

AMPK 激动剂 AICAR 通过阻滞细胞周期于 G_0/G_1 期抑制肺动脉平滑肌细胞增殖

官文俊 许臣洪

摘要 目的 建立 PDGF - BB 诱导的原代大鼠肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary vascular smooth muscle cells, PSMCs) 的增殖细胞模型, 通过 AMPK 激动剂 AICAR 干预, 探讨 AICAR 对 PSMCs 细胞周期和增殖的影响及其机制, 为肺血管重构防治寻找靶点。方法 通过 20ng/ml PDGF - BB 刺激诱导 PSMCs 增殖建立细胞模型, 采用 AICAR (0.5mmol/L) 干预 PDGF - BB 诱导的 PSMCs 增殖, Western blot 法检测总的和磷酸化的 AMPK, CCK - 8 检测 PSMCs 增殖, 流式细胞仪分析细胞周期, 实时定量 PCR (RT - PCR) 检测 cyclinD1、cyclinE、CDK2/4/6 mRNA 的表达。结果 Western blot 法检测表明 AICAR 可以活化 AMPK, CCK - 8 检测结果表明 AICAR 能够抑制 PDGF - BB 诱导的 PSMCs 增殖; 流式细胞仪检测结果表明 AICAR 能够抑制细胞周期于 G_0/G_1 期, RT - PCR 结果表明 AICAR 可以抑制 cyclinD1、cyclinE、CDK2、CDK4 和 CDK6 的 mRNA 的表达。结论 AICAR 通过抑制 cyclinD1、cyclinE、CDK2/4/6 的 mRNA 表达阻滞细胞周期于 $G_0/G_1 \sim S$ 期, 抑制 PSMCs 增殖。

关键词 AMPK PDGF - BB 肺动脉平滑肌细胞 细胞周期 增殖

中图分类号 R3 文献标识码 A DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.05.030

AICAR Blocks the Proliferation of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells by Inhibition of Cell Cycle in G_0/G_1 . Guan Wenjun, Xu Chen-hong. Department of Cardiology, Jingzhou Central Hospital, Hubei 434020, China

Abstract Objective To establish the PDGF - BB - induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells (PSMCs), and investigate the effects of the AMPK agonist AICAR on the cell cycle of PSMCs, in order to search new drugs for prevention of pulmonary vascular remodeling. **Methods** 20ng/ml PDGF - BB was used to induced the proliferation of PSMCs, and the effect of 0.5mmol/L AICAR on the proliferation of PSMCs was observed. Western blot was used to detect the total and phosphorylated AMPK. The proliferation of PSMCs was determined by CCK - 8. The mRNA expression of cyclinD1, cyclinE and CDK2/4/6 were detected by flow cytometry analysis cell cycle, quantitative real - time PCR. **Results** Western blot results indicated AICAR could promote the activation of AMPK. CCK - 8 test results showed that AICAR blocked the proliferation of PSMCs induced by PDGF - BB. Flow cytometry analysis indicated that AICAR arrested the cell cycle in G_0/G_1 to S phase. RT - PCR results demonstrated that AICAR inhibited the mRNA expression of cyclinD1, cyclinE and CDK2/4/6. **Conclusion** The AMPK agonist AICAR can block the proliferation of PSMCs induced through arrest cell cycle in $G_0/G_1 - S$ phase by regulation the mRNA expression of cyclin D1, cyclinE, CDK2/4/6, and AICAR has a potential application in preventing pulmonary vascular remodeling.

Key words AMPK; PDGF - BB; Pulmonary artery smooth muscle cells; Cell cycle; Proliferation

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 的特点是血管重塑和肺血管阻力逐步增加, 结构变化主要表现为血管壁的增厚、官腔狭窄。长期过高的肺动脉压力最终会引起右心室衰竭而死亡^[1]。各种病理性刺激会导致肺小动脉平滑肌细胞发生一系列结构和功能的适应性变化, 主要表现为 PSMCs 异常增殖、迁移, 肌型血管中膜增厚细胞外基质合成增多, 管腔狭窄等。多种细胞因子、生长因子参与这一过程, 其中 PDGF - BB 在肺血管重构中发挥重要作用, 研究发现阻滞 PDGF 受体血管狭窄的形成, 并

