

◇ 基础医学研究 ◇

14,15-EET 通过 TRPV4-SK<sub>Ca</sub> 复合物调节气管平滑肌收缩机制研究张洁<sup>1</sup> 沈兵<sup>1</sup> 桑大成<sup>1</sup> 杜鹃<sup>1</sup> 丁圣刚<sup>2</sup>

**摘要** 目的 探讨花生四烯酸细胞色素 P450 (CYP) 表氧化酶代谢产物 14,15-环氧化二十碳三烯酸(14,15-EET) 对小鼠气管平滑肌收缩功能的影响及其机制。方法 采用离体气管实验,通过运用特异性钙激活钾通道阻断剂和瞬时受体电位离子通道 4 (TRPV4) 通道阻断剂,观察 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的影响;采用免疫共沉淀实验检测 TRPV4 通道蛋白与小电导钙激活钾通道(SK<sub>Ca</sub>) 蛋白在小鼠气管平滑肌组织中的相互作用。结果 与对照组相比,300 nmol/L 14,15-EET 预处理小鼠气管后,卡巴胆碱引起的收缩显著减弱;大、中电导钙激活钾通道阻断剂 IbTX 和 TRAM34 没有显著影响 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的抑制效应;而 SK<sub>Ca</sub> 阻断剂 Apamin 和 TRPV4 通道阻断剂 RN-1734 都分别显著阻断了 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的抑制作用。免疫共沉淀结果显示 TRPV4 通道蛋白和 SK<sub>Ca</sub> 通道蛋白可以彼此相互共沉淀。结论 在小鼠气管平滑肌中,14,15-EET 通过 TRPV4-SK<sub>Ca</sub> 钙信号复合物调节气管平滑肌的收缩。

**关键词** 钙激活钾通道;瞬时受体电位离子通道 4;14,15-EET;气管平滑肌

中图分类号 Q 412

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)05-0565-04

支气管哮喘是由多种炎症因子参与的慢性气道炎症,因其患病率和死亡率的逐年上升,已成为严重威胁公众健康的一种主要慢性病。环氧化二十碳三烯酸(epoxyeicosatrienoic acid, EETs) 作为花生四烯酸的衍生物,可以使气管平滑肌舒张并减弱气管平滑肌细胞对 Ca<sup>2+</sup> 的敏感性<sup>[1]</sup>,但其作用靶点还未完全阐明。该研究通过阐明 EETs 同分异构体中 14,15-EET 对激动剂引起的气管平滑肌收缩的作用及其机制,揭示气管平滑肌中瞬时受体电位离子通道 4 (transient receptor potential vanilloid 4, TRPV4) 与小电导钙激活钾通道 (small conductance Ca<sup>2+</sup>-ac-

tivated K<sup>+</sup>-channel, SK<sub>Ca</sub>) 所形成的钙信号复合物在调节气管张力中的作用。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 试剂与仪器** 14,15-EET 购自英国 Abcam Biochemicals 公司;卡巴胆碱、RN-1734、TRAM34、Apamin 等均购自美国 Sigma 公司;TRPV4、SK<sub>Ca</sub> 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;二抗 Goat-Anti-Rabbit IgG 购自合肥志宏生物有限公司;Protein A Magnetic Beads 购自美国 Millipore 公司;克氏液 (NaCl 118 mmol/L、CaCl<sub>2</sub> 2.5 mmol/L、KCl 4.7 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);高钾溶液 (NaCl 58 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)。

**1.1.2 实验动物** 昆明种雄性小鼠,清洁级,6 周龄 20~25 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。正常进食饮水,室温维持(22±1)℃。

## 1.2 方法

**1.2.1 气管环的制备** 用 CO<sub>2</sub> 窒息法处死小鼠,迅速取出喉部以下的主支气管,放入备好的克氏 (K-H) 液并通有混合气体 (95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub>) 保持 pH 在 7.40±0.05。在解剖显微镜下用精密手术剪和手术镊快速、轻柔地去除气管外周结缔组织,用粗糙的金属丝小心去除气管内皮,然后沿纵轴将气管剪成长约 2 mm 气管环。

