

间尼索地平对 5-羟色胺诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaN}$ 通路的影响

陈雪彦¹, 刘焕龙², 潘振华¹, 苗庆峰¹, 张永健^{1*}

(河北医科大学 1. 药理学教研室, 河北 石家庄 050017; 2. 第二附属医院, 河北 石家庄 050000)

摘要: 探讨 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaN}$ 信号通路在 5-羟色胺 (5-HT) 诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞 (PASMCs) 增殖中的作用以及间尼索地平 (*m*-Nis) 对此的影响。采用细胞培养、噻唑蓝 (MTT) 比色检测、激光共聚焦显微镜及反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 等方法, 研究 5-HT ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对大鼠 PASMCs 细胞增殖的影响以及 *m*-Nis 对此的抑制作用, 并通过检测 *m*-Nis 对 5-HT 诱导的大鼠 PASMCs 增殖中 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaN}$ 通路的影响深入探讨其作用机制。结果显示, 5-HT ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 可明显诱导大鼠 PASMCs 增殖 ($P < 0.01$), *m*-Nis 对此有明显的抑制作用, 并呈现一定的浓度依赖性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 另外, *m*-Nis 还明显抑制了 5-HT 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高 ($P < 0.01$)、CaM 和 CaN mRNA 的表达以及 CaN 活性的升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaN}$ 信号通路在 5-HT 诱导的大鼠 PASMCs 增殖中起重要作用, *m*-Nis 抗 5-HT 诱导的增殖作用可能与抑制 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增高从而阻断了 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaN}$ 信号通路有关。

关键词: 间尼索地平; 5-羟色胺; 肺动脉平滑肌细胞; 增殖; 钙离子

中图分类号: R963

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 01-0049-06

Effect of *m*-nisoldipine on the $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaN}$ signal pathway in 5-HT-induced proliferation of rat PASMCs

CHEN Xue-yan¹, LIU Huan-long², PAN Zhen-hua¹, MIAO Qing-feng¹, ZHANG Yong-jian^{1*}

(1. Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: This study is to explore the activation of the $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaN}$ signal pathway in 5-HT-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) and the inhibitory effect of *m*-nisoldipine (*m*-Nis) on this pathway. PASMCs were cultured with the explant technique. The proliferation of PASMCs was evaluated by MTT assay. Confocal microscopy was used to measure the change of $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The mRNA expression of CaM and CaN was evaluated by RT-PCR and the activity of CaN was measured according to the instruction of kits. The results of MTT assay suggested that 5-HT ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly induced the proliferation of rat PASMCs ($P < 0.01$), which was inhibited obviously by *m*-Nis ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Similarly, *m*-Nis inhibited 5-HT-induced elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($P < 0.01$). The mRNA expression of CaM, CaN and the activation of CaN were also inhibited by *m*-Nis at different degrees ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Thus, the results of this study suggested that $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaN}$ signal pathway played an important role in 5-HT-induced proliferation of rat PASMCs, the inhibition of *m*-Nis on proliferation of rat PASMCs may be related to the blockage of $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaN}$ signal pathway by inhibiting the elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

收稿日期: 2009-08-16.

基金项目: 河北省卫生厅医学科学研究重点课题指导计划 (20090306).