且发现 PAH 患者血液和肺组织中 PDGF 表达增强^[2]。PDGF - BB 诱导的 PSMCs 增殖细胞模型广泛运用于肺血管重构相关疾病的研究^[3]。AMPK (adenosine monophosphate/activated protein kinase) 是存在于所有真核细胞中的一种高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 能感受到细胞内 AMP 的浓度以及 AMP/ATP 比值上的变化, 其是细胞低能量状态的主要调节器^[4,5]。研究表明 AMPK 能抑制 Ang II 诱导的平滑肌细胞增殖^[6,7]。也有研究发现 AMPK 激活能够抑制 VSMCs 细胞周期于 G_1 期, 然而有关 AMPK 在 PSMCs 增殖中的作用未见相关研究^[8]。

材料与方法

1. 材料: SD 大鼠购自武汉大学实验动物中心; I 型胶原

作者单位: 434020 湖北省荆州市中心医院心内科

通讯作者: 官文俊, 电子信箱: jzguanwenjun@126.com

酶及 AICAR 购自 Sigma 公司;DMEM/F12 培养基、双抗、胰酶、胎牛血清等购自 Hyclone 公司;CCK-8 试剂盒购自 Dojindo 公司;细胞周期与凋亡检测试剂盒购自碧云天生物科技有限公司;GAPDH 抗体、总的及磷酸化的 AMPK 购自 Cell Signaling Technology 公司。

2. SD 大鼠 PASCs 原代培养:选择体重 150~200g SD 大鼠,按 50mg/kg 计算所需戊巴比妥钠量,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠水溶液进行麻醉,取出心肺组织分离出肺动脉采用 0.2% I 型胶原酶消化 PASCs^[3];用含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM/F12 培养基培养 PASCs。细胞传至第 4 代应用免疫细胞化学染色法检测平滑肌肌动蛋白进行细胞鉴定(细胞纯度 >95%),3~8 代细胞生长良好用于本研究。

3. 实验分组:分为对照组,0.5mmol/L AICAR 组;PDGF-BB 组,0.5mmol/L AICAR + PDGF-BB 组,当细胞融合度达到 60%~70% 时,细胞加不含血清 DMEM 培养基培养 24h,使细胞同步化后,采用 20ng/ml 的 PDGF-BB 刺激 PASCs 增殖,AICAR 溶解于 DMSO,储存于 -20℃ 冰箱,本实验中 AICAR 干预组给予 0.5 mmol/L AICAR 预处理 2h 后给予 PDGF-BB 刺激。

4. Western blot 法检测总的和磷酸化 AMPK 的表达:PASCs 接种于 60mm 培养皿,细胞融合度达到 70%~80% 后,进行血清饥饿 24h,分别加入 0.5mmol/L AICAR 0.5 及 1h 后,在培养皿加入含有 PMSF 细胞裂解液(购自碧云天生物技术有限公司)100μl 收获细胞提取总蛋白,蛋白定量变性后每个样本取 15μg 进行电泳,检测蛋白的表达。

5. CCK-8 检测细胞增殖:调整 PASCs 浓度以 100μl,5 × 10³/孔接种于 96 孔板,当细胞融合度达到 60%~70% 时加入无血清培养基饥饿处理 24h,PDGF-BB 刺激培养 24h 后,每孔加入 10μl CCK-8 溶液继续在培养箱中培养 4h 后,450nm 测定吸光度。

6. 流式细胞仪检测细胞周期:PASCs 接种于 6 孔板中,细胞融合度达到 60%~70% 后,进行血清饥饿 24h,PDGF-BB 刺激培养 24h 后,收获细胞,加入 70% 乙醇(含 30% PBS)固定,按照细胞周期与凋亡检测试剂盒步骤进行溴化乙锭染色后,通过流式细胞仪分析细胞周期。

7. RT-PCR 检测 cyclin 及 CDK 的表达:PASCs 接种于 6 孔板,当细胞融合度达到 60%~70% 后,进行无血清饥饿培养 24h,PDGF-BB 刺激 24h 后,每孔加入 1ml TRIzol 提取细胞的总 RNA,使用罗氏反转录试剂盒反转录为 cDNA,PCR 扩增后采用 GAPDH 比较得出标准化值。

8. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 软件对数据进行处理,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组之间比较采用两独立样本的 *t* 检验,多组比较采用双侧 ANOVA,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. AICAR 促进 AMPK 的活化:在 0.5mmol/L AICAR 处理 PASCs 0.5 及 1h 后可明显促进 AMPK 的磷酸化(图 1)。

