

二十二碳六烯酸对肺动脉高压大鼠 活化 T 细胞核因子 c1 表达的影响

李红梅, 刘培晶, 陈蕊, 严金川, 王中群, 李梅, 刘朔, 殷云杰

(江苏大学附属医院心内科, 江苏省镇江市 212001)

[关键词] 二十二碳六烯酸; 野百合碱; 活化 T 细胞核因子 c1; 肺动脉高压

[摘要] 目的 观察二十二碳六烯酸(DHA)对野百合碱(MCT)致肺动脉高压(PH)大鼠肺血管重构及活化 T 细胞核因子 c1(NFATc1)表达的影响。方法 24 只 SD 大鼠随机分为正常对照组($n=7$)、DHA 干预组($n=7$)及 MCT 模型组($n=10$)。肺动脉高压模型采用 MCT 诱导法, HE 染色观察大鼠肺小动脉形态学改变, 免疫组织化学、Western blot 和 qRT-PCR 检测大鼠肺动脉 NFATc1 蛋白和 mRNA 的表达。结果 DHA 能明显减轻模型大鼠的肺血管重构; 与正常对照组相比, MCT 模型组肺动脉 NFATc1 蛋白和 mRNA 的表达明显增强($P<0.05$); 与 MCT 模型组相比, DHA 干预组肺动脉 NFATc1 蛋白和 mRNA 的表达减弱($P<0.05$)。结论 DHA 对 MCT 所致肺动脉高压具有较好的抑制作用, 其作用机制可能与其抑制 NFATc1 表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Docosahexaenoic Acid on the Expression of NFATc1 in Pulmonary Hypertension Rats

LI Hong-Mei, LIU Pei-Jing, CHEN Rui, YAN Jin-Chuan, WANG Zhong-Qun, LI Mei, LIU Shuo, and YIN Yun-Jie
(Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

[KEY WORDS] Docosahexaenoic Acid; Monocrotaline; Nuclear Factor c1 of Activated T Cells; Pulmonary Artery Hypertension

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of docosahexaenoic acid (DHA) on monocrotaline-induced pulmonary hypertension (PH) in rats, and explore the potential mechanism involved in its action. **Methods** 24 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups; normal control group ($n=7$), DHA-treated group ($n=7$) and pulmonary hypertension model group ($n=10$). The monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension was established. The microcosmic changes of pulmonary arterial morphologic in lung of rats were measured by optical microscope after the stain of HE. The expression of NFATc1 protein and mRNA levels in pulmonary arterial were detected by immunohistochemistry, Western blot, and qRT-PCR, respectively. **Results** DHA could significantly inhibit the structural remodeling of small pulmonary arterial induced by MCT. Compared with the normal group, the expressions of NFATc1 protein and mRNA were remarkably increased in MCT group. Compared with MCT group, the expressions of NFATc1 protein and mRNA were decreased significantly in DHA-treated group. **Conclusions** DHA reverses the development of pulmonary hypertension induced by MCT in rats. The mechanism may be related to reduction of the expression of NFATc1.

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是肺血管阻力持续升高,右心室负荷不断增加,进而导致进行性右心衰竭甚至死亡的常见严重并发症。

肺血管结构重塑是肺动脉高压发生、发展的重要病理生理基础,其中血管中膜平滑肌层肥厚、外周非肌型肺小动脉发生肌化在肺血管结构重塑中起重

[收稿日期] 2014-11-27

[修回日期] 2015-04-07

[基金项目] 国家自然科学基金(81400208,81370408,81370409);江苏省自然科学基金(BK20131246);镇江市科技支撑计划(SH2014025,SH2013024);镇江市心血管病重点实验室专项经费(SS2012001)

[作者简介] 李红梅,硕士研究生,研究方向为肺动脉高压的基础和临床治疗,E-mail为 leehmee@163.com。陈蕊,博士研究生,研究方向为肺动脉高压的基础和临床治疗。通讯作者刘培晶,硕士研究生导师,研究方向为肺动脉高压的基础和临床治疗,E-mail为 jdfylpj@sina.com。

