

# 血管平滑肌细胞的容积调节Cl<sup>-</sup>通道生物学特性及功能研究进展

关永源<sup>1,2</sup>

(中山大学 1. 中山医学院药理学教研室, 2. 中山医学院心血管研究群体, 广东 广州 510080)

**作者简介:**关永源,教授,现为《中山大学学报(医学科学版)》主编,曾任第4、5、6届国务院学位委员会药学评议组成员,评为卫生部有突出贡献中青年专家,“百篇优秀博士学位论文”指导老师,广东省有突出贡献中青年专家及广东省教学名师;长期从事Cl<sup>-</sup>通道与心血管疾病关系的研究;获国家“973”和“863”项目、国家自然科学基金重点项目、中加国际合作项目等多个项目资助,研究工作发表在 *Circulation*, *Circulation Research*, *Trends in PharmacolSci*, *Hypertension* 等国际心血管权威杂志,先后获国家教委及教育部自然科学一等奖、二等奖以及中华医学二等奖、广东省自然科学一等奖。E-mail: Guanyy@mail.sysu.edu.cn。



关永源

**摘要:**血管平滑肌细胞容积调节Cl<sup>-</sup>通道(VRCC)通过PI3K/Akt信号通路促进细胞的增殖反应,通过线粒体信号通路保护细胞凋亡,通过JNK/P38/MAPK信号通路促清道夫受体表达和摄取ox-LDL功能增强导致巨噬细胞形成,参与动脉粥样硬化。VRCC通过促进细胞增殖、细胞迁移和外基质积聚,抑制细胞凋亡,参与脑血管重构。VRCC分子基础复杂,至今仍未完全明了。VRCC在不同的细胞和组织是多样性的,而不是一个单一的广泛存在的通道,可由细胞类型和组织特异性亚单位成分组成,在血管平滑肌细胞LRRC8A和ClC-3可能是两个不同的VRCC上的亚单位成分。ClC-3容积调节Cl<sup>-</sup>通道受integrin-Src通路使ClC-3上284位酪氨酸磷酸化以及Rho/RhA-ROCK通路使ClC-3第543位苏氨酸磷酸化两条不同通路调节。

**关键词:**血管平滑肌细胞;容积调节Cl<sup>-</sup>通道;ClC-3;LRRC8A;Bestrophin;脑血管重构;细胞增殖;细胞凋亡

中图分类号:R54

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2017)02-0177-07

## Research Progress on Biological Characteristics and Function of Volume Regulated Cl<sup>-</sup> Channel in Vascular Smooth Muscle Cells

GUAN Yong-Yuan<sup>1,2</sup>

(1. Department of Pharmacology, 2. Cardiovascular Research Program, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** Volume regulated chloride channel (VRCC) enhances cell proliferation through PI3K/Akt signal pathway, and inhibits cell apoptosis through mitochondrial pathway in vascular smooth muscle cells, and accelerates the process of atherosclerosis through JNK/p38 MAPK signal pathway, resulting in increasing SR-A expression and ox-LDL uptake. Cerebrovascular remodeling is mediated by VRCC. This effect of VRCC on remodeling is related to accelerating cell proliferation, migration and accumulation of extracellular matrix. As to the molecular identification of VRCC, it is very complex. VRCC is diversity in various cells or tissues, rather than a single ubiquitous channel, VRCC may be contain varied cell type- or tissue-specific subunit compositions. ClC-3 volume regulated Cl<sup>-</sup> channel is regulated by both integrin-Src and Rho/RhA-Rock signal pathways.

**Key words:** vascular smooth muscle cell; volume regulated chloride channel; ClC-3; LRRC8A; Bestrophin; cerebrovascular remodeling; cell proliferation; apoptosis

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2017, 38(2): 177-183]

收稿日期:2017-01-16

基金项目:国家自然科学基金重点项目(81230082; 81230082)

