

曲格列酮对低氧状态下肺动脉平滑肌细胞的作用机制研究*

杨中静,皮卫峰[△],朱萍萍

(上海建工医院呼吸科,上海 200083)

摘要:目的 探讨曲格列酮对低氧状态下肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)的作用机制。方法 人 PASMCs 在 37 ℃ 5% CO₂ + 94% N₂ + 1% O₂ 条件下分别加入 20 μmol/L 的曲格列酮培养 72 h。通过聚合酶链反应(PCR)法测定 PASMCs 内 PTEN、Caspase-3 和 Caspase-8 基因表达;Western blot 法测定 PTEN, p-Akt, Akt 蛋白的表达。结果 曲格列酮抑制低氧条件下 PASMCs 的增殖;曲格列酮组 PASMCs PTEN mRNA 和蛋白表达水平升高,曲格列酮增加了 PASMCs 的 Caspase-3 及 Caspase-8 活性;PTEN 抑制剂 bpV(HOpic)和 PPARγ 抑制剂 GW9662 可通过下调 PTEN 基因表达而逆转曲格列酮对 PASMCs 的增殖抑制作用。结论 曲格列酮可增强 PTEN 的表达,促进低氧条件下 PASMCs 的凋亡,同时通过 PPARγ 途径增强 PTEN 表达。

关键词:增殖体过氧化物酶激活受体 γ;曲格列酮;低氧;人肺动脉平滑肌细胞;PTEN;作用机制

中图分类号:R965;R974

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)06-0004-03

Effect and Mechanism of Troglitazone on Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells Under Hypoxia

YANG Zhongjing, PI Weifeng, ZHU Pingping

(Department of Respiration, Shanghai Jiangong Hospital, Shanghai, China 200083)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of troglitazone on pulmonary artery smooth muscle cells(PASMCs) under hypoxia.

Methods Human PASMCs were cultured with 20 μmol/L troglitazone for 72 h under the condition of 5% CO₂ + 94% N₂ + 1% O₂ at 37 ℃. The gene expression of PTEN, Caspase-3 and Caspase-8 in PASMCs was determined by polymerase chain reaction(PCR), and the protein expression of PTEN, p-Akt and Akt was determined by Western blot. **Results** Troglitazone inhibited the proliferation of PASMCs under hypoxic. The expression of PTEN mRNA and protein in PASMCs in the troglitazone group were increased. Troglitazone increased the activity of Caspase-3 and Caspase-8 in PASMCs, PTEN inhibitor[bpV(HOpic)] and PPARγ inhibitor(GW9662) could reverse the inhibitory effect of troglitazone on the proliferation of PASMCs by down-regulating the gene expression of PTEN.

Conclusion Troglitazone can enhance the expression of PTEN, promote apoptosis of PASMCs under hypoxia, and enhance the expression of PTEN through PPARγ pathway.

Key words: PPARγ; troglitazone; hypoxia; human pulmonary artery smooth muscle cells; PTEN; mechanism of action

形成肺动脉高压的机制非常复杂,其中低氧引起的肺血管收缩和肺血管重塑(PVR)是一个重要机制。低氧可导致肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)过度增殖,从而导致 PVR^[1]。增殖体过氧化物酶激活受体 γ(PPARγ)激动剂是一种平滑肌细胞生长的负性调节剂,在体内外均能抑制平滑肌细胞增殖。既往研究显示,PPARγ 激动剂在多种细胞内均能通过对抑癌基因 PTEN 的调节作用影响细胞的代谢、增殖和凋亡^[2-4],但对低氧状态下的 PASMCs 能否通过调节 PTEN 发挥作用则尚未见报道。因此,本研究观察了 PPARγ 激动剂曲格列酮对低氧状态下 PASMCs 的增殖、凋亡及 PTEN/Akt 表达的影响,并进一步通过 PTEN 抑制剂阻断 PTEN/Akt 通路观察对此作用的影响,以明确其是否通过调节 PTEN 发挥作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人 PASMCs 及细胞培养液(美国 ScienCell 实验

室);逆转录试剂盒和聚合酶链反应(PCR)试剂盒(美国 Fermentas 公司);CyQUANT 细胞增殖检测试剂盒(美国 Invitrogen 公司);小鼠抗 GAPDH、小鼠抗人 PTEN(一抗)和羊抗小鼠 IgG-HRP(二抗)(美国 Santa Cruz 公司)。

PTEN 和 GAPDH 引物均由 1st base 公司(Singapore)合成,PTEN 上游序列:5'-tcaccaactgaagt-gctaaaga-3',下游序列:5'-ctccattcccttaaccga-3',GAPDH 上游序列:5'-agccacatcgctcagacac-3',下游序列:5'-taaaagcaggcctggtgac-3'。

