

PKC及蛋白酪氨酸磷酸化信号通路对血管平滑肌细胞表型转化过程中容积调节性氯通道的作用

张 敏, 吕晓飞, 刘 婕, 关永源, 杜艳华*
(中山大学中山医学院心脑血管研究中心, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】比较蛋白激酶 C (PKC)及蛋白酪氨酸磷酸化信号通路对大鼠股动脉平滑肌细胞(femoral artery smooth muscle cells, FASMC)和股静脉平滑肌细胞(FVSMC)上容积调节性氯通道的调节作用的差异,同时观察这一调节作用在动脉平滑肌细胞表型转化过程中的变化。【方法】分别选取 FASMC 和 FVSMC 的原代,四代和八代作为观察血管平滑肌细胞表型转化的模型。采用全细胞膜片钳技术记录血管平滑肌细胞表型转化过程中容积调节性氯通道(VRCC)的变化以及蛋白酪氨酸激酶(PTK)抑制剂 genistein、蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)抑制剂 sodium orthovanadate 和蛋白激酶 C 激动剂 PDBu 对这一变化的调节作用。【结果】低渗溶液在动脉和静脉平滑肌细胞均可激活 VRCC,且动脉平滑肌细胞的 VRCC 活性大于静脉平滑肌细胞。PTK 抑制剂 genistein 对原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 和 FVSMC 的 VRCC 活性均具有明显抑制作用且随着培养代数增加而逐渐增强;PTP 抑制剂 sodium orthovanadate 对原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 和 FVSMC 的 VRCC 活性均具有增强作用但逐渐减弱;PKC 激动剂 PDBu 对原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 和 FVSMC 的 VRCC 活性均具有抑制作用且逐渐增强。与同代的 FASMC 相比,genistein,sodium orthovanadate 和 PDBu 对 FVSMC 的 VRCC 活性的调节作用更强。【结论】蛋白酪氨酸激酶、酪氨酸磷酸酶和蛋白激酶 C 对股静脉平滑肌细胞 VRCC 的调节作用强于股动脉平滑肌细胞。且随着血管平滑肌细胞由收缩型向合成型转化,VRCC 的活性及酪氨酸蛋白的磷酸化调节作用均有逐渐增强的趋势,而蛋白激酶 C 对 VRCC 的抑制作用增强。

关键词:容积调节性氯通道(VRCC);动脉和静脉;表型转化;血管平滑肌细胞

中图分类号:R543

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2013)03-0387-10

Regulation of PKC and Protein Tyrosine Phosphorylation on VRCC During the Phenotype Modulation of Femoral Artery and Vein Smooth Muscle cells

ZHANG Min, LÜ Xiao-fei, LIU Jie, GUAN Yong-yuan, DU Yan-hua*

(Cardiac & Cerebrovascular Research Center, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To compare the differences between the effects of protein kinase C (PKC) and protein tyrosine phosphorylation on volume-regulated chloride channel (VRCC) during the phenotype modulation of smooth muscle cells in artery and vein. 【Methods】We used the whole cell patch clamp to evaluate swelling induced Cl^- currents ($I_{Cl, vol}$) in primary, IV and VIII passage rat femoral artery (FASMC) and vein smooth muscle cells (FVSMC); and the regulative the effects of protein tyrosine kinase (PTK) inhibitor genistein, protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibitor sodium orthovanadate, and PKC activator PDBu on VRCC activity in these cells were examined. 【Results】Hypotonic solution induced larger $I_{Cl, vol}$ in FASMC than in FVSMC. PTK inhibitor genistein and PKC activator PDBu inhibited VRCC activity in both FASMC and FVSMC, and this inhibitory effect was gradually enhanced in the cells from primary to passage VIII. Whereas PTP inhibitor sodium orthovanadate increased VRCC activity in both FASMC and FVSMC,

收稿日期:2012-12-17

基金项目:国家自然科学基金(81230082;81173055;30900578);广州市科技计划项目(2011J2200077).

作者简介:张敏,硕士研究生,E-mail:zmzzu@163.com; *通信作者:杜艳华,副教授,硕士生导师,E-mail:duyanhua@mail.sysu.edu.cn

and this increase was gradually decreased as cell passages increased. Moreover, at the same cell passage, the regulatory effects of genistein, PDBu, and sodium orthovanadate on VRCC activity were more prominent in FVSMC than in FASMC. 【Conclusion】 PTK, PTP, and PKC could regulate VRCC activity, which were more prominent in FVSMC than in FASMC. Moreover, VRCC activity and the regulatory effects of PKC and protein tyrosine phosphorylation on VRCC were gradually increased as vascular cells switch from contractile to proliferative phenotypes.

Key words: volume-regulated chloride channel (VRCC); artery and vein; phenotypic modulation; vascular smooth muscle cells

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci),2013,34(3):387-396]

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型转化(phenotypic modulation)是高血压、动脉粥样硬化和血管成型术后再狭窄等心血管病 VSMC 增殖和迁移的关键性起始步骤,是这类疾病的共同的发病基础,主要表现为 VSMC 从收缩型转变为合成型,并获得增殖、迁移和合成、分泌大量细胞外基质的能力。细胞外基质的变化又可直接或间接影响 VSMC 的增殖、黏附及迁移等过程^[1]。因此,研究 VSMC 表型调节的分子机制,对上述疾病的防治具有重要意义。迄今为止,VSMC 表型转换和调节因素与细胞信号转导之间的确切关系尚未完全明了。我们实验室前期的工作中发现股动脉和股静脉平滑肌细胞在从收缩型转变为合成型的过程中 ClC-3 蛋白表达量均明显增加,并伴随着细胞容积调节性氯电流的增加,且动脉容积调节性氯通道(volume-regulated chloride channel, VRCC)的活性高于静脉^[2],证明容积调节性 Cl⁻ 通道参与了 VSMC 表型转换。但是其调节机制并不清楚。我们在 A10 血管平滑肌细胞的研究发现^[3],蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)抑制剂 genistein 可以抑制低渗溶液引起的胞内[Cl⁻]_i降低,而蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)抑制剂 sodium orthovanadate 可以增强低渗溶液引起的胞内[Cl⁻]_i降低,说明酪氨酸蛋白磷酸化参与了容积调节性 Cl⁻ 运动;蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)激动剂 PDBu 可以抑制低渗溶液引起的胞内[Cl⁻]_i降低。在此基础上,本研究探讨了大鼠股动脉平滑肌细胞(femoral artery smooth muscle cells, FASMC)与股静脉平滑肌细胞(femoral vein smooth muscle cells, FVSMC)表型

