

心脉隆对肺动脉平滑肌细胞缺氧损伤的保护作用

吴昊¹, 陈俊杰², 蒋雷¹, 孙昊¹, 王军³, 张劲松^{1*}

(¹南京医科大学第一附属医院急诊科, 江苏 南京 210029; ²宜兴市人民医院 ICU, 江苏 宜兴 214200; ³南京医科大学公共卫生学院卫生部毒理实验室, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:研究心脉隆(XML)注射液对人源性肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)缺氧损伤的保护作用,探讨 XML 降低肺动脉高压(PAH)的可能机制。方法:利用 Na₂S₂O₄ 建立缺氧模拟肺动脉高压细胞缺氧模型,流式细胞术观察缺氧刺激下细胞凋亡率,实时定量 PCR 检测凋亡相关基因表达,采用激光共聚焦法检测细胞膜电位、胞浆钙离子的表达变化。结果:在缺氧情况下,与对照组比较,PASMCs 增殖显著,Bcl-2 基因表达增高,Bax 表达下调,具有显著性差异($P < 0.05$)。而 XML 能显著抑制缺氧过程中 Bcl-2 基因表达上调及 Bax 基因表达的下调,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。此外,XML 能稳定细胞膜电位和降低胞浆钙浓度,抑制缺氧诱导的 PASMCs 增殖。结论:XML 可减轻因缺氧引发的 PASMCs 凋亡减少而导致的平滑肌增殖重塑,为 XML 用于临床肺动脉高压的治疗提供实验依据。

[关键词] 心脉隆;肺动脉平滑肌细胞;缺氧

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)02-174-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170208

Effect of XinMaiLong on human pulmonary smooth muscle cells exposed to hypoxia

Wu Hao¹, Chen Junjie², Jiang Lei¹, Sun Hao¹, Wang Jun³, Zhang Jinsong^{1*}

(¹Department of Emergency, Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; ²ICU, Yixing Hospital, Wuxi 214200; ³Key Lab of Modern Toxicology, Ministry of Education, Department of Toxicology, School of Public Health, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the response of human pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) to hypoxia with or without Xinmailong injection (XML), and explore the mechanism for XML to remit pulmonary artery hypertension (PAH). **Methods:** Na₂S₂O₄ was used for building the hypoxic pulmonary artery smooth muscle cell model. The changes of apoptosis rate and apoptosis associated genes were detected by flow cytometry and realtime PCR, respectively, and membrane potentials and cytoplasmic Ca²⁺ under hypoxic stimulation were investigated by a laser scanning confocal microscope. **Results:** Under hypoxia condition, the proliferation of PASMCs was significant compared with that of the control group ($P < 0.05$), however, this effects can be markedly retarded by the treatment of XML ($P < 0.05$). Moreover, under hypoxia condition, Bcl-2 expression in PASMCs was obviously increased, while Bax expression was decreased when compared with those of the control group ($P < 0.05$). Noteworthily, XML can reverse both Bcl-2 and Bax expression induced by hypoxia ($P < 0.05$). In addition, XML stabilized the membrane potential and reduced the cytoplasmic Ca²⁺ under the hypoxic condition. **Conclusion:** Hypoxia leads to the proliferation of PASMCs, depolarization of membrane and increase of cytoplasmic Ca²⁺. The Chinese medicine XML can reduce all the effects induced by hypoxia, thereby our work might provide the experimental evidence for therapeutic strategy for pulmonary artery hypertension.

[Key words] Xinmailong injection (XML); pulmonary artery smooth muscle cell; hypoxia

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(02): 174-178]

[基金项目] 国家自然科学基金 (81273115, 81473012); 江苏省高校优势学科建设工程资助项目; 江苏省中医局项目 (LZ11081)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: zhangjsjz@163.com

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种临床综合征,其特征是持续性肺动脉压力升高^[1],主要病理生理机制包括早期肺血管收缩,后期肺血管重构及血栓形成。针对该疾病尽管目前有不同的疗法^[2-3],但其预后仍然很差^[3-4]。缺氧诱导肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)增殖,引起的肺动脉平滑肌细胞重构^[1],是引起 PAH 的关键原因。缺氧情况下,肺动脉氧含量减少,细胞收缩,肺动脉阻力增加,进一步加重 PAH。现有文献证实 Ca^{2+} 是引起 PSMCs 增殖的必要条件^[4]。在细胞膜去极化过程中,细胞内 Ca^{2+} 增加诱导 PSMCs 的收缩。

