

• 基础研究 •

尼可地尔对 TGF- β 1 诱导人气道平滑肌细胞肥大的实验研究

福建省立医院呼吸与危重症医学科 (福州 350001) 林昌建

【摘要】目的 研究 ATP 敏感性钾通道 (KATP) 开放剂对人气道平滑肌细胞 (HASMCs) 肥大的影响及其可能的作用机制。**方法** 用 TGF- β 1 诱导 HASMCs 肥大, ATP 敏感性钾通道开放剂尼可地尔 (Nico) 进行干预, 将实验分成 Control 组、TGF- β 1 组、TGF- β 1 + Nico 组、Nico 组。显微镜下及免疫荧光法观察细胞形态变化及 α -SMA 表达情况; Western Blot 法测定细胞 α -SMA 蛋白表达和 CaMK II、CREB 磷酸化情况。**结果** 免疫荧光实验表明 TGF- β 1 能浓度依赖性地促进细胞肥大和 α -SMA 表达, Nico 能下调 α -SMA 的表达, 减轻细胞肥大; Western blot 实验表明 TGF- β 1 能升高 α -SMA 表达和 CaMK II、CREB 磷酸化水平, Nico 能抑制 α -SMA 的表达, 降低 CaMK II、CREB 磷酸化水平。**结论** Nico 能减轻 TGF- β 1 诱导的 HASMCs 肥大, 可能与抑制 CaMK II / CREB 信号通路传导有关。

【关键词】 KATP; TGF- β 1; 气道平滑肌细胞; 肥大; α -SMA; CaMK II

【中图分类号】 R562.2⁺5 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2019)01-0109-04

Effects of Nicorandil on TGF- β 1-induced human airway smooth muscle cells hypertrophy LIN Changjian.

Department of Pulmonary and Critical Care Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of the ATP sensitive potassium (K_{ATP}) channel openers on human airway smooth muscle cells (HASMCs) hypertrophy and the mechanism underlying. **Methods** The hypertrophy of HASMCs was induced by exposing to TGF- β 1 in vitro. With the intervention of K_{ATP} channel opener (Nicorandil), the experiment was divided into four groups: control group, TGF- β 1 group, TGF- β 1 + Nico group and Nico group. The cellular morphological changes and the expression of α -SMA were observed by the microscope and immunofluorescence, the protein expression of α -SMA and phosphorylation of CaMK II, CREB were detected by Western blot. **Results** Nicorandil could suppress TGF- β 1-induced HASMCs hypertrophy by reducing the expression of α -SMA and phosphorylation of CaMK II, CREB. **Conclusion** Nicorandil can inhibit TGF- β 1-induced HASMCs hypertrophy by reducing the phosphorylation of CaMK II / CREB signaling pathways.

【Key words】 K_{ATP} ; TGF- β 1; ASMCs; hypertrophy; α -SMA; CaMK II

转化生长因子- β 1 (TGF- β 1) 是哮喘患者气道重塑的重要细胞因子, 可引起细胞外基质增加及气道平滑肌细胞 (ASMCs) 的肥大。TGF- β 1 引起 ASMCs 的肥大与细胞表型的转换有关, TGF- β 1 可使 ASMCs 向收缩型转换, 引起肥大收缩型标志蛋白表达上调, 这些蛋白包括: α -平滑肌激动蛋白 (α -SMA)、平滑肌重链肌球蛋白 (smMHC)、平滑肌蛋白 22 (SM22)、钙调蛋白 (Calponin) 等, 收缩型 ASMCs 对收缩激动剂的反应也将更敏感^[1]。有研究显示, ATP 敏感性钾通道 (KATP 通道) 开放剂尼可地尔对哮喘气道重塑可以产生有益的作用^[2]。TGF- β 1 和 KATP 通道开放剂是否存在相互作用的关系值得探讨。本研究采用 TGF- β 1 体外诱导 HASMCs 肥大, 探索 KATP 通道开放剂能否抑制 TGF- β 1 诱导的 HASMCs 肥大及其机制, 为探讨临床治疗哮喘的新方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料: 人源性 TGF- β 1, 购自美国 R&D 公司; 尼可地尔, 购自美国 Sigma 公司; 平滑肌细胞培养基, 购自美国 ScienCell 公司; 胎牛血清, 购自美国 ScienCell 公司; α -SMA 兔抗人多克隆抗体, 购自英国 abcam 公司; p-CaMK II、CaMK II 兔抗人多克隆抗体, 购自美国 Santa Cruz 公司; p-CREB、CREB 兔抗人多克隆抗体, 购自美国 Cell signaling 公司。