转化与容积调节性氯通道的关系,以及 PTK 及 PKC 对 VRCC 的调控是否在动静脉血管平滑肌细胞上存在差异。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

DMEM/F12 细胞培养基、小牛血清及胎牛血清、青/链双抗(GIBCOBRL 公司);胰蛋白酶(Trypsin)、N-methyl-D-glucamine(NMDG)、MnCl₂、MgCl₂、CdCl₂、N-[2-hydroxyethyl]piperazine -N'-[2-ethanesulfonic acid](HEPES)、Glucose、D-mannitol、Tetraethylammonium chloride (TEACl)、MgATP、EGTA、CsCl、CsOH、DMSO、PDBu、genistein、sodium orthovanadate 购于 Sigma 公司;α-actin 抗体及 Cy3 荧光二抗购自博士德公司;牛血清白蛋白(BSA)购于 Roche 公司;其余试剂均为国产市售分析纯。

SW-CJ-IF 超净工作台(江苏苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);CO₂ 培养箱(美国 Labtech 公司);pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司);倒置显微镜(重庆光学仪器厂);手术显微器械、手术显微镜;渗透压仪(OSMOMAT 030,德国);膜片钳防震台及法拉第防静电笼(TMC,美国);水平电极拉制仪(Sutter Instrument Model P-97,美国);Axon200B 膜片钳放大器、1322AD/DA 转换器(Axon Instrument,美国);微电极控制器(Sutter Instrument MP-225,美国);荧光显微镜(Olympus IX71,日本)。

1.2 实验用溶液

Kreb's 液 (mmol/L):NaCl 130,KCl 5,MgCl₂

1.3, CaCl₂ 0.8, HEPES 10, Glucose 5, pH 7.40。PBS (mmol/L): NaCl 137, KCl 2.7, KH₂PO₄ 2, Na₂HPO₄ 10, pH 7.20。等渗细胞外液 (mmol/L): NMDGCl 107, MnCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.5, CdCl₂ 0.5, HEPES 10, Glucose 10, D-mannitol 70, 用 NMDG 调整 pH 值至 7.40, 渗透压理论值为 300 mOsm。低渗细胞外液 (mmol/L): NMDGCl 107, MnCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.5, CdCl₂ 0.5, HEPES 10, Glucose 10, 用 NMDG 调整 pH 值至 7.40, 渗透压理论值为 230 mOsm。高渗细胞外液 (mmol/L): NMDGCl 107, MnCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.5, CdCl₂ 0.5, HEPES 10, Glucose 10, D-mannitol 140, 用 NMDG 调整 pH 值至 7.40, 渗透压理论值为 370 mOsm。电极内液 (mmol/L): CsCl 96, TEACl 20, EGTA 5, MgATP 5, HEPES 5, D-mannitol 80, 用 CsOH 调整 pH 值至 7.20, 渗透压为 290 mOsm。

1.3 大鼠股动脉及股静脉平滑肌细胞原代、传代培养及鉴定

参照文献报道的方法进行^[2]; 选用体质量(100 ± 20)g 的 SD 大鼠, 处死后无菌条件下迅速取出股动脉及股静脉, 分别放入含有抗菌素(青霉素、链霉素各为 100 kU·L⁻¹) 并预先通氧 30 min 的冰 kreb's 液中, 于超净台中小心去除血管周围结缔组织, 而后将血管转移至含有 1% 双抗及 200 mL/L 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中, 用剪刀剪至 0.2 mm 的小段。将剪碎的血管转入培养瓶中, 在 37 °C 含体积分数为 5% CO₂ 的培养箱中培养 5 ~ 7 d。平滑肌细胞从组织块中爬出后半数换液, 待 7 d 左右与倒置显微镜下观察细胞生长融合出现“峰与谷”后, 可用含 0.25% Trypsin 和 0.02% EDTA 的混合消化液消化, 进行传代培养。第二代细胞用抗 α -actin 肌动蛋白免疫组化法进行鉴定。实验用原代、四代及八代细胞。

1.4 全细胞膜片钳记录容积调节性氯电流

将接种细胞的载玻片置于灌流槽的等渗液中, 细胞外液均以约 2 mL/min 的流速持续灌流, 细胞外液温度维持在 37 °C, 实验电流均在室温下记录。玻璃电极使用硼酸盐毛细玻璃管经水平电极拉制仪分三步拉制而成, 充灌电极内液后电极

电阻在 3 ~ 5 M Ω 。电极入液后, 补偿电极电容, 随后调节显微操作器使电极尖端与细胞表面相接触, 轻轻施加负压使电极与细胞表面形成高阻封接(10 G Ω 以上), 待封接稳定之后, 再稍加负压使细胞破膜。破膜后稳定 3 ~ 5 min, 补偿膜电容及电极电阻, 开始记录等渗时的基础电流, 之后换相应的溶液进行灌流并记录电流。实验中, 刺激脉冲的产生和信号采集由 pClamp8.0 软件完成, 细胞的钳制电位为 -40 mV, 测试电压为 -100 mV 到 120 mV, 刺激梯度 20 mV, 持续时间 400 ms, 频率 0.2 Hz, 滤波频率 1 kHz。电流及电压信号经由膜片钳放大器放大, 1322AD/DA 转换器输入并储存于计算机, 供实验数据的后续分析, 电流大小以电流密度(pA/pF)表示。

1.5 数据分析和统计

所有实验结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS13.0 进行统计学分析, 多组资料比较采用方差分析, 两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 全细胞模式下低渗激活的氯电流及其特性

在股动脉(FASMC)和股静脉(FVSMC)平滑肌细胞(第二代)中, 等渗条件下均可记到一个基础电流(I_{iso}), 给予低渗液灌流后, 可明显激活一个氯电流(图 1), 在 -100 mV 低渗刺激后电流密度(pA·pF⁻¹)分别从等渗条件下的 -3.51 ± 2.02 和 -4.53 ± 2.59 增加至 -13.44 ± 2.62 和 -11.41 ± 1.38 ; 在 +100 mV 电流密度(pA·pF⁻¹)分别从 11.14 ± 1.42 和 11.56 ± 2.31 增加至 45.60 ± 3.39 和 31.87 ± 3.66 ($n = 6$, $P < 0.001$ vs. iso; $P < 0.05$ vs. FASMC)。该电流在正电压时有时间依赖性失活, 为外向整流性, 反转电位分别为 -2.08 ± 1.28 mV 和 -1.54 ± 0.98 mV, 接近 Cl⁻ 的平衡电位($E_{Cl} = 0$ mV)。该结果提示股动脉平滑肌细胞 VRCC 活性大于股静脉。

