

研究论文

白藜芦醇通过调控HIF-1 α /NOX4/ROS通路抑制低氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞氧化应激与增殖

何丽因¹, 兰钰茹¹, 贺光明², 郭姝瑾³, 文富强¹, 汪涛^{1,*}

¹四川大学华西医院/华西临床医学院呼吸病学研究室, 成都 610041; ²四川省肿瘤医院重症医学科, 成都 610041; ³电子科技大学中国科学院四川转化医学研究医院, 成都 610054

摘要: 本文旨在明确白藜芦醇对低氧诱导的肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)氧化应激与增殖的作用及分子机制。体外分离培养原代大鼠PSMCs, 采用不同浓度的白藜芦醇(10、20和40 $\mu\text{mol/L}$)或NADPH氧化酶(NADPH oxidases, NOXs)抑制剂VAS2870 (10 $\mu\text{mol/L}$)预处理0.5 h, 然后将细胞置于常氧(21% O₂, 5% CO₂)或低氧(2% O₂, 5% CO₂)中培养24 h。采用CCK-8法和增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的表达水平检测细胞增殖, 用DCFH-DA测定细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成, 用real-time RT-PCR和Western blot检测NOX1、NOX4和低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)的表达水平, 通过小干扰RNAs (small interference RNAs, siRNAs)特异性沉默Hif-1 α 和Nox4后确定相关信号通路。结果显示, 白藜芦醇和VAS2870均能显著抑制低氧诱导的大鼠PSMCs细胞增殖和ROS生成, 同时白藜芦醇还能有效阻止低氧诱导的HIF-1 α 蛋白的聚集和NOX4的表达上调, 而对NOX1没有明显的影响。沉默Hif-1 α 或Nox4后, 低氧诱导的大鼠PSMCs细胞增殖和ROS累积均显著降低, 且能被白藜芦醇进一步抑制。上述结果提示, 白藜芦醇可能通过阻断HIF-1 α /NOX4/ROS信号通路抑制低氧诱导的大鼠PSMCs氧化应激和增殖。

关键词: 白藜芦醇; 低氧; 低氧诱导因子-1 α ; NADPH氧化酶4; 活性氧

中图分类号: R34; Q291

Resveratrol inhibits hypoxia-induced oxidative stress and proliferation in pulmonary artery smooth muscle cells through the HIF-1 α /NOX4/ROS signaling pathway

HE Li-Nan¹, LAN Yu-Ru¹, HE Guang-Ming², GUO Shu-Jin³, WEN Fu-Qiang¹, WANG Tao^{1,*}

¹Laboratory of Pulmonary Diseases, West China Hospital/West China School of Medicine, Sichuan University, Chengdu 610041, China; ²Department of Critical Care Medicine, Sichuan Cancer Hospital & Institute, Chengdu 610041, China; ³Sichuan Research Hospital of Translational Medicine, Chinese Academy of Sciences, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054, China

Abstract: The purpose of the present study was to determine the effects of resveratrol on hypoxia-induced oxidative stress and proliferation in pulmonary artery smooth muscle cells (PSMCs) and the underlying mechanism. Primary rat PSMCs were isolated and cultured *in vitro* and pretreated with different concentrations of resveratrol (10, 20, and 40 $\mu\text{mol/L}$) or the NADPH oxidase (NOX) inhibitor VAS2870 (10 $\mu\text{mol/L}$) for 0.5 h. The cells were then cultured under normoxia (21% O₂, 5% CO₂) or hypoxia (2% O₂, 5% CO₂) for 24 h. The proliferation of cells was measured using the CCK-8 method and the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). The production of reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA. The expression of rat NOX1, NOX4 and hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α) was detected by real-time RT-PCR and Western blotting assays. The related signaling pathways were determined using the small interference RNAs (siRNAs) specifically targeting Hif-1 α and Nox4. The results showed that resveratrol and VAS2870 significantly inhibited hypoxia-induced cell proliferation and ROS production in rat PSMCs. Resveratrol also effec-

Received 2019-10-30 Accepted 2020-05-04

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31000513, 81700044, 81670038).

