DOI:10.16016/j.1000-5404.202006132

NOX/ROS 在 5-HT 介导大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用

张 英[1],陈 林[1],陈 杨[1],易 斌[1],陈 杰[2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院麻醉科[1];401320 重庆,重庆市巴南区人民医院手术麻醉科[2]

[摘要] **目的** 研究 5-羟色胺(5-HT)介导的肺动脉平滑肌细胞增殖是否与细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)升高有关,并明确 NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)在 ROS 产生及可能由此导致的肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用。**方法** 组织块法建立人肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)细胞系。分别设置正常对照组,不加任何药物; 5-HT 组,给予 5-HT(1 μmol/L)刺激细胞;各干预组分别给予 ROS 清除剂 Tempol(100 μmol/L)、NOX 抑制剂 DPI(20 μmol/L)、ERK 抑制剂 PD98059(30 μmol/L) 预处理,再加入 5-HT 刺激不同时间。处理完成后测定各组 NOX 活性,采用 DCF-DA 荧光探针检测细胞内 ROS 的生成,3H-TdR 掺入法检测 PASMCs 的增殖,免疫印迹杂交法检测 ERK1/2 磷酸化水平。**结果** 研究发现 5-HT 刺激可明显增强 NOX 活性($P<0.05$),引起 ROS 的增加($P<0.05$),DNA 合成增加($P<0.05$),ERK1/2 磷酸化水平增加($P<0.05$)。NOX 抑制剂(DPI)、ROS 清除剂(Tempol)或 ERK 抑制剂 PD98059 均能显著地逆转 5-HT 刺激引起的 ERK1/2 磷酸化及 DNA 合成水平的增加($P<0.05$),NOX 抑制剂(DPI)能显著地逆转 5-HT 刺激引起的 ROS 增加($P<0.05$)。**结论** NOX/ROS 可能是 5-HT 介导的 PASMCs 增殖信号转导重的重要蛋白。

[关键词] 5-羟色胺;NADPH 氧化酶;活性氧 ERK1/2;肺动脉平滑肌细胞

[中图法分类号] R322.121;R329.28;R363.21 [文献标志码] A

Role of NOX/ROS in 5-HT-mediated proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells

ZHANG Ying[1], CHEN Lin[1], CHEN Yang[1], YI Bin[1], CHEN Jie[2] [1]Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [2]Department of Surgical Anesthesiology, Banan District People's Hospital, Chongqing, 401320, China

[**Abstract**] **Objective** To observe whether serotonin (5-HT)-mediated proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) is related to the increase of intracellular reactive oxygen species (ROS), and identify the role of NADPH oxidase (NOX) in the production of ROS and 5-HT-mediated proliferation. **Methods** Tissue block culture method was used to establish a cell line of human PASMCs. Then the cells were divided into 6 groups, normal control (no treatment), 5-HT treatment (1 μmol/L 5-HT), and 3 intervention groups [with pretreatment of ROS scavenger Tempol (100 μmol/L), NOX inhibitor DPI (20 μmol/L) and ERK inhibitor PD98059 (30 μmol/L) for 30 min, respectively and then 5-HT stimulation for different time periods]. Then NOX activity was analyzed by using spectrophotometer to calculate the amount of NADPH consumed. ROS production was measured by DCF-DA assay. The expression of phosphorylated-ERK1/2 (p-ERK1/2) was detected by Western blotting. The changes of PASMC proliferation were determined 3H-TdR incorporation assay. **Results** 5-HT stimulation for 30 min obviously enhanced the NOX activity, ROS production, DNA synthesis, and expression of p-ERK1/2 (all $P<0.05$). While the pretreatment of DPI, Tempol or PD98059 could significantly reverse the ERK1/2 phosphorylation and DNA synthesis induced by 5-HT stimulation (both $P<0.05$). What's more, DPI also notably reduced

[通信作者] 易斌,E-Mail: yibin1974@163.com

the generation of ROS ($P<0.05$). **Conclusion** NOX/ROS may be the key proteins in the signaling pathways of 5-HT mediated proliferation of PASMCs.

