

转化生长因子 β_1 抑制肺动脉平滑肌细胞凋亡的机制研究[△]

刘云*,朱金权,孙增先[#](连云港市第一人民医院药学部,江苏连云港 222002)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)34-4784-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.10

摘要 目的:研究转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)抑制肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)凋亡的可能机制。方法:以无血清培养基进行饥饿诱导(SD),MTT法检测0.1、1、5、10 ng/ml的TGF- β_1 对SD诱导PASMCs细胞存活率的影响。Hoechst 33342染色观察正常对照组、SD组、SD+LY294002[磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂]+TGF- β_1 组、SD+Wortmannin(PI3K抑制剂)+TGF- β_1 组、SD+TGF- β_1 组细胞凋亡情况。分别用Western blot法考察正常对照组、SD组、TGF- β_1 组、SD+TGF- β_1 组细胞内蛋白激酶B(Akt)、磷酸化(p)-Akt蛋白的表达,正常对照组、SD组、SD+TGF- β_1 组、SD+LY294002组、SD+LY294002+TGF- β_1 组细胞环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)、p-CREB蛋白表达,正常对照组、SD组、SD+TGF- β_1 组、SD+Wortmannin组、SD+Wortmannin+TGF- β_1 组细胞CREB和p-CREB蛋白表达,LY294002、Wortmannin、TGF- β_1 的加入浓度分别为10 μ mol/L、50 nmol/L、10 ng/ml。结果:与SD比较,TGF- β_1 作用后细胞存活率呈剂量依赖性增加,其中5、10 ng/ml质量浓度下细胞存活率差异有统计学意义($P<0.05$)。与正常对照组比较,SD组、SD+LY294002+TGF- β_1 组、SD+Wortmannin+TGF- β_1 组细胞凋亡率均增加($P<0.05$);与SD组比较,SD+TGF- β_1 组细胞凋亡率下降($P<0.05$)。与正常对照组比较,TGF- β_1 组细胞内p-Akt蛋白表达增强,p-Akt/Akt增加;与SD组比较,SD+TGF- β_1 组细胞内p-Akt蛋白表达增强,p-Akt/Akt增加。与正常对照组比较,SD组细胞内CREB蛋白表达减弱;与SD组比较,SD+TGF- β_1 组细胞内CREB蛋白表达增强;与SD+TGF- β_1 组比较,SD+LY294002+TGF- β_1 组和SD+Wortmannin+TGF- β_1 组细胞内CREB蛋白表达均减弱,以上差异均有统计学意义($P<0.05$)。结论:TGF- β_1 可能通过激活PI3K/Akt信号通路抑制PASMCs凋亡。

关键词 肺动脉高压;转化生长因子 β_1 ;磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B;凋亡

Study on the Mechanism of TGF- β_1 Inhibiting the Apoptosis of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells

LIU Yun, ZHU Jinquan, SUN Zengxian (Dept. of Pharmacy, the First People's Hospital of Lianyungang, Jiangsu Lianyungang 222002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the potential mechanism of TGF- β_1 inhibiting the apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). METHODS: The serum free medium was used for serum deprivation (SD); MTT assay was used to detect the effects of 0.1, 1, 5, 10 ng/ml TGF- β_1 on the survival rate of PASMCs. The apoptosis of PASMCs were observed by Hoechst 33342 staining in normal control group, SD group, SD+LY294002 [PI3K inhibitor]+TGF- β_1 group, SD+Wortmannin (PI3K inhibitor)+TGF- β_1 group and SD+TGF- β_1 group. Western blot technique was applied to investigate the protein expression of Akt and p-Akt in normal control group, SD group, TGF- β_1 group and SD+TGF- β_1 group; the protein expression of CREB and p-CREB were investigated in normal control group, SD group, SD+TGF- β_1 group, SD+LY294002 group and SD+LY294002+TGF- β_1 group; the protein expression of CREB and p-CREB were investigated in normal control group, SD group, SD+TGF- β_1 group, SD+Wortmannin group and SD+Wortmannin+TGF- β_1 group. The concentrations of LY294002, Wortmannin and TGF- β_1 were 10 μ mol/L, 50 nmol/L, 10 ng/ml, respectively. RESULTS: Compared with SD, survival rate of PASMCs increased as dosage after treated by TGF- β_1 , with statistical significance at 5, 10 ng/ml ($P<0.05$). Compared with normal control group, apoptotic rate of PASMCs increased in SD group, SD+LY294002+TGF- β_1 group and SD+Wortmannin+TGF- β_1 group ($P<0.05$); compared with SD group, the apoptotic rate of PASMCs decreased in SD+TGF- β_1 group ($P<0.05$). Compared with normal control group, the protein expression of p-Akt and p-Akt/Akt ratio increased in TGF- β_1 group; compared with SD group, the protein expression of p-Akt and p-Akt/Akt ratio increased in SD+TGF- β_1 group. Compared with normal control group, the protein expression of CREB decreased in SD group; compared with SD group, the protein expression of CREB increased in SD+TGF- β_1 group; compared with SD+TGF- β_1 group, the protein expression of CREB decreased in SD+LY294002+TGF- β_1 group and SD+Wortmannin+TGF- β_1 group, with statistical significance ($P<0.05$). CONCLUSIONS: TGF- β_1 can inhibit the apoptosis of PASMCs by activating PI3K/Akt signaling pathway.

