热和低渗刺激活化胞外 Ca^{2+} 内流机制升高大鼠滑膜细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$

孙文武 胡芬 杨文修*

(南开大学物理科学学院生物物理系, 生物活性材料教育部重点实验室, 天津 300071. * 联系人, E-mail: yangwenx@nankai.edu.cn)

摘要 类风湿关节炎是一种以关节滑膜炎为主要特征的慢性全身性自身免疫性疾病, 其发病机制尚未清楚阐明. 为了解病变关节的温度和渗透压改变对滑膜细胞病理过程的影响, 本文研究了热、低渗透压和 4α -PDD刺激大鼠关节炎模型的滑膜细胞诱发的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化特征和机制. 结果发现, 温度 28℃、低渗透压和 4α -PDD时可分别诱发 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 跃变性升高, 且随加热温度升高、渗透压降低和 4α -PDD浓度增加 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高的幅值增加; 3种刺激效应间存在相互协同作用, 且重复刺激都呈现脱敏现象. 研究表明, 热、低渗和 4α -PDD刺激诱发的滑膜细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高依赖于胞外 Ca^{2+} 内流, 而不依赖于胞内 Ca^{2+} 释放, 且被钆红和 Gd^{3+} 抑制. 以上这些特征与已知的 TRPV4 通道诸多功能特性相符. 结果提示, 在大鼠关节炎滑膜细胞中, 热和低渗刺激可能通过活化 TRPV4 功能样通道介导胞外 Ca^{2+} 内流机制升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

关键词 滑膜细胞 加热 低渗透压 4α -PDD 细胞内自由钙离子浓度

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是医学临床的多发病症, 现已明确它是一种以关节滑膜炎为主要特征的慢性全身性自身免疫性疾病^[1]. 其病因和病理过程复杂, 至今尚未清楚了解. 例如, 研究发现, 表达HLA-DR4一些亚型的患者对外界环境条件、病毒和细菌感染、患者精神状态和内分泌因素有较高的敏感性^[2]. 活化的免疫细胞大量浸润到滑膜组织, 并释放多种免疫介质, 诱发关节组织炎性反应, 导致滑膜细胞发生增殖、抗凋亡、黏附分子及蛋白酶异常表达等病理过程^[3]. 但对关节炎病变微环境的物理性变化如何参与滑膜细胞的病变过程尚不了解. 对多种细胞的研究表明, 细胞内自由钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的动态变化是调节细胞功能活动的重要第二信使^[4]. 但至今关于滑膜细胞的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 信号特征及其与细胞生理、病理的关系所知甚少. 因而, 研究一些病变相关的刺激因素, 特别是物理因素诱发滑膜细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的特征和机制, 对了解滑膜细胞在病理中的作用及深入认识类风湿关节炎的发生和发展机制都有重要意义. 根据RA患者和动物RA模型的关节出现温度变化、肿胀和关节液渗透压变化等病理现象^[5,6], 本文应用大鼠关节炎模型提取的滑膜细胞, 研究了加热和低渗透压刺激诱发细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化的特征, 确定了热和低渗刺激升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 依赖于胞外 Ca^{2+}

内流的机制.

1 材料与方法

() 动物和试剂. 雄性 Wistar 大鼠 10 只, 体重 150~250 g, 由军事医学科学院卫生学环境医学研究所提供. Fura-2/AM 购自美国 Biotium 公司; EGTA, 胶原酶, U73122, 4α -PDD (4-phorbol 12,13- didecanoate), 硝苯地平(nifedipine), GdCl_3 , 维拉帕米(verapamil), 钆红(ruthenium red, RR), TMB-8(8-(diethylamino) octyl-3,4,5-trimethoxybenzoate hydrochloride)购自美国 Sigma 公司; 弗氏佐剂、RPMI-1640 培养基为美国 Gibco 公司产品; 胎牛血清(FBS)为美国 HyClone 公司产品. 其他试剂为国产分析纯.

