

补肺益肾方对 TGF- β_1 /BMP-4 诱导的肺血管平滑肌细胞 TGF- β_1 /Smad 信号通路的影响

任周新^{1,2*}, 李建生^{1,2}, 沈俊岭³, 梅晓峰¹, 余海滨³, 冯月¹

(1. 河南中医药大学, 郑州 450046; 2. 呼吸疾病诊疗与新药研发河南省协同创新中心, 郑州 450046; 3. 河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

[摘要] 目的:探讨补肺益肾方对转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/骨形成蛋白-4 (BMP-4) 诱导的肺血管平滑肌细胞增殖及 TGF- β_1 /Smad 信号传导的影响,并探讨其相关的作用机制。方法:应用 TGF- β_1 /BMP-4 诱导人肺动脉平滑肌细胞增殖。细胞分为正常组(10%正常大鼠血清),诱导增殖组(含 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 与 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BMP-4 的 10%正常大鼠血清),4%补肺益肾方含药血清(含 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 与 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BMP-4,6%正常大鼠血清及 4%补肺益肾大鼠血清),6%补肺益肾方含药血清(含 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 与 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BMP-4,4%正常大鼠血清及 6%补肺益肾大鼠血清)及 8%补肺益肾方含药血清组(含 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 与 5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BMP-4,2%正常大鼠血清及 8%补肺益肾大鼠血清)。24 h 后,显微镜下观察细胞的密度,5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)法检测细胞增殖,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Smad1,2,3 和 5 以及 p-Smad2/3 蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应法(Real-time PCR)检测纤溶酶原激活物抑制物-1 (PAI-1),结缔组织生长因子(CTGF),分化抑制因子-1(ID-1)和 ID-2 mRNA 的表达。结果:TGF- β_1 /BMP-4 作用 24 h 后,细胞密度增加、细胞增殖率显著增加($P < 0.05$),补肺益肾方抑制 TGF- β_1 /BMP-4 诱导的细胞增殖,显示出浓度依赖性,其中 8%浓度显著抑制细胞增殖($P < 0.01$)。TGF- β_1 /BMP-4 及补肺益肾方均不影响 Smad1,2,3 和 5 蛋白的表达;但 TGF- β_1 /BMP-4 诱导 p-Smad2/3 的表达($P < 0.05$),8%补肺益肾方显著抑制 TGF- β_1 /BMP-4 诱导的 p-Smad2/3 表达($P < 0.05$)。TGF- β_1 /Smad2 通路的下游效应基因的检测发现,TGF- β_1 /BMP-4 及补肺益肾方均不影响 PAI-1, ID-1 和 ID-2 mRNA 的表达;但 TGF- β_1 /BMP-4 诱导后,CTGF mRNA 表达水平的显著增加($P < 0.01$),8%补肺益肾方抑制 TGF- β_1 /BMP-4 诱导的 CTGF mRNA 的表达($P < 0.05$)。结论:补肺益肾方抑制 TGF- β_1 与 BMP-4 合用诱导的肺动脉平滑肌细胞的增殖,抑制 p-Smad2/3/CTGF 通路的活化是可能的作用途径。

[关键词] 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/骨形成蛋白-4 (BMP-4); 补肺益肾方; 肺动脉平滑肌细胞; TGF- β_1 /Smad 通路; 增殖

[中图分类号] R22;R24;R285.5;R289;R256.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0126-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180937

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180228.1723.002.html>

[网络出版时间] 2018-03-01 13:43

Effect of Bufei Yishen Formula on TGF- β_1 /Smad Signaling Pathway of Human Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells Induced by TGF- β_1 and BMP-4

REN Zhou-xin^{1,2*}, LI Jian-sheng^{1,2}, SHEN Jun-ling³, MEI Xiao-feng¹, YU Hai-bin³, FENG Yue¹

(1. Henan University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Zhengzhou 450046, China;

2. Collaborative Innovation Center for Respiratory Disease Diagnosis and Treatment & Chinese Medicine Development of Henan Province, Zhengzhou 450046, China;

3. First Affiliated Hospital of Henan University of TCM, Zhengzhou 450000, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of the study was to explore the effect of Bufei Yishen formula

[收稿日期] 20170913(015)

[基金项目] 国家中医临床研究基地业务建设第二批科研专项(JDZX2015156)

[通信作者] *任周新,博士,高级实验师,从事呼吸疾病的中医药基础与应用研究, Tel:0371-65676568, E-mail:renzhouxin123@126.com

