引物为 5'-CGT TTG TCA AGA GGC TCG TC-3'; STIM1 的上游引物为 5'-ACC GGA GTC ATC GGC AGA A-3', 下游引物为 5'-CCA CCA GCA TGA AGT CCT TGA G-3';  $\beta$ -actin 的上游引物为 5'-ACG GTC AGG TCA TCA CTA TCG-3', 下游引物为 5'-GGC ATA GAG GTC TTT ACG GAT G-3'。收集不同处理组细胞, 按 Trizol 试剂盒说明书抽提细胞 RNA, 紫外分光光度仪检测并计算提取的总 RNA 浓度及纯度,  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  比值在 1.8~2.0 之间。然后按逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA, 以此为模板以  $\beta$ -actin 作为内参照用 real-time PCR 试剂盒对 mRNA 进行多聚酶链反应, 反应体系为 25  $\mu\text{L}$ , 其中 SYBR Premix Ex Tap 12.5  $\mu\text{L}$ , PCR Forward Primer 0.5  $\mu\text{L}$ , PCR Reverse Primer 0.5  $\mu\text{L}$ , 样品 cDNA 2.0  $\mu\text{L}$ , 灭菌蒸馏水 9.5  $\mu\text{L}$ 。反应条件为预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 、30 s; PCR 反应(95 $^{\circ}\text{C}$ 、5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s), 40 个循环。随之由电脑自动分析系统进行定量分析。

## 1.6 免疫印迹法检测 HUVEC 中 TRPC1、STIM1 的蛋白表达

使用蛋白抽提试剂盒提蛋白, 取 5  $\mu\text{L}$  上清用于 BCA 试剂测定蛋白质浓度并标化, 以  $\beta$ -actin 为内参蛋白。上样 30  $\mu\text{g}$  蛋白提取液以 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 将蛋白转移至硝酸纤维素膜进行湿转, 4 $^{\circ}\text{C}$  摇床上用 5% 脱脂奶粉 TBST 溶液封闭 1 h, 分别加入抗 TRPC1、STIM1 稀释抗体(分别为 1:1000、1:1200)、抗  $\beta$ -actin 抗体(1:1000), 置于 4 $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜。封闭液 TBST 漂洗后加入稀释的二抗(1:5000), 37 $^{\circ}\text{C}$  摇床上孵育 1 h, TBST 洗 3 次。使用 Thermo 超敏发光试剂增强反应, 进行显色、显影、定影, 并根据灰度值分析蛋白相对表达量。

## 1.7 HUVEC 中 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的测定

参考文献[5], 将第 2 代或第 3 代 HUVEC 接种于放有圆形玻片的培养皿中, 待细胞达 80% 汇合时进行转染, 转染 48 h 后将玻片取出放入自制的灌流槽中, 将 1  $\mu\text{L}$  1 mmol/L Fura-2/AM 与 499  $\mu\text{L}$  2 mmol/L 含钙液混合后加入灌流槽中, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育细胞 30 min, 冲洗 3~5 遍后用含钙液去酯化 20 min。将灌流槽置于倒置荧光显微镜上, 利用 340 nm 与 380 nm 波长的激发光激发  $\text{Ca}^{2+}$  荧光探针 Fura-2/AM 发射荧光, 用 CCD 拍摄荧光的动态变化, 通过 340 nm 和 380 nm 的荧光强度比值的变化(即  $\Delta\text{ratio}$ )反映  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。

## 1.8 HUVEC 中 NO 含量的检测

参考文献[5], 将第 2 代或第 3 代 HUVEC 接种于放有圆形玻片的培养皿中, 待细胞达 80% 汇合时

进行转染, 转染 48 h 后将玻片取出放入自制的灌流槽中, 按 1:2000 比例加入 DAF-FM DA 荧光探针稀释液稀释 DAF-FM DA, 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育细胞 20 min, 用 2 mmol/L 含钙液冲洗 3 次后将灌流槽置于荧光显微镜上, 用 495 nm 激发波长, 515 nm 发射波长, 实时检测 2 mmol/L 精胺刺激前后荧光的强弱变化, 并通过 IPA Software 进行分析。NO 相对荧光强度(relative fluorescence unit, RFU)代表 NO 含量,  $\text{NO 含量} = (\text{测定孔曲线最高 RFU} - \text{最低 RFU}) - (\text{空白孔曲线最高 RFU} - \text{最低 RFU})$ 。

## 1.9 免疫共沉淀检测 HUVEC 中 TRPC1、STIM1 的相互作用

①用 TRPC1 多克隆抗体沉淀(正向): 将 2~3 代 HUVEC 接种于放有圆形玻片的培养皿中, 待细胞达融合, 与药物孵育 20 min 后加入裂解液充分裂解, 12000 g 离心 3~5 min, 取上清, 加入一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$  摇床过夜, 按 1:10 体积比加 50% Protein G Agarose, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、摇床上混匀 10 min 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、1000 r/min 离心 15 min, 吸除上清液, 用裂解液洗涤沉淀 5 次, 裂解液用量为 500  $\mu\text{L}$ , 洗涤、离心条件和吸除上清液要求同上。完成最后一次洗涤后, 去上清, 加入 SDS 蛋白上样缓冲液中, 混匀煮沸 5 min, 200 g 离心 3 min, 取上清进行 SDS-PAGE 电泳, 用 STIM1 作一抗(1:1000)进行 Western blot 分析。②用 STIM1 单克隆抗体沉淀(反向): 用 TRPC1 作一抗(1:1000)进行 Western blot 分析, 方法同①。实验中用非特异性鼠 IgG 代替一抗沉淀作为对照。