目前,肺血管的研究集中在如何降低 PAH 和逆转肺血管的病理变化,很少有药物被证明有益于降低 PAH^[3]。心脉隆(XML)是一种从美洲大蠊中提取出的生物活性复合物。既往研究表明,XML 可改善微循环,减少肾上腺素相关性水肿,保护油酸和异丙肾上腺素诱导的心肌缺血所致的肺损伤^[5],但 XML 能否治疗人源性仍不清楚。

因而,本研究通过建立人源性细胞模型,观察了 XML 对 PSMCs 细胞凋亡的影响,检测细胞凋亡比例和凋亡相关基因的表达,并采用荧光探针 DiBAC4(3)和 Fluo-4/AM 进一步观察膜电位和胞内钙浓度的改变,旨在阐述 XML 治疗的可能。

1 材料和方法

1.1 材料

人类 PSMCs 细胞(南京医科大学第一附属医院呼吸实验室)。XML 注射液(腾冲制药,云南),连二硫酸钠($Na_2S_2O_4$, Sigma 公司,美国),DiBAC4(3) (D8 189-25 mg, Sigma 公司,美国),Fluo-4-AM (F14 201, Invitrogen 公司,美国),SMCM Medium (1101, Science Cell 公司,美国),低糖 DMEM 培养基 (11966-025, Gibco 公司,加拿大),RPMI1640 培养基 (SH30809.01 B, Thermo 公司,美国),青链霉素 (SV30010, Thermo 公司,美国),Trypsin (25200-056, Gibco 公司,加拿大),TRIzol (Invitrogen 公司,美国),RNeasy Mini Kit (Qiagen 公司,德国),FITC-Anex 凋亡检测盒 (BU-AP0101, Biouniquer, 中国),Prime-Script™ RT Master Mix (RR036A, TaKaRa 公司,日本),Applied Biosystems ViiA™ 7 Dx 试剂盒 (Life Technologies 公司,美国)。所用仪器包括激光共聚焦显微镜 (Zeiss 公司,德国),实时 PCR 仪 (Applied biosystem, 美国),流式细胞仪 (Thermo 公司,美国)等。

1.2 方法

1.2.1 PSMCs 的培养及缺氧模型建立

细胞按 5×10^5 个/mL 的密度接种,于细胞培养箱中培养,2 d 换培养液,3 d 传代。所有实验使用第 3~4 代的 PSMCs。在培养基中加入 $Na_2S_2O_4$ 迅速清除融入培养基中的氧,进而建立细胞的缺氧模型。

1.2.2 细胞活力检测

对数生长期收集细胞,将细胞悬液接种于 96 孔板 (100 μ L/孔)。分为 11 组 (对照组,0.5‰ XML 组,1‰ XML 组,2‰ XML 组,5‰ XML 组,1% XML 组,2% XML 组,5% XML 组,10% XML 组,20% XML 组,50% XML 组),每组 8 份。接种后,细胞培养 24 h 后,每孔加入 10 μ L CCK-8,37℃与细胞孵育 4 h,测得波长为 450 nm 的吸光度。

1.2.3 PSMCs 细胞凋亡检测

在对数生长期对细胞进行收集,然后将细胞悬液接种于 6 孔板 (2 mL/孔),分为 3 组进行孵化 (常氧组、缺氧组、缺氧+XML 组)。24 h 后,通过流式细胞术 (FCM) 观察 XML 对 PSMCs 细胞凋亡的影响。

1.2.4 细胞凋亡相关基因 mRNA 表达的检测

常氧、缺氧、缺氧+XML 3 种方式处理 24 h 后,提取总 mRNA,每个样本取 500 ng 总 RNA 通过随机引物反向转录成 cDNA。利用 Applied Biosystems ViiA™ 7 Dx 试剂盒进行实时定量 PCR 的检测,观察凋亡相关基因 Bax 和 Bcl-2 表达的变化。反应条件:95℃变性 30 s;95℃ 5 s,60℃ 34 s,40 个循环。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法相对量化 mRNA 水平。引物序列见表 1。

