

NF- κ B 对低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞 ET-1 表达的影响

李 玉¹ 高新伟² 李 晋²

(哈尔滨医科大学附属四院 150001 黑龙江省医院道外分院 150056)

摘要 目的:探讨核因子 κ B(NF- κ B)对低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞(PAMSC)内皮素-1(endothelin-1, ET-1)表达的影响。方法:分离培养大鼠肺动脉平滑肌细胞,分别在常氧和低氧条件下培养48小时。ELISA检测培养上清中ET-1含量,RT-PCR检测ET-1 mRNA表达。在培养液中加入NF- κ B抑制剂PDTC,检测PAMSCs ET-1表达的变化。Western blotting检测PAMSCs I κ B表达变化。结果:低氧培养能够诱导PAMSCs表达ET-1。NF- κ B抑制剂能够减少由于低氧引起的ET-1释放,I κ B在低氧情况下表达明显减少。结论:ET-1低氧情况下在PAMSCs表达明显增加,可能参与低氧所引起的肺动脉的病理过程。低氧所引起的ET-1表达增加可能通过NF- κ B信号通路。

关键词:低氧;肺动脉高压;内皮素-1;核因子- κ B

Effect of NF- κ B on ET-1 Expression in PAMSCs of Rats under Hypoxia

LI Yu, GAO Xin-wei, LI Jin

Department of Respiratory Diseases, the Fourth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Department of Pathology, Daowai Branch Hospital, Heilongjiang Hospital, Harbin, China

ABSTRACT Objective: To study the effects of the nuclear factor kappa B (NF- κ B) in the endothelin-1 (ET-1) expression in the PAMSCs of rats under hypoxia. **Methods:** 28 male Wistar rats were selected and their PAMSCs were isolated and incubated at normal situation or under hypoxia for 48 hours. The ET-1 level in the supernatant was detected by ELISA. RT-PCR was used to investigate the mRNA expression of ET-1 in the PAMSCs. The I κ B, which is the most prominent indicator of activation of NF- κ B, was detected by Western blotting in the PAMSCs. The inhibitor of NF- κ B (10 μ M), PDTC, was added to the culture to investigate the effect of it on the expression of ET-1. **Results:** The ET-1 expression can be induced significantly in the hypoxia situation. The inhibitor of NF- κ B can decrease the expression of ET-1 induced by hypoxia. The I κ B expression decreased significantly under hypoxia. **Conclusion:** The expression of ET-1 increased obviously in the PAMSCs under hypoxia, which may participate in the pathological events of the PAMSCs in the hypoxia situation and contribute to the activation of NF- κ B signal pathway. So inhibiting NF- κ B activation could be a new therapy for pulmonary artery hypertension induced by hypoxia.

Key words: Hypoxia; Pulmonary artery hypertension; Endothelin-1; Nuclear factor kappa B

低氧是各种呼吸系统疾病最常发生的病理生理变化之一。由于缺氧所引起的机体调节功能障碍,相应导致各种组织、细胞发生一系列的病理变化。长期低氧可以引起肺动脉高压,导致右心室阻力升高,诱发充血性心力衰竭。低氧所引起的肺动脉高压的病理基础还未完全阐明。内皮素-1(endothelin-1, ET-1)是一种强烈的血管收缩物质,在低氧等情况下可以大量表达。研究表明,ET-1参与肺动脉高压的形成^[1,2]。但到目前为止,低氧引起ET-1表达升高的信号转导通路还不是很清楚。本研究的目的即探讨低氧条件对大鼠肺动脉血管平滑肌细胞(PAMSCs)ET-1表达的影响,以及引起这种改变的可能的信号通路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

雄性Wistar大鼠($n=28$),体重250~280g,购自哈尔滨兽医研究所。细胞培养液DMEM(Gibco),胎牛血清(Hyclone),细胞总RNA提取试剂(Invitrogen),ET-1 ELISA检测试剂盒(北京东亚免疫试剂研究所),NF- κ B抑制剂PDTC(Sigma),Western blot检测试剂盒(Amersham, U.S.A.)。

大鼠PAMSCs分离与培养:参照文献^[1]所记载的方法进行。大鼠麻醉后迅速取出心肺,分离肺内动脉4~6级分支。原代培养细胞达到80~90%融合后代传培养。传代培养的细胞生长至60~70%融合后,换无血清培养基培养24小时同步化。将细胞分别于常氧(37℃,5% CO₂,21% O₂,74% N₂)和低氧(37℃,5% CO₂,5% O₂,90% N₂)条件下培养48小时。

