

- vel protein, PSP, in rat hepatoma cdRLh 84 - beared tumor[J]. J Vet Med Sci, 2003, 65(7): 781 - 785
- 4 Farkas A, Nardai G, Csermely P, *et al.* DUK114, the Drosophila orthologue of bovine brain calpain activator protein, is a molecular chaperone[J]. Biochem J, 2004, 383(1): 165 - 170
- 5 Segura MM, Mangion M, Gaillet B, *et al.* New developments in lentiviral vector design, production and purification[J]. Expert Opin Biol Ther, 2013, 13(7): 987 - 1011
- 6 Kuranaga E. Beyond apoptosis: caspase regulatory mechanisms and functions in vivo [J]. Genes Cells, 2012, 17(2): 83 - 97
- 7 马雯, 陈虹, 黄秉仁, 等. RYBP 慢病毒表达载体的构建及对结肠癌细胞 HCT116 增殖的影响[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(9): 37 - 41
- 8 Suzuki K, Nishida T, Matsumoto M, *et al.* Purification, characterization and developmental expression of rat brain PSP protein[J]. Biochim Biophys Acta, 2001, 1527(1-2): 47 - 53
- 9 Kaneki K, Matsumoto M, Suzuki K, *et al.* Purification, characterization and developmental expression of pig liver PSP[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2003, 134(4): 571 - 578
- 10 Nordin H, Matsumoto M, Suzuki K, *et al.* Purification, characterization and developmental expression of chick (Gallus domesticus) liver PSP protein[J]. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 2001, 128(1): 135 - 143
- 11 Kaneki K, Kanouchi H, Matsumoto M, *et al.* Down regulation of a novel protein, PSP, in rat hepatoma cdRLh 84 - beared tumor[J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2003, 65(7): 781 - 785
- 12 Chong CL, Huang SF, Hu CP, *et al.* Decreased Expression of UK114 Is Related to the Differentiation Status of Human Hepatocellular Carcinoma[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2008, 17(3): 535 - 542

(收稿日期: 2014 - 04 - 09)

(修回日期: 2014 - 04 - 30)

低氧降低大鼠肺动脉平滑肌细胞 Kv1.5 通道表达的 p38MAPK 通路机制

王园园 郑梦晓 黄林静 马迎春 钱小英 王万铁

摘要 **目的** 探讨低氧对肺细小动脉平滑肌细胞 Kv1.5 通道表达的影响及其与 p38 MAPK 通路的关系, 明确低氧性肺动脉高压(HPH)的发病机制。**方法** SPF 级雄性 SD 大鼠, 超净工作台内分离 3 ~ 4 级肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)。采用 p38MAPK 通路抑制剂 SB203580 和激活剂茴香霉素干预低氧过程。细胞传至 3 ~ 6 代后随机分为 5 组: 正常对照组(N), 低氧组(H), 低氧 + DMSO 组(HD), 低氧 + SB203580 组(HS), 低氧 + 茴香霉素组(HA), 其中 N 组继续 5% CO₂ 培养箱培养。其他组于低氧培养箱培养(5% CO₂, 2% O₂, PO₂: 25 ~ 35 mmHg), 均培养 60h。采用 RT - PCR 法测定 PASMCs Kv1.5 mRNA 含量, 采用 Western blot 法测定 PASMCs Kv1.5 蛋白含量。**结果** 与 N 组相比, H 组、HD 组、HA 组 Kv1.5 mRNA 和蛋白表达均明显降低($P < 0.05$)。较之 H 组和 HD 组, HS 组 Kv1.5 mRNA 和蛋白表达明显上升, 差异有统计学意义($P < 0.01$), H 组和 HD 组间差异无统计学意义($P > 0.05$), 与 HS 组相比, HA 组 Kv1.5 mRNA 和蛋白表达明显降低($P < 0.01$)。**结论** 低氧通过激活 p38 MAPK 信号通路降低 Kv1.5 通道表达, 这可能是(HPH)的发病机制。