() 胶原诱导的大鼠关节炎模型的构建和滑膜细胞的培养. 大鼠关节炎模型构建方法参考文献^[7]进行. 滑膜细胞提取方法: 将已确定关节炎病变的大鼠麻醉后, 分离病变关节. 打开关节腔, 将分离的滑膜组织迅速置于D-Hanks液, 剪碎后置入含 Ⅰ型胶原酶无血清的DMEM溶液中, 在 37℃ 环境中放置 3 h. 尼龙网过滤后 800 r/min离心 10 min, 加入含 10%胎牛血清的DMEM培养基中, 于 37℃, 5% CO_2 环境中培养. 传 6 代以后, 得到性状稳定的成纤维样滑膜细胞^[8].

() 溶液配制. 等渗溶液(isotonic medium, ISO)按照Gao等人^[9]的方法配制: 140 mmol/L NaCl, 5.4 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L MgCl₂, 0.4 mmol/L MgSO₄, 3.3 mmol/L NaHCO₃, 2.0 mmol/L CaCl₂, 10 mmol/L HEPES, 5.5 mmol/L葡萄糖, pH 7.4, 渗透压为 300 mmol/L. 低渗溶液(hypotonic medium, HYPO)配制: 将等渗溶液中NaCl分别减少到 130, 120, 100 和 60 mmol/L, 其他成分不变, 渗透压分别为 280, 262, 225 和 150 mmol/L, 分别相当于等渗溶液的 93.5%, 87.5%, 75%和 50%. 要求溶液无Ca²⁺时用等摩尔浓度的MgCl₂ 代替CaCl₂, 同时加入 5 mmol/L的EGTA.

() 单细胞[Ca²⁺]_i的检测^[10]. 荧光指示剂Fura-2/AM溶于DMSO, 用等渗细胞外液稀释(Fura-2/AM终浓度为 5 μmol/L), 室温负载细胞 1 h后, 用等渗外液冲洗 3 次. 将载有细胞的玻片固定于特制的小池内并置于Olympus倒置显微镜载物台上, 每池加入 1 mL等渗溶液. 激发波长分别为 340 和 380 nm, 发射波长 510 nm, 曝光时间 200 ms, 分别记录 340 和 380 nm对应的荧光强度. 应用CCD (CoolSNAP)采集细胞荧光图像, Metafluor软件处理单细胞荧光变化数据. 用 F_{340}/F_{380} 比值(ratio值)代表[Ca²⁺]_i. 每种条件下进行 3 次实验, 每次观测 5~10 个细胞, 10 个以上有相似[Ca²⁺]_i图像特征的结果中取 1 例作为代表示于图中.

利用微循环泵将预加热到不同设定温度或不同渗透压的溶液分别灌流细胞以改变细胞培养液的温度和渗透压, 同时利用温度指示控制仪(WMZK-01)检测和调控溶液的实际温度.

() 统计分析. 采用 SPSS10.0 统计学软件进行统计学分析, 组间比较采用配对 *t* 检验. $P < 0.05$ 为有统计差异, $P < 0.01$ 为有显著差异.

2 结果

2.1 热刺激超过阈值温度后诱发大鼠滑膜细胞[Ca²⁺]_i显著升高

为研究热刺激对滑膜细胞[Ca²⁺]_i变化的影响, 用不同温度的溶液迅速灌流, 使细胞环境溶液的温度分别从 22 陡升到 26, 28, 30, 32 和 36 (加热速度 >1 /s), 同时记录温度陡升过程中相应的单细胞[Ca²⁺]_i动态变化(图 1(a)). 与 22 (对照)和陡升至 26 比较, 温度陡升并保持 28 过程中细胞[Ca²⁺]_i发生了跃变性的显著升高, 之后随加热温度升高[Ca²⁺]_i幅值随之升高, 且上升速度亦随之加快. 多细胞统计

的[Ca²⁺]_i变化幅值结果亦表明, 与 22 相比, 陡升到 26 时[Ca²⁺]_i升高不明显($P > 0.05$), 而陡升至 28, 30, 32 和 36 有显著差异($P < 0.01$) (图 1(b)). 以上结果表明, 在陡升到温度阈值 28 后的热刺激可以诱发滑膜细胞[Ca²⁺]_i显著升高.

