

TRPV4 在小鼠脑血管内皮细胞中的表达及对血管张力调节作用研究

胡文霞^{1,2}, 姜婉², 叶立², 叶沛¹, 朱金行², 沈兵², 杜鹃²

摘要 目的 比较瞬时受体电位 (TRP) 通道家族中香草素受体亚家族 (TRPV) 和经典瞬时感受器电位亚家族 (TRPC) 在小鼠脑、心和肝微血管内皮细胞表达差异, 寻找脑血管中具有特异性高表达亚型, 阐明其对脑血管舒张的调节作用。方法 挖掘 GEO 数据库中芯片表达谱数据, 分析各个通道亚型差异表达情况, 再采用免疫组化检测 TRPV4、TRPP2 和 TRPC1 在脑基底动脉中表达情况, 血管张力实验检测 TRPV4 通道在调节小鼠脑基底动脉舒张中的效应。结果 通过分析表达谱数据显示, 在小鼠脑、心和肝三种微血管内皮中, TRPV4 通道在脑血管内皮细胞显著高表达, 而 TRPC3 通道显著低表达。TRPV4、TRPP2 和 TRPC1 在脑基底动脉内皮和平滑肌层也显著表达。TRPV4 通道激动剂 GSK1016790A 能浓度依赖地舒张苯肾上腺素引起的脑基底动脉收缩, 而且其舒张效应可以被 TRPV4 通道阻断剂 HC067047 所阻断。结论 与心和肝血管内皮细胞相比, TRPV4 通道在小鼠脑血管内皮细胞中显著高表达, 可能在调节脑血管内皮功能中具有重要意义。

关键词 瞬时受体电位离子通道; 内皮细胞; TRPV4; 脑血管中图分类号 Q 412

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1433-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.004

瞬时受体电位 (transient receptor potential, TRP) 通道属于非选择性阳离子通道家族, 由于大多数 TRP 通道都通透钙离子, 所以其在介导细胞钙信号中具有重要作用^[1]。研究^[2]证实, TRP 通道家族中香草素受体亚家族 (transient receptor potential vanilloid, TRPV)、经典瞬时受体亚家族 (transient receptor potential canonical, TRPC) 和多囊受体亚家族 (transient receptor potential polycystic, TRPP) 在血管内皮细胞高表达, 在介导血管内皮依赖的血管舒张、内皮细胞通透性、增殖、凋亡和血管新生等方面都具

有重要作用。

该研究采用芯片表达谱数据, 分析小鼠脑、肝脏和心脏微血管内皮细胞 TRPV 和 TRPC 通道家族差异, 显示 TRPV4 通道在脑血管和脑基底动脉内皮细胞高表达并观察其介导脑基底动脉舒张中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 芯片表达谱数据 血管内皮细胞 Affymetrix 高通量芯片表达谱数据来自于 Gene Expression Omnibus (GEO) 数据库, Series GSE48209^[3]。

1.1.2 试剂与仪器 TRPC1、TRPV4 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; TRPP2 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology Inc 公司; 通用型 SP 检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; U46619、GSK1016790A (GSK) 均购自美国 Sigma 公司; 微血管张力检测仪 (DMT620M) 购自丹麦 Danish Myo Technology A/S 公司。克氏液 (NaCl 118 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mmol/L, NaHCO₃ 25.2 mmol/L 和 glucose 11.1 mmol/L); 高钾溶液 (NaCl 58 mmol/L, KCl 60 mmol/L, CaCl₂ 2.5 mmol/L, KH₂PO₄ 1.2 mmol/L, MgSO₄ · 7H₂O 1.2 mmol/L, NaHCO₃ 25.2 mmol/L 和 glucose 11.1 mmol/L)。

1.1.3 实验动物 清洁级 C57 雄性小鼠, 6~8 周龄 20~25 g, 安徽医科大学动物中心提供。自由摄食和饮水, 室温维持在 (22 ± 1) °C。

1.2 方法

1.2.1 表达谱数据分析方法 脑、心和肝微血管内皮细胞提取自 C57 背景的转基因小鼠, 采用流式细胞仪分选获得高纯度血管内皮细胞, 芯片荧光背景采用 RMA 法处理, 数据归一化后, 探针光密度数值用 Log₂ 处理^[3]。

1.2.2 脑血管环的制备 将小鼠用 CO₂ 窒息法处死后迅速取出脑基底动脉, 置于备好的克氏液并通有 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气。在解剖显微镜下,

