

网络出版时间: 2021-7-28 11:37 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1015.016.html>

高盐环境对大鼠冠状动脉平滑肌钙库操纵的钙内流及其介导的收缩功能的影响

何可¹, 肖慧¹, 卢昊阳¹, 代曼玉¹, 沈兵², 赵韧¹

摘要 目的 探讨不同浓度高盐环境下大鼠冠状动脉平滑肌中钙库操纵的钙内流(SOCE)及其介导的收缩功能的影响。方法 不同浓度高盐培养基(分别含137.65~167.65 mmol/L NaCl)培养离体大鼠冠状动脉24 h后,采用免疫组化检测 Orai1、STIM1、IP₃R 和 ET_A 在冠状动脉平滑肌中表达情况;应用微血管张力测定系统检测 U46619、ET-1 和 SOCE 诱导的大鼠冠状动脉收缩功能;用钙成像技术检测 RCASMCs 中 SOCE。结果 高盐培养可显著增强 ET-1 和 SOCE 诱导的冠状动脉收缩($P < 0.01$)及 RCASMCs 中 SOCE 介导的 Ca²⁺ 内流($P < 0.01$),并使 Orai1、STIM1、IP₃R 在冠状动脉平滑肌中表达显著上调($P < 0.05$)。结论 细胞外高盐环境可增强激动剂及 SOCE 诱导的大鼠冠状动脉的收缩功能,其机制可能与平滑肌 IP₃ 受体-SOCE 途径相关蛋白表达上调及 SOCE 介导的 Ca²⁺ 内流增强有关。

关键词 高盐;冠状动脉;血管收缩;血管平滑肌;钙库操纵的钙内流

中图分类号 R 331.5; R 322.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1263-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.018

膳食钠摄入量增高,冠状动脉痉挛和缺血性心脏病的风险增加,这与冠脉血管反应性的变化有关^[1]。研究^[2]证实,高盐饮食使血管床对激动剂的反应性增强。盐敏感性高血压会引起细胞外液中的钠水潴留^[3],神经体液因素通过冠脉内受体机制影响血管张力。有研究^[4-5]发现血栓素及内皮素受体下游 IP₃ 受体-SOCE 途径关键性调节了小动脉血管张力。钙库操纵的钙内流(store-operated Ca²⁺ entry SOCE)保持内质网 Ca²⁺ 的稳态,是维持血管平滑肌(vascular smooth muscle cells, VSMCs)收缩功能的重要环节。虽然高盐饮食可能导致血管反应性及细胞外 Na⁺ 浓度的暂时性增加,但其是否改变

SOCE 介导的冠脉收缩及其 Ca²⁺ 内流机制尚不清楚。该研究旨在讨论细胞外高盐环境对冠状动脉收缩功能的影响,为高血压相关缺血性心脏病临床治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 本研究中所用大鼠均严格遵守《中华人民共和国实验动物管理条例》,并已得到安徽医科大学动物伦理委员会的允许。实验用动物为体质量 300 g 左右清洁级雄性 SD 大鼠。所有实验大鼠均于 25℃ 左右通风环境下自由活动、饮食。

1.1.2 试剂与仪器 Orai1、ET_A 抗体购自美国 Affinity Biosciences 公司; STIM1 抗体购自美国 Gene-Tex 公司; U46619 购自美国 Sigma 公司; ET-1 购自美国 MedChemExpress 公司; Pluronic F-127 购自美国 Invitrogen 公司;微血管张力检测仪(DMT620M)购自丹麦 Danish Myo Technology A/S 公司;体式辅助显微镜购自日本奥林巴斯株式会社;荧光显微镜(Nikon T200)购自日本尼康公司。Krebs 液(mmol/L) NaCl 118、KCl 4.7、CaCl₂ 2.5、KH₂PO₄ 1.2、MgSO₄ · 7H₂O 1.2、NaHCO₃ 25.2、C₆H₁₂O₆ 11.1;高钾溶液(mmol/L) NaCl 58、KCl 60、CaCl₂ 2.5、KH₂PO₄ 1.2、MgSO₄ · 7H₂O 1.2、NaHCO₃ 25.2、C₆H₁₂O₆ 11.1;1 mol/L NaCl 溶液。

