

胱胺抑制 5-羟色胺诱导的人肺动脉平滑肌细胞增殖及机制

于海英¹, 王寒明², 刘婉珠¹, 何笛³

(锦州医科大学 1. 基础医学实验教学中心, 2. 药理学教研室; 3. 锦州本天药业有限公司质量管理部, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 5-羟色胺; 肺动脉平滑肌细胞; 胱胺; 转谷氨酰胺酶 2

[摘要] 目的 研究胱胺对 5-羟色胺(5-HT)诱导的人肺动脉平滑肌细胞(PASMC)增殖以及 Ras 同源基因家族成员 A(RhoA)信号通路的影响。方法 培养人 PASMC, 用 1 μmol/L 5-HT 进行刺激, 以胱胺进行干预。采用 CCK8 法观察细胞增殖情况; 采用 Western blot、免疫共沉淀检测 RhoA 信号通路各蛋白分子。结果 5-HT 诱导人 PASMC 增殖, 使 RhoA 5-HT 化、RhoA 膜转位、Rho 蛋白激酶 2(ROCK2)表达以及肌球蛋白磷酸酶目标亚基 1(MYPT1)、蛋白激酶 B(Akt)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)磷酸化明显增加。胱胺抑制 5-HT 诱导的 PASMC 增殖、RhoA 5-HT 化及 MYPT1、Akt、ERK 磷酸化, 但对 RhoA 膜转位、ROCK2 蛋白表达无显著影响。结论 胱胺通过抑制 RhoA 5-HT 化从而抑制 5-HT 诱导的人 PASMC 增殖。

[中图分类号] R96;R5

[文献标识码] A

Cystamine inhibits proliferation of human pulmonary arterial smooth muscle cells induced by 5-hydroxytryptamine and its mechanism

YU Haiying¹, WANG Hanming², LIU Wanzhu¹, HE Di³

(1. Experimental Teaching Center of Basic Medicine, 2. Department of Pharmacology, Jinzhou Medical University; 3. Department of Quality Management, Jinzhou Bentian Pharmaceutical Limited Company, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] 5-hydroxytryptamine; pulmonary arterial smooth muscle cell; cystamine; transglutaminase 2

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of cystamine on the proliferation of human pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) induced by 5-hydroxytryptamine (5-HT) and RhoA signaling pathway. **Methods** Human PASMC were cultured and stimulated with 1 μmol/L 5-HT and intervened with cystamine. CCK8 assay was used to observe cell proliferation of PASMC. The protein molecules of RhoA signaling pathway were detected by Western blot and co-immunoprecipitation. **Results** 5-HT induced the proliferation of PASMC, and increased significantly RhoA seronylation, RhoA membrane translocation, Rho-associated protein kinase 2 (ROCK2) expression, and the phosphorylations of myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1), protein kinase B (Akt) and extracellular regulated protein kinase (ERK). Cystamine inhibited PASMC proliferation, RhoA seronylation and the phosphorylations of MYPT1, Akt, ERK induced by 5-HT, but had no significant effect on RhoA membrane translocation and ROCK2 protein expression. **Conclusion** Cystamine inhibits 5-HT-induced proliferation of human PASMC by inhibiting RhoA seronylation.

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)作为自体活性物质,既可引起血管收缩,又可促进各种细胞的增殖和迁移,比如肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cell, PASMC)^[1]。肺动脉高压患者血浆中,5-HT 浓度显著升高,它所刺激的 PASMC 增殖正是肺动脉高压患者肺动脉重构的基础^[1]。

Ras 同源基因家族成员 A (Ras homolog gene family member A, RhoA) 信号通路对血管具有重要作用^[2]。5-HT 诱导 PASMC 增殖与 RhoA 下游信号通路激活有关^[3]。5-HT 引起 RhoA 5-HT 化水平升高,它的下游肌球蛋白磷酸酶目标亚基 1 (myosin phosphatase target subunit 1, MYPT1)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、细胞外调节蛋白激酶(extra-

[收稿日期] 2020-01-08

[修回日期] 2020-03-21

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(2019-MS-139);辽宁省科技厅联合基金项目(201602316)

