

丙磺舒对血小板衍生生长因子-BB 诱发大鼠肺动脉平滑肌细胞迁移和增殖的干预作用*

尼嘎拉·艾克热木^{1,2}, 高瑞娟^{1,3}, 唐雪纯⁴, 孔良靖元^{1,2}, 高逸璇^{1,2}, 袁佳月^{1,2}, 马克涛^{1,2},
李 丽^{1,5}, 司军强^{1,2,6△}

(1. 石河子大学医学院新疆地方与民族高发病教育部重点实验室, 新疆 石河子 832002; 2. 石河子大学医学院生理学教研室, 新疆 石河子 832002; 3. 石河子大学第一附属医院放射科, 新疆 石河子 832002; 4. 石河子大学第一附属医院烧伤整形外科, 新疆 石河子 832002; 5. 嘉兴学院医学院生理学教研室, 浙江 嘉兴 314000; 6. 华中科技大学同济医学院基础医学教研室, 湖北 武汉 430030)

【摘要】 目的: 研究丙磺舒(PROB)对血小板衍生生长因子-BB(PDGF-BB)诱发大鼠肺动脉平滑肌细胞的迁移与增殖的影响。**方法:** 体外原代培养SD大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs), 随机分为正常对照组(CON组)、造模组(10 ng/ml PDGF-BB 24 h)、丙磺舒处理组(10 ng/ml PDGF-BB 和 200 μmol/L PROB 孵育 24 h, PROB 为 Pannexin-1 的特异性阻断剂)。通过 CCK-8 法选取丙磺舒和 PDGF-BB 干预浓度, 并检测各组细胞的增殖能力; 通过细胞划痕实验和 Transwell™ 实验检测各组 PASMCs 的迁移能力; 通过细胞免疫荧光技术检测各组 PASMCs 中骨桥蛋白(OPN)和增殖细胞核抗原(PCNA)的分布和表达; 通过 Western blot 法检测各组 PASMCs 中 OPN 和 PCNA 的蛋白水平差异。**结果:** 与 CON 组相比, PDGF-BB 组的 PASMCs 迁移和增殖能力均有所增强 ($P < 0.05$), 经 PROB 干预后, 细胞迁移和增殖能力降低 ($P < 0.05$); 与 CON 组相比, PDGF-BB 组 OPN 和 PCNA 的表达和蛋白水平均显著升高 ($P < 0.05$), 经 PROB 干预后, 其表达和蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)。**结论:** 丙磺舒通过阻断 Pannexin-1 可以抑制 PDGF-BB 诱发 PASMCs 的增殖和迁移。

【关键词】 丙磺舒; Pannexin-1; 大鼠肺动脉平滑肌细胞; 细胞迁移; 细胞增殖

【中图分类号】 R543.2, R965

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834(2024)01-159-007

【DOI】 10.12047/j.cjap.6326.2022.101

Effects of probenecid on the migration and proliferation ability of platelet derived growth factor-BB induced pulmonary artery smooth muscle cells in rats

NIGALA Aikeremu^{1,2}, GAO Rui-juan^{1,3}, TANG Xue-chun⁴, KONG Liang-jing-yuan^{1,2}, GAO Yi-xuan^{1,2},
YUAN Jia-yue^{1,2}, MA ke-tao^{1,2}, LI Li^{1,5}, SI Jun-qiang^{1,2,6△}

(1. The Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi University Medical College, Shihezi 832002; 2. Department of Physiology, Shihezi University Medical College, Shihezi 832002; 3. Department of Radiology, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832002; 4. Department of Burn and Plastic Surgery, the First Affiliated Hospital of Shihezi University, Shihezi 832002; 5. Department of Physiology, Jiaying University Medical College, Jiaying 314000; 6. Department of Physiology, Huazhong University of Science and Technology of Basic Medical Sciences, Wuhan 430030, China)

【ABSTRACT】 Objective: To investigate whether probenecid (PROB) could improve the proliferation and migration ability of rats' pulmonary artery smooth muscle cells induced by platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB). **Methods:** Primary pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) of SD rats were cultured *in vitro*, and were randomly divided into control group (CON group), PDGF-BB group (10 ng/ml PDGF-BB treatment for 24 h) and PDGF-BB+PROB group (10 ng/ml PDGF-BB and 200 μmol/L PROB treatment for 24 h, PROB is a specific blocker of pannexin-1). CCK-8 method was used to select the suitable intervention concentrations of PROB and PDGF-BB, and to detect the proliferation of PASMCs in each group. The migration ability of PASMCs was detected by Transwell™ assay and cell scratch test. Immunofluorescence cytochemistry and Western blot were used to detect the protein expressions and distribution of osteopontin (OPN) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in PASMCs. **Results:** Compared with CON group, the migration and proliferation ability of PASMCs in PDGF-BB group were enhanced ($P < 0.05$). After treated with PROB, the migration and proliferation ability of PASMCs in PDGF-BB+PROB group were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with CON group, the expression and protein levels of OPN and PCNA in PDGF-BB group were increased significantly ($P < 0.05$), while the expression and protein levels of OPN and PCNA in PDGF-BB+PROB were decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Probenecid inhibits the migration and proliferation of PDGF-BB-induced PASMCs by blocking Pannexin-1.