*通讯作者 Tel: 86-311-86266821, Fax: 86-311-86057291, E-mail: zhangyj@hebm.edu.cn

Key words: *m*-nisoldipine; 5-hydroxytryptamine; PSMCs; proliferation; Ca^{2+}

肺动脉高压是一种严重的病理生理状态,是许多疾病如心脏病和肺心病发生的关键环节。目前,肺动脉高压的发病机制尚不十分清楚,它的两大基本病理改变是肺血管收缩和构型重建,其中肺动脉平滑肌细胞 (PSMCs) 既是肺血管收缩的效应细胞,也是增殖和迁移引起肺血管构型重建的细胞基础^[1, 2]。缺氧、各类生长因子、炎性介质等多种因素均与肺血管重建有关,5-羟色胺 (5-HT) 是其中较为重要的一种。研究发现,5-HT 通过相应受体诱发细胞内相关信号转导机制如钙离子浓度升高,丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 的激活等,调节 PSMCs 的增殖与凋亡,引起肺动脉高压^[3]。其中,钙信号转导在肺动脉高压发生发展过程中起着非常重要的作用,研究发现,细胞内钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的变化是触发细胞增殖相关信号转导的始动因素之一^[4, 5]。钙信号涉及 Ca^{2+} 内流、细胞内钙库释放、钙调素 (CaM) 及钙调神经磷酸酶 (CaN) 激活等环节,最终将 Ca^{2+} 编码的信号传入细胞核内。但是有关钙信号转导与肺血管结构重建的关系尚不清楚,故本研究从这一角度出发,研究了 Ca^{2+} /CaM/CaN 信号通路在 5-HT 诱导大鼠 PSMCs 增殖中的作用以及间尼索地平 (*m*-nisoldipine, *m*-Nis) 对此的影响。

m-Nis 是河北医科大学药学院研制开发的新型二氢吡啶类钙拮抗剂,研究表明该药的光稳定性优于尼索地平,在治疗冠心病、心肌缺血、高血压、心力衰竭及心源性休克等方面更有优越性,有望成为治疗上述疾病的理想药物。前期研究发现 *m*-Nis 对野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压有一定的逆转作用^[6],为详细探讨其细胞分子学作用机制,本研究考察了不同浓度 *m*-Nis 对 5-HT 诱导大鼠 PSMCs 增殖的影响,并且观察了 *m*-Nis 对 Ca^{2+} /CaM/CaN 信号通路的影响,旨在深入认识肺血管结构重建的信号环节。

材料与方 法

动物与试剂 Wistar 大鼠由河北医科大学实验动物中心提供 (合格证号: 711047)。DMEM/F12 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司。间尼索地平由河北医科大学药学院提供 (纯度大于 99.5%, 化学名: 2, 6-二甲基-4-(3-硝基苯基)-1, 4-二氢-3, 5-吡啶二羧酸异丁甲酯; 分子式: $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_6$; 相对分子质量: 388.42)。MTT 购自德国 Serva 公司。胰蛋白酶购自 Amersco 公司。5-HT 购自美国 Sigma 公司。BCA 蛋

白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司。Fluo-3/AM 钙荧光指示剂购自美国 Invitrogen 公司。CaM 及 CaN PCR 反应引物由上海捷瑞生物工程公司合成。CaN 酶活性测定试剂盒购自南京建成生物工程公司。其他试剂均为国产分析纯。

PSMCs 培养与鉴定 采用组织块种植法原代培养^[7]: 取体重 200 g 左右的 Wistar 雄性大鼠,麻醉,无菌取出心肺。迅速分离肺动脉主干及左右肺动脉,预冷 D-Hanks 液漂洗,仔细剥除外膜及内皮细胞,将剩余的中膜剪成 $0.5 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的小块,移入培养瓶内,使其在底部分布均匀,加入含 20% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液,置于 37°C 、 CO_2 培养箱中静置培养。当大部分组织块长出细胞晕时,吸除培养液和组织块,无菌 D-Hanks 液清洗后,用 0.125% 胰蛋白酶 + 0.01% EDTA 消化分散细胞,传代培养。通过三瓶置换法纯化 PSMCs。第 3~6 代细胞用于后续实验。细胞培养过程中,在倒置显微镜下对细胞形态进行观察,采用 α -actin 免疫细胞化学染色鉴定 PSMCs。

