

核转录因子- κ B 在辛伐他汀抑制大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用

刘忠强¹ 王晓琴² 刘瀚旻²

(1. 四川大学华西第二医院 PICU, 四川 成都 610041;
2. 西部妇幼医学研究院肺血管重构实验室, 四川 成都 610041)

[摘要] **目的** 探讨核转录因子- κ B (NF- κ B) 在辛伐他汀抑制大鼠肺动脉平滑肌细胞 (PASMC) 增殖中的作用。**方法** 随机将体外培养的大鼠 PASMC 分为对照组、血小板源性生长因子 (PDGF) 刺激组、辛伐他汀干预组和辛伐他汀联合小白菊内酯 (NF- κ B 抑制剂) 干预组, 每组 6 个样本。通过 MTT 比色法和流式细胞术检测 PASMC 的增殖及细胞周期; 通过免疫组织化学检测 NF- κ B 蛋白的表达并进行图像分析; 通过 Real-Time PCR 检测 NF- κ B mRNA 的表达水平。**结果** PDGF 刺激组的各时间点 MTT 值, S 期和 G2+M 期细胞比例, NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达水平均较对照组显著升高 (均 $P<0.05$); 给予辛伐他汀干预后, 上述各指标水平均较 PDGF 刺激组降低 (均 $P<0.05$); 辛伐他汀联合小白菊内酯干预后上述各指标下降更加明显, 但与辛伐他汀干预组比较差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。**结论** 辛伐他汀能抑制 PASMC 的增殖和细胞周期进程; NF- κ B 可能在辛伐他汀对 PASMC 增殖的抑制中起重要作用。 [中国当代儿科杂志, 2015, 17 (2): 185-189]

[关键词] 肺动脉平滑肌细胞; 核转录因子- κ B; 辛伐他汀; 大鼠

Effect of NF- κ B on proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells inhibited by simvastatin

LIU Zhong-Qiang, WANG Xiao-Qin, LIU Han-Min. Pediatric Intensive Care Unit, West China Second Hospital of Sichuan University, Chengdu 610041, China (Liu H-M, Email: myuxuan@163.com)

Abstract: Objective To explore the effects of NF- κ B on proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) inhibited by simvastatin. **Methods** PASMC isolated from rats and cultured *in vitro* were randomly divided into four groups ($n=6$ each): control, platelet-derived growth factor (PDGF) treatment, PDGF+simvastatin treatment, and PDGF+simvastatin+parthenolide (NF- κ B inhibitor) treatment. MTT colorimetric assay and flow cytometry were performed to detect cell proliferation and cell cycle distribution. Immunohistochemistry was performed to detect the expression of NF- κ B protein. Real-Time PCR was performed to detect NF- κ B mRNA expression. **Results** Compared with the control group, MTT values of PASMC at all time points, cell proportion at the S phase and G2+M phase, NF- κ B protein and mRNA expression increased significantly in the PDGF group ($P<0.05$). With the intervention of simvastatin, the levels of above indexes decreased compared with the PDGF group ($P<0.05$). With the intervention of simvastatin and parthenolide, the levels of above indexes decreased more obviously, but were not significantly different from those in the simvastatin intervention group. **Conclusions** Simvastatin can inhibit proliferation of PASMC and cell cycle process. NF- κ B may play an important role in the inhibitory effect of simvastatin on the proliferation of PASMC.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(2): 185-189]

Key words: Pulmonary artery smooth muscle cell; Nuclear transcription factor kappa B; Simvastatin; Rats

[收稿日期] 2014-08-04; [接受日期] 2014-10-03

[基金项目] 教育部博士点基金 (2013018111056)。

[作者简介] 刘忠强, 男, 硕士, 主治医师。

[通信作者] 刘瀚旻, 男, 教授。

肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cell, PASM) 的增殖和迁移是肺血管重构的主要特征, 是肺动脉高压 (PAH)、动脉粥样硬化等心血管疾病的共同发病基础^[1-3]。研究表明, 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA) 抑制剂辛伐他汀能抑制 PASM 增殖^[4-5], 但具体机制尚不清楚; 核转录因子 kappa B (nuclear transcription factor kappa B, NF- κ B) 具有促进炎症发生、抗凋亡作用, 直接参与细胞周期调控, 激活的 NF- κ B 可促进细胞增殖^[6-7]。但是, NF- κ B 是否在辛伐他汀抑制 PASM 增殖过程中发挥作用尚不明确。因此, 本研究拟通过培养大鼠 PASM, 给予血小板源性生长因子 (PDGF) 刺激增殖, 并给予辛伐他汀进行干预, 检测 PASM 增殖及细胞周期变化, 同时观察 NF- κ B 的表达情况, 探讨辛伐他汀抑制 PASM 增殖中可能的参与因子, 为临床治疗逆转肺血管重构提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

