## 研究论文

# NF-кB抑制剂通过逆转LPS诱导的BMPRII下调改善肺血管重构

周美君1, 邢岩江3, 杨 隽2,3,\*

<sup>1</sup>中国医学科学院基础医学研究所,北京协和医学院基础医学院,医学分子生物学国家重点实验室,北京 100005;<sup>2</sup>浙江大学 医学院基础医学院生理学系,浙江大学医学院附属第二医院心内科,杭州 310058;<sup>3</sup>中国医学科学院基础医学研究所,北京 协和医学院基础医学院细胞生物学系,医学分子生物学国家重点实验室,北京 100005

**摘要:**动脉性肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)的发生、发展与骨形态发生蛋白受体II型(bone morphogenetic protein receptor type II, BMPRII)编码基因的遗传突变和核因子кB (nuclear factor кB, NF-кB)通路介导的炎症反应密切相关。本 文旨在研究NF-кB通路抑制剂对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的肺动脉内皮细胞损伤的作用。用1  $\mu$ g/mL的LPS处理人 肺动脉内皮细胞, 用免疫印迹和qPCR检测BMPRII和白介素8 (interleukin-8, IL-8)的表达水平。腹腔注射野百合碱(monocrotaline, MCT)建立大鼠PAH模型, 用免疫荧光染色法检测肺动脉内皮细胞BMPRII和IL-8的表达情况, 检测模型大鼠心脏血流 动力学变化和肺血管重构情况。结果显示, LPS可引起人肺动脉内皮细胞BMPRII的表达下调和IL-8的表达上调, NF-кB抑制 剂BAY11-7082 (10  $\mu$ mol/L)可逆转LPS的作用。在MCT-PAH大鼠模型中, 肺动脉内皮细胞BMPRII表达下调, IL-8表达上调, 右心室/(左心室+室间隔)重量比值[weight ratio of right ventricle to left ventricle plus septum, RV/(LV+S)]和右心室收缩压(right ventricular systolic pressure, RVSP)显著升高, 心输出量(cardiac output, CO)和三尖瓣环收缩期位移(tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE)明显降低, 肺血管壁明显增厚, 连续21天腹腔注射BAY11-7082 (5 mg/kg)可逆转上述变化。以上结果提示, LPS通过NF-кB信号通路下调BMPRII的表达水平, 促进PAH的发生、发展, 因此NF-кB信号通路可作为PAH潜在治疗靶点。

关键词:肺动脉高压;骨形态发生蛋白受体II型;核因子κB信号通路;BAY11-7082 中图分类号:R3

## NF-κB inhibitor improves pulmonary vascular remodeling by reversing LPSinduced down-regulation of BMPRII

ZHOU Mei-Jun<sup>1</sup>, XING Yan-Jiang<sup>3</sup>, YANG Jun<sup>2, 3, \*</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS), School of Basic Medicine, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100005, China; <sup>2</sup>Department of Physiology, and Department of Cardiology of the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China; <sup>3</sup>State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Department of Cell Biology, Institute of Basic Medical Sciences, CAMS, School of Basic Medicine, PUMC, Beijing 100005, China

**Abstract:** The occurrence and development of pulmonary arterial hypertension (PAH) is closely related to the genetic mutation of bone morphogenetic protein receptor type II (BMPRII) encoding gene and the inflammatory response mediated by nuclear factor  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ) pathway. This paper was aimed to investigate the effect of NF- $\kappa B$  pathway inhibitors on lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary artery endothelial cell injury. Human pulmonary artery endothelial cells were treated with 1 µg/mL of LPS. The expression levels of BMPRII and interleukin-8 (IL-8) were detected by Western blot and qPCR. The rat PAH model was established by intraperitoneal (i.p.) injection of monocrotaline (MCT). The expression levels of BMPRII and IL-8 in pulmonary artery endothelial cells were detected by immunofluorescence staining. Cardiac hemodynamic changes and pulmonary vascular remodeling were detected in the

Received 2019-10-26 Accepted 2020-06-02

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81670054) and the Innovation Project of Chinese Academy of Medical Sciences (No. CIFMS 2016-I2M-4-003).