温度陡升的热刺激引起细胞[Ca²⁺]_i发生的跃变性升高与不同稳定温度下细胞的基础[Ca²⁺]_i特征有明显区别(图 1(b)和(c)), 在不同稳定温度下(22, 26, 28, 32, 36), 细胞[Ca²⁺]_i随温度升高呈略有升高的恒定值. 进一步用 100 μmol/L TMB-8 (一种胞内钙库释放Ca²⁺的抑制剂^[11])预处理 10 min后再进行热刺激(22~30), 单细胞记录(图 1(d))和多细胞统计的结果均表明, TMB-8 不影响热刺激诱发的[Ca²⁺]_i升高($P > 0.05$, $n = 10$).

2.2 低渗透压溶液介导大鼠滑膜细胞[Ca²⁺]_i升高的特征

为研究渗透压变化对细胞[Ca²⁺]_i的影响, 细胞外液温度恒定于 30, 以等渗液(100%)为对照, 分别用不同的低渗溶液迅速灌流. 由图 2(a)可见, 低渗透压 87.5%后介导[Ca²⁺]_i呈显著的单峰状升高, 随渗透压下降, [Ca²⁺]_i上升速度加快, 峰值增加. 图 2(b)是多细胞的统计结果, 渗透压 87.5%时与等渗液对[Ca²⁺]_i的影响有显著差别($n = 10$, $P < 0.01$). 以上结果表明, 低渗透压溶液可介导滑膜细胞的[Ca²⁺]_i呈峰状升高, 且随渗透压下降其效应加强. 进一步应用胞内钙库释放Ca²⁺的抑制剂 TMB-8 (100 μmol/L)预处理细胞 10 min 后, 用 75%低渗溶液诱发的[Ca²⁺]_i动力学特征与图 2(a)中相应曲线比较无明显变化.

2.3 4α-PDD 诱发大鼠滑膜细胞[Ca²⁺]_i升高的特征

应用 TRPV4 通道特异性激动剂 4α-PDD 刺激细胞, 浓度分别为 0.1, 1 和 10 μmol/L, 实验温度为 30, 观察[Ca²⁺]_i的动态变化(图 3(a)). 与正常细胞溶液(对照)相比, 4α-PDD 诱发细胞[Ca²⁺]_i发生峰状的显著升高后缓慢下降, 随 4α-PDD 浓度增加[Ca²⁺]_i幅值随之升高, 且上升速率亦随之加快. 图 3(b)是对多细胞[Ca²⁺]_i峰值的统计结果, 证明大鼠滑膜细胞可以被 TRPV4 特异激动剂 4α-PDD 活化而升高[Ca²⁺]_i.

2.4 胞外 Ca²⁺和药物对热、低渗透压和 4α-PDD 刺激诱发滑膜细胞[Ca²⁺]_i变化的影响

为进一步研究 3 种刺激诱发[Ca²⁺]_i升高的机制, 分别以给予热刺激(22~30), 30 条件下的

图1 热刺激对滑膜细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

(a) 不同热刺激诱发的单细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 变化. 图上部给出温度从22℃分别陡升至26℃, 28℃, 30℃, 32℃和36℃的过程; 下部表示相应过程中 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化(用荧光比率 F_{340}/F_{380} 表示). (b) 不同热刺激诱发的多细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高幅值的统计结果($n=8$, **示 $P<0.01$). (c) 细胞在60 min内由22℃缓升到26℃, 28℃, 32℃和36℃, 稳定后检测细胞的 $[Ca^{2+}]_i$. (d) 细胞用TMB-8 (100 $\mu\text{mol/L}$)预处理10 min后热刺激(22℃陡升至30℃)诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 变化