Cl<sup>-</sup>是细胞内外液的主要阴离子。长期以来人们对Cl<sup>-</sup>的转运未予重视,只把它作为随阳离子跨膜转运的伴侣,认为它只是对细胞膜起稳定作用及调节细胞内pH。直至1990年后,人们才逐渐认识到Cl<sup>-</sup>跨膜转运可能参与许多疾病的发生与发展,并对细胞Cl<sup>-</sup>的调控予以重视。已发现许多疾病,如高血压、癫痫、耳聋、先天性失Cl<sup>-</sup>性腹泻、骨骼石化症、卵黄样黄斑营养不良等,均与Cl<sup>-</sup>转运与失衡相关。目前已知的参与Cl<sup>-</sup>跨膜转运的Cl<sup>-</sup>通道有4种类型:容积调节Cl<sup>-</sup>通道(volume regulated chloride channel, VRCC), Ca<sup>2+</sup>激活Cl<sup>-</sup>通道(Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channels, CaCC),配基门控阴离子通道(ligand gated anion channel)以及cAMP-激活Cl<sup>-</sup>通道(cAMP-activated Cl<sup>-</sup> channel, CFTR)<sup>[1]</sup>。不同的组织及细胞,Cl<sup>-</sup>通道的分布亦有差异。在血管平滑肌细胞上,主要含两种Cl<sup>-</sup>通道:VRCC和CaCC。前者是随细胞容积变化而被激活,后者则是由胞浆Ca<sup>2+</sup>升高而被激活。VRCC参与血管平滑肌细胞增殖、迁移、细胞凋亡、炎症以及血管重构等病理生理过程。本文结合作者的研究工作,就VRCC近年来在血管平滑肌细胞上研究的进展作一综述。

## 1 容积调节Cl<sup>-</sup>通道的分子基础及生物学特性

在许多生理与病理状态下,细胞出现肿胀。在大多数细胞,由于细胞增殖早期出现肿胀。在细胞出现肿胀可通过所谓调节容积减小(regulatory volume decrease, RVD)调节过程,使细胞容量恢复至正常状态。此过程主要是由胞内Cl<sup>-</sup>外溢参与。Cl<sup>-</sup>外溢伴随水排出,从而使容量恢复。Cl<sup>-</sup>的外溢是通过VRCC进行的。VRCC开放,产生一外向整流电流,电导在20~50 pS之间,在血管平滑肌细胞上,其反转电位在(-1.6 ± 2.0)到(-2.3 ± 1.7) mV之间,通道对阴离子通透性的次序为SCN<sup>-</sup> > I<sup>-</sup> ≥ Br<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > HCO<sup>-</sup>。通过对渗透压敏感,低渗使细胞容积改变而激活,在等渗状态下失活。该通道活性受酪氨酸磷酸化调节,被NPPB、DIDS、9-AC、tamoxifen等非特异性Cl<sup>-</sup>通道阻断剂所阻断<sup>[2]</sup>。

长期以来对VRCC的分子基础都存在着争

论。早期曾有学者提出ClC-2、P-糖蛋白及pICln蛋白可能是其分子基础<sup>[3-5]</sup>,但随后的研究工作已作否定。1994年,Kawazaki等<sup>[6]</sup>首次将大鼠肾脏克隆的ClC-3 cDNA表达于爪蟾卵母细胞后记录到一外向整流Cl<sup>-</sup>电流。该通道的离子选择顺序为I<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> = Br<sup>-</sup> > acetate<sup>-</sup> > gluconate<sup>-</sup>,PKC激动剂PDBu和氯通道阻断剂DIDS可抑制该通道电流。1997年Dr. Duan等<sup>[7]</sup>学者首次提出,在心肌细胞ClC-3蛋白是容积调节Cl<sup>-</sup>通道的分子基础。这一观点是基于以下的研究结果:把从豚鼠心肌克隆出来的ClC-3 cDNA转染到NIH/3T3细胞上可产生一个被细胞容积调控基本的活性Cl<sup>-</sup>电导,其电流的特性和心肌细胞自然容积调节的Cl<sup>-</sup>电流( $I_{Cl,vol}$ )特性很相似,如是外向整流,单一电导为40 pS;阴离子的选择次序为I<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > Asp<sup>-</sup>,在正电位失活;细胞外低渗可增加该电流而高渗可抑制。这观点一直受到随后的研究工作挑战,如在HEK293细胞上转染或不转染人的ClC-3 cDNA,其产生的 $I_{Cl,vol}$ 并没有明显差异;过表达ClC-3的HEK293细胞或爪蟾卵细胞,不能产生一外向整流 $I_{Cl,vol}$ <sup>[2,8]</sup>。这些不一致性可能归因于不能把功能性ClC-3蛋白成功地转染;以及很难有效区分基因转染和内源性表达的电流。另外,ClC-3基因敲除鼠上在肝细胞、胰腺细胞及唾液腺细胞上 $I_{Cl,vol}$ 并没有变化<sup>[9-10]</sup>。这些矛盾可能是因为在这些细胞中ClC-3只分布在胞内,不分布胞膜上。尽管如此,ClC-3作为容积调节Cl<sup>-</sup>通道的分子基础,需要得到进一步证实。我们在血管平滑肌上采用斑片钳记录 $I_{Cl,vol}$ 以及荧光影像动态测定Cl<sup>-</sup>跨膜转运的技术,进一步求证ClC-3是否VRCC的有效组分。实验显示,血管平滑肌细胞有内源性ClC-3蛋白表达,用反义寡核苷酸技术或转染ClC-3 siRNA沉默血管平滑肌细胞ClC-3,能抑制细胞外低渗引起的 $I_{Cl,vol}$ ,及Cl<sup>-</sup>外溢导致的胞浆Cl<sup>-</sup>浓度[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>下降;相反,转染ClC-3 cDNA则能明显增强该电流及促进[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>下降。ClC-3引起的电流是Cl<sup>-</sup>电流 $I_{Cl,ClC-3}$ ,其反转电流及对阴离子的选择性(I<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > Asp<sup>-</sup>)与 $I_{Cl,vol}$ 相同,二者同样被PKC激动剂PDBu及蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂genistein抑制,却为蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂sodium orthovanadate增强。ClC-3与细胞外低渗引起的[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>变化及其对酪氨酸磷酸化调节,均与电流