[作者简介] 于海英,硕士,实验师,研究方向为心血管药理学,E-mail 为 yuhaiying8218@163.com。通信作者刘婉珠,高级实验师,研究方向为心脑血管药理学,E-mail 为 wanzhuliu@163.com。

cellular regulated protein kinase, ERK) 也随之激活^[3]。本课题组以前的研究发现, 选择性 5-HT 再摄取抑制剂氟西汀通过抑制 RhoA 5-HT 化及其下游, 抑制 5-HT 诱导的大鼠 PASM C 增殖以及野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压^[3-4]。

现已发现很多蛋白能够 5-HT 化, 它是一种蛋白翻译后修饰, 需要转谷氨酰胺酶 2 (transglutaminase 2, TG2) 的催化^[5-6]。研究表明 TG2 活化与表达增加参与肺动脉高压形成过程^[7-9]。本课题组已经发现 TG2 抑制剂胱胺 (cystamine) 延缓野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压^[9]。但是胱胺是否通过抑制 RhoA 5-HT 化来抑制 5-HT 诱导的 PASM C 增殖, 尚不清楚。所以, 本研究通过观测 TG2 抑制剂胱胺对 5-HT 诱导人 PASM C 增殖与 RhoA 信号转导通路的影响, 探讨胱胺对 5-HT 诱导人 PASM C 增殖的抑制作用及部分作用机制。

1 材料和方法

1.1 试剂与药品

从 Sigma 公司购入胱胺 (C8707)、5-HT 盐酸盐 (H9523); 从武汉博士德生物工程有限公司购入兔抗人 5-HT 多克隆抗体 (BA0121-2)、兔抗人 Rho 蛋白激酶 2 (Rho-associated protein kinase 2, ROCK2) 多克隆抗体 (BA1766); 从北京博奥森生物技术有限公司购入兔抗人 p-MYPT1 多克隆抗体 (bs-3287R)、兔抗人 MYPT1 多克隆抗体 (bs-2998R); 从美国 Santa Cruz 公司购入兔抗人 p-Akt 多克隆抗体 (sc-33437)、兔抗人 Akt 多克隆抗体 (sc-8312)、兔抗人 p-ERK 多克隆抗体 (sc-16982)、兔抗人 ERK 多克隆抗体 (sc-292838)、小鼠抗人 RhoA 单克隆抗体 (sc-418)、小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体 (sc-47778); 从碧云天生物技术有限公司购入 RIPA 蛋白裂解液 (P0013B)、细胞膜蛋白与浆蛋白提取试剂盒 (P0033)。

1.2 人 PASM C 的培养

人 PASM C (购于中国科学院协和细胞中心), 培养于高糖 DMEM 培养液 (90% 高糖 DMEM 培养基+10% 胎牛血清) 中, 培养基中提前加入浓度分别为 100 U/mL、0.1 g/L 的青霉素-链霉素双抗。细胞置于饱和湿度、95% 空气、5% CO₂、37 °C 下的培养箱中传代培养, 取 6 代以内的对数生长期细胞进行实验。

1.3 实验分组

(1) 人 PASM C 增殖实验。分 8 组: 对照组、1 μ mol/L 胱胺组、10 μ mol/L 胱胺组、100 μ mol/L 胱

胺组、1 μ mol/L 5-HT 组、1 μ mol/L 5-HT+1 μ mol/L 胱胺组、1 μ mol/L 5-HT+10 μ mol/L 胱胺组、1 μ mol/L 5-HT+100 μ mol/L 胱胺组; 提前 30 min 加入各剂量胱胺或超纯水, 用 5-HT 刺激人 PASM C, 48 h 后, 收集细胞进行 CCK8 检测。(2) Western blot 实验。分 3 组: 对照组、5-HT (1 μ mol/L) 组、5-HT (1 μ mol/L)+胱胺 10 μ mol/L (或 100 μ mol/L) 组; 提前 30 min 加入各剂量胱胺或超纯水, 用 5-HT 刺激人 PASM C, 48 h 后, 收集细胞进行免疫共沉淀、Western blot 检测。

1.4 细胞增殖实验 (CCK8 法)