图2 不同渗透压溶液对滑膜细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响

滑膜细胞外液恒定于30℃, 用等渗溶液(100%)作为对照. (a) 不同低渗透压(93.5%, 87.5%, 75%和50%)介导的单细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 变化; (b) 不同低渗透压介导的多细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 变化的统计结果($n=10$, **示 $P<0.01$); (c) 细胞用TMB-8 (100 $\mu\text{mol/L}$)预处理10 min后, 再用75%低渗刺激的细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 变化

图 3 4α-PDD 对滑膜细胞[Ca²⁺]_i的影响

滑膜细胞外液恒定于 30 。(a) 不同浓度 4α-PDD (0.1, 1, 10 μmol/L) 诱发的单细胞[Ca²⁺]_i变化; (b) 不同浓度 4α-PDD 诱发的多细胞[Ca²⁺]_i升高幅值的统计结果($n = 10$, **示 $P < 0.01$)

75%低渗刺激和 1.0 μmol/L 4α-PDD 刺激诱发的[Ca²⁺]_i升高(图 1(a)、图 2(a)和图 3(a)中相应条件的曲线)作为对照,研究了胞外 Ca²⁺和一些药物对 3 种刺激诱发单细胞[Ca²⁺]_i升高的影响。由图 4(a)的结果可见: () 当细胞外液无 Ca²⁺时,由热、低渗性和 4α-PDD 刺激的单细胞[Ca²⁺]_i特征性升高效应都消失了; () 用一种 TRPV4 通道阻断剂钆红 10 μmol/L 预处理 10 min,热、低渗性和 4α-PDD 刺激诱发的[Ca²⁺]_i升高都被显著抑制; () 应用另一种 TRPV4 通道抑制剂 Gd³⁺ (25 μmol/L)预处理细胞 10 min,3 种刺激诱发的细胞[Ca²⁺]_i升高都基本消失; () 用磷脂酶 C 抑制剂 U73122 (25 μmol/L)预处理 10 min,对上述 3 种刺激升高[Ca²⁺]_i的特征性效应基本无影响; () 用细胞膜电压门控 Ca²⁺通道阻断剂硝苯地平 and 维拉帕米(各 20 μmol/L)预处理细胞 5 min,对上述 3 种刺激诱发的特

征性[Ca²⁺]_i升高基本无抑制作用。图 4(b)是上述实验对多细胞的统计结果。以上结果表明,胞外无 Ca²⁺条件下,3 种刺激不能诱发的[Ca²⁺]_i升高,表明[Ca²⁺]_i升高依赖于胞外 Ca²⁺内流;TRPV4 通道抑制剂 Gd³⁺和 RR 基本抑制了 3 种刺激诱发的依赖于 Ca²⁺内流的[Ca²⁺]_i升高;硝苯地平 and 维拉帕米及 U73122 不能抑制 3 种刺激诱发的[Ca²⁺]_i升高。这些结果提示,热和低渗刺激诱发滑膜细胞的[Ca²⁺]_i升高可能与 4α-PDD 有相同的机制。

2.5 加热、低渗透压及 4α-PDD 刺激诱发滑膜细胞[Ca²⁺]_i变化的相互关系

在上述实验中,发现热刺激、低渗透压和 4α-PDD 均能诱发滑膜细胞[Ca²⁺]_i升高,我们进一步研究了这 3 种刺激诱发的[Ca²⁺]_i升高之间的相互关系。首

图 4 胞外 Ca²⁺和药物对加热、低渗透压和 4α-PDD 诱发的滑膜细胞[Ca²⁺]_i升高的影响

(a) 对照条件:热刺激均为温度从 22 度升至 32 度;低渗刺激用 30 的 75%低渗液灌流;4α-PDD (1 μmol/L)实验条件为 30 。给药条件:钆红(10 μmol/L)预处理 10 min;Gd³⁺ (25 μmol/L)预处理 10 min;U73122 (25 μmol/L)预处理 10 min;硝苯地平 and 维拉帕米(各 20 μmol/L)预处理 5 min。横坐标为时间尺度(s),纵坐标为[Ca²⁺]_i变化的尺度(实验值与基础值的 F₃₄₀/F₃₈₀ 差值,用 ΔR 表示)。(b) 上述各种条件下诱发的多细胞[Ca²⁺]_i变化的统计结果