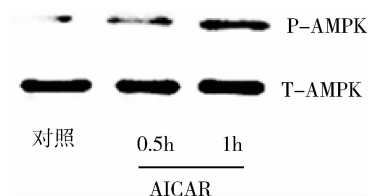


图 1 AICAR 促进 AMPK 的活化

2. AICAR 抑制 PDGF-BB 诱导的 PASCs 增殖:PDGF-BB 刺激 24h 能够促进 PASCs 增殖(*P* < 0.05),0.5mmol/L AICAR 能够抑制 PDGF-BB 诱导的 PASCs 增殖(*P* < 0.05,图 2)。

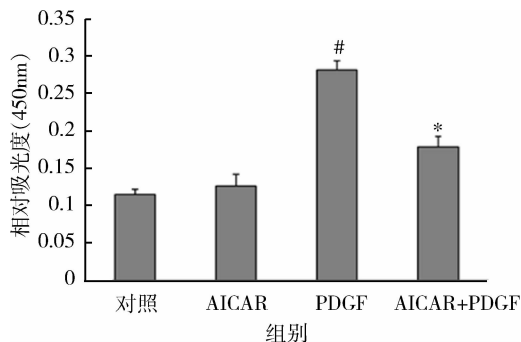


图 2 AICAR 对 PASCs 增殖影响

与对照组比较, #*P* < 0.05; 与 PDGF 组比较, **P* < 0.05; *n* = 5

3. AICAR 阻滞细胞周期影响于 G₀/G₁ 期:PDGF-BB 刺激 24h 后 PASCs 处于 G₀/G₁ 百分比减小,S 期细胞百分比增加,G₂/M 期细胞百分比增加。与对照组相比 0.5mmol/L AICAR 可使 G₀/G₁ 细胞百分比增加,S 期细胞百分比增加(*P* < 0.05),对 G₂/M 期细胞百分比无明显影响。结果表明 AICAR 可阻滞 G₀/G₁ 期细胞向 S 期过渡(图 3)。

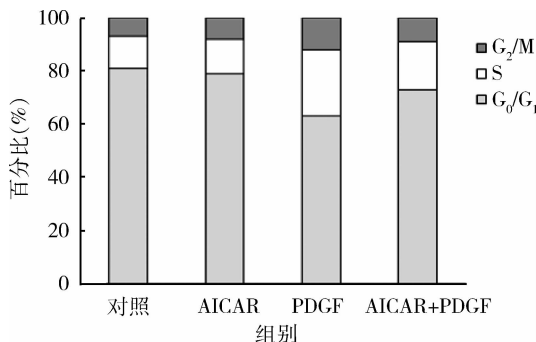


图 3 流式细胞仪分析 AICAR 对 PASCs 细胞周期影响(*n* = 5)

4. AICAR 抑制 cyclinD1、cyclinE、CDK2/4/6 mRNA 的表达:PDGFBB 刺激 24h 后可上调 cyclinD1、cyclinE、CDK2、CDK4、CDK6 的 mRNA 表达(*P* < 0.05),0.5mmol/L AICAR 干预可抑制 cyclinD1、cyclinE、

CDK2/4/6 的 mRNA 表达 ($P < 0.05$, 图 4)。

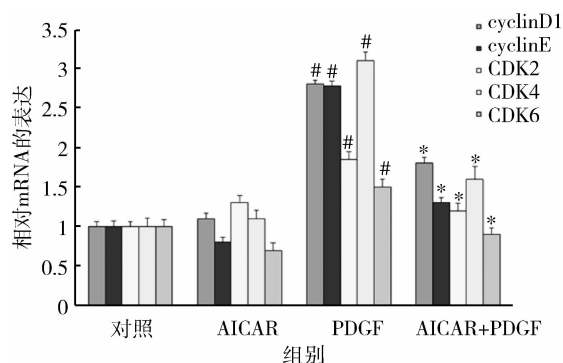


图 4 AICAR 对 cyclinD1、cyclinE、CDK2/4/6 mRNA 的表达影响

与对照组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与 PDGF 组比较, $^*P < 0.05$; $n = 5$

讨 论

本研究显示, PDGF - BB 可明显刺激 PSMCs 增殖, 增加处于 S + G₂/M 期细胞比例增多, 促进 AMPK 活化。AICAR 能够抑制 PDGF - BB 诱导的 PSMCs 增殖。本研究还表明, AICAR 能够通过下调 cyclinD1、cyclinE、CDK2/4/6 的 mRNA 的表达阻滞细胞周期于 G₀/G₁ ~ S 期。这些结果为 AICAR 预防和治疗肺血管重构相关疾病提供了理论依据。