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-571-88208265; E-mail: yang\_jun@zju.edu.cn

MCT-PAH model rats. The results showed that LPS caused down-regulation of BMPRII expression and up-regulation of IL-8 expression in human pulmonary artery endothelial cells. NF-κB inhibitor BAY11-7082 (10 µmol/L) reversed the effect of LPS. In the pulmonary artery endothelial cells of MCT-PAH model, BMPRII expression was down-regulated, IL-8 expression was up-regulated, weight ratio of right ventricle to left ventricle plus septum [RV/(LV+S)] and right ventricular systolic pressure (RVSP) were significantly increased, cardiac output (CO) and tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) were significantly reduced, and pulmonary vessel wall was significantly thickened. BAY11-7082 (5 mg/kg, i.p., 21 consecutive days) reversed the above changes in the MCT-PAH model rats. These results suggest that LPS down-regulates the expression level of BMPRII through NF-κB signaling pathway, promoting the occurrence and development of PAH. Therefore, the NF-κB pathway can be used as a potential therapeutic target for PAH.

**Key words:** pulmonary arterial hypertension; bone morphogenetic protein receptor type II; nuclear factor κB signaling pathway; BAY11-7082

动脉性肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH)的病理特征包括血管内皮细胞、平滑肌 细胞和成纤维细胞增殖与凋亡之间的失衡引起的毛 细肺动脉的狭隘和堵塞、肺动脉管壁的异常增厚<sup>[1]</sup> 和肺血管阻力进行性升高导致的右心衰竭<sup>[2]</sup>。PAH 的发病机制涉及一个复杂的多因素的过程,其中内 皮细胞功能障碍在肺血管系统的结构变化中发挥着 不可或缺的作用<sup>[3]</sup>。特发性 PAH 具有丛状病变的 典型病理特征,内皮层不规则渠道中存在巨噬细胞、 淋巴细胞和树突状细胞炎性浸润<sup>[4]</sup>。

骨形态发生蛋白受体 II 型 (bone morphogenetic protein receptor type II, BMPRII) 是转化生长因子 β (transforming growth factor β, TGF-β) 受体超家族成 员之一<sup>[5]</sup>。在遗传性肺动脉高压中,大约70%的病 例检测出 BMPR2 基因不同位点的杂合突变。此外, 在15%~40%的特发性肺动脉高压病例中也检测到 BMPR2 基因突变<sup>[6]</sup>。因此, BMPR2 家系杂合突变 的鉴定为遗传性肺动脉高压的病理生理学研究提供 了重要的依据<sup>[7]</sup>。肺动脉高压患者肺动脉内皮细胞 (pulmonary artery endothelial cells, PAECs) 呈增生性 和抗凋亡表型<sup>[8]</sup>。研究显示, BMPRII和 Bax 基因 的体细胞突变在特发性肺动脉高压患者中可能促进 了内皮细胞的增殖<sup>[9]</sup>。BMP 配体可促进血管内皮细 胞增殖<sup>[10]</sup>。这一作用是由 BMPRII 受体介导的,受 体的失活会引发内皮细胞凋亡<sup>[11]</sup>。肺动脉平滑肌细 胞和 PAECs 的过度增殖和凋亡抵抗可导致肺动脉 高压患者的肺血管重构。因此, BMP 信号的正常 转导对肺血管功能的维持十分重要。

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性 细胞壁的主要成分,是内皮细胞炎症反应的引发因 素之一。LPS 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ )都能诱导肺血管细胞凋亡<sup>[12]</sup>。研究显示, 核因子  $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 信号通路参与

促炎细胞因子 (如 IL-1β 和 IL-6) 的转录<sup>[13]</sup>。Davies 等研究显示,在遗传性肺动脉高压中,LPS 能激活 肺血管平滑肌细胞中 NF-кB 信号通路,并上调促炎 细胞因子 IL-6 的表达<sup>[14]</sup>。炎症在各种类型肺动脉 高压的发病过程中起着重要的作用。死亡的内皮细 胞释放促炎细胞因子和黏附分子,吸引炎症细胞, 增加其向动脉内膜的增殖和迁移,导致血管损伤和 舒张功能障碍。研究显示, NF-κB的激活能够上调 心血管平滑肌细胞中 BMP2 表达水平<sup>[15]</sup>。此外, NF-кB 能够在软骨细胞中调控 BMP2 的转录活性<sup>[16]</sup>。 然而,关于肺动脉高压中 NF-κB 信号通路与 BMP-RII 之间的关系还鲜有报道,且 BMPRII 与炎症反 应的联系还有待研究。因此,本研究使用 NF-κB 信 号通路抑制剂 BAY11-7082 探讨 NF-κB 在 PAECs 炎症反应中的作用,以及该作用机制是否涉及 BM-PRII, 以期为 PAH 提供潜在的治疗靶点。