## 1.10 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 所有数据采用 SPSS 17.0 统计软件, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 有显著差异者两组间均数比较采用 SNK- $q$  法检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 shRNA 转染 HUVEC 及 HUVEC 中 TRPC1、STIM1 mRNA 的表达

细胞转染 Cy3 标记的 shTRPC1 后, 成功转染的细胞内发出红色荧光; 细胞转染 GFP 标记的 shSTIM1 后, 成功转染的细胞内发出绿色荧光。转染 48 h 后加入 G418 稳筛, 可获取 90% 以上的阳性克隆细胞(图 1)。提取 HUVEC 总 mRNA, 结果显示: 与 Control 组相比, 转染组 mRNA 的表达均有降低( $P < 0.05$ ; 图 2)。

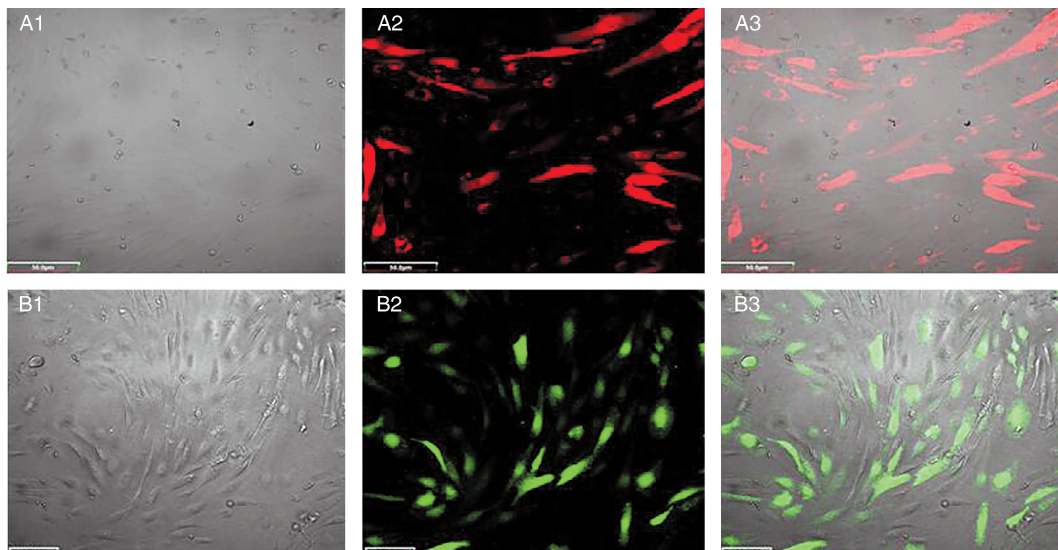


图 1. 化学荧光 Cy3 标记的 shTRPC1、GFP 标记的 shSTIM1 转染进入细胞 (20×) A1、A2、A3 为同一视野; B1、B2、B3 为同一视野, 各自在转染 48 h 后加入 G418 筛选 72 h 时拍摄。A1、B1 在自然光下拍摄, A2 红色代表 Cy3 阳性着色, B2 绿色代表 GFP 阳性着色, A3、B3 为图像的叠加。

Figure 1. Cy3-labelled shTRPC1 and GFP-labelled shSTIM1 were transfected into HUVEC (20×)

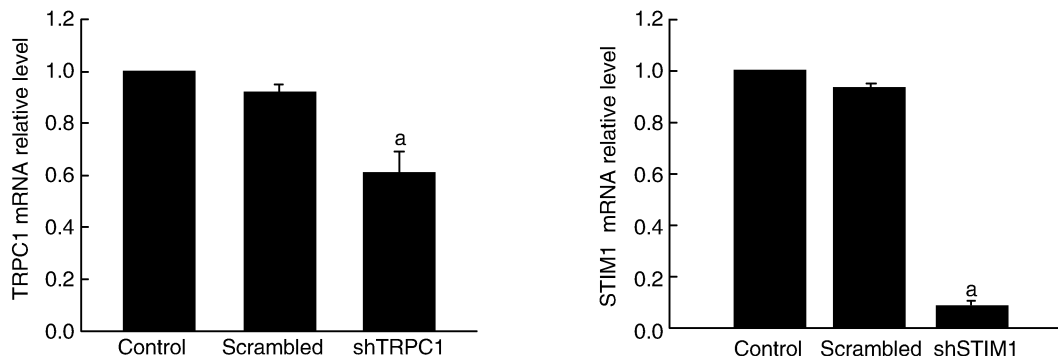


图 2. 转染后 HUVEC 中 TRPC1、STIM1 mRNA 的表达 ( $n=4$ ) a 为  $P<0.05$ , 与 control 组比较。

Figure 2. Expression of TRPC1 and STIM1 mRNA after transfection in HUVEC

## 2.2 HUVEC 中 TRPC1、STIM1 的蛋白表达

提取转染 48 h、用 G418 (200 mg/L) 进行筛选 7 天后的 HUVEC 总蛋白, 与 Control 组相比, 转染组 TRPC1、STIM1 蛋白的表达均有显著降低 ( $P<0.05$ ; 图 3), 与 mRNA 表达的变化趋势一致。

## 2.3 TRPC1 基因沉默对 SOCC 和 ROCC 通路介导的 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 生成的作用

CaR 激动剂、ROCC 模拟剂 TPA+CaR 负性变构调节剂 Calhex231、PKC 抑制剂 Ro31-8220、经典型 PKCs 和 PKC $\mu$  抑制剂 Go6967 处理细胞, 与 Control 组和 Scrambled 组相比, 转染组  $[Ca^{2+}]_i$   $\Delta$ ratio 值和 NO 净荧光强度值均明显降低 ( $P<0.05$ ), 而 Control 组与 Scrambled 组  $[Ca^{2+}]_i$   $\Delta$ ratio 值和 NO 净荧光强度值均无显著差异 ( $P>0.05$ ; 图 4 和 5)。