【KEY WORDS】 probenecid; pannexin-1; PASMCs; migration; proliferation

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是一种以进行性肺动脉压力升高、肺血管重构为特征, 最终导致右心衰和死亡的疾病^[1]。PAH 的病理特征包括血管收缩性增加、肺血管壁重构和血栓形成。其中, 肺小动脉重构和持续的肺血管收缩是该疾病的两个关键事件, 而且都与肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs) 密切相关^[2]。事实上, PASMCs 的异常增殖和迁移被认为是血管重构这个进程中的重要病理机制^[3]。因此, 减弱肺动脉平滑肌细胞的异常增殖与迁移是预防血管重构和防治肺动脉高压的关键步骤。

Pannexin 通道是一种跨膜蛋白质, 通过释放离子和小分子促进细胞间通讯^[4]。Pannexin-1 作为 Pannexin 家族成员之一, 广泛表达于人体各个组织器官, 越来越多的研究证明, Pannexin-1 在多种疾病发生与发展过程中发挥重要作用, 如参与 Ca^{2+} 离子传递的调控、细胞迁移、细胞凋亡、炎症反应、肿瘤等相关疾病^[5]。而且, Pannexin-1 表达于肺循环和体循环的动脉血管网络中, 值得注意的是, 在小动脉中 Pannexin-1 则主要分布在平滑肌细胞, 对血管功能具有调节作用, 因此已经成为人们关注的焦点^[6,7]。

丙磺舒 (Probenecid, PROB) 是临床上治疗痛风的药物, 能抑制有机阴离子转运蛋白, 是 Pannexin-1 通道的特异性阻断剂^[8]。研究表明, Pannexin-1 表达的增加可能与一些疾病的发生发展密切相关^[9], 在多种肿瘤细胞中 Pannexin-1 蛋白表达量明显升高, 阻断 Pannexin-1 通道的激活可抑制肿瘤细胞的侵袭迁移^[10]。Pannexin-1 介导的 ATP 释放最近被确定为全身动脉血管张力的重要调节器^[11,12]。总之, Pannexin-1 通道在细胞增殖迁移和血管调节中起到重要调控作用, 但是否可影响 PASMCs 增殖和迁移能力, 进而对肺小动脉重构和肺动脉高压产生影响, 以及作用机制尚不清楚, 尚待进一步研究。

因此, 本研究将以血小板衍生生长因子-BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 诱导的 PASMCs 为研究对象, 旨在细胞水平上研究丙磺舒是否能通过抑制 Pannexin-1 通道影响 PASMCs 增殖和迁移, 为缓解肺血管重构、探寻预防和治疗肺动脉高压新靶点提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选取 SD 大鼠 (8 周, 雄性), 动物标准为 SPF 级。动物饲养温度与湿度适宜, 在光照充足环境内保持自由饮水和进食。丙磺舒由 Apexbio 公司生产; DMEM 培养基、青霉素、链霉素 (Gibco 公司); 平滑肌细胞培养基 (smooth muscle cell medium, SMCM; Sciencell 公司); Western blot 相关试剂: 兔抗 OPN (ab8448) 和兔抗 GAPDH (ab9485) 的抗体 (Abcam 公司)、鼠抗 PCNA 的抗体 (BM1040 Boster 公司) 牛血清蛋白、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 与山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司)、发光试剂 (Thermo 公司); 细胞免疫荧光相关试剂: 兔抗 α 平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体 (ab5694) 购自 Abcam 公司; 异硫氰酸荧光素 (Fluorescein isothiocyanate, FITC) 标记的山羊抗兔与抗鼠 IgG (Sigma 公司); 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)、Triton X-100 (索莱宝公司); 24 孔的 Transwell™ 小室 (8.0 μ m, Corning 公司); CCK-8 试剂盒 (MCE 公司); D-Hanks 液、多聚甲醛、结晶紫染液 (博士德生物工程有限公司)。