细胞增殖实验参照文献^[10]操作。将人 PASM C 接种于 96 孔板, 每孔约 5×10^3 个细胞, 采用含 10% 胎牛血清的培养液进行培养, 24 h 后细胞贴壁生长; 更换 0.05% 的胎牛血清培养液, 24 h 后进行细胞同步化; 按“1.3”下 (1) 分组加入相应刺激因素, 每组 8 孔, 在 48 h 后把 CCK8 溶液按 1:10 比例加入到每孔中进行染色; 2 h 后, 在 450 nm 条件下, 用酶标仪检测吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖率: 细胞增殖率 = $(A_{\text{样本}} - A_{\text{空白}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$ 。

1.5 免疫共沉淀

收集细胞, 加入裂解液提取并稀释蛋白, 制成 1 g/L 的溶液, 取 500 μ L, 加入抗 RhoA 抗体 1 μ L, 4 °C 缓慢摇晃、孵育过夜; 次日加入 50 μ L 琼脂糖珠, 4 °C 缓慢摇晃、孵育 4 h, 使抗体与琼脂糖珠偶联; 4 °C、3 000 r/min 离心 3 min, 弃上清。用 250 μ L 裂解缓冲液清洗琼脂糖珠 3 次; 加入 4 μ L 的 5 \times 上样缓冲液和 16 μ L 的 1 \times 磷酸盐缓冲液, 煮沸 5 min 待用。Western blot 检测 5-HT (抗体稀释比例 1:150) 与 RhoA (抗体稀释比例 1:500), RhoA 5-HT 化以 5-HT 化的 RhoA 与总 RhoA 的光密度值之比表示。

1.6 Western blot

收集细胞, 加入相应预冷的蛋白裂解液, 提取全蛋白、膜蛋白或浆蛋白; 将蛋白制成上样液后, 进行电泳, 分离不同相对分子质量大小的蛋白; 之后将蛋白转移到 PVDF 膜上; 在 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h 后, 加一抗 (ROCK 1:500、p-ERK 1:800、ERK 1:800、p-Akt 1:800、Akt 1:800、p-MYPT1 1:500、MYPT1 1:500、RhoA 1:500、 β -actin 1:2 000) 4 °C 孵育过夜; 次日在室温下加入二抗孵育 2 h; 采用 ECL 发光液曝光, 最后用成像系统检测蛋白条带并进行分析。以 ROCK2 与 β -actin 的光密度值之比作为 ROCK2 表达水平的指标, 以 p-ERK 与 ERK、p-Akt 与 Akt、p-MYPT1 与 MYPT1、胞膜 RhoA (m-RhoA) 与

胞质 RhoA (c-RhoA) 的光密度值之比分别作为 ERK、Akt、ROCK、RhoA 活化程度的指标。

1.7 数据统计

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,以单因素方差分析对组间进行比较,以 LSD 法进行两两比较; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 胱胺对 5-HT 诱导人 PASM C 增殖的抑制作用

与对照组相比,5-HT 刺激人 PASM C 48 h 后的细胞增殖率明显增加($P < 0.01$),胱胺以剂量依赖的方式抑制这一改变;单独使用胱胺对人 PASM C 进行干预,低浓度胱胺无明显影响,但 100 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺显著降低细胞活性($P < 0.05$;表 1)。

2.2 胱胺对 5-HT 诱导的 PASM C 中 RhoA 5-HT 化的影响

图 1A(免疫共沉淀)和图 1B(Western blot)显示用 5-HT 刺激人 PASM C 48 h 后,RhoA 5-HT 化与

MYPT1 磷酸化显著增加;与 5-HT(1 $\mu\text{mol/L}$)组相比,10 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺明显抑制增加的 RhoA 5-HT 化与 MYPT1 的磷酸化($P < 0.01$)。

表 1. 胱胺对 PASM C 增殖的抑制作用($n=8$)

Table 1. Inhibitory effect of cystamine on proliferation of PASM C ($n=8$)

分组	48 h 细胞增殖率/%
对照组	97.57±8.79
1 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺组	97.56±9.42
10 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺组	93.41±13.07
100 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺组	78.65±14.68 ^a
1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 组	149.05±20.35 ^b
1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT+1 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺组	149.53±17.45
1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT+10 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺组	116.88±14.77 ^c
1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT+100 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺组	88.94±12.17 ^c

注:a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与对照组相比;c 为 $P < 0.01$,与 1 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT 组相比。

