DOI:10.16016/j.2097-0927.202301028

尼古丁通过 Raf/MEK/ERK 信号通路调节 HepG2 细胞中 PCSK9 的表达

周 琳,向 睿,毛 敏,冯 瑞,胡愉皓,陈月茗,陈 杰,石秋月,娄 钦,常 静 400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院心血管内科,重庆市重大代谢性疾病转化医学重点实验室

[**摘要**] **目的** 探讨尼古丁对前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9 型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)表达的影响以及分子机制。**方法** 采用不同浓度的尼古丁(0、5、10、20 μmol/L)处理 HepG2 细胞 0、24、48 h,观察与低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)代谢密切相关的 PCSK9 的变化情况。实验分(n=3):对照组(CON 组,细胞正常培养);尼古丁组(NIC 组,加入 10 μmol/L 的尼古丁孵育 24 h);尼古丁+尼古丁抑制剂组(MH 组,10 μmol/L 尼古丁抑制剂盐酸美加明);尼古丁+Raf 抑制剂组[PLX 组,1 μmol/L Raf 抑制剂(PLX4720)];尼古丁+MEK 抑制剂组[PD 组,1 μmol/L MEK 抑制剂(PD0325901)];尼古丁+ERK 抑制剂组[CC 组,1 μmol/L ERK 抑制剂(CC-90003)]。后 4 组预处理 1 h 后再加入 10 μmol/L 的尼古丁一起孵育 24 h。采用 CCK-8 实验检测 HepG2 细胞的活性,划痕实验检测细胞迁移能力,油红 O 染色检测尼古丁处理后的脂质沉积。运用网络药理学筛选 LDL-C 与尼古丁的共同靶点和作用通路。分别使用 Western blot 和 RT-qPCR 分析 PCSK9 以及 MAPK 通路(Raf、MEK、ERK)的蛋白和 mRNA 的表达水平。用免疫荧光染色、酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 PCSK9 蛋白的表达水平。**结果** 随着尼古丁浓度的升高,HepG2 细胞的活性不断降低,并且相同尼古丁浓度下 48 h 比 24 h 下降更多。与 CON 组比较,NIC 组 HepG2 细胞的迁移能力和脂质沉积增加(P<0.01),而 MH 组相较于 NIC 组迁移能力和脂质沉积下降(P<0.01)。LDL-C 与尼古丁的交集靶点多达 257 个,二者的蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction networks, PPI)核心靶点涉及 MAPK 通路;生物过程包含“MAPK 活性的正向调节”,且通路分析中的“脂质和动脉粥样硬化”富集分数最高。与 CON 组比较,NIC 组 Raf、MEK、ERK 的蛋白和 mRNA 表达增强(P<0.05,P<0.01),MH 组的相关蛋白和 mRNA 表达较 NIC 组明显下调(P<0.05,P<0.01)。NIC 组的 PCSK9 蛋白和 mRNA 较 CON 组上调(P<0.05),MH 组、PLX 组、PD 组和 CC 组的 PCSK9 蛋白和 mRNA 较 NIC 组下降(P<0.05)。**结论** 尼古丁可增加 HepG2 细胞脂质沉积和迁移能力,并通过 Raf/MEK/ERK 信号通路调节 HepG2 细胞中 PCSK9 的表达;上调的 PCSK9 可能是细胞内脂质沉积的重要原因。

[**关键词**] 尼古丁;PCSK9;LDL-C;脂质代谢;HepG2 细胞
[**中图法分类号**] Q591.5; R345; R996 [**文献标志码**] A

Nicotine regulates PCSK9 expression in HepG2 cells through Raf/MEK/ERK signaling pathway

ZHOU Lin, XIANG Rui, MAO Min, FENG Rui, HU Yuhao, CHEN Yueming, CHEN Jie, SHI Qiuyue, LOU Qin, CHANG Jing Department of Cardiovascular Medicine, Chongqing Key Laboratory of Translational Medicine in Major Metabolic Diseases, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of nicotine (NIC) on the expression of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and its molecular mechanism. **Methods** Different concentrations of NIC (0, 5, 10 and 20 μmol/L) were used to treat HepG2 cells for 0, 24 or 48 h to observe

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金(CSTC2020jcyj-msxmX0853)
[**通信作者**] 常 静,E-mail:1584105002@qq.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

the change of PCSK9, which is closely related to the metabolism of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C). Then the cells were grouped into control group (normal culture medium), NIC group (10 μmol/L for 24 h), NIC+inhibitor (MH) group (10 μmol/L NIC inhibitor, mecamylamine hydrochloride), NIC+Raf inhibitor (PLX) group (1 μmol/L Raf inhibitor, PLX4720), NIC+MEK inhibitor (PD) group (1 μmol/L MEK inhibitor, PD0325901), and NIC+ERK inhibitor (CC) group (1 μmol/L ERK inhibitor, CC-90003) ($n=3$). The cells from the latter 4 groups were pretreated with corresponding agents for 1 h followed by 10 μmol/L NIC co-culture for 24 h. CCK-8 assay, cell scratch test and oil red O staining were used to detect cell viability, migration and lipid deposition, respectively. Then network pharmacology was employed to screen the common targets and action pathways of LDL-C and NIC. Western blotting and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were performed to measure the protein and mRNA levels of PCSK9 and Raf, MEK and ERK in MAPK pathway. The expression level of PCSK9 was directly detected by immunofluorescence staining and ELISA. **Results** As the concentration of NIC increased, viability of HepG2 cells was decreased continuously, with the decline more significant at 48 h than at 24 h. The migration ability and lipid deposition of HepG2 cells were increased in the NIC group than the CON group ($P<0.01$), while were decreased in the MH group than the NIC group ($P<0.01$). There are 257 intersection targets of LDL-C and NIC, and the core target of their protein-protein interaction (PPI) involves MAPK pathway. Biological process included "positive regulation of MAPK activity", and the enrichment fraction of "lipid and atherosclerosis" got the highest in pathway analysis. Compared with the CON group, the protein and mRNA levels of Raf, MEK and ERK were increased in the NIC group ($P<0.05$, $P<0.01$), while those of related molecules were significantly reduced in the MH group than the NIC group ($P<0.05$, $P<0.01$). The protein and mRNA levels of PCSK9 were upregulated in the NIC group ($P<0.05$), while those in the MH, PLX, PD and CC groups were decreased than the NIC group ($P<0.05$). **Conclusion** NIC enhanced lipid deposition and migration ability and regulates the expression of PCSK9 through the Raf/MEK/ERK signaling pathway in HepG2 cells. And the up-regulation of PCSK9 may be an important cause of intracellular lipid deposition.