### 1 材料与方法

**1.1 主要试剂** EGM-2 培养基购自 Lonza 公司; 胎牛血清购自 Hyclone 公司;免疫荧光二抗购自 Thermo Fisher 公司;TRIzol 总 RNA 提取试剂盒、 LPS、BAY11-7082、RIPA 裂解液、野百合碱 (monocrotaline, MCT) 均购自 Sigma-Aldrich 公司;BMP9、 FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒 购自 R&D Systems 公司;小鼠抗人 GAPDH 抗体购自 TransGen 公司; 兔抗人 BMPRII、兔抗大鼠 BMPRII、兔抗人 IL-8 抗体购自 Abclonal 公司;小鼠抗大鼠 CD31、兔抗 大鼠 CD68 抗体购自 Abcam 公司;山羊抗鼠及山羊 抗兔 HRP 标记二抗购自北京中杉金桥公司。

**1.2 PAECs 的培养及分组** 人肺动脉内皮细胞 (hPAECs) 由 Lonza 公司提供,用 EGM-2 培养基培养, 并将其置于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养,每两天 换液。将生长好的 hPAECs 置于 EBM-2 (EGM-2 的

基础培养基,不含血清,购自Lonza公司)中饥 饿12h,随机分为:(1)正常对照(control)组:EBM-2 培养基中培养24h;(2)BMP9刺激组:培养液中加 入10 ng/mL BMP9刺激24h;(3)LPS单独作用组: 培养液中加入1µg/mL LPS刺激24h;(4)BAY单 独作用组:培养液中加入10µmol/L BAY11-7082刺 激24h;(5)LPS+BMP9刺激组:培养液中加入1 µg/mL LPS和10 ng/mL BMP9刺激24h;(6)LPS 浓度变化组:在培养液中加入10 ng/mL BMP9的同 时分别加入0.1、1、10µg/mL LPS刺激24h;(7) BAY11-7082处理组:在(5)的基础上同时加入10 µmol/L BAY11-7082刺激24h。

1.3 qPCR 检测 mRNA 药物处理后收集细胞, TRIzol 法提取总 RNA,将2 µg 总 RNA 反转录成 cDNA, 检测 GAPDH、IL-8、BMPR2 mRNA 表达 水平。以 GAPDH 为内参,反应条件为:95 ℃ 预 变性 30 s; 95 ℃ 变性 5 s, 60 ℃ 退火延伸 30 s, 40 个循环。根据扩增曲线,采用 2<sup>-^ACt</sup> 方法进行相对 定量。PCR 引物序列使用 Primer 3 进行设计,得到 引物如下: BMPR2: 上游引物: 5'-GAGTGAAG-GAAGCACCGAAG-3',下游引物:5'-CCCCA AAT-TATTTCCCTCGT-3,产物片段长度:247 bp。IL-8: 上游引物:5'-TTTTGCCAAGGAGTGCTAAAGA-3', 下游引物:5'-AACCCTCTGCACCCAGTTTTC-3', 产物片段长度:194 bp。GAPDH:上游引物: 5'-AACAGCCTCAAGATCATCAGC-3',下游引物: 5'-GGATGATGTTCTGGAGAGCC-3', 产物片段长 度:199bp。

1.4 免疫印迹分析 药物处理后收集 hPAECs, 置于干冰上,然后在 RIPA 中加入蛋白酶抑制剂并 将其置于冰上裂解 30 min。将总蛋白裂解产物 (20 μg) 于十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶中 60 V 恒压持 续电泳 40 min 后,改成 100 V 电压电泳 60 min,然 后电转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 用 5% 脱脂奶粉稀释一、二抗。抗 GAPDH (1:5 000)、 抗 BMPRII (1:1 000)、抗 IL-8 抗体 (1:2 000) 4 °C 孵 育过夜,TBST 洗 3 次,每次 10 min,二抗室温孵 育 1 h 后,再用 TBST 清洗 3 次后,用 ECL 显色, 凝胶系统进行显影。用 Image J 软件进行条带灰度 扫描分析,计算方法:目标蛋白相对表达水平 = 目 标蛋白条带的灰度值 / GAPDH 条带的灰度值。

**1.5 细胞凋亡的检测** 药物处理后,使用 0.05% Trypsin-EDTA 对 hPAECs 进行消化并收集。采用

FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒 I 分析 hPAECs 的 凋亡率。采用 BDAccuriC6 流式细胞仪对样品进行 分析。利用 Accuri CFlow<sup>®</sup> 或 CFlow Plus 软件将细 胞分为活细胞、坏死细胞和凋亡细胞,计算各组细 胞凋亡率。