细胞分组与处理 选择第 3~6 代生长良好的 PSMCs,消化并制备细胞悬液,接种于培养板或培养瓶中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养液培养 1~2 d 至细胞融合达 80% 左右时,换低浓度 (0.1%) 胎牛血清培养液培养 24 h,使细胞生长同步化。然后随机分为空白对照组、5-HT ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, *m*-Nis (1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 及 $1 \times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组: 同步化的细胞先加入含不同浓度的 *m*-Nis 预处理,20 min 后加入终浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-HT 刺激细胞,刺激时间长短根据所检测指标不同而定。

MTT 法检测 PSMCs 增殖 取对数生长期的 PSMCs,消化、计数,以细胞数 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中,每孔 200 μL ,培养 24 h 使细胞完全贴壁。细胞生长同步化,按“细胞分组与处理”方法分组处理细胞,每组设 6 个平行孔,在加入 5-HT 后置培养箱中继续培养 24 h,每孔加入 MTT 溶液 ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 20 μL ,置培养箱中继续培养 4 h,吸弃各孔上清液,每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 200 μL 溶解紫色结晶,室温震荡 10 min,置自动酶标仪上于 490 nm 波长条件下测定各孔的吸收度 (*A*) 值。

Fluo-3/AM 的负载 用 DMSO 配制成 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液,临用时用无血清 DMEM/F12 培养基稀释 100 倍,使其终浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。各组细胞爬片同步化

后, 用终浓度为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Fluo-3/AM 于 37°C 避光负载 40 min, 吸去负载液, 用 D-Hanks 液洗涤 3 次后将细胞爬片放入灌流槽中, 用于实验。

肺动脉平滑肌细胞内钙测定 用氩离子激光器激发荧光, 激发波长 488 nm, 发射波长 530 nm, 在激光扫描共聚焦显微镜下对细胞进行扫描。观察 5-HT 对细胞内钙的影响时, 激光扫描前 50 s, 用正常含钙台氏液灌流, 50 s 时用含终浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 5-HT 的台氏液灌流, 连续扫描 500 s; 观察 *m*-Nis 对 5-HT 引起细胞内钙的影响时, 更换细胞爬片, 预先用不同浓度的 *m*-Nis 孵育 5 min, 然后按上述方法扫描, 采用 5 s 间隔连续扫描的方式记录荧光变化。结果用相对荧光强度 $(\text{FI}-\text{FI}_0)/\text{FI}_0$ (FI_0 和 FI 分别表示 5-HT 处理前后的荧光强度) 表示细胞内游离钙离子浓度的变化。

RT-PCR 检测 CaM 和 CaN mRNA 表达 各组细胞在 5-HT 作用 24 h 后消化分离, 按照总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒操作步骤提取纯化 RNA, 并反转录成 cDNA, 进行 PCR 反应, 实验重复 3 次。引物序列为 CaM: 5'-GATAAGGACGGCAATGGCTACA-3' (sense), 5'-CGATGTCTGCTTCCCTGATCAT-3' (antisense), 产物长度 115 bp; CaN: 5'-ACTGGCATGCTCCCCAGCGGA-3' (sense), 5'-GTGCCGTTAGTCTCTGAGGCG-3' (antisense), 产物长度 244 bp; β -actin: 5'-CCAAGGCCAACCGCGAGAAGATGAC-3' (sense), 5'-AGGGTACATGGTGGTGGCGCCAGAC-3' (antisense), 产物长度 587 bp。扩增条件: 95°C 预变性 2 min, 94°C 变性 40 s, 60°C 退火 50 s, 72°C 延伸 90 s, 72°C 延伸 10 min, 共 35 个循环。扩增产物进行 $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶电泳, Gold view 显色, 紫外透射反射仪观察扩增产物条带的大小及亮度, 凝胶成像系统拍照。采用 Bio1D 软件进行图像分析, 测定产物条带的灰度值, 计算目标产物与 β -actin 的比值作为各扩增产物 mRNA 的相对表达量。

