

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

王寒明¹, 艾秀丽²

(1. 辽宁医学院药理学教研室; 2. 锦州九泰药业有限责任公司质量管理处, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 5-羟色胺; 蛋白激酶 B; RhoA; 肺动脉平滑肌细胞; 氟西汀

[摘要] 目的 研究氟西汀对 5-羟色胺(5-HT)诱导的肺动脉平滑肌细胞(PASMC) RhoA 信号通路的影响。方法 培养大鼠 PASMC, 用氟西汀(0.1、1、10 μmol/L)或法舒地尔(1、10、100 μmol/L)干预后, 加入 1 μmol/L 5-HT 刺激 48 h, 以噻唑蓝比色法观察细胞增殖情况, 以免疫共沉淀、Western blot 等检测 RhoA 信号通路各指标。结果 5-HT 刺激 PASMC 增殖, 使 RhoA 5-HT 化、RhoA 膜转位、Rho 激酶蛋白 2 表达以及肌球蛋白磷酸酶目标亚基 1、细胞外调节蛋白激酶、蛋白激酶 B 磷酸化明显增加; 氟西汀剂量依赖地抑制这些改变; 而 Rho 激酶抑制剂法舒地尔对 RhoA 5-HT 化没有抑制作用。结论 氟西汀通过阻断 RhoA 信号通路抑制 5-HT 诱导的 PASMC 增殖。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Fluoxetine Inhibited Serotonin-induced Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells Proliferation via RhoA Signalling Pathway

WANG Han-Ming¹, and AI Xiu-Li²

(1. Department of Pharmacology, Liaoning Medical University; 2. Department of Quality Assurance, Jinzhou Jiutai Pharmaceutical Co., Ltd, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] Serotonin; Protein Kinase B; RhoA; Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells; Fluoxetine

[ABSTRACT] **Aim** To study the effect of fluoxetine on serotonin-induced RhoA signalling pathway in pulmonary arterial smooth muscle cells. **Methods** The pulmonary arterial smooth muscle cells of rat were exposed to serotonin for 48 h with or without fluoxetine or fasudil. Then pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation was tested by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium broide assay. The cellular extracts were prepared for coimmunoprecipitation or Western blot of RhoA signalling pathway. **Results** Serotonin promoted pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation, increased RhoA seronylation, RhoA membrane translocation, Rho kinase 2 protein expression and myosin phosphatase target subunit 1, extracellular regulated protein kinase and protein kinase B phosphorylation. Fluoxetine inhibited these changes dose-dependently. However, fasudil did not inhibit increased RhoA seronylation induced by serotonin. **Conclusion** Fluoxetine inhibited serotonin-induced pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation via inhibition of RhoA signalling pathway.

肺动脉重构是肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)的重要病理特征之一, 与肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMC)增殖有关^[1-2]。导致肺动脉重构的因素较多, 其中包括 5-羟色胺(serotonin, 5-HT)^[3]。5-HT 经 RhoA/Rho 激酶(Rho kinase, ROCK)信号通路使

PASMC 增殖^[4]。选择性 5-HT 再摄取抑制剂氟西汀通过阻断 5-HT 转运体, 减少 PASMC 对 5-HT 的摄取, 抑制大鼠 PASMC 增殖^[5]; 而且, 本课题组前期研究发现氟西汀改善野百合碱诱导的大鼠肺动脉重构, 抑制大鼠 PAH^[6]; 氟西汀不仅对 PAH 大鼠肺动脉中 ROCK 蛋白表达和活性具有抑制作用, 还对蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)的活性同样具有

[收稿日期] 2015-01-04

[修回日期] 2015-04-03

[基金项目] 辽宁省博士启动基金资助项目(20131066)

[作者简介] 王寒明, 博士, 讲师, 研究方向为心血管药理学, E-mail 为 deagod1@163.com。艾秀丽, 硕士, 工程师, 研究方向为药动学与药效学, E-mail 为 aixiuli2006@163.com。

抑制作用^[6];然而,有文献报道 ROCK 抑制剂减少 ROCK 蛋白表达,却促进血管平滑肌细胞 Akt 激活^[7];那么,为何存在这一矛盾以及为何氟西汀能够抑制 5-HT 诱导的 PSMC 增殖,这些问题仍需研究。因此,本研究通过观察氟西汀对 5-HT 诱导的 PSMC RhoA 信号通路的影响,以探讨氟西汀抑制 5-HT 诱导的大鼠 PSMC 增殖的机制。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂

5-HT 盐酸盐 (H9523) 购于 Sigma 公司;氟西汀为印度 Cadila Pharmaceuticals 公司产品;法舒地尔 (101989) 购于百灵威科技有限公司;兔抗大鼠 ROCK2 多克隆抗体 (BA1766)、兔抗大鼠 5-HT 多克隆抗体 (BA0121-2) 购于武汉博士德生物工程有限公司;兔抗大鼠肌球蛋白磷酸酶目标亚基 1 (MYPT1) 多克隆抗体 (bs-2998R)、兔抗大鼠 p-MYPT1 多克隆抗体 (bs-3287R) 购于北京博奥森生物技术有限公司;小鼠抗大鼠 RhoA 单克隆抗体 (sc-418)、兔抗大鼠 Akt 多克隆抗体 (sc-8312)、兔抗大鼠 p-Akt 多克隆抗体 (sc-33437)、兔抗大鼠细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 多克隆抗体 (sc-292838)、兔抗大鼠 p-ERK 多克隆抗体 (sc-16982)、小鼠抗大鼠 β -actin 单克隆抗体 (sc-47778) 购于美国 Santa Cruz 公司;RIPA 裂解液 (P0013B)、细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒 (P0033) 购于碧云天生物科技有限公司。

1.2 肺动脉平滑肌细胞培养

取 6 周左右 150 ~ 180 g 的雄性 Wistar 大鼠 (由中国医科大学实验动物部提供,动物合格证号:辽实动字 034 号),用 3% 戊巴比妥钠麻醉,在无菌条件下快速剥离出肺动脉,去除脂肪与结缔组织,将肺动脉纵向剪开,轻刮肺动脉内膜,并将其切割成 1 mm² 的小块,贴壁接种于培养皿中;使用含有 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液 (含青霉素 100 kU/L 与链霉素 100 kU/L),在 37℃、5% CO₂ 的条件下进行孵育;培养 7 天后,镜下观察,组织块周围有大量细胞生长。取出组织块,更换培养液继续培养,直到细胞融合生长成长梭形,并有典型峰、谷状的 PSMC;用 0.125% 胰酶消化细胞,传代培养。实验使用第 3 ~ 6 代细胞。

1.3 实验分组

(1) 不同剂量氟西汀干预实验:分 5 组,对照组、5-HT 组 (1 μ mol/L)、0.1 μ mol/L 氟西汀 + 5-HT (1

μ mol/L) 组、1 μ mol/L 氟西汀 + 5-HT (1 μ mol/L) 组、10 μ mol/L 氟西汀 + 5-HT (1 μ mol/L) 组;在使用 5-HT 刺激 PSMC 1 h 前给予不同剂量氟西汀或超纯水,在 5-HT 刺激细胞 48 h 后收集细胞,然后进行各项指标的检测。(2) 不同剂量法舒地尔干预实验:分 5 组,对照组、5-HT (1 μ mol/L) 组、1 μ mol/L 法舒地尔 + 5-HT (1 μ mol/L) 组、10 μ mol/L 法舒地尔 + 5-HT (1 μ mol/L) 组、100 μ mol/L 法舒地尔 + 5-HT (1 μ mol/L) 组;在使用 5-HT 刺激 PSMC 1 h 前给予不同剂量法舒地尔或超纯水,在 5-HT 刺激细胞 48 h 后收集细胞,然后进行 RhoA 5-HT 化的检测。

1.4 噻唑蓝比色法观察细胞增殖

将 PSMC 接种于 96 孔板,每孔约 10⁴ 个细胞,并预留无细胞空白孔,所有孔加入 10% 胎牛血清培养液;培养 24 h,使细胞贴壁生长;更换 0.1% 胎牛血清的培养液后,继续培养 24 h,使细胞同步化;按照分组一进行分组,每组 8 孔,分别在 24 h 与 48 h 后于每孔 (包括空白孔) 中分别加入 0.5% 噻唑蓝溶液 20 μ L,继续培养 4 h;吸出培养液后,加入二甲亚砜 150 μ L,振荡 10 min,使用酶标仪在 490 nm 下检测吸光度 (A) 值,按照下列公式计算细胞增殖率:细胞增殖率 = $(A_{\text{样本}} - A_{\text{空白}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$ 。