1.6 肺动脉高压大鼠模型的建立 所有动物实验 方案均得到中国医学科学院和北京协和医学院动物 保护与使用机构委员会批准。所有动物护理和实验 方法均按照《动物实验机构伦理指南》进行。15只 Sprague Dawley 雄性大鼠 (购自北京华阜康生物 科技股份有限公司)随机分为对照组、MCT组和 BAY11-7082 治疗组。对照组 5 只大鼠采用生理盐 水腹腔注射。剩下10只大鼠采用一次性腹腔注射 55 mg/kg MCT 建立肺动脉高压模型。在模型大鼠 中随机选出5只,连续21天腹腔注射5mg/kg BAY11-7082, 21 d 后进行后续实验。右心室肥厚的 指标为右心室 /( 左心室 + 室间隔 ) 重量比值 [weight ratio of right ventricle to left ventricle plus septum, RV/ (LV+S)]。采用 BL-420S 生理实验系统对右心室收 缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP) 进行 监测。采用小动物超声仪检测心输出量 (cardiac output, CO) 和三尖瓣环收缩期位移 (tricuspid annular plane systolic excursion, TAPSE)。右肺固定于 4% 福 尔马林中性缓冲液中进行组织学观察。

1.7 HE 染色分析 将收取的大鼠肺组织置于 4% 的多聚甲醛中固定 48 h 后进行脱水,石蜡包埋,使用切片机 (Leica 公司)进行切片,切片厚度 5 μm,脱蜡后,蒸馏水清洗 2 min,在切片上滴上一滴苏木素染色液进行染色 5 min 后,使用自来水冲洗 10 min,滴入 95% 乙醇 5 s 后,使用伊红染色液染色 30 s。将染好的切片进行脱水、透明处理。最后使用中性树胶进行封片,置于阴凉通风处存放。显微镜观察肺血管形态学变化。

**1.8 免疫荧光分析** 将大鼠肺组织固定,石蜡包 埋,使用切片机 (Leica 公司)进行切片,切片厚度 5 μm,脱蜡。将脱蜡后的大鼠肺组织进行 97 °C EDTA 抗原修复,用封闭液(PBS + 0.05% Tween + 5% BSA)封闭 1 h。用封闭液稀释一抗,一抗分别为抗 IL-8 (1:60)、抗 BMPRII (1:2 000)、抗 CD68 (1:1 000) 和抗 CD31 (1:4 000) 抗体,4 °C 过夜。第二天用封 闭液稀释荧光二抗 (抗小鼠 Alexa Fluor594 和抗兔 Alexa Fluor488 抗体),室温孵育切片 2 h。核染色 采用 DAPI 试剂。镜下观察切片。 **1.9 统计学分析** 实验数据以 mean ± SD 形式表示,统计检验采用 GraphPad Prism 5 软件进行,用 one-way ANOVA 进行多组间比较分析,组间两两比 较采用 Tukey 法, *P* < 0.05 时认为差异有统计学意义。

#### 2 结果

#### 2.1 LPS能降低BMPRII和上调IL-8在hPAECs中的表达

BMP9 已被证明可通过与 BMPRII 启动子区的 结合调节其表达,同时通过与受体的结合提高肺血 管细胞中的 BMPRII 下游信号<sup>[17]</sup>。为了考察 hPAECs 中 LPS 与 BMPRII 之间的关系,本研究在用 BMP9 上调 hPAECs 中 BMPRII 表达的同时,用 1 μg/mL 的 LPS 刺激 24 h。结果显示,与对照组相比,BMP9 处理的 hPAECs 中 BMPRII 表达上调,在培养基中 加入 LPS 后,BMPRII 蛋白水平相对于只加 BMP9 组显著下调,qPCR 结果与蛋白结果一致(图 1*A、B*)。

Soon 等研究显示, LPS 刺激可上调肺动脉平滑 肌细胞 IL-6 等促炎性因子表达水平<sup>[18]</sup>。本研究采 用不同浓度的 LPS (0.1, 1, 10 µg/mL) 分别刺激 hPAECs, 结果显示, LPS 能够诱导 IL-8 的表达,且作用具有 剂量-效应关系(图 1*C、D*)。

## 2.2 BAY11-7082逆转LPS诱导的IL-8和BMPRII在 hPAECs中的表达

本研究使用 NF-κB 抑制剂 BAY11-7082 进行



图 1. LPS降低BMPRII和上调IL-8在人肺动脉内皮细胞中的表达

Fig. 1. LPS reduced the expression of BMPRII and increased the expression of IL-8 in hPAECs. *A*, *C*: Western blot results of BM-PRII and IL-8. *B*, *D*: The mRNA expression BMPRII and IL-8 measured by qPCR. Mean  $\pm$  SD, n = 3. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001.