2017-05-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81371284)

作者单位: ¹安徽医科大学六安市人民医院神经内科, 六安 237005

²安徽医科大学基础医学院生理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 胡文霞, 女, 副主任医师;

沈兵, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: shenbing@ahmu.edu.cn

采用精密手术镊和剪刀,仔细去除血管周围的结缔组织,沿纵轴将血管剪成长约 2 mm 血管环。

1.2.3 免疫组化实验 采用 SP 法进行免疫组化染色,迅速将小鼠基底动脉取出后,用生理盐水清洗干净,予 4% 多聚甲醛固定 24 h,脱水、包埋,切成 5 μm 厚的组织切片,经脱蜡、水化、微波修复抗原,再用 3% 过氧化氢封闭内源性过氧化物酶,用 10% 山羊血清工作液封闭 40 min,加一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,第 2 天室温复温 30 min,滴加二抗,室温孵育 30 min,再经 DAB 显色、苏木精复染后流水冲洗返蓝 30 ~ 60 min,最后用酒精分色、二甲苯透明和中性树胶封片,镜下观察和拍照。

1.2.4 离体血管张力实验 用细钢丝将分离干净的血管环一边固定在张力换能器上,另一边固定在微调器上,置于含有 5 ml 的克氏液浴槽内,持续通入 95% O_2 和 5% CO_2 混合气并保持 37 $^{\circ}\text{C}$,调节微调器将血管环施加 1 mN 前负荷,采用 Chart 软件和 Powerlab 生物机能信号采集系统记录张力信号,在克氏液中平衡 20 min 后,给予 6×10^{-2} mol/L 的高钾溶液激动血管,收缩达峰值后,用克氏液洗 3 次;再平衡 10 min 后,加入 10^{-8} mol/L 的 U46619 收缩血管,收缩达平台后累积浓度加入 GSK (10^{-8} ~ 10^{-4} mol/L) 舒张血管。

1.3 统计学处理 采用 Sigmaplot 软件进行分析,实验所得数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据之间相比采用独立样本 t 检验。血管张力实验中,浓度依赖地舒张效应数据采用双因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脑和肝脏以及脑和心脏微血管内皮细胞 TRPV、TRPC 家族表达谱差异 如图 1A 所示,由基因表达谱数据热点图及数据分析可见,脑微血管内皮细胞比肝脏微血管内皮细胞中的 TRPV4、TRPC1 表达水平显著升高,但 TRPC3 表达水平则显著低于肝脏微血管内皮细胞 [(6.691 \pm 0.248) vs (5.454 \pm 0.236)、(6.039 \pm 0.213) vs (5.491 \pm 0.222)、(5.959 \pm 0.298) vs (7.772 \pm 0.143), $t = 8.069$ 、 3.975 、 -12.265 , $P < 0.05$]。各组细胞中,TRPV4 比 TRPV1 表达水平显著升高,而 TRPP2 比 TRPV4 表达水平显著升高 [(6.072 \pm 0.691) vs (4.505 \pm .107)、(8.666 \pm 0.115) vs (6.072 \pm 0.691), $t = 7.089$ 、 -11.713 , $P < 0.05$]。

如图 1B 所示,由基因表达谱数据热点图及数

据分析可见,脑微血管内皮细胞 TRPV4 表达水平显著高于心脏微血管内皮细胞 [(6.691 \pm 0.248) vs (6.067 \pm .185), $t = 4.505$, $P < 0.05$];而脑微血管内皮细胞比心脏微血管内皮细胞中的 TRPP2 [(8.666 \pm 0.115) vs (9.279 \pm 0.151), $t = -7.281$, $P < 0.05$]、TRPC1 [(6.039 \pm 0.213) vs (6.876 \pm 0.403), $t = -4.102$, $P < 0.05$]、TRPC3 [(5.959 \pm 0.298) vs (7.023 \pm 0.735), $t = 3.001$, $P < 0.05$]和 TRPV3 [(4.828 \pm 0.076) vs (5.024 \pm 0.118), $t = -3.124$, $P < 0.05$]表达水平显著降低。各组细胞中,TRPV4 比 TRPV1 表达水平显著升高 [(6.379 \pm 0.388) vs (4.513 \pm 0.102), $t = 14.703$, $P < 0.05$],而 TRPP2 比 TRPV4 表达水平显著升高 [(8.969 \pm 0.350) vs (6.379 \pm 0.388), $t = -15.684$, $P < 0.05$]。

