

## Calcineurin 和 TRPC6 参与 ET-1 诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖

王小闯<sup>1\*</sup>, 李满祥<sup>2,3</sup>, 党晓燕<sup>1</sup>, 李萍<sup>1</sup>, 彭卓<sup>1</sup>, 高彦霞<sup>1</sup>, 古长维<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>西安交通大学医学院第二附属医院急诊医学科,<sup>2</sup>呼吸科,<sup>3</sup>呼吸病研究室,陕西 西安 710004)

**[摘要]** 目的:探讨 Calcineurin 和瞬时感受器电位 6(TRPC6)的相互作用以及对内皮素-1(ET-1)诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖的影响。方法:以 ET-1 刺激肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)检测 Calcineurin 活性以及 TRPC6 的表达;分别于 ET-1 刺激前给予 Calcineurin 特异性抑制剂环孢素 A(CsA)和 TRPC6 siRNA 处理,测定 Calcineurin 活性、TRPC6 的表达以及细胞的增殖情况;采用 Calcineurin 活性检测试剂盒检测其活性,Western blot 和 RT-PCR 检测 TRPC6 的表达,MTT 法检测 PASMCs 的增殖。结果:ET-1 可激活原代培养的 PASMCs 中 Calcineurin 的活性,上调 TRPC6 的表达;CsA 和 TRPC6 siRNA 可以分别降低 TRPC6 表达和 Calcineurin 活性;也可以抑制 ET-1 刺激的 PASMCs 增殖。结论:Calcineurin 与 TRPC6 参与 ET-1 诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖并相互影响。

**[关键词]** Calcineurin/NFAT 信号通路;TRPC6;ET-1;肺动脉平滑肌细胞

**[中图分类号]** R543.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)09-1191-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20130904

## Calcineurin and TRPC6 are involved in ET-1-induced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells

Wang Xiaochuang<sup>1\*</sup>, Li Manxiang<sup>2,3</sup>, Dang Xiaoyan<sup>1</sup>, Li Ping<sup>1</sup>, Peng Zhuo<sup>1</sup>, Gao Yanxia<sup>1</sup>, Gu Changwei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Emergency Medicine, <sup>2</sup>Department of Respiratory Diseases, <sup>3</sup>Respiratory Diseases Research Center, the Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the interaction between Calcineurin and TRPC6, and the impact of this interaction on endothelin-1 (ET-1)-induced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). **Methods:** PASMCs were treated with ET-1 to stimulate their proliferation with or without prior treatment of CsA or TRPC6 siRNA. Calcineurin activity in the cells was measured using a calcineurin activity assay kit, and TRPC6 expression was examined using Western blotting and RT-PCR. PASMCs proliferation following the treatments was determined using MTT assay. **Results:** ET-1 activated Calcineurin activity and upregulated TRPC6 expression. TRPC6 expression was decreased in response to the CsA treatment. Calcineurin activity was attenuated after pretreatment with TRPC6 siRNA; however, ET-1-stimulated PASMCs proliferation was inhibited after pretreatment with both CsA and TRPC6 siRNA. **Conclusion:** Calcineurin and TRPC6 are involved in ET-1-induced proliferation in PASMCs, and the interaction exists between Calcineurin and TRPC6 in PASMCs.

**[Key words]** calcineurin/NFAT signaling pathway; TRPC6; endothelin-1; pulmonary artery smooth muscle cells

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1191-1195]

肺动脉高压,特别是继发于由慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)和肺纤维化所引起的持续高压,是一种普遍的临床症

状。它的典型特征是肺动脉阻力和肺动脉压力都增大,右心室肥大,反复发作会导致右心衰竭甚至死亡<sup>[1]</sup>。肺动脉高压的病理机制主要包括持续的肺血管收缩,慢性血管重建和血栓形成<sup>[2-4]</sup>。其中最为关键的血管重建是由肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)的迁移和增殖导致的血管壁改变所引起<sup>[5-7]</sup>。因此,阐明促使 PASMCs 增殖的分子机制,进而有针对性地抑制细