1.2 方法

1.2.1 冠状动脉环的制备 大鼠用 CO₂ 窒息处死后,手术剪打开胸腔,取出心脏后置于灭菌 PBS 液中轻轻挤压排出血液,在显微镜下仔细剥出冠状动脉,分离周围肌肉组织,注意不要钳夹及牵拉血管。分离出的冠状动脉剪成 4 段 1.8~2.0 mm 长的血管环,用细金属丝去除血管内皮。整个分离过程要在 4℃ 冰浴且不断通有 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体的条件下进行。

1.2.2 离体血管培养 用无菌 PBS 将游离的冠状动脉血管环洗 3 次后放入含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,分别加入 10、20、30、40 μl 的 1 mol/L

2021-04-25 接收

基金项目:安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2014A122)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院心血管内科,合肥 230022

²安徽医科大学基础医学院,合肥 230022

作者简介:何可,女,硕士研究生;

赵韧,女,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: zhaoren2008@126.com

NaCl 溶液,放进培养箱培养 24 h 后进行离体血管张力实验。

1.2.3 离体血管张力实验 在 DMT 张力仪的浴槽中预置 5 ml Krebs 液并通有 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体,维持温度在 37 ℃,将培养的冠状动脉血管环用细钢丝固定于浴槽中。调节张力换能器给血管施加 2 mN 的基础张力,利用 Powerlab 生物信号记录系统记录血管张力的变化。待血管在 Krebs 液平衡 1 h 且张力稳定后,用 60 mmol/L 高钾溶液激动血管 2 次,待达到最大收缩效应时,用 Krebs 液冲洗 3 次至基础张力,每次间隔 5 min。为检测血管内皮活性,用 1 μmol/L 的 U46619 刺激血管收缩,维持 5 min 后用 1 μmol/L Ach 诱导血管舒张,若舒张幅度小于 20%,则说明内皮去除良好,方可进行后续实验。洗脱 4 次至基线张力后,依次用 U46619 (0.01 ~ 3 μmol/L)、ET-1 (1 ~ 300 nmol/L) 诱导血管进行浓度依赖性收缩,观察并测定其张力变化。在 SOCE 诱导的收缩实验中,首先用不含 CaCl₂ 的 Krebs 液冲洗 3 次以清除细胞外 Ca²⁺,每次间隔 5 min,然后加入 1 μmol/L 维拉帕米和 100 nmol/L ET-1 孵育 10 min 以耗尽内质网中存储的 Ca²⁺,记录 CaCl₂ (1 ~ 10 mmol/L) 诱导的血管浓度依赖性收缩。

1.2.4 钙成像实验 大鼠冠脉平滑肌细胞株 (rat coronary arterial smooth muscle cells, RCASMCs) 传代种板于 30 mm 玻璃盖玻片上。分别用含 137.65 mmol/L 和 157.65 mmol/L NaCl 的完全培养基培养 24 h 后进行细胞钙成像实验。用含 6 μmol/L Fluo-8 AM 和 0.02% Pluronic F-127 的培养基孵育细胞 30 min,随后在不含 Ca²⁺ 的 OPSS 缓冲溶液中用 4 μmol/L 毒胡萝卜素 (thapsigargin, TG) 处理 10 min 以耗尽内质网中 Ca²⁺ 存储,随即添加 2 mmol/L CaCl₂ 诱导细胞外 Ca²⁺ 内流。在荧光显微镜下检测和记录荧光,Fluo-8 的激发和发射波长分别为 488 和 515 nm。将添加细胞外 Ca²⁺ 之后与添加之前的荧光强度之比 (F₁/F₀) 作为 [Ca²⁺]_i 变化量。

1.2.5 免疫组织化学实验 大鼠离体冠状动脉用不同浓度高盐培养基 (分别含 137.65 ~ 167.65 mmol/L NaCl) 培养 24 h 后,取出并固定于 4% 多聚甲醛中。脱水并包埋成组织蜡块后切成 5 μm 厚的切片。经脱蜡、水化、修复抗原后用 0.3% 过氧化氢处理以封闭内源性过氧化物酶,室温下用 10% 山羊血清封闭 30 min。随后加一抗,在 4℃ 下孵育过夜。室温复温 30 min 后用 PBS 冲洗,室温下用二抗孵育