的变化同步。更进一步,把特异性 ClC-3 抗体通过电极导入细胞内则能完全阻断  $I_{Cl,vol}$ 。这些资料有力地证明了在血管平滑肌细胞上 ClC-3 是 VRCC 的一个基本的功能成分<sup>[12]</sup>。

然而,在 2014 年两个不同的实验室同时报道,通过 genome-wide RNA-interference screen 确认,一个来自含有 4 个跨膜区的蛋白家族的 Leucine-Rich Repeat-containing 8A (LRRC8A) 是 VRCC 的基本成分。沉默 LRRC8A 后,可以抑制 VRCC 电流及增大的细胞容积回复正常的时程。点突变 LRRC8A 可使 VRCC 通道特性发生改变,特别是对 I<sup>-</sup> 和 Cl<sup>-</sup> 选择性变化。然而,过表达 LRRC8A 不能增加 VRCC 电流,相反是使 VRCC 电流减弱。虽然作者对此现象认为离子通道亚基的表达并不总是导致通道活性的增加,机理是多种的,例如它可能是在 VRCC 通道激活的上游有一个限制因子所致;另外 LRRC8A 可能只是一个复杂的多聚体通道的亚基,而其他的亚基可能是限制因素<sup>[12-13]</sup>。

1998 年, Petrukhin 等学者<sup>[14]</sup>首先发现一种基因的突变与 2 型卵黄样黄斑变性疾病(VMD2, 也称为 Best 病)的发生有关,这种疾病是青少年时期开始发病的常染色体显性遗传病。1999 年, Caldwell 等<sup>[15]</sup>证明并将该与卵黄样黄斑变性发生相关的基因名为 VMD2, 也称为 Bestrophin 基因。人类基因组中发现四种 Bestrophin 的同源序列,即 Bestrophin1-4, 两两比较发现, Bestrophin 的 N-末端同源性较高,而 C-末端同源性较小。Bestrophin 各亚型的分布具有组织特异性,其中 Bestrophin1 主要分布于视网膜色素上皮细胞<sup>[16]</sup>。早在 2002 年,有学者发现 Bestrophin-1 可产生一 Cl<sup>-</sup> 电流,在视网膜色素上皮细胞(RPE)上发现 Bestrophin 引起一 Cl<sup>-</sup> 电流,对细胞容积变化敏感,高渗可抑制该电流<sup>[17]</sup>。接着进一步发现,果蝇的 Bestrophin-1 Cl<sup>-</sup> 电流是受 Ca<sup>2+</sup> 及细胞容积调节<sup>[18]</sup>。随后发现果蝇的 Bestrophin-1 Cl<sup>-</sup> 电流与哺乳类细胞的 VRCC 不相似<sup>[19]</sup>。通过 genome-wide RNA-interference screen 识别,阴离子敏感的荧光标记技术,发现果蝇 Bestrophin-1 受细胞容积调节,认为它本身是 VRCC 的组分<sup>[20]</sup>。对 Bestrophin-1 Cl<sup>-</sup> 特性研究的相互矛盾结果,导致不认可它是 VRCC 的组成部分,起码不是脊椎动物细胞的 VRCC<sup>[19]</sup>。然而最近在人诱导多能干细胞分化出来的视网膜色素

上皮细胞上(hiPSC-RPE)发现,低渗可引起一外向整流的 Cl<sup>-</sup> 电流,并具有 VRCC 特性,但来自具有 Bestrophin-1 突变的黄斑不良性患者的 hiPSC-RPE 细胞上,低渗刺激不再产生一外向整流的 Cl<sup>-</sup> 电流;相反,在 hiPSC-RPE 细胞上沉默 LRRC8A 并不影响 VRCC 电流<sup>[21]</sup>。