[**Key words**] nicotine; PCSK9; LDL-C; lipid metabolism; HepG2 cells

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2020jcyj-msxmX0853). Corresponding author: CHANG Jing, E-mail: 1584105002@qq.com

动脉粥样硬化是全球血管疾病的主要原因[1],其主要特征为脂肪和纤维的积累。随着纤维化和钙化的累积,动脉粥样硬化斑块逐渐形成;稳定的斑块会阻塞管腔,导致组织和器官的灌注不足,而不稳定的斑块则会破裂,进而导致血栓形成[2]。动脉粥样硬化会导致严重的并发症,如缺血性心脏病、缺血性中风等。据统计,2015 年,超过 1 700 万人死于心血管疾病;其中,超过 1 400 万人死于冠心病和中风[2]。动脉粥样硬化的危险因素众多,如高血脂、吸烟、肥胖、高血压和酗酒等[3]。作为高脂血症主要危险因素之一的低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)被认为是动脉粥样硬化治疗过程中的重要指标[4]。而 LDL-C 的代谢与前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9 型(proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9)的活性密不可分。

PCSK9 是前蛋白转化蛋白酶家族的第九个成员,它是一组丝氨酸蛋白酶,PCSK9 主要通过结合低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor, LDLR)参与脂质代谢[5]。在生理条件下,血液循环中的 LDL-C 与膜上的 LDLR 结合并进入细胞,从而及时维持血脂的动态平衡。主要产生于肝细胞的 PCSK9 与 LDLR 结合后,将介导其进入溶酶体进行降解,阻止 LDLR 再循环[6]。一旦 PCSK9 过表达,LDLR 被大量降解而无法正常发挥作用,导致血液循环中的 LDL-C 无法得到有效清除,最终将引起高脂血症。因此,PCSK9 可通过调节 LDL-C 的代谢而间接影响动脉粥样硬化的进程。

尼古丁是日常生活中普遍存在的香烟烟雾的主要成分之一,一直备受研究人员的关注。尼古丁不仅对呼吸道疾病(如肺癌)有很大促进作用,而且对动脉粥样硬化的形成也不可忽视。例如尼古丁通过引起血脂异常、胰岛素抵抗和血管炎症等加快动脉粥样硬化的进程[7]。已有研究发现,香烟烟雾提取物降低了 HepG2 细胞中 LDLR 的表达[8],香烟烟雾提取物也通

过 ROS/NF-κB 途径影响 HepG2 细胞中 PCSK9 的表达[9]。更有趣的是,ERK 通路可能调节 PCSK9 的表达[10],并且在 ERK 敲除小鼠中观察到 PCSK9 的分泌量显著减少[11]。然而,香烟烟雾的成分高达 7 000 多种,其对脂质代谢的具体影响机制仍有待研究[12]。本研究通过探讨尼古丁对脂质沉积的影响、尼古丁对 PCSK9 表达的调节及其与 Raf/MEK/ERK 信号通路之间的联系,为动脉粥样硬化的诊疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要材料

尼古丁购自成都 Desite 科技有限公司。盐酸美加明(mecamylamine hydrochloride,MH,尼古丁抑制剂)购自美国 GlpBio 公司。PLX4720(Raf 抑制剂)、PD0325901(MEK 抑制剂)、CC-90003(ERK 抑制剂)购自上海 TOPSCIENCE 有限责任公司。抗-PCSK9 抗体购自武汉 Proteintech 生物科技有限公司。抗 GAPDH 抗体购自美国 Immunoway 公司。辣根过氧化物酶(HRP)抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物科技公司。抗 Raf、抗 MEK、抗 ERK 抗体和抗磷酸化 Raf(Ser259)、抗磷酸化 MEK(Ser217/221)、抗磷化 ERK(Thr202/Tyr204)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。TRIzol 和 SYBR Green 购自武汉 ABclonal 生物科技公司。

1.2 细胞培养和处理分组

1.2.1 细胞培养 HepG2 细胞在补充了 10%胎牛血清(FBS)(中国江苏依科赛生物)的杜氏改良鹰培养基(DMEM)(美国 Gibco 公司)中培养,并放置于 37 ℃含 5% CO_2 的恒温箱中孵育。尼古丁刺激实验:当细胞密度达到 70%~80%时,采用含不同浓度尼古丁(0、5、10、20 μmol/L)的完整培养基[13]孵育不同时间(0、24、48 h)。

1.2.2 实验分组 细胞分 6 组:对照(CON)组、尼古丁(NIC)组、尼古丁+尼古丁抑制剂(MH)组、尼古丁+Raf 抑制剂(PLX)组、尼古丁+MEK 抑制剂(PD)组、尼古丁+ERK 抑制剂(CC)组。CON 组细胞采用不含尼古丁的完整培养基正常培养;NIC 组细胞采用 10 μmol/L 尼古丁孵育 24 h;MH、PLX、PD 和 CC 组分别采用 10 μmol/L 尼古丁抑制剂 MH、1 μmol/L Raf 抑制剂(PLX4720)、1 μmol/L MEK 抑制剂(PD0325901)和 1 μmol/L ERK 抑制剂(CC-90003)预处理 1 h,然后与 10 μmol/L 尼古丁一起孵育 24 h。

1.3 细胞活性测定

细胞计数试剂盒-8(CCK-8)用于检测 HepG2 细胞的活性。将重悬的细胞稀释至 2×10^4/mL 取 100 μL 注入 96 孔板中培养 24 h。尼古丁刺激实验见 1.2。除去上清液后,加入不含 FBS 的培养基,并向每个孔中加入 10 μL CCK-8 试剂(上海 MCE 公司)。在 37 ℃、含 5% CO_2 的培养箱中避光培养 2~3 h 后,在 450 nm 处测量吸光度。

1.4 划痕实验

将 10^5 个 HepG2 细胞植入 6 孔板中。当细胞密度在完全培养基中达到 90%~100%时,使用 200 μL 移液管尖端绘制直线。用 PBS 轻轻冲洗后,在没有 FBS 的情况下预处理 MH 1 h,然后在没有 FBS 的情况下加入 10 μmol/L 尼古丁并培养 24 h。分别在 0 h(p)和 24 h(q)拍摄并记录划痕宽度。使用 Image J 软件分析所有划痕宽度。迁移率计算公式为:(p-q)/p。