关键词 低氧 K⁺通道 p38MAPK 信号通路 肺动脉高压

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

Decreased Kv1.5 Channel of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell by the p38MAPK Signaling Pathway in Hypoxia. Wang Yuanyuan, Zheng Mengxiao, Huang Linjing, *et al.* Tongde Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang 310012, China

Abstract Objective To explore the effect of p38MAPK signaling pathway on Kv1.5 channel in the process of hypoxia. **Methods** The SPF male Sprague - Dawley rats were used. The third or fourth division of pulmonary artery was separated in order to obtain single PASMC. The inhibitor and activator of p38MAPK signaling pathway SB203580 and anisomycin were involved in hypoxia. Cultured for 3 - 6 generations, the PASMCs were randomly divided into five groups: normal group (N), hypoxia group (H), DMSO control group (HD),

基金项目: 浙江省中医药重点学科建设计划项目(2012 - XK - A28); 温州市科技计划一般项目(Y20120161); 温州市医药卫生科学研究项目(2013B03)

作者单位: 310012 杭州, 浙江省立同德医院(王园园); 325035 温州医科大学(王园园、郑梦晓、黄林静、马迎春、王万铁); 325000 温州市人民医院(钱小英、王万铁)

通讯作者: 钱小英, 电子信箱: wqxylet@126.com; 王万铁, 电子信箱: wwt@wzmc.edu.cn

SB203580 group (HS), anisomycin group (HA). Then, group N was continued to be cultured in 5% CO₂ incubator, other groups were to be cultured in hypoxic incubator (5% CO₂, 2% O₂, PO₂: 25 ~ 35mmHg). All cells were cultured for 60 hours. RT-PCR was used to detect the expression of PSMCs Kv1.5 mRNA. Western Blot was used to detect the expression of PSMCs Kv1.5 protein. **Results** Compared with N group, the expression of Kv1.5 mRNA and protein in H group, HD group and HA group were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with H group and HD group, the expression Kv1.5 mRNA and protein in HS group were increased sharply, and the difference was significant ($P < 0.01$), no significant difference between H group and HD group ($P > 0.05$). Compared with the HS group, Kv1.5 mRNA and protein in HA group were significantly lower ($P < 0.01$). **Conclusion** Hypoxia down-regulates the mRNA and protein expression of Kv1.5 channels by activating p38 MAPK signaling pathway, which may be the pathogenesis of HPH.

Key words Hypoxia; Potassium ion channel; p38MAPK signaling pathway; Pulmonary hypertension

低氧引起肺血管收缩 (HPV) 和肺血管结构重建 (PVSR), 导致低氧性肺动脉高压 (HPH) 的形成。Kv 通道 (电压门控性钾离子通道) 是决定 PSMCs 静息膜电位的主要通道, 因其具有显著的氧敏感性而参与 HPH 的形成和发展, 并且阻力性 PSMCs 的 Kv 通道对肺动脉张力起重要作用^[1]。HPH 能够加剧慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 恶化并使其病死率升高, COPD 具有高致残率和高病死率的特点, 治疗处于一种高投入, 低收益的医疗模式^[2]。因此明确 HPH 的发病机制具有重要的临床意义和社会意义。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, MAPKs) 信号通路在 HPH 发生、发展中的作用也越来越受到重视。低氧引起肺动脉高压大鼠肺组织 p-ERK1/2 表达明显增强^[3]。Grag 等的研究表明 SB203580 能抑制 HPV 的短暂和持续性收缩, 在有硝普钠存在下诱导血管舒张。本研究假设低氧通过调节 p38MAPK 信号通路下调 Kv1.5 通道表达引起 HPH, 旨在进一步明确 HPH 的发病机制。