阻断干预,通过免疫印迹和 qPCR 考察 NF-κB 在 LPS 引起 BMPRII 表达下调过程中的作用。结果 显示,在使用 LPS 和 BMP9 刺激的 hPAECs 中加入 BAY11-7082 后,BMPRII mRNA 表达明显高于未 加 BAY11-7082 (10 μmol/L)组,但是蛋白水平并没 有上调(图 2*A*、*C*)。该结果表明,BAY11-7082 能 够在 mRNA 水平逆转 hPAECs 中 LPS 刺激引起的 BMPRII 下调。

同时,本研究也对 hPAECs 中炎性因子 IL-8 的 表达水平进行免疫印迹检测,结果显示,LPS 和 BAY11-7082 联合处理的 hPAECs 中 IL-8 的表达水 平比仅用 LPS 刺激有明显下调(图 2*B*)。qPCR 结 果与免疫印迹实验结果一致(图 2*C*)。该结果表明, BAY11-7082 可逆转 LPS 诱导的 hPAECs 中 IL-8 表 达水平上调。

#### 2.3 BAY11-7082减少LPS诱导的hPAECs晚期凋亡

流式细胞术结果显示,使用 1 μg/mL LPS 处理 hPAECs 24 h 后,细胞出现调亡(图 3)。为了考察 BAY11-7082 对细胞调亡的作用,本研究利用 LPS、 BMP9 和 BAY11-7082 处理 hPAECs,流式结果显示,



图 2. BAY11-7082逆转LPS诱导的IL-8和BMPRII在人肺动脉内皮细胞中的表达

Fig. 2. BAY11-7082 reversed LPS-induced expression of IL-8 and BMPRII in hPAEC. *A*, *B*: The mRNA expression of BMPRII (*A*) and IL-8 (*B*) measured by qPCR. *C*: Western blot results of BMPRII and IL-8. Mean  $\pm$  SD, n = 3. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

BAY11-7082 能够显著下调单独 LPS 刺激 hPAECs 引起的细胞晚期凋亡 (图 3)。

## 2.4 三组大鼠RVSP、RV/(LV+S)、CO及TAPSE的 比较结果

相比于对照组,未经治疗的 MCT 组大鼠的 RV/ (LV+S) 和 RVSP 明显升高(图 4*A、B*), TAPSE 和 CO 明显降低(图 4*C、D*)。相比于未治疗的 MCT 组, 使用 BAY11-7082 治疗的 MCT 处理大鼠 RV/(LV+S) 和 RVSP 明显降低 (图 4*4*、*B*), TAPSE 和 CO 明显 升高 (图 4*C*、*D*)。以上结果表明,肺动脉高压模型 大鼠造模成功, BAY11-7082 对 MCT 引起的肺动脉 高压大鼠模型具有一定治疗效果。

#### 2.5 BAY11-7082对大鼠肺血管重构的影响

为了研究 BAY11-7082 对肺血管重构的作用, 本研究使用 HE 染色观察肺血管壁的变化。结果显 示, MCT 组大鼠肺血管壁对比于对照组明显增厚,



**FITC-Annexin-V** 



图 3. BAY11-7082减少LPS诱导的人肺动脉内皮细胞晚期凋亡

Fig. 3. BAY11-7082 reduced the late-apoptotic ratio in LPS-induced hPAECs. FITC-Annexin-V analysis was performed to detect the late-apoptotic ratio in hPAECs. Mean  $\pm$  SD, n = 3. \*\*\*\*P < 0.000 1. BAY, BAY11-7082.



Fig. 4. Comparison results of right ventricular systolic pressure (RVSP), weight ratio of right ventricle to left ventricle plus septum [RV/(LV+S)], cardiac output (CO) and tricuspid annular plane systolic excursion (TAPSE) in three groups of rat models. Mean  $\pm$  SD, n = 3.  ${}^{*}P < 0.05$ ,  ${}^{**}P < 0.001$ ,  ${}^{****}P < 0.0001$ . BAY, BAY11-7082; MCT, monocrotaline.

而 BAY11-7082 能够改善 MCT 处理大鼠肺血管壁 增厚现象(图 5)。

## 2.6 BAY11-7082对MCT处理大鼠PAECs中IL-8与 BMPRII表达的影响

为了研究 BAY11-7082 对于 MCT 处理大鼠中 IL-8 和 BMPRII 表达含量的影响,本研究进行了内 皮细胞特异性标志物 CD31 与 BMPRII 和 IL-8 共定 位检测。免疫荧光结果显示,与正常对照组大鼠相 比,MCT 组大鼠 PAECs BMPRII 表达量下调,IL-8 表达量明显上调,而用 BAY11-7082 处理可逆转这 一现象(图 6*A、B*)。此外,本研究使用了巨噬细胞 表达的标志物 CD68 来评价巨噬细胞的分布,结果 显示,在 MCT 组大鼠中 CD68<sup>+</sup> 巨噬细胞浸润在血 管丛样病变区中,但未出现在内皮区域,在使用 BAY11-7082 治疗后巨噬细胞在血管丛样病变区浸 润减少(图 6*C*)。该结果提示,PAECs 中 BMPRII 表达水平下调及 IL-8 表达水平的上调共同参与 PAH 的发生, BAY11-7082 可抑制 PAH 的发生。