(BFYS) on cellular proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells induced by transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) /bone morphogenetic protein-4 (BMP-4), furthermore, to explore the effect of BFYS on TGF- β_1 /Smad signaling pathway in the cells. **Method:** TGF- β_1 /BMP-4 was used to induce proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. The cells were divided normal group (10% normal rat serum), induced-proliferation group (10% normal rat serum with 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 and 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BMP-4), 4% BFYS serum group (6% normal rat serum with 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 and 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BMP-4 and 4% BFYS rat serum), 6% BFYS serum group (4% normal rat serum with 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 and 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BMP-4 and 6% BFYS rat serum) and 8% BFYS serum group (2% normal rat serum with 7.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TGF- β_1 and 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BMP-4 and 8% BFYS rat serum). After 24 h induction, cell density was observed under a microscope; 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU) was used to detect the cellular proliferation; Western blot was used to detect the Smad 1, 2, 3, 5 and p-Smad2/3 protein expression, and Real-time PCR was used to detect plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), connective tissue growth factor (CTGF), dominant negative helix-loop-transcription factors-1 (ID-1) and ID-2 mRNA expression. **Result:** After 24 h of TGF- β_1 /BMP-4 treatment, the cells density was increased under micro-examination with significant increase in cellular proliferation ratio ($P < 0.05$). BFYS inhibited TGF- β_1 /BMP-4-induced cellular proliferation in a dose dependent manner, with significant decrease in 8% concentration group ($P < 0.01$). Both TGF- β_1 /BMP-4 and BFYS showed no significant effect on Smad1, 2, 3 and 5 proteins expression. However, p-Smad2/3 expression was significant increased by TGF- β_1 /BMP-4 induction ($P < 0.05$) and 8% BFYS significantly reduced its expression ($P < 0.05$). For assays of down-stream genes expression of TGF- β_1 /Smad pathway, TGF- β_1 /BMP-4 and BFYS showed no significant effect on PAI-1, ID-1 and ID-2 mRNA expression. But TGF- β_1 /BMP-4 increased CTGF mRNA expression ($P < 0.01$) and 8% BFYS inhibited TGF- β_1 /BMP-4 induced CTGF mRNA expression ($P < 0.05$). **Conclusion:** BFYS reduced TGF- β_1 /BMP-4 induced cellular proliferation of human pulmonary arterial smooth muscle cells, and its mechanisms might be associated with inhibiting p-Smad2/3/CTGF pathway.

[Key words] transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) /bone morphogenetic protein-4 (BMP-4); Bufei Yishen formula; human pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMCs); TGF- β_1 /Smad signaling; proliferation

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 是以不完全可逆的气流受限为特征的呼吸性疾病。患者长期缺氧、慢性炎症等对肺血管床的压迫和破坏, 导致肺动脉压力的持续升高与血管重塑, 形成肺动脉高压, 从而进一步降低患者的运动耐力、增加死亡率, COPD 合并肺动脉高压患者的 5 年生存率仅有 10%^[1]。目前对这类患者的治疗, 尚无突破性进展^[2]; 考虑到整体治疗的优势, 有学者呼吁应重视中医中药的治疗作用并开展相应的机制研究^[3]。

补肺益肾方是治疗慢性阻塞性肺疾病肺肾气虚证的中药颗粒剂, 已获国家发明专利 (专利号 ZL 2011 1 0117578.1), 临床取得较好的疗效^[4-6]。另外, 在实验研究中发现补肺益肾方抑制 COPD 大鼠肺动脉血管壁的增厚、抑制右心肥厚^[7-8], 提示补肺益肾方可能具有抑制肺动脉血管重塑的作用。肺血管重塑是形成肺动脉高压的重要病理机制之一, 涉及多种细胞和复杂的机制, 其中, 肺动脉血管平滑肌

细胞的过度增殖是导致肺血管重塑的重要病理环节, 涉及转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 超家族的信号转导^[9]。研究发现, 该超家族的 2 个亚群 TGF- β 与骨形成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP) 介导的信号通路均参与了平滑肌细胞增殖的调控, 存在相互拮抗的调节效应^[9]。显然, 应用两类细胞因子诱导细胞的增殖, 较传统的单纯 TGF- β_1 诱导细胞的增殖, 能够更好地模拟疾病的病理状态和评价中医方剂的治疗效果。本课题组首次应用 TGF- β_1 与 BMP-4 诱导人肺动脉平滑肌细胞增殖的模型评估中药复方 (补肺益肾方含药血清) 的干预效应, 并对 TGF- β_1 及 BMP-4 通路重要的信号转导分子及下游效应靶基因表达进行检测, 推测补肺益肾方抑制肺血管平滑肌细胞增殖的作用机制。