## 2.4 STIM1 基因沉默对 SOCC 和 ROCC 通路介导的 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 生成的作用

同 2.3 方法处理细胞, 与 Control 组和 Scrambled 组相比, 转染组  $[Ca^{2+}]_i$   $\Delta$ ratio 值和 NO 净荧光强度值均明显降低 ( $P<0.05$ ), 而 Control 组与 Scrambled 组  $[Ca^{2+}]_i$   $\Delta$ ratio 值和 NO 净荧光强度值均无显著差异 ( $P>0.05$ ; 图 6 和 7)。

## 2.5 TRPC1、STIM1 基因同时沉默对 HUVEC 中 $[Ca^{2+}]_i$ 和 NO 生成的影响

与单纯加入 CaR 激动剂组相比, 单基因或双基因转染组  $[Ca^{2+}]_i$   $\Delta$ ratio 值和 NO 净荧光强度值均明显降低 ( $P<0.05$ ); 与单基因转染组相比, 双基因转染组  $[Ca^{2+}]_i$   $\Delta$ ratio 值和 NO 净荧光强度值均明显降低 ( $P<0.05$ ; 图 8 和 9)。

## 2.6 HUVEC 中 TRPC1 与 STIM1 的相互作用

用抗 STIM1 的抗体能共沉淀 TRPC1 的蛋白分子,同样用抗 TRPC1 的抗体能共沉淀 STIM1 的蛋白

分子,说明 STIM1 与 TRPC1 在 HUVEC 中能发生相互作用形成复合体,且这种作用在 CaR 激动剂刺激后作用增强( $P<0.05$ ;图 10)。

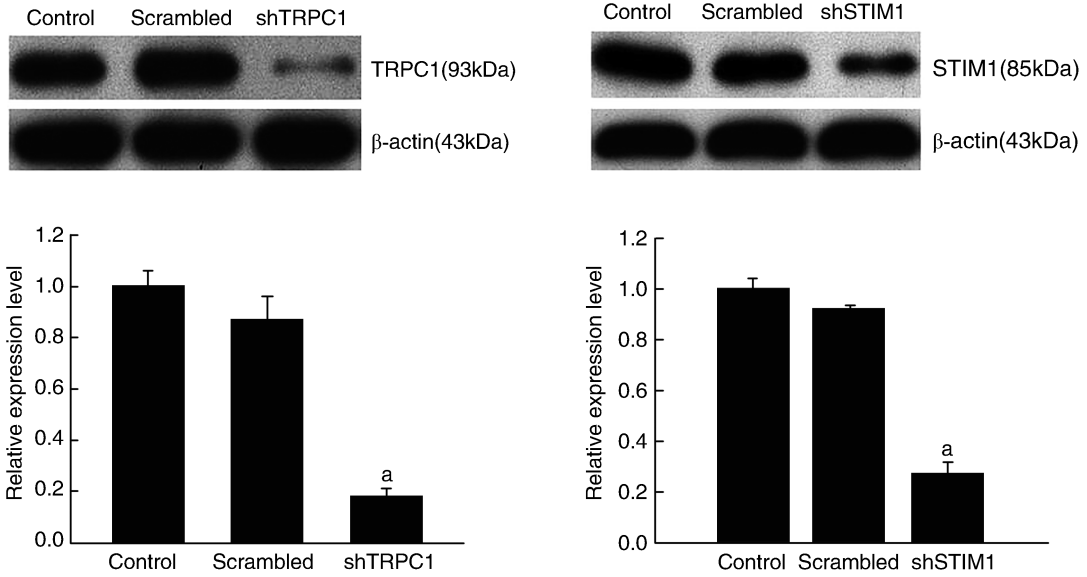


图 3. 转染后 HUVEC 中 TRPC1、STIM1 蛋白的表达 ( $n=3$ ) a 为  $P<0.05$ ,与 control 组比较。

Figure 3. Expression of TRPC1 and STIM1 protein examined by Western blot after transfection in HUVEC