1.2 PASMCs 的原代培养及鉴定

选取体质量为 180 ~ 200 g SD 大鼠进行腹腔注射麻醉 (10 g/L 戊巴比妥钠, 60 mg/kg)。在无菌条件下, 充分暴露心脏和双肺组织, 迅速取出心肺组织。无菌操作分离出肺动脉, 将其浸泡在含有双抗 (100 IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素) 的 D-Hanks 液中。解剖显微镜下, 剥除肺动脉外侧的结缔组织及纤维脂肪组织, 纵向剪开血管, 去除血管组织外膜和内膜, 将剩余组织剪成糊状; 将组织块转移到含有 1 ml 消化酶 (5 mg 胰蛋白酶溶于 1 ml D-Hanks 液 + 4 ml 胶原酶) 的 15 ml 离心管后, 37°C 消化 7 min; 吸弃消化酶, 加入 1 ml 含 20% 胎牛血清 (FBS)、1% 青霉素和链霉素、1% 平滑肌生长因子 (smooth muscle cell growth supplement, SMCGS) 的 SMCM 培养基; 离心 (1 000 r/min, 5 min) 后, 弃上清; 加入 1 ml 培养基重悬后, 将组织移入培养皿中, 将培养皿倒置放于培养箱中 (37°C, 5% CO_2) 静置。2 h 后, 加入 1 ml 培养基, 继续放入 37°C、5% CO_2 培养箱中; 培养 3 d 后, 组织周围可见细胞爬出, 7 d 左右细胞呈“峰-谷”结构。通过显微镜观察及细胞免疫荧光法对 PASMCs 进行鉴定^[13]。

*【基金项目】国家自然科学基金 (81560081); 兵团财政科技计划项目 (2020AB019)

【收稿日期】2022-06-14 【修回日期】2022-09-15

△【通讯作者】Tel: 13999537888; E-mail: sijunqiang@shzu.edu.cn

1.3 CCK-8 法检测 PSMCs 的增殖能力及药物干预浓度的确定

原代培养 PSMCs 至第 3 代后,将 PSMCs 接种于 96 孔板中,调整密度为 5×10^3 cells/well。使用基础培养基对已贴壁的 PSMCs 进行饥饿处理。24 h 后,加入浓度分别为 2.5、5、10、20、40、80 ng/ml 的 PDGF-BB 继续培养,并设置只有基础培养基的空白对照。24 h 后,加入 100 μ l 提前稀释好的 CCK-8 液(DMEM : CCK-8 原液 = 9 : 1),37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。最后测定在 450 nm 处的吸光度(OD 值)。根据上述方法确定的 PDGF-BB 干预浓度进行后续细胞实验。

原代培养 PSMCs 至第 3 代后,将对数生长期的 PSMCs 接种于 96 孔板中,调整密度为 5×10^3 cells/well。等细胞贴壁后,用 10 ng/ml PDGF-BB 进行预处理,再加入不同浓度(50、100、200、400、800) μ mol/L 的丙磺舒培养 24 h。药物干预结束后,每孔加入 100 μ l 以 DMEM : CCK-8 原液 = 9 : 1 比例提前稀释好的 CCK-8 稀释液。避光孵育后立即检测 OD 值(450 nm 处)。根据下述公式计算不同浓度丙磺舒干预后的细胞抑制率:细胞抑制率 = [(对照孔-实验孔)/(对照孔-空白孔)] $\times 100\%$

实验分组:对数生长期的 PSMCs 分为对照组(CON,不做处理,正常对照组)、造模组(PDGF-BB 组,10 ng/ml PDGF-BB 处理 24 h)、丙磺舒处理组(PDGF-BB + PROB 组,10 ng/ml PDGF-BB + 200 μ mol/L PROB 孵育 24 h)。

1.4 划痕实验检测 PSMCs 的迁移能力

将第 3 代之后的 PSMCs 细胞接种于 6 孔板内,6 孔板等间距画 5 条横线作为参考标记,细胞密度达到 80% 以上时,选取 1 ml 吸头,垂直参照横线划痕。PBS(无菌)洗涤 2~3 次,每组加入 1 ml DMEM/H 基础培养基。CON 组为空白组,PDGF-BB 组加入浓度为 10 ng/ml 的 PDGF-BB,而 PDGF-BB + PROB 组先后加入 10 ng/ml PDGF-BB 和 200 μ mol/L PROB。显微镜(Olympus)下观察记录细胞 0 h 至 24 h 的起始划痕愈合情况,根据公式:细胞划痕愈合率(%) = [(0 h 划痕平均面积-24 h 划痕平均面积)/0 h 划痕平均面积] $\times 100\%$,计算细胞愈合率对 PSMCs 的迁移能力进行评价。

1.5 Transwell™ 小室检测 PSMCs 迁移能力

将密度为 10^5 cells/ml 的 PSMCs 细胞(第 3 代之后的)加入基础培养基中充分混匀。Transwell™ 小室依次放置于 24 孔板,每个上室加入 PSMCs 细胞悬液(600 μ l),而下室内缓慢加入含 10% FBS 的

SMCM(600 μ l)。培养 24 h(37 $^{\circ}$ C、5% CO_2),PDGF-BB 组加入 10 ng/ml 的 PDGF-BB,PDGF-BB + PROB 组加入 10 ng/ml PDGF-BB 和 200 μ mol/L PROB。药物干预后,吸弃小室内的旧培养基,并用 PBS 浸洗。晾干后加入 600 μ l 的 4% 多聚甲醛,固定 15 min 后 PBS 浸洗晾干。结晶紫染液对 PSMCs 进行染色处理,将小室浸洗至 PBS 溶液呈无色。棉签擦拭上室细胞后,显微镜对迁移的 PSMCs 进行观察和记录(随机选取 5 个视野),通过迁移细胞的数量对 PSMCs 的迁移能力进行评估。