**1.2.2 离体气管张力实验** 参照朱金行等<sup>[2]</sup> 的实验方法,将分离干净的气管环悬挂于张力换能器上,并置于含有 5 ml K-H 液的浴槽内,通入含 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的混合气体;调节张力换能器,给予气管环 500 mg 前负荷,运用 BL-420S 生物机能实验系统检测气管张力信号,在 K-H 液中平衡 40~60 min,且每隔 15 min 更换一次 K-H 液,待气管张力基线趋于稳定后,加入 60 mmol/L 的高钾溶液激动气管,收缩达峰值后,用 K-H 液洗 3 min × 4 次,反复激动 2

2015-02-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371284)

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:张洁,女,硕士研究生;

沈兵,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: shenbing@anhui.edu.cn

次后分两组,一组为对照组不做任何处理,另一组加入 300 nmol/L 14,15-EET 作为实验组;重复上述相同处理方法后分组,一组加入 300 nmol/L 14,15-EET 作为对照组,另一组加入 IbTX 阻断剂和 300 nmol/L 14,15-EET 预处理 10 min( TRAM34、Apamin、RN-1734 阻断剂方法同 IbTX),然后加入不同浓度的卡巴胆碱,观察量效关系。

**1.2.3 免疫共沉淀** 从小鼠气管组织中提取蛋白进行免疫共沉淀实验。新鲜离体气管去掉脂肪、结缔组织,称重后加入适当体积的裂解液,冰上研磨裂解转入 1.5 ml EP 管中,置于冰上 30~60 min 4℃、3 000 r/min 离心 5 min 后取上清液。两个样品中分别加入抗 TRPV4 的抗体和抗 SK<sub>Ca</sub> 抗体(抗 SK3)进行免疫沉淀,4℃震荡 2 h 后分别加入预处理好的 50 μl Protein A Magnetic Beads 过夜;次日,于冰盒磁力架上吸附后弃上清液。清洗沉淀 3 次后加入 50 μl 5 × 上样缓冲液煮沸,收集上清液后进行 Western blot 实验。

**1.2.4 Western blot 法** 蛋白样品行 SDS-PAGE 电泳后以 0.2 A 恒流转膜,随后用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 4℃孵育一抗过夜。次日,以 PBST 洗膜 5 min × 3 次,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h, PBST 漂洗 5 min × 3 次,显色。

**1.3 统计学处理** 实验所得数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,并运用 Sigma Plot 12.5 软件进行多因素方差分析。

**2 结果**

**2.1 14,15-EET 对小鼠气管张力的影响** 卡巴胆碱可以浓度依赖地引起小鼠气管环收缩(10<sup>-10</sup> ~ 10<sup>-3</sup> mol/L),与对照组相比,300 nmol/L 14,15-EET 预处理使卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩显著减弱(P < 0.05),见图 1。

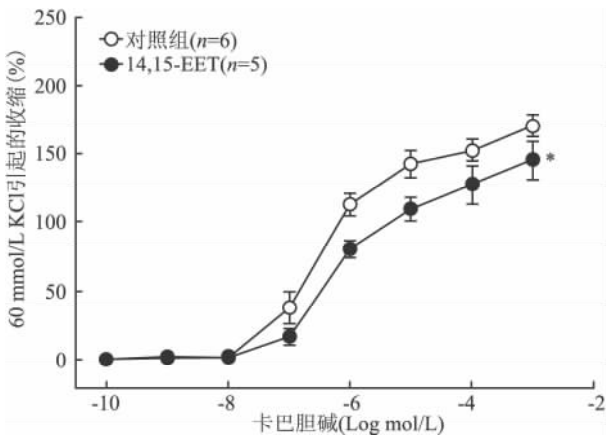


图 1 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的影响  
与对照组比较: \* P < 0.05

**2.2 3 种 Ca<sup>2+</sup> 激活钾通道阻断剂对 14,15-EET 引起的气管舒张的影响** 大、中电导钙激活钾通道阻断剂 50 μmol/L IbTX 和 10 μmol/L TRAM 34 没有显著影响 300 nmol/L 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的抑制效应;而 SK<sub>Ca</sub> 阻断剂 1 μmol/L Apamin 显著阻断了 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的抑制作用(P < 0.05),见图 2。