1.2.5 缺氧条件下 XML 对 PSMCs 膜电位的影响

实验取对数生长期收集细胞。检测前弃培养基,并洗涤细胞。然后加入 DiBAC4(3)工作液,37℃孵育 30 min。缺氧组:将 $Na_2S_2O_4$ 工作液加入培养皿中 (1 mmol/L),使用激光共聚焦显微镜观察细胞荧光。XML 处理组:将 XML 与 DiBAC4(3)与细胞共孵 30 min 后,将 $Na_2S_2O_4$ 工作液加入培养皿中 (1 mmol/L),利用激光共聚焦观察荧光改变。实验重复 3 次。

1.2.6 缺氧条件下 XML 对 PSMCs 细胞质 Ca^{2+} 的影响

细胞弃培养基后,洗涤细胞,加钙离子荧光剂 Fluo-4-AM 工作液 (1 μ mol/L),37℃共孵 30 min,再次洗涤细胞 3 次,然后细胞在培养箱中放置 20~30 min 以确保 AM's 脱脂后,用激光共聚焦显微镜观察细胞荧光。缺氧组细胞培养皿中加入 $Na_2S_2O_4$ 工作液。XML 处理组,将细胞与 XML 预孵,后加入 $Na_2S_2O_4$

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	上游(5'→3')	下游(5'→3')
GAPDH	GGCTGAGAATGGGAAGCTGGTCAT	CAGCCTTCTCCATGGTGGTGAAGA
Bax	CCAAGAAGCTGAGCGAGTGTCT	TGAGGACTCCAGCCACAAAGA
Bcl-2	ATCCAGCCTCCGTTATCCT	CCGGGAGATCGTGATGAAGT

工作液,每 30 s 进行荧光强度扫描,观察和比较两组荧光差别。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

所有统计分析采用 SPSS17.0 软件包进行分析。数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计方法使用方差分析并采用 LSD 法进行两两比较。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 XML 对 PSMCs 存活率的影响

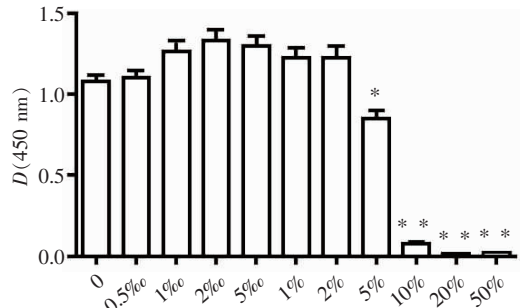
与对照组比较,0.5%~2.0%剂量 XML 处理组细胞活力未见显著性差异,而 5%~50%XML 剂量处理细胞后,细胞增长明显减少,尤其是 10%~50%的浓度组。鉴于上述结果,后续实验选择 2%XML 作为实验药物浓度(图 1)。

2.2 在缺氧条件下 XML 对 PSMCs 凋亡的影响

利用流式细胞术观察 XML 对 PSMCs 细胞凋亡的影响。缺氧或缺氧+2% XML 干预 24 h 后,与对照组(20.47 ± 0.88)%比较,缺氧组凋亡率降低,为(16.97 ± 0.17)%。而缺氧组与缺氧+2% XML 干预组(21.67 ± 0.87)%比较,差异具有统计学意义(图 2)。

2.3 缺氧条件下 XML 对细胞凋亡基因 mRNA 表达的改变

为进一步证明 XML 对细胞凋亡的影响,在 mRNA 水平,通过实时定量 PCR 观察凋亡相关基因 Bax 及 Bcl-2 的表达(图 3)。结果显示,Bax 在缺氧组表达下调,在缺氧+2%XML 组上调。相反,Bcl-2 基因在缺氧组表达上调,在缺氧+2%XML 组下调。