KEYWORDS Pulmonary arterial hypertension; TGF- β_1 ; PI3K/Akt; Apoptosis

肺动脉高压(PAH)是一种致命性疾病,其特点是肺血管过度收缩和平滑肌细胞增殖和凋亡失衡引起血管壁不规则重构。内皮细胞、平滑肌细胞及成纤维细胞等过度分化增生,并积累到血管壁各层,会造成血管闭塞性病变、肺动脉压及肺血

管阻力升高、右心室后负荷增加,从而导致右心室衰竭,甚至死亡^[1]。所以,肺血管重构的防治研究日益受到人们的重视。肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖和凋亡的失衡是导致PASMCs增殖累积和肺部血管壁重构的重要因素之一,抑制PASMCs过度增殖、诱导其凋亡可以作为治疗和控制PAH的有效方法。转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)是体内最强且最广泛的促纤维化介质之一,具有调控细胞分化、增殖、凋亡的功能,其对软骨组织代谢有重要作用^[2],也可促进PAH中肺血管重构过程^[3-4],但是其作用机制尚不清楚。Akt,亦被称为蛋白激酶B(PKB),是一种分子质量为60 kD的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,

[△]基金项目:江苏省自然科学基金面上项目(No.BK20161297);连云港市第一人民医院博士科研启动基金项目(No.BS15012)

*主管药师,博士。研究方向:肺动脉高压发病机制。电话:0518-85605518。E-mail:yunliu211315@163.com

[#]通信作者:主任药师,博士。研究方向:临床药学。电话:0518-85605518。E-mail:sunzx715@163.com

可以通过磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)依赖的方式调节多种细胞因子和生长因子,活化的PI3K/Akt通路调控细胞的生长与存活、增殖与凋亡、细胞迁移运动以及细胞周期等多种细胞活动和生物学效应。PI3K/Akt通路在PAH的发病机制中已有广泛研究^[5]。本研究假设TGF- β_1 通过PI3K/Akt通路抑制PASCs凋亡从而引起PAH,现对其进行验证。

1 材料

1.1 仪器

MK3型酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);体视显微镜(上海光学仪器厂);IX 70-SIF2型倒置显微镜、IX73-奥林帕斯倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);核酸蛋白定量仪(瑞士Amersshams公司)。

1.2 药品与试剂

TGF- β_1 (美国PeproTech公司,批号:0719029,规格:2 $\mu\text{g/ml}$);环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB)抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国Santa公司);Akt抗体、磷酸化Akt(p-Akt)抗体、p-CREB抗体(美国Cell Signaling公司);Hoechst 33342试剂盒、MTT试剂、辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(H+L)和PI3K抑制剂LY294002、Wortmannin(碧云天生物技术研究所)。

1.3 动物

健康SD大鼠25只,♀♂不限,体质量160~200 g,鼠龄7~9周,由徐州医科大学实验动物中心提供,购自北京维通利华动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2012-0001。

2 方法

2.1 PASCs的来源

常规麻醉大鼠,75%乙醇冲洗颈部和腹部,开胸,取完整的心肺组织放入培养皿内,分离肺动脉。将取出的肺动脉放入无菌磷酸盐缓冲液(PBS)里,去除纤维外膜和内皮,剪成1~2 mm的组织块,用1.5% II型胶原酶消化1~2 h,直至组织块变成细胞团,加入含20%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基,终止消化,400 \times g离心5 min,弃上清,加入1 ml新鲜培养基重悬细胞,接种于细胞瓶中,常规静置培养,待细胞生长达培养皿面积的80%左右对其进行传代培养。