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(81070045);卫生部部属(管)医院临床学科重点项目(111)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: wxc8128@aliyun.com

胞增殖对于治疗肺动脉高压具有潜在临床作用。

瞬时感受器电位 (transient receptor potential canonical, TRPC)通道是非选择性阳离子通道,在各种细胞与组织中参与受体介导的钙信号。瞬时感受器电位6 (canonical transient receptor potential 6, TRPC6)参与许多病理过程,包括局灶性节段性肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)、心脏肥大以及肺动脉高压。另外有研究发现,钙调磷酸酶/T细胞激活因子(Calcineurin/NFAT)信号通路的激活参与肺动脉高压的病理过程<sup>[8]</sup>。在肾小球足细胞损伤过程中,TRPC6与Calcineurin/NFAT存在一个正反馈调节过程。但在PASMCs中的相互作用还不清楚。多种生物活性介质如内皮素-1(ET-1)、5-羟色胺(5-HT)等均可通过激活Calcineurin/NFAT信号通路介导肺血管重塑,进而参与肺动脉高压的发病。本研究探讨TRPC6与Calcineurin的相互作用以及对ET-1诱导的PASMCs增殖的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

DMEM-F12培养基、胎牛血清(FCS)(GIBCO BRL公司,美国);BCA总蛋白定量试剂盒(Thermo Scientific公司,美国);ECL化学发光试剂盒、RNAsimple Total RNA Kit总RNA提取试剂盒(TIANGEN公司,德国);反转录试剂盒、LA Taq酶和dNTP(TaKaRa公司,大连);抗 $\beta$ -actin、抗TRPC6抗体、MTT和辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔IgG(Santa Cruz公司,美国);Calcineurin抑制剂环孢素A(CsA)、弹性蛋白酶、胶原酶、 $\alpha$ -SMA和ET-1(Sigma公司,美国);DAP(Invitrogen公司,美国);CO<sub>2</sub>细胞培养箱(Binder公司,德国);PCR仪、ECL化学发光仪(Bio-Rad公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 原代大鼠PASMCs的分离与培养

具体参照卢家美等<sup>[9]</sup>的方法。取SD大鼠体质量120~250 g,CO<sub>2</sub>处死。采用无菌条件下取出肺动脉,以1.5 mg/ml胶原酶消化肺动脉20 min,显微镜下去除血管内皮层及外膜,将平滑肌层剪成细小组织块,置于含0.5 mg/ml弹性蛋白酶和1.5 mg/ml胶原酶的溶液中继续消化45 min,离心收集细胞并培养于含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100  $\mu$ g/ml链霉素的DMEM-F12培养基中。以0.05%胰酶消化细胞并传代。所培养的细胞经异硫氰酸荧光素(FITC)标记的 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)和DAPI

染色,证实平滑肌细胞阳性率大于95%。下述所有实验均在第4~8代细胞中进行,干预前均预先给予1%胎牛血清饥饿24 h。以ET-1刺激原代培养的PASMCs诱导其增殖。

#### 1.2.2 实验分组和处理

实验共分为4组。空白对照组、ET-1刺激组、ET-1+CsA刺激组以及ET-1+TRPC6-siRNA刺激组。PASMCs经ET-1刺激48 h后,检测TRPC6的表达及Calcineurin的活性;进一步,细胞预先给予CsA或TRPC6-siRNA转染24 h预处理30 min后,再给予ET-1刺激,48 h后再检测TRPC6的表达、Calcineurin的活性及细胞的增殖程度。

#### 1.2.3 Western blot检测蛋白的表达

提取细胞中的膜蛋白,BCA法测定蛋白浓度。蛋白样品经SDS-PAGE电泳,上样量为30  $\mu$ g,电泳完毕后,电转移至PVDF膜进行如下处理:5%脱脂奶粉4 $^{\circ}$ C封闭过夜,一抗(1:1 000比例稀释)室温孵育2 h,TBST洗涤3次,HRP-IgG(1:2 000比例稀释)室温孵育1.5 h,TBST洗涤3次,ECL发光试剂盒检测蛋白的表达。

