

FTY720 对低氧性大鼠肺动脉平滑肌细胞 P38MAPK 和 NF- κ B P65 表达及细胞凋亡的影响

叶玉柱 包财盈 温新意 薛彬彬 袁培根 林丽娜

摘要 目的 观察 FTY720 对低氧性大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)炎症通路和细胞凋亡的影响。方法 取成年雄性 SD 大鼠 15 只,用 I 型胶原酶消化法进行 PASMCs 原代培养,将第 4~6 代生长良好的细胞随机分组:①常氧组(N 组);②低氧组(H 组);③P38MAPK 抑制剂(SB203580)组(H+SB 组);④~⑤:FTY720 干预组(2500ng/ml、5000ng/ml)组(H+FTY720 组),孵育 24h。采用 Western blot 法检测总 P38MAPK 和总 NF- κ B P65 以及 p-P38MAPK 和 p-NF- κ B P65 的相对表达量。TUNEL 法观察 PASMCs 的细胞凋亡情况。结果 与 N 组比较,H 组细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$),总 P38MAPK 和总 NF- κ B P65 无明显改变($P > 0.05$),p-P38MAPK 和 p-NF- κ B P65 的表达显著升高($P < 0.01$)。与 H 组比较,H+FTY720 组与 H+SB 组的细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),总 P38MAPK 和总 NF- κ B P65 无明显改变($P > 0.05$),p-P38MAPK 和 p-NF- κ B P65 的表达显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),且细胞凋亡率与 FTY720 浓度呈正相关($P < 0.01$)。结论 在低氧条件下,PASMCs 可能通过 P38MAPK/NF- κ B P65 通路促进细胞增殖。FTY720 可降低 p-P38MAPK 和 p-NF- κ B P65 的表达抑制低氧性 PASMCs 炎症反应,抑制细胞增殖并促进细胞凋亡,缓解肺动脉高压进展。

关键词 FTY720 肺动脉平滑肌 P38MAPK NF- κ B P65 凋亡

中图分类号 R363

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.06.016

Impact of FTY720 on the Expression of P38MAPK and NF- κ B P65 and Apoptosis of Rat Hypoxic Pulmonary Artery Smooth Muscle cells.

Ye Yuzhu, Bao Caiying, Wen Xinyi, et al. The First Clinical Medical College of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the impact of FTY720 on the apoptosis and the expression of P38MAPK and NF- κ B P65 of rat hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). **Methods** Pulmonary artery smooth muscle cells were isolated from adult male SD rats and primarily cultured. The subcultured cells were harvested and divided into control group, hypoxia group, hypoxia group treated with FTY720 (5000ng/ml) and SB203580 (5 μ mol/L) and hypoxia group treated with FTY720 (2500ng/ml, 5000ng/ml). The protein expression of P38MAPK, p-P38MAPK, NF- κ B P65, p-NF- κ B were detected by Western blot. TUNEL was applied to detect the apoptosis of PASMCs. **Results** The apoptosis rate of PASMCs was markedly reduced in H group compared with N group ($P < 0.05$). The expression of p-P38MAPK and p-NF- κ B P65 were significantly increased and had no difference in the total P38MAPK and NF- κ B P65 in H group. Compared with H group, the apoptosis rate of all treated groups was up regulated. The expression of p-P38MAPK and p-NF- κ B P65 were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the manner of dose-dependent and had no difference in the total P38MAPK and NF- κ B P65 ($P > 0.05$). **Conclusion** FTY720 inhibits inflammatory response and proliferation of hypoxic PASMCs by down regulation of the expression of p-P38MAPK and p-NF- κ B and promotes apoptosis.