曲格列酮(湖北巨胜科技有限公司,批号为 20161009,规格为每瓶 10 mg);GW9662(美国 Sigma 公司,批号为 011M4616V);bpV(HOpic)(德国 Merck 公司,批号为 S865101)。

1.2 方法

分组:人 PASMCs 分别加入 0.5~60 μmol/L 的曲格列酮培养 72 h,将培养的 PASMCS 分为正常对照组、

*基金项目:上海市卫生科研课题计划项目[20124278]。

第一作者:杨中静,女,大学本科,主治医师,研究方向为慢性气道疾病的发病机制,(电子信箱)xixia.1032@163.com。

[△]通信作者:皮卫峰,男,博士研究生,副主任医师,研究方向为肺血管疾病的发病机制,(电子信箱)shmowf@hotmail.com。

模型组、曲格列酮(20 $\mu\text{mol/L}$)组、曲格列酮(20 $\mu\text{mol/L}$) + GW9662(1 $\mu\text{mol/L}$)组及曲格列酮(20 $\mu\text{mol/L}$) + bpV(HOpic, 2.5 $\mu\text{mol/L}$)组。除正常对照组在常氧下培养,其余组均于1%氧体积分数、5% CO_2 条件下培养。

PASMCs增殖检测:细胞培养48 h后使用细胞增殖检测试剂盒检测 PASMCs 增殖情况,操作步骤按照说明书进行。

定量 PCR 检测:采用定量 PCR 法检测基因的表达水平。使用 25 μL 的反应体系,定量 PCR 的循环数设定为 40 循环,初始变性 10 min,随后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s。

Western blot 检测:使用 PhosphoSafe™ 蛋白提取试剂盒抽提细胞蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度,Western blot 法检测蛋白表达情况。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析,计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

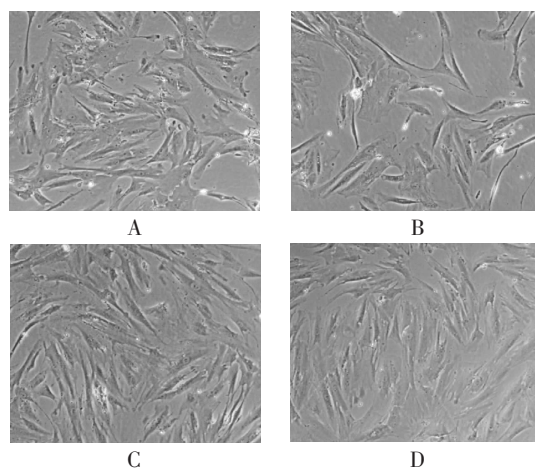
2 结果

结果见图 1 至图 4。曲格列酮在低氧浓度下培养细胞 2, 8, 0.5 h 时分别增加 PTEN mRNA 表达(3.2 ± 0.5)倍, Caspase-3 mRNA 表达(3.1 ± 0.6)倍, Caspase-8 mRNA (8.9 ± 1.1)倍。低氧条件下,曲格列酮浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, PASMCs 内 PTEN 与 p -Akt 的 mRNA 和蛋白表达水平最高,而 Akt 无明显变化,使用 bpV(HOpic)和 GW9662 预处理后都能显著抑制曲格列酮引起的 PTEN 蛋白表达水平升高,且能持续 24 h。

3 讨论

过氧化物酶增殖体激活受体(PPAR)属核激素受体超家族,共有 PPAR α , PPAR γ , PPAR δ 3 种亚型,其中 PPAR γ 在调控细胞分化和调控多种代谢(糖、脂肪、能量代谢等)中起重要作用。PPAR γ 还能通过抑制 TGF/ smads 信号途径而抑制细胞因子和生长因子的信号传导,发挥抑制血管平滑肌细胞增殖及迁移作用。PPAR γ 受体在正常肺组织中广泛表达,而重度肺动脉高压患者的肺血管中 PPAR γ 基因及蛋白表达明显降低^[5]。对平滑肌细胞 PPAR γ 基因敲除小鼠的研究表明,基因敲除的小鼠自发产生肺动脉高压,引起右心室收缩压上升,右心室的肥厚及远端肺动脉的肌化^[6]。

