

褪黑素对 LPS 诱导的肺动脉平滑肌细胞 P38MAPK 和 NF- κ B 表达的影响

张雨雪 虞晓明 邵布勒 鲁 亭 陈蒙君 孙学成 吴建胜

摘 要 **目的** 观察褪黑素对 LPS 诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)炎症的保护作用及作用机制。**方法** 体外培养 SD 雄性大鼠 PASMCs,随机分为 5 组:空白对照组(N 组)、脂多糖(LPS)组、脂多糖+褪黑素(LPS+MLT)组(0.5mmol/L、1.0mmol/L)、LPS+P38MAPK 抑制剂(SB203580)(LPS+SB)组(5 μ mol/L)。CCK-8 试验检测褪黑素对 PASMCs 的药物毒性;半定量 RT-PCR 分别检测 mRNA 水平丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)通路中 P38MAPK 和核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)的表达量;Western blot 法检测 P38MAPK 和 NF- κ B 以及磷酸化 P38MAPK 和 NF- κ B 的表达量。**结果** 在实验设计的浓度内,褪黑素对 PASMCs 无药物毒性不良反应($P>0.05$)。与 LPS 组相比,LPS+MLT 和 LPS+SB 抑制 MAPK 信号通路中的磷酸化 P38MAPK 和磷酸化 NF- κ B 的表达($P<0.01$),且随褪黑素的剂量的增加而降低($P<0.01$)。**结论** 褪黑素抑制 MAPK 信号通路中 P38MAPK 和 NF- κ B 的激活,减轻 LPS 诱导的 PASMCs 炎症反应。

关键词 褪黑素 肺动脉 平滑肌细胞 P38MAPK NF- κ B

中图分类号 R363 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.04.019

Effects of Melatonin on the Expression of P38MAPK and NF- κ B of LPS in the Pulmonary Artery smooth Muscle Cells Induced by LPS.

Zhang Yuxue, Yu Xiaoming, Shao Bule, et al. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To investigate the effects of melatonin on the expression of P38MAPK and NF- κ B in rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) induced by LPS. **Methods** The cultured male SD rat PASMCs were divided into control group, lipopolysaccharide (LPS) group, melatonin + LPS (MLT + LPS) group (0.5mmol/L, 1.0mmol/L) and SB203580 + LPS (SB + LPS) group (5 μ mol/L). The toxicity of melatonin was detected by Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay. The expression of P38MAPK and NF- κ B mRNA were detected by RT-PCR. The changes in protein levels of P38MAPK, NF- κ B, phosphorylated P38MAPK and phosphorylated NF- κ B were detected by Western blot. **Results** Melatonin showed no toxicity on rat PASMCs in designed concentration ($P>0.05$). Compared to LPS group, the expression of phosphorylated P38MAPK and phosphorylated NF- κ B were down-regulation in MLT + LPS group and SB + LPS group, and in a dose-dependent manner ($P<0.01$). **Conclusion** Melatonin can alleviate the LPS-induced inflammation reaction in rat PASMCs by inhibiting the activation of P38MAPK and NF- κ B in MAPK signal pathway.

Key words Melatonin; Pulmonary artery; Smooth muscle cells; P38MAPK; NF- κ B

褪黑素(melatonin, MLT)是由松果体产生并分泌到血液循环中,发挥多种生物功能,包括抗氧化、抗炎症、免疫调节、抗癌作用^[1]。褪黑素的抗炎症效应在于能清除活性氧和抑制促炎性基因的表达^[2]。许多研究表明褪黑素能减少脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)导致的炎症反应^[3]。然而,褪黑素抑制炎症反应的机制仍在进一步研究中。Meng 等^[4]发现, LPS 作为细菌的活性成分,刺激巨噬细胞和血管平滑肌细