CaN 活性测定 将细胞悬液接种于 6 孔板中, 同

步化处理后按“细胞分组与处理”方法随机分组, 每组设 6 个复孔。继续培养 24 h, 收集每孔细胞于离心管中, 各加入冷生理盐水 200 μL , 反复冻融 3 次破碎细胞, 离心取上清液, 应用 BCA 法进行蛋白定量。然后根据 CaN 测定试剂盒说明书, 以钙调素作激活剂, 对硝基磷酸酚 (PNPP) 为底物, 用定磷法进行活性测定。定义每小时每毫克蛋白的 CaN 分解底物 PNPP 产生 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 无机磷的量为 1 个 CaN 的活力单位, 结果以比活力 ($\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{protein})\cdot\text{h}^{-1}$) 表示。

统计学分析 采用 SPSS 15.0, Origin 7.5 软件进行数据统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析; 如果方差齐, 则采用 Dunnett *t* 检验; 如果方差不齐, 则采用秩和检验。

结果

1 *m*-Nis 对 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 增殖的影响

MTT 实验结果表明, 与空白对照组相比, 5-HT ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组的 *A* 值升高, 说明其明显促进大鼠 PSMCs 增殖 ($P < 0.01$)。与 5-HT 组相比, *m*-Nis (1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 及 $1 \times 10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组的 *A* 值均有不同程度地下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 表明 *m*-Nis 对 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 增殖具有明显抑制作用, 并呈现一定的浓度依赖性 (表 1)。

2 5-HT 对培养的大鼠 PSMCs 内游离钙离子浓度的影响

肺动脉平滑肌细胞以 Fluo-3/AM 负载后, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察, 呈不规则的梭形或多边形, 轮廓清晰, 胞核荧光较强, 胞质较弱。Fluo-3/AM 负载的 PSMCs 图像清晰, 强弱变化可较好地显示细胞内游离钙离子浓度的变化过程。加入 5-HT ($1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 后, 荧光强度增强, 表明细胞内钙离子浓度迅速升高, 在 90 s 左右达到峰值, 然后减弱, 在 200 s 左右荧光强度达到稳定的状态, 而后有一个较长的平台期 (图 1)。

Table 1 Effect of *m*-Nis on 5-HT-induced PSMCs proliferation, CaN activity and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes in rat PSMCs

Group ($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	MTT assay (values of <i>A</i>)	CaN activity/ $\mu\text{mol Pi}\cdot\text{mg}^{-1}(\text{protein})\cdot\text{h}^{-1}$	$(\text{FI}-\text{FI}_0)/\text{FI}_0$ (%)
Control	0.48 ± 0.04	1.7 ± 0.5	3.0 ± 1.0
Vehicle + 5-HT (1×10^{-6})	$0.74 \pm 0.09^{##}$	$3.7 \pm 0.8^{##}$	$132.4 \pm 4.3^{##}$
<i>m</i> -Nis (1×10^{-8}) + 5-HT (1×10^{-6})	$0.62 \pm 0.07^*$	$3.1 \pm 0.5^*$	$54.7 \pm 2.2^{**}$
<i>m</i> -Nis (1×10^{-7}) + 5-HT (1×10^{-6})	$0.59 \pm 0.06^{**}$	$3.0 \pm 0.7^*$	$41.5 \pm 2.3^{**}$
<i>m</i> -Nis (1×10^{-6}) + 5-HT (1×10^{-6})	$0.57 \pm 0.07^{**}$	$2.9 \pm 0.6^{**}$	$33.6 \pm 9.0^{**}$
<i>m</i> -Nis (1×10^{-5}) + 5-HT (1×10^{-6})	$0.54 \pm 0.05^{**}$	$2.4 \pm 0.6^{**}$	$20.1 \pm 4.1^{**}$

$n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{##}P < 0.01$ vs control group; $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs vehicle + 5-HT ($1 \times 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. $(\text{FI}-\text{FI}_0)/\text{FI}_0$: The relative fluorescence intensity at peak time after 5-HT treatment (FI_0 and FI represent the fluorescence intensity before and after 5-HT treatment)

