

## 钙库操纵钙内流和钠钙交换体 在卡巴胆碱引起的气管平滑肌收缩中的作用

闫德俊<sup>1</sup>, 尹 胜<sup>1</sup>, 丁圣刚<sup>2</sup>, 沈 兵<sup>1</sup>, 杜 鹃<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨钙库操纵钙内流(SOCE)和钠钙交换体(NCX)在卡巴胆碱引起的气管平滑肌收缩中的作用。方法 采用小鼠离体气管实验,观察NCX特异性阻断剂KB-R7943、电压依赖型钙通道阻断剂尼非地平、Orai1阻断剂BTP2对卡巴胆碱引起的气管收缩的抑制效应。结果 KB-R7943和BTP2显著阻断了累积浓度卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩和卡巴胆碱引起的SOCE介导的气管收缩,而尼非地平未显著阻断卡巴胆碱引起的气管收缩。结论 NCX和Orai1都参与介导卡巴胆碱引起的气管平滑肌收缩,Orai1主要参与卡巴胆碱引起的起始阶段的瞬时收缩,NCX主要参与后期的持续收缩,而起始阶段的Orai1介导的钙内流可能是激活NCX的前提条件,阻断Orai1的同时也会导致后期NCX引起的收缩阻断,两者共同参与介导卡巴胆碱引起的收缩。

**关键词** 气管平滑肌; 钠钙交换体; 钙库操纵的钙内流; 卡巴胆碱

**中图分类号** Q 412

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2017)08-1137-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.08.009

Ca<sup>2+</sup>作为细胞内重要的第二信使,在很多情况下发挥着重要的作用<sup>[1]</sup>,静息状态下,细胞质中Ca<sup>2+</sup>浓度通常维持在约10<sup>-7</sup> mol/L,细胞受到各种刺激后可引起胞内Ca<sup>2+</sup>浓度升高,诱发Ca<sup>2+</sup>信号介导的一系列生理反应。而钙库操纵钙内流(store-operated calcium entry,SOCE)是介导Ca<sup>2+</sup>内流的一种重要方式,Orai1和基质相互作用蛋白分子1(stomal-interacting molecular 1,STIM1)是SOCE的两个重要组成成分<sup>[2]</sup>。钠钙交换体(sodium calcium exchanger,NCX)是广泛分布于细胞质膜、线粒体膜、内质网、分泌小泡膜等膜性结构上的一种阳离子转运蛋白。NCX可以对胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度进行快速精确的调节,从而影响细胞内信号转导、细胞生长发育等一系列生理活动。

2017-04-01 接收

基金项目:安徽省高校优秀青年人才支持计划

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学基础医学院生理学教研室,合肥 230032

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院儿科,合肥 230022

作者简介:闫德俊,男,硕士研究生;

杜 鹃,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: dujuan@ahmu.edu.cn

## Effect of EGFR gene knockdown on invasion and migration of hepatocellular carcinoma MHCC-97H cell line

Zhang Chuanhai<sup>1</sup>, Gui Yang<sup>1</sup>, Guo Fenglin<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of General Surgery, <sup>2</sup>Dept of Anesthesiology, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate the effect of RNA interference on the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cell by epidermal growth factor receptor gene. **Methods** The expression of EGFR and p-EGFR was detected by Real-time PCR and Western blot. Cell scratch and Transwell were used to detect the invasion and migration of MHCC-97H cells. Lipofectamine 2000 was used to transfect MHCC-97H cells. **Results** EGFR and p-EGFR were significantly decreased in EGFR siRNA group compared with the normal group ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, the invasion and migration of EGFR siRNA group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Interfering with EGFR can reduce the ability of invasion and migration of MHCC-97H cells and reduce the distant metastasis ability of MHCC-97H cells.