看来真正阐明 VRCC 的分子基础很复杂,还需走一段较长的路。这也说明了不同的细胞和组织的 VRCC 通道是多样性的,而不是一个单一的广泛存在的通道,VRCC 是由细胞类型或组织特异性亚单位成分组成<sup>[21]</sup>。但不管怎样,我们的研究工作起码在血管平滑肌细胞上证明 ClC-3 是构成 VRCC 的一个基本组成成分。

## 2 容积调节 Cl<sup>-</sup> 通道在血管平滑肌细胞的功能作用

### 2.1 参与血管平滑肌细胞的增殖和凋亡反应

细胞增殖早期,细胞容积出现肿胀可激活 VRCC。VRCC 可促进细胞的增殖反应。沉默 ClC3 可抑制内皮素(ET-1)及血管紧张素(Ang II)引起的脑椎底动脉血管平滑肌细胞(BASMC)的增殖反应。ClC3 可通过 PI3K-Akt 信号通路增加细胞周期因子 cyclinE 及 cyclin D1 表达从而促进细胞周期从 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期向 S 期转换,从而增强 BASMC 的细胞增殖反应<sup>[22-25]</sup>。

VRCC 参与细胞凋亡。低渗液可抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 BASMC 的凋亡。这一作用是通过线粒体通路发挥的。沉默 ClC-3 可促进 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的凋亡并使 Bcl-2 表达减少, Bax 表达增加,线粒体膜电位减少去极化从而导致细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆,使 caspase-3 激活,从而促凋亡。过表达 ClC-3 可抑制线粒体通路,减少 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起的 BASMC 凋亡过程中 Bax 表达,增加 Bcl-2 表达,稳定线粒体膜电位,抑制细胞色素 C 释放,从而阻止 caspase-3 活化及 LaminA 下降产生保护作用<sup>[26]</sup>。

### 2.2 促进巨噬细胞泡沫化,参与动脉粥样硬化发生

动脉粥样硬化是一个复杂的过程,涉及修饰脂蛋白之间的相互作用。例如,氧化低密度脂蛋白(ox-LDL),从单核细胞衍生出来的巨噬细胞、内皮细胞及血管平滑肌细胞。通过清道夫受体摄取 ox-LDL 到巨噬细胞,导致动脉粥样硬化早期的

脂肪紊乱特性。摄取胆固醇的巨噬细胞形成泡沫细胞沉积在动脉内层下,是动脉粥样硬化形成的关键环节<sup>[27]</sup>。我们研究发现<sup>[28]</sup>,在巨噬细胞形成泡沫细胞过程中,VRCC活性增加使胞浆 $[Cl^-]_i$ 明显下降;在高脂饮食 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠中,VRCC导致 $[Cl^-]_i$ 下降与巨噬细胞泡沫化呈正相关。VRCC明显促进泡沫化细胞和动脉粥样硬化斑块形成,二者呈良好正相关。

在 CIC-3 基因敲除的高脂饮食 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,整体实验进一步发现,敲除 CIC-3 基因可通过 JNK/P38/MAPK 信号通路抑制清道夫受体表达和对 OX-LDL 摄取,从而阻止巨噬细胞泡沫化,明显减少动脉粥样斑块的形成<sup>[29]</sup>。以上的整体实验和细胞实验均证明,VRCC 使 JNK/P38/MAPK 信号磷酸化被激活,后者促进清道夫受体表达和摄取 OX-LDL 功能增强,促进巨噬细胞泡沫化,参与动脉粥样硬化的形成。

### 2.3 参与脑血管重构

脑血管重构是脑卒中最重要病理变化,是一个脑卒中关键性的危险因素。低渗激活 VRCC 参与脑血管重构。在双肾双夹高血压大鼠脑血管重构过程中,低渗激活 VRCC 活性随脑血管重构发生发展而增强,二者呈良好的正相关,相应的  $Cl^-$  外溢及 CIC3 表达也增多,均与脑血管重构呈良好正相关<sup>[23]</sup>。