#### 1.2.4 Calcineurin活性的检测

采用Calcineurin活性检测试剂盒(Calbiochem公司,美国)检测Calcineurin的活性。以RIPA裂解液破碎培养的PASMCs,4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心10 min,收集上清液获取细胞总蛋白。将上清液过色谱柱以去除游离的磷酸盐。依次加入2 $\times$ 上样缓冲液25  $\mu$ l、Calcineurin底物10  $\mu$ l、细胞提取物5  $\mu$ l,蒸馏水调整至总体积为50  $\mu$ l。室温孵育30 min,加入100  $\mu$ l Malachite Green/Tween溶液并继续孵育30 min。紫外分光光度计下于620 nm处读取吸光度值,根据标准曲线计算待测样品中Calcineurin的活性,以pmol/(min $\cdot$ mg)为单位。

#### 1.2.5 RT-PCR检测TRPC6表达

收集细胞,按试剂盒说明书提取总RNA。反转录合成第一链cDNA,PCR扩增。引物信息如下:TRPC6上游引物5'-CACCGCGGCAGACAGTTC-TTCG-3',下游引物5'-CTTGCTGGAGTTCAGACTG-GCTGGG-3'; $\beta$ -actin上游引物5'-GGTGTGATG-GTGGGTATGGGT-3',下游引物5'-CTGGGTCATC-TTTTCACGGT-3'。按照试剂盒的说明书进行RT-PCR。扩增条件为:预变性94 $^{\circ}$ C 5 min,进入循环,变性94 $^{\circ}$ C 1 min,退火60 $^{\circ}$ C 1 min,延伸72 $^{\circ}$ C 3 min,30个循环后,72 $^{\circ}$ C延伸5 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测。利用Primer5.0软件设计引物。引物

由上海生工生物工程有限公司合成。依据  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算各样本 mRNA 的相对表达量。

### 1.2.6 TRPC6 基因 siRNA 序列的设计及转染

siRNA 片段由上海生工合成。TRPC6-siRNA 序列为: 5'-GACCUAGCAGAACUUAUUA-3' (sense) 和 5'-UAAUAAGUUCUGCUAGGUC-3' (antisense); non silencing siRNA 序列为: 5'-UUCCCCGAACGUGUCACGU-3' (sense) 和 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA-3' (antisense)。实验组加入 TRPC6-siRNA 混合物, 同时设置空白对照组 (control) 和脂质体对照组 (mock)。采用 Lipofectamine™ 2000 将 siRNA 转染细胞, 混匀后于 5% CO<sub>2</sub>、37°C 恒温培养箱中孵育。24 h 后采用 Western blot 检测各组的转染效率。

### 1.2.7 MTT 法测定 PSMCs 增殖

取对数生长期 PSMCs, 消化后计数, 按每孔  $6 \times 10^4$  个接种于 96 孔培养板, 置于 37°C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 48 h。每孔加入 5 mg/ml MTT 20  $\mu$ l, 37°C 孵育 4 h 后, 吸取培养基, 加入 150  $\mu$ l 的 DMSO 以溶