**Key words** EGFR; p-EGFR; MHCC97 cells; RNA interference; invasion and migration

气管平滑肌舒缩在调节气道和呼吸功能中发挥重要作用,而 SOCE 和 NCX 在调节气管平滑肌细胞内钙浓度和收缩功能中有重要作用,但详细机制仍未阐明清楚。该研究采用小鼠气管为研究对象,阐明其内在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 本实验选用雄性清洁级 C57 小鼠,6~8 周龄,20~25 g,由安徽医科大学实验动物中心提供,所用小鼠放置于室温 20~25 °C、通风环境饲养,不阻碍其活动,自由饮水、进食。实验中所用的小鼠完全遵循《实验动物质量管理方法》和《中华人民共和国实验动物管理条例》法规。

**1.1.2 药品与试剂** 卡巴胆碱、尼非地平(Nifedipine)均购自美国 Sigma 公司;KB-R7943、BTP2 购自美国 Santa Cruz 公司;克氏液(NaCl 118 mmol/L, KCl 4.7 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mmol/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 25.2 mmol/L 和 glucose 11.1 mmol/L);高钾溶液(NaCl 62.7 mmol/L, KCl 60 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2.5 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mmol/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 25.2 mmol/L 和 glucose 11.1 mmol/L)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 离体气管环的制备** CO<sub>2</sub> 窒息法处死小鼠,然后行颈部正中切口,按照皮肤、皮下黏膜、肌肉组织依次剪开,充分暴露并尽快取出气管,放入预先通入混合气体(95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub>) 的克氏液中。在解剖显微镜下用精密手术剪和手术镊仔细、快速的去除气管周围脂肪组织。然后用钢丝小心的去除气管内皮,沿纵轴快速而准确的将气管剪成长度约 2 mm 的气管环以备用。

**1.2.2 离体气管张力实验** 参照朱金行、张洁等<sup>[3-4]</sup> 实验方法将制备好的气管环小心穿入张力换能器的双层挂钩上,注意不要让钢丝损伤气管,调节换能器位置,拉开气管。然后放置于装有 5 ml 克氏液的恒温玻璃浴槽内,持续通入混合气体(95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub>)。调节张力换能器位置,使小鼠气管环维持在 500 mg 的前负荷,用 BL-420S 生物机能实验系统检测气管环张力。在克氏液中平衡 45~60 min,并且每 15 min 换一次新鲜的克氏液。待气管环平衡稳定后,向浴槽内加入 60 mmol/L 的高钾溶液激动气管,收缩达到最大值后,用克氏液冲洗 3 次,然后进行后续实验。在 SOCE 引起的收缩实验

中,克氏液冲洗完后再用含有 1 μmol/L EGTA 的无钙克氏液洗 3 次,然后用 1 μmol/L 卡巴胆碱和不同类型的阻断剂分别处理 10 min,最后加入 2.5 mmol/L CaCl<sub>2</sub>,记录实验过程中气管环张力的变化。

**1.3 统计学处理** 采用 Sigma Plot 12.5 软件进行统计分析,本实验所得的全部数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间资料采用独立样本 *t* 检验进行比较,认为 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 阻断 NCX 对 SOCE 引起的气管平滑肌收缩的影响** 在无钙缓冲液中加入胆碱受体激动剂卡巴胆碱,清空气管平滑肌肌浆网钙库内的钙离子,可引起气管平滑肌收缩(图 1),稳定 10 min 后,在缓冲液中加入 2.5 mmol/L 的 CaCl<sub>2</sub>,引起外钙内流,这一过程即为 SOCE,内流的钙离子可引起胞质钙离子浓度升高和气管平滑肌收缩,从而使气管环张力增加。NCX 的阻断剂 KB-R7943(10 μmol/L)与卡巴胆碱一同加入后,SOCE 引起的气管环瞬间收缩(46.50 ± 3.10, *t* = 11.58, *P* < 0.05) 和 10 min 后(28.25 ± 6.59, *t* = 17.03, *P* < 0.05) 的持续收缩的幅度均显著下降,收缩形式由持续收缩转变为瞬时性收缩(图 1B、E、F),该结果表明,NCX 在 SOCE 引起的气管平滑肌收缩中发挥重要作用,且主要参与收缩的持续过程。