要作用。干预肺血管结构重塑,降低肺动脉压力是目前研究的重点之一。

二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)是 ω -3多不饱和脂肪酸的一种。我们前期研究表明DHA能明显降低肺动脉压,减轻肺小动脉壁增厚,改善肺血管重塑^[1-2]。活化T细胞核因子c1(nuclear factor c1 of activated T cells, NFATc1)是活化T细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)家族的成员之一,在肺动脉中有表达,并受 Ca^{2+} 的调控,新近研究表明肺动脉高压时肺动脉平滑肌细胞NFAT核转位,可使 Ca^{2+} -NFAT信号通路激活,表现为NFATc1表达量增多^[3-4]。然而,DHA的抗肺动脉高压作用机制是否与NFATc1的表达有关,尚未见国内外文献报道,故本研究拟通过腹腔注射野百合碱(monocrotaline, MCT)制备肺动脉高压动物模型^[5],旨在探讨DHA对肺血管重构及NFATc1表达的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

6~8周龄清洁级雄性SD大鼠,体重 200 ± 20 g,购自江苏大学动物中心,许可证号为SCXK(苏)2013-0011。实时定量PCR扩增仪(美国Applied Biosystems公司),倒置相差显微镜(德国ZEISS公司),逆转录试剂盒、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II试剂盒(TaKaRa公司),Trizol mRNA提取液(Sangon公司),MCT、DHA(美国Sigma公司),Anti-NFAT2抗体(Abcam公司),羊抗兔HRP标记的二抗(康为世纪)。

1.2 动物分组及模型构建

成年雄性SD大鼠24只,适应性试养一周后随机分为三组:正常对照组($n=7$)、DHA干预组($n=7$)和MCT模型组($n=10$)。除正常对照组外,其余两组以MCT复制肺动脉高压模型,即MCT用乙醇和生理盐水(2:8)混合液配成质量分数为2%的溶液,按照60 mg/kg腹腔注射一次成模的经典方法^[6],3周即可形成。DHA干预组自腹腔注射之日起每天100 mg DHA灌胃,正常对照组和MCT模型组每天等体积生理盐水灌胃,共3周。三组大鼠放置同一温度、湿度环境中,均自由饮水、摄食及活动。

1.3 标本取材及大鼠肺血管形态学改变检测

待饲养21天后,于第22天以颈椎脱臼法处死全部大鼠,取出肺浸入生理盐水中漂洗后,再取左下肺叶放入10%福尔马林中固定,石蜡包埋,常规切片,HE染色,光学显微镜下观察肺组织及肺小动

脉形态学改变;部分肺组织 -80°C 冻存,用于Western blot和qRT-PCR检测。

1.4 肺动脉平滑肌细胞NFATc1的表达检测

用免疫组织化学染色法检测肺动脉平滑肌细胞NFATc1的表达,DAB显色。一抗为兔抗大鼠NFAT2单克隆抗体,1:200稀释。光学显微镜观察NFATc1的表达,胞核棕黄色颗粒为阳性信号。结果判断依据阳性细胞密度及免疫显色强度综合计分。每张切片随机选取5个高倍镜视野,每视野计数100个细胞,计算NFATc1阳性细胞百分率。阳性细胞少于5%记0分,5%~25%记1分,26%~49%记2分,50%~75%记3分,大于75%记4分;显色强度记0~3分:细胞内无着色记0分,淡黄色记1分,棕黄色记2分,棕褐色记3分;将两项指标评分相加,分4级:阴性(-)为0~1分,弱阳性(+)为2~3分,中等阳性(++)为4~5分,强阳性(+++)大于5分。