进一步的研究工作进一步证明,CIC3 容积调节  $Cl^-$  通道参与脑血管重构过程。DOCA-盐性高血压小鼠引起明显的脑血管重构。这种脑血管重构与血压升高不呈平衡,因为用  $\beta$  受体阻断药心得安降低小鼠血压,但并不影响脑血管重构的发生发展。DOCA-盐引起的脑血管重构表现为脑血管内外腔变窄,血管横切面积增大,脑血管平滑肌细胞坏死、排列出现紊乱,细胞间空隙增大,胶原纤维积聚,细胞外基质沉积,纤连蛋白(fibronectin)及 MMP-2 蛋白合成增加。CIC-3 敲除能明显抑制 DOCA-盐引起的脑血管重构,使血管的超微结构如平滑肌细胞排列、细胞间空隙等明显改善;外基质沉积及纤连蛋白表达及 MMP-2 蛋白合成明显减少。这些作用与 CIC-3 敲除以后降低 TGF- $\beta$ ,使 Smad3 磷酸化受抑制从而导致纤连蛋白合成减少,MMP-2、MT1-MMP、TIMP-1 及 TIMP-2 减少相关。这些结果进一步证明 CIC-3 容积调节性  $Cl^-$  通

道参与脑血管重构<sup>[30]</sup>。

在血管紧张素 II 引起的脑血管重构模型也提供这方面的新依据。Ang II 可产生一外向整流的 VRCC 电流,该电流是 CIC-3 依赖的。因为在 CIC-3 敲除细胞上 Ang II 不再产生  $Cl^-$  电流。Ang II 激活 CIC-3 是通过 Rho/RhA 激酶信号通路进行的。在 CIC-3 蛋白第 532 位苏氨酸是 Rho/RhA 通路上 ROCK2 的磷酸化位点。Ang II 通过激活 Rho/RhA 通路上 ROCK2,后者使 CIC-3 蛋白第 532 位苏氨酸磷酸化而激活 CIC-3;如敲除 ROCK2,Ang II 不再产生  $Cl^-$  电流。Ang II 可引起脑血管重构,在敲除 CIC-3 的 Ang II 血管重构模型中发现,CIC-3 敲除可明显阻止 Ang II 引起的脑血管重构<sup>[31]</sup>。VRCC 引起脑血管重构是通过促进脑血管平滑肌细胞的增殖和迁移,抑制细胞凋亡,促进细胞外基质沉积增多来实现的。

他汀类药物是降脂药,随后发现该类物质具有非降脂的作用,后者是通过 Rho/RhA 信号通路对心血管疾病产生有益的效应。他汀类药物是目前临床上用于脑卒中的二级预防。我们的研究工作证明,辛伐他汀能明显减轻高血压过程中的脑血管重构,其抑制脑血管重构的作用与抑制 CIC-3 在脑血管的表达作用是相平衡的,而且辛伐他汀能浓度依赖地抑制 VRCC 及 CIC-3 通道  $Cl^-$  电流。他汀类药物对脑血管重构的作用是通过 Rho/RhA 信号通路抑制 CIC-3 通道活性而产生的,在 Rho/RhA 通路中,辛伐他汀抑制 Rock2 活性导致 CIC-3 通道失活<sup>[32-33]</sup>。

## 3 调控 CIC-3 容积调节性 $Cl^-$ 通道的信号通路

### 3.1 Integrin-Src 信号通路的调控

由于 PKC 和蛋白酪氨酸磷酸化通路参与调控 VRCC 及 CIC-3 容积调节性  $Cl^-$  通道活性,因此,CIC-3 蛋白的酪氨酸磷酸化是通道开放所必需的。经系统的生物信息学分析 CIC-3 蛋白序列,发现在 CIC-3 蛋白上主要存在 3 个酪氨酸残基位点可能发生磷酸化,分为 N 端 284 位,位于 C 端的 572 和 631 位酪氨酸残基(Y284、Y572 和 Y631)。通过定点突变分析 CIC-3  $Cl^-$  电流,发现只有 Y284 突变后可使 CIC-3 电流及引起  $[Cl^-]_i$  下降的功能

消失。把284位酪氨酸突变成天冬氨酸可模拟磷酸化(Y284D),该突变可使ClC-3在等渗状态仍产生一外向整流Cl<sup>-</sup>电流,电流特性与低渗引起Cl<sup>-</sup>电流相同。另外Y284突变可使ClC-3对凋亡的保护作用消失。这充分说明Y284是ClC-3功能性的酪氨酸。

Src酪氨酸激酶(Src protein tyrosine kinases, Src-PTK)是胞内非受体酪氨酸激酶家族,它包含Src、Yes、Fyn、Yrk、Lck等9个成员。Src在不同组织细胞均有表达。Src主要含C端的激酶区“kinase”和尾部“tail”,中间的蛋白结合区SH2和SH3,以及N端的与细胞膜锚合区“M”和9个成员各特有的序列“Unique Sequences”U区。