1.6 免疫荧光法测定 PSMCs 中的 OPN、PCNA 的表达和定位

爬片培养 PSMCs(第 3 代以后的),等细胞贴壁后,不同药物进行干预(分组和处理同上)。干预 24 h 后用预温 37 $^{\circ}$ C 的 PBS 清洗,随后依次进行 4% 多聚甲醛固定(15 min)、0.2% 的 Triton X-100 透化(3 min)、PBS 清洗、0.5% 的牛血清白蛋白封闭(30 min)的操作;封闭结束后,加入 OPN 抗体(1 : 200)或抗 PCNA 抗体(1 : 200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;PBS 洗去未结合一抗(3 次,每次 3 min);避光条件下,根据目的蛋白分别加入以 1 : 100 稀释的荧光二抗(FITC 标记的山羊抗兔或抗鼠 IgG),37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 2 h;PBS 清洗 3 次洗去未结合二抗后 DAPI(1 : 1 000)染核 20 min;封片并在荧光显微镜下观察并拍照,分析用 Image J 软件^[14]。

1.7 Western blot 检测 PSMCs 中 OPN 与 PCNA 蛋白的表达

PSMCs(第 3 代以后)接种于 6 孔板中,继续培养于恒温培养箱内。待细胞贴壁并且密度适宜后,根据分组对 PSMCs 进行药物干预。24 h 后用 PBS 清洗 PSMCs 3 次,随后滴加细胞裂解液(PMSF : RIPA = 1 : 100)进行裂解(冰上 30 min)。刮落细胞后移入 EP 管(1.5 ml)中,离心 15 min(12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C)。测定蛋白样本的浓度并配平(BCA 法),并且 100 $^{\circ}$ C 下变性 10 min。聚丙烯酰胺凝胶电泳法电泳,并将测定浓度并配平的蛋白电转到 0.45 μ m 的 PVDF 膜,在封闭液(5% 的脱脂奶粉)内浸泡电转好的 PVDF 膜 2 h。加入 1 : 1000 比例稀释的抗 OPN、抗 PCNA 和抗 GAPDH 的抗体,4 $^{\circ}$ C 冰箱内孵育(过夜);一抗孵育后用 1 \times TBST 洗去未结合的抗体(5 次,每次 5 min)后,室温在 1 : 10 000 比例稀释的二抗溶液中孵育 1.5 h;洗去未结合二抗(5 次,每次 5 min)后进行曝光^[15],采用 Image J 软件分析目的蛋白与内参蛋白条带的灰度值。

1.8 统计学处理

分析作图使用 Graphpad Prism9.0 软件,实验数据的统计学分析使用了 SPSS 21.0。各实验均重复 3 次以上,并采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,one-way ANOVA 用于多组间比较,而两组数据比较采用 q 检验。

2 结果

2.1 大鼠 PSMCs 的原代培养及鉴定

显微镜下可见,有细胞从肺动脉组织块边缘爬出(图 1A),在原代提取的第 7 日左右,呈现"峰-谷"结构(图 1B)。传代至第 3 代,培养的细胞形态呈梭形,并且细胞的胞体透明,生长状态良好(图 1C)。采用平滑肌标志性蛋白 α -SMA 细胞免疫荧光化学染色法,对第 3 代 PSMCs 进行染色的结果发明,胞质 α -SMA 表达丰富,可以鉴定原代提取后爬出的细胞为 PSMCs(图 1D)。

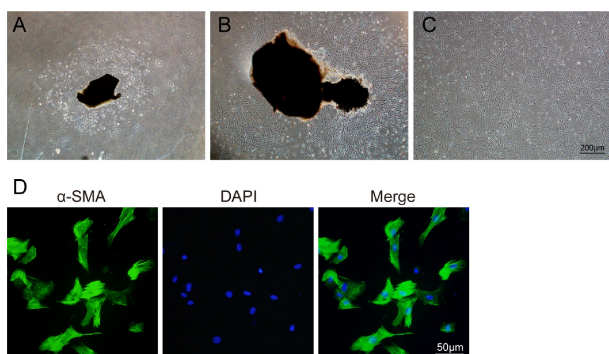


Fig. 1 Primary culture and identification of PSMCs

A: On the 5th day, cell clusters appeared around the cultured tissue ($\times 40$); B: On the 8th-9th day, "peak" and "Valley" appeared; C: The third generation of primary cultured PSMCs ($\times 40$); D: Expression of α -SMA in primary cultured cells ($\times 200$)