1.5 油红 O 染色

在用 4%多聚甲醛(重庆蒙柏欧生物科技有限公司)固定 15 min 后,将载玻片浸入油红染液(武汉谷歌生物科技有限公司)8~10 min(覆盖并避光),并用蒸馏水洗涤。用 75%酒精分化后,苏木精(武汉谷歌生物科技有限公司)复染 3~8 min。用蒸馏水洗涤后,用盐酸酒精分化载玻片 1 s,用蒸馏水冲洗,用氨水溶液恢复蓝色,再用蒸馏水冲洗。载玻片用甘油明胶(武汉谷歌生物科技有限公司)封片。显微镜拍照,使用 Image J 软件分析所有结果,通过计算一个视野中脂滴的面积,反映细胞内中脂质沉积的面积比。

1.6 网络药理学分析

运用 PubChem 数据库和 Swiss Target Prediction 数据库筛选尼古丁作用靶点。在 GeneCards 数据库筛选低密度脂蛋白胆固醇的靶点。然后利用 Uniprot 蛋白标准化数据库对相关靶点进行统一转化。用 Venny2.1.0 制作靶点的交集基因,导入 String 数据库以构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction networks,PPI)网络图。通过微生信平台对靶点分子进行基因本体(gene ontology,GO)、京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)富集分析,得到相应靶点的生物过程(Biological Process)和通路分析(Pathway Analysis)。最后导入 Cytoscape3.7.2 软件进行可视化分析。

1.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测

将处理过的细胞从培养基中倒出,并用 PBS 洗涤 3 次。将培养皿加入含有蛋白酶抑制剂(1∶100)和磷酸酶抑制剂(1∶50)(北京索莱宝科技有限公司)的细胞裂解液(RIPA)120 μL(重庆蒙柏欧生物科技有限公司),并在 4 ℃的摇床上放置 20 min。将刮取的细胞在

12 000 r/min、4 ℃离心 15 min,然后收集上清液并通过 BCA 法(上海碧云天生物技术有限公司)测量蛋白质浓度。将 20 μg 变性蛋白加入到十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳的每个孔中,然后将蛋白转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。用含有 0.1%-20 吐温(TBS-T)的 Tris 缓冲盐水洗涤膜,在室温下用 5%的脱脂牛奶(北京索莱宝科技有限公司)封闭 1 h。用 TBS-T 洗涤后,将膜与抗 PCSK9 抗体(1∶2 000)、抗 GAPDH 抗体(1∶5 000)、抗 Raf 抗体(1∶1 000)、抗 MEK 抗体(1∶1 000)、抗 ERK 抗体(1∶1 000)和抗磷酸化 Raf 抗体(1∶1 000),抗磷酸化 MEK 抗体(1∶1 000),抗磷化 ERK 抗体(1∶1 000)一起在 4 ℃的摇床上孵育过夜。第 2 天将 TBS-T 洗涤后的膜与 HRP 抗兔 IgG(1∶5 000)在室温下孵育 1 h。结果采用 Fusion 软件进行分析。

1.8 RT-qPCR 检测

根据制造商的要求,用 Trizol 提取总 RNA。RNA 的纯度取决于 260 和 280 nm 处的吸光度比率。通过 Applied Biosystems(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)反转录:37 ℃下 2 min、55 ℃下 15 min 和 85 ℃下 5 min,将 RNA 反转录成互补 DNA(cDNA)。SYBR Green 与目标基因引物和 cDNA 一起用于 Bio-Rad CFX connect 实时系统(美国 Bio-Rad 公司)。qPCR 方案为:95 ℃ 3 min,循环 1 次;随后 95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s 循环 40 次。引物序列如下:PCSK9 正向 5′-GTACCGGGCGGATGAATACC-3′,反向 5′-TGCACATTCTCGAAGTGT-3′;Raf 正向 5′-GACTGCCCTACATCTGGATCAT-3′,反向 5′-GGTTCTCGTTGCCCAAATTGATTT-3′;MEK 正向 5′-GGAGAGCATTGAGATTGACCAGA-3′,反向 5′-CCAAGTTCTCCAGGTCGTTGATT-3′;ERK 正向 5′-GTGTGCAGATCCAGACCATGAT-3′,反向 5′-TGCAGCCTACGACCATGAT-3′;GAPDH 正向 5′-GGGAGTCCACTGGCGTCTTCA-3′,反向 5′-GTCCATGAGTCCTCCACGATACC-3′。使用 SYBR Green 的荧光值通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法获得 RNA 的相对表达量。以甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的 RNA 表达量作为内参。

1.9 免疫荧光检测

干燥后,将载玻片在盖玻片中间画一个圆圈,加入 50 μL Triton X-100(德国 BioFroxx 公司),在室温下孵育 20 min,用 PBS 洗涤 5 min,重复 3 次。在圆圈中加入 3%牛血清白蛋白(BSA)(德国 BioSroxx 公司)均匀覆盖样品,并在室温下密封 30 min。轻轻摇动封闭溶液后,将抗 PCSK9 抗体(1∶500)(美国 Abcam 公司)添加到载玻片中,并将载玻片在 4 ℃的湿箱中孵育过夜。将载玻片在摇床上洗涤 5 min,重复 3 次。干燥后,将辣根过氧化物酶(HRP)抗小鼠 IgG 添加到组织化学试剂盒中以覆盖样品,并将载玻片在室温下孵育 50 min,用含有 4,6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)(武汉赛维尔生物科技有限公司)的抗荧光淬灭剂(美国 Southern Biotech 公司)覆盖它们。在荧光显微镜下观察载玻片并收集图像。DAPI 染色的细胞核为蓝色,PCSK9 表达为荧光标记的红色。所有结果使用 Image J 软件进行分析。

1.10 酶联免疫吸附实验(ELISA)

根据制造商的说明,使用人前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/ kexin 9 型(PCSK9)ELISA 试剂盒(重庆蒙柏欧生物科技有限公司)检测 PCSK9 在 HepG2 细胞裂解上清液中的表达。

1.11 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0.2 软件进行数据统计分析和绘图。数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行多重比较。$P<0.05$ 被认为具有统计学意义。所有统计结果来自 3 次不同的实验。