1.5 实时定量PCR检测肺动脉NFATc1 mRNA表达

冰冻的肺组织置于冰上研磨,提取总RNA,按试剂盒方法进行扩增,引物合成由上海瑞楚生物科技有限公司完成。NFATc1和 β -actin的特异性引物序列:NFATc1上游为5'-GGC CCA CAT CCC CCT GCA ACA AGC GC-3',下游5'-GCC CAG GTC TTC CCC AGC CGG CTC -3',扩增产物为302 bp; β -actin上游为5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3',下游5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3',扩增产物为296 bp。各目的基因扩增条件相同:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 复制30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共30个循环。以 β -actin基因表达为参照比较NFATc1基因表达水平在三组中的差异。

1.6 Western blot检测肺动脉NFATc1蛋白表达

取肺组织剪碎后加入蛋白裂解液,冰浴下进行组织匀浆,Bradford法测定蛋白含量。各待测样按蛋白含量折算取20 μg 蛋白加上样缓冲液,煮沸后进行SDS-PAGE电泳,转PVDF膜,将膜封闭,加入抗NFAT2抗体(1:500)和 β -actin(1:3000)抗体,室温振荡1 h后置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,反复洗膜后与山羊抗兔二抗(1:1000)室温孵育1 h。用ECL显色系统定影显色,使用伯乐凝胶成像仪和Image J软件分析各条带灰度值。

1.7 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物一般情况

MCT 模型组于第 17、19、20、21 天分别自发性死亡大鼠 1 只, DHA 干预组于第 19 天死亡大鼠 1 只, 正常对照组大鼠全部存活。MCT 模型组腹腔注射 MCT 14 天后, 大鼠活动迟缓, 毛色晦暗无光泽, 呼吸急促, 食欲下降, 体重减轻。随着时间延长部分大鼠出现口鼻部发绀, 腹水。死前数天大鼠有明显的呼吸急促, 口鼻发绀, 进食差。MCT 模型组大鼠死亡率为 40%, 尸检, 肉眼观大鼠肺组织凹凸不平, 弹性差, 并可见淤血, 双侧胸腔积液, 肺组织表面有点片状出血, 右心室明显增大扩张, 腹腔积液, 肝脏明显肿大。于第 22 天处死全部大鼠, 正常对照组和 DHA 干预组大鼠肺组织成灰白色, 柔软无肿

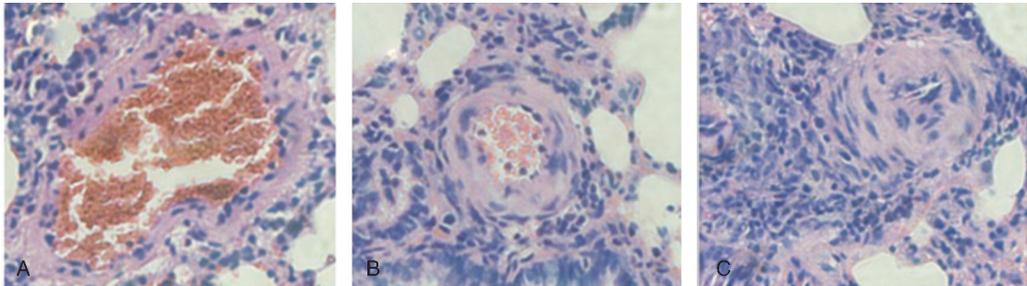


图 1. 各组大鼠肺小动脉 HE 染色 ($\times 400$, $n=6$) A 为正常对照组, B 为 DHA 干预组, C 为 MCT 模型组。

Figure 1. HE staining of rat pulmonary artery in each group ($\times 400$, $n=6$)