1 材料

1.1 药物 补肺益肾方主要由人参 9 g, 黄芪 15 g, 山茱萸 12 g, 枸杞子 12 g, 五味子 9 g, 淫羊藿 9 g, 浙

贝母 9 g, 赤芍 9 g, 地龙 12 g, 紫苏子 9 g, 矮地茶 15 g, 陈皮 9 g 组成, 由河南中医药大学第一临床医学院中药制剂与剂型改革基地提供, 经河南中医药大学第一附属医院陈天朝主任药师鉴定符合 2015 年版《中国药典》规定。补肺益肾方制备方法为五味子粉、陈皮水蒸馏 5 h, 收集挥发油, 备用; 五味子和陈皮水蒸馏 5 h, 收集挥发油, 备用。药渣与人参粉、山茱萸、浙贝母及紫苏子 80% 乙醇回流提取, 浓缩成浸膏备用。药渣加水煎煮 1 h, 滤液备用; 黄芪、枸杞子、淫羊藿、赤芍、地龙和矮地茶加水煎煮, 得到滤液; 混合 2 次滤液, 浓缩得到浸膏。合并 2 次浸膏, 与糊晶混合、制粉, 备用; 挥发油与糊晶混合, 制粉; 合并 2 种药粉, 经干燥等处理, 即得。

1.2 细胞和动物 人肺动脉平滑肌细胞购于上海子实生物科技有限公司。SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 4 月龄, 体质量 200 ~ 220 g, 由河南省实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(豫)2015-0004。实验通过河南中医药大学第一附属医院实验动物福利审查委员会批准, 编号 YFYD2016027。

1.3 试剂 重组人 TGF- β_1 , 重组人 BMP-4 (美国 Peprotech 公司, 批号分别为 0316209-1, 0916346); 高糖 DMEM 细胞培养基, 青链霉素混合液 (美国

Solarbio 公司, 批号分别为 20160822, 20160427); 胰蛋白酶 (美国 BBI Life Sciences 公司, 批号 B911FA0001); 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 细胞增殖检测试剂盒 (美国 Biovision Incorporated 公司, 批号 2M08K03060); trizol 超纯 RNA 提取试剂盒 (张家口赛诺生物科技有限公司, 批号 40267142); PCR-0208-C PCR 八连排管 (美国 Axygen 公司); HiScript II 1ST Strand cDNA Synthesis Kit, Aceq qPCR SYBR Green Master Mix (南京诺唯赞生物科技公司, 批号分别为 L/N 7E 191D7, L/N 7E180F7); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司, 批号 R6KA9704H); 兔抗 Smad2 + Smad3 磷酸化多克隆抗体 (美国 Abcam 公司, 上海分装, 批号 R6KA9704H); 兔抗 Smad1, 2, 3, 5 多克隆抗体, 山羊抗兔 IgG Goat Anti-Rabbit IgG (武汉博士德公司, 批号分别为 ZP1796BP79, 601041B12F71J72, ZP1785BP85, 13A124, BA1054); 兔抗 β -肌动蛋白 (β -actin) 多克隆抗体 (美国 Proteintech 公司, 批号 20536-1-AP); 彩虹 245 plus 广谱蛋白 marker, ECL plus 超敏发光液 (美国 Solarbio 公司, 批号分别为 20170119, 20160928)。引物序列见表 1, 均为南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence list

基因	引物序列 5'-3'	序列长度/bp
纤溶酶原激活物抑制物-1 (PAI-1)	上游 CATCCTGGAAGTCCCTACC	20
	下游 TTCCAGTGGCTGATGAGCTG	20
结缔组织生长因子-1 (CTGF-1)	上游 GTTTGGCCCAGACCAACTA	20
	下游 GGCTCTGCTTCTAGCCTG	20
分化抑制因子-1 (ID-1)	上游 GCCTGCCTGCCCTGC	15
	下游 GTCGATGACGTGCTGGAGAA	20
ID-2	上游 CCGTGAGGTCCGTTAGAAA	20
	下游 TGAGCTTGGAGTAGCAGTCC	20
甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)	上游 AGAAGGCTGGGGCTCATTTG	20
	下游 AGGGCCATCCACAGTCTTC	20

1.4 仪器 Multiskan Go 型全波长酶标仪 (美国 Thermo Scientific 公司); Veriti 96 型梯度热循环仪/PCR 仪, 7500 型实时荧光 PCR 仪 (美国 ABI 公司); 28-9560-57 型核酸蛋白定量检测仪 (美国 NanoVue Plus 公司); 164-5070 通用型 PowerPac Universal 电源, 165-8000 小型垂直电泳槽, 170-3910 小型 Trans-Blot 转印槽及 ChemiDoc MP 型凝胶成像系统