1.2 实验分组

培养细胞按照以下分组:(1)常氧组(N组):在无血清培养

基中常氧培养。(2) 低氧组(H 组): 细胞在低氧中培养。(3) 常氧+ PDTC 组(NPD 组): 常氧培养同时加入 NF- κ B 抑制剂 PDTC(10 μ M)。(4) 低氧+ PDTC 组(HPD 组): 低氧培养同时加入 PDTC(10 μ M)。

细胞培养上清 ET-1 测定: 收集培养上清, 按照试剂盒说明书进行, 应用放免法测定上清内 ET-1 含量, 结果以 ng/L 表示。

细胞总 RNA 提取及 RT-PCR: 应用 Trizol 总 RNA 提取试剂提取上述细胞总 RNA, RT-PCR 合成 cDNA 第一链。以此 cDNA 第一链为模板, PCR 扩增 ET-1 mRNA, 以 GAPDH 作为内参照, 校正各组之间 RNA 含量。ET-1 引物序列如下: Upstream: 5'-GTC TTG GGA GCA GAG CTC AG-3'。Downstream: 5'-CIT GG C AGA AAT TCC AGC AC-3' 产物长度 311bp。GAPDH 引物序列如下: Upstream: 5'-CTC AAC TAC ATG GTC TAC AT-3', Downstream: 5'-CTC AGC ACC AGC ATC ACC CCA T-3'。产物长度 162bp。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C-2min, 94 $^{\circ}$ C-45s, 58 $^{\circ}$ C-45s, 72 $^{\circ}$ C-1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 分钟。PCR 产物通过 1% 凝胶电泳检样, 以 Quality one(Biorad) 凝胶分析仪分析扩增产物相对于内参照的灰度, 每组取 4 个样品, 取平均值代表 ET-1 mRNA 相对表达量。

Westernblot 检测 PAMSCs I κ B 表达: 培养细胞中加入蛋白提取缓冲液(Tris-HCL, pH 7.5, 50mmol/L. PMSF, 10mmol/L. 亮肽酶, 50ug/ml. 抑肽酶, 50ug/ml. EDTA, 1mmol/L. 1% Igepal CA-630), 冰上震荡 30 分钟, 13000g 离心 15 分钟, 收集蛋白上清。Bio-rad 蛋白显色法测量蛋白浓度后分装储存于-70 $^{\circ}$ C 备用。取 20ug 蛋白, 加入 2 $\times$ SDS 加样缓冲液, 煮沸 5 分钟, 冷却后加入 12% SDS-PAGE 进行蛋白电泳。4v, 2 小时转移至醋酸纤维素膜, 脱脂乳封闭过夜。加入 1:200 稀释的兔抗大鼠 I κ B 单克隆抗体(Santa Cruz), 摇床封闭 1 小时。TBST 洗膜 3 次, 每次 10 分钟。加入 1:3000 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 二抗作用 30 分钟, TBST 洗膜。显色试剂盒显色 1-5 分钟, 控制显色时间, 待目标带明显后双蒸去离子水洗膜终止反应, 照相存片。结果采用 Quality One Software(Biorad) 处理。

1.3 统计学处理

以平均值 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SEM) 计算各组数据, 组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 有统计学差异。

2 结果

2.1 低氧诱导 PAMSCs ET-1 表达增加

PAMSCs 在低氧条件下培养 48 小时后, ELISA 测定上清中 ET-1 含量。

在低氧组, 上清内 ET-1 含量平均为 112.25 ± 10.23 ng/L, 常氧组为 48.23 ± 6.89 ng/L, 两组相比 $P < 0.05$ 。RT-PCR 检测二组之间 ET-1 mRNA 表达变化, 结果显示, 在低氧组 ET-1 mRNA 表达明显高于常氧组。(图 1, 2)

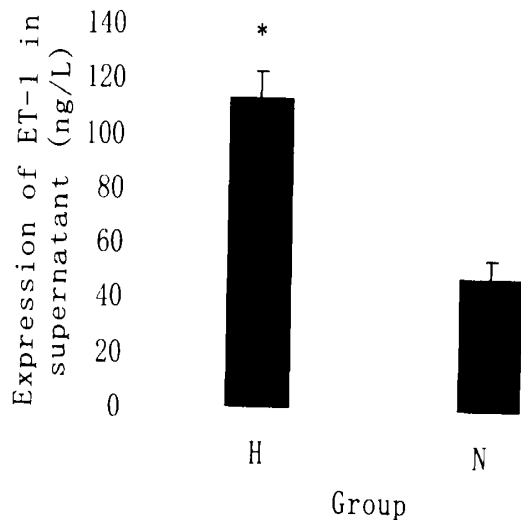


图1 低氧对 ET-1 表达影响。ELISA 检测培养细胞上清内 ET-1 的表达。结果显示, ET-1 含量常氧组为 48.23 ± 6.89 ng/L, 低氧组为 112.25 ± 10.23 ng/L。说明低氧能明显诱导 PAMSCs 表达 ET-1。(H: 低氧组; N: 常氧组; *: 与常氧组相比 $P < 0.05$)