2.2 PTK 抑制剂 genistein 对大鼠 FASMC 和 FVSMC 容积调节性氯通道的影响

如图 2, 表 1 所示: 在 -100 mV 时, 胞外低渗溶

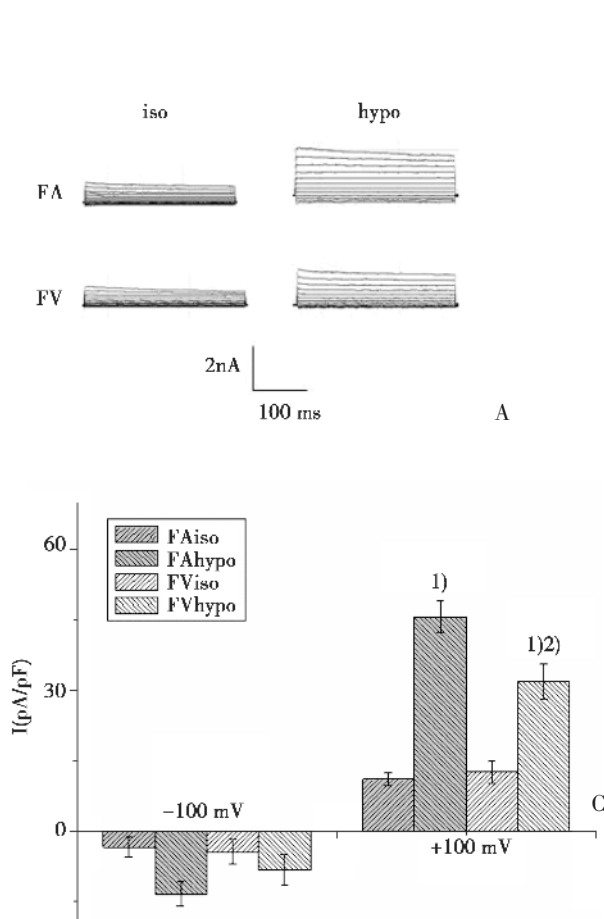


图 1 低渗在动静脉平滑肌细胞(第二代)上激活的氯电流及其特性

Fig.1 The characteristics of the volume-regulated Cl^- current in II passage rat FASMC and FVSMC

A: representative traces of Cl^- currents induced by isotonic, hypotonic solutions in II passage FASMC and FVSMC; B: Mean current-voltage relationships for $I_{\text{Cl,vol}}$ under isotonic and hypotonic solutions; C: current densities at -100 mV and $+100 \text{ mV}$. 1) $P < 0.001$ vs. iso; 2) $P < 0.05$ vs. FASMCs; $n = 6$.

液刺激, 原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 的电流密度 (pA.pF^{-1}) 分别从等渗条件下的 -3.05 ± 0.95 , -3.52 ± 1.79 和 -3.72 ± 3.26 增加至 -11.66 ± 2.26 , -17.40 ± 2.63 和 -35.83 ± 9.23 ; 接着灌入 $30 \mu\text{mol/L}$ genistein 作用至稳定后电流密度 (pA.pF^{-1}) 分别降至 -8.73 ± 2.33 , -13.33 ± 3.17 和 -23.12 ± 6.04 。在 $+100 \text{ mV}$ 时, 胞外低渗溶液刺激, 原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 的电流密度 (pA.pF^{-1}) 分别从等渗条件下的 9.87 ± 2.10 , 12.55 ± 2.25 和 11.12 ± 2.10 增加至 33.88 ± 2.61 , 54.17 ± 4.10 和 100.55 ± 5.71 ($P < 0.001$ vs. iso; $n = 6$); 接着灌入 $30 \mu\text{mol/L}$ genistein 作用至稳定后电流密度 (pA.pF^{-1}) 分别降至 28.67 ± 2.07 , 41.38 ± 2.68 和 65.04 ± 5.56 ($P < 0.05$ vs. hypo; $n = 6$)。抑制率分别为 21.58 ± 2.23 , 31.73 ± 3.17 和 $42.72 \pm 3.41\%$ ($P < 0.05$ vs. primary passage cells; $n = 6$)。

在 -100 mV 时, 胞外低渗溶液刺激, 原代、4 代、8 代大鼠 FVSMC 的电流密度 (pA.pF^{-1}) 分别从

等渗条件下的 -3.25 ± 1.47 , -3.02 ± 0.97 和 -3.96 ± 1.85 增加至 -9.24 ± 2.50 , -11.06 ± 1.93 和 -25.72 ± 5.01 ; 接着灌入 $30 \mu\text{mol/L}$ genistein 作用至稳定后电流密度 (pA.pF^{-1}) 分别降至 -6.16 ± 2.40 , -8.22 ± 2.01 和 -13.39 ± 3.79 。在 $+100 \text{ mV}$ 时, 胞外低渗溶液刺激, 原代、4 代、8 代大鼠 FVSMC 的电流密度 (pA.pF^{-1}) 分别从等渗条件下的 10.28 ± 2.16 , 11.95 ± 1.32 和 9.98 ± 3.71 增加至 28.97 ± 3.09 , 38.13 ± 5.55 和 73.64 ± 7.19 ($P < 0.001$ vs. iso; $n = 6$); 接着灌入 $30 \mu\text{mol/L}$ genistein 作用至稳定后电流密度 (pA.pF^{-1}) 分别降至 22.42 ± 2.67 , 26.04 ± 4.31 和 38.28 ± 3.86 ($P < 0.05$ vs. hypo; $n = 6$)。抑制率分别为 33.16 ± 2.65 , 46.25 ± 3.48 和 $55.57 \pm 4.68\%$ ($P < 0.05$ vs. primary passage cells; $P < 0.05$ vs. FASMCs; $n = 6$)。

这些结果表明随着培养代数的增加, FASMC 和 FVSMC 的 VRCC 活性逐渐增强。胞外给予酪氨酸激酶抑制剂 genistein $30 \mu\text{mol/L}$ 可明显降低低