[**Key words**] 5-HT; NADPH oxidase; reactive oxygen species; ERK1/2; pulmonary artery smooth muscle cells

Corresponding author: YI Bin, E-mail: yibin1974@163.com

鉴于多个引起肺动脉高压的病因都与5-羟色胺(5-HT)有关[1],探讨其相关的下游信号通路就显得尤为重要。既往研究表明5-HT刺激肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖过程中伴随活性氧(ROS)增多,而ROS的具体来源尚不明确[2]。在本研究中,我们首先探讨活性氧的具体来源,发现ROS的增加主要与NOX活性增强相关。既往研究表明[3],NOX通过产生活性氧簇(ROS)介导了多种细胞内的信号转导,如通过激活细胞外信号调节激酶(ERK)以及活化蛋白-1(AP-1)和核因子(NF)-κB等转录因子,我们在随后的研究中发现细胞内ROS增多可引起ERK1/2的磷酸化水平升高。进一步研究明确了5-HT刺激平滑肌细胞使NOX活性增高,致使ROS水平上升,进而导致ERK1/2的磷酸化激活,最终促进PASMCs异常增殖。本文研究证实了NOX/ROS/ERK1/2通路对5-HT介导的PASMCs异常增殖的影响,为肺动脉高压的防治寻找到一个潜在的新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

低糖DMEM培养基(PAA,美国),D-Hanks液(hyclone,美国),NADPH、ROS检测试剂盒、RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天),5-羟色胺、DPI、Tempol(sigma,美国),兔单克隆抗磷酸化细胞外信号调节蛋白激酶(p-ERK1/2)、HRP标记的羊抗兔IgG(Santa,美国),其余试剂均为国产分析纯。Alpha Imager凝胶成像分析系统(Alpha Innotech,美国),流式细胞仪(BD,美国)。

1.2 PASMC的培养及分组

人肺动脉平滑肌细胞(human pulmonary arterial smooth muscle cell,hPASMC)的原代培养、传代、纯化、鉴定实验步骤见参考文献[4]。第4~6代PASMC细胞用于实验。相同密度($10^6/cm^2$)接种后待细胞长至瓶底80%左右换含0.1%胎牛血清DMEM培养基同步生长48 h,随后分别设置正常对照组,不加任何药物;5-羟色胺组,给予5-羟色胺(1 μmol/L)刺激细胞;各干预组分别给予ROS清除剂Tempol(100 μmol/L)、NOX抑制剂DPI(20 μmol/L)、ERK抑制剂PD98059(30 μmol/L)预处理30 min后,再加入5-羟色胺刺激不同时间。进行上述各组处理后,分别测定DNA合成,NOX活性,ROS含量,ERK1/2磷酸化情况。

1.3 [^{3}H]胸苷掺入测定

在加入5-羟色胺(1 μmol/L)孵育16 h后,各处理组与[^{3}H]标记的胸腺嘧啶核苷(1 μCi/孔)孵育12 h。随后,冷PBS液终止掺入,加入0.25%胰酶消化细胞,使之脱离孔壁,用多头细胞样品收集器收集细胞于玻璃纤维膜上,生理盐水冲洗3次,然后用10%三氯乙酸固定,无水乙醇脱色,80 ℃干烤30 min,放入闪烁液中,于液体闪烁计数仪计数(counts/min,cpm)。

1.4 NOX活性测定

NOX活性测定采用NADPH消耗测定法:5-羟色胺处理10 min(NOX活性达峰时间)后,细胞经胰酶消化后,在4 ℃,2 500×g离心5 min,然后以PBS再悬浮,随后加入250 μmol/L NADPH孵育,在λ=340 nm下观察5 min,通过吸光率的减少来探测NADPH的消耗量。为了标准化,取等量的细胞加入SDS溶解,浓缩蛋白后通过考马斯亮蓝法测定。用来计算NADPH消耗总量的吸收消光系数(absorption extinction coefficient)是6.22 $mmol^{-1}\cdot cm^{-1}$,结果以pmol NADPH/min·mg蛋白表示[5]。