*Corresponding author. Tel: +86-28-85164087; E-mail: tao.wang@scu.edu.cn

tively prevented hypoxia-induced increase of HIF-1 α protein levels and NOX4 up-regulation, but had little effect on NOX1. After the knocking down of Hif-1 α or Nox4 with siRNAs, hypoxia-induced cell proliferation and ROS accumulation were significantly decreased, and both were further inhibited by resveratrol treatment. These results suggest that resveratrol inhibits hypoxia-induced oxidative stress and cell proliferation in rat PSMCs possibly through blocking the HIF-1 α /NOX4/ROS pathway.

Key words: resveratrol; hypoxia; hypoxia inducible factor 1 α ; NADPH oxidase 4; reactive oxygen species

长期慢性低氧可能会导致生活在高海拔地区的居民以及患有慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)、间质性肺疾病等慢性低氧性肺病患者发生肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH), 甚至会引起右心衰竭并最终导致死亡。当机体处于慢性低氧状态时, 肺部常驻细胞增殖和凋亡之间的平衡主要被肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs) 的进行性增殖所打破, 从而导致肺血管的管壁增厚和管腔狭窄, 发生肺血管重塑, 进而引起肺血管阻力增加和顺应性降低, 肺动脉压力持续升高^[1, 2]。然而, 目前临床上用于治疗 PAH 的方法还很有限, 且预防策略在很大程度上也仍然有待明确。

白藜芦醇 (resveratrol) 是一种天然的多酚化合物, 具有较强的抗氧化和抗炎的活性。大量研究表明, 白藜芦醇在 2 型糖尿病、心肌缺血/再灌注、动脉粥样硬化和衰老等动物模型中具有显著的血管保护作用^[3–7]。新近的研究还显示, 在低氧诱导的大鼠 PAH 模型中, 白藜芦醇能明显降低肺动脉重塑和右心室收缩压, 并抑制 PSMCs 的增殖^[8–10], 这可能与其抗氧化的血管保护作用有关, 但具体的分子作用机制尚未完全明了。

氧化还原失衡或氧化应激是导致肺血管重塑的关键环节^[11, 12]; 在低氧条件下, 肺血管内包括超氧阴离子 (O₂^{•-})、羟基自由基 (OH[•])、过氧化氢 (H₂O₂) 等的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的形成显著增加, 可结合并氧化多种细胞组分 (脂质、DNA、蛋白和细胞膜等), 从而修饰其结构和功能, 促进下游的信号转导, 引起细胞炎症反应、肥大、增殖、凋亡、迁移和功能障碍^[11, 13]。目前认为, NADPH 氧化酶 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases, NOXs) 是肺血管和心血管系统中 ROS 的主要来源^[14], 且与 PAH 的形成密切相关^[15, 16]。NOXs 家族包括七种异构体: NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1 和 DUOX2, 它们具有不同的细胞类型和组织特异性表达模式; 在肺血管平滑肌细胞中, NOX1 和 NOX4 是两种最重要的 NOXs 异构体^[17]。

不同 NOXs 异构体所介导的氧化应激在 PSMCs 病理性增殖过程中可能发挥着重要作用, 因此成为潜在的治疗靶点。而低氧条件下, 白藜芦醇对血管的抗氧化保护作用是否通过调控不同 NOXs 异构体来实现还不清楚, 具体调控方式也未明了。本研究通过分离大鼠原代 PSMCs, 体外低氧培养, 研究白藜芦醇对细胞不同 NOXs 异构体的表达调控和信号转导通路的作用, 及其与细胞氧化应激和增殖的关系, 以期进一步明确白藜芦醇对低氧诱导的肺血管重塑的干预作用机制。