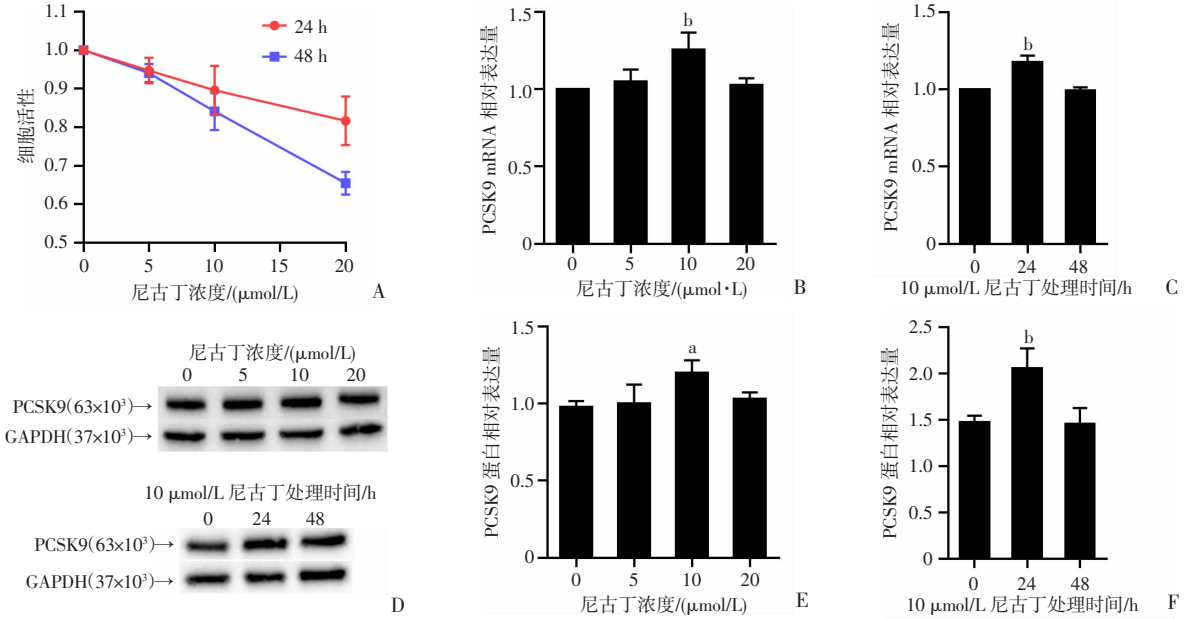
2 结果

2.1 尼古丁刺激对 HepG2 细胞活性及 PCSK9 表达的影响

CCK-8 实验结果表明,当尼古丁浓度<5 μmol/L 时,细胞活性高于 90%;当尼古丁浓度>5 μmol/L 时,细胞活性急剧下降,且孵育 48 h 比 24 h 下降更多(图 1A)。RT-qPCR 和 Western blot 结果显示,尼古丁孵育 24 h ,5、20 μmol/L 尼古丁处理后,PCSK9 mRNA 和蛋白表达量差异无统计学意义,10 μmol/L 尼古丁显著提高 PCSK9 mRNA($P<0.01$)和蛋白($P<0.05$)的表达(图 1B、D、E);10 μmol/L 尼古丁培养细胞 24 h 后,PCSK9 mRNA($P<0.01$)和蛋白表达($P<0.01$)增加,而培养 48 h 后,PCSK9 mRNA 和蛋白表达无统计学差异(图 1C、D、F)。提示 10 μmol/L 尼古丁培养 HepG2 细胞 24 h 可作为后续最佳实验条件。

2.2 尼古丁增加 HepG2 细胞迁移能力,促进脂质沉积

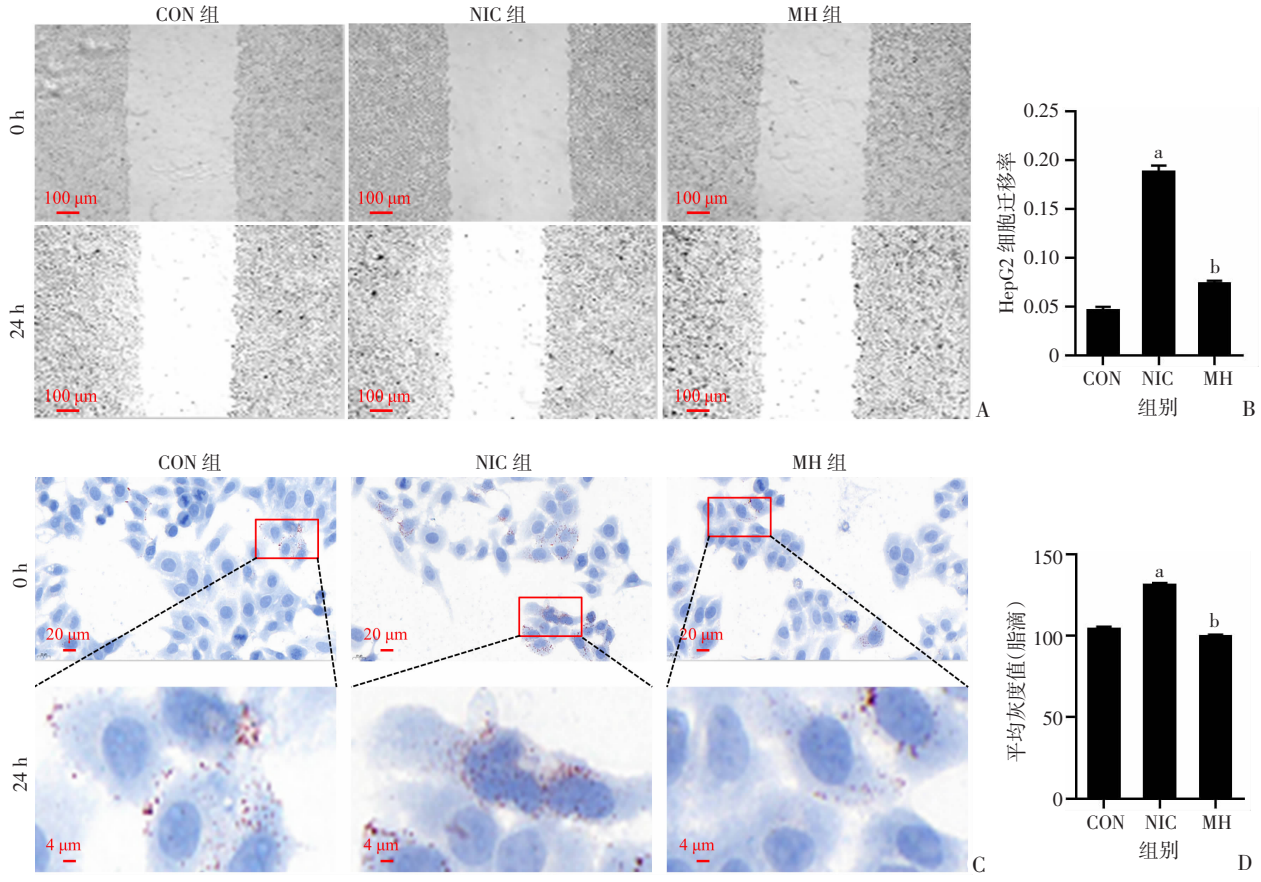
划痕实验结果显示,CON 组细胞迁移率<5%,NIC 组迁移率约 18%, MH 组迁移率约 7%。尼古丁显著增加 HepG2 细胞 24 h 的迁移能力($P<0.01$),并且加入尼古丁抑制剂(MH)后,细胞的迁移能力明显减弱($P<0.01$,图 2A、B)。油红 O 染色用于检测 HepG2 细胞中的脂质沉积(图 2C)。半定量分析发现,与 CON 组比较,NIC 组的平均灰度值(脂滴)显著增加($P<0.01$);加入 MH 后,平均灰度值(脂滴)又显著下降($P<0.01$,图 2D)。提示尼古丁提高 HepG2 细胞迁移能力,并促进脂滴积累。