胞释放一系列的炎性介质,如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 1(IL-1)等,并且生成诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和环氧合酶(COX-2)等蛋白,引起系统性休克。本实验旨在研究褪黑素 LPS 诱导血管平滑肌细胞的炎症反应是否具有保护作用以及保护机制,以寻求其抗炎作用的细胞机制。

材料与方法

1. 动物和材料:SPF 级标准健康雄性 SD 大鼠,体重为 200 $\pm$ 20g,由温州医科大学实验动物中心提供。褪黑素(MLT)、脂多糖(LPS)、P38MAPK 抑制剂(SB203580)购自 Sigama 公司;高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶、青-链霉素购自 Gibco 公司;兔抗磷酸化 P38MAPK、兔抗 P38、兔抗磷酸化 P65、兔抗 P65、兔抗 β -actin、辣根过氧化物酶(HRP)标

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Q12H030005)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院消化内科(张雨雪、邵布勒、鲁亭、陈蒙君、孙学成、吴建胜),呼吸内科(虞晓明)

通讯作者:吴建胜,电子信箱:wzwujs@163.com

记的山羊抗兔 IgG 二抗购自 CST 公司;Fast Quant RT Kit 购于天根生化(北京)有限公司;Cell counting Kit-8 试剂盒购于日本同仁化学研究所;BCA Protein Assay Kit 购于 Thermo 公司;Trizol 试剂盒购于 Invitrogen 公司。

2. PSMCs 分离、培养:用 10% 水合氯醛麻醉大鼠后处死,放入 75% 乙醇浸泡消毒,迅速取出心肺组织,在解剖显微镜直视下取 3~4 级肺动脉,去内外膜剪成 1mm^3 大小的组织块,置于 0.2% 胶原酶 I 消化 45min~1h,离心后得大量单个平滑肌细胞,以适当密度种植于培养瓶中,加入含 20% 胎牛血清的高糖培养基置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。当细胞生长至培养瓶 80%~90% 左右时,可用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞进行并传代培养,通常取第 4~6 代的平滑肌细胞用于实验。

3. PSMCs 鉴定:免疫荧光染色法鉴定。PSMCs 经过一抗为 SM α -actin 肌动蛋白单克隆抗体,二抗为 DyLightTM488 结合的山羊抗小鼠 IgG,经 DAPI 液染核后,在荧光显微镜下分别检测 DAPI (358nm) 标记的细胞核及 DyLightTM488 结合的山羊抗小鼠 IgG 标记的肌丝(488nm),观察细胞形态并摄片。

4. 实验分组:取 4~6 代生长良好对数生长期 PSMCs,制成细胞悬液,按 5×10^5 个/毫升的密度接种于 10cm 培养皿中,加入含 10% FBS 的培养基,置于 37°C 、5% CO_2 普通培养箱中进行培养,待融合成单层细胞时(约 80% 铺满)换成无血清培养基饥饿培养 24h 后,进行药物干预。空白对照组(N 组)、LPS 组、LPS + MLT 组(0.5mmol/L、1.0mmol/L)、LPS + SB 组(5 $\mu\text{mol/L}$)。

5. CCK-8 法检测药物毒性试验:PSMCs 以 5×10^4 /ml 接种于 96 孔板,培养至铺满孔底面积 80%~90%,弃上清液,PBS 清洗后加 DMEM 同步化 24h;加入不同浓度 MLT, 37°C 培养 1h 后,各组加入等量 LPS(终浓度为 $1\mu\text{g/ml}$), 37°C 培养 20h,取出 96 孔板,分别按每孔培养基总体积的 10% 加入 CCK-8 试剂,在酶联免疫检测仪 450nm 波长下检测各孔的吸光度值(A 值)。