Key words FTY720; Pulmonary artery smooth muscle cells; P38MAPK; NF- κ B P65; Apoptosis

低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)的病理过程包括肺血管收缩和血管重构过程,其中肺动脉平滑肌细胞过度增殖迁移是血管重构的一个重要因素。研究发现,P38MAPK 和 NF- κ B 在调节平滑肌细胞炎症、增殖调控中起到核心作用,与肺部疾病有着密切关系^[1,2]。FTY720 是冬虫夏草

主要活性成分多球壳菌素经加工获取的一种 1-磷酸鞘氨醇(S1P)受体阻滞剂,可用于自身免疫疾病、炎症反应、器官移植排斥反应等疾病的治疗^[3]。新的研究表明,FTY720 对 S1P 产生竞争性拮抗,抑制血小板衍生因子(PDGF)介导的平滑肌细胞的增殖和迁移,并可介导兔子血管平滑肌细胞的凋亡^[4,5]。FTY720 对低氧下肺动脉平滑肌细胞 P38MAPK 和 NF- κ B P65 表达的改变和对其凋亡的影响目前尚无报道,本实验通过 FTY720 对低氧性肺动脉平滑肌细

基金项目:浙江省科技计划项目(2012C37092)

作者单位:325000 温州医科大学第一临床医学院

通讯作者:林丽娜,电子邮箱:wzlinlina@163.com

胞的干预,观察其肺动脉高压的保护作用及机制。

材料与方法

1. 主要材料:(1)动物:SPF 级健康雄性 SD 大鼠 15 只,体重 180 ~ 220g,购于温州医科大学实验动物中心。(2)主要试剂:高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、胰酶、青 - 链霉素购于美国 Gibco 公司;FTY720、台盼蓝、胶原酶 I、P38MAPK 抑制剂(SB203580)购于美国 Sigma 公司;BCA Protein Assay Kit 购于美国 Thermo 公司;TUNEL 试剂盒购于瑞士 Roche 公司;SM - α - actin 小鼠单克隆抗体、FITC 标记的羊抗小鼠 IgG 购于英国 Abcam 公司;兔抗大鼠磷酸化 P38MAPK、兔抗大鼠 P38MAPK、兔抗大鼠磷酸化 NF - κ B P65、兔抗大鼠 NF - κ B P65、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 二抗购自 CST 公司。

2. 方法:(1)PASMCs 分离、培养:大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后处死,取 2 ~ 4 级肺动脉,去内外膜剪成 5mm × 5mm 的组织块,胶原酶 I 消化 30min,取单个平滑肌细胞,并转移到培养瓶中用 20% 胎牛血清 DMEM 于恒温培养箱中培养。当细胞生长至培养瓶底面积 90% 时,可用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,吹打后制成悬液,以适当密度种植于培养皿继续传代培养。(2)PASMCs 鉴定:倒置相差显微镜观察细胞形态并摄片,激光共聚焦免疫荧光染色法鉴定 PASMCs 采用 α - actin 肌动蛋白单克隆抗体(稀释度 1:100),4℃ 过夜后滴加 FITC 标记羊抗小鼠(稀释度 1:200)孵育。滴加 DAPI 核染液(1 μ g/ml),室温避光 3min,在激光共聚焦显微镜下以同一视野不同激发波长观察摄片,其中 FITC:激发波长 488nm,发射光峰值 630nm;DAPI:激发波长 488nm,发射光峰值 358nm。(3)实验分组:取第 4 ~ 5 代对数生长期 PASMCs,胰酶消化后按 5 × 10⁵ 个/毫升的密度接种于 10cm 培养皿中,加入含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基,置于 37℃、5% CO₂ 普通培养箱中进行培养,约 80% 铺满时换成无血清培养基饥饿培养 24h,然后行药物干预,分组如下:①常氧组(N 组);②低氧组(H 组);③P38MAPK(SB203580)抑制剂组(H + SB 组);④ ~ ⑤:FTY720 干预组(2500ng/ml,5000ng/ml)组(H + FTY720 组)分别孵育 24h。(4)Western blot 法检测 p - P38MAPK 与总 P38MAPK、p - NF - κ B P65 与总 NF - κ B P65 的蛋白含量表达:弃培养液,将各组细胞用预冷的 PBS 洗 3 次。各组培养皿内加入细胞裂解液 100 μ l,冰上裂解 30 ~ 50min。充分裂解后,12000r/min,4℃ 离心 20min,取上清液后以 BCA 法测定蛋白浓度。用 10% SDS - PAGE 分离蛋白,再经湿转(300mA,70min)至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1.5h。加入兔抗大鼠 P38MAPK、兔抗大鼠 p - P38MAPK(稀释度 1:1000)、兔抗大鼠 NF - κ B P65、兔抗大鼠 p - NF - κ B P65(稀释度 1:1000)、兔抗大鼠 GAPDH(稀释度 1:1000),4℃ 孵育过夜。山羊抗兔二抗(稀释度 1:5000)孵育 1h,TBST 清洗 3 次,每次 10min。ECL 化学发光法覆盖条带,全自动曝光机曝光。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 p - P38MAPK 与总 P38MAPK、磷酸化 NF - κ B P65 与总 NF - κ B P65 的灰度值比值(相对 A 值)表示目的条带强度。(5)原位