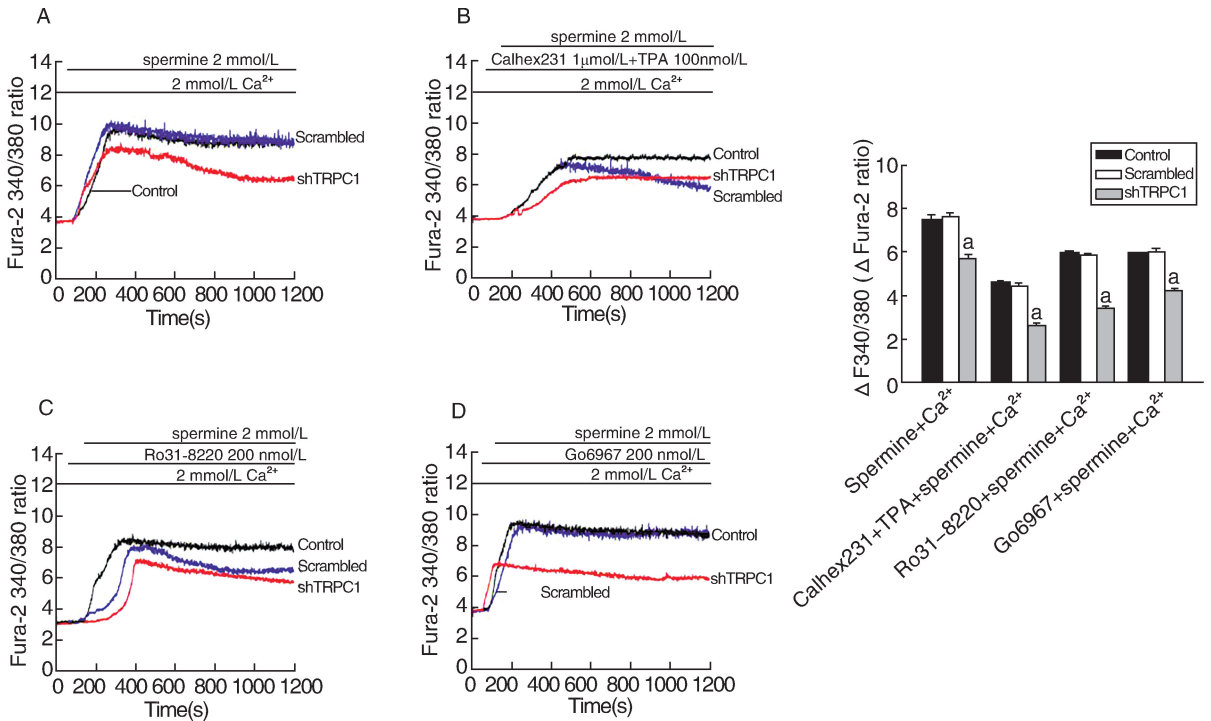


图 4. 不同处理因素对转染 TRPC1 的 HUVEC 中 SOCC、ROCC 介导的  $Ca^{2+}$  荧光强度的影响 ( $n=3$ ) A 为 CaR 激动剂处理, B 为 ROCC 模拟剂 TPA+CaR 负性变构调节剂 Calhex231 处理, C 为 PKC 抑制剂 Ro31-8220 处理, D 为经典 PKCs 和 PKC $_{\mu}$  抑制剂 Go6967 处理。a 为  $P<0.05$ ,与 control 组比较。

Figure 4. The effects of the different treatments on calcium fluorescence intensity induced by SOCC and ROCC in shTRPC1-transfected HUVEC

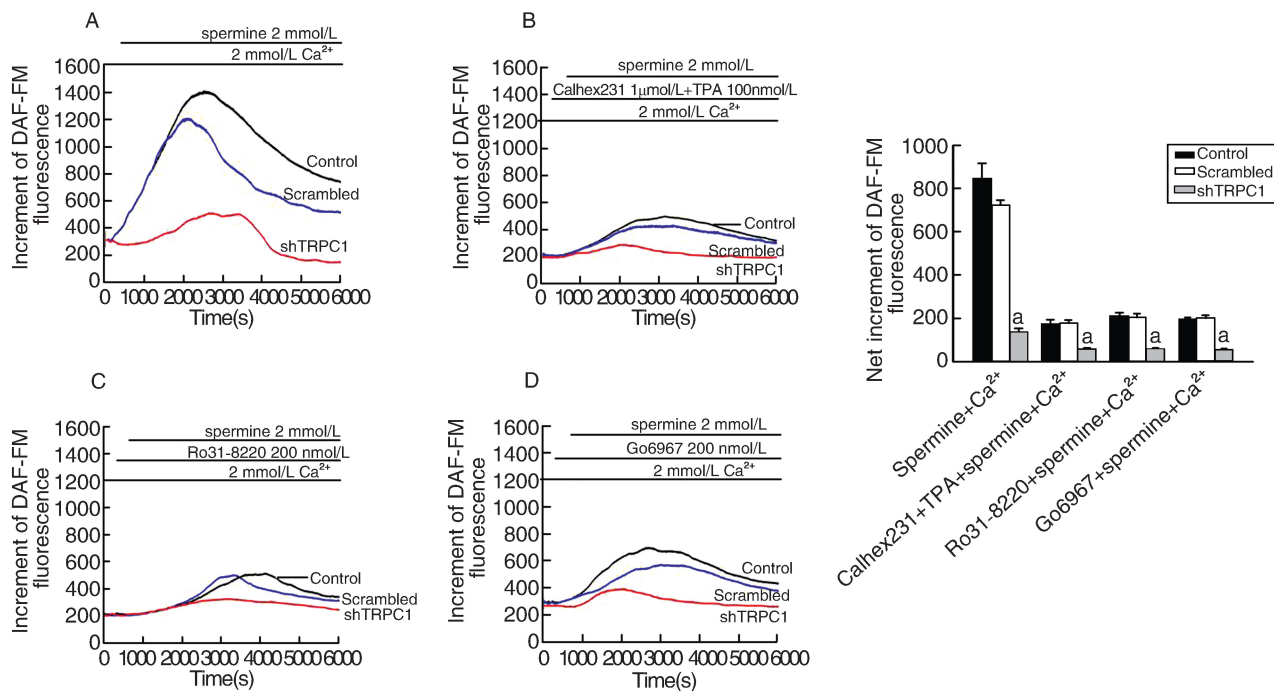


图 5. 不同处理因素对转染 TRPC1 的 HUVEC 中 SOCC、ROCC 介导的 NO 荧光强度的影响 (n=3) A 为 CaR 激动剂处理, B 为 ROCC 模拟剂 TPA+CaR 负性变构调节剂 Calhex231 处理, C 为 PKC 抑制剂 Ro31-8220 处理, D 为经典型 PKCs 和 PKC<sub>μ</sub> 抑制剂 Go6967 处理。a 为 P<0.05, 与 control 组比较。