先,加热(20 陡升到 30)和低渗(75%)同时刺激滑膜细胞,结果(图 5(a))显示这两种刺激诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 单峰状升高明显高于稳定的 30 时单独低渗刺激的效果;其次,加热(20 陡升到 30)和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 4 α -PDD 同时刺激细胞诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高显著大于稳定的 30 时单独 4 α -PDD 的作用(图 5(b));相似地,低渗性刺激(75%)和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 4 α -PDD 同时作用诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高也显著强于单独 4 α -PDD 作用(图 5(c)).这些结果表明了 3 种刺激诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的作用间有明确的协同效应.

我们又分别研究了重复施加刺激的效应,以进一步了解加热、低渗和 4 α -PDD 诱发滑膜细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高的特征:()在等渗溶液条件下每隔 200 s 给予一次 22 陡升至 30 并持续 10 s 的热刺激,连续 3 次;()在 28 恒温条件下,每隔 200 s 给予一次持续 100 s 的 75%的低渗溶液灌流;()在 30 恒温条件下,每隔 200 s 给予一次 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 4 α -PDD 的刺激,期间用无 4 α -PDD 的细胞外液换洗一次.图 5(d)~(f)的结果表明,随加热、低渗和 4 α -PDD 刺激次数增加, $[Ca^{2+}]_i$ 峰值都逐渐降低,说明 3 种重复的刺激诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高均呈现脱敏效应.

3 讨论

本文研究了热刺激和细胞外液渗透压降低对大鼠关节炎模型提取的滑膜细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响,发现了关节炎滑膜细胞存在一种温度敏感的、低渗透压活化的依赖于 Ca^{2+} 内流的升高 $[Ca^{2+}]_i$ 的机制.其基本特征如下:()加热温度从 22 陡升到 28 时可显著升高 $[Ca^{2+}]_i$,随加热温度升高, $[Ca^{2+}]_i$ 升高速率加快,幅值增加;()低渗透压刺激可诱发 $[Ca^{2+}]_i$ 升高,且随渗透压降低其效应增强;()胞外无 Ca^{2+} 条件下,热和低渗刺激诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高消失;()在不同稳定温度下(26~36 范围),细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 只呈现恒定的小幅值升高;()一种胞内钙库释放钙抑制剂 TMB-8 不影响热和低渗刺激的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高.这些结果表明,在一定温度阈值以上的热刺激和低渗诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高依赖于胞外 Ca^{2+} 内流.

近年来,一类介导胞外 Ca^{2+} 内流的 TRP 通道超家族引起了广泛重视,它们是 6 次跨膜的正离子通道,其中 TRPV4 通道可以被多种刺激因素活化,包括温热性刺激、低渗性、化学物及机械性刺激等,通道活化导致胞外的 Ca^{2+} 和 Na^{+} 内流.据报道,TRPV4 通道的功能特性包括:热刺激活化的温度阈值是 27 ;

图5 热、低渗和 4 α -PDD 刺激诱发滑膜细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 升高间的相互关联性及耐受性

(a) 加热(20 陡升到 30)和低渗(75%)同时刺激细胞诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高显著高于稳定 30 条件下单独低渗刺激的结果;(b) 加热(20 陡升到 30)和 1 $\mu\text{mol/L}$ 4 α -PDD 诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高显著高于稳定 30 条件下单独 4 α -PDD 刺激的结果;(c) 低渗性刺激(75%)和 4 α -PDD (1 $\mu\text{mol/L}$)诱发的 $[Ca^{2+}]_i$ 升高显著高于 30 条件下单独 4 α -PDD 刺激的结果;(d)~(f) 加热(从 22 陡升到 30)、低渗(75%)和 4 α -PDD (1 $\mu\text{mol/L}$)重复刺激细胞时导致 $[Ca^{2+}]_i$ 峰值随刺激次数增加逐渐下降