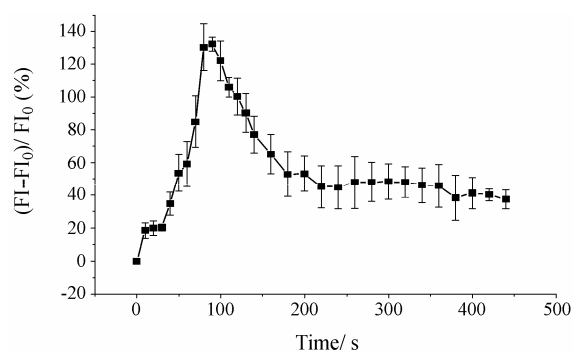


Figure 1 Effect of 5-HT on the $[Ca^{2+}]_i$ in rat PSMCs. Quantitative representation of the relative fluorescence intensity $((FI-FI_0)/FI_0)$ of the rat PSMCs before and after 5-HT treatment recorded every 5 s (FI_0 and FI represent the fluorescence intensity before and after 5-HT treatment). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

3 *m*-Nis 对 5-HT 诱导大鼠 PSMCs 内 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的影响

与 5-HT 单独处理组相比, *m*-Nis (1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 和 1×10^{-8} mol·L⁻¹) 组能明显抑制 5-HT ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 诱导的细胞内钙离子浓度的升高 (图 2)。空白对照组的 PSMCs 游离钙离子浓度变化曲线较为平坦, 没有出现较大的波动。与空白对照组相比, 5-HT ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 单独处理组达到峰值时其相对荧光强度 $(FI-FI_0)/FI_0$ 值明显升高 ($P < 0.01$), *m*-Nis (1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 和 1×10^{-8} mol·L⁻¹) 预处理组达峰值时相对荧光强度 $(FI-FI_0)/FI_0$ 值均明显下降 ($P < 0.01$, 表 1)。

4 *m*-Nis 对 5-HT 诱导大鼠 PSMCs 中 CaM 和 CaN mRNA 表达的影响

RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳及半定量

分析表明, 与空白对照组相比, 5-HT ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作用 24 h 后明显诱导大鼠 PSMCs 中 CaM 及 CaN mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$), 而 *m*-Nis (1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 和 1×10^{-7} mol·L⁻¹) 组均明显抑制了 5-HT 诱导的 CaM mRNA 表达水平的升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但 *m*-Nis (1×10^{-8} mol·L⁻¹) 组的抑制作用不明显 (图 3)。*m*-Nis (1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 和 1×10^{-8} mol·L⁻¹) 也明显抑制了 5-HT 诱导的 CaN mRNA 表达水平的升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 4)。

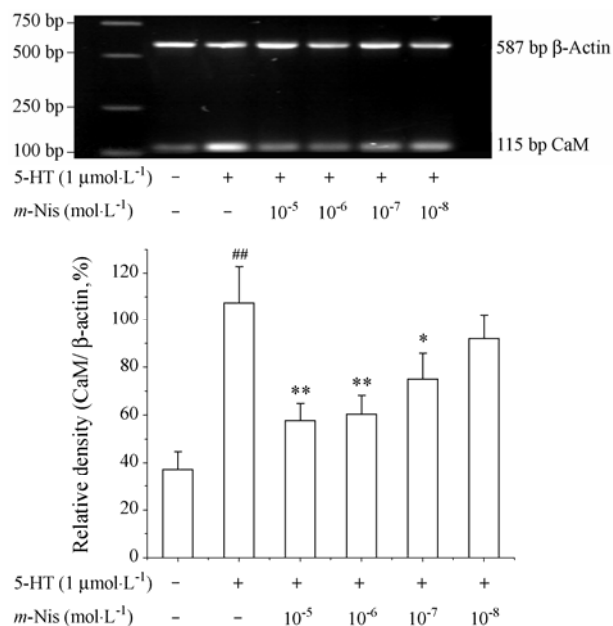


Figure 3 Effect of *m*-Nis on 5-HT-induced mRNA expression of CaM in rat PSMCs. Intensity of CaM was standardized to that of β -actin. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 5-HT group