材料与方法

1. 模型复制与分组: SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重 200 ~ 250g, 由温州医科大学实验动物中心提供, 5% 水合氯醛腹腔麻醉后, 迅速取出心肺组织, 置于 4℃ 无菌生理盐溶液中 (PBS: NaCl 135mmol/L, KCl 4.7mmol/L, KH₂PO₄ 1.2mmol/L, NaHCO₃ 25mmol/L, CaCl₂ 2.5mmol/L, EDTA 0.026mmol/L, glucose 5.0mmol/L, pH 7.4), 超净工作台内体式显微镜下分离 3 ~ 4 级肺动脉分支, 去除内皮和外膜, 将平滑肌层剪成 1mm × 1mm 大小, 1000 × g, 离心 5min 弃 PBS 液, 加入含有消化酶的低钙溶液 (I 型胶原酶、牛血清白蛋白、木瓜蛋白酶、二硫苏糖醇), 37℃ 孵育 18min, 培养基终止消化, 吹打, 静置 3min, 吸出细胞悬液于无菌离心管中。余未消化组织块继续 37℃ 消化 5min, 重该步骤, 直至完全消化, 收集细胞悬液, 1000 × g 离心 5min, 弃上清。用含 20% 胎牛血清的培养基重悬细胞, 37℃, 5% CO₂ 培养箱培养。选第 3 代以后对数生长期 PSMCs 按 5 × 10⁵ 个/毫升的密度接种, 待细胞融合成单层时, 换成无血清培养基饥饿 24h 使细胞周期同步化并随机分

组: 正常组 (N): 5% CO₂ 37℃; 低氧组 (H): 5% CO₂ 2% O₂ 37℃。DMSO 对照组 (HD): 0.05% DMSO, 5% CO₂ 2% O₂ 37℃; SB203580 组 (HS): 10μmol/L SB203580 0.05% DMSO, 5% CO₂ 2% O₂ 37℃; 茴香霉素组 Anisomycin (HA): 10μmol/L 茴香霉素 0.05% DMSO, 5% CO₂, 2% O₂, 37℃。每组 3 皿细胞, 培养 60h。因 SB203580 和茴香霉素 (Sigma 公司) 均由 DMSO 溶解, 所以本实验设计了 DMSO 对照组 (HD) 以消除 DMSO 对研究结果的影响。采用血气分析仪评估低氧状态 (PO₂: 25 ~ 35mmHg), 低氧培养箱培养 2h 后达到低氧状态。

2. RT-PCR 测定 PSMCs Kv1.5 mRNA 表达: 按试剂盒说明提取总 RNA, 于 260nm、280nm 测吸光度比值确定纯度和量, 取总 RNA 反转录合成 cDNA (42℃ 60min, 1 个循环, 70℃ 5min, 1 个循环, 4℃ 5min, 1 个循环), 反应体系为 20μl。取反转录产物进行 PCR 反应 (95℃ 6min, 1 个循环; 95℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 40 个循环; 72℃ 10min, 1 个循环), 反应体系为 25μl, Kv1.5 上游序列: 5' - ACT TCG CAG AGG CAG ACA ATC A - 3', 下游序列: 5' - GGT TGC CTT GTT CTT CCT TCA G - 3', 扩增片段为 267bp。β-actin 引物: 上游序列: 5' - GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC - 3', 下游序列: 5' - TCG GGG GAT CGG AAC CGC TCA - 3', 扩增片段为 400bp, PCR 反应条件: 95℃ 预变性 6min, 95℃ 变性 1min 56℃ 退火 1min 72℃ 延伸 1min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用 MUVB-20 凝胶照相分析系统测定吸光度值 (A), 以 Kv1.5 与 β-actin A 值之比作为 Kv1.5 mRNA 的相对表达量。