可直接被低渗溶液和一定范围的流体切应力活化^[12]，也可被内源性的花生四烯酸(AA)代谢产物 5',6'-EET 活化；佛波脂衍生物 4 α -PDD 是其特异性激活剂；钆红和 Gd³⁺ 对 TRPV4 通道有特异性抑制作用^[13~16]。另外报道，与室温条件比较，在 37 条件下 4 α -PDD、低渗和机械刺激诱发的转染于 HEK293 细胞中的 TRPV4 通道电流和 [Ca²⁺]_i 升高显著增强^[9]，同时 4 α -PDD 预处理的细胞，热活化通道的阈值亦降低^[17]。上述结果表现出这些物理和化学刺激活化该通道作用的相互依赖性。

我们得到热和低渗刺激诱发滑膜细胞 [Ca²⁺]_i 升高的特征后，为了了解其引发胞外 Ca²⁺ 内流的机制，应用 TRPV4 的特异性激动剂 4 α -PDD 研究了其诱发滑膜细胞 [Ca²⁺]_i 升高的特征；同时研究了一些抑制剂分别对 4 α -PDD、热和低渗刺激诱发 [Ca²⁺]_i 升高的影响。结果表明，4 α -PDD 诱发的滑膜细胞 [Ca²⁺]_i 升高特征与其活化已知的 TRPV4 通道的特征相同，说明该细胞存在 TRPV4 通道功能。同时，钆红与 Gd³⁺ 对 4 α -PDD、热和低渗刺激的 [Ca²⁺]_i 升高都有极显著的抑制作用，电压门控 Ca²⁺ 通道抑制剂硝苯地平和维拉帕米及 PLC 抑制剂 U73122 基本不影响 3 种刺激诱发的 [Ca²⁺]_i 升高。这些结果表明，加热、低渗和 4 α -PDD 活化的胞外 Ca²⁺ 内流机制的相似性。

为进一步认识 3 种刺激活化滑膜细胞 Ca²⁺ 内流机制是否属于同一类通道的功能，我们分别研究了加热和低渗、加热和 4 α -PDD 及低渗和 4 α -PDD 同时刺激细胞对 [Ca²⁺]_i 升高的影响，这些新的结果表明，这些刺激每两种之间都有很好的协同作用，表现出 3 种刺激对胞外 Ca²⁺ 内流同一机制作用的叠加效应。我们又确定了 3 种刺激分别多次重复作用都表现出相似的对 [Ca²⁺]_i 升高的脱敏效应，这也是已知的 TRPV4 通道的特征之一。这些结果进一步表明，热和低渗刺激与 4 α -PDD 活化的 Ca²⁺ 内流是相同的机制，提示在大鼠类风湿关节炎模型的滑膜细胞中，热和低渗刺激的 [Ca²⁺]_i 升高可能依赖于一种 TRPV4 功能样的通道介导胞外 Ca²⁺ 内流。研究表明，TRPV4 通道在多种组织的细胞表达，包括中枢神经系统、外周神经和神经感觉细胞、肺脏、肾脏、肝脏、血管内皮和平滑肌细胞等^[12,18]，并且 TRPV4 通道表达情况受病理条件的影响^[19,20]。新近在滑膜肿瘤细胞中检测到 TRPV4 的 mRNA^[21]，但在正常滑膜及类风湿关节炎滑膜细胞上的 TRPV4 通道蛋白表达情况及相关功能的检测没

有报道。我们的实验结果表明，热和低渗刺激诱发 [Ca²⁺]_i 升高的特性符合 TRPV4 通道的功能性特征，但尚需用分子生物学方法进一步证实类风湿关节炎模型的滑膜细胞膜上存在 TRPV4 通道蛋白，并用电生理方法研究其单通道电流的功能性和药理学特征。