研究表明,Src酪氨酸蛋白激酶的活化主要与Src蛋白上两个酪氨酸残基(Y416和Y527)的磷酸化与去磷酸化有关。在非活性状态下,处于磷酸化状态下的Y527与SH2区相互作用,而此时包含去磷酸化状态Y416激酶区与激酶本身的SH3结合,从而阻止了Src酪氨酸蛋白激酶与其底物蛋白的结合。在激活状态下,Y527去磷酸化,解除了对激酶区的限制,此时Y416发生自磷酸化,激酶的SH2、SH3可以发挥底物蛋白相互作用的作用,从而导致Src酪氨酸蛋白激酶相关底物的磷酸化,激活下游一系列信号分子。可见,Y416、Y527的磷酸化与去磷酸化介导的Src酪氨酸蛋白激酶的结构变化参与了激酶活化过程。经系统的生物信息学分析ClC-3蛋白序列后发现,在ClC-3蛋白上主要存在2个酪氨酸残基位点所在基序符合Src蛋白酪氨酸激酶作用位点序列要求,是可能的Src蛋白酪氨酸激酶作用位点,它们分别是位于N端284位酪氨酸残基(Y284)和位于C端的572位酪氨酸残基(Y572)。Src选择性抑制剂SU6656可浓度依赖性抑制ClC-3电流。另外把表达活性形式和表达非活性形式Src激酶质粒转染进细胞后,可分别增强和抑制低渗引起[Cl<sup>-</sup>]<sub>i</sub>下降及Cl<sup>-</sup>电流,说明Src通过对Y284酪氨酸磷酸化参与对ClC-3通道活性的调节<sup>[34]</sup>。

Integrins是一类由α亚基和β亚基形成的跨膜异质二聚体糖蛋白,是细胞黏附分子家族的重要成员,并且可以作为细胞的压力感受器将细胞外机械力的刺激转化为细胞内的信号分子。在哺乳动物中,目前已经鉴定出来的Integrin有18种α亚

基和8种β亚基。Integrin的α、β亚基均具有一个大的胞外N端结构域,通过其折叠内旋的构型改变与特异的配体相结合;其胞内区可与有关的细胞骨架蛋白相连。有研究报道Integrins参与了细胞容积改变的信号转导。Browe等<sup>[35]</sup>的研究发现,在兔的心肌细胞上直接对Integrinβ1施以一个机械牵力能诱导一个氯电流,并且该氯电流的电流特性与VRCC相似,进一步研究发现该电流是通过Integrinβ1/FAK/Src介导的。Dahl等<sup>[36]</sup>的研究发现,在大鼠肝脏中,Integrins作为容积感受器参与调节胰岛素引起的肝细胞肿胀。也有研究报道<sup>[37-41]</sup>,在高血压引起的血管重构及球囊损伤引起的血管重构模型中,Integrin αvβ3通过影响VSMC增殖从而参与血管重构。我们发现,Integrinβ3参与对低渗引起VRCC电流的调节。当沉默脑血管平滑肌细胞Src或ClC-3蛋白表达Integrinβ3对低渗引起Cl<sup>-</sup>电流的调节作用消失。进一步资料证明,Integrinβ3在脑血管重构发展过程中,Integrinβ3蛋白表达增加与脑血管重构的发展程度呈正相关。这些研究结果说明在高血压状态下,血管壁承受压力刺激使Integrinβ3激活从而激活Src,后者通过ClC-3上Y284酪氨酸磷酸化从而使VRCC激活参与脑血管重构<sup>[42]</sup>。

### 3.2 Rho/RhA 信号通路的调控

在双肾双夹高血压大鼠的脑基底动脉中,GTP-RhoA即活性的RhoA随血压升高而增加,而总的RhoA保持不变,RhoA的下游ROCK2的表达也随着血压的升高而增加,并且RhoA的活性及ROCK2的表达与大鼠的血压及脑血管的重构呈正相关。这说明在双肾双夹高血压大鼠的脑基底动脉中,随着血压的升高,RhoA/Rho激酶通路被激活从而导致了脑血管的重构。血管紧张素II引起Cl<sup>-</sup>电流及血管平滑肌细胞增殖、迁移及脑血管重构均通过激活Rho/RhA通路中的ROCK,后者磷酸化ClC-3通道532位苏氨酸,激活ClC-3通道而产生的<sup>[31-32]</sup>。

这样,对ClC-3容积调节性Cl<sup>-</sup>通道的调节,存在Integrin-Src-ClC-3及Rho-ROCK2-ClC-3通道两个不同的调节信号通路。