与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$, $n=3$ 。

图 1 XML 对肺动脉平滑肌细胞活力的影响

Figure 1 Effect of XML on PSMCs viability

而对照组和缺氧+2%XML 组未发现显著差异。

2.4 缺氧条件下 XML 对 PSMCs 膜电位的影响

利用激光共聚焦法,发现 XML 在 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导的缺氧条件下可引起膜电位的变化。表现为作用前期膜电位迅速降低,随后快速恢复,荧光强度增加,最后呈缓慢下降趋势(图 4A)。而 XML 干预组显示较长时间的膜电位增加,未观察到 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱发的超极化(图 4B)。

2.5 缺氧条件下 XML 对 PSMCs 胞浆 Ca^{2+} 的影响

常氧条件下,用 Fluo-4-AM 预处理 PSMCs,观察 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 诱导的缺氧处理后细胞钙浓度的改变(图 5)。研究显示,细胞处理后,钙离子荧光强度逐渐增加(图 5A),而 XML 预先干预组荧光强度降低(图 5B)。

3 讨论

PAH 的发病机制复杂多样,如持续的血管收

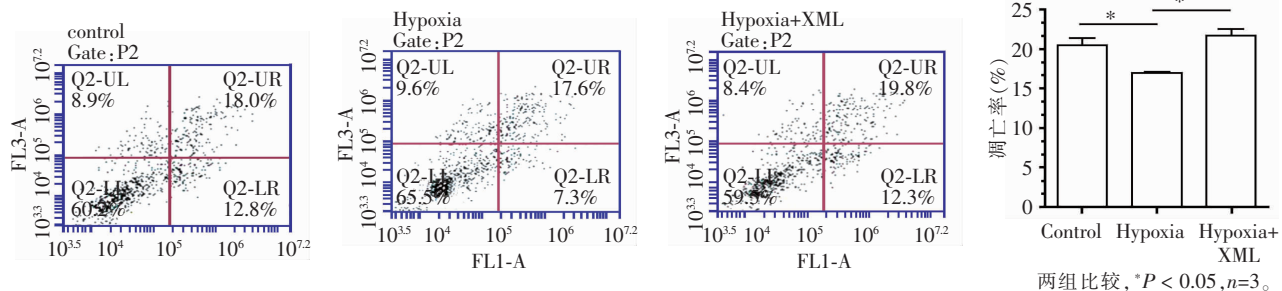
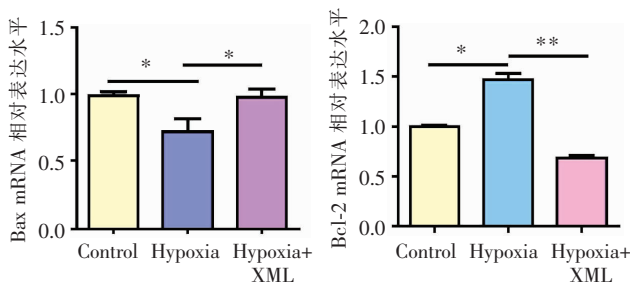


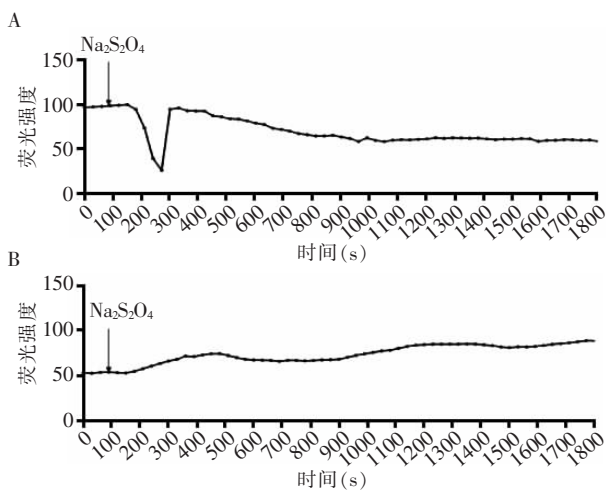
图 2 缺氧条件下 XML 对肺动脉平滑肌细胞凋亡影响

Figure 2 Effect of XML on PSMCs apoptosis under hypoxic condition



两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, $n=3$ 。

图 3 缺氧条件下 XML 对肺动脉平滑肌细胞凋亡基因表达
Figure 3 Effect of XML on expression of apoptosis associated genes under anoxic condition