1.5 Western Blot

收集细胞,按照蛋白提取试剂盒说明加入相应的预冷蛋白裂解液,提取全蛋白、膜蛋白或浆蛋白;用考马斯亮蓝法测定蛋白含量,制成上样液;配制不同浓度聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,当电泳染料抵达分离胶底部时,断开电源,取下凝胶;用湿转膜仪接负极到正极的顺序依次放置海棉、滤纸、胶、PVDF 膜、滤纸、海棉,去除每层间的气泡,根据分子量确定转膜电流和转膜时间,进行转膜;在 5% 脱脂奶粉中封闭 1 ~ 2 h;封闭结束后,将 PVDF 滤膜置于一抗中,4℃ 孵育过夜;室温下二抗孵育 1 ~ 2 h;加 ECL 发光液曝光,用成像系统检测蛋白条带,最后进行统计分析。以胞膜 RhoA (m-RhoA) 与胞浆 RhoA (c-RhoA)、p-MYPT1 与 MYPT1、p-Akt 与 Akt、p-ERK 与 ERK 的光密度值比分别作为 RhoA、ROCK、Akt、ERK 活化程度的指标,以 ROCK2 与 β -actin 的光密度值比作为 ROCK2 蛋白表达水平的指标。

1.6 免疫共沉淀

收集细胞,加入裂解液,超声破碎后,10000 r/min、4℃ 离心 10 min;用裂解液将各组蛋白稀释成 1 g/L 的浓度各 500 μ L;加入 1 μ L 抗 RhoA 抗体,

4℃缓慢摇晃孵育过夜;取 50 μL 琼脂糖珠,用适量裂解缓冲液洗 3 次,每次 3000 r/min 离心 3 min;将预处理过的 50 μL 琼脂糖珠加入到和抗体孵育过夜的细胞裂解液中,4℃缓慢摇晃孵育 4 h,使抗体与琼脂糖珠偶联;在 4℃以 3000 r/min 的速度离心 3 min,将琼脂糖珠离至管底;吸去上清,琼脂糖珠用 250 μL 裂解缓冲液洗 3 次;加入 4 μL 的 5 × 上样缓冲液和 16 μL 1 × 磷酸盐缓冲液,沸水煮 5 min 备用。用抗 5-HT 抗体与抗 RhoA 抗体进行 Western blot,对得到的蛋白条带进行统计分析,以 5-HT 化的 RhoA 与总 RhoA 的光密度值比作为 RhoA 5-HT 化的指标。

1.7 数据统计

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析采用 SPSS 13.0 软件,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 氟西汀抑制 5-HT 诱导的大鼠 PASM 增殖

培养的 PASM 加入 5-HT 刺激 48 h 后,细胞增殖率较对照组显著增加 ($P < 0.01$),氟西汀剂量依赖地抑制 5-HT 诱导的 PASM 增殖。但是,5-HT 刺激 PASM 24 h 时,各组细胞增殖率差异没有显著性(表 1)。

2.2 氟西汀对 5-HT 诱导 RhoA 信号通路的影响

培养的 PASM 加入 5-HT 刺激 48 h 后,RhoA 膜转位、MYPT1、ERK、Akt 磷酸化以及 ROCK2 表达均显著增加,氟西汀剂量依赖地抑制这些改变(图 1 和表 2)。

2.3 氟西汀与法舒地尔对 5-HT 诱导的 RhoA 5-HT 化的影响

培养的 PASM 加入 5-HT 刺激 48 h 后,RhoA 5-HT 化(s-RhoA)水平明显升高($P < 0.01$),氟西汀

剂量依赖性地抑制这一改变(表 2 和图 1)。但是法舒地尔对 5-HT 诱导的 RhoA 5-HT 化增加则没有影响(图 2)。

表 1. 氟西汀对 5-HT 诱导的 PASM 增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1. The effect of fluoxetine on serotonin-induced PASM proliferation($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组	细胞增殖率(24 h)	细胞增殖率(48 h)
对照组	100.1% ± 9.9%	112.1% ± 10.3%
5-HT 组	109.1% ± 13.7%	163.6% ± 23.7% ^a
0.1 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组	110.8% ± 9.2%	159.1% ± 12.8%
1 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组	108.3% ± 11.2%	134.8% ± 15.0% ^{bc}
10 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组	108.1% ± 11.2%	116.9% ± 10.7% ^{bed}

a 为 $P < 0.01$,与对照组相比;b 为 $P < 0.01$,与 5-HT 组相比;c 为 $P < 0.01$,与 0.1 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组相比;d 为 $P < 0.05$,与 1 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组相比。