1.2 方法:

1.2.1 细胞培养: HASMCs 购自美国 ScienCell 公司, 用含有 100 U/mL 青霉素、100 μ g/链霉素、稀释 100 倍的平滑肌细胞生长因子和 2% 胎牛血清 (FBS) 的平滑肌细胞培养基 (SMCM) 常规传代培养。将细胞置于 37 $^{\circ}$ C, 含 5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。隔 2 d 换液, 2~4 d 传代 1 次, 所

有实验均选取 6~10 代细胞, 药物或细胞因子作用阶段均采用无血清的空白培养基。

1.2.2 TGF- β 1 诱导 HASMCs 肥大: 分别以 TGF- β 1 不同浓度 (0.1、1、10 ng/mL) 作用于 HASMCs, 72 h 后显微镜下及免疫荧光法观察细胞形态及 α -SMA 表达情况, 并选择有显著诱导效应的 TGF- β 1 适宜浓度。

1.2.3 显微镜下及免疫荧光法观察细胞形态及 α -SMA 表达情况: 将实验分成 Control 组、TGF- β 1 组、TGF- β 1+Nico 组、Nico 组。Nico 预保护 1 h 后加 TGF- β 1, 作用 72 h 光镜下观察各组间细胞形态学变化和拍照, 并进行免疫荧光染色和拍照, 观察各组间细胞形态及 α -SMA 表达情况。

1.2.4 Western Blot 法检测 HASMCs 的 α -SMA 表达情况及 CaMK II、CREB 磷酸化水平: 药物作用细胞适宜时间 (α -SMA 为 72 h, CaMK II、CREB 为 12 h) 后提取蛋白, BCA 蛋白浓度测定法测定蛋白浓度, 电泳跑胶, 转膜, 抗体结合, 曝光并读取目标条带灰度值。

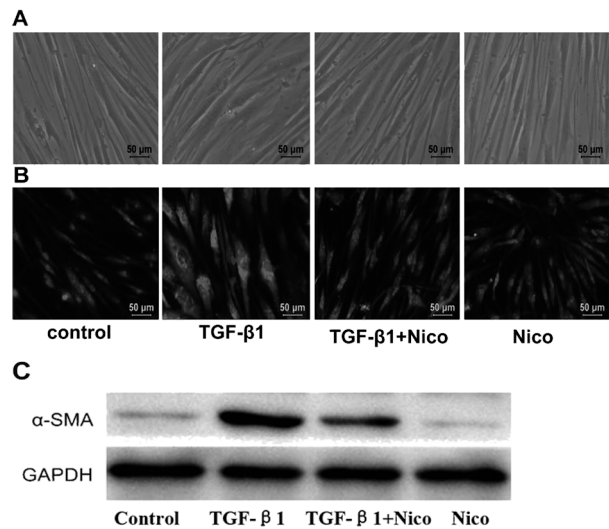
1.3 统计学方法: 图像资料采用 Photoshop 7 软件进行处理。计量资料以均数 \pm 标准差表示, 采用 GraphPad Prism 统计学软件进行图表制作和数据分析, 采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TGF- β 1 诱导 HASMCs 肥大: TGF- β 1 能引起 HASMCs 肥大, 并呈现浓度依赖性特征。TGF- β 1 可诱导 HASMCs 向肥大收缩型细胞转换的效应, 使用肥大收缩型标志性蛋白 α -SMA 进行荧光标记, 发现在 1 ng/mL 的 TGF- β 1 作用 72 h 后可显著促进 HASMCs 细胞肥大和 α -SMA 表达。