(Biorad Imager) (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 大鼠随机分为正常组、补肺益肾方组。补肺益肾方组以 18 g·kg⁻¹ 连续灌胃 3 d, 每天 2 次, 2 次相隔 12 h, 连续灌胃 7 次; 正常组灌胃给予等量生理盐水。末次给药后 2 h (灌药前禁食不禁水 12 h) 腹主动脉采血, 3 000 r·min⁻¹ 离心

15 min, 无菌分离血清, 同组血清相混合, 经 56 °C 灭活 30 min 后, -20 °C 保存备用。

2.2 细胞的培养和传代 细胞培养于 5 mL 含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 完全培养液中 (含有 1% 的青霉素, 1% 链霉素), 常规 37 °C 5% CO₂ 培养。待汇合度达 80% ~ 90%, 胰酶消化, 按照 1:3 传代, 4 ~ 8 代细胞用于下述实验。

2.3 分组 每孔 1 × 10⁵ 个/孔的密度将细胞接种到 6 孔细胞培养板上, 待汇合度达到 80%, 吸弃培养液, 加入含 0.1% 血清的 DMEM 完全培养液, 培养 24 h。吸弃培养液, 加入 10% 正常大鼠血清的 DMEM 完全培养液 (正常组), 含有 7.5 μg · L⁻¹ TGF-β₁ 与 5.0 μg · L⁻¹ BMP-4 的 10% 正常大鼠血清的 DMEM 完全培养液 (增殖组), 及含有不同浓度的补肺益肾方含药血清的含有 7.5 μg · L⁻¹ TGF-β₁ 与 5.0 μg · L⁻¹ BMP-4 用正常大鼠血清补充使最终大鼠血清浓度达到 10% 的 DMEM 培养液。培养 24 h, 显微镜下观察后, 分别进行以下实验。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 Smad1, 2, 3 和 5 以及 p-Smad2/3 蛋白表达 PBS 洗涤贴壁细胞 2 次, 弃去 PBS, 每孔加入添加了 PMSF 的膜和细胞浆蛋白提取液 (碧云天生物公司), -70 °C 和室温反复融冻 3 次, 显微镜下观察细胞的破碎率 > 90%。蛋白定量后, 每个样本上样量 15 ~ 30 mg, SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转印到 PVDF 膜。转印膜经过 5% 脱脂奶粉的封闭、分别用兔抗 Smad1, 2, 3, 5, p-Smad2/3 多克隆抗体或 β-actin 多克隆抗体作为一抗孵育过夜 (浓度依次为 1:100, 1:100, 1:100, 1:100, 1:500, 1:500), TBST 液洗涤、山羊抗兔 IgG 作为二抗孵育 (浓度 1:500), TBST 洗涤, ECL 化学发光目的蛋白, Chemical Doc MP 图像分析系统检测蛋白表达的光强度值 (Intensity, Int)。结果以目的蛋白的检测值与 β-actin 检测值的比值表示。

2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应法 (Real-time PCR) 检测 PAI-1, CTGF, ID-1, ID-2 mRNA 的表达 trizol 法提取总 RNA, 使用 HiScript II 1st Strand cDNA synthesis 试剂盒将总 RNA 逆转录合成为 cDNA, 再进行 PCR 反应, 反应条件为 95 °C 5 min, 95 °C 10 s, 60 °C 60 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。以正常样本为对照, 检测样本的基因表达水平是正常样本基因表达水平的 2^{-ΔΔC_t} 倍, ΔΔC_t 按照下列公式求得。

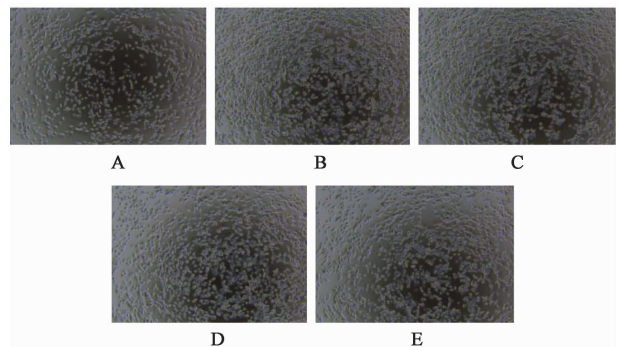
$$\Delta\Delta C_t = (C_{t \text{ 检测样本的待测基因}} - C_{t \text{ 检测样本的GADPH}}) - (C_{t \text{ 正常样本的待测基因}} - C_{t \text{ 正常样本的GADPH}})$$