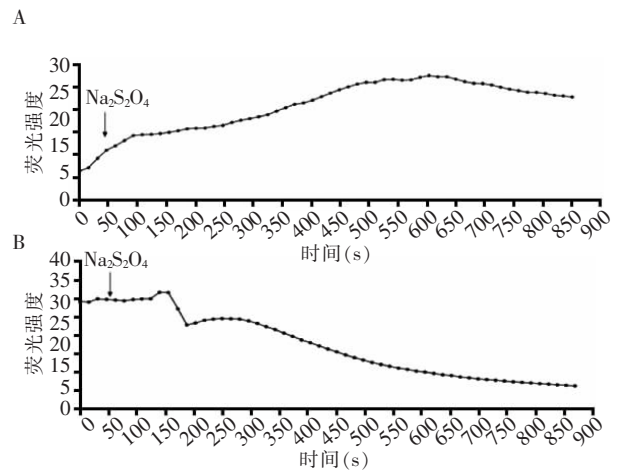


A: 缺氧; B: 缺氧+XML。

图 4 缺氧条件下心脉隆对肺动脉平滑肌细胞膜电位的作用
Figure 4 Effect of XML on membrane potentials in PAMSCs under anoxic condition

缩,血管重塑,原位血栓形成和动脉壁硬化。由缺氧诱导产生的氧化产物(如 H_2O_2)在缺氧时释放,抑制肺动脉平滑肌细胞电压-门控钾通道(K_v),进而调控电压门控 Ca^{2+} 通道,影响膜电位和控制 Ca^{2+} 内流^[5]。XML 是从美洲大蠊中提取的一种生物活性混合物。前期研究显示,XML 可改善微循环,降低肾上腺素相关的水肿,保护油酸引起的肺损伤和异丙肾上腺素引起的心肌缺血^[5]。本研究发现,低到中剂量的 XML 对细胞活力没有影响,而高剂量 XML (5%~50%)抑制细胞生长,可能是因其细胞毒性或高浓度 XML 对渗透压的改变。因此本研究中 2%XML 作为最佳实验浓度。研究显示,PAMSCs 在缺氧条件下增殖,导致 PAH^[6]。而 XML 干预后,发现缺氧组细胞凋亡率明显增高,提示 XML 可部分逆转由缺氧导致的 PAMSCs 增殖作用。

Bcl-2 家族是细胞凋亡中的重要蛋白,在维持组



A: 缺氧; B: 缺氧+XML。

图 5 缺氧条件下 XML 对肺动脉平滑肌细胞钙浓度的作用
Figure 5 Effect of XML on cytoplasmic Ca^{2+} in PAMSCs under anoxic condition

织器官的正常形态、功能及个人生长、发育、繁殖和衰老中发挥重要作用。Bax 和 Bcl-2 是促进和抑制细胞凋亡最有代表性的基因。作为 Bcl-2 家族的核心蛋白质,Bax 蛋白的促凋亡机制包括:①干扰线粒体通透性转换、氧化磷酸化和 ATP 合成的功能^[7];②改变细胞氧化还原反应^[8];③激活半胱天冬酶信号转导途径^[9]。Bcl-2 位于核膜、内质网和线粒体外膜,抑制细胞凋亡可通过:①调节细胞氧化还原状态,阻断氧化损伤对细胞成分的影响^[10];②影响细胞跨膜转运^[11];③抑制细胞色素 C^[12];④保护细胞免受核酸酶的影响。该研究发现,与对照组比较,缺氧+XML 处理组 Bax 基因显著增强。Bcl-2 基因在缺氧组表达上调,而在缺氧+XML 组下调,提示 XML 可通过促进凋亡而起到抑制 PAMSCs 增殖的作用。

研究显示,膜电位改变和细胞凋亡相关。本研究中,发现 XML 对缺氧引起的细胞膜电位的改变作用明显。在缺氧条件下,其刺激产生 3 段不同表现的膜电位。首先膜电位快速下降可能归因于 $Na_2S_2O_4$ 还原反应,它被广泛用于建立急性缺氧模型^[13]。在缺氧环境中,PAMSCs K_v 通道被抑制,可能导致细胞阶段性膜的去极化,继而引起缓慢的超极化。缺氧+XML 组表现为膜电位缓慢持续的增加,说明其具有稳定细胞膜的作用。