Figure 5. The effects of the different treatments on NO fluorescence intensity induced by SOCC and ROCC in shTRPC1-transfected HUVEC

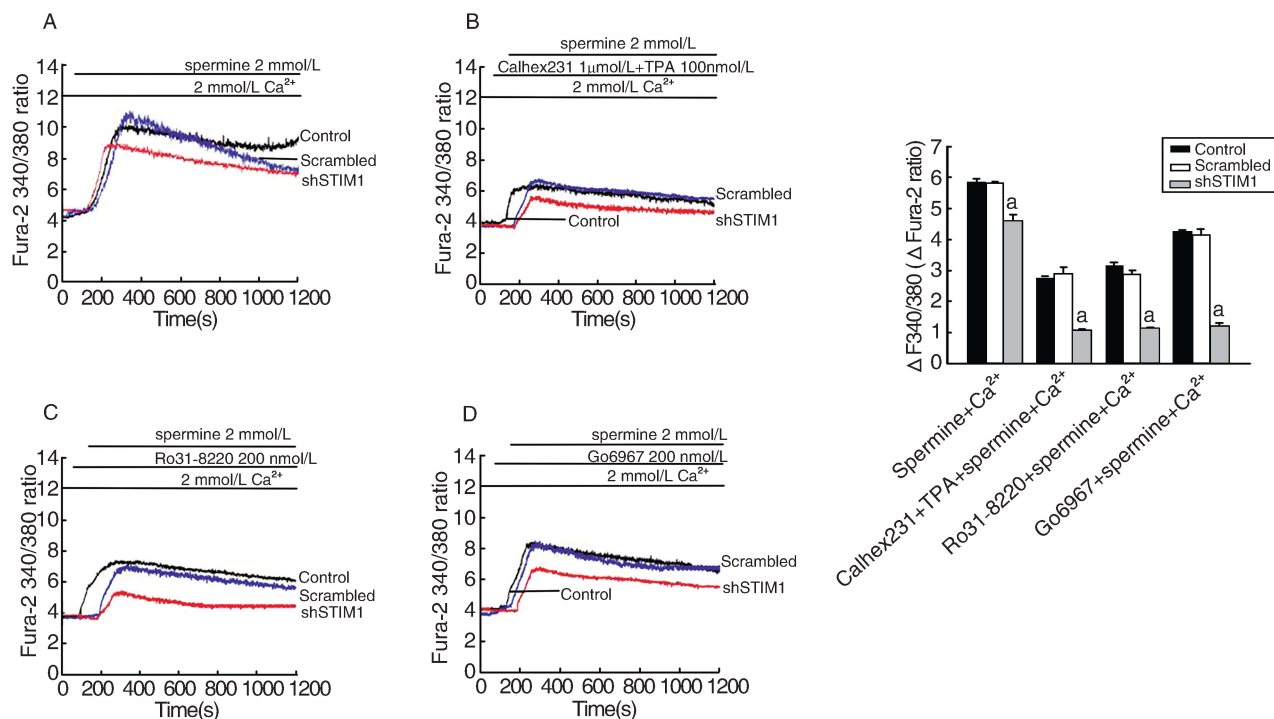


图 6. 不同处理因素对转染 STIM1 的 HUVEC 中 SOCC、ROCC 介导的 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度的影响 (n=3) A 为 CaR 激动剂处理, B 为 ROCC 模拟剂 TPA+CaR 负性变构调节剂 Calhex231 处理, C 为 PKC 抑制剂 Ro31-8220 处理, D 为经典型 PKCs 和 PKC<sub>μ</sub> 抑制剂 Go6967 处理。a 为 P<0.05, 与 control 组比较。

Figure 6. The effects of the different treatments on calcium fluorescence intensity induced by SOCC and ROCC in shSTIM1-transfected HUVEC

