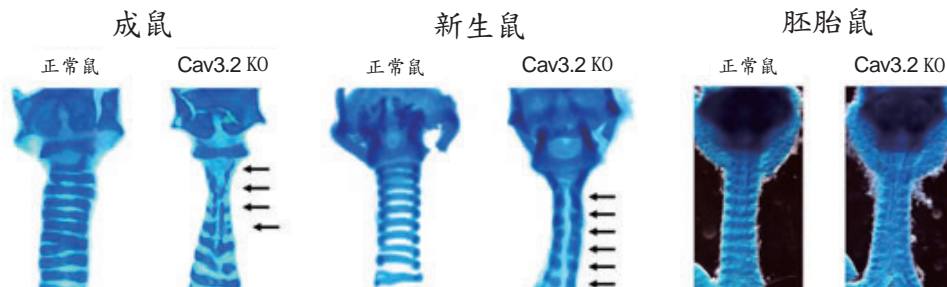


知識天地

鈣離子通道與氣管發育

林鑫秀博士、陳建璋副研究員（生物醫學科學研究所）

鈣離子（ Ca^{2+} ）傳遞細胞內許多重要的訊息：從草履蟲的游泳、身體內荷爾蒙的分泌、神經訊息的傳送或是肌肉的收縮，鈣離子都參與其中。鈣離子通道（ Ca^{2+} channel）是細胞膜上負責控制鈣離子流動的蛋白質；鈣離子通道的開或關可由細胞膜電位（voltage）的改變或其他方式來控制，那些由膜電位控制的鈣離子通道又可分為高電位驅動（HVA）、及低電位驅動（LVA）一或稱為T型鈣離子通道一兩大類。本實驗室主要研究T型鈣離子通道。我們利用Cav3.2 T型鈣離子通道基因剔除（Cav3.2 KO）小鼠來研究Cav3.2參與心室肥大症與慢性疼痛的病理機制。同時我們也發現Cav3.2 KO小鼠呼吸時會發出不正常的咻咻聲，檢查後發現Cav3.2 KO小鼠有氣管狹窄的現象。利用Alcian blue染色觀察小鼠的氣管，我們發現Cav3.2 KO小鼠有先天性的氣管軟骨環發育缺失（圖一）。



圖一 Cav3.2 KO小鼠有先天性的氣管軟骨環發育問題。箭頭指出斷裂的氣管軟骨環。比例尺: 300 μm 。

哺乳動物的呼吸系統是由執行大氣和血液之間交換氣體有關的器官組成，這些內含空腔的器官，起自鼻孔而終止於肺部內的支氣管形成一個連續的管道，稱為呼吸道。呼吸道是氣體進出肺的通道，臨床上以環狀軟骨(cricoid cartilage)為界，把鼻、咽、會厭合稱為上呼吸道(upper respiratory tract)；氣管、支氣管、肺內的各級支氣管及肺合稱為下呼吸道(low respiratory tract)，下呼吸道中肺內的各級支氣管，其大小分支好像一棵倒置的樹，故又稱為支氣管樹(tracheobronchial tree)。

呼吸道若發生阻塞，不正常的氣流因摩擦呼吸道會產生喘鳴聲(stridor)：吸氣時對咽喉與氣管產生壓力，若氣管結構不健全將造成氣管塌陷，使得吸氣時氣流的流速增加，急速的氣流振動到聲帶，就會產生喘鳴聲。因此，若氣管結構不健全，呼吸就會不順暢。氣管位於食道的前方，從環狀軟骨開始延伸到左右主支氣管分枝前，為一後壁略為平整的半圓形管狀結構，由軟骨、肌肉、結締組織及黏膜所構成。人類約有16-20個C型軟骨環(C-shaped cartilaginous ring)水平排列撐開整個氣管通道保持氣體暢通，正常的氣管也存在少數Y型軟骨環。C型軟骨環的開口向背部，透過氣管平滑肌(trachealis muscle)連接C型軟骨環的兩端，軟骨環間則由韌帶結締組織連接，這一系列的構造維持氣管管徑的支持力，使氣管壁不會在呼吸過程中向內塌陷而阻塞氣道。