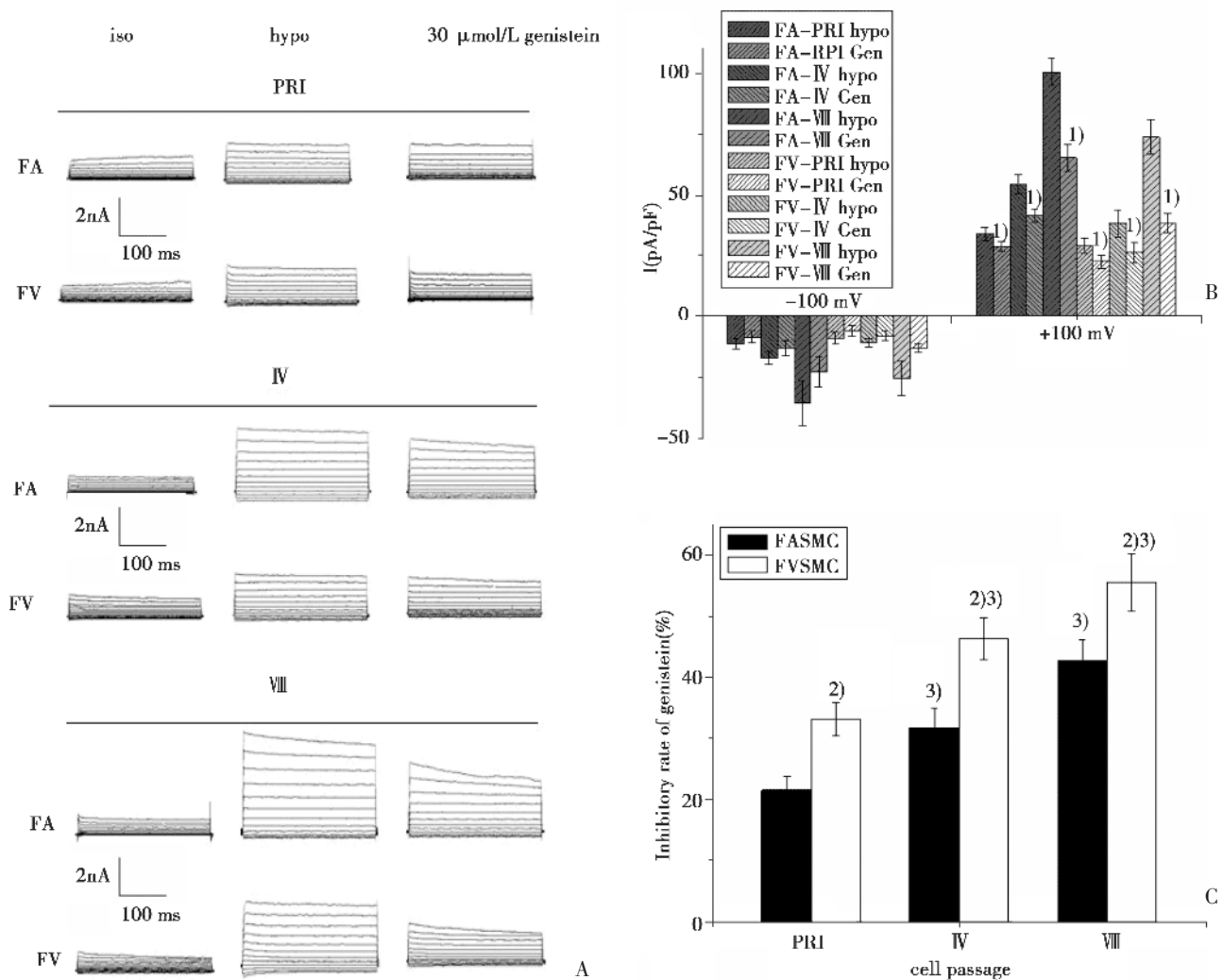


图2 PTK抑制剂 genistein 对大鼠 FASMC 和 FVSMC 容积调节性氯通道的影响

Fig.2 Effect of genistein (Gen) on volume-regulated Cl^- current with respect to the progress in male Sprague-Dawley rat femoral artery smooth muscle cells (FASMC) and femoral vein smooth muscle cells (FVSMC)

A: representative traces of the effect of 30 $\mu\text{mol/L}$ genistein on VRCC in primary, IV and VIII passage cells from FASMC and FVSMC; B: mean current-voltage relationships for $I_{Cl, vol}$; C: the inhibitory rate of genistein on $I_{Cl, vol}$. 1) $P < 0.05$ vs. hypo; 2) $P < 0.05$ vs. FASMC; 3) $P < 0.05$ vs. primary passage cells; $n = 6$.

渗透导的容积调节性氯电流 ($I_{Cl, vol}$), 且随着培养代数的增加这种抑制作用逐渐增强; 与相同代数的 FASMC 相比, genistein 对 FVSMC 的 $I_{Cl, vol}$ 抑制率更大。提示随着细胞从收缩型向合成型的转化, VRCC 活性受酪氨酸激酶的磷酸化调控作用逐渐增强, 且 FVSMC 的 VRCC 受酪氨酸激酶的磷酸化调控作用强于 FASMC。

2.3 PTP 抑制剂 sodium orthovanadate 对大鼠 FASMC 和 FVSMC 容积调节性氯通道的影响

由于胞内蛋白酪氨酸磷酸化水平由酪氨酸激酶和酪氨酸磷酸酶的活性共同调节。为进一步探讨酪氨酸磷酸化对 VRCC 的调节作用, 我们观察了酪氨酸磷酸酶抑制剂 sodium orthovanadate 对 $I_{Cl, vol}$ 的影响。

如图 3, 表 2 所示: 在 -100 mV 时, 胞外低渗溶液刺激, 原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 的电流密度 ($\text{pA} \cdot \text{pF}^{-1}$) 分别从等渗条件下的 -3.04 ± 1.94 , -3.51 ± 1.69 和 -3.42 ± 3.28 增加至 -11.06 ± 2.16 ,

表 1 PTK 抑制剂 genistein 对大鼠 FASMC 和 FVSMC 容积调节性氯通道的影响

Table 1 Effects of genistein on volume-regulated Cl⁻ current in femoral artery and vein smooth muscle cells of Sprague-Dawley rats