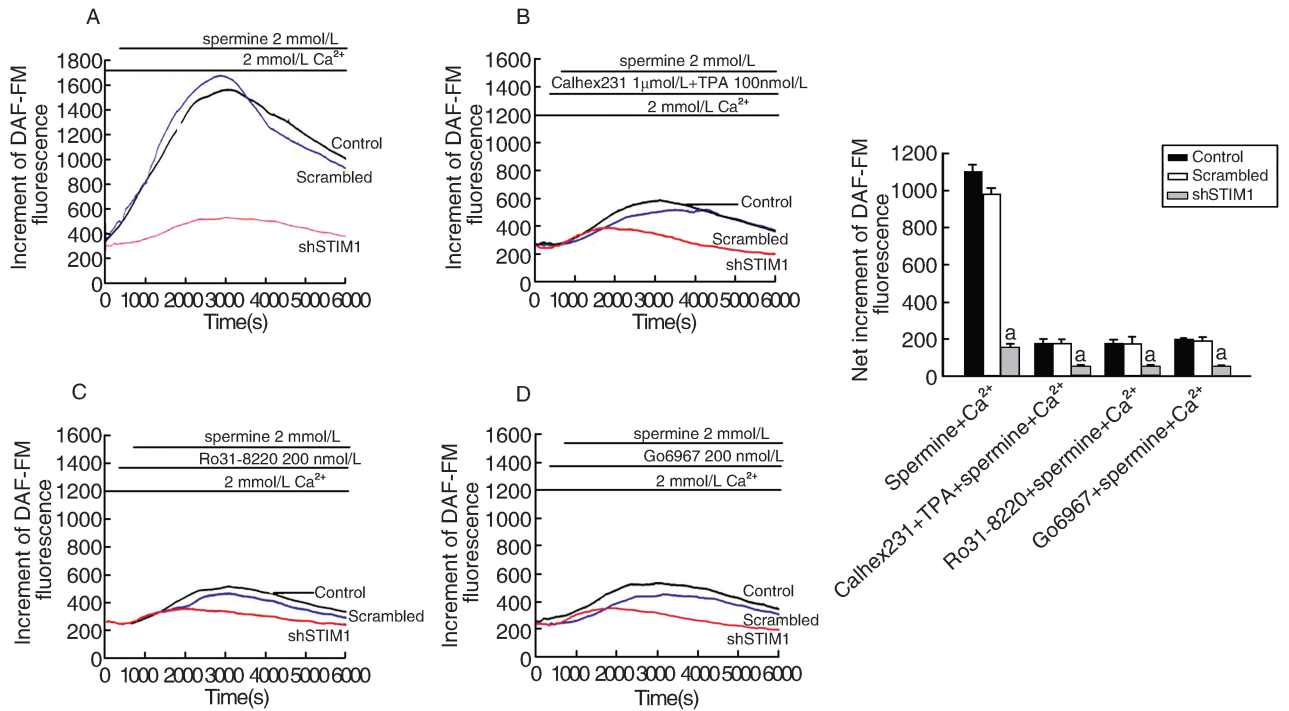


图 7. 不同处理因素对转染 STIM1 的 HUVEC 中 SOCC、ROCC 介导的 NO 荧光强度的影响 ( $n=3$ ) A 为 CaR 激动剂处理, B 为 ROCC 模拟剂 TPA+CaR 负性变构调节剂 Calhex231 处理, C 为 PKC 抑制剂 Ro31-8220 处理, D 为经典型 PKCs 和 PKC $\mu$  抑制剂 Go6967 处理。a 为  $P<0.05$ , 与 control 组比较。

Figure 7. The effects of the different treatments on NO fluorescence intensity induced by SOCC and ROCC in shSTIM1-transfected HUVEC

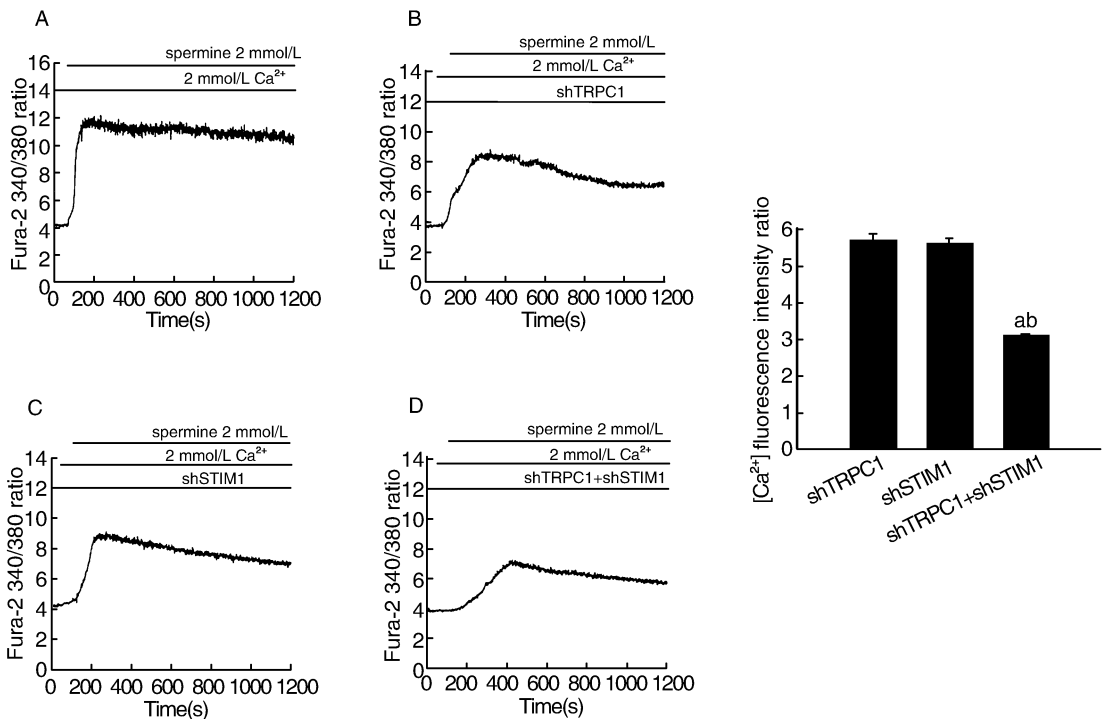


图 8. 转染 TRPC1 和 STIM1 的 HUVEC 中 SOCC、ROCC 介导的 Ca<sup>2+</sup> 荧光强度动态变化 ( $n=3$ ) A 为单纯加入 CaR 激动剂组, B 为 shTRPC1 转染组, C 为 shSTIM1 转染组, D 为 shTRPC1+shSTIM1 转染组。a 为  $P<0.05$ , 与 shTRPC1 转染组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 shSTIM1 转染组比较。

Figure 8. Dynamic changes of intracellular calcium fluorescence intensity ratio by SOCC, ROCC after different treatments in shTRPC1 and STIM1-transfected HUVEC