1.5 细胞内ROS含量检测

按1∶1 000用无血清IMDM培养基稀释DCFH-DA,使其终浓度为10 μmol/L。5-羟色胺处理10 min(ROS含量达峰时间)后,收集各实验组的细胞,用无血清IMDM培养基清洗3次,将细胞悬浮于已稀释的DCFH-DA中,37 ℃细胞培养箱内孵育20 min,取出后用无血清IMDM培养基清洗3次,收集细胞制备成单细胞悬液,流式细胞仪检测DCF荧光(激发波长:488 nm,发射波长:525 nm)。

1.6 磷酸化ERK1/2的测定

5-羟色胺处理10 min(ERK1/2磷酸化达峰时间)后,RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂磷酸酶抑制剂)提取细胞总蛋白,BCA法进行蛋白含量测定。配制10%的分离胶和5%浓缩胶。蛋白样品加入SDS上样缓冲液,100 ℃变性5 min。聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白后将蛋白转移至硝酸纤维素膜(NC膜)上,用5%的脱脂牛奶封闭1 h,NC膜与稀释成1∶1 000的p-ERK1/2一抗4 ℃孵育过夜;洗膜后将NC膜置入

1∶10 000 的二抗中孵育 4~5 h；洗膜后,采用化学发光液显影,使用凝胶图像成像系统和 Quality One 软件进行扫描分析,以目的蛋白 p-ERK1/2 与相应的 β-actin 蛋白灰度值比作为蛋白的相对表达量。

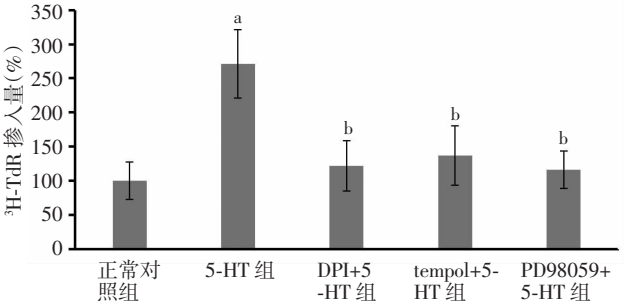
1.7　统计

统计学分析采用 SPSS13.0 软件包进行数据分析。实验数据以均数±标准差表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间多重比较采用 Tukey post hoc 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　^{3}H-TdR 掺入量法检测结果

结果见图 1。相比于对照组,5-羟色胺组^{3}H-TdR 掺入量是其 2.71 倍($P<0.05$),DPI 干预组、Tempol 干预组、PD98059 干预组^{3}H-TdR 掺入量分别是其 1.22、1.37、1.16 倍。相比于 5-羟色胺组,各干预组^{3}H-TdR 掺入量均显著减少($P<0.05$),其中尤以 DPI 干预组、PD98059 干预组最为明显。

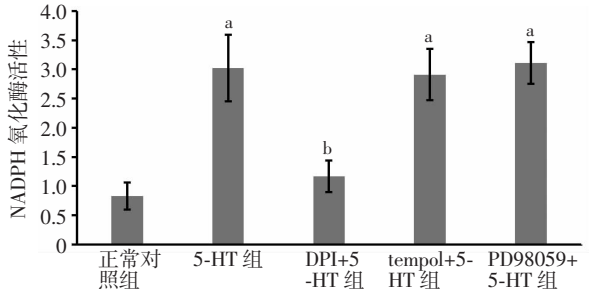


a:$P<0.05$, 与正常对照组比较;b:$P<0.05$, 与 5-HT 组比较

图 1　^{3}H-TdR 掺入量测定结果　($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

2.2　NOX 活性测定结果

结果见图 2。相比于对照组,5-羟色胺组、Tempol 干预组、PD98059 干预组 NOX 活性均显著升高($P<0.05$)。相比于 5-羟色胺组,DPI 干预组 NOX 活性显著降低($P<0.05$)。