		FASMC Current Densities (pA.pF ⁻¹)		FVSMC Current Densities (pA.pF ⁻¹)	
		-100 mV	100 mV	-100 mV	100 mV
Primary	Iso	-3.05 ± 0.95	9.87 ± 2.10	-3.25 ± 1.47	10.28 ± 2.16
	Hypo	-11.66 ± 2.26	33.88 ± 2.61	-9.24 ± 2.50	28.97 ± 3.09
	genistein	-8.73 ± 2.33	28.67 ± 2.07	-6.16 ± 2.40	22.42 ± 2.67
IV	Iso	-3.52 ± 1.79	12.55 ± 2.25	-3.02 ± 0.97	11.95 ± 1.32
	Hypo	-17.40 ± 2.63	54.17 ± 4.10	-11.06 ± 1.93	38.13 ± 5.55
	genistein	-13.33 ± 3.17	41.38 ± 2.68	-8.22 ± 2.01	26.04 ± 4.31
VIII	Iso	-3.72 ± 3.26	11.12 ± 2.10	-3.96 ± 1.85	9.98 ± 3.71
	Hypo	-35.83 ± 9.23	100.55 ± 5.71	-25.72 ± 5.01	73.64 ± 7.19
	genistein	-23.12 ± 6.04	65.04 ± 5.56	-13.39 ± 3.79	38.28 ± 3.86

-17.58 ± 2.61 和 -30.83 ± 5.23; 接着灌入 500 μmol/L sodium orthovanadate 作用至稳定后电流密度 (pA.pF⁻¹) 分别增加至 -17.72 ± 2.33, -25.72 ± 3.17 和 -50.72 ± 6.04。在+100 mV 时,胞外低渗溶液刺激,原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 的电流密度 (pA.pF⁻¹) 分别从等渗条件下的 10.81 ± 2.16, 12.54 ± 2.45 和 12.12 ± 2.10 增加至 38.13 ± 2.62, 54.47 ± 4.08 和 100.59 ± 5.45 ($P < 0.001$ vs. iso; $n = 6$); 接着灌入 500 μmol/L sodium orthovanadate 作用至稳定后电流密度 (pA.pF⁻¹) 分别增加至 53.64 ± 2.27, 73.54 ± 2.86 和 132.95 ± 5.23 ($P < 0.05$ vs. hypo; $n = 6$)。电流密度分别增加了 53.90 ± 3.12, 45.53 ± 2.78 和 36.24 ± 2.57% ($P < 0.05$ vs. primary passage cells; $n = 6$)。

在-100 mV 时,胞外低渗溶液刺激,原代、4 代、8 代大鼠 FVSMC 的电流密度 (pA.pF⁻¹) 分别从等渗条件下的 -3.45 ± 1.21, -3.87 ± 1.36 和 -3.26 ± 1.65 增加至 -9.48 ± 2.51, -11.37 ± 1.91 和 -26.02 ± 7.21; 接着灌入 500 μmol/L sodium orthovanadate 作用至稳定后电流密度 (pA.pF⁻¹) 分别增加至 -13.40 ± 2.40, -16.77 ± 4.64 和 -35.83 ± 3.79。在+100 mV 时,胞外低渗溶液刺激,原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 的电流密度 (pA.pF⁻¹) 分别从

等渗条件下的 9.98 ± 2.25, 12.15 ± 2.37 和 10.18 ± 3.32 增加至 29.25 ± 3.24, 38.47 ± 4.52 和 73.68 ± 5.19 ($P < 0.001$ vs. iso; $n = 6$); 接着灌入 500 μmol/L sodium orthovanadate 作用至稳定后电流密度 (pA.pF⁻¹) 分别增加至 41.17 ± 2.45, 52.49 ± 3.97 和 103.54 ± 4.86 ($P < 0.05$ vs. hypo; $n = 6$)。电流密度分别增加了 65.28 ± 2.94, 54.86 ± 2.93 和 46.98 ± 2.61% ($P < 0.05$ vs. primary passage cells; $P < 0.05$ vs. FASMC; $n = 6$)。

这些结果表明,PTP 抑制剂 sodium orthovanadate 对原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 和 FVSMC 的 $I_{Cl,vol}$ 均具有增强作用,且这种增强作用随着代数的增加而减弱,提示 VRCC 活性受酪氨酸磷酸酶的调节作用逐渐减弱。与相同代数的 FASMC 相比, sodium orthovanadate 对 FVSMC 容积调节性氯电流的增强作用更强,提示 FVSMC 的 VRCC 受酪氨酸磷酸酶的调控作用强于 FASMC。

2.4 PKC 激动剂 PDBu 对大鼠 FASMC 和 FVSMC 容积调节性氯通道的影响

如图 4,表 3 所示:在-100mV 时,胞外低渗溶液刺激,原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 的电流密度 (pA.pF⁻¹) 分别从等渗条件下的 -4.49 ± 2.74, -3.51 ± 1.79 和 -3.50 ± 2.35 增加至 -11.78 ± 2.31, -17.41