解蓝紫色结晶甲瓚, 置摇床上震荡 20 min, 充分溶解结晶物。混匀后用酶标仪测定 490 nm 处吸光值。并设立不加任何处理的对照组。

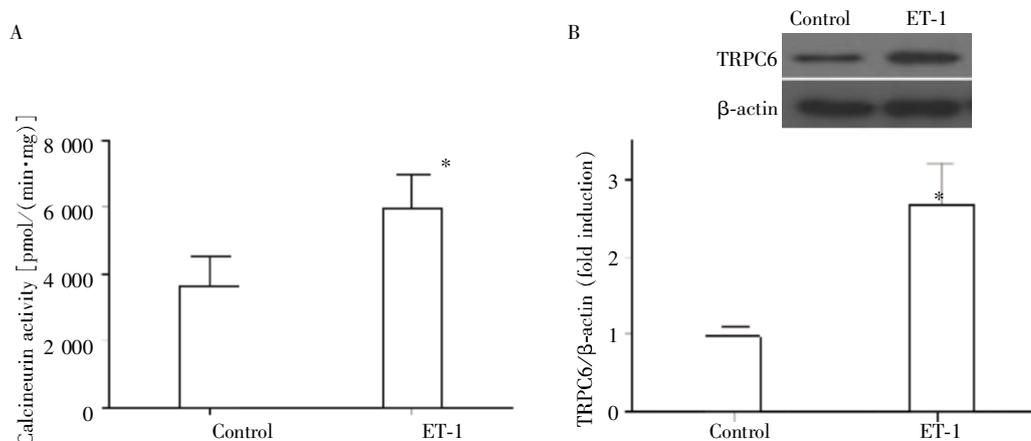
### 1.3 统计学方法

所有数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS11.0 统计软件对数据进行统计学处理, 多组样本间比较用单因素方差分析 (ANOVA), 两组样本间比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  代表差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ET-1 诱导 Calcineurin 活性和 TRPC6 表达增加

Calcineurin 活性和 TRPC6 表达的检测结果显示 ET-1 可明显激活 Calcineurin, 与对照组相比差异显著 (图 1A,  $P < 0.05$ )。同时, TRPC6 的表达也显著增加, 与对照组相比差异显著 (图 1B,  $P < 0.05$ )。提示 ET-1 可以激活 Calcineurin/NFAT 信号通路并上调 TRPC6 的表达。



与对照组相比, \* $P < 0.05$  ( $n=3$ )。

图 1 ET-1 诱导 Calcineurin 活性和 TRPC6 表达的增加

Figure 1 ET-1 induces the increase of Calcineurin activity and TRPC6 expression

### 2.2 CsA 抑制 ET-1 诱发的 TRPC6 表达增高

ET-1 干预前预先给予 Calcineurin 抑制剂 CsA 处理, 发现 CsA 可逆转 ET-1 诱导的 TRPC6 表达增加, 与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ , 图 2)。提示 Calcineurin/NFAT 信号通路参与 TRPC6 表达升高的调控。

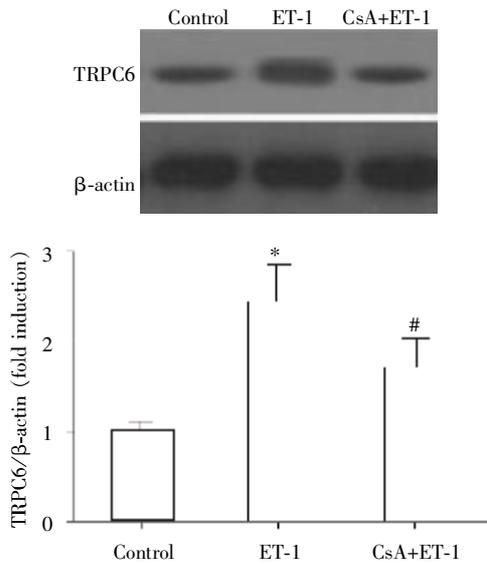
### 2.3 下调 TRPC6 表达使 Calcineurin 活性下降

PSMCs 于 ET-1 干预前预先给予 TRPC6 siRNA 处理, 发现 TRPC6 siRNA 可以逆转 ET-1 诱导的

Calcineurin 活性增加, 与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ , 图 3)。提示 TRPC6 可以反馈调控 Calcineurin/NFAT 信号通路。