2.6 BrdU 法检测细胞的增殖 以每孔 50 个/μL 接种 A549 细胞于 96 孔板, 24 h 贴壁后, 更换无血清培养基同步化培养 12 h。更换培养液, 按如上分组并更换培养液。培养 24 h, 每孔加入 10 × BrdU 液 10 μL, 37 °C 孵育 3 h; 弃培养液, 每孔加入 Fixing/Denaturing 100 μL, 室温孵育 30 min; 弃培养液, 加入 1 × BrdU Detection Antibody 液 100 μL, 室温孵育 1 h; 弃培养液, 洗涤液洗涤 2 次, 加入 1 × Anti-mouse HRP-linked 抗体液, 室温孵育 1 h; 洗涤液洗涤 3 次, 加入 TMP 液 100 μL, 室温避光 25 min; 加入终止液 100 μL 终止颜色反应, 450 nm 检测吸光度 A。正常组细胞增殖率为 100%, 其他各组细胞增殖率 = (A_{实验组} / A_{正常组}) × 100%。

2.7 统计学方法 所有数据采用 SPSS 19.0 统计分析软件处理, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 的 SNK 法 (方差齐) 或 Dunnett-t 法 (方差不齐), 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。显著性水平取 α = 0.05。P < 0.05 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 补肺益肾方含药血清对 TGF-β₁/BMP-4 诱导的细胞增殖的影响 肺动脉平滑肌细胞呈现明显的峰-谷状分布, TGF-β₁/BMP-4 组细胞的分布密度高于正常大鼠血清组, 含药血清组的细胞密度有一定程度的降低, 尤以 8% 含药血清组的细胞密度较小。BrdU 增殖检测的结果显示, 与正常大鼠血清组比较, TGF-β₁/BMP-4 组细胞增殖率明显增加 (P < 0.05); 与 TGF-β₁/BMP-4 组比较, 补肺益肾方含药血清组的细胞增殖率随着剂量的增加而减少, 其中 8% 血清组与 TGF-β₁/BMP-4 组的细胞增殖率的比较, 差异具有显著性 (P < 0.01)。见图 1, 表 2。



A. 正常组; B. TGF-β₁/BMP-4 组; C ~ E. 4%, 6%, 8% 补肺益肾方含药血清组 (图 2, 3 同)

图 1 补肺益肾方含药血清对 TGF-β₁/BMP4 诱导的细胞增殖的影响 (BrdU, × 50)

Fig. 1 Effect of Bufeiyishen formula on proliferation of PASM cells treated with TGF-β₁/BMP4 (BrdU, × 50)

表 2 补肺益肾方含药血清对 TGF-β₁/BMP4 诱导的细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of Bufei Yishen formula on proliferation ratio of PSMCs treated with TGF-β₁/BMP4 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	体积分数/%	细胞增殖率/%
正常	-	100.0 ± 5.5
TGF-β ₁ /BMP-4	-	118.6 ± 8.3 ¹⁾
补肺益肾方	4	108.7 ± 4.2 ¹⁾
	6	104.0 ± 5.5
	8	94.1 ± 4.0 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 TGF-β₁/BMP-4 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 补肺益肾方含药血清对 TGF-β₁/BMP-4 诱导细胞的 Smads 蛋白表达的影响 TGF-β₁/BMP-4 未见明显影响细胞浆内 Smad1, Smad2, Smad3 和 Smad5 蛋白表达,补肺益肾方含药血清也未见明显影响。见图 2,表 3。

表 3 补肺益肾方含药血清对 TGF-β₁/BMP4 诱导细胞 Smad1,2,3 和 5 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of Bufei Yishen formula on Smad1,2,3 and 5 protein expression of PSMCs treated with TGF-β₁/BMP4 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	体积分数/%	Smad1/β-actin	Smad2/β-actin	Smad3/β-actin	Smad5/β-actin
正常	-	0.707 ± 0.212	0.738 ± 0.142	1.110 ± 0.159	0.218 ± 0.022
TGF-β ₁ /BMP-4	-	0.529 ± 0.079	0.730 ± 0.174	0.970 ± 0.215	0.230 ± 0.060
补肺益肾方	4	0.565 ± 0.048	0.752 ± 0.095	0.955 ± 0.194	0.183 ± 0.016
	6	0.576 ± 0.045	0.674 ± 0.047	0.924 ± 0.152	0.174 ± 0.021
	8	0.562 ± 0.121	0.742 ± 0.194	0.909 ± 0.162	0.212 ± 0.037