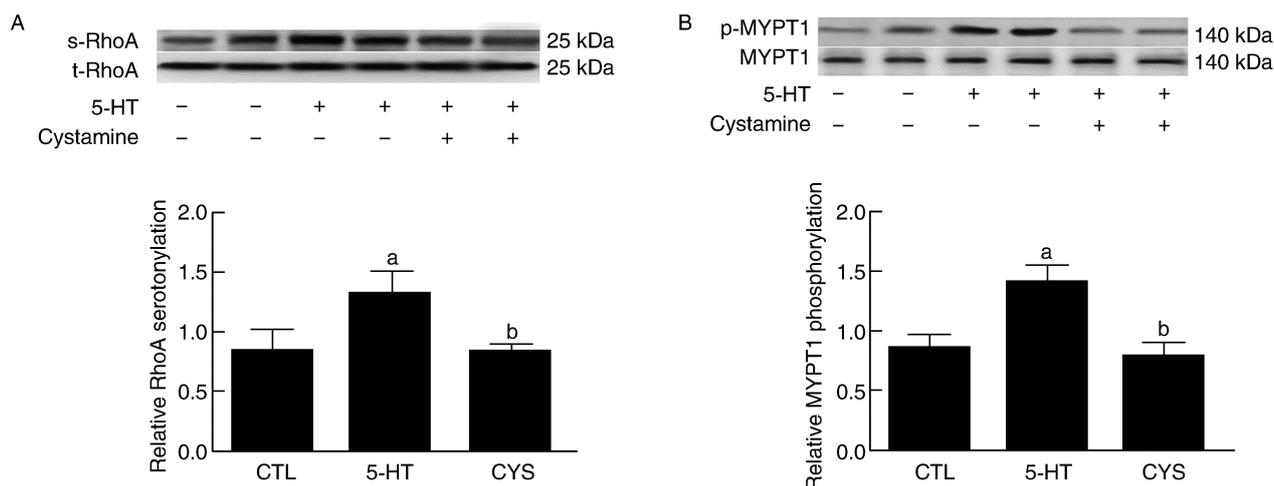


图 1. 10 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺对 5-HT 诱导的人 PASM C RhoA 5-HT 化的影响($n=4$)

CTL 为对照组,5-HT 为 5-HT(1 $\mu\text{mol/L}$)组,CYS 为 5-HT(1 $\mu\text{mol/L}$)+胱胺(10 $\mu\text{mol/L}$)组。

a 为 $P < 0.01$,与对照组相比;b 为 $P < 0.01$,与 5-HT(1 $\mu\text{mol/L}$)组相比。

Figure 1. Effect of 10 $\mu\text{mol/L}$ cystamine on RhoA serotonylation induced by 5-HT in human PASM C ($n=4$)

2.3 胱胺对 5-HT 诱导的 PASM C 中 RhoA 膜转位的影响

5-HT 刺激人 PASM C 48 h 后,RhoA 膜转位、ROCK2 表达显著增加($P < 0.01$);10 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺对 RhoA 膜转位、ROCK2 表达无显著抑制作用;同样,100 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺对 RhoA 膜转位、ROCK2 表达也无

显著抑制作用(图 2)。

2.4 胱胺对 5-HT 诱导的 PASM C 中 Akt、ERK 活性的影响

从图 3 可以看出,5-HT 刺激人 PASM C 48 h 后,Akt、ERK 磷酸化显著增加($P < 0.01$);10 $\mu\text{mol/L}$ 胱胺明显抑制 Akt 的过度磷酸化($P < 0.01$),但对 ERK 过