### 2.4 CsA 或 TRPC6 siRNA 抑制 ET-1 诱导的细胞增殖

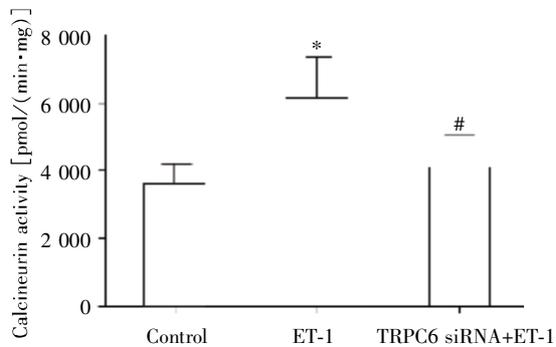
以 ET-1 刺激前预先以 CsA 或 TRPC6 siRNA 处理, 结果表明: ET-1 可以促进细胞增殖。而 CsA 或 TRPC6 siRNA 可明显降低 ET-1 诱导的细胞增殖程度 ( $P < 0.05$ , 图 4)。提示 Calcineurin 和 TRPC6 参与了 ET-1 诱导的 PSMCs 增殖。



与对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 ET-1 处理组相比, # $P < 0.05$  ( $n = 3$ )。

图2 Calcineurin 特异性抑制剂 CsA 抑制 ET-1 引起的 TRPC6 表达的增高

Figure 2 CsA, a selective calcineurin inhibitor, significantly inhibits ET-1-induced the increasing of TRPC6 expression in PSMCs



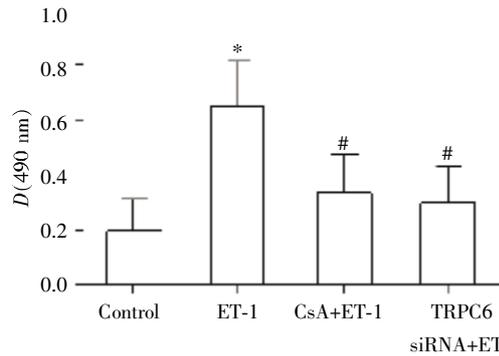
与对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 ET-1 处理组相比, # $P < 0.05$  ( $n = 3$ )。

图3 TRPC6 siRNA 抑制 ET-1 引起的 Calcineurin 活性增加  
Figure 3 TRPC6 siRNA inhibits ET-1-induced the increasing of Calcineurin activity in PSMCs

### 3 讨论

肺动脉平滑肌细胞与 PAH 的发病密切相关,其异常增殖可诱发 PAH<sup>[10]</sup>。二十几年来有关肺动脉高压发病机制方面的研究进展已明显改善了临床患者的生活质量和生存寿命<sup>[11]</sup>。寻求新的抑制平滑肌细胞增殖的治疗靶点,有望从根本上防控肺动脉高压的发生发展。

ET-1 是一种内源性长效缩血管调节因子,并具有较强的促进血管平滑肌有丝分裂的作用,是最主



与对照组相比, \* $P < 0.05$ ; 与 ET-1 处理组相比, # $P < 0.05$  ( $n = 3$ )。

图4 Calcineurin 特异性抑制剂 CsA 或 TRPC6 siRNA 抑制 ET-1 诱导的细胞增殖

Figure 4 Both CsA and TRPC6 siRNA inhibit ET-1-stimulated PSMCs proliferation *in vitro*