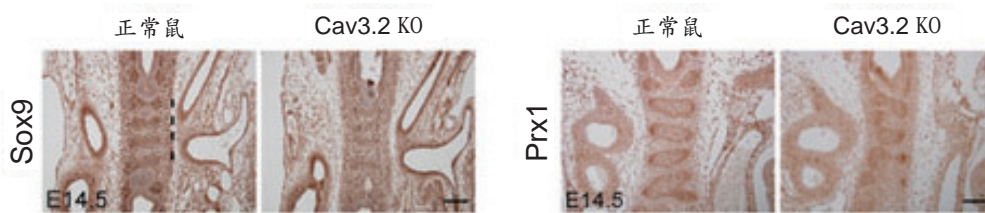
為何氣管要選擇C型軟骨來支撐通道，而不是完整的O型軟骨環？原因是C型比O型軟骨環更能增加氣管通道的張力與彈性。C型軟骨環可利用與其兩端相連的氣管平滑肌幫忙，藉由氣管平滑肌的擴張與收縮來調整管徑，這樣可以隨時因呼吸量增大，容許被大量的氣流撐開氣管，可利於激烈運動時所需要的呼吸調節；或者咳嗽時，氣管平滑肌可以強烈收縮，促使氣體快速排出體外，這時由於有C型軟骨環的支持，維持氣管開通，避免造成換氣困難。同時開口朝向食道的C型軟骨環可使位於氣管後方的食道有伸展空間的餘地。吞嚥時食物會撐開食道管壁，進而壓迫到鄰近的氣管，氣管藉助平滑肌之彈性，可容許被食物撐開的食道微微壓迫到氣管，卻不使其變形。正常的氣管軟骨是維持氣管通道的重要支柱，若氣管軟骨發育不良，任何微小的壓力都可使它塌陷而產生呼吸阻塞。臨床上常見氣管軟骨不正常的病因，有部分來自於胚胎發展時期某種因素導致氣管軟骨發育障礙，而形成不同類型和程度的畸形。

氣管的發育一開始有來自前腸的內胚層(anterior foregut endoderm)和內臟中胚層(splanchnic mesoderm)，分別構成管道的內壁和外壁兩層。管道的外壁會逐漸分化成為結締組織並開始發展出軟骨和平滑肌；而內壁會分化成上皮組織並開始形成腺體。隨著咽弓(pharyngeal arch)的發展，神經脊細胞(neural crest cell)也移動至此，形成保護氣管周圍的彈性纖維(elastic fiber)，可以避免氣管受到撞擊等外力時的傷害。軟骨屬於結締組織的一種，基本由軟骨細胞(chondrocyte)及細胞外基質(extracellular matrix, ECM)構成，主要功能為支持與保護作用。

軟骨的生成過程(chondrogenesis)主要可分為三個步驟，一開始間葉細胞 (mesenchymal cell)大量的增生 (proliferation)，增生的間葉細胞逐漸緻密堆積(condensation)，緻密堆積的間葉細胞開始進入軟骨細胞分化(chondrogenic differentiation)，先分化成軟骨母細胞(chondroblasts)，軟骨母細胞隨即大量生成，造成許多膠原纖維及細胞外基質在此處堆積，最後分化成軟骨細胞。對於軟骨的生成，Sox9扮演很重要的影響分子。Sox9是一個轉錄因子(transcription factor)，屬於具有HMG (higher mobility group) domain的 Sox蛋白質家族，Sox9可以結合DNA序列，對於基因的調控有重要的生理意義，而且在各物種皆有發現並有高度的相似度，其功能包括了神經分化、淋巴球分化、性別分化及軟骨形成等等。對於哺乳動物胚胎的軟骨形成過程相當重要，是參與調控軟骨生成、決定間葉細胞分化成軟骨細胞的主要因子。臨床研究上發現，人類Sox9基因的突變會造成軟骨發育不全，更甚而導致男性變女性的性別轉變(sexreversal)。