30 min,经 DAB 显色后用苏木精对切片进行复染,流水冲洗后用显微镜观察是否染色完全,烘干后用中性树脂封片晾干,镜下观察并拍照。

1.3 统计学处理 实验数据均采用以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计分析和绘制统计图采用 Sigma Plot 12.5 软件,两组间比较采用双因素方差分析及两独立样本 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高盐培养对 U46619 和 ET-1 诱导的冠状动脉血管收缩的影响 采用累积给药法加入 U46619 (0.01 ~ 3 mmol/L) 或 ET-1 (1 ~ 300 nmol/L),可诱导大鼠冠状动脉产生浓度依赖性收缩。与对照组 (培养基中 NaCl 浓度为 137.65 mmol/L) 相比,大鼠冠脉在高盐培养后 (培养基中 NaCl 浓度为 147.65 ~ 167.65 mmol/L) 由 U46619 所引发的血管浓度依赖性收缩增强 (*P* < 0.05),见图 1A 及表 1。由 ET-1 所引发的血管浓度依赖性收缩也增强 (*P* < 0.01),见图 1B 及表 2。这一结果表明,细胞外高盐环境可增强激动剂诱导的大鼠冠状动脉的收缩功能。

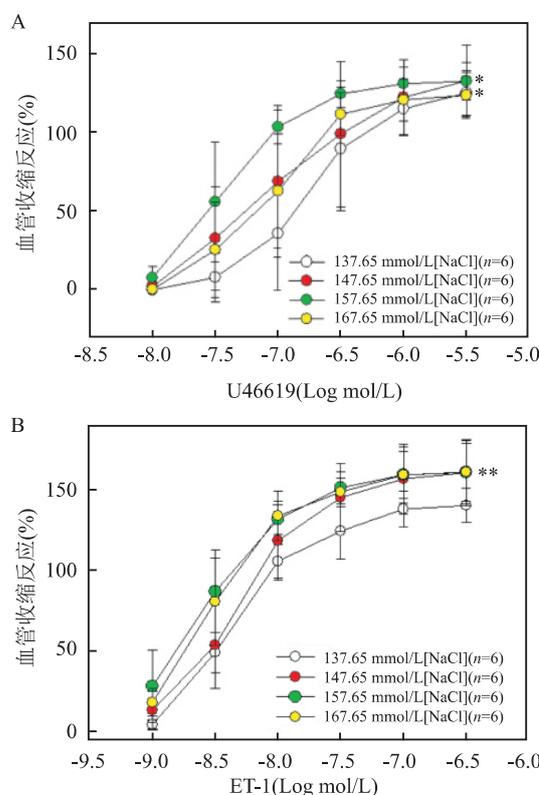


图 1 高盐培养对激动剂诱导的冠状动脉收缩的影响

A: U46619 诱导的冠状动脉浓度依赖性收缩; B: ET-1 诱导的冠状动脉浓度依赖性收缩; 与 137.65 mmol/L [NaCl] 组比较: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01

2.2 高盐培养对 SOCE 诱导的冠状动脉血管收缩的影响 结果如图 2 及表 3 所示 与对照组相比 高盐培养后 SOCE 诱导的冠状动脉浓度依赖性收缩增强 ($P < 0.01$)。

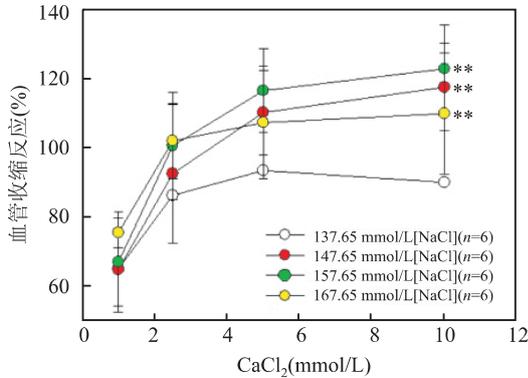


图 2 高盐培养对 SOCE 诱导的冠状动脉收缩反应的影响 与 137.65 mmol/L [NaCl] 组比较: ** $P < 0.01$

2.3 高盐培养对 RCASMCs 中 SOCE 介导 Ca^{2+} 内流的影响 为了探究高盐环境下 SOCE 介导 Ca^{2+} 内流的变化 选取使冠状动脉收缩最强的高盐浓度(培养基中 NaCl 浓度为 157.65 mmol/L) 处理 RCASMCs 24 h 后做钙成像实验 结果如图 3 所示,