### 参考文献:

- [1] Duran C, Thompson CH, Xiao Q, et al. Chloride Chan-

- nels: Often Enigmatic, Rarely Predictable [J]. *Annu Rev Physiol*, 2010, 72:95-121.
- [2] Nilius B, Droogmans G. Amazing chloride channels: an overview [J]. *Acta Physiol Scand*, 2003, 177(2): 119-147.
- [3] Grunder S, Thiemann A, Pusch M, et al. Region involved in the opening of ClC-2 chloride channel by voltage and cell volume [J]. *Nature*, 1992, 360(6406): 759-762.
- [4] Valverde MA, Diaz M, Sepulveda FV, et al. Volume-regulated chloride channels associated with the human multidrug-resistance P-glycoprotein [J]. *Nature*, 1992, 355(6363): 830-833.
- [5] Krapivinsky GB, Ackerman MJ, Gordon EA, et al. Molecular characterization of a swelling-induced chloride conductance regulatory protein, pICln [J]. *Cell*, 1994, 76(3): 439-448.
- [6] Kawasaki M, Uchida S, Monkawa T, et al. Cloning and expression of a protein C-regulated chloride channel abundantly expressed in rat brain neuronal cells [J]. *Neuron*, 1994, 12(3): 597-604.
- [7] Duan D, Winter C, Cowley S, et al. Molecular identification of a volume-regulated chloride channel [J]. *Nature*, 1997, 390(6658): 417-421.
- [8] Sardini A, Amey J S, Weylandt K H, et al. Cell volume regulation and swelling-activated chloride channels [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1618(2): 153-162.
- [9] Stobrawa SM, Breiderhoff T, Takamori S, et al. Disruption of ClC-3, a chloride channel expressed on synaptic vesicles, leads to a loss of the hippocampus [J]. *Neuron*, 2001, 29(1): 185-196.
- [10] Arreola J, Begenisich T, Nehrke K, et al. Secretion and cell volume regulation by salivary acinar cells from mice lacking expression of the Clcn3 Cl<sup>-</sup> channel gene [J]. *J Physiol*, 2002, 545(Pt 1): 207-216.
- [11] Zhou JG, Ren JL, Qiu QY, et al. Regulation of intracellular Cl<sup>-</sup> concentration through volume-regulated ClC-3 chloride channels in A10 vascular smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(8): 7301-7308.
- [12] Voss FK, Ullrich F, Münch J, et al. Identification of LRRC8 heteromers as an essential component of the volume-regulated anion channel VRAC [J]. *Science*, 2014, 344(6184): 634-638.
- [13] Qiu Z, Dubin AE, Mathur J, et al. SWELL1, a plasma membrane protein, is an essential component of volume-regulated anion channel [J]. *Cell*, 2014, 157(2): 447-458.
- [14] Petrukhin K, Koisti MJ, Bakall B, et al. Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy [J]. *Nat Genet*, 1998, 19(3): 241-247.
- [15] Caldwell GM, Kakuk LE, Griesinger IB, et al. Bestrophin gene mutations in patients with Best vitelliform macular dystrophy [J]. *Genomics*, 1999, 58(1): 98-101.
- [16] Tsunenari T, Sun H, Williams J, et al. Structure-function analysis of the bestrophin family of anion channels [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(42): 41114-41125.
- [17] Fischmeister R, Hartzell HC. Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels [J]. *J Physiol*, 2005, 562(Pt 2): 477-491.
- [18] Chien LT, Hartzell HC. Drosophila bestrophin-1 chloride current is dually regulated by calcium and cell volume [J]. *J Gen Physiol*, 2007, 130(5): 513-524.
- [19] Chien LT, Hartzell HC. Rescue of volume-regulated anioncurrent by bestrophin mutants with altered charge selectivity [J]. *J Gen Physiol*, 2008, 132(5): 537-546.
- [20] Stotz SC, Clapham DE. Anion-sensitive fluorophore identifies the Drosophila swell-activated chloride channel in a genome-wide RNA interference screen [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(10): e46865.
- [21] Milenkovic A, Brandl C, Milenkovic VM, et al. Bestrophin 1 is indispensable for volume regulation in human retinal pigment epithelium cells [J]. *PNAS*, 2015, 112(20): E2630-2639.
- [22] Wang GL, Wang XR, Lin MJ, et al. Deficiency in ClC-3 chloride channels prevents rat aortic smooth muscle cell proliferation [J]. *Circ Res*, 2002, 91(10): E28-32.
- [23] Shi XL, Wang GL, Zhang Z, et al. Alteration of volume-regulated chloride movement in rat cerebrovascular smooth muscle cells during hypertension [J]. *Hypertension*, 2007, 49(6): 1371-1377.
- [24] Tang YB, Liu YJ, Zhou JG, et al. Silence of ClC-3 Chloride Channel inhibits cell proliferation and cell cycle via G1/S Phase Arrest in Rat Basilar Arterial Smooth Muscle Cells [J]. *Cell Prolif*, 2008, 41(5): 775-785.
- [25] Guan YY, Wang GL, Zhou JG. Roles of ClC-3 Cl channel in cell volume regulation, proliferation and apoptosis in vascular smooth muscle cells [J]. *Trends in Pharmacol Sci*, 2006, 27(6): 290-295.
- [26] Qian Y, Du YH, Tang YB, et al. ClC-3 Chloride Channel Prevents Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide in Basilar Artery Smooth Muscle Cells through Mitochon-