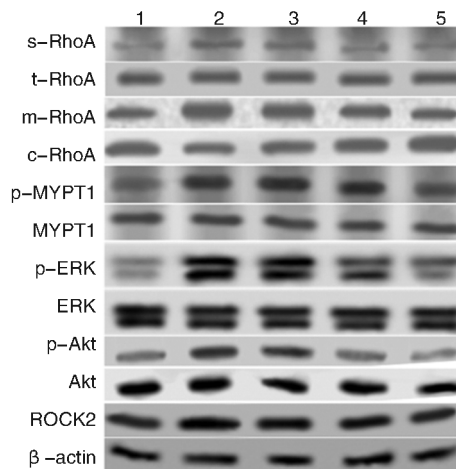


图 1. 氟西汀对 5-HT 诱导的 PASM RhoA 信号通路的影响 1 为对照组,2 为 5-HT 组,3 为 0.1 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组,4 为 1 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组,5 为 10 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组。

Figure 1. The effect of fluoxetine on serotonin-induced changes of RhoA signalling pathway in PASM

表 2. 氟西汀对 5-HT 诱导的 RhoA 信号通路的影响($\bar{x} \pm s, n = 3 \sim 5$)

Table 2. The effect of fluoxetine on serotonin-induced changes of RhoA signalling pathway in PASM ($\bar{x} \pm s, n = 3 \sim 5$)

分组	s-RhoA/t-RhoA	m-RhoA/c-RhoA	ROCK2/β-actin	p-MYPT1/MYPT1	p-ERK/ERK	p-Akt/Akt
对照组	0.70 ± 0.14	0.68 ± 0.09	0.88 ± 0.13	0.78 ± 0.10	0.59 ± 0.14	0.73 ± 0.08
5-HT 组	1.35 ± 0.20 ^a	1.46 ± 0.26 ^a	1.39 ± 0.17 ^a	1.27 ± 0.14 ^a	1.28 ± 0.17 ^a	1.34 ± 0.13 ^a
0.1 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组	1.32 ± 0.14	1.24 ± 0.05 ^b	1.33 ± 0.15	1.13 ± 0.15	1.25 ± 0.10	1.33 ± 0.10
1 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组	1.04 ± 0.17 ^{cd}	1.09 ± 0.16 ^c	1.09 ± 0.17 ^{cd}	1.06 ± 0.16 ^b	1.02 ± 0.11 ^{cd}	0.97 ± 0.08 ^{ce}
10 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组	0.71 ± 0.13 ^{ceg}	0.76 ± 0.13 ^{ceg}	0.83 ± 0.10 ^{cef}	0.85 ± 0.12 ^{cef}	0.76 ± 0.09 ^{ceg}	0.92 ± 0.13 ^{ce}

a 为 $P < 0.01$,与对照组相比;b 为 $P < 0.05$,c 为 $P < 0.01$,与 5-HT 组相比;d 为 $P < 0.05$,e 为 $P < 0.01$,与 0.1 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组相比;f 为 $P < 0.05$,g 为 $P < 0.01$,与 1 μmol/L 氟西汀 + 5-HT 组相比。

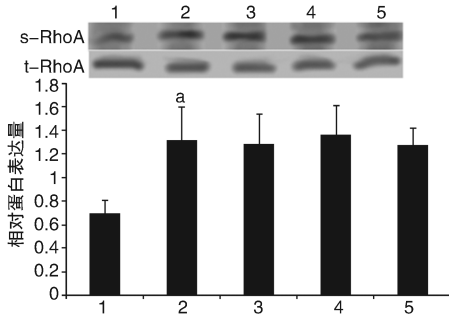


图 2. 法舒地尔对 5-HT 诱导的 PASMC RhoA 5-HT 化的影响($\bar{x} \pm s, n=3$) 1 为对照组, 2 为 5-HT 组, 3 为 1 $\mu\text{mol/L}$ 法舒地尔 + 5-HT 组, 4 为 10 $\mu\text{mol/L}$ 法舒地尔 + 5-HT 组, 5 为 100 $\mu\text{mol/L}$ 法舒地尔 + 5-HT 组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

Figure 2. The effect of fasudil on serotonin-induced change of RhoA serotonylation in PASMC ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