根据医学临床报告，类风湿关节炎患者的关节液的渗透压较正常值降低^[6]，同时病变关节局部温度变化伴有疼痛加剧。我们的研究表明，加热到温度阈值以上和低渗可通过活化关节炎滑膜细胞 Ca²⁺ 内流机制显著升高 [Ca²⁺]_i。[Ca²⁺]_i 升高作为重要第二信使，可调节其他与病变相关的信号分子活性及蛋白表达，已有报道表明耳毛神经细胞通过活化 TRPV4 升高细胞 [Ca²⁺]_i 的途径增加 NO 生成^[22]。我们的实验也证实，75% 低渗的细胞外液可增加 NO 产物(数据没有给出)，NO 也是参与类风湿关节炎病理过程的重要炎性介质。另据报道，由于炎性介质前列腺素(PGE₂)等在炎症部位的敏化作用，降低了热和力刺激活化神经感觉细胞 TRPV4 通道的阈值，从而增强神经对温度变化和机械刺激的疼痛过敏反应^[23~26]，提示这些可能是温度变化和低渗透压介导类风湿关节炎滑膜细胞病理过程的一种机制，参与关节炎的红肿热痛病理过程。我们的研究结果为从新的视角认识关节炎滑膜细胞病理机制及相关治疗的新途径提供了一定基础。

参 考 文 献

- 1 Tsubaki T, Arita N, Kawakami T, et al. Characterization of histopathology and gene-expression profiles of synovitis in early rheumatoid arthritis using targeted biopsy specimens. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7: R825—R836[DOI]
- 2 Salmon M, Akbar A N. Telomere erosion: A new link between HLA DR4 and rheumatoid arthritis? *Trends Immunol*, 2004, 25, 7: 339—341[DOI]
- 3 McInnes I B, Liew F Y. Cytokine networks-towards new therapies for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2005, 1: 31—39[DOI]
- 4 Gallo E M, Cante-Barrett K, Crabtree G R. Lymphocyte calcium signaling from membrane to nucleus. *Nat Immunol*, 2006, 7: 25—32[DOI]
- 5 de Silva M, Kyle V, Hazleman B, et al. Assessment of inflammation in the rheumatoid knee joint: Correlation between clinical, radioisotopic, and thermographic methods. *Ann Rheum Dis*, 1986, 45: 277—280
- 6 Shanfield S, Campbell P, Baumgarten M, et al. Synovial fluid osmolality in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Clin Orthop Relat Res*, 1988, 235: 289—295
- 7 Shou J, Bull C M, Li L, et al. Identification of blood biomarkers of