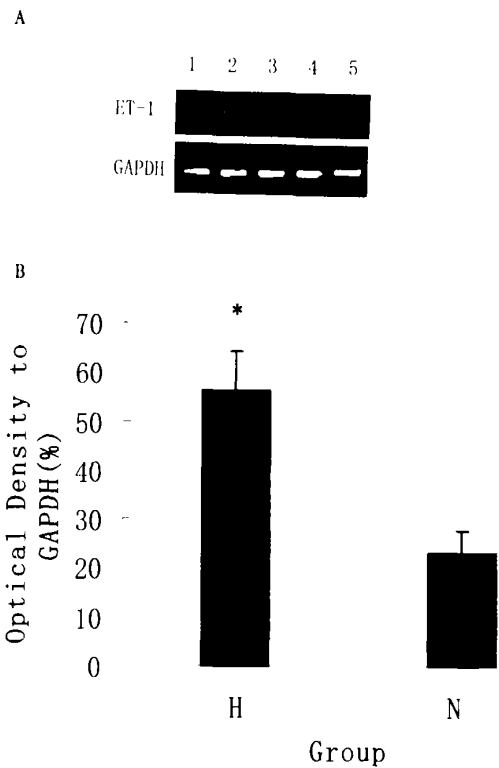


图2 低氧对 ET-1 mRNA 表达影响。低氧情况下, ET-1 mRNA 表达明显增加, 说明低氧能够刺激 ET-1 基因表达上调。A: 1, 2 组为低氧组, 3, 4, 5 组为常氧组。B: ET-1 mRNA 相对于内参照 GAPDH 的灰度值。每组测定三个结果取平均值。(H: 低氧组; N: 常氧组; *: 与常氧组相比 $P < 0.05$)

2.2 PDTC 抑制低氧引起的 ET-1 表达

在低氧培养液中加入 10 μ M 的 NF- κ B 抑制剂 PDTC 后, ELISA 检测 ET-1

含量下降为 67.12 ± 5.69 ng/L(与不加 PDTC 组相比, $P < 0.05$)。而常氧培养组加入 PDTC 后, ET-1 表达虽然也有所下降(48.23 vs 42.12), 但下降不明显。($P > 0.05$)(图 3)

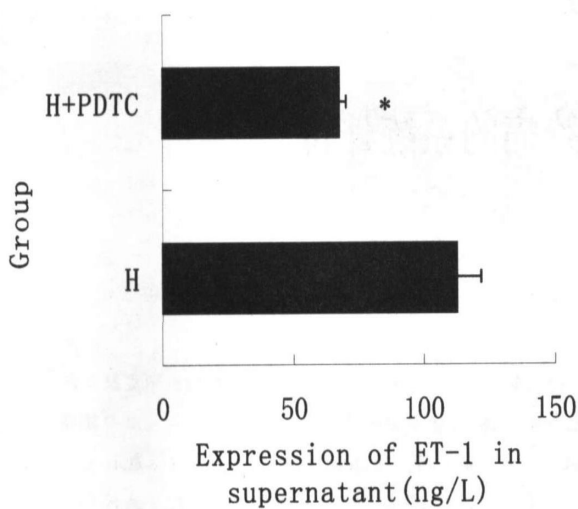


图3 PDTC对ET-1表达影响。在培养的PAMSC中加入NF- κ B抑制剂PDTC(10 μ M),测定上清中ET-1含量。PDTC明显抑制低氧引起的ET-1表达。(H:低氧组;N:常氧组;* :与常氧组相比 $P < 0.05$)

2.3 低氧引起的ET-1表达通过NF- κ B途径

Western Blot检测表明,在低氧培养条件下,I κ B的表达明显下降。I κ B下降时间特征与ET-1 mRNA表达增加的时间特征吻合。(图4)