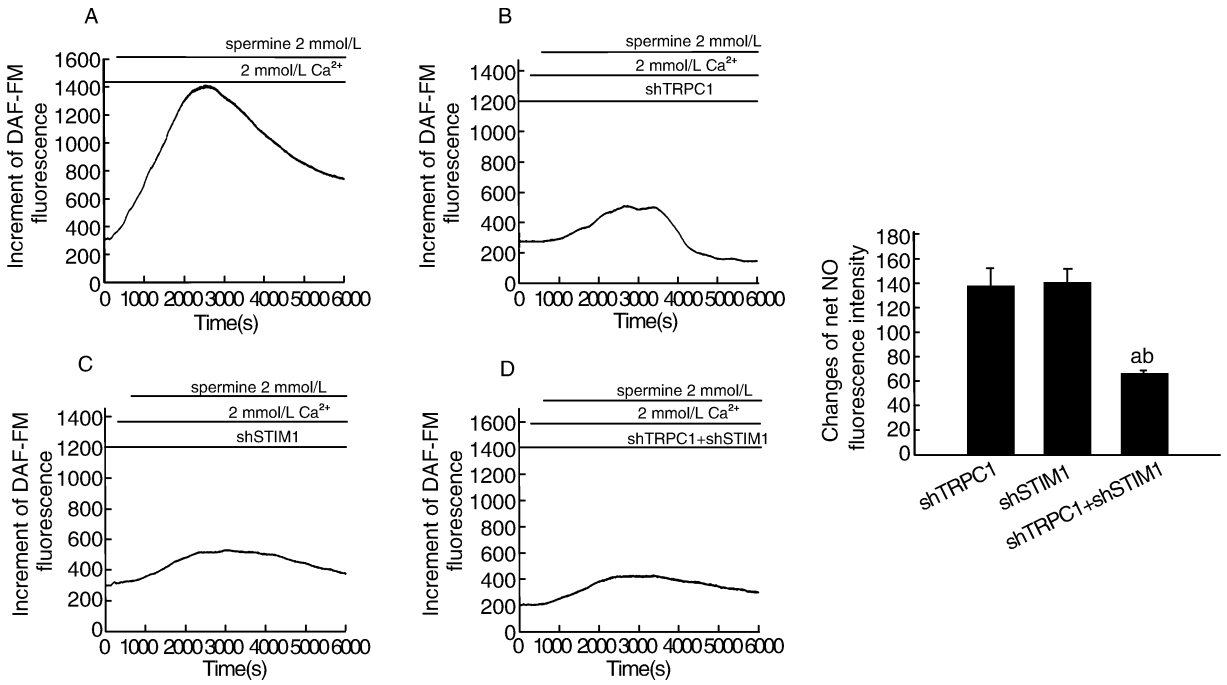


图 9. 转染 TRPC1 和 STIM1 的 HUVEC 中 SOCC、ROCC 介导的 NO 荧光强度动态变化 (n=3) A 为单纯加入 CaR 激动剂组, B 为 shTRPC1 转染组, C 为 shSTIM1 转染组, D 为 shTRPC1+shSTIM1 转染组。a 为 P<0.05, 与 shTRPC1 转染组比较; b 为 P<0.05, 与 shSTIM1 转染组比较。

Figure 9. Dynamic changes of NO fluorescence intensity by SOCC, ROCC after different treatments in shTRPC1 and STIM1-transfected HUVEC

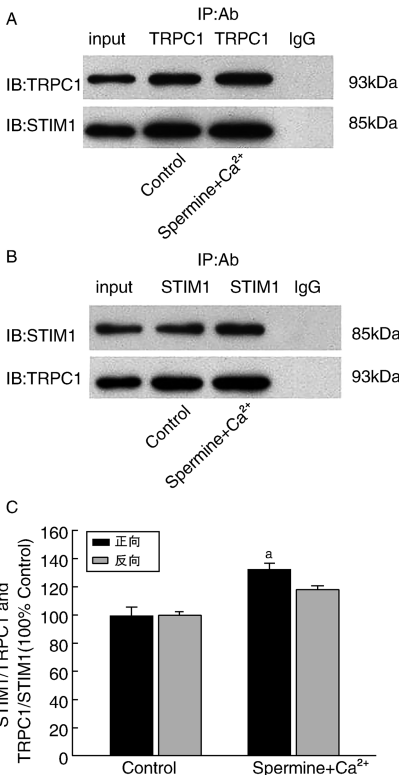


图 10. 不同处理因素刺激下 HUVEC 中 TRPC1 和 STIM1 的相互作用 (n=3) A 为正向 IP: TRPC1, B 为反向 IP: STIM1。a 为 P<0.05, 与 control 组比较。

Figure 10. The interaction of TRPC1 and STIM1 proteins after different treatments in HUVEC

### 3 讨论

在细胞膜上存在各种介导不同类型外钙内流的通道,包括电压门控性钙通道(voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel, VOC)、SOCC、ROCC 等<sup>[6]</sup>,其中 SOCC 和 ROCC 是非兴奋细胞外钙内流的主要通道。SOCC 激活依赖内质网(endoplasmic reticulum, ER)钙池耗竭后 ER 腔内 Ca<sup>2+</sup> 浓度下降,对 Ca<sup>2+</sup> 有高度选择性;ROCC 激活不依赖钙池耗竭,对 Ca<sup>2+</sup> 缺乏选择性。在哺乳动物中,TRPC 超家族有 7 个成员均表达于内皮细胞。不同细胞由不同或相同的 TRPC 以同源二聚体、异源二聚体及多聚体形式构成不同的 SOCC<sup>[7]</sup>,TRPC1 是不同 SOCC 关键组件成份之一,其中在 HUVEC 中由 TRPC1/TRPC3 异源二聚体构成 SOCC。位于内质网的 Ca<sup>2+</sup> 感受蛋白 STIM(包括 STIM1 和 STIM2 两个亚型),它们普遍表达在不同类型的细胞中。STIM1 作为 SOCC 的感受器<sup>[8]</sup>,通过影响钙离子内流调节细胞功能,它能感受钙库中钙离子浓度下降,然后易位到胞膜,将信息传给位于胞膜的 TRPC 及钙释放激活钙通道调节分子,介导外钙内流的通道开放,胞外钙离子内流以补充胞内钙离子。文献证实 TRPC、STIM、Orai 单个组件或复合物在不同组织细胞中经 SOCC 或 ROCC 介导生理和病理生理作用<sup>[9-10]</sup>,如 Jardin 等<sup>[11]</sup> 在人血小板