## 3 讨论

本研究结果显示,LPS 能够通过 NF-кB 信号通路抑制 hPAECs 中 BMPRII 的表达,表明 NF-кB 信号通路可能成为肺动脉高压的潜在治疗靶点。在使用 LPS (1 µg/mL) 刺激 hPAECs 24 h 后,IL-8 的表达量增加,BAY11-7082 可以逆转 LPS 引起的这些分子病理变化。进一步研究结果显示,BAY11-7082 能够减少 LPS 诱导引起的内皮细胞的晚期凋亡。相对于正常对照组大鼠,MCT 组大鼠 PAECs 中的BMPRII 表达下调,IL-8 表达上调,CD68 阳性细胞的数量(巨噬细胞)表达增多,MCT 处理大鼠连续 21 天腹腔注射 BAY11-7082 可以逆转这一现象的产生。除此之外,该大鼠的 RVSP、RV/(LV+S) 和 CO相比 MCT 组大鼠都有所改善。

BMPR2 突变携带者比非携带者更易于发生肺动

CON MCT MCT+BAY

图 5. 各组肺血管HE染色结果

Fig. 5. HE staining results of pulmonary blood vessels. Scale bar, 50 µm. BAY, BAY11-7082; MCT, monocrotaline.



图 6. BAY11-7082对MCT处理大鼠内皮细胞中IL-8与BMPRII表达的影响

Fig. 6. Effect of BAY11-7082 on expression of IL-8 and BMPRII in MCT-treated rat endothelial cells detected by immunofluorescence staining. *A*: BMPRII; *B*: IL-8; *C*: CD68. CD31 is a specific marker of endothelial cells. Scale bar, 50 μm. 脉高压,并且表现出更严重的血流动力学特征<sup>[19]</sup>。 已有针对肺动脉高压中 BMPRII 半倍剂量不足的治 疗方法,即通过表达外源性 BMP 配体,并通过剩 余的有功能的受体增强信号转导<sup>[20]</sup>。BMP9一方面 通过基因转录调控增加 BMPRII 的表达,另一方面 通过提高配体量增加与内皮细胞上 BMPRII 的结合, 从而恢复缺陷的信号,这表明该配体可将内皮细胞 信号向 BMPRII 转移<sup>[17]</sup>。IL-8 是趋化家族的细胞因 子,研究表明在 BMPRII 缺陷的 hPAMCs 中 IL-8 表达水平上调<sup>[18]</sup>。但是并没有报道指出在 hPAECs 中关于 IL-8 与 BMPRII 之间的关系。因此,在本研 究中,我们在 hPAECs 中使用 BMP9 来增加 BMP-RII 信号转导,并观察 IL-8 的表达。

LPS 是革兰氏阴性菌细胞外膜的组成部分<sup>[21]</sup>。 LPS-TLR4/NF-кB 信号通路在不同生物过程中都扮 演着重要角色,包括免疫反应、细胞增殖和炎症<sup>[22]</sup>。 LPS 首先与膜蛋白 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)结合,并激活 NF-κB,使其进入细胞核并调 控炎症和细胞凋亡相关基因的表达<sup>[23]</sup>。巨噬细胞清 除凋亡细胞在重塑和炎症消退等细胞过程中具有重 要的促稳态作用<sup>[24]</sup>。凋亡细胞清除的失败导致二次 坏死组织损伤,并与慢性炎症和自身免疫性疾病有 关<sup>[25]</sup>。Oliveira 等用 LPS 注射小鼠体内 96 h 后,发 现相对于野生型小鼠, LPS 处理小鼠肺中 BMPRII 的表达量降低<sup>[22]</sup>。Chowdhury等研究显示,BMP-RII 缺乏可降低 Bcl-xL 表达,导致内皮细胞凋亡<sup>[26]</sup>。 LPS 可通过 NF-кB 通路引起免疫反应, 且在小鼠体 内 LPS 可下调 BMPRII 表达。本研究结果显示, LPS 引起 hPAECs 中 BMPRII 表达水平下调和 IL-8 表达 水平上调,并且导致 hPAECs 凋亡。