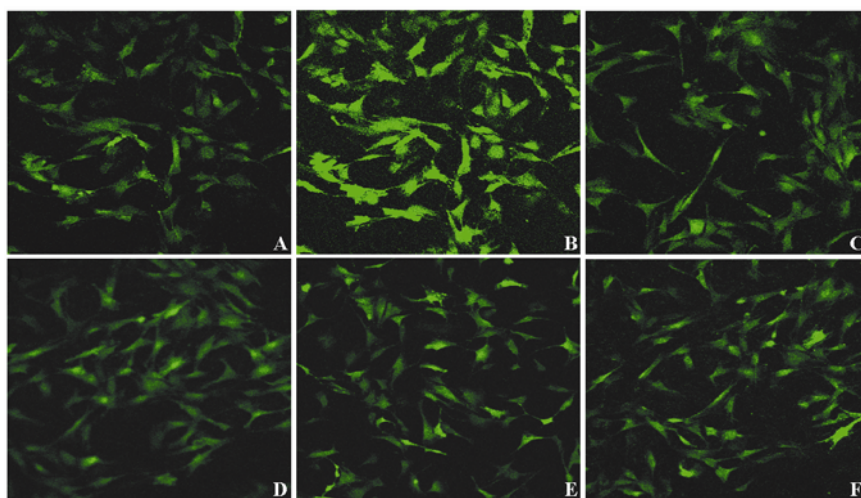


Figure 2 Effect of *m*-Nis on 5-HT-induced $[Ca^{2+}]_i$ changes in rat PSMCs. A-F: Representative fluorescence images of the rat PSMCs in control, 5-HT ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) and *m*-Nis (1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , and 1×10^{-5} mol·L⁻¹) groups

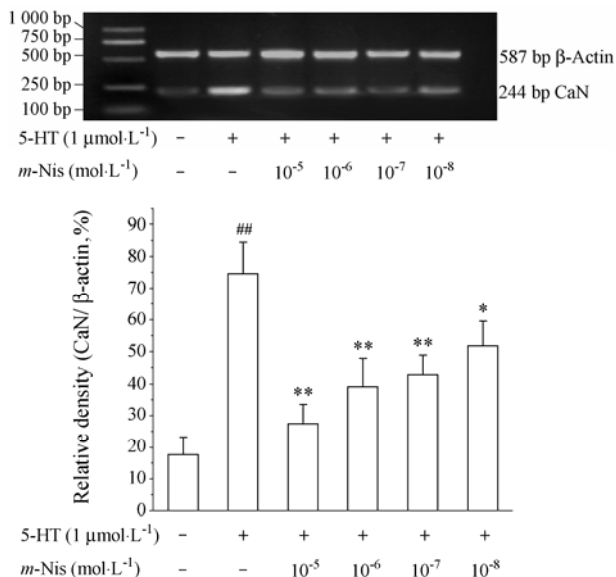


Figure 4 Effect of *m*-Nis on 5-HT-induced mRNA expression of CaN in rat PSMCs. Intensity of CaN was standardized to that of β -actin. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs 5-HT group

5 *m*-Nis 对 5-HT 诱导大鼠 PSMCs 中 CaN 活性的影响

同步化的 PSMCs 经 5-HT (1 μmol·L⁻¹) 作用 24 h 后, CaN 活性与空白对照组相比明显升高 ($P < 0.01$), 用不同浓度 *m*-Nis (1×10⁻⁵、1×10⁻⁶、1×10⁻⁷ 和 1×10⁻⁸ mol·L⁻¹) 预处理 20 min 后, 均不同程度地降低了 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 中 CaN 活性的升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 1)。