- drial Dependent Pathway [J]. *Apoptosis*, 2011, 16(5): 468-477.
- [27] Webb NR, Moore KJ. Macrophage-derived foam cells in atherosclerosis: lessons from murine models and implications for therapy [J]. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(12): 1249-1263.
- [28] Hong L, Xie ZZ, Du YH, et al. Alteration of volume-regulated chloride channel during macrophage-derived foam cell formation in atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2011, 216(1): 59-66.
- [29] Tao J, Li CZ, Yang J, et al. ClC-3 deficiency prevents atherosclerotic lesion development in ApoE<sup>-/-</sup> mice [J]. *J Mol Cellular Cardiol*, 2015, 87: 237-247.
- [30] Zheng LY, Li L, Ma MM, et al. Deficiency of volume-regulated ClC-3 chloride channel attenuates cerebrovascular remodeling in DOCA-salt hypertension [J]. *Cardiovas Res*, 2013, 100(1): 134-142.
- [31] Ma MM, Lin CX, Liu CZ, et al. Threonine532 phosphorylation in ClC-3 channels is required for angiotensin II-induced Cl current and migration in cultured vascular smooth muscle cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(3): 529-544.
- [32] Ma MM, Li SY, Wang M, et al. Simvastatin Attenuated Cerebrovascular Cell Proliferation in the Development of Hypertension Through Rho/Rho-kinase Pathway [J]. *J Cardiovas Pharmacol*, 2012, 59(6): 576-582.
- [33] Liu YJ, Wang XG, Tang YB, et al. Simvastatin ameliorates rat cerebrovascular remodeling during hypertension via inhibition of volume-regulated chloride channel [J]. *Hypertension*, 2010, 56(3): 445-452.
- [34] Wang XG, Tao J, Ma MM, et al. Tyrosine 284 phosphorylation is required for ClC-3 chloride channel activation in vascular smooth muscle cells [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 98(3): 469-478.
- [35] Browe DM, Baumgarten CM. Stretch of  $\beta 1$  integrin activates an outwardly rectifying chloride current via FAK and Src in rabbit ventricular myocytes [J]. *J Gen Physiol*, 2003, 122(6): 689-702.
- [36] Dahl S, Schliess F, Reissmann R G B, et al. Involvement of integrins in osmosensing and signaling toward autophagic proteolysis in rat liver [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(29): 27088-27095.
- [37] Mawatari K, Liu B, Craig Kent K. Activation of integrin receptors is required for growth factor-induced smooth muscle cell dysfunction [J]. *J Vasc Surg*, 2000, 31(2): 375-381.
- [38] Nguyen Dinh Cat A, Touyz RM. Cell signaling of angiotensin II on vascular tone: novel mechanisms [J]. *Curr Hypert Reports*, 2011, 13(2): 122-128.
- [39] Han M, Wen J, Zheng B, et al. Blockade of Integrin  $\beta 3$ -FAK signaling pathway activated by osteopontin inhibits neointimal formation after balloon injury [J]. *Cardiovasc Pathol*, 2007, 16(5): 283-290.
- [40] Panchatcharam M, Miriyala S, Yang F, et al. Enhanced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in response to vascular injury under hyperglycemic conditions is controlled by  $\beta 3$  integrin signaling [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010, 42(6): 965-974.
- [41] Sadeghi MM, Krassilnikova S, Zhang J, et al. Detection of injury-induced vascular remodeling by targeting activated  $\alpha v \beta 3$  integrin in vivo [J]. *Circulation*, 2004, 110(1): 84-90.
- [42] Zeng JW, Wang XG, Ma MM, et al. Integrin  $\beta 3$  mediates cerebrovascular remodelling through Src/ClC-3 volume-regulated Cl<sup>-</sup> channel signalling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(13): 3158-3170.

(编辑 刘清海)