a:$P<0.05$,与 0 μmol/L 尼古丁组比较;b:$P<0.01$,与尼古丁处理 0 h 组比较

A:CCK-8 细胞活性实验;B:不同浓度尼古丁处理 24 h 后的 PCSK9 mRNA 表达;C:10 μmol/L 尼古丁处理不同时间后的 PCSK9 mRNA 表达;D:Western blot 检测不同浓度尼古丁和尼古丁干预不同时间后的 PCSK9 蛋白表达;E:不同浓度尼古丁处理 24 h 后 PCSK9 蛋白表达的半定量分析;F:10 μmol/L 尼古丁处理不同时间后 PCSK9 蛋白表达的半定量分析

图 1 尼古丁对 HepG2 细胞活性及 PCSK9 表达的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)



a:$P<0.01$,与 CON 组比较;b:$P<0.01$,与 NIC 组比较

A:划痕实验检测细胞迁移能力;B:划痕实验的半定量分析;C:油红 O 染色检测细胞脂质沉积;D:油红 O 染色实验的半定量分析

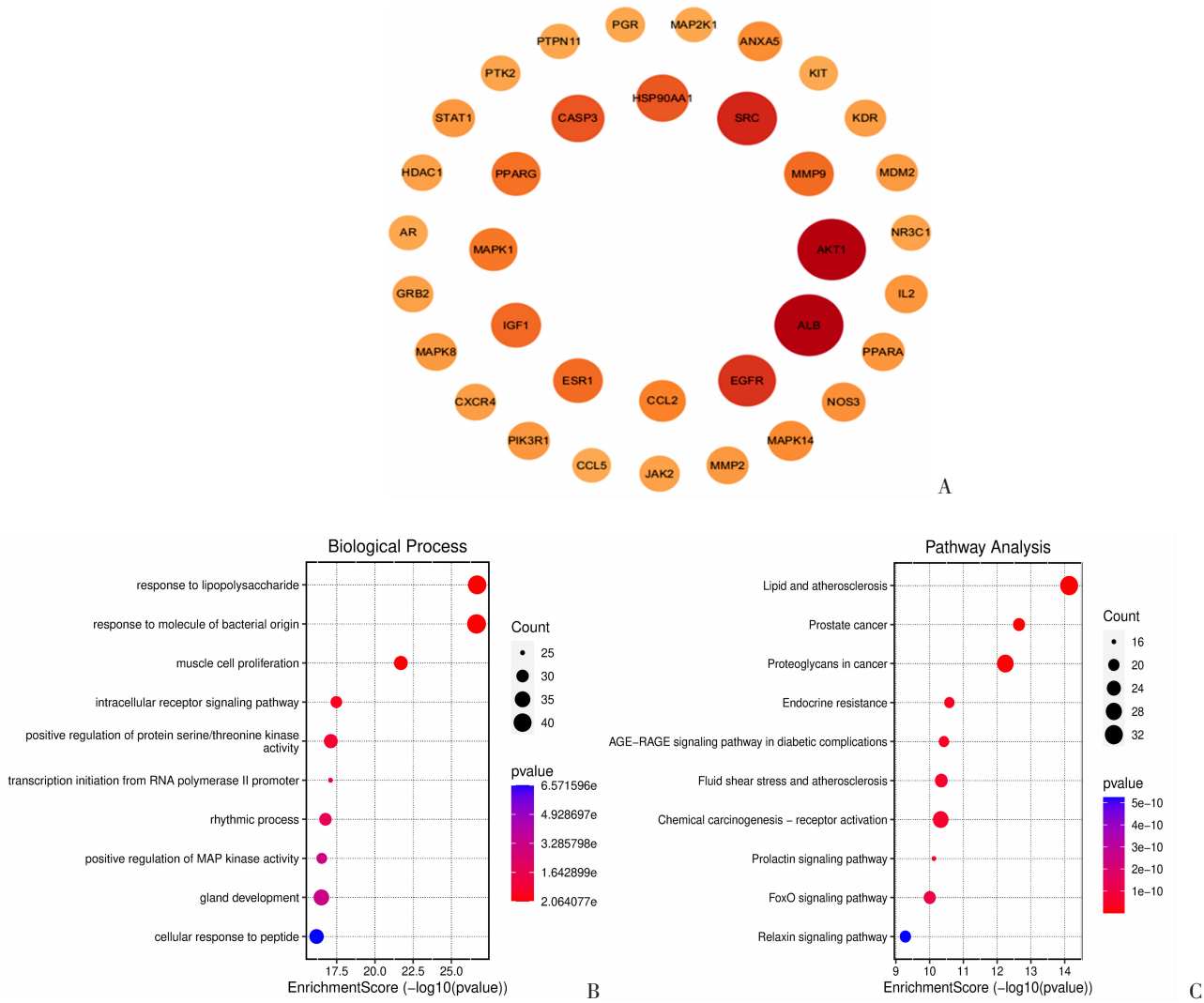
图 2 尼古丁对 HepG2 细胞迁移能力和脂质沉积的影响 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.3　LDL-C 和尼古丁靶点的筛选和网络药理学分析

Venny 图结果显示:经数据库筛选出尼古丁靶点为 380 个,LDL-C 的靶点为 10 322 个。其中,二者的共有靶点为 257 个,占总量的 2.5%。对 35 种最靠前的核心靶点进行网络图筛选,核心靶点用"度"进行量化,包括 ALB(度=130)、AKT1(度=129)、SRC(度=103)、EGFR(度=97)、CASP3(度=83)、HSP90AA1(度=82)、IGF1(度=74)、MMP9(度=73)、ESR1(度=93)、PPARG(度=71)、MAPK1(度=68)和 CCL2(度=64)等(图 3A)。GO 生物过程分析显示:富集分数最高的是"对脂多糖的反应"和"对细菌来源分子的反应";富集分数较低的"MAPK 活性的正向调节"在整个生物过程中排第 8 位(图 3B)。KEGG 通路分析显示:"脂质和动脉粥样硬化"的富集分数最高,其后是"前列腺癌""癌症中的蛋白聚糖"等(图 3C)。