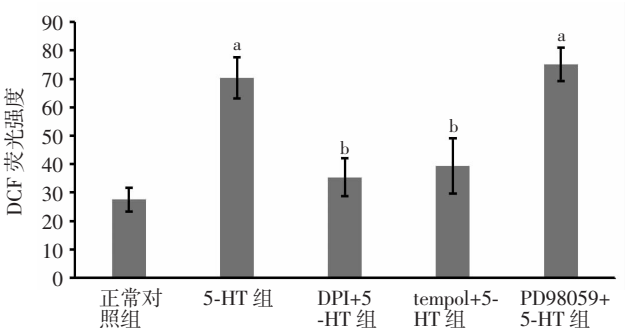


a:$P<0.05$, 与正常对照组比较;b:$P<0.05$, 与 5-HT 组比较

图 2　各组 NOX 活性检测结果　($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

2.3　细胞内 ROS 水平检测结果

结果见图 3。相比于对照组,5-羟色胺组、Tempol 干预组、PD98059 干预组 DCF 荧光强度均显著升高($P<0.05$),相比于 5-羟色胺组,DPI 干预组、Tempol 干预组 DCF 荧光强度均显著减弱($P<0.05$)。

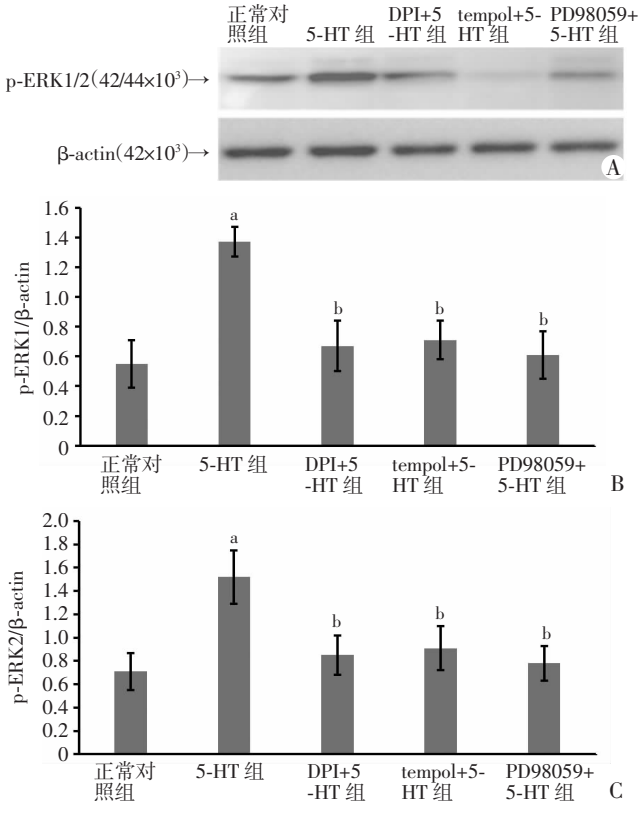


a:$P<0.05$,正常对照组比较;b:$P<0.05$,5-HT 组比较

图 3　各组 DCF 荧光强度检测结果　($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

2.4　磷酸化 ERK1/2 水平测定结果

结果见图 4。相比于对照组,5-羟色胺组 ERK1/2 蛋白磷酸化水平显著升高($P<0.05$)。相比于 5-羟色胺组,各干预组 ERK1/2 蛋白磷酸化水平均显著减少($P<0.05$)。



A:各组 p-ERK1/2 蛋白表达;B、C:蛋白表达的半定量分析,a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与 5-HT 组比较

图 4　各组 ERK1/2 磷酸化水平测定结果　($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

3 讨论

在本研究中,我们首先发现 5-HT 增加了 PASMCs DNA 的合成。随后证实 5-HT 刺激增加了细胞内 NOX 活性、ROS 水平以及 ERK1/2 活化水平。接下来我们进一步探索了 NOX 来源的 ROS 在 PASMCs 增殖中的作用及具体机制。我们发现 NOX 抑制剂有效抑制 NOX 活性的同时显著降低 5-HT 刺激增加的 ROS、ERK1/2 活化及 PASMCs 增殖水平的;ROS 清除剂显著降低 5-HT 刺激导致的 ROS 水平的同时显著降低 ERK1/2 活化水平及 PASMCs 增殖水平;ERK 抑制剂显著抑制 5-HT 刺激导致的 ERK1/2 活化水平的同时显著降低 PASMCs 增殖水平。研究结果表明,NOX 及其催化产生的 ROS 介导了 5-HT 刺激导致的 PASMCs 增殖,ROS 通过影响 ERK1/2 的磷酸化水平发挥作用。