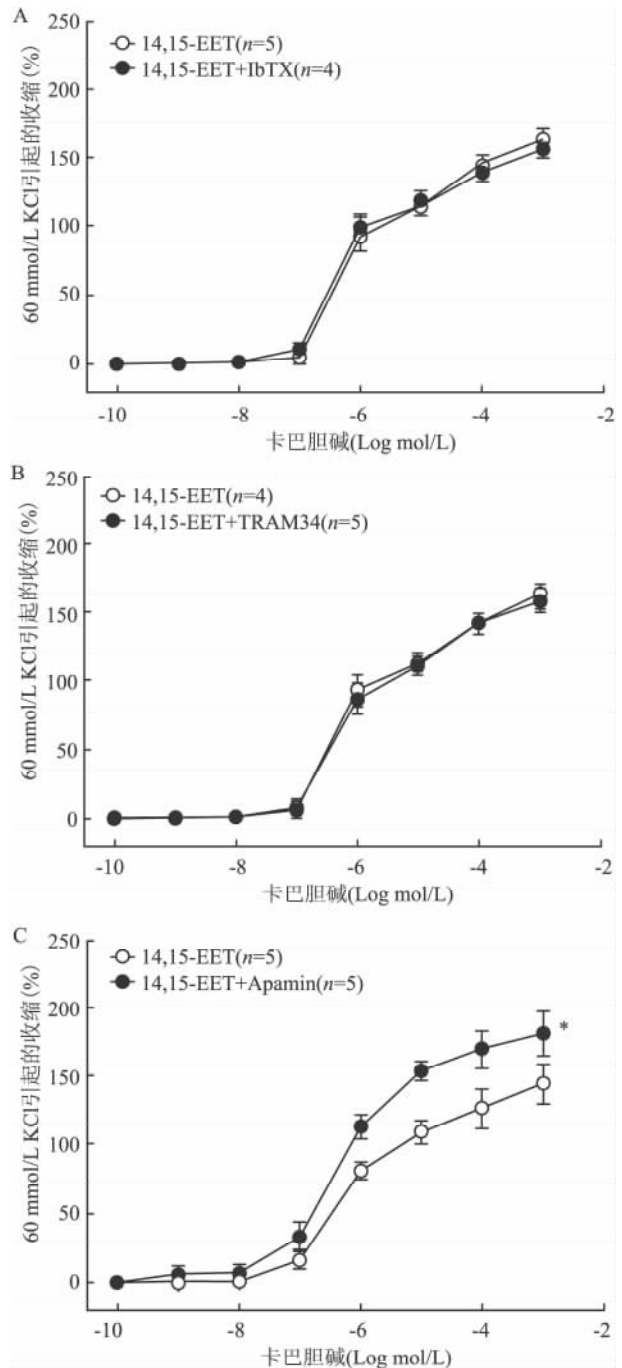


图 2 通道抑制剂对 14,15-EET 抑制卡巴胆碱引起的小鼠气管的收缩效应

A: 大电导钙激活钾通道阻断剂; B: 中电导钙激活钾通道阻断剂; C: SK<sub>Ca</sub> 通道阻断剂; 与 14,15-EET 组比较: \* P < 0.05

**2.3 TRPV4 通道阻断剂对 14,15-EET 引起的气管舒张的影响** TRPV4 通道阻断剂 20  $\mu\text{mol/L}$  RN-1734 + 14,15-EET 处理组与 14,15-EET 组相比,明显减弱了 14,15-EET 对卡巴胆碱引起的小鼠气管收缩的抑制效应( $P < 0.05$ ) ,见图 3。

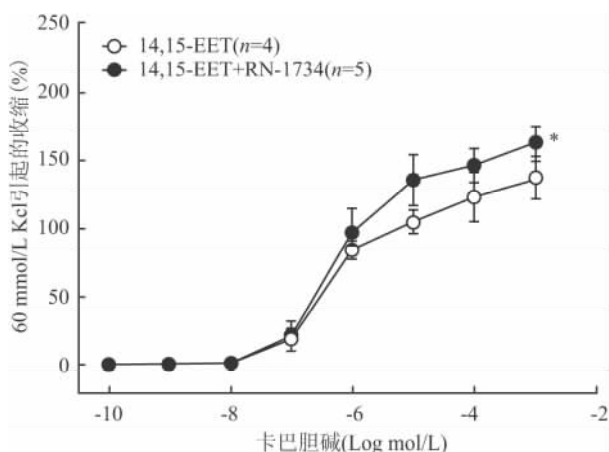


图3 TRPV4 阻断剂 RN-1734 对 14,15-EET 抑制卡巴胆碱引起的小鼠气管的收缩效应  
与 14,15-EET 组比较: \*  $P < 0.05$