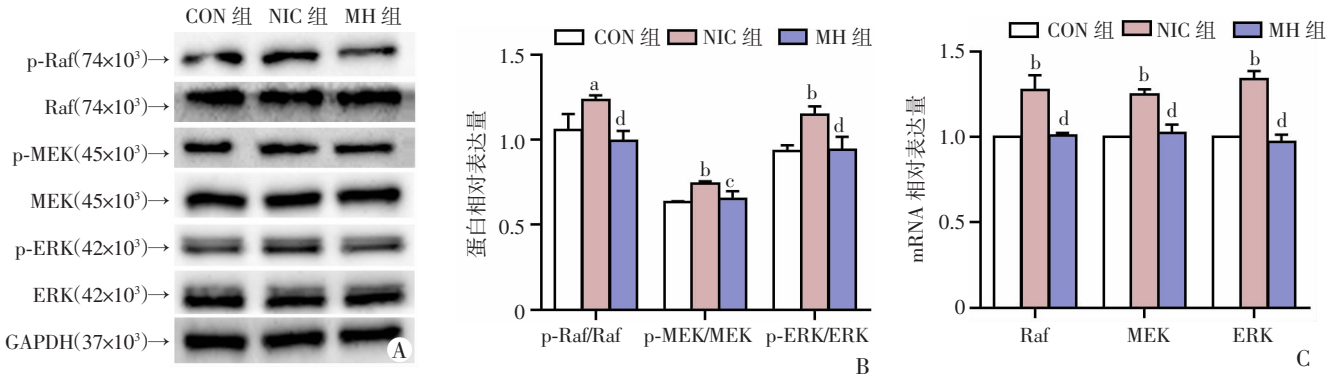
2.4　尼古丁可激活 Raf/MEK/ERK 信号通路

Western blot 及半定量分析显示:与 CON 组比较,NIC 组 Raf、MEK、ERK 的磷酸化蛋白相对表达量均上调($P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.01$)。加入 MH 后,因尼古丁刺激上调的 Raf、MEK、ERK 的磷酸化蛋白相对表达量受到抑制($P<0.01$,$P<0.05$,$P<0.01$,图 4A、B)。RT-qPCR 分析显示:与 CON 组比较,NIC 组 Raf、MEK、ERK 的 mRNA 表达都增强($P<0.01$),MH 则削弱了这种增强作用($P<0.01$,图 4C)。提示尼古丁提高下游 Raf、MEK、ERK 基因转录水平并激活了 Raf、MEK、ERK 级联的磷酸化过程。



A:尼古丁与低密度脂蛋白胆固醇蛋白质-蛋白质相互作用中靠前的核心靶点;B:尼古丁与低密度脂蛋白胆固醇共有靶点富集分析中的生物过程　横坐标为富集分数,纵坐标为不同 GO 生物学过程;C:尼古丁与低密度脂蛋白胆固醇共有靶点富集分析中的通路分析　横坐标为富集分数,纵坐标为不同 KEGG 通路;图中圆圈的颜色越红、面积越大,表明该基因富集程度越高

图 3　LDL-C 和尼古丁靶点的筛选和网络药理学分析



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 CON 组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 NIC 组比较

A:Western blot 检测 Raf、MEK、ERK 以及磷酸化 Raf、MEK、ERK 的蛋白表达;B:磷酸化 Raf、MEK、ERK 的蛋白相对表达量的半定量分析;C:RT-qPCR 检测 Raf、MEK、ERK 基因的 mRNA 表达

图 4 尼古丁可激活 Raf/MEK/ERK 信号通路 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

2.5 尼古丁通过 Raf/MEK/ERK 信号通路调节 HepG2 细胞中的 PCSK9 表达

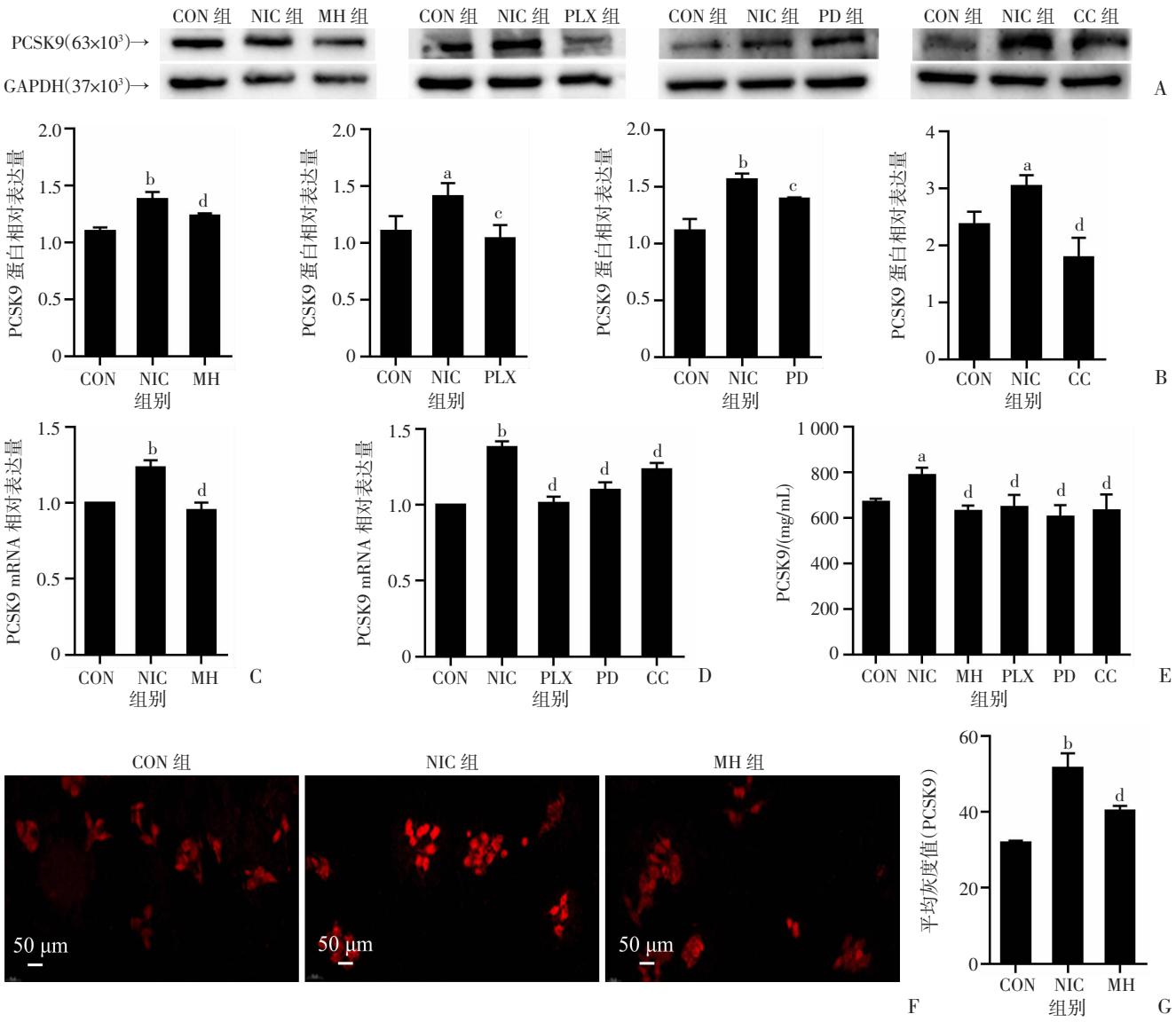
Western blot 及其半定量结果显示,NIC 组 PCSK9 的蛋白表达量较之 CON 组显著升高;而 MH 组、PLX 组、PD 组和 CC 组较之 NIC 组 PCSK9 蛋白表达下调($P<0.01$,$P<0.05$,$P<0.01$,$P<0.05$;图 5A、B)。RT-qPCR 结果显示,尼古丁使得 PCSK9 mRNA 表达量较之 CON 组明显增多($P<0.01$),MH 可减少 PCSK9 mRNA($P<0.01$,图 5C);相应地,PLX 组、PD 组和 CC 组较之 NIC 组 PCSK9 mRNA 表达下调($P<0.01$,图 5D)。ELISA 结果显示,在尼古丁的刺激下,PCSK9 的蛋白表达量较之 CON 组显著升高($P<0.05$),而 MH 组、PLX 组、PD 组和 CC 组较之 NIC 组 PCSK9 蛋白表达下调($P<0.01$,图 5E)。免疫荧光及其半定量结果显示,NIC 组 PCSK9 的蛋白表达量比 CON 组明显增强($P<0.01$),MH 的加入减少了 PCSK9 的蛋白表达($P<0.01$,图 5F、G)。