3.3 补肺益肾方含药血清对 TGF-β₁/BMP-4 诱导细胞的 p-Smad2/3 蛋白表达的影响 与正常组比较,TGF-β₁/BMP-4 组 p-Smad2/3 蛋白的表达明显增加 ($P < 0.05$); 与 TGF-β₁/BMP-4 组比较,补肺益肾方减少 p-Smad2/3 蛋白的表达显示出剂量依赖性,其中 8% 补肺益肾方明显减少 p-Smad2/3 蛋白的表达 ($P < 0.05$)。见图 3,表 4。

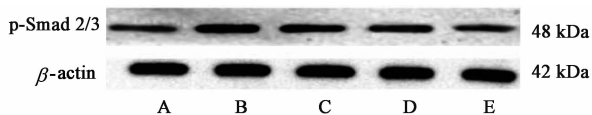


图 3 补肺益肾方含药血清对 TGF-β₁/BMP4 诱导细胞的 p-Smad2/3 蛋白表达电泳

Fig. 3 Effect of Bufei Yishen formula on p-Smad2/3 protein expression of PSMCs treated with TGF-β₁/BMP4

3.4 补肺益肾方含药血清对 PAI-1, ID-1 和 ID-2, CTGF mRNA 表达的影响 TGF-β₁/BMP-4 未见明显影响 PAI-1, ID-1 和 ID-2 mRNA 的表达,补肺益肾方含药血清也未见明显影响;与正常组比较,TGF-

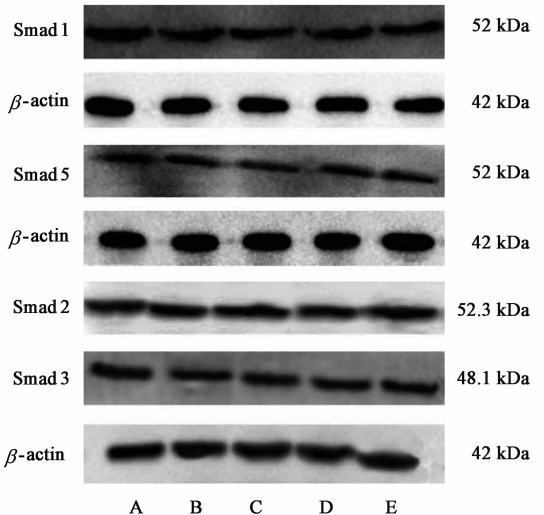


图 2 补肺益肾方含药血清对 TGF-β₁/BMP4 诱导细胞 Smad1,2,3 和 5 蛋白表达的电泳

Fig. 2 Effect of Bufei Yishen formula on Smad1,2,3 and 5 protein expression of PSMCs treated with TGF-β₁/BMP4

表 4 补肺益肾方含药血清对 TGF-β₁/BMP4 诱导细胞的 p-Smad2/3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 4 Effect of Bufei Yishen formula on p-Smad2/3 protein expression of PSMCs treated with TGF-β₁/BMP4 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	体积分数/%	p-Smad2/3/β-actin
正常	-	0.255 ± 0.069
TGF-β ₁ /BMP-4	-	0.441 ± 0.055 ¹⁾
补肺益肾方	4	0.322 ± 0.048
	6	0.290 ± 0.047
	8	0.262 ± 0.019 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 TGF-β₁/BMP-4 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

β₁/BMP-4 组 CTGF mRNA 的表达显著升高 ($P < 0.01$); 补肺益肾方含药血清减少 CTGF mRNA 的表达,其中 8% 补肺益肾方减少明显 ($P < 0.05$)。见表 5。

4 讨论

TGF 超家族主要分为 TGF-β 和 BMP 两个亚家族,

表 5 补肺益肾方血清对 PAI-1, ID-1, ID-2 及 CTGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of Bufeiyishen formula on PAH-1, CTGF, ID-1 and ID-2 mRNA expression of PASCs treated with TGF- β_1 /BMP4 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	体积分数/%	PAH-1	CTGF	ID-1	ID-2
正常	-	1.00 \pm 0.41	1.00 \pm 0.39	1.00 \pm 0.35	1.00 \pm 0.31
TGF- β_1 /BMP-4	-	1.50 \pm 0.24	3.71 \pm 0.86 ¹⁾	1.24 \pm 0.17	1.03 \pm 0.13
补肺益肾方	4	1.18 \pm 0.17	4.09 \pm 0.21 ¹⁾	1.00 \pm 0.07	0.93 \pm 0.04
	6	1.31 \pm 0.17	3.68 \pm 0.35 ¹⁾	1.02 \pm 0.09	1.14 \pm 0.08
	8	1.08 \pm 0.12	2.26 \pm 0.12 ^{1,2)}	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.22