与对照组 ($F_1/F_0 = 2.70 \pm 0.43$) 相比,高盐培养 ($F_1/F_0 = 4.32 \pm 0.59$) 使 RCASMCs 中 SOCE 介导的 Ca^{2+} 内流增强 ($t = 4.477, P < 0.01$)。

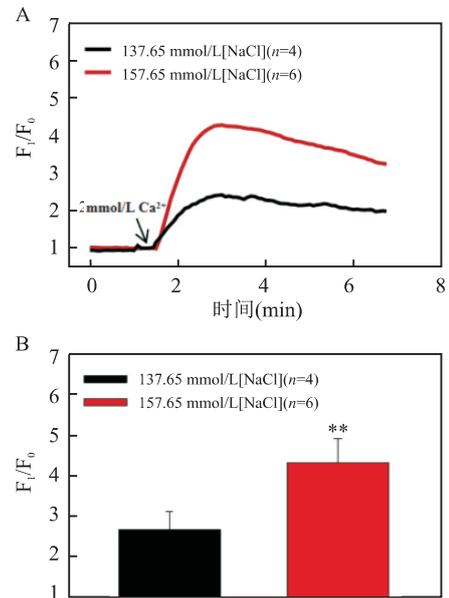


图 3 高盐培养对 RCASMCs 中 SOCE 介导的 Ca^{2+} 内流的影响
A: RCASMCs 中 SOCE 介导的 Ca^{2+} 内流的钙成像代表性曲线;
B: RCASMCs 中 SOCE 介导的 Ca^{2+} 内流的钙成像的统计图表; 与 137.65 mmol/L [NaCl] 组比较: ** $P < 0.01$

表 1 高盐培养对 U46619 诱导的冠状动脉收缩的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s, \%$)

| NaCl 浓度 (mmol/L) | U46619 ($\mu\text{mol/L}$) | | | | | | F 值 |
|---------------------|------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------|
| | 0.01 | 0.03 | 0.1 | 0.3 | 1 | 3 | |
| 137.65 | 0.27 \pm 0.29 | 8.31 \pm 14.13 | 36.10 \pm 32.71 | 90.05 \pm 36.00 | 115.49 \pm 15.76 | 125.45 \pm 13.21 | - |
| 147.65 | 2.40 \pm 2.43 | 33.06 \pm 30.15 | 69.25 \pm 44.09 | 99.46 \pm 42.14 | 122.72 \pm 21.70 | 133.20 \pm 20.59 | 4.14* |
| 157.65 | 8.04 \pm 6.33 | 56.32 \pm 34.77 | 103.98 \pm 9.81 | 124.95 \pm 7.51 | 131.39 \pm 9.46 | 133.01 \pm 10.84 | 36.03** |
| 167.65 | 0.56 \pm 1.24 | 25.82 \pm 27.66 | 63.20 \pm 32.98 | 111.98 \pm 12.55 | 121.07 \pm 12.35 | 124.09 \pm 13.33 | 4.73* |

与 137.65 mmol/L [NaCl] 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 高盐培养对 ET-1 诱导的冠状动脉收缩的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s, \%$)

| NaCl 浓度 (mmol/L) | ET-1 (nmol/L) | | | | | | F 值 |
|---------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------|
| | 1 | 3 | 10 | 30 | 100 | 300 | |
| 137.65 | 4.94 \pm 2.61 | 49.37 \pm 11.31 | 105.47 \pm 9.68 | 124.04 \pm 15.46 | 137.64 \pm 9.90 | 139.85 \pm 9.49 | - |
| 147.65 | 13.67 \pm 10.78 | 53.86 \pm 24.27 | 118.20 \pm 22.28 | 144.71 \pm 18.92 | 156.21 \pm 19.56 | 160.02 \pm 18.52 | 12.39** |
| 157.65 | 28.48 \pm 20.59 | 86.89 \pm 23.13 | 131.30 \pm 8.15 | 150.77 \pm 9.21 | 158.73 \pm 15.77 | 160.21 \pm 16.33 | 52.71** |
| 167.65 | 18.54 \pm 7.59 | 80.57 \pm 24.47 | 133.45 \pm 13.72 | 148.11 \pm 8.04 | 158.67 \pm 12.95 | 160.36 \pm 17.59 | 46.89** |