**2.4 TRPV4 蛋白和 SK<sub>Ca</sub> 通道相互作用** 将小鼠气管平滑肌组织裂解后,提取蛋白,上样分别为小鼠气管平滑肌裂解液、洗脱液、免疫共沉淀 IP 产物,实验结果显示,TRPV4 蛋白和 SK<sub>Ca</sub> 通道蛋白第三亚型 SK3 可以彼此相互共沉淀。见图 4。

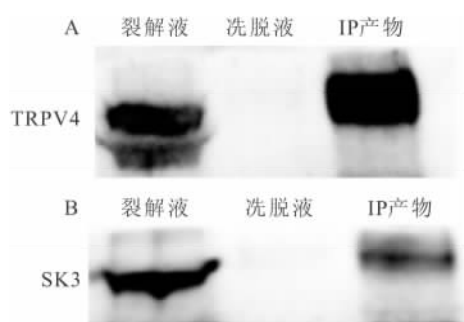


图4 TRPV4 蛋白和第三亚型 SK<sub>Ca</sub> 通道蛋白 (SK3) 存在物理上的相互作用  
A: SK3 沉淀 TRPV4; B: TRPV4 沉淀 SK3

### 3 讨论

钙激活钾通道属于钾通道家族中的一个分支。根据其电导大小可分为大电导钙激活钾通道、中电导钙激活钾通道和 SK<sub>Ca</sub> 通道。SK<sub>Ca</sub> 通道广泛存在于

哺乳动物组织中,如平滑肌、骨骼肌、肾脏及内分泌细胞等<sup>[3]</sup>。TRPV4 通道是瞬时受体电位离子通道家族(transient receptor potential, TRP) 中香草素受体亚家族成员,属于非选择性阳离子通道,对 Ca<sup>2+</sup> 具有一定的通透性,在生物体许多组织、器官中均有表达,可以感受低渗引起的细胞膨胀、机体温度变化以及佛波醇酯衍生物、细胞内外 Ca<sup>2+</sup> 浓度、花生四烯酸等的理化刺激,参与调节体内渗透压、机械刺激、温度、血管张力以及气管平滑肌的收缩,维持机体内环境的稳定,对机体许多生理功能的正常完成有重要作用。

EETs 有多种同分异构体,如 5,6-EET、8,9-EET、11,12-EET 和 14,15-EET<sup>[4]</sup>。目前研究认为 EETs 有舒张血管、调节脏器局部血流和抗炎等多种功能<sup>[5-6]</sup> 还可作为第二信使在某些细胞信号转导过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。有研究<sup>[8]</sup> 显示, EETs 能直接激活内皮细胞中的 TRPV4 通道调节血管平滑肌张力。然而, EETs 引起平滑肌舒张的分子机制尚不十分清楚。在大鼠肠系膜动脉内皮细胞中, TRPV4 和 SK<sub>Ca</sub> 可以形成钙信号复合物,通过 TRPV4 调节 SK<sub>Ca</sub> 开放并引起血管平滑肌细胞超极化,从而引起血管舒张<sup>[9]</sup>。

气管平滑肌的收缩效应在调节呼吸系统疾病中起着重要作用。EETs 作为花生四烯酸的衍生物,在哺乳动物的肺部、心脏和内皮细胞中都有表达<sup>[6,10-11]</sup> 在气管上皮细胞中被称为超极化因子起到舒张气管和抗炎的作用<sup>[6]</sup>。虽然 EETs 相关研究日益受到重视,但其对气管平滑肌功能的作用还未完全阐明。平滑肌的收缩是一个复杂的生理过程,有多种机制参与调节。有研究<sup>[9]</sup> 报道在血管内皮细胞中, TRPV4-SK<sub>Ca</sub> 可形成钙信号复合物调节血管平滑肌的收缩。本研究中的免疫共沉淀实验结果显示, TRPV4 和 SK<sub>Ca</sub> 在气管平滑肌也可以形成钙信号复合物,而且气管张力实验表明,预先加入 14,15-EET 处理后比对照组对卡巴胆碱的收缩反应显著减弱,这是由于 14,15-EET 可以激活细胞膜上 TRPV4 通道,介导 Ca<sup>2+</sup> 内流,导致局部 Ca<sup>2+</sup> 浓度迅速升高,进而激活与其相互作用的 SK<sub>Ca</sub> 通道产生外向钾电流并导致细胞膜超极化,反馈性抑制电压依赖钙通道,使 Ca<sup>2+</sup> 内流减少、细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度降低,抑制气管平滑肌的收缩,最终引起气管舒张。因此,充分认识 EETs 对 TRPV4-SK<sub>Ca</sub> 复合物在气管平滑肌细胞上