3 讨论

尼古丁是香烟烟雾中 7 000 多种化学成分之一[12],影响脂质代谢并加速动脉粥样硬化的形成。体内实验表明,较高浓度的尼古丁会导致大鼠脂肪因子和脂质异常[14],暴露于尼古丁的动脉粥样硬化模型小鼠显示该模型组比正常组动脉粥样硬化斑块形成显著增强[15]。与上述结果一致,本实验发现,尼古丁组脂质沉积显著增加,而尼古丁抑制剂可翻转此效果,表明尼古丁对脂质沉积确有促进作用。PCSK9 靶向结合 LDLR 并于溶酶体内将其降解,血液中 LDL-C 升高从而间接升高血脂[6]。目前,关于尼古丁和 PCSK9 的研究较少。已经发现,香烟烟雾提取物可以通过 ROS/NF-κB 刺激 HepG2 细胞分泌 PCSK9[9]。香烟烟雾提取物也可降低 HepG2 细胞中 LDLR 的表达[8]。此外,PCSK9 敲除小鼠 LDLR 表达增加。有趣的是,肝脏是 PCSK9 产生和尼古丁代谢的主要场所,这可能为二者之间的相互作用提供潜在条件。基于以上原因,推测尼古丁可能促进 PCSK9 在 HepG2 中的表达。本实验的结果显示,尼古丁刺激后,PCSK9 mRNA 和蛋白表达确实上调,并且在添加尼古丁抑制剂后,PCSK9 mRNA 和蛋白表达降低,表明尼古丁可位于 PCSK9 的上游并对其表达发挥调控作用。

为进一步研究尼古丁对 PCSK9 表达的影响机制,本实验筛选尼古丁与 LDL-C 之间的靶点并进行富集分析。二者 257 个共有靶点中包含 MAPK1 通路。虽然通路分析中“脂质和动脉粥样硬化”的富集分数最高,但生物过程中富集分数最靠前的却是“对脂多糖的反应”和“对细菌来源分子的反应”,而“MAPK 活性的正向调节”仅在整个生物过程中排第 8 位。这一结果可以借助“炎症”作为桥梁得以解释。无论是用于炎症建模的脂多糖[16]还是细菌来源产物[17],它们对炎症的形成都有极大的影响。动脉粥样硬化的形成本身就是一种慢性炎症[18],而 LDL-C 造成的高脂血症促进炎症形成[19];此外,已有研究表明,口腔摄入尼古丁可释放大量炎症标志物,如 IL-6、TNF-α 等[20]。

MAPK 通路的激活可促进肿瘤形成[21],而肿瘤形成中常伴有肿瘤细胞的迁移、增殖等[22]。本实验同样发现,尼古丁提高 HepG2 细胞迁移能力。NIC 组的 Raf、MEK、ERK 的磷酸化水平和转录水平提高,表明尼古丁可处于 Raf、MEK、ERK 的上游并激活此通路。Raf、MEK、ERK 的蛋白同源性分别为:83%、80%、39%,因此 ERK 的磷酸化激活对通路发挥作用显得尤



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 CON 组比较; c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与 NIC 组比较

A:尼古丁刺激并分别加入 MH、PLX4720、PD0325901 和 CC-90003 后 PCSK9 的蛋白表达变化;B:PCSK9 的蛋白表达水平的半定量分析;C:RT-qPCR 检测 PCSK9 mRNA 表达;D:RT-qPCR 检测 PCSK9 mRNA 表达;E:ELISA 实验检测 PCSK9 的蛋白表达;F:免疫荧光检测 PCSK9 的荧光强度;G:免疫荧光实验的半定量分析

图 5 尼古丁对 PCSK9 表达的调节以及该过程与 Raf/MEK/ERK 信号通路的关系 ($n=3,\bar{x}\pm s$)

为重要[21]。结合网络药理学分析结果,推测尼古丁对 PCSK9 的调控或许与 MAPK 通路有关。借助 Western blot、RT-qPCR 和 ELISA 实验发现,尼古丁刺激引起 PCSK9 蛋白和 mRNA 的表达上调, Raf 特异性抑制剂、MEK 特异性抑制剂和 ERK 特异性抑制剂可削弱上述效应,表明控制 Raf、MEK、ERK 的活性有助于调控 PCSK9 的转录和翻译过程。加之尼古丁可位于上游并激活 Raf、MEK、ERK,由此得出结论,尼古丁可借助 Raf/MEK/ERK 信号通路调节 PCSK9 在 HepG2 细胞中的转录和翻译。