PTEN 是 PPAR γ 下游信号通路的一个重要因子。国外的研究表明,PTEN 在肺动脉高压发病机制中起了重要作用。在敲除小鼠血管平滑肌细胞的 PTEN 基因后,发现小鼠平滑肌细胞出现异常增殖,血管重构,以及与肺动脉高压一致的组织病理改变^[7]。而同时国内学者研究证实,PTEN/Akt 的转录和激活与低氧导致的 PASMCs 增殖密切相关,并在低氧性肺动脉高压形成过程中发挥重要作



A. 正常对照组 B. 曲格列酮组(20 $\mu\text{mol/L}$)
C. 曲格列酮 + GW9662 组 D. 曲格列酮 + bpV(HOpic)组
图 1 曲格列酮抑制低氧条件下 PASMCs 增殖情况($\times 100$)

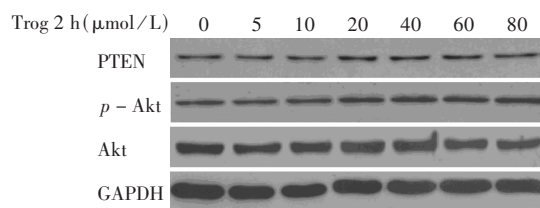


图 2 曲格列酮对低氧条件下相关蛋白表达的作用

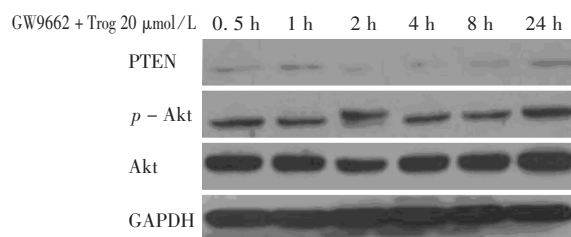


图 3 曲格列酮对低氧条件下相关蛋白表达的作用
(GW9662 预处理)

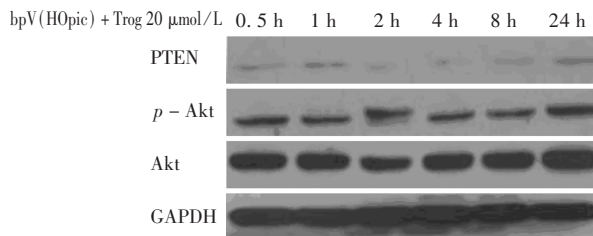


图 4 曲格列酮对低氧条件下相关蛋白表达的作用
[bpV(HOpic)预处理]

用^[8]。大量研究表明,PPAR γ 在不同的细胞内对 PTEN 具有不同的调节作用,进而影响细胞的代谢、增殖和凋亡^[9-12]。既往的研究同样显示,骨成形蛋白-2(BMP-2)能通过上调 PTEN 的表达抑制低氧状态下 PASMCs 的增殖,且 PPAR γ 拮抗剂能逆转 BMP-2 的抑制增殖作用^[13],提示 BMP-2 通过 PPAR γ 途径发挥作用。

本研究结果显示,PPAR γ 激动剂曲格列酮能抑制低氧条件下人 PASMCs 的增殖,上调 PASMCs 的 PTEN

基因及蛋白和 p -Akt 蛋白的表达;提示了 PPAR γ 激动剂曲格列酮可能通过增加 PTEN 的表达,激活 PI3K/Akt 信号通路,抑制人 PSMCs 的水平,从而抑制慢性阻塞性肺疾病患者低氧状态下的肺血管重塑。进一步验证发现,PTEN 抑制剂 bpV(HOpic) 和 PPAR γ 拮抗剂 GW9662 均能逆转曲格列酮的抑制低氧条件下人 PSMCs 增殖作用,并下调 PSMCs 的 PTEN 蛋白表达,进一步证明曲格列酮上调 PTEN 蛋白的表达是通过 PPAR γ 信号通路途径实现的,而其抑制 PSMCs 增殖的作用依赖于 PPAR γ -PTEN 途径。

Caspases 家族在细胞凋亡中具有关键作用,又称凋亡蛋白酶。Caspase-3 为细胞凋亡的终末剪切酶,是诱导细胞凋亡的直接实施者,具有不可替代的地位。而 Caspase-8 是介导细胞凋亡的关键启动因子,激活下一级级联反应。检测曲格列酮及低氧环境下 Caspase-3 和 Caspase-8 基因表达,结果提示,曲格列酮能增强 Caspase-3 和 Caspase-8 的活性,说明曲格列酮不仅可以直接抑制人 PSMCs 的增殖,还同时促进 PSMCs 的凋亡来抑制其低氧条件下的过度增殖,对抑制慢性阻塞性肺疾病等低氧状态下的肺血管重塑具有重要意义。