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 SOCC 或 ROCC)中发挥重要作用。与此不同, Alicia 等<sup>[12]</sup> 在 HEK293 细胞株发现 TRPC1 插入脂筏, TRPC1/STIM1 形成复合物定位于脂筏并介导 SOCC 激活, 缺乏 STIM1 时, TRPC1 与 TRPC 其他亚型结合激活 ROCC, 认为 STIM1 是 TRPC1 功能从 ROCC 转变成 SOCC 的关键分子。

本课题组前期研究发现 SOCC 与 ROCC 是以协同方式参与 CaR 介导钙内流及 NO 生成。因此本研究首先将前期筛选出来的抑制效率最高的 TRPC1 和 STIM1 shRNA 分别转染 HUVEC, 保证沉默基因有效抑制相关表达, 用精胺与 HUVEC 共孵育激活 SOCC 和 ROCC 通路, 结果发现, 在 HUVEC 中, 沉默 TRPC1 和 STIM1 可抑制 SOCC 和 ROCC 通路介导的  $[Ca^{2+}]_i$  升高和 NO 生成。随后又与 TPA + Calhex231、Ro31-8220 或 Go6967 共孵育 HUVEC, 分别激活 SOCC 或 ROCC 通路, 发现沉默 TRPC1、STIM1 既可抑制 SOCC 通路又可以抑制 ROCC 通路, 表明 TRPC1 和 STIM1 作为 SOCC 和 ROCC 的关键组件, 参与了 SOCC 和 ROCC 通路介导钙内流及 NO 生成。最后将 TRPC1、STIM1 shRNA 同时转染 HUVEC, 用精胺与 HUVEC 共孵育激活 SOCC 和 ROCC 通路, 与单独转染一个基因相比,  $[Ca^{2+}]_i$  升高和 NO 生成均降低, 再用免疫共沉淀检测结果显示, 用精胺与 HUVEC 共孵育激活 SOCC 和 ROCC 通路, TRPC1 与 STIM1 发生相互作用, 且这种作用在精胺作用下增强, 进一步证明在 HUVEC 中 TRPC1 与 STIM1 相互作用形成复合体共同调节 CaR 经 SOCC 和 ROCC 激活介导的钙内流和 NO 生成。

上述研究结果已初步显示出 TRPC1 与 STIM1 在心血管疾病发生、发展中的作用。未来的研究将更多阐明在心血管系统不同细胞中 TRPC1 与 STIM1 的功能、寡聚化模式及调节机制, 了解不同细胞中 SOCC 和 ROCC 通道的结构与调节机制之间的细微差别, 进而在分子水平实现选择性靶向作用治疗心血管疾病。

(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] 王振焕, 胡清华, 钟华, 等. 小凹蛋白-1 在脐静脉内皮细胞 CaR 介导 NO 生成中的作用和机制[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(5): 934-938.
- [2] 梁霄, 罗小林, 钟华, 等. 小干扰 RNA 沉默细胞外钙敏感受体抑制人脐静脉内皮细胞钙内流和 NO 生成[J]. 生理学报, 2012, 64(3): 289-295.
- [3] 刘青, 林默君. 钙池操纵性钙通道的激活信号分子与肺动脉高压[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20(3): 273-277.
- [4] 陈玉龙, 贾敏. 香烟提取物对人脐静脉内皮细胞蛋白亚硝基化的影响及机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(9): 889-892.
- [5] Ziegelstein RC, Xiong Y, He C, et al. Expression of a functional extracellular calcium-sensing receptor in human aortic endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342(1): 153-163.
- [6] Belkacemi L, Bédard I, Simoneau L, et al. Calcium channels, transporters and exchangers in placenta: a review[J]. Cell Calcium, 2005, 37(1): 1-8.
- [7] Facemire CS, Mohler PJ, Arendshorst WJ. Expression and relative abundance of short transient receptor potential channels in the rat renal microcirculation[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 286(3): F546-F551.
- [8] Cui B, Yang X, Li S, et al. The inhibitory helix controls the intramolecular conformational switching of the C-terminus of STIM1[J]. PLoS One, 2013, 8(9): e74735.
- [9] Darbellay B, Arnaudeau S, Ceroni D, et al. Human muscle economy myoblast differentiation and excitation-contraction coupling use the same molecular partners, STIM1 and STIM2[J]. J Biol Chem, 2010, 285(29): 22 437-447.
- [10] Bisailon JM, Motiani RK, Gonzalez-Cobos JC, et al. Essential role for STIM1/Orai1-mediated calcium influx in PDGF-induced smooth muscle migration[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 298(5): C993-C1 005.
- [11] Jardin I, Lopez JJ, Salido GM, et al. Orai1 mediates the interaction between STIM1 and hTRPC1 and regulates the mode of activation of hTRPC1-forming  $Ca^{2+}$  channels[J]. J Biol Chem, 2008, 283(37): 25 296-304.
- [12] Alicia S, Angélica Z, Carlos S, et al. STIM1 converts TRPC1 from a receptor-operated to a store-operated channel: moving TRPC1 in and out of lipid rafts[J]. Cell Calcium, 2008, 44(5): 479-491.

(此文编辑 文玉珊)