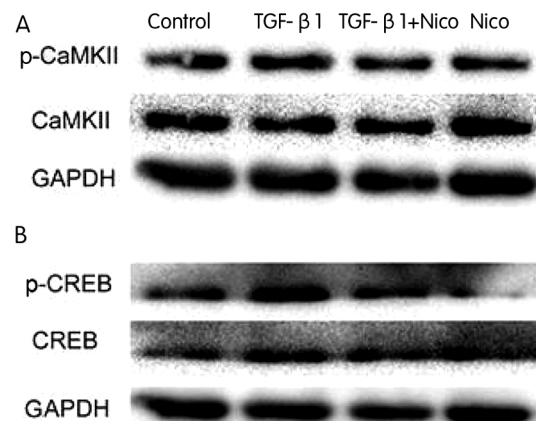
2.2 Nico 对 TGF- β 1 诱导的 HASMCs 肥大的影响: 选取 100 μ m 的 Nico 加入了含有 TGF- β 1 的细胞中, 发现细胞重新变得纤细, α -SMA 荧光信号强度也下降了 (图 1), Western blot 结果显示 α -SMA 表达量下降 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.3 Nico 对 HASMCs 细胞 CaMK II、CREB 磷酸化水平的影响: TGF- β 1 和 Nico 作用 12 h 后, TGF- β 1 组 CaMK II、CREB 磷酸化水平较对照组升高 ($P < 0.05$), TGF- β 1 + Nico 组 CaMK II、CREB 磷酸化水平较 TGF- β 1 组下降 ($P < 0.05$)。



注: A, 普通光学显微镜下表现; B, 荧光显微镜镜下表现; C, Western blot 检测 α -SMA 在各组细胞中的表达。

图 1 Nico 对 TGF- β 1 诱导的 HASMCs 肥大的影响 ($\times 200$)



注: A, CaMK II 蛋白磷酸化水平; B, CREB 蛋白磷酸化水平。

图 2 Nico 对 HASMCs 细胞 CaMK II、CREB 磷酸化水平的影响

表 1 各组表达 α -SMA、p-CaMK II、p-CREB 的 Western blot 蛋白印迹灰度值比 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA	p-CaMK II	p-CREB
Control 组	0.083 17 \pm 0.010 97	0.739 64 \pm 0.082 88	0.678 83 \pm 0.048 98
TGF- β 1 组	0.943 43 \pm 0.039 23 *	1.065 65 \pm 0.050 02 *	1.001 85 \pm 0.079 77 *
TGF- β 1+Nico 组	0.319 83 \pm 0.108 32 #	0.803 99 \pm 0.029 54 #	0.738 33 \pm 0.100 19 #
Nico 组	0.083 87 \pm 0.029 13	0.554 12 \pm 0.022 55	0.633 40 \pm 0.110 17

注: 与 control 组相比, * $P < 0.05$; 与 TGF- β 1 组相比, # $P < 0.05$ 。

3 讨论

支气管哮喘是以气道高反应性、慢性炎症和气

道重塑为主要特征的慢性气道疾病^[3]。气道平滑肌细胞 (ASMCs) 是构成气道壁主要的结构细胞, 在过去的几十年中, 已经有大量研究表明, 异常的 ASMCs 肥大是导致气道重塑的重要原因。因此, 通过抑制 ASMCs 的肥大是缓解气道重塑的一项有效手段。目前能有效缓解气道重塑的药物很少, 故对气道重塑机制的深入探讨, 能为支气管哮喘的治疗和管理提供新的方向和思路。