RhoA/Rho 激酶信号通路在 PAH 形成过程中具有重要作用。当该信号通路激活时, RhoA 在鸟嘌呤核苷酸交换因子的催化下, 由 GDP 形式转化为 GTP 形式, 并从胞浆转位到胞膜上, 活化 ROCK, 增加 MYPT1 磷酸化, 从而引起肺血管收缩^[8]。而且, 激活的 RhoA/ROCK 信号通路也参与 5-HT 诱导的 PASMC 增殖, ROCK 抑制剂对 5-HT 诱导的 PASMC 增殖以及 ROCK 下游 MYPT1 与 ERK 的磷酸化抑制显著^[4]。Guilluy 等^[7]发现氟西汀抑制 5-HT 诱导的血管平滑肌细胞 RhoA GTP 形式增加。本研究发现, 氟西汀抑制 5-HT 诱导的 PASMC RhoA 的膜转位、ROCK2 的蛋白过表达以及 MYPT1、ERK 磷酸化水平升高, 提示氟西汀对 5-HT 诱导的 PASMC RhoA/ROCK 信号通路激活具有抑制作用。

尽管 ROCK 抑制剂对 MYPT1、ERK 的活化具有抑制作用, 但对 5-HT 诱导的 PASMC Akt 的活化却无抑制作用, 甚至在血管平滑肌细胞中, 单独使用 ROCK 抑制剂可通过抑制 ROCK 的蛋白表达激活 Akt^[7]。然而, 我们以前的研究发现氟西汀抑制野百合碱诱导的大鼠肺动脉中 ROCK2 过表达, 同时抑制 Akt 激活的增加^[6]。本研究也发现, 氟西汀抑制 5-HT 诱导的 PASMC ROCK2 过表达以及 Akt 过度磷酸化。这可能是由于氟西汀通过 RhoA/ROCK 信号通路以外的其他通路抑制 Akt 的活性。有研究发现 PAH 患者肺组织和血小板中 RhoA 5-HT 化明显增加, 5-HT 刺激 PASMC RhoA 的 5-HT 化水平升高^[9]。本研究发现氟西汀抑制 5-HT 诱导的 PASMC RhoA 5-HT 化增加, 但是 ROCK 抑制剂法舒地尔对

5-HT 诱导的 RhoA 5-HT 化增加却没有影响。RhoA 5-HT 化除了需要 5-HT 进入 PASMC 外, 还需要转谷氨酰胺酶的催化, 转谷氨酰胺酶抑制剂磺酰尸胺对 5-HT 诱导的 RhoA 5-HT 化及 Akt 磷酸化均有抑制作用^[10]。提示氟西汀抑制 5-HT 诱导的 Akt 活性增加可能与阻断 RhoA 5-HT 化有关。

5-HT 是刺激 PASMC 增殖的有效自体活性物质, 早期的研究已发现 ERK 抑制剂、Akt 抑制剂、ROCK 抑制剂或者选择性 5-HT 再摄取抑制剂均能抑制 5-HT 诱导 PASMC 增殖^[4-5]。此外, 转谷氨酰胺酶抑制剂对 5-HT 诱导的 PASMC 增殖也具有抑制作用^[9]。本研究在重现氟西汀抑制 5-HT 诱导的 PASMC 增殖的基础上, 发现氟西汀对 RhoA/ROCK 以及 RhoA 的 5-HT 化两条不同的通路均发挥抑制作用。

综上所述, 氟西汀通过阻断 RhoA 信号通路抑制 5-HT 诱导的 PASMC 增殖。

[参考文献]

- [1] Grant JS, White K, MacLean MR, et al. MicroRNAs in pulmonary arterial remodeling [J]. Cell Mol Life Sci, 2013, 70(23): 4 479-494.
- [2] 张凌云, 高宝安. 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.
- [3] Gray EA, Tsuchimochi H, Pearson JT, et al. Assessment of the serotonin pathway as a therapeutic target for pulmonary hypertension [J]. J Synchrotron Radiat, 2013, 20(Pt 5): 756-764.
- [4] Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, et al. Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin [J]. Circ Res, 2004, 95(6): 579-586.
- [5] Eddahibi S, Fabre V, Boni C, et al. Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin [J]. Circ Res, 1999, 84(3): 329-336.
- [6] 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): 1 506-515.
- [7] Guilluy C, Rolli-Derkinderen M, Tharaux PL, et al. Transglutaminase-dependent RhoA activation and depletion by serotonin in vascular smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 2007, 282(5): 2 918-928.
- [8] Duong-Quy S, Bei Y, Liu Z, et al. Role of Rho-kinase and its inhibitors in pulmonary hypertension [J]. Pharmacol Ther, 2013, 137(3): 352-364.
- [9] 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.
- [10] Penumatsa K, Abualkhair S, Wei L, et al. Tissue transglutaminase promotes serotonin-induced AKT signaling and mitogenesis in pulmonary vascular smooth muscle cells [J]. Cell Signal, 2014, 26(12): 2 818-825.

(此文编辑 许雪梅)