5-HT 已在多种动物模型及临床患者中被证实与肺动脉高压的发生发展相关,其主要机制是 5-HT 通过细胞内受体(5-HTR,属于 G 蛋白耦合受体家族,GPCR)和转运体(SERT)激活多个信号通路[1,2,6]。近些年来,越来越多的研究发现 ROS 在许多血管性疾病的病理生理进程中发挥着重要作用。相关研究表明,低氧、AngⅡ、5-羟色胺等在引起 PASMCs 增殖的过程中伴随着 ROS 含量的增加[7]。通过抑制 Cu/Zn SOD 活性增加细胞内 ROS 水平刺激了 PASMCs 的增殖,而抗氧化剂则抑制了其增殖并在一定程度上促进其凋亡[8]。细胞内的线粒体和 NOX 均可催化产生 ROS,而在血管类组织中,NOX 被认为是 ROS 的主要来源[9]。

在 PASMCs 过表达 5-HT 转运体的转基因小鼠上诱导了经典的肺动脉高压模型[10]。另一方面,通过敲低色氨酸羟化酶(5-HT 的生物合成的限速酶)表达或敲除 5-HT 转运体减轻了缺氧引发的肺动脉高压和右心室肥大[11]。通过药物抑制 5-HT 转运体也表现出类似的治疗效果[12]。另外,5-HT 转运体基因多态性也被发现与肺动脉高压有关[13]。ROS 在细胞信息传递、基因转录、细胞生长和凋亡等事件的调节中发挥着重要作用,其过量产生可能是 PASMCs 增殖的重要因素。体内有多种酶参与 ROS 的生成,而 NOX 目前被认为是血管内生成 ROS 的主要酶体[9]。NOX 是多种蛋白酶的复合物,可通过催化电子从 NADPH 转移至分子氧而产生超氧化物。根据催化亚基的不同 NOX 分为 5 种亚型,分别是 Nox1~Nox5。其中,在心血管细胞表达的有 Nox1、Nox2 和 Nox4。与其他来源(如线粒体、黄嘌呤氧化酶和解耦联的 NO 合酶)的 ROS 相比较,NOX 主要被特异的激动剂刺激后产生活性氧,特别是和 AngⅡ、ET-1、TNF-α、TGF-β 等[14]。本研究发现 5-HT 可上调 NOX 活性,使 PASMCs 内 ROS 生成过多。

丝裂原活化蛋白激酶(mitogen- activatedproteinkinase, MAPK)是生物体内一种重要的信号传导系统,ERK 是 MAPK 家族中的成员之一,它能被多种因子激活,主要介导细胞增殖和分化的信号转导。ERK1/2 相关的激酶的激活导致的 PASMCs 的增殖常可在多种条件如缺氧[15],家族性肺动脉高压[16],G 蛋白耦联受体激动剂色胺(血清素,内皮素-1)和生长因子存在的情况下观察到。在各种静息态细胞中,ERK1/2 主要存在于细胞质,但在后续某些激动剂作用下磷酸化 ERK1/2 并转位到胞核,在核内磷酸化(激活)若干转录因子如 GATA-4 和 ETS(26)家族成员 Elk-1(ETS 样激酶 1)等调控基因的表达[17]。本实验的结果表明,5-HT 通过 NOX-ROS 通路显著地促进了 ERK1/2 活化,进而促进了 PASMCs 的增殖。

综上,肺动脉高压作为一类以肺血管重塑为主要病变特点的慢性疾病,5-HT 在其发生发展过程中起着重要作用。本研究表明 NOX 及其催化产生的 ROS 介导了 5-HT 刺激 PASMCs 增殖的过程,增进了我们对 5-HT 介导的肺动脉高压机制的了解,为抗肺动脉高压治疗研究提供了新的思路。

参考文献:

[1] HAN J L, TIAN H Y, LIU Y, *et al*. 5-HT promotes pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation through the TRPC channel[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2018, 64(13): 89. DOI: 10.14715/cmb/2018.64.13.17.