度磷酸化无显著抑制作用;而 100 μmol/L 胱胺却显著

抑制 5-HT 诱导的 ERK 磷酸化水平升高($P < 0.01$)。

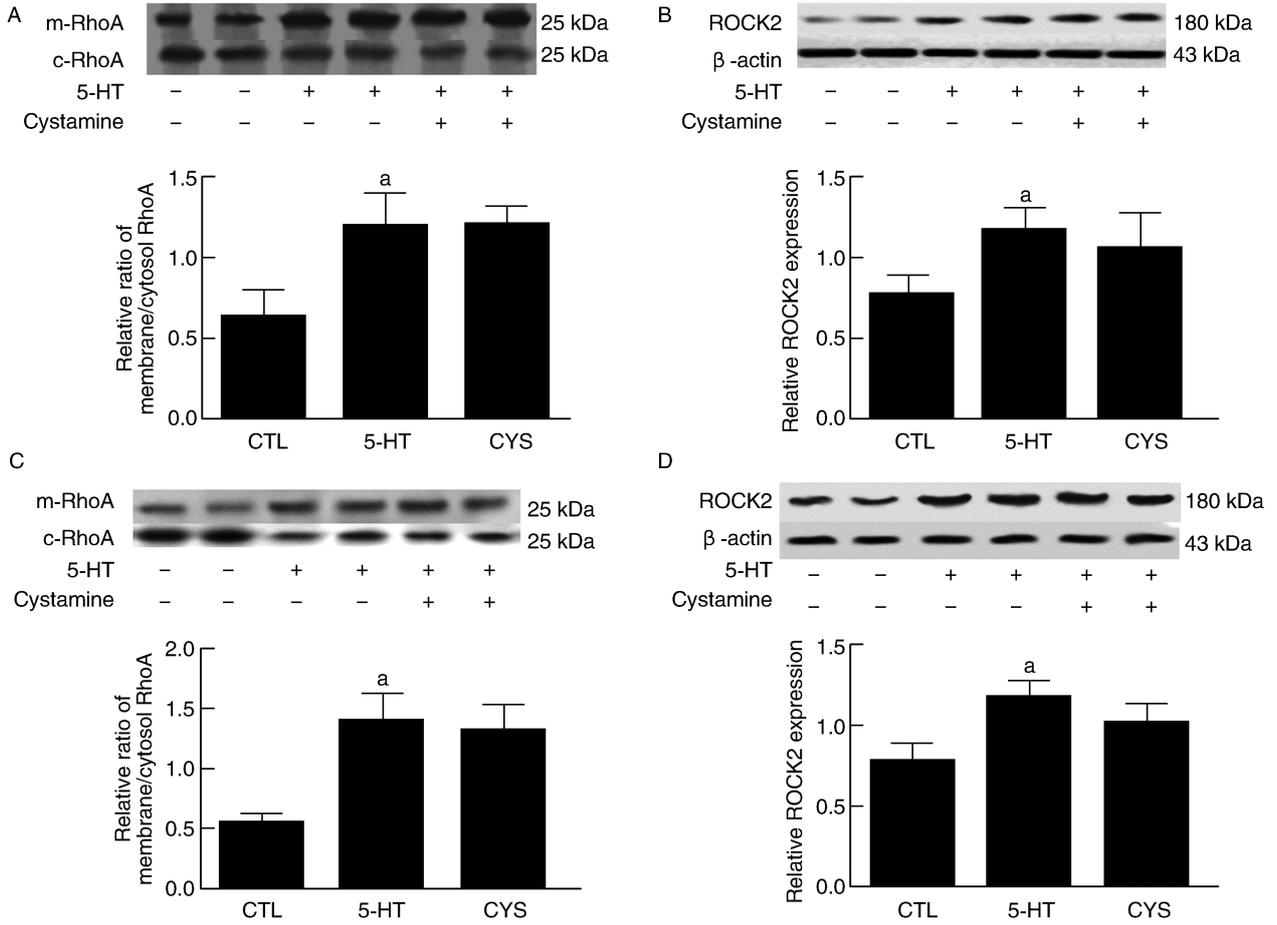


图 2. 胱胺对 5-HT 诱导的人 PASMC RhoA 膜转位的影响 ($n=4$)

A 图、B 图: CTL 为对照组, 5-HT 为 5-HT (1 μmol/L) 组, CYS 为 5-HT (1 μmol/L) + 胱胺 (10 μmol/L) 组;

C 图、D 图: CTL 为对照组, 5-HT 为 5-HT (1 μmol/L) 组, CYS 为 5-HT (1 μmol/L) + 胱胺 (100 μmol/L) 组。

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

Figure 2. Effect of cystamine on 5-HT-induced RhoA membrane translocation in human PASMC ($n=4$)