Willette 等研究显示, NF-κB 信号通路的激活 可以导致人血管平滑肌细胞中 BMP2 表达增加<sup>[27]</sup>。 Graham 等研究显示, 在 C4-2B 细胞中, TNF-α 诱 导 NF-κB 的激活从而促进 BMP2 mRNA 转录, 在 前列腺癌细胞中 BMP2/BMPR2 可通过激活 NF-κB 从而激活 Smad 通路<sup>[28]</sup>。Simic 等研究显示, 在内 皮细胞中敲除 *BMPRII* 会导致 NF-κB 信号通路的激 活和内皮炎症的发生<sup>[29]</sup>。BMPRII 如何触发 NF-κB 信号通路还需要进一步的阐明,可能与细胞类型 和生物演化有关。根据以上研究结果,本研究用 NF-κB 信号通路抑制剂 BAY11-7082 处理 hPAECs 后, 检测 IL-8 及 BMPRII 的表达,结果显示 BAY11-7082 能够降低 IL-8 表达水平,上调 BMPRII 表达水平。 值得注意的是,BAY11-7082处理的MCT-PAH大 鼠 RV/(LV+S)和 RVSP值相对未给药MCT-PAH大 鼠明显降低,TAPSE和CO值明显恢复,且肺血管 重构现象有所改善,提示NF-κB信号通路可作为 PAH 潜在治疗靶点。

综上所述,本研究显示,LPS 刺激可引起 hPAECs 中 BMPRII 表达下调,并使 IL-8 表达水平升高,引 起炎症反应,进而促进细胞凋亡。在 NF-κB 抑制剂 存在的情况下,这种病理变化能被有效逆转。本研 究结果表明,NF-κB 信号通路在肺动脉高压的发病 过程中起着重要的作用。但是 NF-κB 信号通路抑制 剂影响 PAH 发生和发展的具体作用机制,有待进 一步探讨和阐明。

#### 参考文献

- Morrell NW, Adnot S, Archer SL, Dupuis J, Jones PL, MacLean MR, McMurtry IF, Stenmark KR, Thistlethwaite PA, Weissmann N, Yuan JX, Weir EK. Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. J Am Coll Cardiol 2009; 54(1 Suppl): S20–S31.
- 2 Gaine SP, Rubin LJ. Primary pulmonary hypertension. Lancet 1998; 352(9129): 719–725.
- 3 Humbert M, Montani D, Perros F, Dorfmuller P, Adnot S, Eddahibi S. Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. Vascul Pharmacol 2008; 49(4–6): 113– 118.
- 4 Dorfmuller P, Humbert M, Perros F, Sanchez O, Simonneau G, Muller KM, Capron F. Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. Hum Pathol 2007; 38(6): 893–902.
- 5 Warburton D, Schwarz M, Tefft D, Flores-Delgado G, Anderson KD, Cardoso WV. The molecular basis of lung morphogenesis. Mech Dev 2000; 92(1): 55–81.
- 6 Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. J Am Coll Cardiol 2009; 54(1 Suppl): S43–S54.
- 7 Long L, Ormiston ML, Yang X, Southwood M, Graf S, Machado RD, Mueller M, Kinzel B, Yung LM, Wilkinson JM, Moore SD, Drake KM, Aldred MA, Yu PB, Upton PD, Morrell NW. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. Nat Med 2015; 21(7): 777–785.
- 8 Jonigk D, Golpon H, Bockmeyer CL, Maegel L, Hoeper

MM, Gottlieb J, Nickel N, Hussein K, Maus U, Lehmann U, Janciauskiene S, Welte T, Haverich A, Rische J, Kreipe H, Laenger F. Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension composition, architecture, and microenvironment. Am J Pathol 2011; 179(1): 167–179.