缺口末端标记(TUNEL)检测 PASMCs 细胞凋亡: PASMCs 以 5 × 10⁴ 的密度种植于玻片,分别以 500、1500、4500ng/ml 的 FTY720 干预细胞低氧 24h 后取出检测。按 TUNEL 试剂盒说明书操作,以无末端转移酶的标记液代替 TUNEL 复合物作为阴性对照,以棕黄色细胞核的细胞作为阳性对照,每张玻片随机选择 5 个高倍镜视野,计算凋亡细胞数的百分数,即凋亡指数(%) = 凋亡阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

3. 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 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。样本均数进行方差齐性检验,采用单因素方差分析进行组间比较。方差齐者采用 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. 原代培养 PASMCs 的鉴定:原代 PASMCs 培养 48 ~ 72h 后,可在 Olympus 倒置相差显微镜下观察到细胞呈长梭形或三角形生长,大小不一,重叠交织排铺。培养至 5 ~ 7 天,培养皿内细胞密度低处呈网格状,密度高处呈栅栏状,呈现出平滑肌细胞特有的“峰 - 谷”状生长(图 1)。PASMCs 经 α - actin 单克隆抗体孵育、FITC 标记的二抗染色、DAPI 细胞核复染后,在激光共聚焦显微镜下观察,98% 的 PASMCs 表达阳性。FITC 标记的平滑肌 α - 肌动蛋白呈现绿色荧光,以纤维细丝状排列;DAPI 染色的细胞核呈卵圆形,发蓝色荧光(图 2)。

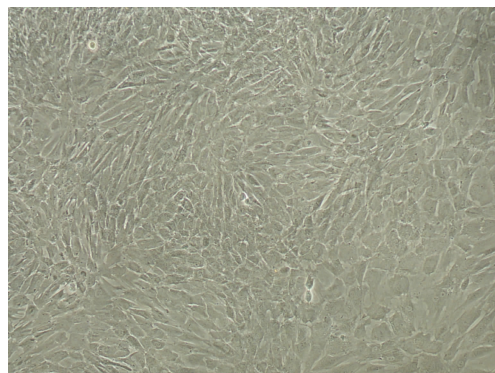


图 1 大鼠原代培养肺动脉平滑肌细胞(×100)

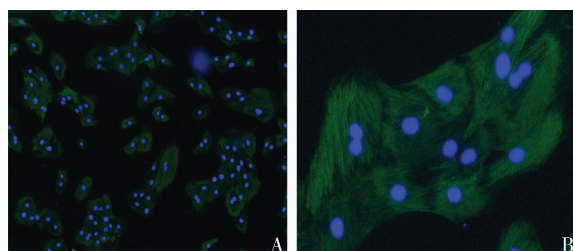


图 2 大鼠肺动脉平滑肌细胞 α - actin 免疫荧光染色(A. ×100, B. ×400)