4 周龄 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠 6 只, 体重 250~400 g, 由四川大学华西医学院实验动物中心提供。胎牛血清、M199 培养基 (中国哈里公司), PDGF-BB、MTT、辛伐他汀、NF- κ B 抑制剂小白菊内酯 (美国 Sigma 公司), 兔抗鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体 (美国 Cell Signaling 公司), 生物素标记的羊抗兔抗体 (北京中杉公司); 光学显微镜 (日本 Olympus 公司), Leica 显微镜 (北京杰忠科技有限公司), Image-Pro plus 计算机图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司), 流式细胞仪 (美国 Coulter 公司)。

1.2 大鼠 PASM 培养及分组

SD 大鼠用 100 g/L 水合氯醛腹腔麻醉后, 在无菌技术条件下切开胸腔, 切取肺动脉, 分离中膜, 将中膜剪碎并接种到培养瓶中, 加入胎牛血清少许, 翻转培养瓶, 在 37℃、5%CO₂ 条件下培养 4 h 让组织贴壁后加入 M199 培养液 (含有 100 g/L 胎牛血清、10 万 IU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素), 继续静置培养。PASM 呈特征性“波峰”、“波谷”状态生长, 通过光镜和 α -SM-actin 免疫组化法鉴定证实。将 3~5 代生长旺盛的 PASM 作

为实验对象, 并根据随机化原则将其分为 4 组:

(1) 对照组: 仅给予 M199 基本培养基进行培养; (2) PDGF 刺激组: 实验前 12 h 在 M199 基本培养基中加入 PDGF (终浓度: 10 ng/mL^[8]); (3) 辛伐他汀干预组: 实验前 12 h 在 M199 基本培养基中加入 PDGF (终浓度: 10 ng/mL) 和辛伐他汀 (10 μ mol/L^[9]); (4) 辛伐他汀联合小白菊内酯干预组 (联合干预组): 实验前 12 h 在 M199 基本培养基中加入 PDGF (终浓度: 10 ng/mL)、辛伐他汀 (10 μ mol/L) 和 NF- κ B 抑制剂小白菊内酯 (20 μ mol/L)。

1.3 MTT 比色法检测细胞增殖情况

取对数生长期细胞, 用 2.5 g/L 胰酶消化后, 加入 M199 培养基, 制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 1×10^5 /mL, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 200 μ L。同条件继续在培养箱静置培养至每孔细胞约 10^5 个, 按上述分组给予干预措施, 每组 6 个复孔, 并分别在实验开始后 3 h、6 h、12 h 加入 MTT 溶液 (5 g/L) 20 μ L, 继续培养 4 h 后, 加入 150 μ L 二甲基亚砷 (DMSO), 振荡 10 min 后选择 492 nm 波长在酶标仪上测定各孔光吸收值 (A)。

1.4 流式细胞术检测细胞周期

按照 1.3 节中的方法取对数生长期细胞接种于 6 孔培养板中, 每孔 1 mL, 继续培养至细胞长满后, 饥饿 24 h, 分别按分组给予干预措施, 每组 6 个样本, 24 h 后终止实验, 消化离心后 (1000 rpm 离心 5 min), 经 PBS 洗涤细胞, 沉淀、吹打成单细胞悬液后, 用 4℃ 的 70% 冰乙醇固定, 调整细胞浓度为 1×10^6 /mL, 0.5 mL/L 碘化丙啶 (PI) 染色后, 用流式细胞仪进行细胞周期测定。

1.5 免疫组织化学法检测 NF- κ B 蛋白的表达

按照 1.3 节中的方法取对数生长期细胞接种于 6 孔培养板中, 每孔 1 mL, 在 6 孔板内预先放入已消毒的盖玻片, 于 37℃、5%CO₂ 条件下让细胞贴壁过夜; 分别按分组给予干预措施, 每组 6 个样本, 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶 (SP) 法检测细胞爬片, 再经苏木素淡染、常规脱水、透明及封片; 用 OLYMPUS 显微镜观察结果并照相, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照; 在 Leica 显微镜 ($\times 400$) 下, 逐一拍摄切片并录入电脑后, 用 Image-pro plus 6.0 软件对图像进行分析处理, 表达水平用平均光密度值 (AOD) 表示。