6. 半定量 RT-PCR 法检测 PSMCs P38 和 P65 的 mRNA 表达:取对数生长期 PSMCs,分组干预结束后,Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,分光光度计检测各样本 RNA 浓度和纯度,按反转录试剂盒在 PCR 仪上进行扩增。引物由上海生工生物工程有限公司设计合成,引物序列为:P38MAPK 上游序列:5'-CCGTTTCAGTCCATCATTC-3',下游序列:5'-TCATTTTCGTCATCAGTGTGC-3',367bp;PCR 扩增条件如下: 95°C 5min; 94°C 1min; 60°C 30s; 72°C 1min; 72°C 10min;共 35 个循环。P65 上游序列:5'-GCGTTTCCGTTACAAGTGC-3',下游序列:5'-GGACCGCATTCAAGTCATAGT-3',377bp; β -actin 上游序列:5'-GCTACAGCTTCAACCACCACAG-3',下游序列:5'-GGTCTTACGGATGTCAACGTC-3',165bp。 β -actin 共扩增,PCR 扩增条件如下: 94°C 2min; 94°C 30s; 58°C 1min; 72°C 1min; 72°C 10min;共 35 循环。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(溴化乙锭 0.5mg/ml),在 UV-800 凝

胶成像分析系统紫外灯下观察结果并拍摄,以目的条带平均灰度值与 β -actin 的平均灰度值比值来表示目的蛋白 mRNA 表达的相对强度。

7. Western blot 法检测 PSMCs P38MAPK 和 P65 蛋白含量表达:收集细胞悬液于 EP 管,加入适量细胞蛋白裂解液(每 1000 μl RIPA 加入 10 μl PMSF、100 μl 磷酸化酶抑制剂),经 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。配置 12% SDS-PAGE 分离胶及 5% 浓缩胶,各样品取 40 μg 总蛋白量上样,电泳,转膜,封闭。加入一抗, 4°C 孵育过夜,HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗室温 1h,用 ECL 化学发光显色法在凝胶成像仪下成像分析。Quantity one 凝胶软件分析系统测定各目的条带的平均灰度值,并以 pP38MAPK 与 β -actin,PP65 与 β -actin 的灰度值比值(相对 A 值)表示目的条带相对强度。

8. 统计学方法:应用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计量资料进行正态性检验,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。方差齐则采用 LSD 法进行两两比较,方差不齐者采用 Dunnett's t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 细胞免疫荧光法鉴定 PSMCs:原代培养的 PSMCs 在显微镜下呈长梭形,大小不一,边界清楚,折光性好,具有平滑肌细胞特有的“峰-谷”状生长(图 1)。PSMCs 经 SM α -actin 小鼠单克隆抗体孵育、DyLightTM488、DAPI 双染色后,在免疫荧光显微镜下观察,95% 以上的 PSMCs 呈阳性反应。高倍镜下 DyLightTM488 标记的平滑肌 α -肌动蛋白与细胞长轴平行呈纤维细丝状,呈现绿色荧光;DAPI 染色的细胞核呈卵圆形居中,发蓝色荧光(图 2)。

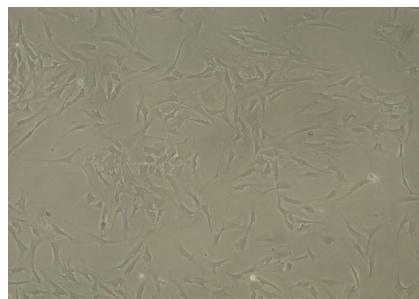


图 1 大鼠原代培养肺动脉平滑肌细胞($\times 100$)

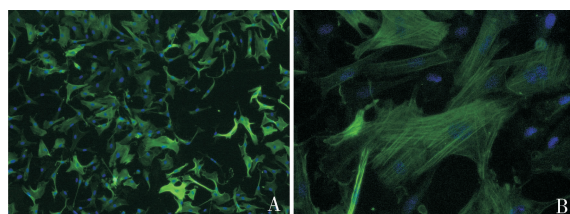


图 2 大鼠肺动脉平滑肌细胞 α -actin 免疫荧光染色

A. 放大 100 倍;B. 放大 400 倍

2. 褪黑素对大鼠肺动脉平滑肌细胞的药物毒性：CCK - 8 实验数据显示不同浓度 MLT (1.0、0.5、0.25、0.125mmol/L)与对照组相比,差异无统计学意义($P < 0.05$),说明肺动脉平滑肌细胞的细胞活性差异无统计学意义,说明 MLT 药物在设计的浓度范围内无任何不良反应($P > 0.05$,图 3)。