讨论

肺动脉高压时, 血管平滑肌细胞增殖、肥大, 形成肺动脉高压与血管平滑肌细胞异常增殖之间的恶性循环。血管平滑肌细胞异常增殖是高血压等血管增生性疾病的病理基础^[8]。因此, 抑制 PSMCs 增殖迁移可以防止肺血管构型重建。前期研究发现 *m*-Nis 对野百合碱诱导的肺动脉高压有一定的防治作用, 可能与其抑制肺血管重建有关^[6]。为深入探讨其机制, 本研究采用 MTT 法观察了 *m*-Nis 对 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 增殖的影响。结果表明, *m*-Nis 明显抑制了 5-HT 诱导的大鼠 PSMCs 增殖。5-HT 作为一种重要的血管活性物质, 不仅刺激 PSMCs 收缩还可造成其增生和肥大, 还能与多种细胞生长因子发生协同作用。5-HT 与受体结合后, 促使细胞内 Ca^{2+} 浓度升高是触发细胞增殖相关信号转导的始动因素。由此推断, 作为钙拮抗剂的 *m*-Nis 抑制 PSMCs 增殖的

机制, 可能是通过抑制细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的增高而阻断了一系列信号转导途径。因此, 本文研究了 *m*-Nis 对细胞内游离钙离子浓度和 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}/\text{CaN}$ 信号途径的影响, 并深入探讨了其抗 PSMCs 增殖的机制。

细胞内游离钙离子 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 在细胞信息传递过程中起着重要作用。钙离子作为细胞内第二信使, 在细胞兴奋、增殖及收缩等反应中起重要的作用。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高可激活 Ca^{2+} 依赖的信号转导蛋白 (如 MAPK) 和上调许多转录因子的表达 (c-fos、c-jun、Ras 和 NF- κ B 等), 促进细胞增殖^[9]。本研究采用激光扫描共聚焦显微镜技术, 观察了 *m*-Nis 对 5-HT 诱导的 PSMCs 内游离钙离子浓度的影响。结果表明, 加入 5-HT 后, PSMCs 荧光强度增强, 在 90 s 左右达到峰值, 然后减弱, 在 200 s 左右荧光强度达到稳定的状态, 而后有一个较长的平台期。说明 5-HT 可明显升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 参与肺血管收缩。*m*-Nis 孵育 PAMSCs 后, 显著降低了 5-HT 诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高, 揭示 5-HT 引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高与 L-型钙通道介导的外钙内流有关。

$[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化是触发细胞增殖相关信号转导的始动因素^[10]。钙信号转导涉及 Ca^{2+} 内流、胞内 Ca^{2+} 库释放、CaM、CaN 激活等环节, 最终将 Ca^{2+} 编码的信号传入胞核, 引起细胞增殖^[11]。CaM 是广泛分布于真核细胞内的一种钙结合蛋白, 其表达减少可抑制某些因素引起的平滑肌细胞增殖和迁移^[12]。CaN 是被 Ca^{2+} 活化的多功能信号酶, CaN 介导的脱磷酸化和核转位作用在信号转导途径中是一中枢性事件。它不仅本身可介导多条信号转导通路, 而且通过其去磷酸化作用可对其他信号通路进行调节, 使 Ca^{2+} 信号与其他第二信使的调节机制发生“交谈”, 协同调节细胞的功能。研究发现, CaN 信号通路与其他信号途径是互相交联的, 其可通过抑制因子 1 对 PKC 和 MAPK 进行调节^[13]。另外, 在雷尼丁刺激的平滑肌细胞增殖中亦观察到 CaN 信号通路与其他信号途径的交联^[14]。总之, CaN 依赖的信号通路在大鼠 VSMCs 增殖中发挥重要作用, 其机制可能与激活 c-fos、c-myc 表达, 进而促进 PCNA 转录有关^[15]。本实验采用 RT-PCR 检测了 CaM 和 CaN mRNA 表达水平的变化, 并观察了 CaN 活性的变化。结果发现, 在 5-HT 诱导的 PSMCs 增殖模型中, CaM 和 CaN mRNA 表达均明显增加, CaN 活性也明显升高, 说明 5-HT 通过激活钙信号途径诱导了 PSMCs 增殖。*m*-Nis 预处