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 TGF- β_1 /BMP-4 组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

均参与了多种生物学机能的调控。在鼠类肺动脉高压模型中,观察到 TGF- β_1 信号的亢进和 BMP 信号的低下^[10-11];一些体外研究也发现 TGF- β_1 诱导肺动脉平滑肌细胞的增殖,而多种 BMP (BMP-4, BMP-2 等)抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖^[12-15]。近期,有学者提出这两个家族涉及平滑肌细胞增殖的信号通路之间存在相互拮抗的关系^[16]。笔者前期的研究发现,一定剂量的范围内, TGF- β_1 与 BMP-4 合用, TGF- β_1 促进而 BMP-4 抑制肺动脉平滑肌细胞的增殖,支持两者之间存在拮抗作用的观点;另外发现某些优化组合促进细胞的增殖。与单纯的 TGF- β_1 诱导的细胞增殖比较,理论上这种促增殖效应涉及 BMPs 介导的信号通路的干预,与血管平滑肌细胞异常增殖的病理机制更为吻合。在本次研究中,肺动脉平滑肌细胞在 TGF- β_1 /BMP-4 的诱导下,呈现典型的“峰-谷”状分布,细胞增殖迅速。补肺益肾方含药血清抑制 TGF- β_1 /BMP-4 诱导的细胞增殖,显示出剂量依赖性。

TGF- β_1 和 BMP-4 分别与细胞膜上的相应受体结合,激活胞浆中的蛋白信号分子, TGF- β_1 激活 Smad2 和 Smad3, BMP-4 激活 Smad1 和 Smad5。可见上述蛋白在胞浆中表达量的变化,影响信号的传递。实验的结果发现, TGF- β_1 /BMP-4 处理细胞的上述蛋白的表达量并未出现明显的变化,也未发现补肺益肾方显著的干预这些蛋白的表达。一个合理的推断是补肺益肾方的抗增殖作用与细胞浆内的 Smad 蛋白的合成量无关。

TGF- β_1 诱导细胞增殖的作用,主要依赖于经典通路的活化^[17-19]。活化的 Smad2 与 Smad3 形成磷酸化的复合物 p-Smad2/3, 再与 Smad4 结合,进入细胞核、结合靶基因,调控基因的表达,产生促进细胞增殖的效应。可见, p-Smad2/3 水平的高低是其信号传导的关键环节。本实验中,补肺益肾方减少 p-

Smad2/3 的表达水平,可能是其抑制 TGF- β_1 /BMP-4 诱导的细胞增殖的重要机制。

经典的 TGF- β_1 通路活化后,下游靶基因 PAI-1 和 CTGF mRNA 的表达上调。观察到 BMP-4 的拮抗作用,表现在 PAI-1 的表达受到抑制,并未显著增加。但 BMP-4 的拮抗作用对不同的 TGF- β_1 靶基因的干预强度存在差异,如 CTGF mRNA 表达未受到明显的抑制。CTGF 具有增加细胞增殖、促进细胞迁移和增加细胞外基质合成等作用^[20-21],是 TGF- β_1 信号通路的重要效应基因。补肺益肾方减弱 CTGF mRNA 的表达,可能是其抑制上游 P-Smad2/3 表达的反映。

BMP-4 通路活化导致下游靶基因 ID-1 和 ID-2 的 mRNA 表达上调,其中 ID-1 是肺动脉平滑肌细胞增殖的关键效应蛋白^[22]。但 TGF- β_1 与 BMP-4 合用,这两个靶基因的表达没有明显的变化,表明 TGF- β_1 对 BMP-4 诱导的信号通路活化有较强的干预效应,也未发现补肺益肾方对这两个基因转录的明显干预效应。上述结果提示,本研究中的 TGF- β_1 /BMP-4 诱导的细胞增殖可能由 TGF- β_1 活化介导的部分靶基因活化介导, BMP-4 显示了一定的拮抗效应;与目前常用的 TGF- β_1 诱导的细胞增殖模型,在机制上存在差异。

早期的实验发现补肺益肾方减少 COPD 大鼠肺小动脉壁的厚度,提示其可能具有预防或治疗继发的肺动脉高压的远后效应^[7-8]。本次研究证实补肺益肾方的靶细胞之一是肺动脉平滑肌细胞,阐释抑制 TGF- β_1 /BMP-4 活化的 p-Smad2/3-CTGF 通路是其作用机制。本研究的结果有助于开拓补肺益肾方的临床应用范围,发掘其潜在的应用价值。