2. FTY720 对各组 PSMCs 的 p - P38MAPK、总 P38MAPK、磷酸化 NF - κ B P65、总 P65 蛋白表达的影响:如图 3 所示,与 N 组比较,H 组的总 P38MAPK 和总 NF - κ B P65 表达量无明显改变($P > 0.05$),p - P38MAPK 和 p - NF - κ B P65 的表达显著升高($P < 0.01$)。与 H 组比较,H + SB 组和不同浓度的 H + FTY720 组的总 P38MAPK 和总 NF - κ B P65 表达量无明显改变($P > 0.05$),p - P38MAPK 和 p - NF - κ B P65 的表达显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

表 1 各组 PSMCs 的 p - P38MAPK/P38MAPK、p - NF - κ B P65/NF - κ B P65 相对表达量

组别	p - P38MAPK/ P38MAPK	p - NF - κ B P65/ NF - κ B P65
N 组	0.157 $\pm$ 0.023	0.199 $\pm$ 0.035
H 组	0.339 $\pm$ 0.041 *	0.453 $\pm$ 0.044 *
H + SB 组	0.291 $\pm$ 0.024 #	0.382 $\pm$ 0.031 #
H + FTY720 (2500ng/ml) 组	0.204 $\pm$ 0.0158 ##	0.302 $\pm$ 0.058 #
H + FTY720 (5000ng/ml) 组	0.120 $\pm$ 0.0157 ## Δ	0.179 $\pm$ 0.019 ## Δ

与 N 组比较,* $P < 0.01$;与 H 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与 H + FTY720 (2500ng/ml) 组比较, $\Delta P < 0.01$

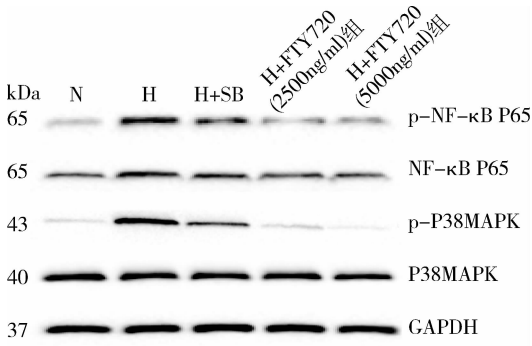


图 3 各组 PSMCs p - P38MAPK、总 P38 MAPK、p - NF - κ B P65、总 NF - κ B P65 的蛋白表达

3. 低氧和 FTY720 对各组 PSMCs 凋亡率的影响:TUNEL 结果显示,凋亡细胞细胞核染色为棕黄色,细胞形态变小、出现核固缩等改变。与 N 组比较,H 组细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$),差异有统计学意义。与 H 组比较,H + FTY720 组与 H + SB 组的细胞凋亡率显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),且细胞凋亡率与 FTY720 浓度呈正相关(图 4)。

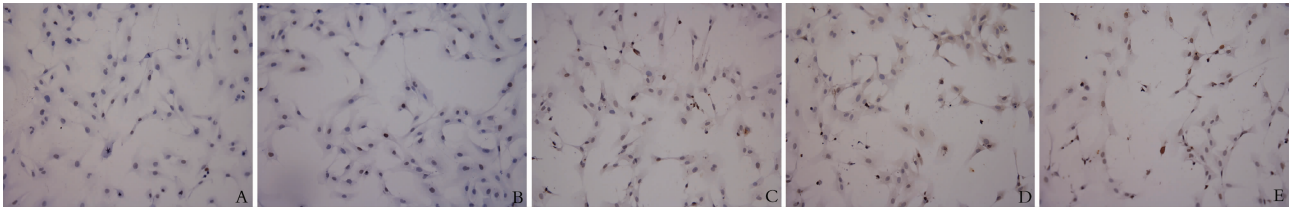


图 4 低氧、SB203580 和不同浓度 FTY720 对各组 PSMCs 凋亡的影响
A. N 组;B. H 组;C. H + SB 组;D. H + FTY720 (2500ng/ml) 组;E. H + FTY720 (5000ng/ml) 组