本研究采用体外 TGF- β 1 诱导 HASMCs 肥大, 结果表明 Nico 能下调 α -SMA 的表达和 CaMK II 的磷酸化水平, 从而抑制 TGF- β 1 诱导的 HASMCs 肥大。上述结果表明 KATP 通道开放剂 Nico 能抑制 TGF- β 1 诱导的 HASMCs 肥大, 且这些效应可能与降低 CaMK II 蛋白磷酸化水平有关。

Nico 是一种 KATP 通道开放剂, KATP 通道是由内向整流钾通道和磺酰脲类受体 (SUR1, SUR2) 家族按照 4:4 比例构成的异源八聚体组成, KATP 通道开放剂主要作用于 SUR2 型 KATP 通道^[4]。气道平滑肌细胞膜上存在 KATP 通道, KATP 通道开放, 引起 K^+ 外流, 使细胞膜电位升高, 导致膜发生超极化, 进而引起 Ca^{2+} 内流减少和平滑肌松弛。 Ca^{2+} 在气道平滑肌的细胞内信号通路中发挥着重要的作用, 包括 ASM 收缩、对激动剂的反应。已经证实 ASM 的 Ca^{2+} 平衡失调是导致哮喘 ASM 表型转换和气道高反应性发生的重要原因^[5]。当 KATP 通道开放, 膜电位转向超极化, 继而引起电压依赖性 Ca^{2+} 通道的关闭, 可导致机体内多种细胞内 Ca^{2+} 浓度降低, 这些细胞包括骨骼肌细胞、内分泌细胞、心肌细胞、神经细胞、血管平滑肌细胞及肾细胞^[6-7]。细胞内 Ca^{2+} 是调节气道平滑肌收缩和 ASM 细胞增殖的关键^[8], 因此通过开放 KATP 通道来抑制 Ca^{2+} 内流继而影响细胞内与 Ca^{2+} 相关的病理过程, 可影响细胞的多种生理过程。已有大量实验显示 KATP 通道开放剂在慢性气道疾病中发挥着重要作用, 如埃他卡林可抑制 PDGF-BB 诱导的人 ASM 细胞增殖和迁移^[9]; 尼可地尔可减轻卵清蛋白诱导的小鼠哮喘模型的气道炎症^[10]。Nico 是起初研究用于治疗高血压的药物。在本研究中, 我们发现 Nico 部分逆转 TGF- β 1 诱导的 HASMCs 肥大, 抑制收缩型 HASMCs 标志蛋白 α -SMA 的表达。这表明 Nico 可能存在缓解慢性气道疾病气道重塑的作用。

TGF- β 1 是具有调节机体多项生物功能的细胞因子, 包括细胞增殖、凋亡、转化等。多项研究发

现, TGF- β 1 能显著地促进 ASMCs 肥大, 引起细胞体积增大、蛋白合成增加、肥大收缩相关蛋白如 α -SMA 表达上调, 使 HASMCs 向收缩型转换, 收缩型 HASMCs 对收缩激动剂更敏感^[1,11]。有学者研究 TGF- β 1 可通过 CaMK II 信号通路促进心肌细胞的肥大^[12], 而 CaMK II 又受到细胞内 Ca^{2+} 、钙调蛋白 (CaM) 的调控, 因此 CaMK II 信号通路是 TGF- β 1 和 KATP 通道开放剂共同作用靶点, 不难发现他们之间应该是相互抑制的关系。通过我们的实验, 也进一步验证了 KATP 通道开放剂可通过抑制 CaMK II 信号通路来减轻 TGF- β 1 诱导的 HASMCs 肥大。环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 (CREB) 是一种核内转录因子, 同时也是 CaMK II 信号通路的下游信号分子^[13], CREB 结合蛋白 (CBP) 可与 CERB 结合, 形成转录复合体, 启动靶基因的表达, 使用 CBP 特异性抑制剂, 可有效抑制 α -SMA 基因的表达^[14]。以上研究显示, 通过影响胞内 Ca^{2+} 浓度来影响 CaMK II / CREB 信号通路, 可能是 Nico 抑制 TGF- β 1 诱导 HASMCs 肥大和下调 α -SMA 表达的机制。