与 137.65 mmol/L [NaCl] 组比较: ** $P < 0.01$

表 3 高盐培养对 SOCE 诱导的冠状动脉收缩的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s, \%$)

| NaCl 浓度 (mmol/L) | CaCl ₂ (mmol/L) | | | | F 值 |
|---------------------|----------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|---------|
| | 1 | 2.5 | 5 | 10 | |
| 137.65 | 4.94 \pm 2.61 | 49.37 \pm 11.31 | 105.47 \pm 9.68 | 124.04 \pm 15.46 | - |
| 147.65 | 13.67 \pm 10.78 | 53.86 \pm 24.27 | 118.20 \pm 22.28 | 144.71 \pm 18.92 | 14.81** |
| 157.65 | 28.48 \pm 20.59 | 86.89 \pm 23.13 | 131.30 \pm 8.15 | 150.77 \pm 9.21 | 32.55** |
| 167.65 | 18.54 \pm 7.59 | 80.57 \pm 24.47 | 133.45 \pm 13.72 | 148.11 \pm 8.04 | 23.54** |

与 137.65 mmol/L [NaCl] 组比较: ** $P < 0.01$

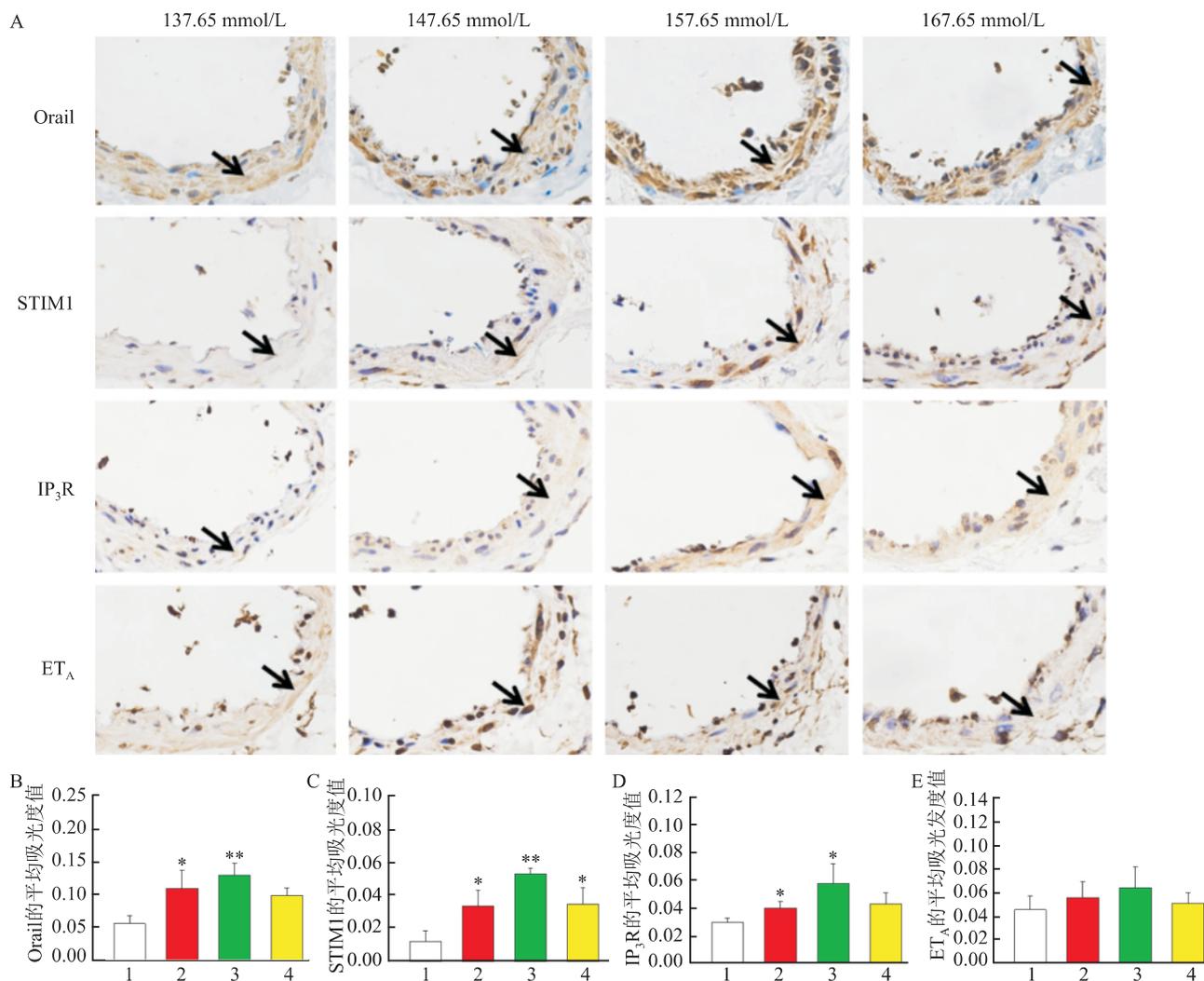


图4 高盐培养后冠状动脉免疫组化结果 ×400

A: Orai1、STIM1、IP₃R 和 ET_A 蛋白在冠状动脉平滑肌层的表达; B-E: Orai1、STIM1、IP₃R 和 ET_A 蛋白免疫组化平均吸光度值的统计结果;

1: 137.65 mmol/L [NaCl]; 2: 147.65 mmol/L [NaCl]; 3: 157.65 mmol/L [NaCl]; 4: 167.65 mmol/L [NaCl]; 与 137.65 mmol/L [NaCl] 组比较;