**2.2 阻断电压依赖的钙通道对 SOCE 引起的气管平滑肌收缩的影响** 与卡巴胆碱同时加入电压依赖的钙通道阻断剂 Nifedipine(10 μmol/L),结果显示, Nifedipine 对 SOCE 引起的气管平滑肌瞬时性和持续性收缩效应均差异无统计学意义(图 1B、E、F)。

**2.3 抑制 Orail 通道对 SOCE 引起的气管平滑肌收缩反应的影响** 与卡巴胆碱同时加入 Orail 通道阻断剂 BTP2(1 μmol/L),可显著抑制 SOCE 引起的气管平滑肌瞬时性(6.07 ± 2.38, *t* = 18.69, *P* < 0.05) 和持续性收缩反应(13.36 ± 4.17, *t* = 11.07, *P* < 0.05)(图 1D、E、F),结果表明,在气管平滑肌中,Orail 也是 SOCE 的主要组成成分。

**2.4 阻断 NCX 和 Orail 对卡巴胆碱引起的气管平滑肌收缩反应的影响** 气管环在平衡稳定后,按浓度梯度依次加入卡巴胆碱,累计加入  $3 \times 10^{-8} \sim 3 \times 10^{-5.5}$  mol/L,气管呈浓度依赖性逐渐增强的收缩,如所示,加入 NCX 的阻断剂 KB-R794(10 μmol/L) 或加入 Orail 通道阻断剂 BTP2(1 μmol/L) 均可显著抑制卡巴胆碱引起的气管平滑肌浓度依赖性收缩