综上所述,曲格列酮以剂量依赖性方式通过 PPAR γ 途径增加 PTEN 的表达,促进低氧条件下 PSMCs 的凋亡。临床上对于长期处于低氧状态的人群如慢性阻塞性肺疾病患者,应用 PPAR γ 激动剂可能通过抑制 PSMCs 的过度增殖显著改善肺血管重塑状况,预防或延缓肺动脉高压、肺源性心脏病的发生,显著改善慢性阻塞性肺疾病等低氧状态患者的预后。而针对已发生低氧性肺动脉高压的患者,PPAR γ 激动剂如曲格列酮可能同样能显著改善其病情,预防其进一步发展。本研究为体外试验研究,证实了 PPAR γ 作为低氧性肺动脉高压的一个重要治疗靶点^[14-16],可能通过多种机制发挥作用。但目前仍需进一步在体内试验及大规模临床试验来进一步明确 PPAR γ 激动剂在低氧状态人群及肺动脉高压患者中的作用特点及临床疗效。

参考文献:

- [1] 丁兴,孙莉,王蓓.低氧性肺动脉高压发病机制研究进展[J].临床肺科杂志,2017,22(7):1318-1319.
- [2] KIM KY,CHO HS,JUNG WH,et al. Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 suppression is an important process in peroxisome proliferator-activated receptor- γ signaling in adipocytes and myotubes[J]. Mol Pharmacol, 2007, 71(6): 1554-1562.
- [3] YOUSEFI B,AZIMI A,MAJIDINIA M,et al. Balaglitazone reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance via up-regulation of PTEN in a PPAR γ -dependent manner in leukemia cells[J]. Tumour Biol, 2017, 39(10): 1010428317716501.
- [4] LI Y,ZHANG DW,LIN DQ,et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ inhibits pancreatic cancer cell invasion and metastasis via regulating MMP-2 expression through PTEN[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(4): 6255-6260.
- [5] MATSUDA Y,HOSHIKAWA Y,AMESHIMA S,et al. Effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats[J]. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi, 2005, 43(5): 283-288.
- [6] HANSMANN G,VINICIO A,PEREZ J,et al. An antiproliferative BMP-2/PPAR γ /apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension[J]. J Clin Invest, 2008, 118(5): 1846-1857.
- [7] NEMENOFF RA,SIMPSON PA,FURGESON SB,et al. Targeted deletion of PTEN in smooth muscle cells results in vascular remodeling and recruitment of progenitor cells through induction of stromal cell-derived factor-1 α [J]. Circ Res, 2008, 102(9): 1036-1045.
- [8] 易斌,钱桂生,白莉,等.低氧致大鼠肺动脉平滑肌细胞中 PTEN/Akt1 表达的变化与细胞增殖的关系[J]. 中华呼吸和结核杂志, 2008, 31(8): 586-590.
- [9] LEE YR,YU HN,NOH EM,et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor synergistically up-regulate the tumor suppressor PTEN in human promyeloid leukemia cells[J]. Int J Hematol, 2007, 85(3): 231-237.
- [10] ZHANG W,WU N,LI Z,et al. PPARgamma activator rosiglitazone inhibits cell migration via upregulation of PTEN in human hepatocarcinoma cell line BEL-7404[J]. Cancer Biol Ther, 2006, 5(8): 1008-1014.
- [11] TERESI RE,SHAIU CW,CHEN CS,et al. Increased PTEN expression due to transcriptional activation of PPARgamma by Lovastatin and Rosiglitazone[J]. Int J Cancer, 2006, 118(10): 2390-2398.
- [12] LEE SY,HUR GY,JUNG KH,et al. PPAR- γ agonist increase gefitinib's antitumor activity through PTEN expression[J]. Lung Cancer, 2006, 51(3): 297-301.
- [13] PI WF,GUO XJ,XU WG,et al. BMP-2 Up-Regulates PTEN Expression and Induces Apoptosis of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells under Hypoxia[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e35283.
- [14] GREEN DE,SUTLIFF RL,HART CM. Is peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppargamma) a therapeutic target for the treatment of pulmonary hypertension[J]. Pulm Circ, 2011, 1(1): 33-47.
- [15] RABINOVITCH M. PPARgamma and the pathobiology of pulmonary arterial hypertension[J]. Adv Exp Med Biol, 2010, 661(21): 447-458.
- [16] IDRIS-KHODJA N,OUERD S,TRINDADE,et al. Vascular smooth muscle cell peroxisome proliferator-activated receptor γ protects against endothelin-1-induced oxidative stress and inflammation[J]. J Hypertens, 2017, 35(7): 1390-1401.

(收稿日期:2018-07-27)