[参考文献]

[1] Zakyntinos E, Daniil Z, Papanikolaou J, et al. Pulmonary hypertension in COPD: pathophysiology and

- therapeutic targets [J]. *Curr Drug Targets*, 2011, 12 (4):501-513.
- [2] Jasińska-Stroschein M, Orszulak-Michalak D. The current approach into signaling pathways in pulmonary arterial hypertension and their implication in novel therapeutic strategies [J]. *Pharmacol Rep*, 2014, 66 (4):552-564.
- [3] 宋燕,房芳. COPD 合并 PH 的内科治疗研究进展 [J]. *中国医学创新*, 2014, 11 (35):149-152.
- [4] XIE Y, LI J S, YU X Q, et al. Effectiveness of Bufeī Yishen granule (补肺益肾颗粒) combined with acupoint sticking therapy on quality of life in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19 (4):260-268
- [5] 李素云,周庆伟,王明航,等. 以补肺益肾法复方制剂调节慢性阻塞性肺疾病缓解期患者肺通气及免疫功能:随机分组安慰剂对照(英文) [J]. *中国临床康复*, 2006, 10 (7):145-147.
- [6] 李素云,周庆伟,吴纪珍. 补肺益肾颗粒对 COPD 缓解期患者肺通气功能和免疫功能的影响 [J]. *山东中医杂志*, 2003, 22 (6):333-335.
- [7] 王英,李亚,李建生,等. 调补肺肾三法对慢性阻塞性肺疾病大鼠右心室重构的影响和远后效应 [J]. *中医杂志*, 2013, 54 (5):415-419, 429.
- [8] 李素云,李亚,李建生,等. 调补肺肾三法治疗慢性阻塞性肺疾病大鼠疗效及远后效应 [J]. *中华中医药杂志*, 2012, 27 (12):3116-3121.
- [9] 任周新,李建生,余海滨,等. 转化生长因子 β 及骨形成蛋白通路调节肺动脉血管平滑肌细胞异常增殖 [J]. *重庆医科大学学报*, 2017, doi:10.13406/j.cnki.cyx.001359.
- [10] Morty R E, Nejman B, Kwapiszewska G, et al. Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27:1072-1078.
- [11] LONG L, Crosby A, YANG X, et al. Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease [J]. *Circulation*, 2009, 119 (4):566-576.
- [12] YAN Y, WANG X J, LI S Q, et al. Elevated levels of plasma transforming growth factor- β_1 in idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 222:368-374.
- [13] Sturrock A, Cahill B, Norman K, et al. Transforming growth factor-beta 1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290 (4):L661-L673.
- [14] WONG G A, TANG V, El-Sabeawy F, et al. BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells *via* p21^{Cip1/Waf1} [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 284 (5):E972-E979.
- [15] CAI P, Kovacs L, DONG S, et al. BMP 4 inhibits PDGF-induced proliferation and collagen synthesis *via* PKA-mediated inhibition of calpain-2 in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 312 (5):L638-L648.
- [16] Sheares K K, Jeffery T K, Long L, et al. Differential effects of TGF-beta1 and BMP 4 on the hypoxic induction of cyclooxygenase-2 in human pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 287 (5):L919-927.
- [17] Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, et al. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders [J]. *Chest*, 2005, 128 (6):585S-590S.
- [18] Tsai S, Hollenbeck S T, Ryer E J, et al. TGF- β through Smad3 signaling stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation [J]. *Am J Physiol Heart Physiol*, 2009, 297:H540-H549.
- [19] Suwanabol P A, Seedial S M, ZHANG F, et al. TGF- β and Smad3 modulate PI3K/Akt signaling pathway in vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302 (11):H2211-H2219.
- [20] FAN W H, Pech M, Karnovsky M J. Connective tissue growth factor (CTGF) stimulates vascular smooth muscle cell growth and migration *in vitro* [J]. *Eur J Cell Biol*, 2000, 79 (12):915-23.
- [21] WANG R, DING X, ZHOU S, et al. MicroRNA26b attenuates monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling *via* targeting connective tissue growth factor (CTGF) and cyclin D₁ (CCND₁) [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (45):72746-72757.
- [22] YANG J, LI X, LI Y, et al. Id proteins are critical downstream effectors of BMP signaling in human pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 305 (4):L312-L321.

[责任编辑 全燕]