1.6 Real-Time PCR 法检测 NF- κ B mRNA 表达

选择 NCBI 基因数据库中大鼠 NF- κ B p65 cDNA 序列 (GI: 100135665), 运用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR 扩增引物和探针。扩增 NF- κ B p65 基因的引物合成及 TaqMan 探针修饰由上海生物工程有限公司合成并经质量检测。扩增 NF- κ B p65 基因的引物: Left Primer 为 5'-TCTGGCGCAGAAGTTAGGT-3', Right Primer 为 5'-CCAGAGACCTCATAGTTGT-3', NF- κ B p65 TaqMan 探针的序列为 5'-GGACTCAGCCGGAAGGC-ATT-3', 产物的大小为 96 bp。用 Ferments 反转录试剂盒将提取的总 RNA 反转录合成 cDNA, 用于 PCR 扩增检测。PCR 扩增用 TAKARA 扩增试剂盒配制反应体系, 共 30 μ L, 包括模板 5 μ L, 热启动 Taq 酶 (5 u/ μ L) 0.3 μ L, 10 $\times$ PCR 缓冲液 (Mg²⁺ free) 3 μ L, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, 探针 (10 μ mol/L) 1 μ L, 25 mmol/L dNTP 0.36 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 3 μ L, 灭菌蒸馏水补足体积至 30 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共扩增 45 个循环。在延伸时采集荧光, 形成荧光定量扩增动力曲线, 根据曲线得到达到阈值的循环数 (Ct 值), 用 Ct 值来表示各样本中 NF- κ B mRNA 表达的情况, 相对表达量用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件包对数据进行统计学分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间的比较采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 PASMCM 增殖情况

PDGF 刺激组在各时间点 MTT 值均较对照组高 ($P < 0.05$); 给予辛伐他汀干预及联合小白菊内酯干预后, 各时间点 MTT 值较 PDGF 刺激组均降低 ($P < 0.05$); 但是, 两干预组之间各时间点 MTT 值比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

2.2 各组 PASMCM 细胞周期

流式细胞术测定各组 PASMCM 细胞周期结果显示, 在培养 24 h 后 PDGF 刺激组的 G0+G1 期细胞

比例较对照组明显减少 ($P < 0.05$), S 和 G2+M 期细胞比例较对照组明显增多 ($P < 0.05$); 给予辛伐他汀及联合小白菊内酯干预后, S 和 G2+M 期细胞比例明显减少, G0+G1 期细胞比例明显增多, 与 PDGF 刺激组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 但是, 两干预组之间各细胞周期细胞比例比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。

表 1 不同时间点各组 PASMCM 增殖情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	3 h	6 h	12 h
对照组	6	0.367 $\pm$ 0.048	0.394 $\pm$ 0.065	0.245 $\pm$ 0.054
PDGF 刺激组	6	0.477 $\pm$ 0.045 ^a	0.480 $\pm$ 0.024 ^a	0.362 $\pm$ 0.047 ^a
辛伐他汀干预组	6	0.415 $\pm$ 0.047 ^b	0.438 $\pm$ 0.037 ^b	0.297 $\pm$ 0.039 ^b
联合干预组	6	0.384 $\pm$ 0.038 ^b	0.423 $\pm$ 0.049 ^b	0.288 $\pm$ 0.043 ^b
<i>F</i> 值		7.053	3.596	6.598
<i>P</i> 值		0.002	0.032	0.003

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与 PDGF 刺激组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 各组 PASMCM 培养 24 h 后的细胞周期比例比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	<i>n</i>	G0+G1	S	G2+M
对照组	6	82.6 $\pm$ 2.3	16.9 $\pm$ 2.1	7.4 $\pm$ 1.3
PDGF 刺激组	6	65.4 $\pm$ 3.4 ^a	21.7 $\pm$ 3.2 ^a	23.3 $\pm$ 2.7 ^a
辛伐他汀干预组	6	73.2 $\pm$ 4.0 ^b	17.4 $\pm$ 3.0 ^b	13.4 $\pm$ 2.2 ^b
联合干预组	6	79.5 $\pm$ 3.1 ^b	16.6 $\pm$ 2.3 ^b	7.5 $\pm$ 1.7 ^b
<i>F</i> 值		39.858	4.774	79.467
<i>P</i> 值		<0.001	0.011	<0.001

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与 PDGF 刺激组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 各组 NF- κ B 蛋白的表达

各组 PASMCM 免疫组化结果显示, 棕黄色为 NF- κ B 蛋白胞浆内表达, 蓝色为 PASMCM 细胞核 (图 1); 对各组 AOD 进行比较, 差异有统计学意义 ($F = 70.18$, $P < 0.05$); 其中 PDGF 刺激组 NF- κ B 蛋白表达水平 (84 $\pm$ 8) 明显高于对照组 (33 $\pm$ 6, $P < 0.05$); 给予辛伐他汀干预后, NF- κ B 蛋白表达水平 (45 $\pm$ 7) 较 PDGF 刺激组明显下降 ($P < 0.05$); 联合小白菊内酯干预后, 其表达 (40 $\pm$ 6) 下降更明显, 但是, 与辛伐他汀干预组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