3. Western blot 法测定 PSMCs Kv1.5 蛋白表达: 每皿细胞加入含 1mmol/L PMSF 的细胞裂解液 100μl, 冰上静置 20min, 12000 × g, 离心 20min, 吸取上清蛋白, 分装于 200μl 去酶 EP 管中, -70℃ 保存。SDS-PAGE 凝胶电泳, 上样体积为 20μl, 上样量为 50μg。300mA 恒流转膜 55min, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h。TBST 稀释的兔抗鼠 Kv1.5 多克隆抗体 (1:400, Sigma 公司)、内参 β-actin (1:10000) (上海康城公司), 4℃ 孵育过夜。辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔二抗 (1:50000, abcam 公司), 室温孵育 1h。显影液中显影、定影液中定影。

4. 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示。多组样本均数比较进行

方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析(*one way ANOVA*),方差齐性者两两比较采用 *LSD* 法,方差不齐者进行 *Dunnet't* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组 Kv1.5 mRNA 表达比较:与 N 组相比,H 组、HD 组、HA 组 Kv1.5 mRNA 表达均明显降低($P < 0.05$)。较之 H 组和 HD 组,HS 组 Kv1.5 mRNA 表达明显上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),H 组和 HD 组间差异无统计学意义($P > 0.05$),与 HS 组比较,HA 组 Kv1.5 mRNA 表达明显降低($P < 0.01$,表 1、图 1)。

表 1 各组细胞 Kv1.5 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)	
组别	Kv1.5 mRNA
N 组	0.479 ± 0.058
H 组	0.398 ± 0.099 * ☆
HD 组	0.406 ± 0.066 * ☆
HS 组	0.520 ± 0.079 ▲ **
HA 组	0.398 ± 0.070 * ☆

与 N 组比较, * $P < 0.05$;与 H 组比较, ▲ $P < 0.01$;与 HD 组比较, ★ $P < 0.01$;与 HS 组比较, ☆ $P < 0.01$

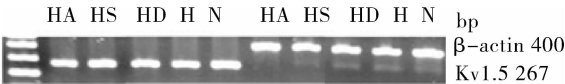


图 1 正常组、低氧组、p38MAPK 通路
干预组 Kv1.5 mRNA 表达

2. 各组 Kv1.5 蛋白表达比较:与 N 组相比低氧条件下 H 组、HD 组、HA 组蛋白表达均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 H 组和 HD 组相比较,HS 组蛋白明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),H 组和 HD 组间差异无统计学意义。与 HS 组比较,HA 组的蛋白显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$,表 2、图 2)。

表 2 各组细胞 Kv1.5 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)	
组别	Kv1.5 蛋白
N 组	0.547 ± 0.061
H 组	0.420 ± 0.090 * ☆
HD 组	0.437 ± 0.116 * ☆
HS 组	0.604 ± 0.060 ▲ **
HA 组	0.386 ± 0.114 ** ☆

与 N 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 H 组比较, ▲ $P < 0.01$;与 HD 组比较, ★ $P < 0.01$;与 HS 组比较, ☆ $P < 0.01$