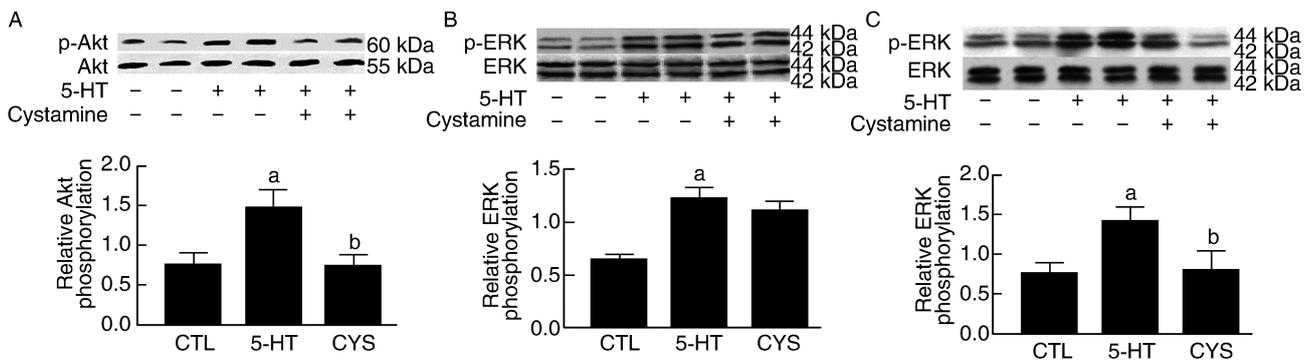


图 3. 胱胺对 5-HT 诱导的人 PASMC Akt 和 ERK 磷酸化的影响 ($n=4$)

A 图、B 图: CTL 为对照组, 5-HT 为 5-HT (1 μmol/L) 组, CYS 为 5-HT (1 μmol/L) + 胱胺 (10 μmol/L) 组;

C 图: CTL 为对照组, 5-HT 为 5-HT (1 μmol/L) 组, CYS 为 5-HT (1 μmol/L) + 胱胺 (100 μmol/L) 组。

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.01$, 与 5-HT (1 μmol/L) 组相比。

Figure 3. Effect of cystamine on 5-HT-induced Akt and ERK phosphorylation in human PASMC ($n=4$)

3 讨论

本课题组以前的研究表明 5-HT 诱导 PASMCM 增殖,促进 RhoA 5-HT 化、RhoA 膜转位、ROCK2 蛋白表达以及 MYPT1、Akt、ERK 磷酸化增加;选择性 5-HT 再摄取抑制剂氟西汀抑制 5-HT 导致的这些改变^[3]。但是,本研究发现 TG2 抑制剂胍胺虽然对 5-HT 诱导的 PASMCM 增殖、RhoA 5-HT 化以及 MYPT1、Akt、ERK 磷酸化增加具有抑制作用,但却不能抑制 RhoA 过度膜转位与 ROCK2 蛋白过表达。这说明胍胺抑制 5-HT 诱导的人 PASMCM 增殖所通过的下游信号通路与氟西汀存在差异。

RhoA 5-HT 化是 RhoA 激活的重要途径之一,需要 TG2 的催化^[4]。研究表明肺动脉高压形成时, TG2 活性或表达以及其催化的蛋白 5-HT 化水平显著提高^[8,11-12]。通过抑制蛋白 5-HT 化或 TG2 对抑制肺动脉高压具有重要意义,比如,本课题组发现氟西汀通过抑制 RhoA 5-HT 化抑制野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压^[4],胍胺通过抑制 TG 蛋白过表达延缓野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压^[9]。本研究发现胍胺抑制 5-HT 诱导的 PASMCM 增殖,同时抑制 5-HT 刺激的 RhoA 5-HT 化增加。所以本课题组推测胍胺通过改善肺动脉重构延缓大鼠肺动脉高压,可能也与抑制 RhoA 5-HT 化有关。

RhoA 的膜转位是 RhoA 激活的又一条途径,鸟嘌呤核苷酸交换因子催化 RhoA,使其从 GDP 形式转变为 GTP 形式,从细胞质中转位到细胞膜上,从而激活 ROCK2,使 MYPT1 磷酸化增加^[13]。本课题组已经发现肺动脉高压大鼠肺组织以及 5-HT 诱导的 PASMCM 中 RhoA 膜转位、ROCK2 蛋白表达与活化增加,氟西汀抑制这些改变^[3,4]。而且,文献表明 ROCK 抑制剂法舒地尔抑制 5-HT 诱导的 PASMCM 增殖与肺动脉高压^[14-15]。但是,本研究却发现胍胺对 RhoA 过度膜转位和 ROCK2 蛋白过表达无显著抑制作用。胍胺抑制 5-HT 诱导的人 PASMCM 增殖,但是需要比氟西汀更高的浓度^[3];而且胍胺只能延缓大鼠肺动脉高压,效果差于氟西汀^[4,9]。所以,我们推测抑制 RhoA 膜转位和 ROCK2 过表达对逆转大鼠肺动脉高压可能同样重要。