2.2 TRPV4、TRPP2 和 TRPC1 蛋白在脑基底动脉中的表达 为了检测 TRPV4、TRPP2 和 TRPC1 蛋白在小鼠脑基底动脉的表达情况,采用免疫组化实验,结果显示:小鼠脑基底动脉内皮细胞和平滑肌层都有 3 种蛋白的表达,而且在血管内皮细胞层表达更加显著(图 2)。

2.3 TRPV4 在介导脑基底动脉舒张中的作用 在脑血管内皮细胞中,TRPV4 高表达可能与内皮依赖的血管舒缩有密切关系,为了进一步阐明 TRPV4 在脑血管张力中的调节作用,本研究采用血管张力测定,检测 TRPV4 激动剂 GSK 引起的小鼠脑基底动脉舒张。如图 3 所示, 10^{-8} ~ 10^{-4} mol/L GSK 可以浓度依赖地舒张血栓素 A2 类似物 U46619 (10^{-8} mol/L) 引起的血管收缩;若去除血管内皮,GSK 舒张效应显著减弱 ($F = 30.031$, $P < 0.05$)。

3 讨论

TRPV 亚家族有 6 个亚型,其中 TRPV4 通道在血管内皮细胞高表达,参与介导血流剪切力引起的血管舒张^[4]。本研究中首先采用表达谱数据分析并显示,与肝脏和心脏微血管内皮细胞相比,脑微血管内皮细胞 TRPV4 通道显著高表达,因而 TRPV4 通道在脑微血管功能调节中可能有重要作用。由于脑微血管功能研究较难实现,为此本研究以小鼠脑基底动脉为实验研究对象,由于表达谱数据来自于脑微血管内皮细胞,为此本研究采用免疫组化实验也检测了 TRPV4、TRPP2 和 TRPC1 在小鼠基底动脉的表达情况,结果显示三者脑基底动脉内皮和平滑肌层也都显著表达,尤其是在内皮层表达较高。

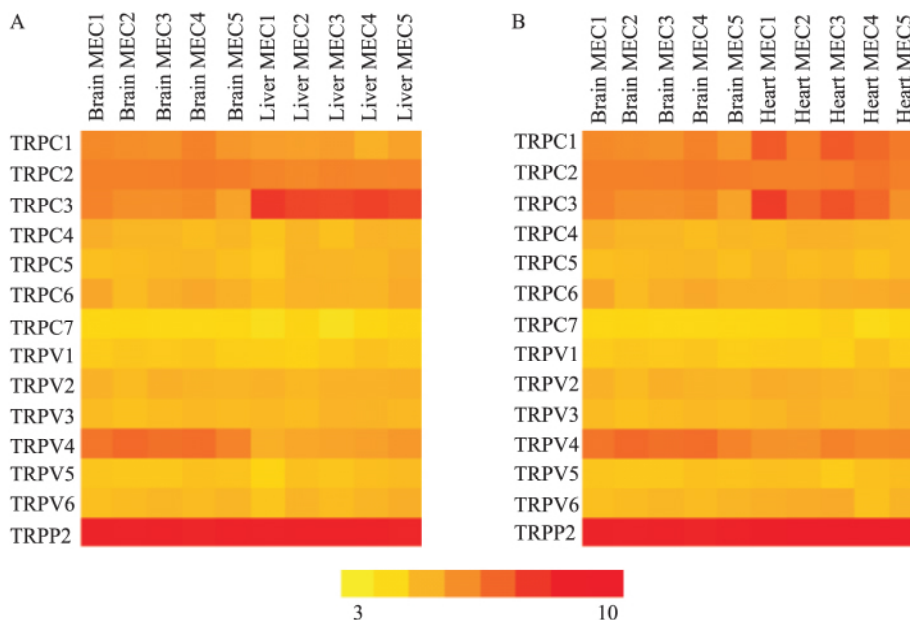


图1 小鼠微血管内皮细胞表达谱差异热点图

A: Brain MEC: 脑微血管内皮细胞, Liver MEC: 肝脏微血管内皮细胞; B: Brain MEC: 脑微血管内皮细胞, Heart MEC: 心脏微血管内皮细胞