讨 论

低氧性肺动脉高压是一种常见的严重病症,中心

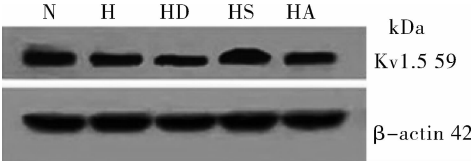


图 2 正常组、低氧组、p38MAPK 通路
干预 Kv1.5 蛋白表达

环节为肺血管收缩和结构重建。HPH 是多因素参与的过程,发病机制十分复杂,至今仍未明确。低氧导致 PSMCs Kv 通道开放减少,细胞去极化,电压依赖性钙通道开放,钙内流增加,胞质钙浓度升高,而 Ca^{2+} 作为第 2 信使,能够引起肺动脉收缩, PSMCs 增殖、重构,从而形成 HPH,另有研究表明 5 - 羟基癸酸盐通过增加 Kv 通道表达,阻止肺动脉高压的发展^[4]。这使得 Kv 通道成为一个极受关注的潜在治疗靶点。Kv 通道由核心 α 亚基和调节 β 亚基组成。 α 亚基由 4 个亚单位通过非共价键组成功能性钾通道, β 亚基与 α 亚基结合后可使钾通道失活。Kv α 亚基家族包含 9 个亚型(Kv1 ~ Kv9),但哪个亚型在 HPH 过程中发挥作用仍有争议。PSMCs 表达 Kv1.1、Kv1.2、Kv1.5、Kv2.1、Kv9.3 和 Kv3.1 亚型,并认为 Kv1.5、Kv1.2、Kv2.1 或单独或共同参与 HPV 的形成和发展^[5-9]。有以下研究支持这一观点,首先,神经酰胺通过抑制 Kv1.5 和 Kv2.1 通道电流促进大鼠和人的肺动脉收缩^[10]。采用 RT - PCR 和全细胞膜片钳的研究表明低氧可能通过抑制 Kv1.5、Kv2.1 通道参与肺静脉平滑肌细胞收缩^[11]。

本实验结果显示,慢性低氧可以明显降低大鼠 3 ~ 4 级阻力性 PSMCs Kv1.5 mRNA 和蛋白表达,说明低氧可能通过下调 Kv1.5 通道表达参与 HPH 过程,这与已经有的研究结果一致,并认为 Kv1.5 是低氧过程中的优势 Kv 通道。但低氧通过何种方式调节 Kv1.5 通道仍未可知,近年来 MAPK 信号通路在 HPH 的形成发展中的作用越来越受到关注。MAPK 信号通路是存在于从酵母到人中的高度保守的、以丝/苏氨酸磷酸化为特征的丝裂原激活的蛋白激酶。细胞受到诸如低氧、激素、缺血、生长因子及细胞因子等各种细胞外刺激时可以激活 MAPK 信号通路的 3 级酶链反应,从而引起基因表达、细胞增殖分化、转化和凋亡等过程。MAPKs 主要包含 3 种激酶:胞外信号调节激酶(ERKs)、p38MAPK 和 C - jun N 氨基末端激酶/应激激活蛋白激酶(JNKs)。p38 激活后发生核转位,从而磷酸化和激活许多蛋白激酶和转录因

子。SB203580 作为一种常用的 p38MAPK 抑制剂可以通透细胞,抑制 p38MAPK,因此 SB203580 可以抑制一些炎症因子(如 IL-1 β 、TNF- α)诱导的部分信号转导。

有关 MAPK 信号通路的研究表明,低氧能够激活 MAPK 信号通路,显著增加 PASMCs p-ERK1/2 和 p38MAPK mRNA 和蛋白表达^[12,13]并且异常骨形态生成蛋白通过激活 p38 和 ERK1/2 MAPK 信号通路,调节瞬时受体电势 C 通道表达及钙离子信号通路,参与 HPH 过程,而 p38MAPK 通路抑制剂 SB202190 能抑制低氧诱导的 VEGF 合成增加^[14,15]。既然 Kv1.5 通道和 MAPK 通路都参与 HPH 过程,那么它们之间是否存在某种联系,如果存在又是怎样的联系,是调节与被调节还是相互作用?茴香霉素能够激活丝裂原活化激酶 MAPK 中的几个主要通路,即 ERK1/2 通路,p38MAPK 通路和 JNK 通路^[16,17]。本实验选用茴香霉素作为 p38MAPK 通路的激活剂,选择 SB203580 作为 p38MAPK 通路抑制剂共同干预低氧过程。结果显示,SB203580 能够上调低氧引起的 Kv1.5 mRNA 和蛋白的低水平,茴香霉素能够在低氧的基础上轻微下调 Kv1.5 mRNA 和蛋白表达,这说明低氧通过激活 p38MAPK 通路抑制 Kv1.5 基因表达,最终导致 Kv1.5 mRNA 和蛋白含量下降,低氧可能通过此种方式引起 HPH 的形成,提示 HPH 新的治疗方向。