3. 褪黑素对各组肺动脉平滑肌细胞 pP38、pP65 蛋白表达的影响:如图 4 所示,与 N 组相比,LPS 组 P38MAPK 和 P65 磷酸化的表达显著增加;与 LPS 组相比, MLT 和 P38MAPK 抑制剂作用与肺动脉平滑肌细胞后,在不同程度上抑制了 P38MAPK 和 P65 磷酸化

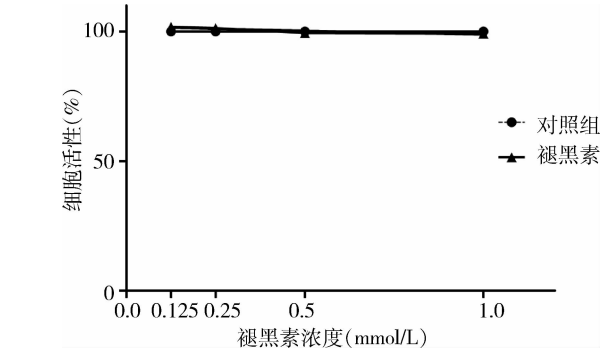


图 3 褪黑素对大鼠肺动脉平滑肌细胞的药物毒性作用

的表达水平降低,同时 MLT 组呈浓度依赖性($P < 0.01$)。

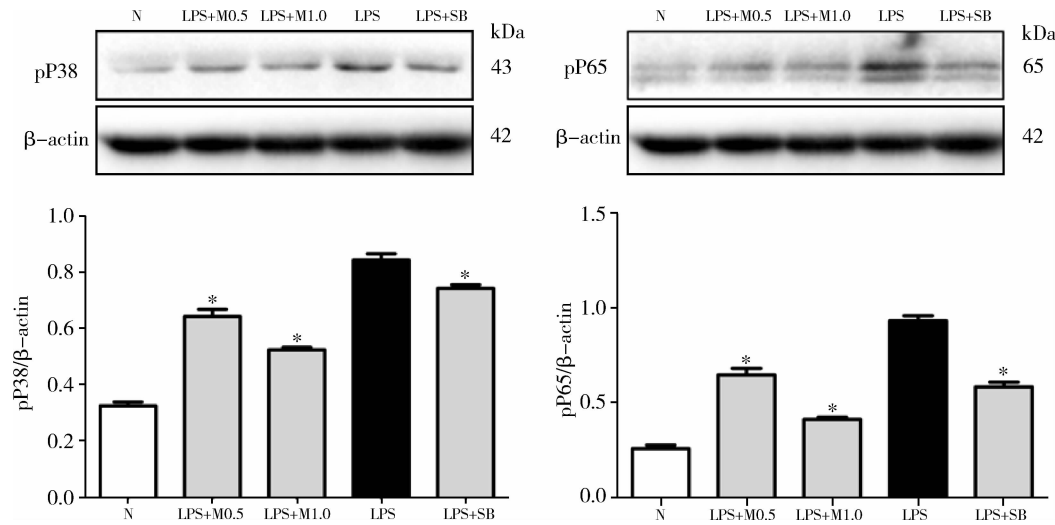


图 4 Western blot 法检测各组肺动脉平滑肌 pP38、pP65 蛋白的表达

与 LPS 组相比, * $P < 0.01$

4. 褪黑素对各组肺动脉平滑肌细胞 P38 和 P65 在 mRNA 水平的表达变化:RT - PCR 结果表明,与 N 组

相比,LPS 组、MLT 组及 SB 组的 P38 和 P65 在 mRNA 水平的表达,差异无统计学意义($P > 0.05$,图 5)。

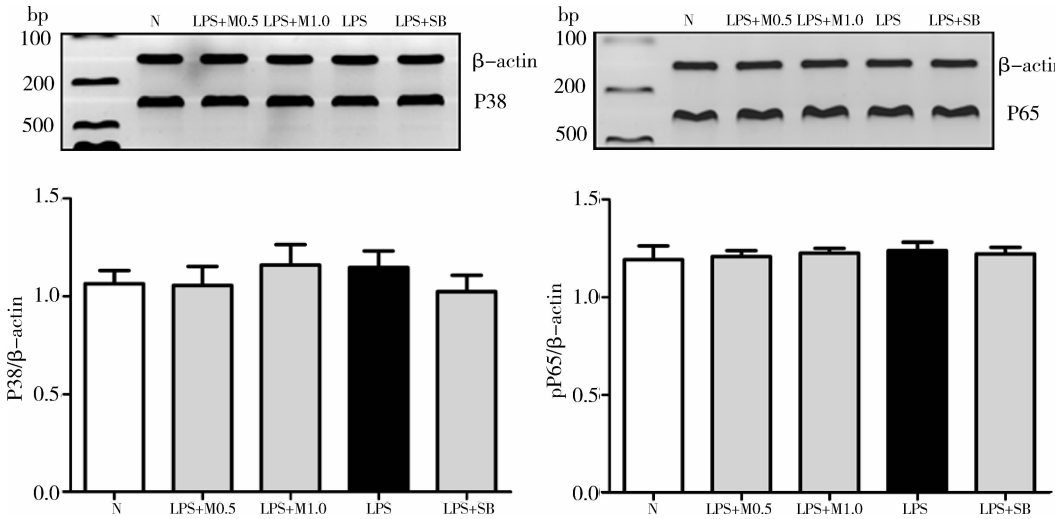


图 5 RT - PCR 检测各组肺动脉平滑肌 P38 和 P65mRNA 的表达

讨 论