2.2 MTT法检测PASCs存活率

收集对数期PASCs,胰酶消化,用培养液配成细胞悬液,加至96孔板中,调整细胞数为每孔5 000~10 000个,铺板后置于温箱中培养24 h,分别加入含0.1、1、5、10 ng/ml TGF- β_1 的无血清DMEM培养基,每个质量浓度6个复孔。另取6个孔加入不含TGF- β_1 的无血清DMEM培养基进行饥饿诱导(记为SD)。共同孵育48 h后,加入20 ml MTT试剂,孵育4 h,弃上清,每孔加入150 μl 二甲亚砜(DMSO),低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶标仪492 nm处测定吸光度值,计算细胞存活率,细胞存活率(%)=(加药孔吸光度-本底吸光度)/(对照孔吸光度-本底吸光度) \times 100%。

2.3 Hoechst 33342染色观察PASCs的凋亡情况

收集对数期PASCs,待细胞生长达培养皿面积70%左右对其进行饥饿诱导24 h,然后分为正常对照组、SD组、SD+LY294002+TGF- β_1 组、SD+Wortmannin+TGF- β_1 组、SD+TGF- β_1 组,每组6个复孔,LY294002、Wortmannin、TGF- β_1 的加入浓度分别为10 $\mu\text{mol/L}$ 、50 nmol/L、10 ng/ml。除正常对照组细胞加入含20% FBS的DMEM培养基外,其余各组细胞分别加入相应含药或不含药的无血清DMEM培养基。培养24 h后,弃培养液,用PBS洗3次,每次5 min,弃PBS,加入Hoechst 33342染料与细胞共同孵育20 min。加入抗荧光淬灭封片液,荧光显微镜观察蓝色荧光产生情况,评价细胞凋亡情况,激发波长为

352 nm,发射波长为400~500 nm。

2.4 Western blot法检测PASCs内Akt、p-Akt、CREB和p-CREB蛋白表达

收集对数期PASCs,待细胞生长达培养皿面积70%左右对其进行饥饿诱导24 h,然后分为正常对照组、SD组、TGF- β_1 组、SD+TGF- β_1 组、SD+LY294002组、SD+Wortmannin组、SD+LY294002+TGF- β_1 组、SD+Wortmannin+TGF- β_1 组,每组4个复孔,LY294002、Wortmannin、TGF- β_1 的加入浓度分别为10 $\mu\text{mol/L}$ 、50 nmol/L、10 ng/ml。除正常对照组和TGF- β_1 组细胞加入20% FBS DMEM培养基外,其余各组细胞分别加入相应含药或不含药的无血清DMEM培养基。作用24 h后,弃培养液,用PBS洗3次,加入细胞蛋白裂解液,冰上裂解30 min后,收集液体,超声破碎细胞,3 000 \times g离心15 min后收集上清。根据Bradford法测定蛋白浓度,加入上样缓冲液,煮沸5 min,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,200 mA恒流转膜1.5 h。转膜完毕后,取出膜放入平皿中的TBST缓冲液中,摇洗5 min,洗净转膜液,封闭1 h后取出膜,再用TBST缓冲液洗5 min,加入Akt(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、CREB(1:1 000)、p-CREB(1:1 000)一抗(溶于3%牛血清白蛋白),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。一抗孵育完毕后,用TBST缓冲液洗30 min,然后将HRP标记山羊抗兔二抗溶于5%脱脂牛奶中(1:5 000),室温孵育1 h。二抗孵育完毕后,用TBST缓冲液洗30 min。均匀滴加增强化学发光(ECL)试剂的A、B液(1:1)混合液,静置5 min,放入凝胶成像仪曝光,Quantity One软件分析光密度(OD)。以目的蛋白灰度值与 β -actin(内参)灰度值的比值表示目的蛋白的相对含量^[6]。分别考察正常对照组、SD组、TGF- β_1 组、SD+TGF- β_1 组细胞内Akt、p-Akt蛋白的表达,正常对照组、SD组、SD+TGF- β_1 组、SD+LY294002组、SD+LY294002+TGF- β_1 组细胞CREB、p-CREB蛋白表达,正常对照组、SD组、SD+TGF- β_1 组、SD+Wortmannin组、SD+Wortmannin+TGF- β_1 组细胞CREB、p-CREB蛋白表达。

2.5 统计学方法

采用Microsoft Excel软件进行分析。计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞存活率

0.1、1、5、10 ng/ml TGF- β_1 和SD作用后PASCs存活率分别为(62.65 \pm 3.76)%、(66.07 \pm 3.81)%、(83.46 \pm 4.80)%、(91.59 \pm 1.43)%、(63.12 \pm 2.64)% ($n=6$)。与SD比较,加入TGF- β_1 作用后的PASCs存活率呈剂量依赖性升高,其中5、10 ng/ml质量浓度下细胞存活率差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3.2 细胞凋亡情况