研究表明 AMPK 抑制剂 compound C 可以促进 PSMCs 增殖, 而 AMPK 激动剂 AICAR 可以抑制 PSMCs 增殖^[9]。然而 AMPK 调控 PSMCs 具体机制还存在大量的未知。各种病理刺激能够促进肺动脉壁各层细胞发生增殖, 尤其是中膜层 PSMCs 的增殖在肺血管重构中发挥关键作用^[10,11]。本研究发现, AICAR 能够抑制 PDGF - BB 诱导的 PSMCs 增殖。细胞增殖与细胞周期密切相关, 正常生理条件下 PSMC 处于静止 G₀ 期, 肺血管重构时需要静态状态的 PSMCs 进入和通过细胞周期各阶段^[12]。为此, 本研究检测 AICAR 对 PSMCs 周期的影响。流式细胞仪分析的结果表明, PDGF - BB 刺激 24h 可增加处于 S + G₂/M 期细胞比例, 减少处于 G₀/G₁ 期细胞的百分比, AICAR 可抑制 PDGF - BB 诱导的 S 期细胞百分比的增加及 G₀/G₁ 期细胞百分比的减少, 但对 G₂/M 期细胞百分比无明显影响, 可见 AICAR 主要阻滞细胞周期于 G₀/G₁ ~ S 期。cyclinD1 和 cyclinE 与 CDK4/6 和 CDK2 形成复合物是 G₀/G₁ 细胞周期向 S 期过度必不可少的, 这些复合物可以通过磷酸化的 pRB 促进 DNA 的合成促进细胞周期的进程^[13,14]。本研究发现, AICAR 能够抑制 PDGF - BB 诱导 cyclinD1、cyclinE、CDK2/4/6 的 mRNA 的表达。

笔者研究发现, AMPK 激动剂 AICAR 能够抑制 PDGF - BB 诱导 PSMCs 的增殖, 阻滞细胞周期于 G₀/G₁ ~ S 期, 这一过程是与 AICAR 调控 cyclinD1、cyclinE、CDK2/4/6 的 mRNA 表达有关。综上所述, AMPK 有可能成为治疗和预防肺血管重构相关疾病的新靶点。

参考文献

- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension [J]. N Engl J Med, 2004, 351(14): 1425 - 1436
- Banai S, Wolf Y, Golomb G, et al. PDGF - receptor tyrosine kinase blocker AG1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine [J]. Circulation, 1998, 97(19): 1960 - 1969
- Chen C, Tang Y, Deng W, et al. Salidroside blocks the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells induced by platelet-derived growth factor? BB [J]. Mol Med Rep, 2014, 10(2): 917 - 922
- Hardie DG, Scott JW, Pan DA, et al. Management of cellular energy by the AMP - activated protein kinase system [J]. FEBS Lett, 2003, 546(1): 113 - 120
- Kemp BE, Stapleton D, Campbell DJ, et al. AMP - activated protein kinase, super metabolic regulator [J]. Biochem Soc Trans, 2003, 31 (Pt 1): 162 - 168
- Nagata D, Takeda R, Sata M, et al. AMP - activated protein kinase inhibits angiotensin II - stimulated vascular smooth muscle cell proliferation [J]. Circulation, 2004, 110(4): 444 - 451
- McCarty MF, Barroso - Aranda J, Contreras F. AMP - activated kinase may suppress NADPH oxidase activation in vascular tissues [J]. Med Hypotheses, 2009, 72(4): 468 - 470
- Imamura K, Ogura T, Kishimoto A, et al. Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5' - AMP activated protein kinase activator, 5 - aminoimidazole - 4 - carboxamide - 1 - beta - D - ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 287(2): 562 - 567
- Huang X, Fan R, Lu Y, et al. Regulatory effect of AMP - activated protein kinase on pulmonary hypertension induced by chronic hypoxia in rats: in vivo and in vitro studies [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41 (6): 4031 - 4041
- Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2010, 43(6): 629 - 634
- Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia - induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms [J]. Circ Res, 2006, 99(7): 675 - 691
- Fouty BW, Grimison B, Fagan KA, et al. p27 (Kip1) is important in modulating pulmonary artery smooth muscle cell proliferation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25(5): 652 - 658
- Jirawatnotai S, Aziyu A, Osmundson EC, et al. Cdk4 is indispensable for postnatal proliferation of the anterior pituitary [J]. J Biol Chem, 2004, 279(49): 51100 - 51106
- Martín A, Odajima J, Hunt SL, et al. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27 (Kip1) and p21 (Cip1) [J]. Cancer Cell, 2005, 7(6): 591 - 598

(收稿日期: 2014 - 09 - 17)

(修回日期: 2014 - 10 - 16)