参考文献

- 1 Lv Y, Tang LL, Wei JK, *et al.* Decreased Kv1.5 expression in intrauterine growth retardation rats with exaggerated pulmonary hypertension [J]. American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology, 2013, 305: L856 - L865
- 2 Michael WJ, Mark DT. Pathophysiology and clinical implications of pulmonary arterial enlargement in COPD [J]. Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 2013, 8: 509 - 521
- 3 孔春初,戴爱国.丝裂原活化蛋白激酶调节缺氧诱导因子 1 α mRNA 大鼠缺氧性肺动脉高压的作用[J].中华结核和呼吸杂志,2005, 28(5): 328 - 332
- 4 Dong L, Li Y, Hu H, *et al.* Potential therapeutic targets for hypoxia - induced pulmonary artery hypertension [J]. J Transl Med, 2014, 12(1): (39) 1 - 9
- 5 Park WS, Firth AL, Han J, *et al.* Patho - physiological roles of voltage - dependent K⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. J Smooth Muscle Res, 2010, 46(2): 89 - 105
- 6 Oleksandr P, Ying Y, Eun AK, *et al.* Heterogeneity of hypoxia - mediated decrease in IK(V) and increase in [Ca²⁺]_i in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293: L402 - L416
- 7 Gguo L, Qiu Z, Zhang L, *et al.* Hypoxia suppresses Kv 2.1 channel expression through endogenous 15 - hydroxyeicosatetraenoic acid in rat pulmonary artery [J]. J Physiol Sci, 2010, Sep; 60(5): 373 - 381
- 8 Pozeg ZI, Michelakis ED, McMurtry MS, *et al.* In vivo gene transfer of the O₂ - sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats [J]. Circulation, 2003, 107: 2037 - 2044
- 9 Hong Z, Weir EK, Nelson DP, *et al.* Subacute hypoxia decreases voltage - activated potassium channel expression and function in pulmonary artery myocytes [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 31: 337 - 343
- 10 Javier MS, Teresa G, Carmen M, *et al.* Ramide inhibits Kv currents and contributes to TP - receptor - induced vasoconstriction in rat and human pulmonary arteries [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2011, 301: C186 - C194
- 11 Ciprian D, élène W, Iain R, *et al.* Hypoxia sensitivity of a voltage - gated potassium current in porcine intrapulmonary vein smooth muscle cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012, 303: L476 - L486
- 12 Steinbach JP, Klumpp A, Wolburg H, *et al.* Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling protects human malignant glioma cells from hypoxia - induced cell death [J]. Cancer Res, 2004, 64(5): 1575 - 1578
- 13 朱啊楠,王万铁,林丽娜. MAPK 通路抑制剂对低氧高二氧化碳性肺动脉收缩的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(8): 1538 - 1542
- 14 Fan B, Wang YX, Yao T, *et al.* p38 Mitogen - activated protein kinase. Mediates hypoxia - induced vascular endothelial growth factor release in human endothelial cells [J]. Sheng Li Xue Bao, 2005, 57(1): 13 - 20
- 15 Li X, Lu W, Fu X, *et al.* BMP4 increases canonical transient receptor potential protein expression by activating p38 MAPK and ERK1/2 signaling pathways in pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(2): 212 - 220
- 16 Tscheulin DK, Dreves F. The relevance of unrelated costs internal and external to the healthcare sector to the outcome of a cost - comparison analysis of secondary prevention: the case of general colorectal cancer screening in the Gennan population [J]. Eur J Health Econ, 2010, 11(2): 141 - 150
- 17 Wijndaele K, Lynch BM, Owen N, *et al.* Television viewing time and weight gain in colorectal cancer survivors: a prospective Population - based study [J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(8): 1355 - 1362

(收稿日期:2014 - 03 - 19)

(修回日期:2014 - 04 - 16)