综上所述,在 HepG2 细胞中,尼古丁促进脂质沉积和细胞迁移,尼古丁通过激活 MAPK(Raf/MEK/ERK)通路参与调控下游 PCSK9 的表达,且上调的 PCSK9 可能是细胞内脂质沉积的重要原因。但本实验仅进行了体外研究,因此,下一步应增加动物实验以增强实验结果的信服力。本课题将为未来进一步研究烟雾成分和血脂代谢提供参考,并为更好地治疗动脉粥样硬化提高可能的方向。

致谢 感谢重庆市重大代谢性疾病转化医学重点实验室肖晓秋教授课题组提供的 HepG2 细胞。

参考文献:

[1] HERRINGTON W, LACEY B, SHERLIKER P, *et al*. Epidemiology of atherosclerosis and the potential to reduce the global burden of atherothrombotic disease[J]. Circ Res, 2016, 118(4): 535-546. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307611.

[2] LIBBY P, BURING J E, BADIMON L, *et al*. Atherosclerosis[J]. Nat Rev Dis Primers, 2019, 5(1): 56. DOI: 10.1038/s41572-019-0106-z.

[3] CZERNIUK M R, SURMA S, ROMAŃCZYK M, *et al*. Unexpected relationships: periodontal diseases: atherosclerosis-plaque destabilization? from the teeth to a coronary event[J]. Biology, 2022, 11(2): 272. DOI: 10.3390/biology11020272.

[4] HOOGEVEEN R C, BALLANTYNE C M. Residual cardiovascular risk at low LDL: remnants, lipoprotein(a), and inflammation[J]. Clin Chem, 2021, 67(1): 143-153. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa252.

[5] GLERUP S, SCHULZ R, LAUFS U, *et al*. Physiological and therapeutic regulation of PCSK9 activity in cardiovascular disease[J]. Basic Res Cardiol, 2017, 112(3): 32. DOI: 10.1007/s00395-017-0619-0.

[6] SHAPIRO M D, TAVORI H, FAZIO S. PCSK9: from basic science discoveries to clinical trials[J]. Circ Res, 2018, 122(10): 1420-1438. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.311227.

[7] LEE J, COOKE J P. Nicotine and pathological angiogenesis[J]. Life Sci, 2012, 91(21/22): 1058-1064. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.06.032.

[8] MA B T, CHEN Y F, WANG X B, *et al*. Cigarette smoke exposure impairs lipid metabolism by decreasing low-density lipoprotein receptor expression in hepatocytes[J]. Lipids Health Dis, 2020, 19(1): 88. DOI: 10.1186/s12944-020-01276-w.

[9] MA B T, WANG X B, ZHANG R, *et al*. Cigarette smoke extract stimulates PCSK9 production in HepG2 cells via ROS/NF-κB signaling[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 331. DOI: 10.3892/mmr.2021.11970.

[10] MA C Y, SHI X Y, WU Y R, *et al*. Berberine attenuates atherosclerotic lesions and hepatic steatosis in $ApoE^{-/-}$ mice by down-regulating PCSK9 via ERK1/2 pathway[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(20): 1517. DOI: 10.21037/atm-20-8106.

[11] DING Z, WANG X, LIU S, *et al*. NLRP3 inflammasome via IL-1beta regulates PCSK9 secretion[J]. Theranostics, 2020, 10(16): 7100-7110. DOI: 10.7150/thno.45939.

[12] CENTNER A M, BHIDE P G, SALAZAR G. Nicotine insenescence and atherosclerosis[J]. Cells, 2020, 9(4): 1035. DOI: 10.3390/cells9041035.

[13] YARAHMADI A, ZAL F, BOLOUKI A. Protective effects of quercetin on nicotine induced oxidative stress in 'HepG2 cells'[J]. Toxicol Mech Methods, 2017, 27(8): 609-614. DOI: 10.1080/15376516.2017.1344338.

[14] FAHEEM A, REHMAN K, JABEEN K, *et al*. Nicotine-mediated upregulation of microRNA-141 expression determines adipokine-intervened insulin resistance[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2020, 80: 103506. DOI: 10.1016/j.etap.2020.103506.

[15] KOGA M, KANAOKA Y, OKAMOTO M, *et al*. Varenicline aggravates atherosclerotic plaque formation in nicotine-pretreated ApoE knockout mice due to enhanced oxLDL uptake by macrophages through downregulation of ABCA1 and ABCG1 expression[J]. J Pharmacol Sci, 2020, 142(1): 9-15. DOI: 10.1016/j.jphs.2019.11.002

[16] CIESIELSKA A, MATYJEK M, KWIATKOWSKA K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78(4): 1233-1261. DOI: 10.1007/s00018-020-03656-y.

[17] GRONDMAN I, PIRVU A, RIZA A, *et al*. Biomarkers of inflammation and the etiology of sepsis[J]. Biochem Soc Trans, 2020, 48(1): 1-14. DOI: 10.1042/BST20190029.

[18] WOLF D, LEY K. Immunity and inflammation in atherosclerosis[J]. Circ Res, 2019, 124(2): 315-327. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.313591.

[19] MENSINK F B, LOS J, TEN CATE T J F, *et al*. Pharmaco-invasive therapy: early implementation of statins and proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 inhibitors after acute coronary syndrome[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 1061346. DOI: 10.3389/fcvm.2022.1061346.

[20] SHAIKH S B, TUNG W C, PANG C, *et al*. Flavor classification/categorization and differential toxicity of oral nicotine pouches (ONPs) in oral gingival epithelial cells and bronchial epithelial cells[J]. Toxics, 2022, 10(11): 660. DOI: 10.3390/toxics10110660.

[21] ULLAH R, YIN Q, SNELL A H, *et al*. RAF-MEK-ERK pathway in cancer evolution and treatment[J]. Semin Cancer Biol, 2022, 85: 123-154. DOI: 10.1016/j.semcancer.2021.05.010.

[22] CZYZYKOWSKI R, POŁOWINCZAK-PRZYBYŁEK J, POTEMSKI P. Nicotine-induced resistance of non-small cell lung cancer to treatment: possible mechanisms[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2016, 70: 186-193. DOI: 10.5604/17322693.1196391.

(收稿:2023-01-07;修回:2023-04-07)

(编辑 汪勤俭)