1 材料与方法

1.1 原代大鼠 PSMCs 的分离和体外培养 体重 200~250 g 的无特定病原体级 (specific pathogen-free, SPF) 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠由四川大学实验动物中心提供。所有动物实验方案均经四川大学华西医院实验动物伦理委员会批准。参考我们之前报道的方法分离和培养大鼠 PSMCs^[21]。采用戊巴比妥钠 (40 mg/kg, Merk, 德国) 麻醉处死大鼠后, 在解剖显微镜下切除并分离肺动脉, 轻轻去除内皮和外膜, 将动脉段切成小块并用胶原酶 (5 mg/mL, Gibco, 美国) 37 °C 消化 2 h 后离心, 用 DMEM 培养基 (Gibco, 美国) [添加 10% 胎牛血清 (Gibco, 美国)、100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素 (Gibco, 美国)] 在 CO₂ 孵箱中培养。

1.2 大鼠 PSMCs 形态学观察和鉴定 采用免疫荧光对大鼠 PSMCs 进行鉴定。将细胞爬片用 4% 多聚甲醛在 4 °C 固定 30 min, 加入 1% Triton X-100 打孔 10 min, 加抗 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 单克隆抗体 (NeoMarkers, Lab Vision, 美国), 4 °C 过夜。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 加入 Texas Red-羊抗兔 IgG 荧光二抗 (Invitrogen, 美国), 室温下避光孵育 2 h。PBS 洗 3 次, 每次 5 min, DAPI 染核, 甘油封片, 即刻在荧光显微镜下观察拍照。胞浆红色为阳性结果。

1.3 细胞低氧培养 采用三气水套式 CO₂ 培养箱 (型号 3131, Thermo, 美国)。通过向培养箱注入

N₂ 和 CO₂ 调节箱内 O₂ 浓度, 使箱内达到合适的低氧培养环境 (2% O₂, 5% CO₂, 93% N₂)。

1.4 细胞增殖分析 将大鼠 PSMCs 以每孔 2 000 个 /mL 的密度接种在 96 孔微孔板中。实验前, 将细胞置于低血清培养基 (DMEM, 0.5% FBS) 的环境中同步化 24 h, 再用不同浓度的白藜芦醇 (Sigma-Aldrich; 10, 20, 40 μ mol/L) 或 NOXs 抑制剂 VAS2870 (Sigma-Aldrich; 10 μ mol/L) 预处理 0.5 h, 然后将细胞置于常氧 (21% O₂, 5% CO₂) 或低氧 (2% O₂, 5% CO₂) 的培养箱中培养 24 h。

用细胞增殖试剂盒 CCK-8 (Dojindo, 日本) 评估细胞增殖活力。在每个孔中加入 10 μ L 的 CCK-8 试剂并孵育 1 h 后, 用酶标仪 (Model 680, Bio-Rad, 美国) 在 450 nm 波长下读取吸光度数值。

1.5 细胞 ROS 检测 用荧光探针 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA, 碧云天) 测定细胞内 ROS 生成。细胞用 DCFH (终浓度 10 μ mol/L) 在 37 $^{\circ}$ C 黑暗中孵育 20 min, 然后立即用 PBS 冲洗 3 次, 用多功能酶标仪 (Synergy 2, BioTek, 美国) 在 485 nm 波长处激发, 在 535 nm 波长处记录 DCF 的荧光。所有实验至少重复 3 次, 并且每个实验条件下的每个样本中至少有 5 个重复孔。

1.6 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (real-time RT-PCR) 分析 使用 E.Z.N.A HP 总 RNA 提取试剂盒 (Omega Bio-Tek, 美国) 从培养的 PSMCs 中提取总 RNA。每个样品使用 1 μ g 总 RNA, 用 iScript cDNA 合成试剂盒 (Bio-Rad) 合成 cDNA。使用 SsoFast EvaGreen SuperMix (Bio-Rad) 与 CFX96 实时 PCR 检测系统 (Bio-Rad) 进行实时定量 PCR。引物序列如下: 大鼠低氧诱导因子 -1 α (Hif-1 α) 引物: 正向: 5'-GACTTCGGCAGCGATGACAC-3', 反向: 5'-CCAGT-GACTGGGGCTTGACTC-3'; Nox1: 正向: 5'-AGAT-GGACGAATTAGCAAACC-3', 反向: 5'-ACTCATTG-CCCATTGGTCTC-3'; Nox4: 正向: 5'-TTCTGG-ACCTTTGTGCCTATAC-3', 反向: 5'-ATCTGAGGG-ATGATTGACTG-3'; β -actin: 正向: 5'-CCTCAT-GAAGATCCTGACCGAG-3', 反向: 5'-ACCGCT-CATTGCCGATAGTG-3'。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 酶激活 30 s, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 / 延伸 5 s, 共 40 个循环。最后得到 Ct 值, 以 β -actin 为内参, 用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算各 mRNA 的相对表达水平。