研究表明,MYPT1、Akt、ERK 是 RhoA 的重要下游信号蛋白。其中,增加 RhoA 膜转位、MYPT1 磷酸化可引起肺血管的收缩,是导致肺血管阻力增加的原因之一^[16]。本研究发现胍胺虽不能抑制 RhoA 膜转位,但能抑制 MYPT1 的活性,这印证了 MYPT1 可能也是 RhoA 5-HT 化的下游分子^[14]。而且,对 MYPT1、Akt、ERK 进行直接或间接的抑制均可对 5-HT 诱导的 PASMCM 产生抑制作用^[3,11],这提示抑制 5-HT 诱导

PASMCM 增殖需要通过抑制 MYPT1、Akt、ERK 的活性。

总之,胍胺通过降低 RhoA 5-HT 化水平及其下游分子活性从而抑制 5-HT 诱导的人 PASMCM 增殖。

[参考文献]

- [1] Han X, Chen C, Cheng G, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma attenuates serotonin-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis inhibition involving ERK1/2 pathway[J]. *Microvasc Res*, 2015, 100: 17-24.
- [2] 许忠波,杜婷婷,冯欣,等. Rho/ROCK 信号通路与人动脉硬化患者血液流变学的相关性研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(1): 51-54.
- [3] 王寒明,艾秀丽. 氟西汀通过 RhoA 信号通路抑制 5-羟色胺诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(11): 1113-1116.
- [4] Wang HM, Wang Y, Liu M, et al. Fluoxetine inhibits monocrotaline-induced pulmonary arterial remodeling involved in inhibition of RhoA-Rho kinase and Akt signalling pathways in rats[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(11): 1506-1515.
- [5] Farrelly LA, Thompson RE, Zhao S, et al. Histone seronylation is a permissive modification that enhances TFIIID binding to H3K4me3[J]. *Nature*, 2019, 567(7749): 535-539.
- [6] Mi Z, Si T, Kapadia K, et al. Receptor-stimulated transamidation induces activation of Rac1 and Cdc42 and the regulation of dendritic spines[J]. *Neuropharmacology*, 2017, 117: 93-105.
- [7] Mertens TCJ, Hanmandlu A, Tu L, et al. Switching-off adora2b in vascular smooth muscle cells halts the development of pulmonary hypertension[J]. *Front Physiol*, 2018, 9: 555.
- [8] Penumatsa KC, Toksoz D, Warburton RR, et al. Transglutaminase 2 in pulmonary and cardiac tissue remodeling in experimental pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 313(5): L752-L762.
- [9] Wang HM, Liu WZ, Tang FT, et al. Cystamine slows but not inverses the progression of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2018, 96(8): 783-789.
- [10] 束波,钱民章. 高迁移率族蛋白 1 及其受体促进人主动脉血管平滑肌细胞增殖及迁移的作用研究[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(8): 761-766.
- [11] Wei L, Warburton RR, Preston IR, et al. Seronylated fibronectin is elevated in pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(12): L1273-L1279.
- [12] DiRaimondo TR, Klock C, Warburton R, et al. Elevated transglutaminase 2 activity is associated with hypoxia-induced experimental pulmonary hypertension in mice[J]. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(1): 266-275.
- [13] Wang XQ, Zhang YP, Zhang LM, et al. Resveratrol enhances vascular reactivity in mice following lipopolysaccharide challenge via the RhoA-ROCK-MLCP pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(1): 308-316.
- [14] Guilluy C, Eddahibi S, Agard C, et al. RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009, 179(12): 1151-1158.
- [15] Zhang Y, Wu S. Effects of fasudil on pulmonary hypertension in clinical practice[J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2017, 46: 54-63.
- [16] Reyes RV, Diaz M, Ebensperger G, et al. The role of nitric oxide in the cardiopulmonary response to hypoxia in highland and lowland newborn llamas[J]. *J Physiol*, 2018, 596(23): 5907-5923.

(此文编辑 曾学清)