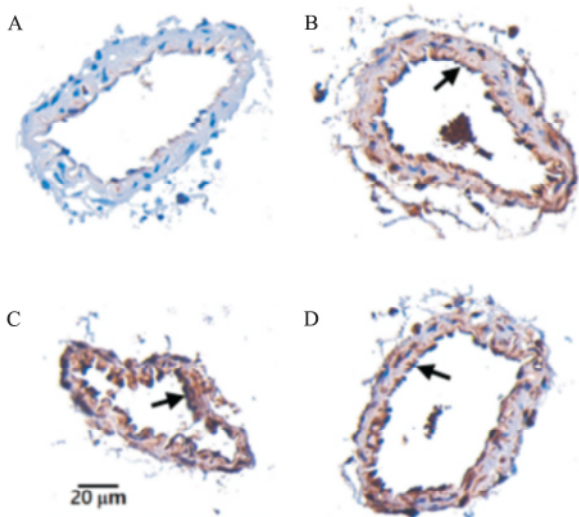


图2 小鼠脑基底动脉免疫组化结果

DAB 显色和苏木精复染 ×100

A: 无一抗对照; B: TRPV4 蛋白; C: TRPP2 蛋白; D: TRPC1 蛋白; 箭头所示为血管内皮细胞

因而, TRPV4、TRPP2 和 TRPC1 在脑血管内皮细胞中广泛表达。在功能研究中,采用张力实验检测 TRPV4 调节脑血管张力的作用,结果显示,TRPV4 通道激动剂 GSK 可舒张由 U46619 引起的小鼠脑基底动脉收缩,而且去除血管内皮后,该舒张效应显著减弱。由此说明,TRPV4 通道显著参与内皮细胞介导的脑动脉舒张。前期研究^[5]也显示,TRPV4 可与 TRPP2 形成复合离子通道,介导血流剪切力引起的