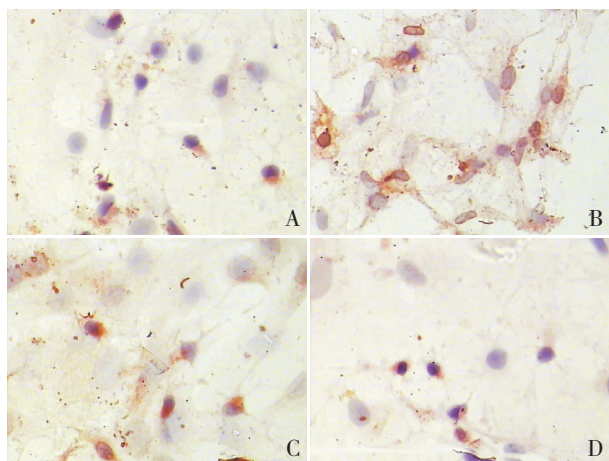


图 1 各组 PSMC 的 NF- κ B 蛋白表达 (SP 法, $\times 400$) A: 对照组 PSMC 中 NF- κ B 蛋白表达少; B: PDGF 刺激组的 NF- κ B 蛋白表达较对照组增多; C: 辛伐他汀干预组的 NF- κ B 蛋白表达水平较 PDGF 刺激组明显下降; D: 联合干预组的 NF- κ B 蛋白表达水平较 PDGF 刺激组亦明显下降。NF- κ B 蛋白胞浆内阳性表达呈棕黄色, PSMC 细胞核呈蓝色。

2.4 各组 NF- κ B mRNA 的表达

Real-Time PCR 检测各组 NF- κ B mRNA 的表达水平差异有统计学意义 ($F=5.711$, $P<0.05$); 其中 PDGF 刺激组 NF- κ B mRNA 表达水平 (1.50 ± 0.18) 明显高于对照组 (1.06 ± 0.38 , $P<0.05$); 给予辛伐他汀干预后, NF- κ B mRNA 表达水平 (0.95 ± 0.35) 较 PDGF 刺激组显著下降 ($P<0.05$); 联合小白菊内酯干预后, 其表达 (0.76 ± 0.34) 下降更明显 ($P<0.05$), 但是, 与辛伐他汀干预组比较差异无统计学差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

肺血管重构是 PAH 的主要病理特征, 包括血管内皮细胞和肺动脉平滑肌细胞 (PSMC) 异常增殖、小动脉管腔狭窄甚至阻塞等^[1]。故调整体内血管舒张和收缩物质的平衡、抑制血管平滑肌细胞增殖和减轻甚至逆转肺血管重构的治疗手段是目前 PAH 药物治疗的研究热点^[2-3]。药物包括前列环素、内皮素受体拮抗剂、磷酸二酯酶抑制剂 5 型、一氧化氮供体 (L-精氨酸) 等^[10]。3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMG-CoA) 抑制剂, 即他汀类药物是目前临床广泛应用的调整血脂药物。大规模临床研究已证实, 他汀类药物所带来的临床益处已远远超过其血脂调节作用, 其还可通过

改善血管内皮功能, 抑制血管平滑肌细胞增殖和迁移, 调节细胞凋亡等, 改善 PAH 等疾病的预后^[5,11-13]。

NF- κ B 是一组由 B 细胞核提取物中发现的能与免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子 κ B 序列特异结合的蛋白因子^[14]。在生长因子、细胞因子、内毒素、促肿瘤剂以及癌基因等刺激下, NF- κ B 被激活, 上调下游信号的表达, 从而引起增殖失衡、细胞凋亡等变化^[15-16]。研究表明, 他汀类药物可通过抑制 NF- κ B 的表达从而干预如糖尿病、动脉粥样硬化症等疾病的进程^[17-19]。但是, 在肺血管重构中肺血管平滑肌细胞增殖的病理生理过程, 他汀类药物是否可通过对 NF- κ B 作用而抑制 PSMC 的增殖尚不清楚。