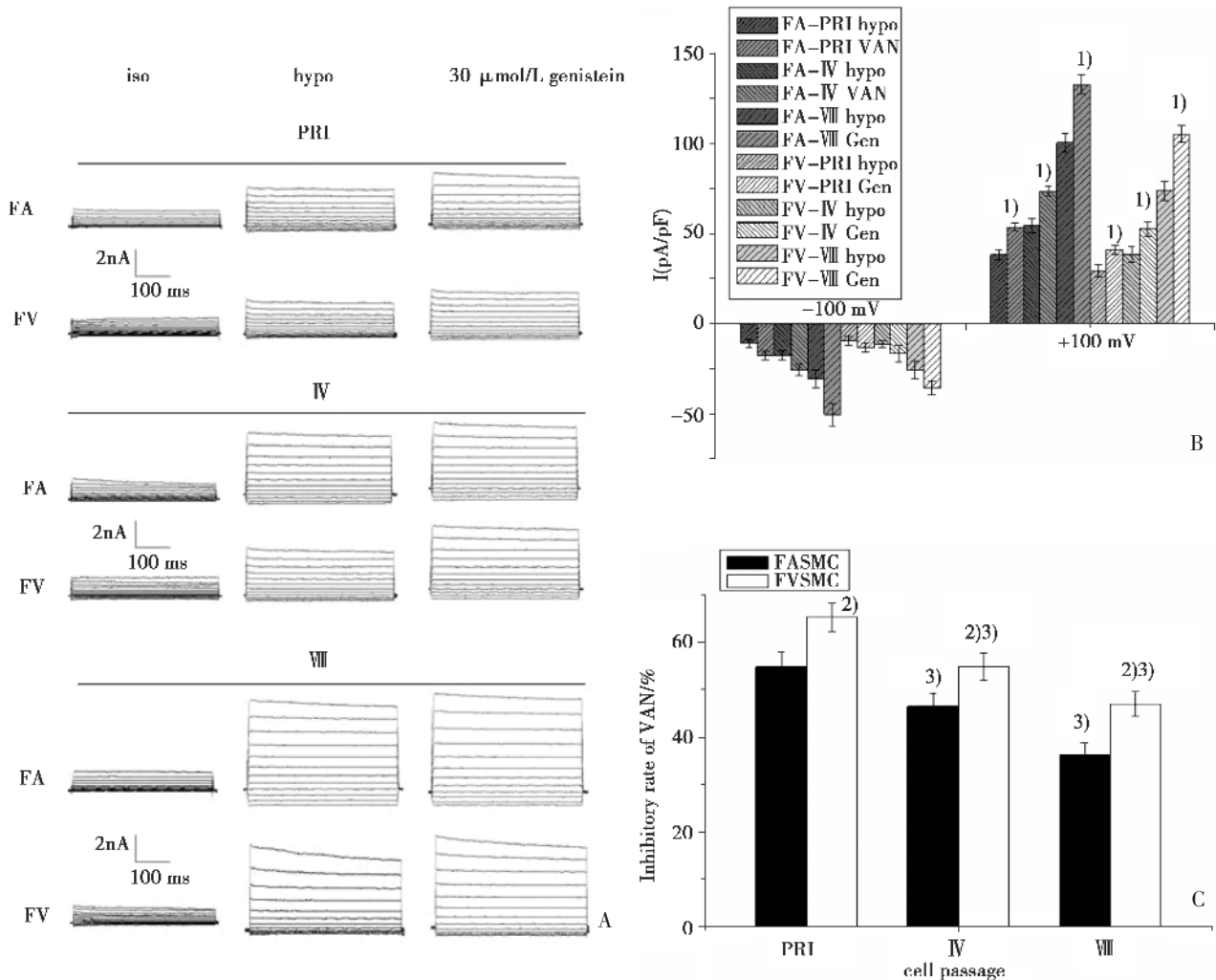


图3 PTP抑制剂 sodium orthovanadate 对大鼠 FASMC 和 FVSMC 容积调节性氯通道的影响

Fig.3 Effect of sodium orthovanadate (VAN) on volume-regulated Cl^- current with respect to the progress in male Sprague-Dawley rat femoral artery smooth muscle cells (FASMC) and femoral vein smooth muscle cells (FVSMC)

A: representative traces of the effect of 500 μ mol/L sodium orthovanadate on VRCC in primary, IV and VIII passage cells from FASMC and FVSMC; B: mean current-voltage relationships for $I_{Cl, vol}$; C: the incremental rate of sodium orthovanadate on $I_{Cl, vol}$ in FASMC and FVSMC. 1) $P < 0.05$ vs. hypo; 2) $P < 0.05$ vs. FASMC; 3) $P < 0.05$ vs. primary passage cells; $n = 6$.

± 2.58 和 -35.97 ± 5.34 ;接着灌入 100 nmol/L PKC 的激动剂 PDBu 作用至稳定后电流密度 ($pA \cdot pF^{-1}$) 分别降至 -9.13 ± 2.64 , -11.06 ± 3.25 和 -23.58 ± 5.27 。在 +100 mV 时,胞外低渗溶液刺激,原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 的电流密度 ($pA \cdot pF^{-1}$) 分别从等渗条件下的 9.74 ± 2.11 , 12.22 ± 2.17 和 12.14 ± 2.13 增加至 34.23 ± 3.91 , 52.23 ± 3.19 和 97.54 ± 5.22 ($P < 0.001$ vs. iso; $n = 6$);接着灌入 100 nmol/L PDBu 作用至稳定后电流密度 ($pA \cdot pF^{-1}$) 分别降至 27.87 ± 2.37 , 39.13 ± 3.28 和 69.24 ± 4.57 ($P < 0.05$ vs. hypo; $n = 6$)。抑制率分别为 21.37 ± 2.33 ,

28.43 ± 2.67 和 $38.42 \pm 2.49\%$ ($P < 0.05$ vs. primary passage cells; $n = 6$)。

在 -100 mV 时,胞外低渗溶液刺激,原代、4 代、8 代大鼠 FVSMC 的电流密度 ($pA \cdot pF^{-1}$) 分别从等渗条件下的 -4.27 ± 2.17 , -3.03 ± 1.02 和 -4.16 ± 2.07 增加至 -9.47 ± 2.91 , -13.34 ± 1.96 和 -25.21 ± 5.43 ;接着灌入 100 nmol/L PDBu 作用至稳定后电流密度 ($pA \cdot pF^{-1}$) 分别降至 -6.46 ± 2.38 , -8.53 ± 3.64 和 -12.94 ± 2.45 。在 +100 mV 时,胞外低渗溶液刺激,原代、4 代、8 代大鼠 FASMC 的电流密度 ($pA \cdot pF^{-1}$) 分别从等渗条件下的 10.87 ± 2.75 , 12.02

表 2 PTP 抑制剂 sodium orthovanadate 对大鼠 FASMC 和 FVSMC 容积调节性氯通道的影响
Table 2 Effects of sodium orthovanadate (VAN) on volume-regulated Cl⁻ current in femoral artery and vein smooth muscle cells of Sprague-Dawley rats

		FASMC Current Densities (pA.pF ⁻¹)		FVSMC Current Densities (pA.pF ⁻¹)	
		-100 mV	100 mV	-100 mV	100 mV
Primary	Iso	-3.04 ± 1.94	10.81 ± 2.16	-3.45 ± 1.21	9.98 ± 2.25
	Hypo	-11.06 ± 2.16	38.13 ± 2.62	-9.48 ± 2.51	29.25 ± 3.24
	PDBu	-17.72 ± 2.33	53.64 ± 2.27	-13.40 ± 2.40	41.17 ± 2.45
IV	Iso	-3.51 ± 1.69	12.54 ± 2.45	-3.87 ± 1.36	12.15 ± 2.37
	Hypo	-17.58 ± 2.61	54.47 ± 4.08	-11.37 ± 1.91	38.47 ± 4.52
	PDBu	-25.72 ± 3.17	73.54 ± 2.86	-16.77 ± 4.64	52.49 ± 3.97
VIII	Iso	-3.42 ± 3.28	12.12 ± 2.10	-3.26 ± 1.65	10.18 ± 3.32
	Hypo	-30.83 ± 5.23	100.59 ± 5.45	-26.02 ± 7.21	73.68 ± 5.19
	PDBu	-50.72 ± 6.04	132.95 ± 5.23	-35.83 ± 3.79	103.54 ± 4.86