過去的研究發現，有些基因剔除小鼠有氣管軟骨發育的缺陷，這些基因包括Tmem16a (Rock et al., 2008)、Tbx4/Tbx5 (Arora et al., 2012)、Cftr (Bonvin et al., 2008)、Shh (Miller et al., 2004)、Hoxa-5 (Aubin et al., 1997)、Traf4 (Regnier et al., 2002)、FoxF1 (Mahlapuu et al., 2001)、Raldh2 (Vermot et al., 2003)、Wnt7b (Rajagopal et al., 2008)、Fgfr2c (Eswarakumar et al., 2004) 和幾種 retinoic acid receptors (Mendelsohn et al., 1994)。然而遺憾的是上述研究未對這些基因如何影響氣管軟骨發育的機制有更進一步地研究，因此目前對於氣管軟骨生成分子機制尚不完全明瞭。

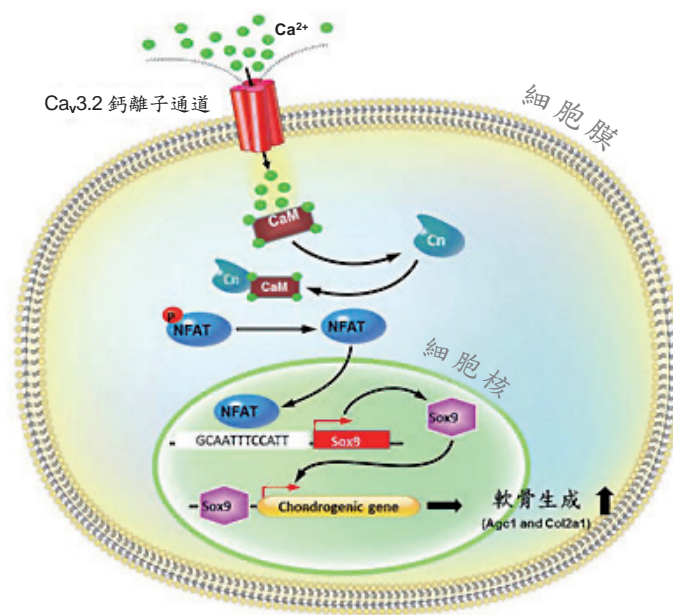
由於我們發現Cav3.2 KO小鼠有先天性的氣管軟骨環發育缺失，而且已知細胞內的鈣離子對於間葉細胞分化成軟骨細胞的初期是很重要的，因此我們利用Cav3.2 KO小鼠為模式，來研究氣管軟骨生成的分子機制。首先我們發現，Sox9蛋白的表現量在Cav3.2 KO小鼠的氣管間葉細胞比正常小鼠明顯降低且其分布的位置也改變，間葉細胞在Cav3.2 KO胎鼠的氣管無法形成正常的聚集(圖二)。這些結果顯示Cav3.2 T型鈣離子通道，可能參與調控Sox9基因的表現。利用培養的ATDC5 軟骨前驅細胞(chondroprogenitor cell)，我們發現增加Cav3.2 的表現量可促使ATDC5細胞往軟骨細胞分化，包含產生更多的Sox9、第二型膠原蛋白(Col2a1)、聚合醣類(Agc1)與醣胺多醣；反之如果使用T-型鈣離子通道阻斷劑，阻斷鈣離子流入細胞，軟骨分化的現象則明顯受到抑制，說明流經Cav3.2鈣離子通道的鈣離子有助於誘導ATDC5朝向軟骨生成的能力。



圖二 Cav3.2 KO小鼠氣管的間葉細胞成不正常的排列。組織免疫染色偵測Sox9和Prx1(兩者都是間葉細胞標誌蛋白)在胎鼠氣管的表現。Sox9和Prx1蛋白在野生正常型的胎鼠氣管能形成清晰的條帶狀結構，但在Cav3.2 KO胎鼠氣管中無法聚集成清楚的條帶狀結構。比例尺: 100 μ m。E14.5，胚胎期第14.5天。