综上所述, 本文研究了 Nico 对 HASMCs 肥大的影响。Nico 通过开放气道平滑肌细胞膜上 KATP 通道, 使得 K^+ 外流增加, 细胞膜发生超极化, 引起电压门控钙通道的关闭, 使得 Ca^{2+} 内流减少, 从而抑制 HASMCs 的肥大。Nico 的这些效应可能与调节 CaMK II 信号通路相关。因此, KATP 通道开放剂 Nico 有望成为治疗慢性气道疾病、缓解气道重塑的有效药物。

参考文献

- [1] Goldsmith A M, Bentley J K, Zhou L, et al. Transforming growth factor-beta induces airway smooth muscle hypertrophy [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 34 (2): 247-254.
- [2] Wan X, Zhao J, Xie J. Effects of mitochondrial ATP-sensitive K^+ channel on protein kinase C pathway and airway smooth muscle cell proliferation in asthma [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2012, 32 (4): 480-484.
- [3] Heinz F, Christina W, Michael W. Airway remodeling in asthma: what really matters [J]. Cell Tissue Res, 2017, 367 (3): 551-569.
- [4] 朱斌, 赵金宪, 叶铁虎. ATP 敏感性钾通道的阻断剂与开放剂研究进展 [J]. 中国临床药理学杂志, 2005, 2 (1): 70-73.
- [5] Amy M S, Yongfeng L, Li-Yan S, et al. Smooth Muscle CaMKII δ Promotes Allergen Induced Airway Hyperresponsiveness and Inflammation [J]. Pflugers Arch, 2015, 467 (12): 2541-2554.

- [6] Jaggar J H, Porter V A, Lederer W J, et al. Calcium sparks in smooth muscle [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278 (2): C235-256.
- [7] Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, et al. ATP-sensitive K⁺ channels in pancreatic, cardiac and vascular smooth cells [J]. Am J Physiol, 1998, 274 (1 Pt1): C25-37.
- [8] Jorge R, Edgar F, Abril C, et al. Maintenance of intracellular Ca²⁺ basal concentration in airway smooth muscle [J]. Int J Mol Med, 2018, 42 (6): 2998-3008.
- [9] Liu W, Kong H, Zeng X, et al. Iptakalim inhibits PDGF-BB-induced human airway smooth muscle cells proliferation and migration [J]. Exp Cell Res, 2015, 336 (2): 204-210.
- [10] El-Kashef D H. Nicorandil alleviates ovalbumin-induced airway inflammation in a mouse model of asthma [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2018, 59: 132-137.
- [11] Christie A, Ojiaku E, Yoo P. Transforming growth factor β 1 function in airway remodeling and hyperresponsiveness [J]. The Missing Link Am J Respir Cell Mol Biol, 2017, 56 (4): 432-442.
- [12] 石永英, 陈广原, 刘世明, 等. TGF- β 1 诱导大鼠心肌细胞肥大中钙调素依赖蛋白激酶 II 信号途径研究 [J]. 广州医学院学报, 2011 (3): 21-25.
- [13] Huan M, Rachel D, Groth S, et al. γ CaMKII shuttles Ca²⁺ / CaM to the nucleus to trigger CREB phosphorylation and gene expression [J]. Cell, 2014, 159 (2): 281-294.
- [14] Zhou B, Liu Y, Kahn M, et al. Interactions between β -catenin and transforming growth factor- β signaling pathways mediate epithelial-mesenchymal transition and are dependent on the transcriptional co-activator cAMP-response element-binding protein (CREB) -binding protein (CBP) [J]. J Biol Chem, 2012, 287 (10): 7026-7038.