1.7 Western blot 分析 在含有 50 mmol/L Tris-HCl、150 mmol/L NaCl、1% NP-40、0.5% 脱氧胆酸钠、

2 mmol/L NaF、2 mmol/L EDTA、0.1% SDS 和蛋白酶抑制剂混合片剂 (Roche Applied Science, 美国) 的裂解液中进行细胞裂解。采用 BCA 蛋白定量试剂盒 (ThermoFisher, 美国) 检测蛋白浓度。每个样品的蛋白质上样量为 20 μ g, 在 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上分离, 然后转移到孔径为 0.45 μ m PVDF 膜上 (Millipore, 美国)。一抗使用抗 HIF-1 α 多克隆抗体 (1:1 000, CST, 美国)、抗 NOX1 多克隆抗体 (1:1 000, Sigma, 美国)、抗 NOX4 兔单克隆抗体 (1:3 000, Epitomics, 美国)、抗 PCNA 和 β -actin 抗体 (1:2 000, 正能生物, 成都), 与 PVDF 膜在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。二抗使用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG (1:5 000, CST, 美国), 与 PVDF 膜在室温下孵育 2 h。采用化学发光法检测信号, 以 β -actin 为内参计算各蛋白的相对表达水平。

1.8 siRNA 转染 使用 HiPerFect 转染试剂 (Qiagen, 德国) 将 Nox4 siRNA、Hif-1 α siRNA 或阴性对照 siRNA 转染到大鼠原代 PSMCs 中。参照 HiPerFect 使用说明书, 采用终浓度为 100 nmol/L 的 siRNA 先在低容量培养基中转染细胞 3 h, 然后补充新鲜培养基至正常容量后继续培养 21 h, 接着再加 40 μ mol/L 白藜芦醇预处理 0.5 h 后进行低氧处理。siRNA 购自 Sigma 公司, 产品序列信息: 大鼠 Nox4 siRNA: SASI_Rn02_00266136; 大鼠 Hif-1 α siRNA: SASI_Rn01_00053994; siRNA 通用阴性对照: SIC001。

1.9 统计分析 所有数据以 mean \pm SD 表示, 用 SPSS 16.0 进行统计检验, 用单因素或双因素方差分析进行统计分析, 用 Tukey's HSD 测试进行多重比较。P < 0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇和 NOXs 抑制剂 VAS2870 抑制低氧诱导的 PSMCs 细胞增殖和氧化应激

形态学观察和鉴定结果显示, 分离培养的细胞表达高水平的平滑肌特异性肌动蛋白 α -SMA (红色荧光, 图 1A)。随机选取细胞爬片 5 个不同视野, 计算阳性细胞比例, 得出分离到的 PSMCs 纯度达 97% 以上。

CCK-8 试剂盒检测结果显示, 低氧对照组的 PSMCs 增殖活性比常氧组显著增加 (P < 0.05), 加入 20 和 40 μ mol/L 的白藜芦醇或 10 μ mol/L NOXs 抑制剂 VAS2870 后, 细胞增殖活性与低氧对照组相比明显下降 (均 P < 0.05) (图 1B)。在低氧条件下,