[2] HOOD K Y, MAIR K M, HARVEY A P, *et al*. Serotonin signaling through the 5-HT 1B receptor and NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial hypertension[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(7): 1361-1370. DOI: 10.1161/atvbaha.116.308929.

[3] LI T, LUO X J, WANG E L, *et al*. Magnesium lithospermate B prevents phenotypic transformation of pulmonary arteries in rats with hypoxic pulmonary hypertension through suppression of NADPH oxidase[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 847: 32-41. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.01.020.

[4] GOLOVINA V A, BLAUSTEIN M P. Preparation of primary cultured mesenteric artery smooth muscle cells for fluorescent imaging and physiological studies[J]. Nat Protoc, 2006, 1

(6): 2681-2687. DOI: 10.1038/nprot.2006.425.

[5] HERRERA B, MURILLO M M, ÁLVAREZ-BARRIENTOS A, *et al*. Source of early reactive oxygen species in the apoptosis induced by transforming growth factor-β in fetal rat hepatocytes[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 36(1): 16-26. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2003.09.020.

[6] BOPP C, AUGER C, DIEMUNSCH P, *et al*. The effect of urapidil, an alpha-1 adrenoceptor antagonist and a 5-HT1A agonist, on the vascular tone of the porcine coronary and pulmonary arteries, the rat aorta and the human pulmonary artery [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 779: 53-58. DOI: 10.1016/j.ejphar.2016.03.012.

[7] ZIMMER A, TEIXEIRA R B, BONETTO J H P, *et al*. Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension [J]. Mol Cell Biochem, 2020, 464(1/2): 93-109. DOI: 10.1007/s11010-019-03652-2.

[8] YOU B Y, LIU Y B, CHEN J, *et al*. Vascular peroxidase 1 mediates hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, apoptosis resistance and migration [J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(1): 188-199. DOI: 10.1093/cvr/cvx234.

[9] PETRY A, GÖRLACH A. Regulation of NADPH oxidases by G protein-coupled receptors [J]. Antioxid Redox Signal, 2019, 30(1): 74-94. DOI: 10.1089/ars.2018.7525.

[10] GUIGNABERT C, IZIKKI M, TU L I, *et al*. Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension[J]. Circ Res, 2006, 98(10): 1323-1330. DOI: 10.1161/01.res.0000222546.45372.a0.

[11] IZIKKI M, HANOUN N, MARCOS E, *et al*. Tryptophan hydroxylase 1 knockout and tryptophan hydroxylase 2 polymorphism: effects on hypoxic pulmonary hypertension in mice[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293(4): L1045-L1052. DOI: 10.1152/ajplung.00082.2007.

[12] DELANEY C, SHERLOCK L, FISHER S, *et al*. Serotonin 2A receptor inhibition protects against the development of pulmonary hypertension and pulmonary vascular remodeling in neonatal mice[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2018, 314(5): L871-L881. DOI: 10.1152/ajplung.00215.2017.

[13] JIAO Y R, WANG W, LEI P C, *et al*. 5-HTT, BMPR2, EDN1, ENG, KCNA5 gene polymorphisms and susceptibility to pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis[J]. Gene, 2019, 680: 34-42. DOI: 10.1016/j.gene.2018.09.020.

[14] MAGNANI F, MATTEVI A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases[J]. Curr Opin Struct Biol, 2019, 59: 91-97. DOI: 10.1016/j.sbi.2019.03.001.

[15] ZHANG L X, MA C, GU R, *et al*. Paeonol regulates hypoxia-induced proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells via EKR 1/2 signalling[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 834: 257-265. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.07.017.

[16] YANG X D, LONG L, SOUTHWOOD M, *et al*. Dysfunctional smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension [J]. Circ Res, 2005, 96(10): 1053-1063. DOI: 10.1161/01.res.0000166926.54293.68.

[17] KOVACS L, HAN W H, RAFIKOV R, *et al*. Activation of calpain-2 by mediators in pulmonary vascular remodeling of pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2016, 54(3): 384-393. DOI: 10.1165/rcmb.2015-0151oc.

(收稿:2020-06-14;修回:2020-10-12)

(编辑 邓强庭)