- 9 Soubrier F, Chung WK, Machado R, Grunig E, Aldred M, Geraci M, Loyd JE, Elliott CG, Trembath RC, Newman JH, Humbert M. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. J Am Coll Cardiol 2013; 62(25 Suppl): D13–D21.
- 10 Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, Brugman M, Itoh S, Lebrin F, Sideras P, ten Dijke P. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. Circulation 2002; 106(17): 2263–2270.
- 11 Teichert-Kuliszewska K, Kutryk MJ, Kuliszewski MA, Karoubi G, Courtman DW, Zucco L, Granton J, Stewart DJ. Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. Circ Res 2006; 98(2): 209–217.
- 12 Wang X, Zhao Z, Zhu K, Bao R, Meng Y, Bian J, Wan X, Yang T. Effects of CXCL4/CXCR3 on the lipopolysaccharide-induced injury in human umbilical vein endothelial cells. J Cell Physiol 2019; 234(12): 22378–22385.
- 13 Hoesel B, Schmid JA. The complexity of NF-kappaB signaling in inflammation and cancer. Mol Cancer 2013; 12: 86.
- 14 Davies RJ, Holmes AM, Deighton J, Long L, Yang X, Barker L, Walker C, Budd DC, Upton PD, Morrell NW. BMP type II receptor deficiency confers resistance to growth inhibition by TGF-beta in pulmonary artery smooth muscle cells: role of proinflammatory cytokines. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2012; 302(6): L604–L615.
- 15 He J, Zhong X, Zhao L, Gan H. JAK2/STAT3/BMP-2 axis and NF-kappaB pathway are involved in erythropoietininduced calcification in rat vascular smooth muscle cells. Clin Exp Nephrol 2019; 23(4): 501–512.
- 16 Feng JQ, Xing L, Zhang JH, Zhao M, Horn D, Chan J, Boyce BF, Harris SE, Mundy GR, Chen D. NF-kappaB specifically activates BMP-2 gene expression in growth plate chondrocytes *in vivo* and in a chondrocyte cell line *in vitro*. J Biol Chem 2003; 278(31): 29130–29135.
- 17 Upton PD, Davies RJ, Trembath RC, Morrell NW. Bone morphogenetic protein (BMP) and activin type II receptors balance BMP9 signals mediated by activin receptor-like kinase-1 in human pulmonary artery endothelial cells. J Biol Chem 2009; 284(23): 15794–15804.
- 18 Soon E, Crosby A, Southwood M, Yang P, Tajsic T, Toshner M, Appleby S, Shanahan CM, Bloch KD, Pepke-Zaba J, Upton P, Morrell NW. Bone morphogenetic protein receptor

type II deficiency and increased inflammatory cytokine production. A gateway to pulmonary arterial hypertension. Am J Respir Crit Care Med 2015; 192(7): 859–872.

- 19 Girerd B, Montani D, Eyries M, Yaici A, Sztrymf B, Coulet F, Sitbon O, Simonneau G, Soubrier F, Humbert M. Absence of influence of gender and BMPR2 mutation type on clinical phenotypes of pulmonary arterial hypertension. Respir Res 2010; 11: 73.
- 20 Ormiston ML, Upton PD, Li W, Morrell NW. The promise of recombinant BMP ligands and other approaches targeting BMPR-II in the treatment of pulmonary arterial hypertension. Glob Cardiol Sci Pract 2015; 2015(4): 47.
- 21 Akashi S, Saitoh S, Wakabayashi Y, Kikuchi T, Takamura N, Nagai Y, Kusumoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Adachi Y, Kosugi A, Miyake K. Lipopolysaccharide interaction with cell surface Toll-like receptor 4-MD-2: higher affinity than that with MD-2 or CD14. J Exp Med 2003; 198(7): 1035–1042.
- 22 Oliveira SDS, Castellon M, Chen J, Bonini MG, Gu X, Elliott MH, Machado RF, Minshall RD. Inflammation-induced caveolin-1 and BMPRII depletion promotes endothelial dysfunction and TGF-beta-driven pulmonary vascular remodeling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2017; 312(5): L760–L771.
- 23 Baldwin AS Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol 1996; 14: 649– 683.
- 24 Fan WJ, Li HP, Zhu HS, Sui SP, Chen PG, Deng Y, Sui TM, Wang YY. NF-kappaB is involved in the LPS-mediated proliferation and apoptosis of MAC-T epithelial cells as part of the subacute ruminal acidosis response in cows. Biotechnol Lett 2016; 38(11): 1839–1849.
- 25 Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. Curr Biol 2001; 11(19): R795–R805.
- 26 Chowdhury HM, Sharmin N, Yuzbasioglu Baran M, Long L, Morrell NW, Trembath RC, Nasim MT. BMPRII deficiency impairs apoptosis via the BMPRII-ALK1-BclX-mediated pathway in pulmonary arterial hypertension. Hum Mol Genet 2019; 28(13): 2161–2173.
- 27 Willette RN, Gu JL, Lysko PG, Anderson KM, Minehart H, Yue T. BMP-2 gene expression and effects on human vascular smooth muscle cells. J Vasc Res 1999; 36(2): 120–125.
- 28 Graham TR, Odero-Marah VA, Chung LW, Agrawal KC, Davis R, Abdel-Mageed AB. PI3K/Akt-dependent transcriptional regulation and activation of BMP-2-Smad signaling by NF-kappaB in metastatic prostate cancer cells. Prostate 2009; 69(2): 168–180.
- 29 Simic T. Anti-inflammatory and anti-atherogenic role of BMP receptor II in atherosclerosis. Future Cardiol 2013; 9(5): 619–622.