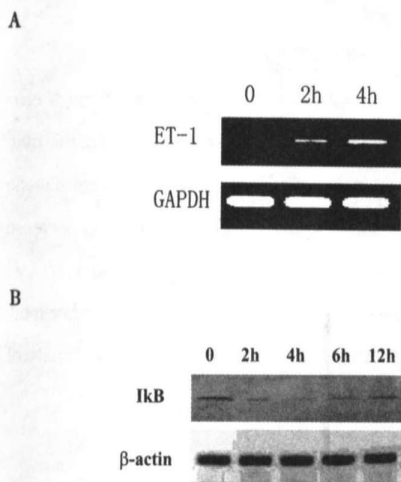


图4 低氧情况下ET-1 mRNA表达与I κ B之间关系。图A, RT-PCR检测不同时间ET-1 mRNA表达。在低氧第2小时开始,ET-1 mRNA表达开始升高,第4小时升高更显著。图B, Western blot检测I κ B表达,随着时间延长,在第2,4小时I κ B表达开始下降,从第6小时开始逐渐恢复,到第12小时基本接近正常水平。

3 讨论

低氧是各种呼吸系统疾病最常见的病理生理改变之一。低氧能够引起多种血管活性物质的释放,引起一系列的病理生理改变。内皮素在低氧条件下释放增多,引起血管的收缩,肺动脉阻力增加^[2]。长期作用可以引起肺动脉高压等病理生理改变。在引起ET-1释放增多的机制之中,目前还没有完全阐明。

核因子 κ B是调节基因转录的重要转录因子,在多种基因的转录过程中起重要作用。如炎症反应,应激状态等,核因子

被激活引起一系列基因的转录激活,进而合成相关蛋白,应对机体对通过的各种反应。NF- κ B证明对于ET-1基因的转录起重要作用^[3,4]。

本实验通过分离大鼠肺动脉血管平滑肌细胞进行低氧培养,结果发现,在低氧条件下,PAMSC能够大量分泌ET-1,RT-PCR检测发现ET-1 mRNA表达增加。这说明PAMSC在低氧情况下是ET-1产生的一个重要来源。同时表明,低氧刺激ET-1表达增加可能是通过ET-1基因转录的调控达到的。加入NF- κ B抑制剂后,ET-1的分泌明显减少,说明抑制转录确实能够减少ET-1的分泌。为了进一步明确ET-1表达增加是否与NF- κ B通路有关,我们应用Western blot检测I κ B。因为I κ B是代表NF- κ B激活的最重要和直接的标志,它的增加和减少可以直接反应NF- κ B的激活^[5,6]。结果表明,在低氧条件下,I κ B表达明显减少,说明NF- κ B在低氧情况下被激活。而I κ B减少的时间特征与ET-1 mRNA表达增加的时间特征相吻合。在缺氧第1,2,4小时,I κ B表达逐渐减少,而同时ET-1 mRNA表达明显增加。这说明NF- κ B的激活促进了ET-1 mRNA的转录,进而引起ET-1表达增加。而常氧培养组细胞对于PDTC的反应并不明显,间接说明常氧条件下不能引起NF- κ B的激活。在此条件下ET-1的表达可能通过其他信号通路起作用。

以上研究结果表明,在低氧情况下,NF- κ B能够被激活,引起ET-1 mRNA转录增加,同时ET-1蛋白表达量增加。抑制NF- κ B激活对于治疗由于低氧引起的肺动脉高压可能是一条新的途径。

参考文献

- [1] 孔伟,王迪浚.慢性缺氧改变肺内动脉平滑肌细胞环氧合酶基因的表达[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24:531-533
- [2] Takahashi H, Soma S, Muramatsu M, et al. Discrepant distribution of big endothelin (ET) 21 and ET receptors in the pulmonary artery[J]. Eur Respir J, 2001, 18: 5-14
- [3] Woods M, Elizabeth G, Wood SC, et al. Role for Nuclear Factor- κ B and Signal Transducer and Activator of Transcription 1/Interferon Regulatory Factor-1 in Cytokine-Induced Endothelin-1 Release in Human Vascular Smooth Muscle Cells[J]. Mol Pharmacol, 2003, 64: 923-931
- [4] Octavio JG, Javier CC, Antonio I et al. Early Effects of Modulating Nuclear Factor- κ B Activation on Traumatic Spinal Cord Injury in Rats[J]. Ann. N. Y. Acad. Sci. 2005, 1053: 148-150
- [5] Ohkita M, Takaoka M, Shiota Y, et al. A Nuclear Factor- κ B Inhibitor BAY 11-7082 Suppresses Endothelin-1 Production in Cultured Vascular Endothelial Cells[J]. J. Pharmacol. 89, 81-84 (2002)
- [6] Ohkita M, Takaoka M, Sugii M et al. The role of nuclear factor- κ B in the regulation of endothelin-1 production by nitric oxide[J]. European Journal of Pharmacology 472 (2003) 159-164