* P < 0.05, ** P < 0.01

2.4 IP₃R-SOCE 相关蛋白的分布和表达 结果如图4所示,用免疫组织化学方法对不同浓度高盐培养后的离体冠状动脉进行染色,放大400倍视野观察,Orai1、STIM1、IP₃R 和 ET_A 于冠状动脉平滑肌层均有分布,与对照组相比,高盐培养后,Orai1、STIM1 和 IP₃R 的表达增强 (P < 0.05),ET_A 的表达有增强趋势,但差异无统计学意义。

3 讨论

现有证据^[3]表明钠摄入量与血压值之间存在直接关系,过量的钠摄入已被证明会引发血压的显著增加,并与缺血性心脏病的发病及其心血管并发症有关。高钠摄入及血压水平升高与保水、全身外

周阻力增加、内皮功能改变、大弹性动脉结构和功能改变、交感神经活动改变、心血管系统自主神经调节有关。一些研究^[6]表明,在高钠摄入期间,体内钠含量的增加虽然很小,也许是暂时的,但仍可能高于低钠摄入期间,无论是在人类^[6]还是在实验模型^[7]中,钠可能在体内积累,而不伴随着水的滞留。此外,虽然体内钠可能增加的位置尚不清楚,但一些钠可能存在于细胞内,而很大一部分可能在细胞外液中^[8]。最近的研究^[9]表明,钠血浆水平的变化不仅对小阻力动脉产生影响,而且还可能影响大弹性动脉的功能和结构。

生理情况下,当第一信使(如内皮素和血栓环素)激活细胞膜上G蛋白偶联受体,下游第二信使

1,4,5-三磷酸肌醇(IP₃)激活内质网上的IP₃R引起内质网中的Ca²⁺释放到胞质中引起血管收缩。钙库操纵的钙通道(store-operated calcium channel, SOCC)是细胞膜钙通道的一种,其开放与胞内钙库的释放密切相关,是血管收缩机制之一,而Orai1、STIM1是SOCC作用的关键蛋白^[10]。病理情况下冠状动脉的粥样硬化处由于内皮损伤和血小板聚集后能够释放如内皮素和血栓环素等强烈的缩血管因子,通过G蛋白偶联受体发挥收缩血管的作用,导致局部严重的冠脉痉挛,因此G蛋白偶联受体-IP₃R-SOCC作用是调节冠脉血管张力不可忽视的因素。血管平滑肌细胞的增殖、迁移的调节都与SOCC密切相关,更有动物研究^[11-12]表明在肺动脉高压以及自发性高血压的疾病大鼠,肺动脉及胸主动脉收缩张力增加与SOCC作用增强有关。