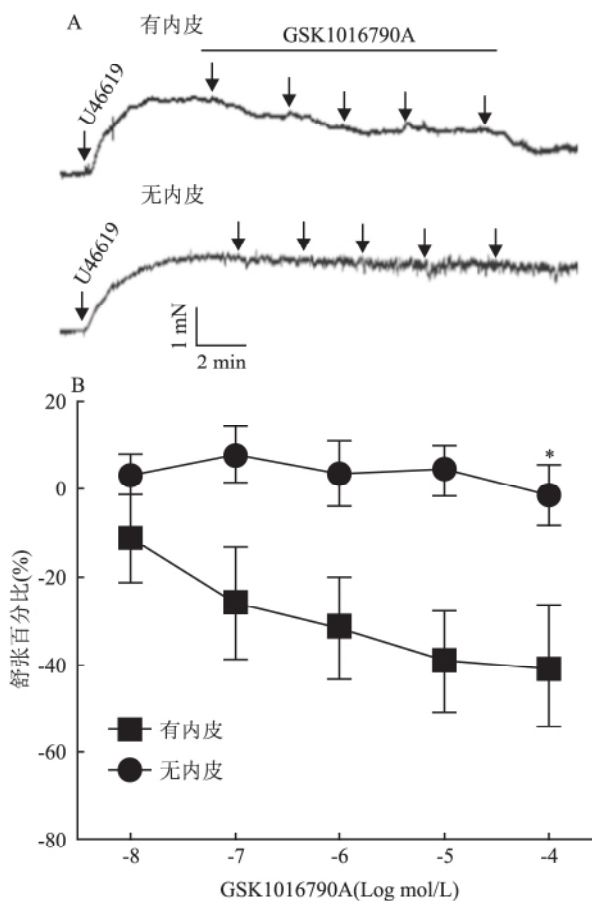


图3 TRPV4 激动剂 GSK1016790 对

U46619 引起的小鼠脑基底动脉收缩效应的影响

A: GSK1016790 引起的血管舒张代表性曲线; B: 统计分析; 与有内皮血管比较: * $P < 0.05$

内皮依赖血管舒张,本研究中的表达谱数据也显示,脑微血管内皮细胞 TRPP2 通道表达水平与肝脏微血管内皮无显著差异,却显著低于心脏微血管内皮,但在各种细胞中,TRPP2 通道表达水平都显著高于 TRPV4,因而 TRPV4-TRPP2 复合通道在脑血管内皮细胞功能调节中可能有重要作用;报道^[5-6]也显示,TRPV4 也可与 TRPC1 形成复合离子通道,介导血流剪切力引起的内皮依赖血管舒张。本研究中的表达谱数据也显示,脑微血管内皮细胞 TRPC1 表达水平在三种组织的微血管内皮细胞中居于中等水平,而且其表达水平与 TRPV4 相近。所以,TRPV4-TRPC1 复合通道在脑血管内皮细胞功能调节中也有一定贡献;TRPV4 也可与 TRPV1 形成复合离子通道,参与缺血/低氧引起的心肌与血管保护^[7-8],本研究中的表达谱数据也显示,TRPV1 在三种组织来源的内皮细胞中表达差异无统计学意义,但表达水平显著低于 TRPV4。因而,TRPV1-TRPV4 复合离子通道在三者细胞中差异无统计学意义,对内皮细胞功能调节作用相对较弱。

TRPC 亚家族有 7 个亚型,其中 TRPC3 通道在血管内皮细胞表达较高,参与介导内质网应激引起的内皮细胞凋亡和动脉粥样硬化形成^[9],本研究中的表达谱数据分析也显示,与肝脏和心脏微血管内皮细胞相比,脑微血管内皮细胞 TRPC3 通道显著低表达。由此推测,TRPC3 在介导脑微血管内皮细胞凋亡中可能相对较弱。

综上所述,在脑、肝脏和心脏微血管内皮细胞中,TRPV4 在脑微血管和脑基底动脉内皮细胞中显

著高表达,可能在调节脑血管内皮功能中具有重要意义。

参考文献

- [1] Tomilin V, Mamenko M, Zaika O, et al. Role of renal TRP channels in physiology and pathology [J]. *Semin Immunopathol*, 2016, 38(3): 371-83.
- [2] Earley S, Brayden J E. Transient receptor potential channels in the vasculature [J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(2): 645-90.
- [3] Coppello G, Collantes M, Sirerol-Piquer M S, et al. Meox2/Tcf15 heterodimers program the heart capillary endothelium for cardiac fatty acid uptake [J]. *Circulation*, 2015, 131(9): 815-26.
- [4] Randhawa P K, Jaggi A S. TRPV4 channels: physiological and pathological role in cardiovascular system [J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110(6): 54.
- [5] Du J, Ma X, Shen B, et al. TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel [J]. *Faseb J*, 2014, 28(11): 4677-85.
- [6] Ma X, Cheng K T, Wong C O, et al. Heteromeric TRPV4-C1 channels contribute to store-operated Ca²⁺ entry in vascular endothelial cells [J]. *Cell Calcium*, 2011, 50(6): 502-9.
- [7] 黄海燕, 张世忠. TRPV1 和 TRPV4 通道参与缺血/氧处理心血管保护的研究进展 [J]. *药学研究*, 2016, 35(1): 37-40.
- [8] Randhawa P K, Jaggi A S. TRPV1 and TRPV4 channels: potential therapeutic targets for ischemic conditioning-induced cardioprotection [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 746: 180-5.
- [9] Ampem P T, Smedlund K, Vazquez G. Pharmacological evidence for a role of the transient receptor potential canonical 3 (TRPC3) channel in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis of human coronary artery endothelial cells [J]. *Vascul Pharmacol*, 2016, 76: 42-52.

Expression profile of TRPV4 in mouse brain vascular endothelial cells and its regulatory effect on vessel tension

Hu Wenxia^{1,2}, Jiang Wan², Ye Li² et al

(¹Dept of Neurology, Lu'an People's Hospital of Anhui Medical University, Lu'an 237005;

²School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To compare the expression difference of transient receptor potential subfamilies including transient receptor potential vanilloid (TRPV) and transient receptor potential canonical (TRPC) channels in mouse microvascular endothelial cells from brain, heart and liver, and find a specific high expression subtypes in brain microvessels endothelial cells, to clarify its regulation function in cerebral vasodilatation. **Methods** The array data for the expression profiling from GEO Databases was analyzed to clarify the expression profiles of all TRPV and TRPC channel subtypes. Then immunohistochemistry was used to identify the expression profile of TRPV4, TRPP2 and TRPC1 in the cerebral basilar artery, and vessel tension measurement was used to investigate the regulatory effect of TRPV4 channel having high expression level on the cerebral basilar artery relaxation. **Results** The results

网络出版时间: 2017-7-29 12:00 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170729.1200.005.html