讨 论

肺动脉高压是由诸多因素引起的肺动脉压力异常增高而导致的循环衰竭甚至死亡。低氧环境可引起肺血管收缩、肺动脉平滑肌增殖、血管重构等一系列病理生理改变,导致肺动脉高压的发生。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen - activated protein kinase, MAPK)是调节细胞增殖的重要通路,也是细胞内外信号转导的重要共同途径,其亚家族包括 JNKs/SAPKs、ERK1/2、P38MAPK 等^[6]。国外研究表明,在重度哮喘和 COPD 患者的 PSMCs 内发现 P38MAPK 大量激活^[7]。Zhang 等^[8]发现在慢性缺氧的大鼠肺动脉内发现 p - P38MAPK 蛋白表达显著增加,提示低氧刺激可能通过 P38MAPK 信号通路调节肺动脉平滑肌细胞的增殖,引发肺动脉高压的发生。核因子 κ B (nuclear factor - κ B, NF - κ B) 是一种重要的核转录

因子,它激活后可调控细胞内多种炎性介质和细胞因子的释放,发挥生理效应^[9]。研究发现,NF - κ B 激活后可明显抑制细胞的凋亡,加速 G₀/G₁ 期向 S 相进展,促进细胞增殖^[10]。近年来对 NF - κ B 于肺动脉高压关系的大量研究显示,低氧可诱导 NF - κ B 的转录活性增加,而 NF - κ B 抑制剂可缓解肺损伤和肺动脉高压的病理过程^[11]。

FTY720 具有强效的免疫调节、抗氧化、抗疲劳等作用,对呼吸系统、心血管系统等有很好的保护作用。研究表明,FTY720 可通过下调磷酸化 Akt 和 Bcl2 并增加 caspase - 3 的活性来抑制胰腺细胞的增殖、迁移和细胞集落形成^[12]。Mousseau 等^[13]发现 FTY720 通过下调 S1PR1/S1PR3 的通路来抑制血管平滑肌细胞的迁移增殖。

本研究发现低氧刺激 PSMCs 24h 后,低氧组的

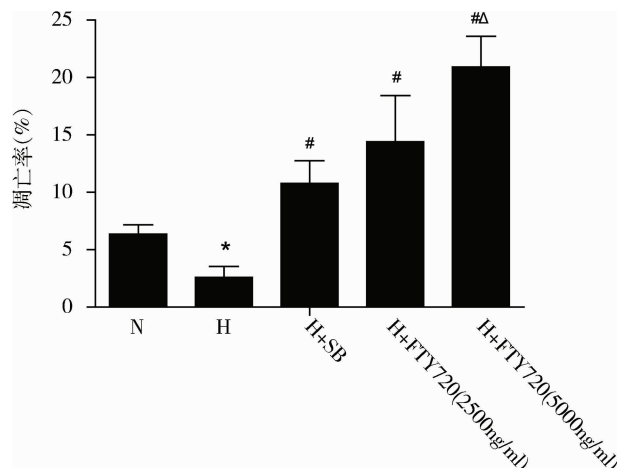


图 5 低氧、SB203580 和不同浓度 FTY720 对各组 PSMCs 凋亡率的影响

与 N 组比较, * $P < 0.05$; 与 H 组比较, # $P < 0.01$;
与 H + FTY720 (2500ng/ml) 组比较, Δ $P < 0.01$

p - P38MAPK 和 p - NF - κ B P65 表达量显著升高, 与常氧组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。TUNEL 结果表明低氧组细胞凋亡率较常氧组也明显降低 ($P < 0.05$)。低氧下 P38MAPK 的特异性抑制剂 SB203580 在低氧下干预 PSMCs 后, p - P38MAPK 和 p - NF - κ B P65 表达量均受到显著抑制, 且细胞凋亡率也较低氧组明显提高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。以上结果提示, 低氧下 PSMCs 的 NF - κ B P65 的磷酸化过程需要 P38MAPK 通路的激活。因此, 阻断 P38MAPK/NF - κ B P65 通路的激活能有效抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖, 成为治疗肺动脉高压的有效靶点。