ET-1对血管平滑肌上ET_A受体的主要作用是促进血管收缩、高血压、纤维化、炎症改变以及动脉粥样硬化。缺血性心脏病患者冠状动脉ET_A和ET_B受体水平显著高于充血性心衰患者及正常对照组^[13]。高盐诱导高血压大鼠的外周小动脉收缩张力显著增加,而SOCC介导的血管收缩对脑基底动脉张力的调节起重要作用^[14]。有研究^[5]证明了血管激动剂介导的SOCC信号通路在冠状动脉血管收缩中的作用,发现IP₃R-SOCC蛋白水平与冠脉的收缩张力呈现正相关性。本研究显示高盐培养离体冠脉后,激动剂(U46619、ET-1和CaCl₂)诱导的血管收缩力增强,SOCC介导的Ca²⁺内流增强,冠脉平滑肌层G蛋白偶联受体ET_A和下游IP₃R上调,SOCC蛋白(STIM1和Orai1)上调。所以本实验中冠脉收缩增强可能由于细胞外高盐环境引起IP₃R-SOCC蛋白水平升高及SOCC介导的Ca²⁺内流增强有关。

有研究^[15]发现生理范围内细胞外NaCl浓度增加可通过Na⁺/Ca²⁺反向交换促使Ca²⁺进入细胞(而不是内钙释放)从而增强5-HT诱导的冠脉收缩,而细胞外NaCl浓度进一步升高时由于离子张力增加冠脉血管张力却是下降的。本研究在NaCl浓度为137.65~157.65 mmol/L时,随着盐浓度的提高,激动剂诱导的冠脉收缩依次增强,Orai1、STIM1和IP₃R蛋白在冠状动脉平滑肌的表达依次上调,而当盐浓度进一步提高到167.65 mmol/L时,激动剂诱导的冠脉收缩较低浓度NaCl组反而有所下降,相应的蛋白表达下调,这可能与离子强度的过度增加有关,并可能掩盖细胞外NaCl的生理增加对

冠状动脉血管收缩的显著影响。

参考文献

- [1] Feng W, Dell'italia L J, Sanders P W. Novel paradigms of salt and hypertension[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(5): 1362-9.
- [2] Mokotedi L, Michel F S, Woodiwiss A J, et al. Effects of high salt-low potassium diet on blood pressure and vascular reactivity in male sprague dawley rats[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2018, 71(6): 340-6.
- [3] Grillo A, Salvi L, Coruzzi P, et al. Sodium intake and hypertension[J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 1970.
- [4] Kato K, Okamura K, Hattata M, et al. Involvement of IP₃-receptor activation in endothelin-1-induced Ca(2+) influx in rat pulmonary small artery[J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 720(1-3): 255-63.
- [5] Domínguez-Rodríguez A, Díaz I, Rodríguez-Moyano M, et al. Urotensin-II signaling mechanism in rat coronary artery: role of STIM1 and Orai1-dependent store operated calcium influx in vasoconstriction[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(5): 1325-32.
- [6] Heer M, Baisch F, Kropp J, et al. High dietary sodium chloride consumption may not induce body fluid retention in humans[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278(4): F585-95.
- [7] Titze J, Bauer K, Schafflhuber M, et al. Internal sodium balance in DOCA-salt rats: a body composition study[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 289(4): F793-802.
- [8] Skorecki K L, Brenner B M. Body fluid homeostasis in man. A contemporary overview[J]. *Am J Med*, 1981, 70(1): 77-88.
- [9] Kurtz T W, Dicarlo S E, Pravenec M, et al. The American Heart Association Scientific Statement on salt sensitivity of blood pressure: Prompting consideration of alternative conceptual frameworks for the pathogenesis of salt sensitivity[J]. *J Hypertens*, 2017, 35(11): 2214-25.
- [10] Prakriya M, Lewis R S. Store-operated calcium channels[J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(4): 1383-436.
- [11] Yun X, Chen Y, Yang K, et al. Upregulation of canonical transient receptor potential channel in the pulmonary arterial smooth muscle of a chronic thromboembolic pulmonary hypertension rat model[J]. *Hypertens Res*, 2015, 38(12): 821-8.
- [12] Liantonio A, Camerino G M, Scaramuzza A, et al. Calcium homeostasis is altered in skeletal muscle of spontaneously hypertensive rats: cytofluorimetric and gene expression analysis[J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(10): 2803-15.
- [13] Wackenfors A, Emilson M, Ingemansson R, et al. Ischemic heart disease induces upregulation of endothelin receptor mRNA in human coronary arteries[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 484(1): 103-9.
- [14] Jiang W, Ye L, Yang Y, et al. TRPP2 associates with STIM1 to regulate cerebral vasoconstriction and enhance high salt intake-induced hypertensive cerebrovascular spasm[J]. *Hypertens Res*, 2019, 42(12): 1894-904.
- [15] Coleman D A, Khalil R A. Physiologic increases in extracellular sodium salt enhance coronary vasoconstriction and Ca²⁺ entry[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2002, 40(1): 58-66.