本研究通过辛伐他汀及 NF- κ B 抑制剂小白菊内酯对 PSMC 的干预发现, 在 PDGF 的刺激作用下, PSMC 细胞增殖得到促进, 辛伐他汀干预使 PSMC 细胞增殖受到抑制, 联合 NF- κ B 抑制剂小白菊内酯进行干预, 抑制作用更加明显。免疫组织化学、Real-Time PCR 研究也得出相似的结果, PDGF 的刺激使 PSMC 的 NF- κ B 蛋白和 mRNA 表达都明显增加, 给予辛伐他汀及联合小白菊内酯干预, 均使 PSMC 中的 NF- κ B 蛋白及 mRNA 表达明显减少, 且联合小白菊内酯干预后下降更加明显。因此, 本研究结果表明辛伐他汀能抑制 PSMC 的增殖, 抑制细胞周期进程, NF- κ B 信号因子参与了辛伐他汀对 PSMC 的增殖抑制, 但是否参与调节 PAH 肺血管重构有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Tudor RM, Stacher E, Robinson J, et al. Pathology of pulmonary hypertension[J]. Clin Chest Med, 2013, 34(4): 639-650.
- [2] Villegas LR, Kluck D, Field C, et al. Superoxide dismutase mimetic, MnTE-2-PyP, attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension, pulmonary vascular remodeling, and activation of the NALP3 inflammasome[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 18(14): 1753-1764.
- [3] 刘瀚旻. 先天性心血管畸形的肺血管重构: 一个历久弥新的话题[J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(10): 805-809.
- [4] Gao C, Xu W, Xiao W, et al. Simvastatin decreases stent-induced in-stent restenosis rate via downregulating the expression of PCNA and upregulating that of p27kip1[J]. J Interv Cardiol, 2013, 26(4): 384-391.
- [5] Zhang Z, Zhang M, Li Y, et al. Simvastatin inhibits the additive activation of ERK1/2 and proliferation of rat vascular smooth

- muscle cells induced by combined mechanical stress and oxLDL through LOX-1 pathway[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(1): 332-340.
- [6] Shen RR, Zhou AY, Kim E, et al. TRAF2 is an NF- κ B-activating oncogene in epithelial cancers[J]. *Oncogene*, 2015, 34(2): 209-216.
- [7] Jeong IK, Oh da H, Park SJ, et al. Inhibition of NF- κ B prevents high glucose-induced proliferation and plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells[J]. *Exp Mol Med*, 2011, 43(12): 684-692.
- [8] 罗勤, 高正祥, 曹丽丽, 等. 脾酪氨酸激酶对大鼠肺血管平滑肌细胞增殖的作用[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(11): 886-890.
- [9] 李峻岭, 姜盛花, 段颖欣, 等. 硫酸吡啶酚对大鼠主动脉平滑肌细胞钙化影响的实验研究[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(18): 8335-8338.
- [10] 纪晓玲, 郭晓玲. 左心疾病相关性肺动脉高压的诊治进展[J]. *心血管病防治知识(学术版)*, 2014, (2): 155-157.
- [11] Zeng WJ, Xiong CM, Zhao L, et al. Atorvastatin in pulmonary arterial hypertension(APATH) study[J]. *Eur Respir J*, 2012, 40(1): 67-74.
- [12] Zhao G, Yu YM, Kaneki M, et al. Simvastatin protects hepatocytes from apoptosis by suppressing the TNF- α /caspase-3 signaling pathway in mice with burn injury[J]. *Ann Surg*, 2013, 257(6): 1129-1136.
- [13] Kou R, Shioto T, Sartoretto JL, et al. Suppression of Gas synthesis by simvastatin treatment of vascular endothelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(4): 2643-2651.
- [14] DiDonato JA, Mercurio F, Karin M. NF- κ B and the link between inflammation and cancer[J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 379-400.
- [15] Yang C, Ling H, Zhang M, et al. Oxidative stress mediates chemical hypoxia-induced injury and inflammation by activating NF- κ B-COX-2 pathway in HaCaT cells[J]. *Mol Cells*, 2011, 31(6): 531-538.
- [16] Gong J, Xie J, Bedolla R, et al. Combined targeting of STAT3/NF- κ B/COX-2/EP4 for effective management of pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(5): 1259-1273.
- [17] Andreassen AS, Kelly M, Berg RMG, et al. Type 2 diabetes is associated with altered NF- κ B DNA binding activity, JNK phosphorylation, and AMPK phosphorylation in skeletal muscle after LPS[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9): e23999.
- [18] Baumann B, Salem HH, Boehm BO. Anti-inflammatory therapy in type 1 diabetes[J]. *Curr Diab Rep*, 2012, 12(5): 499-509.
- [19] Fang D, Yang S, Quan W, et al. Atorvastatin suppresses Toll-like receptor 4 expression and NF- κ B activation in rabbit atherosclerotic plaques[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(2): 242-246.

(本文编辑: 万静)