2.2 丙磺舒对 PSMCs 增殖的影响

CCK-8 法检测结果表明,与未添加 PDGF-BB 相比,PDGF-BB 处理 PSMCs 组,细胞增殖数量增加,并且在 PDGF-BB 浓度为 10 ng/ml 时,细胞增殖率显著增加($P < 0.05$,表 1)。因此,在后续实验中,将该浓度设为 PDGF-BB 诱发 PSMCs 增殖的浓度。在 10 ng/ml PDGF-BB 诱发细胞增殖的基础上加入不同浓度丙磺舒后,各组 450 nm 处的 OD 值均下降,细胞抑制率增加(表 2),这表明了 PROB 对 PDGF-BB 诱发的 PSMCs 增殖起到一定抑制作用,并且丙磺舒的浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,对 PSMCs 增殖的抑制率显著增加($P < 0.05$);因此,在后续实验中,将该浓度选为丙磺舒的干预浓度。

Tab. 1 OD value and cell proliferation rate of PSMCs treated

with different concentrations of PDGF-BB ($\bar{x}\pm s$, $n = 12$)

PDGF-BB (ng/ml)	OD value	Cell proliferation rate
0	1.03±0.08	0
2.5	1.19±0.17*	0.18±0.15
5	1.17±0.12**	0.17±0.12
10	1.31±0.18**	0.32±0.15 [#]
20	1.18±0.15**	0.17±0.14
40	1.17±0.25	0.15±0.22
80	1.09±0.12	0.07±0.09 [#]

PDGF-BB: Platelet-derived growth factor-BB; PSMCs:

Primary pulmonary artery smooth muscle cells

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0; [#] $P < 0.05$ vs 2.5

Tab. 2 OD value and cell proliferation rate of PSMCs treated with different concentrations of PROB ($\bar{x}\pm s$, $n = 10$)

PROB ($\mu\text{mol/L}$)	OD value	Cell inhibition rate
0	0.93±0.09	0
50	0.85±0.09	0.18±0.16
100	0.78±0.11**	0.35±0.30
200	0.71±0.13**	0.52±0.43 [#]
400	0.71±0.14**	0.53±0.42 [#]
800	0.71±0.15**	0.53±0.44 [#]

** $P < 0.01$ vs 0; [#] $P < 0.05$ vs 50

2.3 丙磺舒对 PSMCs 迁移的影响

细胞划痕、Transwell™ 实验结果表明,与 CON 组相比,PDGF-BB 组的 PSMC 划痕愈合率显著增加($P < 0.01$,图 2A,表 3),Transwell™ 小室下方迁移细胞数显著增多($P < 0.05$,图 2B,表 3)。与 PDGF-BB 组比较,PDGF-BB+PROB 组细胞划痕愈合率显著降低,小室下方迁移细胞数显著减少($P < 0.05$,表 3)。

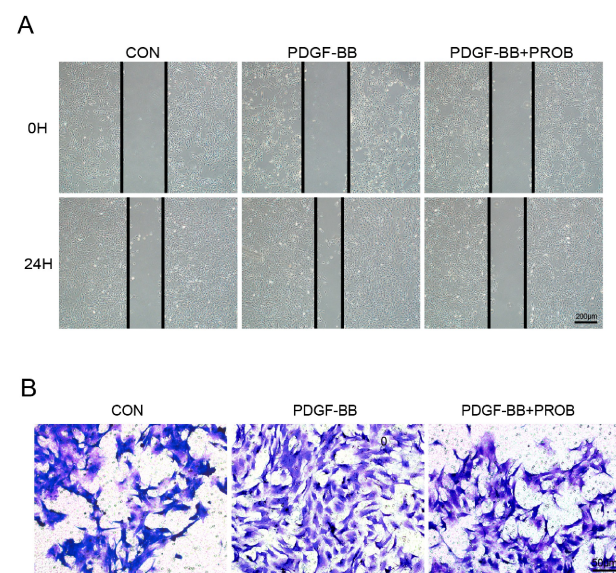


Fig. 2 Cell scratch and Transwell™ test were used to detect the proliferation and migration ability of PSMCs

A: Cell scratch ($\times 100$); B: Transwell™ test ($\times 400$)

Tab. 3 Semi quantitative analysis of cell wound healing and migration quantity ($\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

Group	Wound healing rate (%)	Cell migration number
CON	27.38±0.02	175.00±19.80
PDGF-BB	51.92±0.04**	289.00±52.36*
PDGF-BB+PROB	33.55±0.06#	176.00±29.01#

PROB: Probenecid

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CON; # $P < 0.05$ vs PDGF-BB

2.4 丙磺舒对 PSMCs 中 OPN 和 PCNA 表达的影响

细胞免疫荧光化学染色结果提示, OPN 在 PSMCs 的细胞质、细胞核均有表达, 而 PCNA 主要表达于 PSMCs 的胞核中。与 CON 组相比, PDGF-BB 组 OPN、PCNA 表达水平显著增加 ($P < 0.05$, 图 3); 而与 PDGF-BB 组相比, PDGF-BB + PROB 组 OPN、PCNA 表达显著减少 ($P < 0.05$, 表 4)。