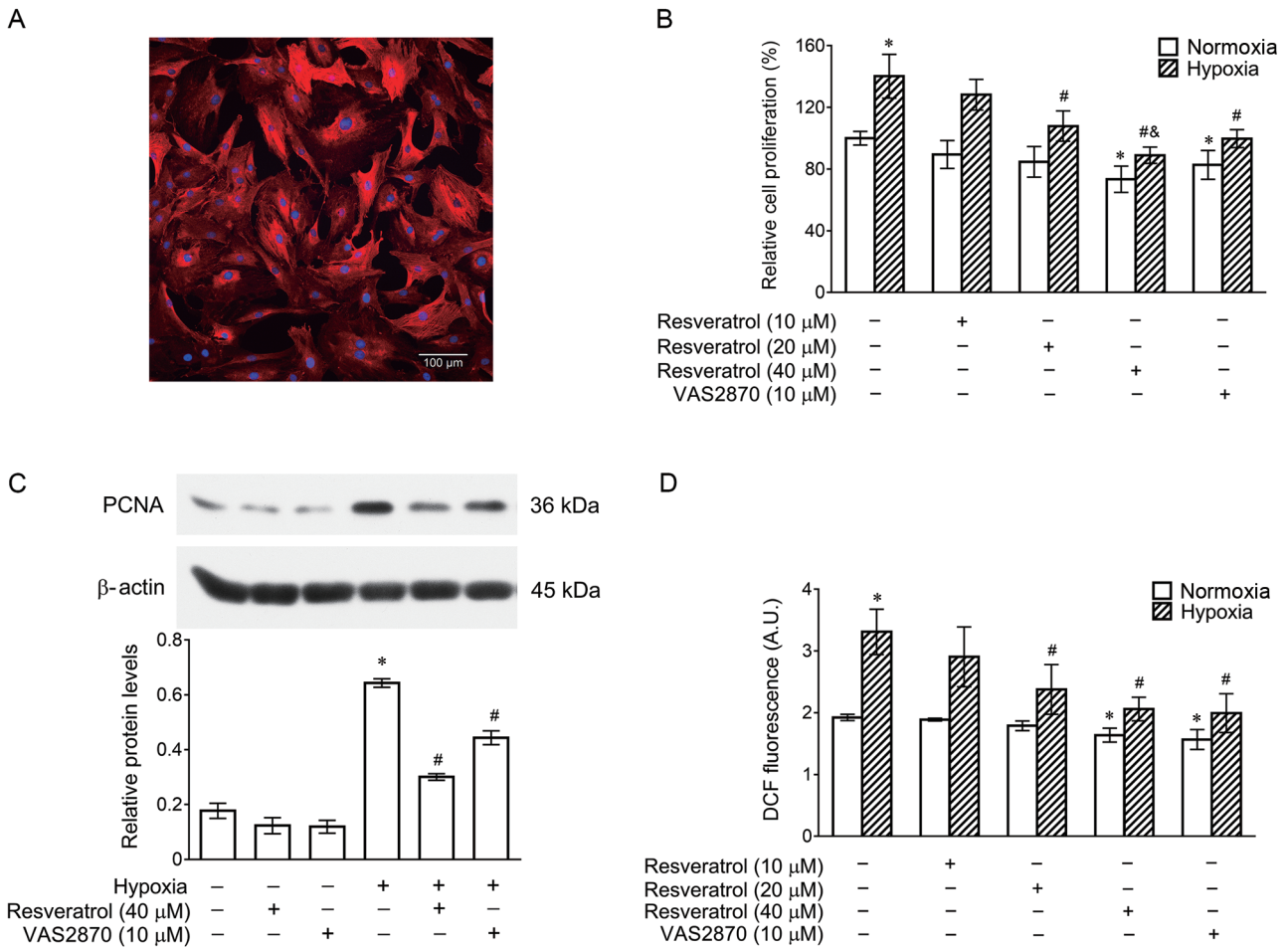


图 1. 白藜芦醇抑制低氧诱导的大鼠PASMCs细胞增殖和氧化应激
 Fig. 1. Resveratrol inhibited hypoxia-induced cell proliferation and intercellular oxidative stress in rat PASMCs. A: Cell fluorescent immunostaining with anti- α -smooth muscle actin (α -SMA; red) was performed to confirm the purity of the cells. Scale bar, 100 μ m. B: Cell proliferation measured using CCK-8 assay kit. C: Protein expression level of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) detected by Western blotting analysis. D: Intracellular ROS production measured using DCFH-DA. Mean \pm SD. $n = 5$ (B, D); $n = 3$ (C). * $P < 0.05$ vs Normoxia; # $P < 0.05$ vs Hypoxia control; & $P < 0.05$ vs Hypoxia + 20 μ mol/L Resveratrol. μ M, μ mol/L.