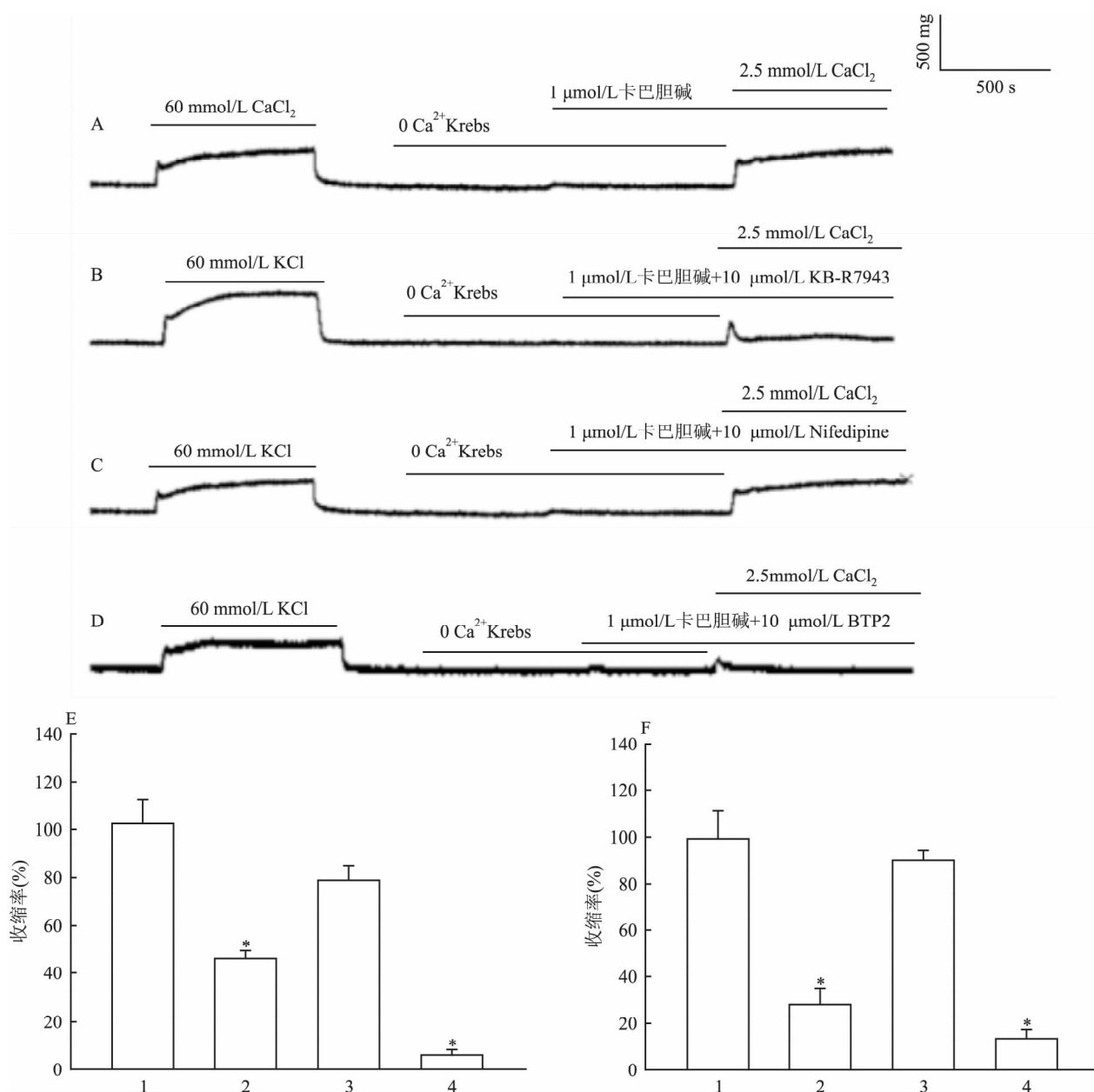


图 1 3 类阻断剂对 SOCE 引起的气管平滑肌收缩效应的影响

A: 卡巴胆碱对照组的原始曲线图; B: 加阻断剂 KB-R7943 实验组原始曲线图; C: 加阻断剂 Nifedipine 实验组原始曲线图; D: 加阻断剂 BTP2 实验组原始曲线图; E: SOCE 引起气管平滑肌开始阶段瞬间收缩反应; F: SOCE 引起的气管平滑肌 10 min 后持续性收缩反应; 1: 卡巴胆碱对照组; 2: 加阻断剂 KB-R7943 实验组; 3: 加阻断剂 Nifedipine 实验组; 4: 加阻断剂 BTP2 实验组; 与卡巴胆碱对照组比较: \* P < 0.05

效应(图 2B、D、E、F)。

### 3 讨论

NCX 作为一种双向转运蛋白广泛分布于各种膜结构中<sup>[5]</sup>。研究者已成功克隆出三大家族、九种不同类型的 NCX: 非 K<sup>+</sup> 依赖性的钠钙交换蛋白 (K<sup>+</sup>-independent sodium calcium exchanger): NCX1、NCX2、NCX3; K<sup>+</sup> 依赖的钠钙交换蛋白 (K<sup>+</sup>-dependent sodium calcium exchanger, NCKX): NCKX1、

NCKX2、NCKX3、NCKX4、NCKX5; 阳离子依赖的钠钙交换蛋白 (calcium cation exchanger, CCX): NCKX6 或 NCLX (Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Li<sup>+</sup> exchanger)<sup>[6]</sup>。NCX 的主要功能是调节细胞内钙浓度,其转运的方式主要依赖膜电位以及细胞膜两侧的 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 浓度差。现阶段许多研究<sup>[7-8]</sup>表明,NCX 是按照 3 Na<sup>+</sup>: 1 Ca<sup>2+</sup> 的比例进行钠钙交换。离子的转运方向主要取决于细胞膜两侧游离的 Na<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 的电度<sup>[9-10]</sup>。NCX 的两种模式中,前向模式是主要的工