正常对照组、SD组、SD+LY294002+TGF- β_1 组、SD+Wortmannin+TGF- β_1 组、SD+TGF- β_1 组PASCs凋亡率分别为(4.83 \pm 0.60)%、(37.83 \pm 1.14)%、(34.50 \pm 1.33)%、(34.00 \pm 1.59)%、(16.83 \pm 0.95)% ($n=6$)。与正常对照组的正常细胞(图1a)比较,SD组、SD+LY294002+TGF- β_1 组、SD+Wortmannin+TGF- β_1 组细胞在核染色质形态上有明显改变,例如细胞核呈锯齿状,部分染色质出现浓缩状态(见图1b1);细胞核的染色质高度凝集、边缘化(见图1b2);细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体(见图1b3),这些形态的发生提示细胞的凋亡数均增加($P < 0.05$)。与SD组比较,SD+TGF- β_1 组细胞凋亡数明显减少($P < 0.05$)。各组细胞的凋亡染色图见图1。

3.3 细胞内Akt、p-Akt蛋白表达

正常对照组、SD组、TGF- β_1 组、SD+TGF- β_1 组细胞内

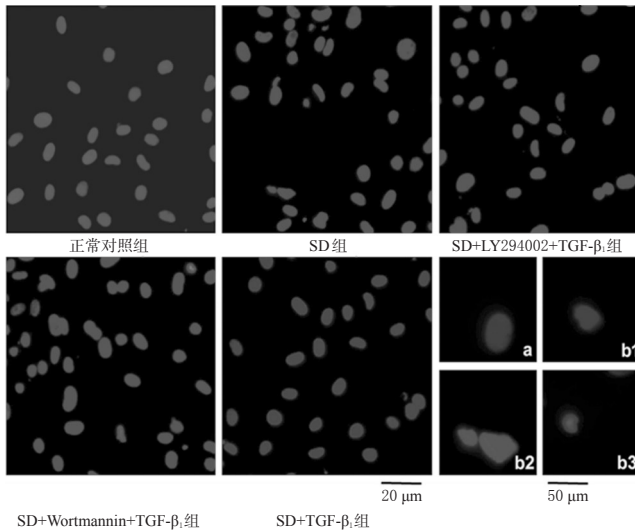


图1 各组细胞的凋亡染色图

Fig 1 Apoptosis staining of cells in each group

p-Akt/Akt分别为 1 ± 0 、 0.61 ± 0.04 、 1.48 ± 0.12 、 1.02 ± 0.06 ($n=4$)。与正常对照组比较, TGF- β_1 组细胞内 p-Akt 蛋白表达增强, p-Akt/Akt 增加 ($P < 0.05$)。与 SD 组比较, SD+TGF- β_1 组细胞内 p-Akt 蛋白表达增强, p-Akt/Akt 增加 ($P < 0.05$)。各组细胞内 Akt, p-Akt 蛋白表达的电泳图见图 2。

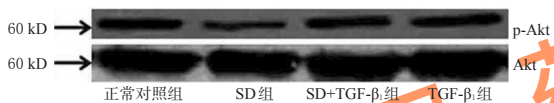


图2 各组细胞内 Akt、p-Akt 蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of the protein expression of Akt and p-Akt of cells in each group

3.4 细胞内 CREB、p-CREB 蛋白表达变化

与正常对照组比较, SD 组细胞内 CREB 蛋白表达减弱 ($P < 0.05$)。与 SD 组比较, SD+TGF- β_1 组细胞内 CREB 蛋白表达增强 ($P < 0.05$)。与 SD+TGF- β_1 组比较, SD+LY294002+TGF- β_1 组和 SD+Wortmannin+TGF- β_1 组细胞内 CREB 蛋白表达均减弱 ($P < 0.05$)。各组细胞内 CREB、p-CREB 蛋白表达的电泳图见图 3, 检测结果见表 1。

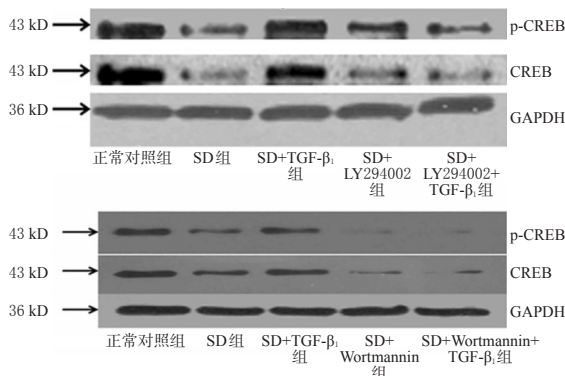


图3 各组细胞内 p-CREB、CREB 蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretogram of the protein expression of p-CREB and CREB of cells in each group