理后, CaM 和 CaN mRNA 表达明显减少, CaN 活性也显著下降, 提示 *m*-Nis 的抗 PSMCs 增殖作用与其抑制 5-HT 诱导的 $[Ca^{2+}]_i$ 增加, 阻断 Ca^{2+} /CaM/CaN 信号转导途径有关。

References

- [1] Nakamura M. Chronic hypoxic pulmonary hypertension [J]. Nippon Rinsho, 2001, 59: 1181–1185.
- [2] Suzuki YJ, Day RM, Tan CC, et al. Activation of GATA-4 by serotonin in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 17525–17531.
- [3] Eddahibi S, Chaouat A, Morrell N, et al. Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease [J]. Circulation, 2003, 108: 1839–1844.
- [4] Mauban JR, Remillard CV, Yuan JX. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: role of ion channels [J]. J Appl Physiol, 2005, 98: 415–420.
- [5] Mukai K, Matsushima H, Ishii Y, et al. Effects of calcium on lens epithelial cells in rabbits [J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 2006, 110: 361–369.
- [6] Chen XY, Zhang W, Miao QF, et al. M-nisoldipine attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension by suppressing 5-HT/ERK MAPK pathway [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2008, 43: 1011–1018.
- [7] Li B, Yang L, Shen J, et al. The antiproliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells is mediated via upregulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and degradation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation [J]. Anesth Analg, 2007, 105: 1034–1041.
- [8] Landxberg BR, Frishman WH, Lerrick K. Pathophysiology and pharmacological approaches for prevention of coronary artery restensis following coronary artery balloon angioplasty and related procedures [J]. Prog Cardiovasc Dis, 1997, 39: 361–398.
- [9] Han HJ, Han JY, Heo JS, et al. ANG II-stimulated DNA synthesis is mediated by ANG II receptor-dependent Ca^{2+} /PKC as well as EGF receptor-dependent PI3K/Akt/mTOR/p70S6K1 signal pathways in mouse embryonic stem cells [J]. J Cell Physiol, 2007, 211: 618–629.
- [10] Matsushima H, Mukai K, Yoshida S, et al. Effects of calcium on human lens epithelial cells *in vitro* [J]. Jpn J Ophthalmol, 2004, 48: 97–100.
- [11] Wada H, Hasegawa K, Morimoto T, et al. Calcineurin-GATA-6 pathway is involved in smooth muscle-specific transcription [J]. J Cell Biol, 2002, 156: 983–991.
- [12] Zhang S, Yang Y, Kone BC, et al. Insulin-stimulated cyclic guanosine monophosphate inhibits vascular smooth muscle cell migration by inhibiting Ca/calmodulin-dependent protein kinase II [J]. Circulation, 2003, 107: 1539–1544.
- [13] Lim HW, New L, Han J, et al. Calcineurin enhances MAPK phosphatase1 expression and p38 MAPK inactivation in cardiac myocytes [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 15913–15919.
- [14] Yang YJ, Zhu J, Zhou XW, et al. Signaling pathway mediated cultured vascular smooth muscle cells proliferation by calcium activator [J]. Chin J Arterioscler (中国动脉硬化杂志), 2001, 9: 37–39.
- [15] Liang H, Venema VJ, Wang X, et al. Regulation of angiotensin II-induced phosphorylation of STAT3 in vascular smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 1999, 274: 19846–19851.