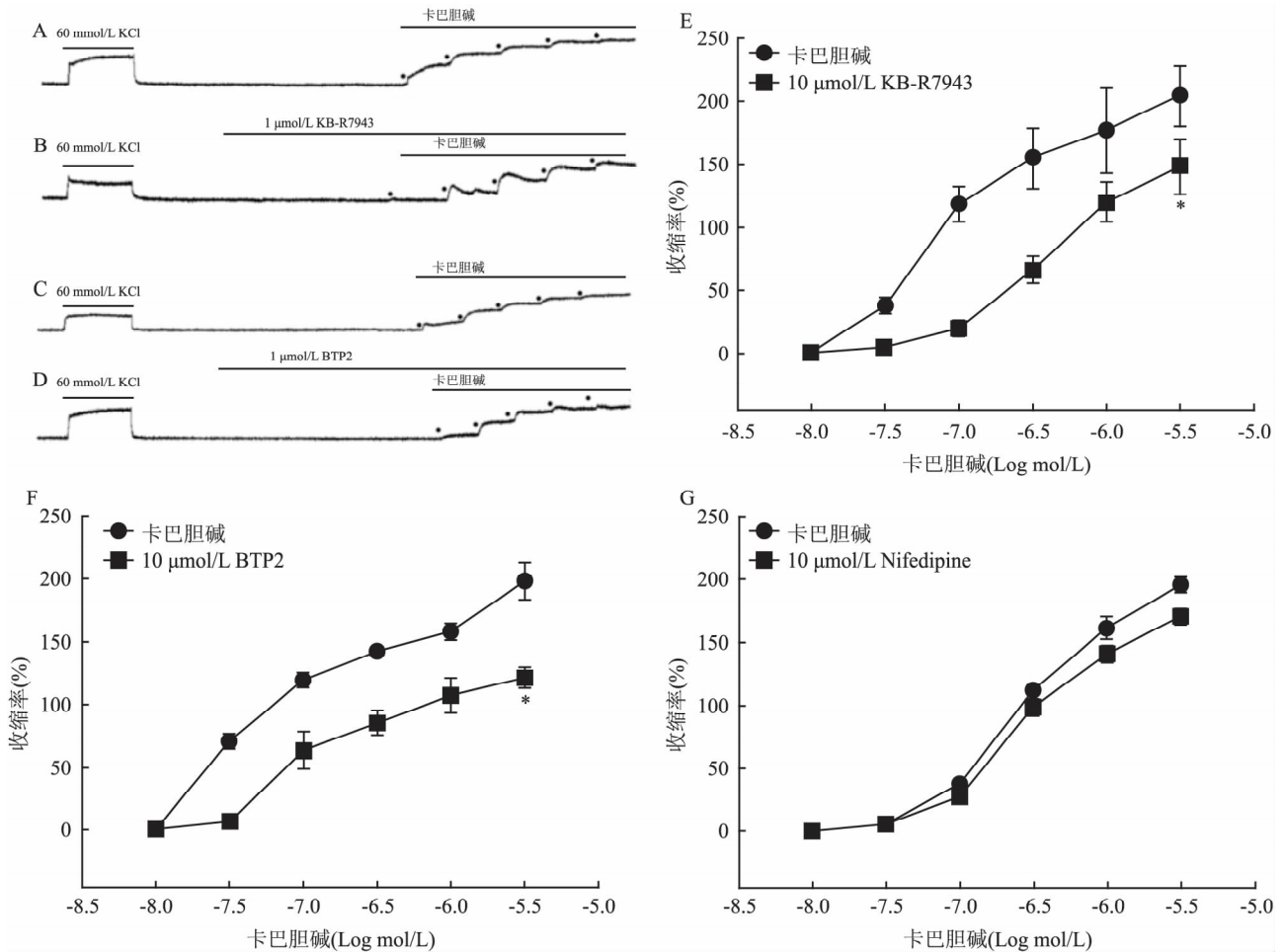


图2 3类阻断剂对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩效应

A: 卡巴胆碱对照组的原始曲线图; B: 加入 NCX 的阻断剂 KB-R7943 原始曲线图; C: 卡巴胆碱对照组的原始曲线图; D: 加入 Orai1 通道的阻断剂 BTP2 原始曲线; E: NCX 的阻断剂 KB-R7943 的实验组; F: Orai1 通道的阻断剂 BTP2 实验组; G: 电压依赖的钙通道阻断剂 Nifedipine 的实验组; 与卡巴胆碱对照组比较: \* P < 0.05

化学梯作模式,其与细胞膜上的钙泵共同将 Ca<sup>2+</sup> 转运到细胞外,维持胞内 Ca<sup>2+</sup> 的稳态。在不同的组织细胞,钙泵的功能主要是在静息状态下维持 Ca<sup>2+</sup> 浓度,但是 NCX 主要功能是调节 Ca<sup>2+</sup> 浓度变化<sup>[11]</sup>。

SOCE 被普遍认为是调节非兴奋性细胞 Ca<sup>2+</sup> 内流的重要方式,Orai1 和 STIM1 蛋白是组成 SOCE 的两种重要蛋白<sup>[12]</sup>。