4 讨论

TGF- β_1 是肺形态形成、肺纤维化发病、血管重构重要的调节因子。笔者以往研究发现, TGF- β_1 参与肺动脉血管重构,且在缺氧鼠肺动脉中过表达^[9]。目前研究中,笔者发现 TGF- β_1 可

表1 各组细胞内 CREB 蛋白表达及 p-CREB/CREB 的检测结果 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 1 The protein expression of CREB and p-CREB/CREB of cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	CREB/GAPDH	p-CREB/CREB	组别	CREB/GAPDH	p-CREB/CREB
正常对照组	1.42 ± 0.11	1.02 ± 0.06	正常对照组	1.47 ± 0.03	0.90 ± 0.05
SD组	0.90 ± 0.08*	0.92 ± 0.06	SD组	0.83 ± 0.06*	1.04 ± 0.03
SD+TGF- β_1 组	1.24 ± 0.08 ^a	1.00 ± 0.07	SD+TGF- β_1 组	1.24 ± 0.10 ^a	0.98 ± 0.02
SD+LY294002组	0.80 ± 0.01	1.07 ± 0.03	SD+Wortmannin组	0.78 ± 0.07	1.10 ± 0.07
SD+LY294002+TGF- β_1 组	0.73 ± 0.03 ^a	0.95 ± 0.09	SD+Wortmannin+TGF- β_1 组	0.75 ± 0.05 ^a	1.05 ± 0.07

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$;与 SD 组比较, ^a $P < 0.05$;与 SD+TGF- β_1 组比较, ^a $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.05$; vs. SD group, ^a $P < 0.05$; vs. SD+TGF- β_1 group, ^a $P < 0.05$

诱导 Akt 磷酸化,提示 PI3K/Akt 通路在 TGF- β_1 抑制 PSMCs 凋亡中是必要的。

CREB 是一种缺氧敏感的转录因子,可选择性结合环磷酸腺苷反应元件 (CREs) 的核蛋白。缺氧可以激活 CREB 的高表达, CREB 已经被认为是 PAH 血管平滑肌细胞增殖的一个指标^[7]。笔者研究发现, TGF- β_1 不仅可增加 CREB 磷酸化而且也可加强 CREB 总蛋白表达,抑制 PSMCs 中 PI3K/Akt 通路后, CREB 表达受到抑制,而 p-CREB/CREB 的比例没有发生变化,表明 CREB 磷酸化水平增加归功于总蛋白水平增加。

综上所述, PI3K/Akt 通路涉及到 TGF- β_1 诱导的 PAH, 这一研究为 TGF- β_1 抑制 PSMCs 凋亡找到了新的信号转导通路和机制。TGF- β_1 调节 PI3K/Akt 通路可能是治疗 PAH 的重要机制,为将来治疗 PAH 提供了新的靶点。

参考文献

- [1] Crosswhite P, Sun Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling[J]. *Mol Med*, 2014, 20(1): 191.
- [2] 郭铁峰,周明旺,李盛华,等.转化生长因子 β_1 对软骨组织代谢影响的研究进展[J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(15): 2 827.
- [3] Liu Y, Ma C, Zhang Q, *et al.* The key role of transforming growth factor-beta receptor I and 15-lipoxygenase in hypoxia-induced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(7): 1 184.
- [4] Liu Y, Cao Y, Sun S, *et al.* Transforming growth factor-beta1 upregulation triggers pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis imbalance in rats with hypoxic pulmonary hypertension via the PTEN/Akt pathways[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 77(Pt A): 141.
- [5] Zhang H, Gong Y, Wang Z, *et al.* Apelin inhibits the proliferation and migration of rat PSMCs via the activation of PI3K/Akt/mTOR signal and the inhibition of autophagy under hypoxia[J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(3): 542.
- [6] 李丽艳,俞金正,沈群.黄芪颗粒对病毒性心肌炎模型大鼠心肌细胞中 Cav-3、Smad3 表达的影响[J]. *中国药房*, 2016, 27(25): 3 509.
- [7] Yu SH, Chen JY, Zhang YM, *et al.* Effect of thoracic epidural blockade on hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17(9): 710.

(收稿日期:2016-07-29 修回日期:2016-10-26)

(编辑:邹丽娟)