的作用机制对呼吸系统疾病的防治具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Morin C, Rousseau E. Effects of 5-oxo-EET and 14,15-EET on reactivity and  $Ca^{2+}$  sensitivity in guinea pig bronchi [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007 82(1-4): 30-41.
- [2] 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.
- [3] Lee R J, Foskett J K.  $Ca^{2+}$  signaling and fluid secretion by secretory cells of the airway epithelium [J]. *Cell Calcium* 2014 55(6): 325-36.
- [4] Roman R J. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function [J]. *Physiol Rev* 2002 82(1): 131-85.
- [5] Quilley J, Fulton D, McGiff J C et al. Hyperpolarizing factors [J]. *Biochem Pharmacol* 1997, 54(10): 1059-70.
- [6] Node K, Huo Y, Ruan X et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids [J]. *Science*, 1999 285(5431): 1276-9.
- [7] Chen J K, Wang D W, Falck J R et al. Transfection of an active cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase indicates that 14,15-epoxyeicosatrienoic acid functions as an intracellular second messenger in response to epidermal growth factor [J]. *J Biol Chem*, 1999 274(8): 4764-9.
- [8] Vriens J, Owsianik G, Fisslthaler B et al. Modulation of the  $Ca^{2+}$  permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium [J]. *Circ Res* 2005 97(9): 908-15.
- [9] Ma X, Du J, Zhang P et al. Functional role of TRPV4-KCa2.3 signaling in vascular endothelial cells in normal and streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Hypertension* 2013 62(1): 134-9.
- [10] Wu S, Moomaw C R, Tomer K B et al. Molecular cloning and expression of CYP2J2, a human cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase highly expressed in heart [J]. *J Biol Chem*, 1996 271(7): 3460-8.
- [11] Morin C, Sirois M, Echeve V, et al. Epoxyeicosatrienoic acid relaxing effects involve  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel activation and CPI-17 dephosphorylation in human bronchi [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2007 36(5): 633-41.

## 14,15-epoxyeicosatrienoic acid regulates airway smooth muscle contraction through TRPV4-SK<sub>Ca</sub> signal complex

Zhang Jie, Shen Bing, Sang Dacheng et al

(Dept of Physiology, College of Basic Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To provide a mechanistic insight into how 14,15-epoxyeicosatrienoic acid (14,15-EET) which is a product of cytochrome P450 epoxygenase regulates mouse airway smooth muscle contraction. **Methods** Isolated mouse tracheal tension was measured *in vitro*. Mouse tracheal rings were treated by  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel blockers or transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channel blocker. The changes of relaxation caused by 14,15-EET in tracheal rings were recorded after the tracheal rings were contracted by carbachol in concentration-dependent fashion. Co-immunoprecipitation was used to examine the physical interaction between TRPV4 and SK<sub>Ca</sub> in airway smooth muscle. **Results** Tracheal tension measurement showed that compared with the control group, carbachol-induced contraction in 300 nmol/L 14,15-EET pretreatment group was significantly reduced. BK<sub>Ca</sub> and IKCa blockers did not affect the effect of 14,15-EET on carbachol-induced tracheal contraction. However, SK<sub>Ca</sub> and TRPV4 blockers notably inhibited the effect of 14,15-EET on carbachol-induced tracheal contraction, respectively. **Conclusion** 14,15-EET regulates airway smooth muscle contraction *via* TRPV4-SK<sub>Ca</sub> signal complex. **Key words**  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channel; transient receptor potential vanilloid 4; 14,15-EET; airway smooth muscle