白藜芦醇或 VAS2870 均可下调低氧诱导的细胞增殖标志蛋白 PCNA 的表达 ($P < 0.05$) (图 1C)。ROS 水平检测结果显示, 与低氧对照组相比, 白藜芦醇在低氧条件下剂量依赖性 (20, 40 μ mol/L) 地抑制大鼠 PASMCs ROS 的产生, VAS2870 也可显著抑制低氧诱导的 ROS 产生 (均 $P < 0.05$) (图 1D)。

2.2 白藜芦醇抑制低氧诱导的大鼠PASMCs中HIF-1 α 和NOX4表达, 而对NOX1没有明显作用

将经白藜芦醇预处理或不经白藜芦醇预处理的大鼠原代 PASMCs 置于 2% O₂ 的低氧环境中培养 24 h, 然后提取 RNA 和蛋白进行分析, 检测目的基因 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示, 与常氧组比较, 低氧对照组 Hif-1 α 的 mRNA 水平增加 0.2 倍 ($P < 0.05$), 同时其蛋白水平增加 1.4 倍 ($P < 0.05$)

(图 2), 表明白藜芦醇对 Hif-1 α 的 mRNA 水平影响较小, 但能剂量依赖性地阻止低氧诱导的 HIF-1 α 蛋白的聚积 ($P < 0.05$) (图 2)。与常氧组比较, 低氧对照组 NOX4 的 mRNA 和蛋白水平均显著上调 (图 2), 且均能被白藜芦醇剂量依赖性地抑制 ($P < 0.05$) (图 2)。常氧和低氧条件下 NOX1 的 mRNA 和蛋白水平之间均无显著差异, 而白藜芦醇对其也无明显的调节作用 (图 2)。在大鼠 PASMCs 中, 我们未检测到有 Nox2 基因的表达 (结果未显示), 这与 Veit 等人的研究结果一致 [18]。