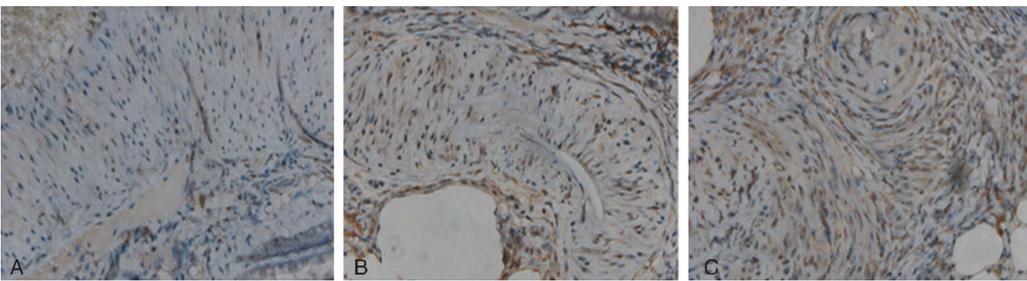


图 2. 免疫组织化学分析大鼠肺动脉 NFATc1 的表达 ($\times 400$, $n=6$) A 为正常对照组, B 为 DHA 干预组, C 为 MCT 模型组。

Figure 2. The NFATc1 expression in pulmonary artery by immunohistochemical analysis ($\times 400$, $n=6$)

表 1. 肺动脉 NFATc1 的免疫组织化学分析 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1. Immunohistochemical analysis of NFATc1 in pulmonary artery ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分组	NFATc1 阳性细胞率	免疫显色强度	表达强度
正常对照组	2.9% \pm 0.5%	淡黄色	阴性(+)
DHA 干预组	40.5% \pm 8.4% ^b	棕黄色	中等阳性(++)
MCT 模型组	85.1% \pm 10.1% ^a	褐黄色	强阳性(+++)

a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 MCT 模型组比较。

胀, 无淤血。

2.2 DHA 对 MCT 所致肺动脉高压肺小动脉形态学的影响

HE 染色结果显示, 正常对照组大鼠肺小动脉管腔直径较大, 血管壁较薄, 管壁厚薄一致; MCT 模型组大鼠肺小动脉管腔狭窄, 血管中膜平滑肌细胞明显增殖, 管壁明显增厚, 甚至完全闭塞, 伴有炎性细胞浸润; 与 MCT 模型组比较, DHA 干预组管腔狭窄程度明显减轻, 管壁变薄, 明显抑制血管平滑肌细胞增殖及炎性细胞浸润(图 1)。

2.3 DHA 对大鼠肺动脉 NFATc1 表达的影响

正常对照组 NFATc1 呈微量表达, MCT 模型组 NFATc1 蛋白阳性表达较正常对照组显著增强 ($P < 0.05$), DHA 干预组 NFATc1 蛋白阳性表达较 MCT 模型组降低 ($P < 0.05$; 表 1 和图 2)。

2.4 DHA 对大鼠肺动脉 NFATc1 mRNA 和蛋白表达的影响

与正常对照组比较, MCT 模型组大鼠肺动脉 NFATc1 mRNA 及蛋白的表达明显升高 ($P < 0.05$); DHA 明显降低大鼠肺动脉 NFATc1 mRNA 和蛋白的表达 ($P < 0.05$; 图 3)。