更進一步探討Cav3.2誘導ATDC5 軟骨生成的細胞內訊號傳遞機制時，我們發現Cav3.2 透過活化去磷酸化酵素—鈣調磷酸酶(calcineurin, Cn)—造成T淋巴細胞核因子(nuclear factor of activated T lymphocyte, NFAT) 的活化，誘導ATDC5 軟骨細胞分化；實驗也證實鈣調磷酸酶的抑制劑—cyclosporin A—也能阻斷Cav3.2促進的軟骨生成；最後並找到Sox9基因的上游調控區有一個NFAT蛋白結合位置。我們的研究顯示: 鈣離子經由Cav3.2 T型鈣離子通道進入細胞，透過活化calcineurin/NFAT蛋白的訊號傳遞路徑調控Sox9蛋白的表現，進而調控小鼠氣管軟骨的生成(圖三)。

軟骨是身體中非常特殊的組織，因為缺乏血管系統的支持，軟骨細胞自身的修復能力極差。我們的研究中發現Cav3.2具有促進軟骨生成的潛力(Lin et al., 2014)，並且找出參與調控軟骨生成的機制，期望未來這項研究方向能延伸探討Cav3.2與軟骨修復的關係，能進一步應用於臨床之軟骨組織修復與再生。



圖三 Cav3.2 T型鈣離子通道在間葉細胞調控小鼠氣管軟骨生成之訊號傳遞示意圖。

參考文獻：

- Arora, R., Metzger, R.J., and Papaioannou, V.E. (2012). Multiple roles and interactions of Tbx4 and Tbx5 in development of the respiratory system. *PLoS genetics* 8, e1002866.
- Aubin, J., Lemieux, M., Tremblay, M., Berard, J., and Jeannotte, L. (1997). Early postnatal lethality in Hoxa-5 mutant mice is attributable to respiratory tract defects. *Dev Biol* 192, 432-445.
- Bonvin, E., Le Rouzic, P., Bernaudin, J.F., Cottart, C.H., Vandebrouck, C., Crie, A., Leal, T., Clement, A., and Bonora, M. (2008). Congenital tracheal malformation in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. *The Journal of physiology* 586, 3231-3243.
- Eswarakumar, V.P., Horowitz, M.C., Locklin, R., Morriss-Kay, G.M., and Lonai, P. (2004). A gain-of-function mutation of Fgfr2c demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 12555-12560.
- Lin SS, Tzeng BH, Lee KR, Smith RJ, Campbell KP, Chen CC. (2014). Cav3.2 T-type calcium channel is required for the NFAT-dependent Sox9 expression in tracheal cartilage. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, E1990-E1998.
- Mahlapuu, M., Enerback, S., and Carlsson, P. (2001). Haploinsufficiency of the forkhead gene Foxf1, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations. *Development* 128, 2397-2406.
- Mendelsohn, C., Lohnes, D., Decimo, D., Lufkin, T., LeMeur, M., Chambon, P., and Mark, M. (1994). Function of the retinoic acid receptors (RARs) during development (II). Multiple abnormalities at various stages of organogenesis in RAR double mutants. *Development* 120, 2749-2771.
- Miller, L.A., Wert, S.E., Clark, J.C., Xu, Y., Perl, A.K., and Whitsett, J.A. (2004). Role of Sonic hedgehog in patterning of tracheal-bronchial cartilage and the peripheral lung. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 231, 57-71.
- Rajagopal, J., Carroll, T.J., Guseh, J.S., Bores, S.A., Blank, L.J., Anderson, W.J., Yu, J., Zhou, Q., McMahon, A.P., and Melton, D.A. (2008). Wnt7b stimulates embryonic lung growth by coordinately increasing the replication of epithelium and mesenchyme. *Development* 135, 1625-1634.
- Regnier, C.H., Masson, R., Kedinger, V., Textoris, J., Stoll, I., Chenard, M.P., Dierich, A., Tomasetto, C., and Rio, M.C. (2002). Impaired neural tube closure, axial skeleton malformations, and tracheal ring disruption in TRAF4-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 5585-5590.
- Rock, J.R., Futtner, C.R., and Harfe, B.D. (2008). The transmembrane protein TMEM16A is required for normal development of the murine trachea. *Developmental Biology* 321, 141-149.
- Vermot, J., Niederreither, K., Garnier, J.M., Chambon, P., and Dolle, P. (2003). Decreased embryonic retinoic acid synthesis results in a DiGeorge syndrome phenotype in newborn mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1763-1768.