钙离子作为信号转导途径重要的第二信使,在许多生理及病理过程中发挥重要作用^[14]。该实验发现,XML 可减少急性缺氧肺动脉平滑肌细胞胞内钙浓度,提示细胞内 Ca^{2+} 减少可能是 XML 治疗肺动脉高压的部分机制。此外有研究显示,XML 对野百合

碱所致的大鼠 PAH 有一定的对抗作用,使血浆中一氧化氮(NO)明显升高而内皮素下降,提示其与血管内皮保护作用相关^[15],体现了 XML 对抗 PAH 机制的多样性,但在目前未见 XML 用于临床 PAH 的治疗。

本研究发现 XML 能显著抑制缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖,后者在 PAH 的发展中发挥了重要作用。此外,低氧条件下,XML 可以稳定细胞膜,减少胞内钙浓度的增加,可为解释 XML 治疗肺动脉高压提供一定理论基础。

[参考文献]

- [1] Goyal R, Papamatheakis DG, Loftin M, et al. Long-term maternal hypoxia: the role of extracellular Ca^{2+} entry during serotonin-mediated contractility in fetal ovine pulmonary arteries[J]. *Reprod Sci*, 2011, 18(10): 948-962
- [2] Kuhr FK, Smith KA, Song MY, et al. New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca^{2+} signaling[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(8): H1546-1562
- [3] Idrees MM, Swiston J, Nizami I, et al. Saudi guidelines on the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: medical and surgical management for pulmonary arterial hypertension[J]. *Ann Thorac Med*, 2014, 9 (Suppl 1): S79-91
- [4] Cribbs LL. T-type Ca^{2+} channels in vascular smooth muscle: multiple functions[J]. *Cell Calcium*, 2006, 40(2): 221-230
- [5] Obata H, Sakai Y, Ohnishi S, et al. Single injection of a sustained-release prostacyclin analog improves pulmonary hypertension in rats[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177(2): 195-201
- [6] Lambert CM, Roy M, Robitaille GA, et al. HIF-1 inhibition decreases systemic vascular remodelling diseases by promoting apoptosis through a hexokinase 2-dependent mechanism[J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88(1): 196-204
- [7] Kim JY, Kim YH, Chang I, et al. Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: role of Bax in TRAIL-induced apoptosis [J]. *Oncogene*, 2002, 21(20): 3139-3148
- [8] Giles GI. The redox regulation of thiol dependent signaling pathways in cancer[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(34): 4427-4443
- [9] Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609-619
- [10] Ofabisiak JP, Kagan VE, Ritov VB, et al. Bcl-2 inhibits selective oxidation and externalization of phosphatidylserine during paraquat-induced apoptosis[J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(2Pt1): C675-684
- [11] Armstrong JS, Steinauer KK, French J, et al. Bcl-2 inhibits apoptosis induced by mitochondrial uncoupling but does not prevent mitochondrial transmembrane depolarization [J]. *Exp Cell Res*, 2001, 262(2): 170-179
- [12] Zhang D, Fu M, Song C, et al. Expressions of apoptosis-related proteins in rats with focal cerebral ischemia after Angong Niu Huang sticker point application[J]. *Neural Regen Res*, 2012, 7(3): 2347-2353
- [13] Xu SM, Wang PY, Ma HY. Preparation of hypoxic surroundings with sodium dithionite for cell culture[J]. *J Third Milit Med University*, 2005, 27(4): 359-360
- [14] Randriamampita C, Tsien RY. Emptying of intracellular Ca^{2+} stores releases a novel small messenger that stimulates Ca^{2+} influx[J]. *Nature*, 1993. 364(6440): 809-814
- [15] 吴建新, 杨玲玲, 袁国林, 等. “心脉隆”抗野百合碱性肺动脉高压的作用及机制探讨[J]. *医学研究杂志*, 2009, 38(1): 29-32

[收稿日期] 2016-03-23