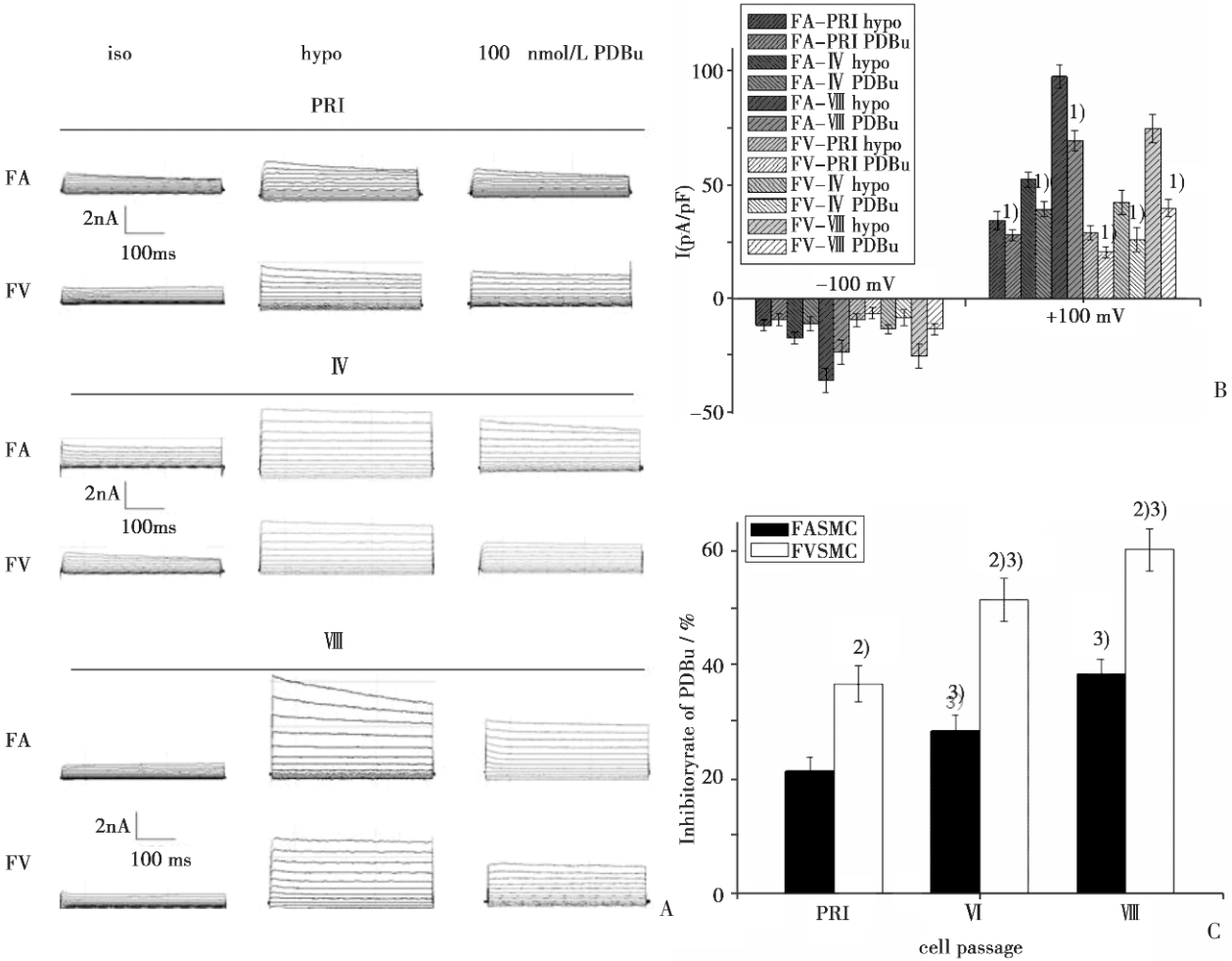


图 4 PKC 激动剂 PDBu 对大鼠 FASMC 和 FVSMC 容积调节性氯通道的影响

Fig.4 Effect of PDBu on volume-regulated Cl⁻ current with respect to the progress in male Sprague-Dawley rat femoral artery smooth muscle cells (FA) and femoral vein smooth muscle cells (FV)

A: representative traces of the effect of 100 nmol/L PDBu in FA and FV from primay, IV and VIII passage cells; B: mean current-voltage relationships for I_{d,vol}; C: the inhibitory rate of PDBu on I_{d,vol}. 1)P < 0.05 vs. hypo; 2)P < 0.05 vs. FASMC; 3)P < 0.05 vs. primary passage cells; n = 6.

表 3 PKC 激动剂 PDBu 对大鼠 FASMC 和 FVSMC 容积调节性氯通道的影响

Table 3 Effects of PDBu on volume-regulated Cl⁻ current in femoral artery and vein smooth muscle cells of Sprague-Dawley rats

		FASMC Current Densities (pA.pF ⁻¹)		FVSMC Current Densities (pA.pF ⁻¹)	
		-100 mV	100 mV	-100 mV	100 mV
Primary	Iso	-4.49 ± 2.74	9.74 ± 2.11	-4.27 ± 2.17	10.87 ± 2.75
	Hypo	-11.78 ± 2.31	34.23 ± 3.91	-9.47 ± 2.91	28.93 ± 3.01
	PDBu	-9.13 ± 2.64	27.87 ± 2.37	-6.46 ± 2.38	20.22 ± 2.46
IV	Iso	-3.51 ± 1.79	12.22 ± 2.17	-3.03 ± 1.02	12.02 ± 1.32
	Hypo	-17.41 ± 2.58	52.23 ± 3.19	-13.34 ± 1.96	42.18 ± 5.52
	PDBu	-11.06 ± 3.25	39.13 ± 3.28	-8.53 ± 3.64	25.73 ± 5.27
VIII	Iso	-3.50 ± 2.35	12.14 ± 2.13	-4.16 ± 2.07	10.76 ± 2.61
	Hypo	-35.97 ± 5.34	97.54 ± 5.22	-25.21 ± 5.43	74.63 ± 6.19
	PDBu	-23.58 ± 5.27	69.24 ± 4.57	-12.94 ± 2.45	39.78 ± 3.77