3 讨论

肺动脉高压发生发展的病理基础是肺血管内皮

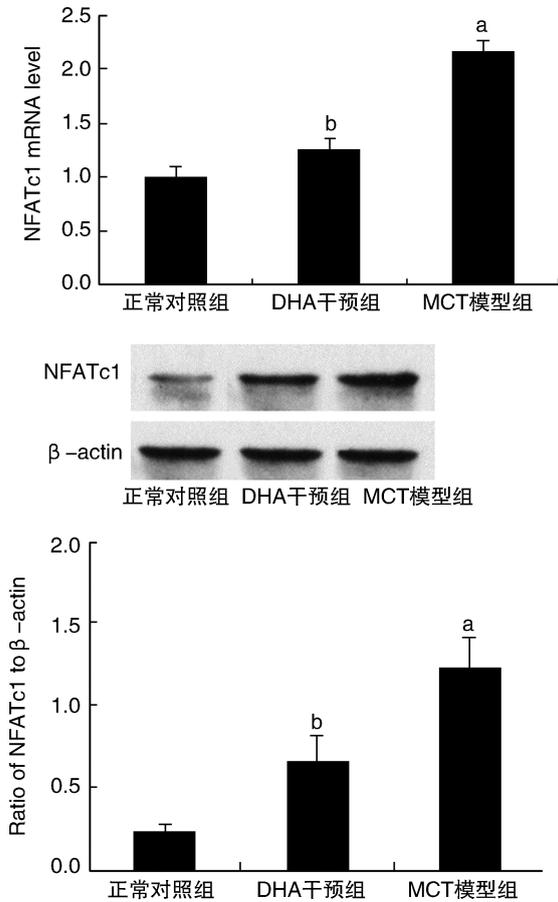


图3. 各组大鼠肺动脉 NFATc1 的 mRNA 和蛋白表达 ($n = 6$) a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 MCT 模型组比较。

Figure 3. Expression of NFATc1 mRNA and protein in rat pulmonary artery in each group ($n = 6$)

细胞和平滑肌细胞异常增殖引起的肺小动脉闭塞性改变。1961年 Lalich 等建立的 MCT 诱导大鼠肺动脉高压模型是目前公认的经典造模方法。MCT 诱导肺动脉高压机制是: MCT 注入大鼠体内可经肝脏代谢生成五元杂环的吡咯野百合碱, 吡咯野百合碱流经肺时可损伤肺血管内皮细胞, 导致血管平滑肌细胞增殖、肺血管重构及肺动脉压力增高^[7]。大鼠 3 周内即可形成肺动脉高压模型, 周期明显短于其它方法。故本研究采用腹腔注射 MCT 致肺动脉高压, 肺小血管形态学检测结果显示: 肺小动脉中膜显著增厚, 肺动脉管腔狭窄, 甚至闭塞, 表明 MCT 诱导肺动脉高压模型建立成功。

DHA 是鱼油中的一种不饱和脂肪酸, 有报道显示 DHA 与心血管事件呈负相关, 是冠心病二级预防治疗药物^[8], 我们实验室前期研究发现 DHA 预防肺动脉高压是通过抗肺动脉平滑肌细胞增殖及迁移来实现的^[2], DHA 可能是通过开放大电导钙激活

的钾离子通道抑制肺动脉平滑肌细胞增殖^[9]。本研究在 MCT 诱导肺动脉高压模型中应用 DHA 干预显示: 与 MCT 模型组相比, 管腔狭窄程度明显减轻, 血管管壁明显变薄, 表明 DHA 能显著减轻血管狭窄程度, 减轻肺小动脉管壁增厚, 抑制肺动脉高压病理改变的进程。

肺动脉高压是多因素共同参与的复杂病理过程, 虽然其发病机制目前尚不完全清楚, 但肺动脉平滑肌细胞的异常增殖和迁移在肺动脉高压的形成及发展中起着至关重要的作用^[10]。NFAT 是一种具有广泛生理功能且与众多信号转导途径相联系的转录因子, 其中 NFATc1-NFATc4 在肺动脉中有表达。近期的研究表明, NFAT 与肺动脉平滑肌细胞增殖及肺动脉高压形成有关^[11-12], 因此推测 NFAT 在肺动脉高压发病机制中亦发挥重要作用。NFATc1 是 NFAT 家族重要成员之一, 主要通过受体 Ca^{2+} /钙调神经磷酸酶 (calcineurin, CaN) 信号途径被激活而发挥基因调控功能, 是 CaN 的一个靶点, 更是其最重要的底物, CaN/NFATc1 信号通路在心血管系统中具有重要作用^[13]。新近研究表明肺动脉高压时, 细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 可以激活 CaN, 而 CaN 可以使 NFAT 去磷酸化进而转位至核内, 从而激活细胞内多种生长因子的转录^[14]。NFAT 激活可能导致电压门控钾通道转录活性下调^[15-16], 我们研究发现肺动脉高压模型大鼠肺动脉平滑肌细胞 NFATc1 的表达高于正常大鼠, 而 DHA 干预组 NFATc1 的表达低于 MCT 模型组, 因此, 我们推测 DHA 可能与 NFATc1 因子存在内在关联, NFATc1 因子有望成为肺动脉高压的治疗靶点和生物化学标志物。