最近的研究显示, 低氧下血管平滑肌细胞的鞘氨醇酶 1 (SphK1) 的表达和活性显著增高, 促进平滑肌细胞的增殖^[14]。1 - 磷酸鞘氨醇主要通过 S1PR1 激活下游通路促进细胞的增殖迁移。本研究还发现经不同浓度的 FTY720 处理后, p - P38MAPK 和 p - NF - κ B P65 表达显著下降 ($P < 0.01$), FTY720 作为 S1PR 的竞争性拮抗, 该机制可能是通过拮抗 1 - 磷酸鞘氨醇受体 S1PR1 和 S1PR3 并影响 P38MAPK/NF - κ B 通路的激活, 从而抑制了平滑肌细胞的迁移增殖, 发挥血管保护作用。TUNEL 结果显示随着 FTY720 浓度的增高, 细胞凋亡率也随之增加。该结果表明, FTY720 对 PSMCs 的促凋亡效应呈剂量依赖性, 不同浓度组之间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

综上所述, 低氧性 PSMCs 可能通过 P38MAPK/NF - κ B P65 通路激活促进细胞增殖。FTY720 可明显抑制 p - P38MAPK 和 p - NF - κ B P65 的表达, 抑制增殖并促进 PSMCs 的凋亡, 该过程可能与 FTY720 与 PSMCs 的 S1P 受体激活抑制有关。FTY720 抑制 p - P38MAPK 和 p - NF - κ B P65 的表达与 S1P 受体之间存在何种关系仍需进一步研究。

参考文献

- Christman JW, Sadikot RT, Blackwell TS. The role of nuclear factor - κ B in pulmonary diseases[J]. Chest, 2000, 117(5):1482 - 1487
- Morse D, Lin L, Choi AM, *et al.* Heme oxygenase - 1, a critical arbitrator of cell death pathways in lung injury and disease[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(1):1 - 12
- 郑明克, 肖鹤, 黎燕, 等. 新型免疫抑制剂芬戈莫德的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2013, 1:100 - 104
- Mousseau Y, Mollard S, Richard L, *et al.* Fingolimod inhibits PDGF - B - induced migration of vascular smooth muscle cell by down - regulating the S1PR1/S1PR3 pathway[J]. Biochimie, 2012, 94(12):2523 - 2531
- Bohler T, Guillebaud J, Etienne L, *et al.* Effect of FTY720 on apoptosis of smooth muscle cells[J]. Transplant Proc, 2007, 39(8):2624 - 2626
- Huang P, Han J, Hui L. MAPK signaling in inflammation - associated cancer development[J]. Protein Cell, 2010, 1(3):218 - 226
- Chung KF. p38 mitogen - activated protein kinase pathways in asthma and COPD[J]. Chest, 2011, 139(6):1470 - 1479
- Zhang CL, Song F, Zhang J, *et al.* Hypoxia - induced Bcl - 2 expression in endothelial cells via p38 MAPK pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(4):976 - 980
- Lawrence T. The nuclear factor NF - κ B pathway in inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6):a1651
- Hinz M, Krappmann D, Eichten A, *et al.* NF - κ B function in growth control: regulation of cyclin D1 expression and G₀/G₁ - to - S - phase transition[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(4):2690 - 2698
- Di Giuseppe M, Gambelli F, Hoyle G W, *et al.* Systemic inhibition of NF - κ B activation protects from silicosis[J]. PLoS One, 2009, 4(5):e5689
- Shen Y, Cai M, Xia W, *et al.* FTY720, a synthetic compound from Isaria sinclairii, inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. Cancer Lett, 2007, 254(2):288 - 297
- Mousseau Y, Mollard S, Richard L, *et al.* Fingolimod inhibits PDGF - B - induced migration of vascular smooth muscle cell by down - regulating the S1PR1/S1PR3 pathway[J]. Biochimie, 2012, 94(12):2523 - 2531
- 郭强, 张凯, 刘漠熔, 等. 1 - 磷酸鞘氨醇促进大鼠血管平滑肌细胞迁移的实验研究[J]. 军事医学, 2011, 4:278 - 281

(收稿日期:2014 - 10 - 31)

(修回日期:2014 - 12 - 01)