- rheumatoid arthritis by transcript profiling of peripheral blood mononuclear cells from the rat collagen-induced arthritis model. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8: R28[DOI]
- 8 Hinoi E, Ohashi R, Miyata S, et al. Excitatory amino acid transporters expressed by synovial fibroblasts in rats with collagen-induced arthritis. *Biochem Pharmacol*, 2005, 70: 1744—1755[DOI]
 - 9 Gao X, Wu L, O'Neil R G. Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: Activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem*, 2003, 278: 27129—27137[DOI]
 - 10 Jiu Y M, Hu Z T, Liu J, et al. α -LTX and α -LTX-(N4C) induce $[Ca^{2+}]_i$ elevation through different mechanisms in pancreatic β cells. *Chin Sci Bull*, 2006, 51: 158—163[DOI]
 - 11 Tosuji H, Seki Y, Kyozuka K, et al. Two phases of calcium requirement during starfish meiotic maturation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2007, 147: 432—437[DOI]
 - 12 Liedtke W, Choe Y, Marti-Renom M A, et al. Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell*, 2000, 103: 525—535[DOI]
 - 13 Vriens J, Watanabe H, Janssens A, et al. Cell swelling, heat, and chemical agonists use distinct pathways for the activation of the cation channel TRPV4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 396—401[DOI]
 - 14 Vriens J, Owsianik G, Fisslthaler B, et al. Modulation of the Ca^{2+} permeable cation channel TRPV4 by cytochrome P450 epoxygenases in vascular endothelium. *Circ Res*, 2005, 97: 908—915[DOI]
 - 15 Watanabe H, Davis J B, Smart D, et al. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem*, 2002, 277: 13569—13577[DOI]
 - 16 Liu X, Bandyopadhyay B, Nakamoto T, et al. A role for AQP5 in activation of TRPV4 by hypotonicity: Concerted involvement of AQP5 and TRPV4 in regulation of cell volume recovery. *J Biol Chem*, 2006, 281: 15485—15495[DOI]
 - 17 Chung M K, Lee H, Caterina M J. Warm temperatures activate TRPV4 in mouse 308 keratinocytes. *J Biol Chem*, 2003, 278: 32037—32046[DOI]
 - 18 Nilius B, Vriens J, Prenen J, et al. TRPV4 calcium entry channel: A paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 286: C195—C205[DOI]
 - 19 Mangos S, Liu Y, Drummond I A. Dynamic expression of the osmosensory channel trpv4 in multiple developing organs in Zebrafish. *Gene Expr Patterns*, 2007, 7: 480—484[DOI]
 - 20 Fu Y, Subramanya A, Rozansky D, et al. WNK kinases influence TRPV4 channel function and localization. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290: F1305—F1314[DOI]
 - 21 Kochukov M Y, McNearney T A, Fu Y, et al. Thermosensitive TRP ion channels mediate cytosolic calcium response in human synoviocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 291: C424—C432[DOI]
 - 22 Takeda-Nakazawa H, Harada N, Shen J, et al. Hyposmotic stimulation-induced nitric oxide production in outer hair cells of the guinea pig cochlea. *Hear Res*, 2007, 230: 93—104 [DOI]
 - 23 Alessandri-Haber N, Dina O A, Yeh J J, et al. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *J Neurosci*, 2004, 24: 4444—4452[DOI]
 - 24 Alessandri-Haber N, Dina O A, Joseph E K, et al. A Transient receptor potential vanilloid 4-dependent mechanism of hyperalgesia is engaged by concerted action of inflammatory mediators. *J Neurosci*, 2006, 26: 3864—3874[DOI]
 - 25 Liedtke W. Transient receptor potential vanilloid channels functioning in transduction of osmotic stimuli. *J Endocrinol*, 2006, 191: 515—523[DOI]
 - 26 Alessandri-Haber N, Yeh J J, Boyd AE, et al. Hypotonicity induces TRPV4-Mediated nociception in rat. *Neuron*, 2003, 39: 497—511[DOI]

· 招 聘 ·

中国科学院生物物理研究所范祖森课题组招聘副研究员及博士后

中国科学院生物物理研究所范祖森实验室主要从事肿瘤发生的分子基础、免疫活性细胞介导的肿瘤杀伤机制以及肿瘤与传染性疾病的免疫治疗等领域的研究。拥有一支全天候的创新研究队伍，正从事着学科前沿领域的研究探索(Fan Z, et al. *Cell*, 2003; *Nature Immunology*, 2003; *Blood*, 2006; Lu H et al. *J Immunol*. 2006; Zhao T et al. *Cell Death Differ & JBC*, 2007; Hua G, et al. *JBC*, 2007 etc).

因工作需要，特招聘博士后和副研究员。受聘者应最近在结构生物学、生物化学、细胞生物学、免疫学及生物医学等相关领域获得博士学位，在一流实验室接受过博士或博士后训练，具有良好的研究论文发表和英语写作交流能力，并具有良好的组织协调能力。薪酬将根据应聘者个人能力面议。请应聘者将个人简历、陈述以及推荐信发送至 fanz@moon.ibp.ac.cn; Tel: 010-64888457.

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb2007-52-23-2752>