± 1.32 和 10.76 ± 2.61 增加至 28.93 ± 3.01,42.18 ± 5.52 和 74.63 ± 6.19($P < 0.001$ vs. iso; $n = 6$);接着灌入 100 nmol/L PDBu 作用至稳定后电流密度(pA.pF⁻¹) 分别降至 20.22 ± 2.46,25.73 ± 5.27 和 39.78 ± 3.77($P < 0.05$ vs. hypo; $n = 6$)。抑制率分别为 36.64 ± 3.21,51.33 ± 3.73 和 60.16 ± 3.71% ($P < 0.05$ vs. primary passage cells; $P < 0.05$ vs. FASMCs; $n = 6$)。

这些结果表明,胞外给予 100 nmol/L PKC 激动剂 PDBu 可明显降低细胞 I_{Cl,vol},且随着培养代数的增加,这种抑制作用逐渐增大,提示 PKC 负调控 VRCC 活性,且这种负调控作用随着细胞从收缩型向合成型的转化而逐渐加强。与相同代数的 FASMC 相比,PDBu 对 FVSMC 低渗溶液激活的 VRCC 的抑制率更大,提示 FVSMC 受 PKC 的调控作用强于 FASMC。

3 讨 论

20 世纪 90 年代以来,已针对氯通道进行了大量广泛的研究。容积调节性氯通道(VRCC)除调节细胞容积外,还在许多生理过程中发挥作用,包括细胞膜电位稳定、维持细胞兴奋性、细胞的增殖、

分化、细胞迁移、血管生成、凋亡和胞内酸碱平衡等^[4-9]。VRCC 可被细胞肿胀及改变细胞外液渗透压所激活,同样也可在等渗、等容情况下通过减少细胞内离子强度而被激活^[10]。但其具体的活化和调控机制还远未清楚,而且迄今为止还没有观察到一种普遍存在的调控机制。目前多数研究认为胞内的一些蛋白激酶可能参与调控了容积调节性氯通道的开放。我们在 A10 血管平滑肌细胞的研究发现,PKC 和蛋白酪氨酸磷酸化信号通路参与调控 A10 细胞内源性容积调节性氯通道的开放。基于动静脉的生理功能以及两者内源性 VRCC 的差异,本研究发现 PTK 及 PKC 对 VRCC 的这一调控在动静脉血管平滑肌细胞上也存在差异,表现为蛋白酪氨酸激酶、酪氨酸磷酸酶和蛋白激酶 C 对股静脉平滑肌细胞 VRCC 的调节作用强于股动脉平滑肌细胞。这一发现为理解动静脉在动脉粥样硬化血管重构等病理现象上的差异提供了一些新的线索。

在高血压和动脉粥样硬化发展过程中会发生血管重构,表现为 VSMC 表型由收缩型转向增生型,并且出现中膜肥大的关键特征,而中膜肥大归因于血流动力学变化或不同形式的血管损伤引起的 VSMC 增殖增强而凋亡失调^[11-12]。因此,血管平

滑肌细胞表型转化是高血压、动脉粥样硬化和血管成型术后再狭窄等心血管病 VSMC 增殖和迁移的关键性起始步骤,是该类疾病的共同的发病基础,但 VSMC 表型转换和调节因素与细胞信号转导之间的确切关系尚未完全明了。我们实验室前期的工作亦证明 VRCC 在动静脉上活性不同,且参与调控动静脉平滑肌细胞的表型转化,本研究进一步探讨了参与 VRCC 调控的 PKC 及 PKC 通路在动静脉平滑肌细胞的表型转化过程中是否有变化。结果发现,酪氨酸蛋白的磷酸化调节作用在动静脉平滑肌细胞上均有逐渐增强的趋势,而蛋白激酶 C 对 VRCC 的抑制作用也是逐渐增强的。提示细胞处于增殖型时,对酪氨酸激酶的磷酸化调控更为敏感,这一结果与高血压过程中 VRCC 和酪氨酸激酶的活性均增加^[13-14]是相吻合的。这一发现将可能从离子通道角度上为防治高血压及动脉粥样硬化血管重构等血管异常病理改变提供新的作用靶点。

综上所述,本研究发现 PKC 及蛋白酪氨酸磷酸化信号通路对股静脉平滑肌细胞 VRCC 的调节作用强于股动脉平滑肌细胞。且随着血管平滑肌细胞由收缩型向合成型转化,VRCC 的活性及酪氨酸蛋白的磷酸化调节作用均有逐渐增强的趋势,而蛋白激酶 C 对 VRCC 的抑制作用也有增强的趋势。这一发现为进一步理解动脉和静脉血管异常病理改变提供了新的可能的线索。

参考文献:

- [1] Faries PL. Vascular smooth muscle cells derived from atherosclerotic human arteries exhibit greater adhesion, migration, and proliferation than venous cells[J]. *J Surg Res*, 2002, 104(1): 22-28.
- [2] Kang XL, Zhang M. Differences between femoral artery and vein smooth muscle cells in volume-regulated chloride channels[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(11): 1516-1526.
- [3] Zhou JG, Ren JL, Qiu QY, et al. Regulation of intracellular Cl^- concentration through volume-regulated $\text{ClC}-3$ chloride channels in A10 vascular smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(8): 7301-7308.
- [4] d'Anglemont de Tassigny A. Structure and pharmacology of swelling-sensitive chloride channels, I (Cl , swell)[J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2003, 17(5): 539-553.
- [5] Nilius B. Properties of volume-regulated anion channels in mammalian cells[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 1997, 68(1): 69-119.
- [6] Park SJ. Volume-activated chloride currents in interstitial cells of Cajal [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 289(5): G791-G797.
- [7] Baumgarten CM, Clemp HF. Swelling-activated chloride channels in cardiac physiology and pathophysiology [J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2003, 82(1-3): 25-42.
- [8] Wondergem R. Blocking swelling-activated chloride current inhibits mouse liver cell proliferation [J]. *J Physiol*, 2001, 532(Pt 3): 661-672.
- [9] Xiao GN, Guan YY. Effects of Cl^- channel blockers on endothelin-1-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells [J]. *Life Sci*, 2002, 70(19): 2233-2241.
- [10] Nilius B. Activation of volume-regulated chloride currents by reduction of intracellular ionic strength in bovine endothelial cells[J]. *J Physiol*, 1998, 506(Pt 2): 53-61.
- [11] Intengan HD. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis [J]. *Hypertension*, 2001, 38(3Pt2): 581-587.
- [12] Mandegar M. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension[J]. *Microvasc Res*, 2004, 68(2): 75-103.
- [13] 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.
- [14] 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.

(编辑 孙慧兰)