综上所述, 本研究通过检测 NFATc1 在 mRNA 及蛋白水平上表达的变化, 发现 DHA 能在转录和翻译水平上降低 NFATc1 的表达, 提示肺动脉高压发病过程中 DHA 可能通过 NFATc1 发挥其抑制作用, DHA 是否通过调控 NFATc1 表达而抑制肺动脉高压的形成有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Yan J, Chen R, Liu P, et al. Docosahexaenoic acid inhibits development of hypoxic pulmonary hypertension: in vitro and in vivo studies [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 168 (4): 411-116.
- [2] 陈蕊, 刘培晶, 严金川, 等. 二十二碳六烯酸干预低氧诱导大鼠肺动脉高压的研究 [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37 (2): 109-112.

- [3] Kang K, Peng X, Zhang X, et al. MicroRNA-124 suppresses the transactivation of nuclear factor of activated T cells by targeting multiple genes and inhibits the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288 (35): 25 414-427.
- [4] 李积凤, 王丛, 刘杰, 等. 低氧通过 Ca^{2+} /NFAT 信号通路促进肺动脉平滑肌细胞增生 [J]. 首都医科大学学报, 2009, 30 (2): 172-176.
- [5] 汪浩文, 何志旭, 王志华, 等. 野百合碱诱导实验性肺动脉高压的研究 [J]. 贵阳医学院学报, 2007, 32 (1): 1-4.
- [6] Hayashi Y, Hussa JF, Lalich JJ. Cor pulmonale in rats [J]. *Lab Invest*, 1967, 16 (6): 875-881.
- [7] 周光德, 陈瑞芬, 刘国贞, 等. 野百合碱引起肺血管重建的观察 [J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17 (6): 573-574.
- [8] 胡大一, 丁荣晶. n-3 多不饱和脂肪酸在心血管疾病中的应用 [J]. 中华内科杂志, 2008, 47 (12): 1 040-042.
- [9] 刘培晶, 陈蕊, 严金川, 等. 二十二碳六烯酸对低氧性肺血管收缩的影响及机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (8): 680-684.
- [10] 张凌云, 高保安. 肺动脉平滑肌细胞与低氧性肺血管重塑形成机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2013, 21 (2): 177-181.
- [11] El Chami H, Hassoun PM. Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2012, 55 (2): 218-228.
- [12] Paulin R, Courboulin A, Meloche J, et al. Signal transducers and activators of transcription-3/pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2011, 123 (11): 1 205-215.
- [13] 王笑, 严金川, 龚杰. 钙调神经磷酸酶/活化 T 细胞核因子信号通路在心血管发育中的作用 [J]. 中华心血管杂志, 2012, 40 (9): 798-800.
- [14] Chan MC, Weisman AS, Kang H, et al. The amiloride derivative phenamil attenuates pulmonary vascular remodeling by activating NFAT and the bone morphogenetic protein signaling pathway [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31 (3): 517-530.
- [15] Yan J, Chen R, Liu P, et al. Docosahexaenoic acid attenuates hypoxic pulmonary vasoconstriction by activating the large conductance Ca^{2+} -activated K^{+} currents in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2014, 28 (1): 9-16.
- [16] 承伟, 李智. 肺动脉高压模型大鼠肺动脉平滑肌细胞内钙的改变 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26 (5): 593-596.

(此文编辑 文玉珊)