其中,Orai1<sup>[13]</sup> 是定位于质膜上的四次跨膜蛋白,STIM1 作为内质网上的 Ca<sup>2+</sup> 浓度感受器<sup>[14-15]</sup>,大部分位于内质网膜上,当 Ca<sup>2+</sup> 库耗竭时,STIM1 聚集到内质网膜和质膜之间的区域并且数量逐渐增加<sup>[16]</sup>。与此同时,Orai1 在质膜表面聚集并与 STIM1 相互作用激活 Orai1 通道,介导细胞外 Ca<sup>2+</sup> 内流。在本研究中,卡巴胆碱作为人工合成的拟胆碱药物性质稳定,通过激活胆碱受体可增加内质网膜上 IP<sub>3</sub> 的合成,引起钙库内钙释放引起

STIM1 的聚集并最终激活细胞膜上的 Orai1 通道,诱导 SOCE 的发生。

本实验结果表明,NCX 的阻断剂 KB-R7943 和 Orai1 阻断剂 BTP2 均可显著抑制卡巴胆碱引起的气管平滑肌浓度依赖性收缩反应,但电压依赖的钙通道阻断剂 Nifedipine 则没有显著阻断作用,说明主要是 NCX 和 SOCE 参与了卡巴胆碱引起的气管平滑肌收缩。而在探讨 NCX 与 SOCE 的关系中显示,NCX 的阻断剂 KB-R7943 可显著限制 SOCE 引起的瞬时和 10 min 时的持续收缩,且导致 SOCE 引起的气管平滑肌收缩不能维持,使其在瞬时收缩后就迅速出现舒张。由此可见,NCX 在 SOCE 引起的气管平滑肌中的作用主要是维持持续收缩。