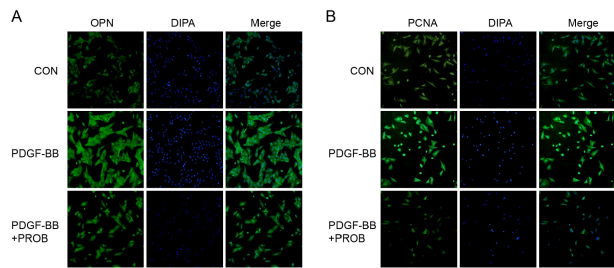


Fig. 3 Immunofluorescencecytochemical of OPN and PCNA
A: Expression and distribution of OPN in PSMCs ($\times 400$); B: Expression and distribution of PCNA in PSMCs ($\times 400$)

Tab. 4 Semi quantitative analysis of OPN and PCNA fluorescence intensity in PSMCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Group	OPN	PCNA
CON	0.58±0.30	0.68±0.27
PDGF-BB	1.79±0.96*	1.63±0.79
PDGF-BB+PROB	0.54±0.36#	0.59±0.35#

OPN: Osteopontin; PCNA: Proliferating cell nuclear antigen

* $P < 0.05$ vs CON; # $P < 0.05$ vs PDGF-BB

2.5 丙磺舒对 PSMCs 中 OPN、PCNA 蛋白含量的影响

通过 Western blot 法进一步检测结果表明, 与 CON 组相比, PDGF-BB 组 PSMCs 的 OPN、PCNA 蛋白表达水平均显著增加 ($P < 0.05$, 图 4); 而与 PDGF-BB 组相比, PDGF-BB+PROB 组的 OPN 和 PCNA 蛋白水平均显著降低 ($P < 0.05$, 表 5), 并且其结果与免疫荧光半定量结果是相一致的。

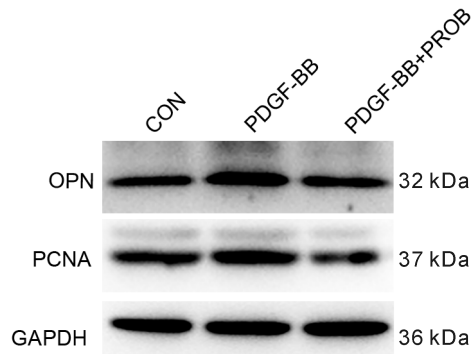


Fig. 4 Protein expressions of OPN and PCNA detected by Western blot

Tab. 5 Semi quantitative analysis of OPN and PCNA protein levels in PSMCs ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Group	OPN	PCNA
CON	1.33±0.30	0.74±0.17
PDGF-BB	2.05±0.41*	1.27±0.38*
PDGF-BB+PROB	1.29±0.43#	0.77±0.21#

* $P < 0.05$ vs CON; # $P < 0.05$ vs PDGF-BB

3 讨论

本研究主要关注与肺血管重构机制密切相关的细胞过度增殖和迁移, 旨在探索丙磺舒对于 PDGF-BB 诱导肺血管平滑肌细胞增殖和迁移的干预作用及其可能机制。肺动脉高压是一种进行性的肺动脉压升高, 最终导致右心衰和死亡的疾病^[1,2]。并且主要作用于肺小动脉, 肺小血管平滑肌细胞的增生、血管收缩性增加在其发病机制中起着重要作用^[3]。改善 PSMCs 的异常增殖、迁移是预防和改善肺血管重构和肺动脉高压的关键环节^[16]。

在血管功能调控中, ATP 作为重要的自分泌/旁分泌信号发挥不同的作用(如: 调节血管舒缩张力、平滑肌细胞增殖和白细胞转移等)^[6]。最近研究发现, Pannexin-1 通道作为调节细胞释放 ATP 的一种重要途径, 既具有高度可调节性, 又与嘌呤能受体的激活相耦合, 与细胞间 Ca^{2+} 运输相关, 而且在心血管系统中普遍有表达, 参与心血管疾病的发生与发展^[17,18]。另外, 有研究表明, 抑制 Pannexin-1 的表达, 可减弱黑色素瘤的生长和迁徙^[19], 可抑制乳腺癌细胞在微血管的侵袭^[20]。然而, Pannexin-1 在心血管系统中的具体影响和作用机制方面都需要更深入的研究, 而且目前鲜有文献报道有关 Pannexin-1 对肺动脉高压中 PSMCs 增殖、迁移功能影响的研究; 丙磺舒是否能通过抑制细胞迁移与增殖来改善肺小血管重构, 进而改善肺动脉高压的问题尚不清楚。为了探讨上述问题, 本研究用 PDGF-BB 诱导原

代培养的SD大鼠PASCs增殖,在细胞水平上模拟肺动脉高压状态,探究抑制Pannexin-1是否对PASCs的增殖和迁移能力产生抑制作用。

在本研究中,使用PDGF-BB诱发PASCs增生和迁移,CCK-8实验、细胞划痕实验和Transwell™实验结果表明,与CON相比,PDGF-BB组PASCs的增殖和迁移能力增加,这表明在细胞水平上的增殖和迁移模型成功复制,即PDGF-BB诱发肺动脉平滑肌细胞的迁移与增殖。然而,在给予PROB阻断Pannexin-1后,PDGF-BB诱导的PASCs的增殖和迁移能力均明显下降。这些结果与之前文献报道的PROB可抑制肿瘤细胞的侵袭迁移能力的结果相一致^[21]。