研究者用拮抗药物及分子证实,当 LPS 刺激细胞时,MAPK 通路信号转导通路激活^[5]。MAPKs 是丝氨酸-苏氨酸激酶家族,其中,P38MAPK 信号通路是 MAPK 通路的一个重要亚族,控制基因转录,蛋白合成,细胞凋亡和分化,对细胞外的炎症刺激和氧化应激做出反应^[6]。同时,目前研究证实,LPS 刺激细胞激活 MAPK 通路的同时,激活 NF- κ B 转录因子。NF- κ B 是由 5 种不同的蛋白组成的异质二聚体,包括 P50、P52、P65/RelA、RelB 及 c-Rel,调控炎症反应,细胞增殖和凋亡。各种活化剂包括 LPS 刺激时,抑制蛋白 I κ B 磷酸化并降解,P65 磷酸化并转移至细胞核,介导 iNOS、COX-2、黏附分子和细胞炎性因子等的释放^[7]。Chen 等^[8]研究指出,在人脐静脉内皮细胞中,LPS 激活 MAPK 通路和 NF- κ B,导致 ROS 等炎症的表达。

褪黑素的抗炎性效应在于能清除活性氧和抑制促炎性基因的表达^[9]。实验证明,褪黑素能够通过抑制 MAPK 和 NF- κ B,有效的抑制 LPS 引起的巨噬细胞、腺泡细胞、星形肿瘤细胞炎性因子释放^[3,10,11]。此外,Jin 等^[12]报道,褪黑素可以抑制 MAPK 和 NF- κ B 的磷酸化,抑制 PSMCs 炎症和增生,阻止低氧性肺动脉高压的发生。