综上所述,在气管平滑肌收缩过程中,NCX 和 SOCE 共同调节 Ca<sup>2+</sup> 浓度,影响气管平滑肌的收缩。

## 参考文献

- [1] Soboloff J, Rothberg B S, Madesh M, et al. STIM proteins: dynamic calcium signal transducers [J]. *Nat Rev Mol Cell Bio*, 2012, 13(9): 549–65.
- [2] Vármai P, Hunyady L, Balla T. STIM and Orai: the long-awaited constituents of store-operated calcium entry [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2009, 30(3): 118–28.
- [3] 朱金行, 祝延, 柯道平, 等. Orai1 和 STIM1 在衰老大鼠平滑肌细胞中的变化及对血管收缩的调节作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(2): 122–6.
- [4] 张洁, 沈兵, 桑大成, 等. 14, 15-EET 通过 TRPV4-SKCa 复合物调节气管平滑肌收缩机制研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2015, 50(5): 565–8.
- [5] 宿俊杰, 齐戈尧, 党晓智, 等. 钠钙交换体的生理和病理生理功能研究进展 [J]. *生理学报*, 2014, 66(2): 241–51.
- [6] Lytton J.  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers: three mammalian gene families control  $\text{Ca}^{2+}$  transport [J]. *Biochem J*, 2007, 406(3): 365–82.
- [7] Minelli A, Castaldo P, Gobbi P, et al. Cellular and subcellular localization of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat [J]. *Cell Calcium*, 2007, 41(3): 221–34.
- [8] Reyes R C, Verkhratsky A, Parpura V. Plasmalemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger modulates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytotic release of glutamate from rat cortical astrocytes [J]. *ASN Neuro*, 2012, 4(1): e00075.
- [9] Minelli A, Castaldo P, Gobbi P, et al. Cellular and subcellular localization of  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat [J]. *Cell Calcium*, 2007, 41(3): 221–34.
- [10] Reyes R C, Verkhratsky A, Parpura V. Plasmalemmal  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger modulates  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent exocytotic release of glutamate from rat cortical astrocytes [J]. *ASN Neuro*, 2012, 4(1): e00075.
- [11] Brini M, Carafoli E. The plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase and the plasma membrane sodium calcium exchanger cooperate in the regulation of cell calcium [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(2): a004168.
- [12] Salido G M, Sage S O, Rosado J A. Biochemical and functional properties of the store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels [J]. *Cell Signal*, 2009, 21(4): 457–61.
- [13] Feske S, Gwack Y, Prakriya M, et al. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function [J]. *Nature*, 2006, 441(7090): 179–85.
- [14] Roos J, DiGregorio P J, Yeromin A V, et al. STIM1, an essential and conserved component of store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channel function [J]. *J Cell Biol*, 2005, 169(3): 435–45.
- [15] Wu M M, Buchanan J, Luik R M, et al.  $\text{Ca}^{2+}$  store depletion causes STIM1 to accumulate in ER regions closely associated with the plasma membrane [J]. *J Cell Biol*, 2006, 174(6): 803–13.
- [16] Liou J, Kim M L, Heo W D, et al. STIM is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor essential for  $\text{Ca}^{2+}$ -store-depletion-triggered  $\text{Ca}^{2+}$  influx [J]. *Curr Biol*, 2005, 15(13): 1235–41.

## The role of store-operated calcium entry and sodium calcium exchanger in carbachol-induced tracheal smooth muscle contraction

Yan Dejun<sup>1</sup>, Yin Sheng<sup>1</sup>, Ding Shenggang<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>Dept of Pediatric, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the role of store-operated calcium entry (SOCE) and sodium calcium exchanger (NCX) in the contraction of tracheal smooth muscle induced by carbachol. **Methods** Isolated tracheal rings of mice were used to observe the effect of NCX blocker KB-R7943, voltage-dependent calcium channel blocker nifedipine and Orai1 blocker BTP2 on carbachol-induced tracheal contraction. **Results** KB-R7943 and BTP2 were significantly inhibited the cumulative mouse tracheal contraction induced by carbachol and carbachol-induced SOCE-mediated tracheal contraction, whereas nifedipine did not significantly affect carbachol-induced tracheal contraction. **Conclusion** Both NCX and Orai1 contribute carbachol-induced contraction of tracheal smooth muscle. Orai1 mainly participates in the initial phase of contraction. NCX is mainly involved in the continued contraction of the late phase. Orai1-mediated calcium intracellular flow may be a prerequisite for activation of NCX, blocking Orai1 also led to late NCX-induced contraction blockage and they both are involved in mediating carbo-induced contractility.

**Key words** tracheal smooth muscle; NCX; SOCE; carbachol