OPN介导细胞与细胞间、细胞与外基质之间的粘附,参与血管管腔的形成,参与细胞的迁移;研究表明,OPN表达的升高会导致平滑肌细胞在内的多种细胞迁移能力的增加^[22]。PCNA与细胞DNA合成关系密切,是反映细胞增殖状态的重要指标,PCNA表达的增加会促进细胞的增殖^[23]。在本研究中,细胞免疫荧光及Western blot实验结果均表明,与CON相比,PDGF-BB组的OPN和PCNA蛋白表达增加,在给予PROB阻断Pannexin-1后,PDGF-BB诱导的PASCs的OPN和PCNA的蛋白表达水平均出现降低。这些结果提示,当Pannexin-1被PROB阻断后,对PDGF-BB诱导的PASC增殖和迁移能力产生明显的抑制作用,可能会减轻肺小血管重构的程度。

此外,ATP浓度的增加使细胞外信号调节激酶(ERK激酶)及其他一些激酶磷酸化^[11,12],而有文献报道,在多种肿瘤细胞中,抑制Pannexin-1可抑制ERK1/2的磷酸化^[21];而ERK1/2是重要的MAPK家族成员,可调控细胞周期进程、增殖和迁移等多种细胞功能^[24]。并且已被证实与多种血管平滑肌异常的疾病有关,ERK1/2的磷酸化促进肺动脉平滑肌的增殖^[25]。因此,推测PROB对PASCs增殖和迁移的干预作用机制可能与ERK1/2信号通路有关。

综上所述,PROB可能通过阻断Pannexin-1而抑制PDGF-BB诱发的PASCs的增殖和迁移,该研究结果可为研发缓解肺动脉高压疾病进程的措施提供一定的实验资料。

【参考文献】

[1] Montani D, Günther S, Dorfmueller P, et al. Pulmonary arterial hypertension[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2013, 8:

97.

- [2] Hassoun PM. Pulmonary arterial hypertension[J]. *N Engl J Med*, 2021, 385(25): 2361-2376.
- [3] Worssam MD, Jørgensen HF. Mechanisms of vascular smooth muscle cell investment and phenotypic diversification in vascular diseases [J]. *Biochem Soc Trans*, 2021, 49(5): 2101-2111.
- [4] Scemes E, Velišková J. Exciting and not so exciting roles of pannexins[J]. *Neurosci Lett*, 2019, 695(16): 25-31.
- [5] Lohman AW, Billaud M, Straub AC, et al. Expression of pannexin isoforms in the systemic murine arterial network [J]. *J Vasc Res*, 2012, 49(5): 405-416.
- [6] Good ME, Begandt D, DeLalio LJ, et al. Emerging concepts regarding pannexin 1 in the vasculature [J]. *Biochem Soc T*, 2015, 43(3): 495-501.
- [7] Billaud M, Chiu YH, Lohman AW, et al. A molecular signature in the pannexin1 intracellular loop confers channel activation by the $\alpha 1$ adrenoreceptor in smooth muscle cells[J]. *Sci Signal*, 2015, 8(364): ra17.
- [8] 郑翔,叶升,赵伟,等. Pannexin1离子通道的结构与功能研究进展[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2021, 48(10): 1137-1145.
- [9] Crespo YS, Willebrords J, Johnstone SR, et al. Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2017, 1864(1): 51-61.
- [10] Graham SV, Jiang JX, Mesnil M. Connexins and Pannexins: Important players in tumorigenesis, metastasis and potential therapeutics[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(6): 1645-1672.
- [11] Whyte-Fagundes P, Zoidl G. Mechanisms of pannexin1 channel gating and regulation [J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2018, 1860(1): 65-71.
- [12] Young CN, Brutkowski W, Lien CF, et al. P2X7 purinoceptor alterations in dystrophic mdx mouse muscles: relationship to pathology and potential target for treatment [J]. *J Cell Mol Med*, 2012, 16(5): 1026-1037.
- [13] Xiao J, Yang R, Qin X, et al. A role of AMPK and connexin 43 in the suppression of CoCl₂-induced apoptosis of spiral modiolar artery smooth muscle cells by adiponectin [J]. *Life Sci*, 2019, 238: 116876.
- [14] Tian X, Sun C, Wang X, et al. ANO1 regulates cardiac fibrosis via ATI-mediated MAPK pathway [J]. *Cell Calcium*, 2020, 92: 102306.
- [15] Cao N, Tang X, Gao R, et al. Galectin-3 participates in PASC migration and proliferation by interacting with TGF- β 1 [J]. *Life Sci*, 2021, 274: 119347.