网络出版时间: 2021-7-28 11:40 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1015.018.html>

肺炎支原体 P116 基因 FP2 片段的免疫优势和细胞黏附活性

林康¹, 文志¹, 周畅¹, 李文丽¹, 吴焕武¹, 刘丹艳², 朱玉林³, 王林定¹

摘要 目的 通过对肺炎支原体 P116 基因 FP2 段的 453 bp 片段进行了克隆表达, 探讨肺炎支原体 P116 蛋白对 A549 细胞的黏附性。方法 肺炎支原体感染者血清和肺炎支原体抗体用 Western blot 和 ELISA 检测纯化的 P116 蛋白片段的免疫原性及效价。P116-FP2 多克隆抗体和 A549 细胞黏附试验用免疫荧光评价肺炎支原体的黏附、黏附抑制。结果 P116-FP2 蛋白具有免疫原性, 用该蛋白构建的 ELISA 方法

具有较高的敏感性和特异性。制备的 P116-FP2 抗体可阻断肺炎支原体黏附 A549 细胞。随着多克隆抗体效价的增加, 肺炎支原体对 A549 细胞的黏附率明显降低。结论 初步证明 P116-FP2 蛋白具有免疫反应性。P116-FP2 多克隆抗体能够抑制肺炎支原体对 A549 细胞的黏附。

关键词 肺炎支原体; P116 蛋白; A549 细胞; 多克隆抗体
中图分类号 R 375.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1268-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.019

2020-10-16 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81271837); 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2012A161); 安徽省自然科学基金项目(编号: 1708085MH193); 安徽医科大学基础与临床合作研究提升计划(编号: 2019xkjT024); 2019 年度安徽医科大学校科研基金项目(编号: 2019xkj020)

作者单位: ¹ 安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032

² 阜阳师范大学, 阜阳 236000

³ 安徽医科大学第一附属医院儿科, 合肥 230032

作者简介: 林康, 男, 硕士研究生;

王林定, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: wanglinding@ahmu.edu.cn

肺炎支原体是一种原核细胞型微生物, 是已知能够自我复制的最小的人类病原体, 大约 7% ~ 20% 的获得性肺炎病例是由该病原体引起的^[1-2]。肺炎支原体对宿主呼吸道黏膜上皮细胞的黏附和定植是成功感染的关键因素之一^[3]。这一过程由肺炎支原体的附着细胞器(adherent organelle, AO)所介导。AO 是一种极化和锥形的细胞延伸, 被认为与肺炎支原体滑动和细胞分裂有关^[4]。肺炎支原

Effects of high-salt environment on store-operated calcium entry and contractile function in rat coronary artery smooth muscle

He Ke, Xiao Hui, Lu Haoyang, et al

(Dept of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects of high-salt environment on store-operated calcium entry (SOCE) and contractile function in rat coronary artery smooth muscle. **Methods** After culturing the isolated rat coronary arteries in different concentrations of high-salt culture media (with 137.65 ~ 167.65 mmol/L NaCl respectively) for 24 h, the distribution and expression of Orai1, STIM1, IP₃R and ET_A in coronary artery smooth muscle were detected by immunohistochemistry assays, U46619, ET-1 and SOCE-induced coronary vasoconstriction were examined by microvascular tension measurement system, and the SOCE mediated Ca²⁺ influx in RCASMCs was detected by calcium imaging technology. **Results** High-salt environment significantly enhanced ET-1 and SOCE-induced coronary vasoconstriction ($P < 0.01$) and SOCE mediated Ca²⁺ influx in the RCASMCs ($P < 0.01$), and increased the expression of Orai1, STIM1 and IP₃R in coronary artery smooth muscle ($P < 0.05$). **Conclusion** The extracellular high-salt environment can enhance the contractile function of rat coronary artery induced by agonist and SOCE, and the mechanism may be associated with the up regulation of key proteins related to the IP₃R-SOCE pathway and the enhancement of Ca²⁺ influx mediated by SOCE in the rat coronary artery smooth muscle.

Key words high-salt; coronary artery; vasoconstriction; vascular smooth muscle; store-operated calcium entry