应用自-异体混编肌腱重建兔前交叉韧带的生物力学分析

谢迎¹, 何俊山², 王亚东², 吴继云², 邓亚开², 陈伟南^{1,2}

摘要 目的 比较应用兔的自-异体混编肌腱与异体肌腱重建前交叉韧带(ACL)的生物力学特性方面的差异。方法

兔40只,随机分成混编组及异体组,每组20只,分4个时间节点(术后3、8、12、24周),每个时间节点样本量为5只。均行右膝关节ACL重建。混编组采用自体肌腱与异体肌腱混合编织后重建ACL,异体组则完全采用异体肌腱编织后重建ACL。分别于术后3、8、12、24周处死每组的5只兔子,取右膝关节能制成标本,行单轴拉力实验并对实验数据进行统计分析。结果 术后3、8、12、24周,标本拉力测试显示,混编组的极限负荷、刚度均高于异体组,混编组拉伸长度均低于异体组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后3、8周标本毁损模式两组均以移植物自骨隧道拔出为主,术后12、24周两组均为移植物实质部断裂。4个时间节点毁损模式 Fisher 确切检验均差异无统计学意义。结论 重建ACL,自-异体混编肌腱的生物力学特性优于异体肌腱。

关键词 前交叉韧带; 自-异体混编肌腱; 异体编织肌腱; 生物力学

中图分类号 R 686.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1437-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.005

生物力学对于人体关节的运动、稳定及退变过程意义重大。膝关节作为人体下肢运动的重要关

节,其稳定及运动基本由韧带控制,其中前交叉韧带(anterior cruciate ligament, ACL)在维持膝关节稳定及运动方面意义重大^[1]。ACL的损伤可导致膝关节生物力学发生变化,引起膝关节的不稳,甚至可导致膝关节骨性关节炎,因此手术重建ACL显得至关重要。目前临床上供选择替代损伤的ACL的移植物类型较多,临床多采用自-异体混编肌腱重建损伤的ACL,许沛荣等^[2]通过临床术后长期随访观察发现自-异体混编肌腱重建ACL临床疗效明确。邓亚开、吴继云等^[3-4]使用兔重建ACL模型发现,自-异体混编肌腱重建ACL有利于促进移植物的组织学愈合过程。然而对于应用自-异体混编肌腱重建ACL后移植物的相关生物力学特性的研究相对较少,因此该研究使用兔建立自-异体混编肌腱与异体肌腱重建ACL模型。观察及比较术后3、8、12、24周两组移植物的生物力学方面指标之间的差异。

1 材料与方法

1.1 动物分组与模型制作 健康成年新西兰兔40只(无锡市血吸虫防治中心提供),2.7~3.3 kg,雌雄各20只。将兔随机分成自-异体混编肌腱组(混编组)及异体肌腱组(异体组),每组20只。40只兔运动正常,膝关节前抽屉检查及Lachman试验均阴性。所有兔行右膝关节ACL重建手术。混编组采用自体趾长伸肌腱与另一只兔的趾长伸肌腱混合编织后行ACL重建术,异体组则完全采用另外一只兔的两侧趾长伸肌腱编织后重建ACL。

2017-04-18 接收

基金项目: 南京军区重大研究专项项目(编号: 12MA011)

作者单位: ¹安徽医科大学无锡临床学院骨科, 无锡 214044

²中国人民解放军第101医院骨科, 无锡 214044

作者简介: 谢迎,男,硕士研究生;

陈伟南,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-

mail: chenweinan@med-mail.com.cn

showed that in three types of endothelial cells from brain, heart and liver, the expression level of TRPV4 channel was highest but the expression level of TRPC3 was lowest in brain microvascular endothelial cells. TRPV4, TRPP2 and TRPC1 were expressed in the endothelial and smooth muscle layers of the cerebral basilar artery as well. GSK1016790A, an agonist of TRPV4, concentration-dependently relaxed the cerebral basilar artery which was pre-constructed by phenylephrine. Additionally, GSK1016790A-induced vessel relaxation was inhibited by HC067047, an antagonist of TRPV4. **Conclusion** Compared with the microvascular endothelial cells from heart and liver, the brain microvascular endothelial cells show significantly high expression in TRPV4 channel. Therefore, TRPV4 may have a critical role in the function of brain microvascular endothelial cells.

Key words transient receptor potential channel; endothelial cell; TRPV4; brain vessel