(下转第170页)

- [11] Ok E, Basnakian AG, Apostolov EO, *et al.* Carbamylated low-density lipoprotein induces death of endothelial cells: a link to atherosclerosis in patients with kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2005, 68 (1): 173-178.
- [12] Kraus LM, Garber L, Handorf CR, *et al.* Carbamoylation of glomerular and tubular proteins in patients with kidney failure: a potential mechanism of ongoing renal damage[J]. *SMW*, 2001, 131(11-12): 139-147.
- [13] Chetan R, Shobhit G, Syed AM, *et al.* Biochanin A alleviates unilateral ureteral obstruction-induced renal interstitial fibrosis and inflammation by inhibiting the TGF- β 1/Smad2/3 and NF- κ B/NLRP3 signaling axis in mice [J]. *Life Sci*, 2022; 298: 520-527.
- [14] Anees M, Akbar H, Ibrahim M, *et al.* Pulmonary functions and factors affecting them in patients with chronic kidney disease[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2020, 30(10): 1082-1085.
- [15] Kwon EJ, Ju JH. Impact of posttranslational modification in pathogenesis of rheumatoid arthritis: Focusing on citrullination, carbamylation, and acetylation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(19): 10576-10631.
- [16] Sakai N, Tager AM. Fibrosis of two: epithelial cell-fibroblast interactions in pulmonary fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1832(7): 911-921.
- [17] Chioma OS, Drake WP. Role of microbial agents in pulmonary fibrosis [J]. *Yale J Biol Med*, 2017, 90(2): 219-227.
- [18] Case AH. Clinical overview of progressive fibrotic interstitial lung disease[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2022, 9: 839-858.
- [19] Conese M, Di Gioia S. Pathophysiology of lung disease and wound repair in cystic fibrosis[J]. *Pathophysiology*, 2021, 28(1): 155-188.
- [20] Estornut C, Milara J, Bayarri MA, *et al.* Targeting oxidative stress as a therapeutic approach for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 794-797.
- [21] Caldeira D, Weiss D, Rocco P, *et al.* Mitochondria in focus: From function to therapeutic strategies in chronic lung diseases[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 782074.
- [22] Shaykh M, Pegoraro AA, Mo W, *et al.* Carbamylated proteins activate glomerular mesangial cells and stimulate collagen deposition[J]. *J Lab Clin Med*, 1999, 133(3): 302-308.
- [23] Musaelyan A, Lapin S, Nazarov V, *et al.* Vimentin as antigenic target in autoimmunity: A comprehensive review [J]. *Autoimmun Rev*, 2018, 17(9): 926-934.
- [24] Rockey DC, Bell PD, Hill JA. Fibrosis-a common pathway to organ injury and failure [J]. *N Engl J Med*, 2015, 372(12): 1138-1149.
- [25] Sgalla G, Iovene B, Calvello M, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis: pathogenesis and management [J]. *Respir Res*, 2018, 19(1): 32-68.
- [26] Barratt SL, Creamer A, Hayton C, *et al.* Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF): an overview [J]. *J Clin Med*, 2018, 7(8): 201-235.
- [27] Katoh M. Molecular genetics and targeted therapy of WNT-related human diseases[J]. *Int J Mol Med*, 2017, 40(3): 587-606.

(上接第 164 页)

- [16] Zhu N, Xiang YJ, Zhao XY, *et al.* Thymoquinone suppresses platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation, migration and neointimal formation[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(12): 8482-8492.
- [17] Neijssen J, Herberts C, Drijfhout JW, *et al.* Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions[J]. *Nature*, 2005, 434(7029): 83-88.
- [18] Grimmer B, Krauszman A, Hu X, *et al.* Pannexin 1-a novel regulator of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction[J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 118(11): 2535-2547.
- [19] Freeman TJ, Sayedyahosseini S, Johnston D, *et al.* Inhibition of Pannexin 1 reduces the tumorigenic properties of human melanoma Cells[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(1): 102-126.
- [20] Furlow PW, Zhang S, Soong TD, *et al.* Mechanosensitive pannexin-1 channels mediate microvascular metastatic cell survival[J]. *Nat Cell Biol*, 2015, 17(7): 943-949.
- [21] Liu HF, Yuan M, Yao YX, *et al.* *In vitro* effect of Pannexin 1 channel on the invasion and migration of I-10 testicular cancer cells via ERK1/2 signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109090.
- [22] 邹呈雨, 宋关斌. 骨桥蛋白促细胞迁移作用及其分子机理[J]. *生命的化学*, 2009, 29(04): 543-546.
- [23] 宋楠萌, 桑建利, 徐恒. 增殖细胞核抗原(PCNA)的分子结构及其生物学功能研究进展[J]. *自然科学进展*, 2006, 10(1): 1201-1209.
- [24] Ramos JW. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(12): 2707-2719.
- [25] Peng LQ, Chen YW, Li Y, *et al.* Chemerin regulates the proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells via the ERK1/2 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 767705.