要的促进 PSMCs 增殖的因子之一<sup>[12]</sup>。ET-1 可以上调心肌细胞中 TRPC6 的表达, 激活 Calcineurin/NFAT 信号通路<sup>[13]</sup>。本实验证实, 在 PSMCs 中, ET-1 激活了 Calcineurin/NFAT 信号通路并且上调 TRPC6 的表达, 与之前研究相一致。Calcineurin 是一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶, 一种细胞感受器酶, 在将  $Ca^{2+}$  信号转导到细胞内的过程中发挥着重要的作用<sup>[14]</sup>。Calcineurin 的激活将会导致底物的去磷酸化, 包括激活 T 细胞核转移因子(nuclear factor of activated T-cell, NFATC)<sup>[15]</sup>。一旦去磷酸化, NFATC 就会定位到细胞核中, 进而与其他的转录因子相互作用, 促发多种生物学过程相关基因的表达, 如 T 细胞的活化、心肌肥大、骨的重建以及血管生成等<sup>[16]</sup>。TRPC6 是 6 个跨膜阳离子通道瞬时感受器电位家族成员之一, 研究发现, 在心肌母细胞和纤维母细胞中, 它可激活 Calcineurin/NFAT 信号通路<sup>[17-18]</sup>。但是在 PSMCs 中, TRPC6 和 Calcineurin/NFAT 信号通路之间的关系还没有研究清楚。在本试验中, 证实 TRPC6 可以激活 Calcineurin, 并上调 TRPC6 的表达。提示 TRPC6 和 Calcineurin/NFAT 信号通路之间可能存在一个阳性环状反馈调节作用。并且可以通过这种机制促进 PSMCs 的增殖。后续试验中, 将会探讨在 PSMCs 中何种 NFAT 亚型参与 ET-1 刺激的 TRPC6 表达增加, 为临床上治疗肺动脉高压提供新的靶向位点。

### [参考文献]

[1] Li M, Liu Y, Sun X, et al. Sildenafil inhibits calcineurin/NFATc2-mediated cyclin A expression in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Life Sci, 2011, 89 (17-

- 18): 644-649
- [2] Mam V, Tanbe AF, Vitali SH, et al. Impaired vasoconstriction and nitric oxide-mediated relaxation in pulmonary arteries of hypoxia- and monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 332(2): 455-462
- [3] Rosenblum WD. Pulmonary arterial hypertension: pathobiology, diagnosis, treatment, and emerging therapies [J]. *Cardiol Rev*, 2010, 18(2): 58-63
- [4] Oka M, Homma N, Taraseviciene-Stewart L, et al. Rho kinase-mediated vasoconstriction is important in severe occlusive pulmonary arterial hypertension in rats [J]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 923-929
- [5] Firth AL, Yao W, Remillard CV, et al. Upregulation of Oct-4 isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 298(4): L548-557
- [6] Hanze J, Weissmann N, Grimminger F, et al. Cellular and molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor driven vascular remodeling [J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97(5): 774-787
- [7] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms[J]. *Circ Res*, 2006, 99(7): 675-691
- [8] Chan MC, Weisman AS, Kang H, et al. The amiloride derivative phenamil attenuates pulmonary vascular remodeling by activating NFAT and the bone morphogenetic protein signaling pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(3): 517-530
- [9] 卢家美, 王小闯, 谢新明, 等. Calcineurin/NFAT 信号通路上调 5 型磷酸二酯酶的表达及介导内皮素-1 诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖 [J]. *南方医科大学学报*, 2013, 33(1): 26-29
- [10] Wang J, Jiang Q, Wan L, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate inhibits canonical transient receptor potential expression in pulmonary arterial smooth muscle from pulmonary hypertensive rats[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(1): 125-134
- [11] O'Callaghan DS, Humbert M. A critical analysis of survival in pulmonary arterial hypertension [J]. *Eur Respir Rev*, 2012, 21(125): 218-222
- [12] Huh JW, Kim SY, Lee JH, et al. YC-1 attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in mice [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2011, 24(6): 638-646
- [13] Eder P, Molkenin JD. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2011, 108(2): 265-272
- [14] Aramburu J, Rao A, Klee CB. Calcineurin: From structure to function[J]. *Curr Top Cell Regul*, 2001, 36: 237-295
- [15] Rao A. Signaling to gene expression: calcium, calcineurin and NFAT[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(1): 3-5
- [16] Wu H, Peisley A, Graef IA, et al. NFAT signaling and the invention of vertebrates [J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(6): 251-260
- [17] Wu X, Eder P, Chang B, et al. TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(15): 7000-7005
- [18] Onohara N, Nishida M, Inoue R, et al. TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy[J]. *EMBO J*, 2006, 25(22): 5305-5316

[收稿日期] 2013-04-24

本刊现已启用网上稿件管理系统，作者登陆  
<http://jnmunjmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件  
审理情况。