本研究中,在 LPS 刺激 PSMCs 时,P38MAPK、P65 磷酸化明显增加(图 5)。褪黑素预处理 PSMCs,再进行 LPS 刺激,能显著抑制 P38MAPK 和 P65 磷酸化,并具有剂量依赖性。说明褪黑素能抑制 LPS 诱导的 PSMCs 细胞的炎性反应。同时,在使用 P38MAPK 抑制剂 SB203580 处理 PSMCs,能显著地抑制 LPS 诱导的 P65 磷酸化。并且,Ryan 等^[13]证实,在内皮细胞中 NF- κ B 的活化依赖 P38MAPK 的激活。这些结果表明,P38MAPK 是 NF- κ B 重要的上游信号,褪黑素通过 P38MAPK 抑制 NF- κ B 的表达。目前,在 PSMCs 中 P38MAPK 诱导 NF- κ B 的活化机制仍不明确,可能与 P38MAPK 影响 I κ B 的降解或是 P65 转移入核有关^[14]。

综上所述,褪黑素可以有效的抑制 LPS 诱导的肺动脉平滑肌细胞的 P38MAPK 和 NF- κ B 的激活,且不良反应小。本实验结果为褪黑素用于临床提供了更多的实验数据,但仍需进一步研究褪黑素调节 MAPK 和 NF- κ B 的具体机制。

参考文献

- Mukherjee D, Roy SG, Bandyopadhyay A, *et al.* Melatonin protects against isoproterenol-induced myocardial injury in the rat: antioxidative mechanisms [J]. *J Pineal Res*, 2010, 48: 251-262
- Deng WG, Tang ST, Tseng HP, *et al.* Melatonin suppresses macrophage cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting p52 acetylation and binding [J]. *Blood*, 2006, 108: 518-524
- Ohta Y, Kongo-Nishimura M, Matsura T, *et al.* Melatonin prevents disruption of hepatic reactive oxygen species metabolism in rats treated with carbon tetrachloride [J]. *J Pineal Res*, 2004, 36: 10-17
- Meng X, Brown JM, Ao L, *et al.* Endotoxin induces cardiac HSP70 and resistance to endotoxemic myocardial depression in rats [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271: C1316-1324
- Caivano M, Cohen P. Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages [J]. *J Immunol*, 2000, 164: 3018-3025
- Jiang P, Xu J, Zheng S, *et al.* 17beta-estradiol down-regulates lipopolysaccharide-induced MCP-1 production and cell migration in vascular smooth muscle cells [J]. *J Mol Endocrinol*, 2001, 45: 87-97
- Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB [J]. *Genes Dev*, 2004, 18: 2195-2224
- Chen G, Zhao J, Yin Y, *et al.* C-type natriuretic peptide attenuates LPS-induced endothelial activation: involvement of p38, Akt, and NF-kappaB pathways [J]. *Amino Acids*, 2014, 46: 2653-2663
- Tamura H, Takasaki A, Taketani T, *et al.* Melatonin as a free radical scavenger in the ovarian follicle [J]. *Endocr J*, 2013, 60(1): 1-13
- Zhang S, Li W, Gao Q, *et al.* Effect of melatonin on the generation of nitric oxide in murine macrophages [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 501: 25-30
- Franco DG, Markus RP. The cellular state determines the effect of melatonin on the survival of mixed cerebellar cell culture [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e106332
- Jin H, Wang Y, Zhou L, *et al.* Melatonin attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting the inflammation and the proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *J Pineal Res*, 2014, 57: 442-450
- Ryan S, McNicholas WT, Taylor C. A critical role for p38 map kinase in NF-kappaB signaling during intermittent hypoxia/reoxygenation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 355: 728-733
- Baeza-Raja B, Munoz-Canoves P. p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6 [J]. *Mol Biol Cell*, 2004, 15: 2013-2026

(收稿日期:2014-10-09)

(修回日期:2014-11-02)