2.3 沉默Hif-1 α 或Nox4基因后, 低氧诱导的大鼠PASMCs细胞增殖和ROS累积均显著降低, 且能被白藜芦醇进一步抑制

为了进一步明确白藜芦醇抑制低氧诱导的 PASMCs

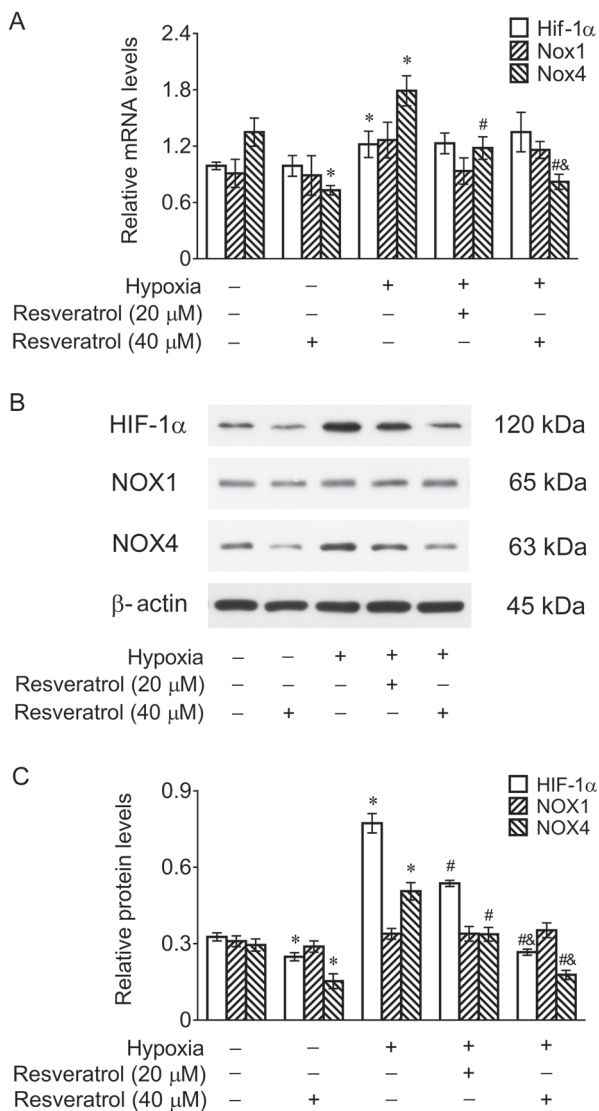


图 2. 白藜芦醇对低氧培养的大鼠 PSMCs 中 HIF-1 α 、NOX1 和 NOX4 表达的作用

Fig. 2. Effects of resveratrol on mRNA and protein levels of HIF-1 α , NOX1 and NOX4 in PSMCs exposed to hypoxia. A: mRNA expression levels in rat primary PSMCs detected by real-time quantitative RT-PCR. B: Protein expression levels detected by Western blot. C: Statistical result of Western blot. Mean \pm SD, $n = 3$. * $P < 0.05$ vs Normoxia; # $P < 0.05$ vs Hypoxia; & $P < 0.05$ vs Hypoxia + 20 μ mol/L Resveratrol. μ M, μ mol/L.

氧化应激和细胞增殖的信号转导上下游通路, 我们采用 Nox4 或 Hif-1 α siRNA 转染大鼠原代 PSMCs。结果显示, 沉默 Nox4 后可显著减少低氧诱导的大鼠 PSMCs 中 HIF-1 α 蛋白积累 ($P < 0.05$); 而同样的, 沉默 HIF-1 α 后也可明显降低低氧诱导的大鼠 PSMCs 中 NOX4 蛋白表达水平 ($P < 0.05$) (图 3A、B)。沉默 Nox4 或 Hif-1 α 后, 与 siRNA 阴性对

照组相比, 低氧诱导的大鼠 PSMCs 中 ROS 累积 (图 3C) 和细胞增殖 (图 3D) 均显著降低, 且二者能被白藜芦醇进一步抑制 (均 $P < 0.05$)。

3 讨论

慢性低氧是肺血管重塑和 PAH 的一个常见诱因, 可促使 PSMCs 进行性增殖, 从而引起肺血管结构重塑。在低氧诱导的 PAH 和肺血管重塑的动物疾病模型中, 白藜芦醇显示出较好的干预效果, 可能与其血管保护作用有关, 但具体的分子机制尚未完全明确。HIF-1 是低氧高度特异性的转录因子, 其激活是细胞感知和适应内环境氧分压的关键环节, 且血管平滑肌中的 HIF-1 α 亚基在慢性低氧诱导的肺血管重塑和 PAH 中发挥了重要的调控作用^[2]。HIF-1 α 亚基在低氧条件下蛋白稳定性显著提高, 因为低氧可抑制 HIF-1 α 蛋白的氧依赖降解结构域 (oxygen dependent degradation domain, ODD) 脯氨酸的羟基化, 从而阻止 HIF-1 α 的泛素化降解。本研究结果显示, 白藜芦醇能够剂量依赖性地抑制低氧诱导的原代大鼠 PSMCs 增殖, 同时阻止低氧诱导的 HIF-1 α 蛋白累积, 但是 Hif-1 α mRNA 水平没有明显变化。已有研究显示, 在多种肿瘤细胞的低氧模型中, 相对于转录水平的调控, 白藜芦醇似乎更倾向于调节 HIF-1 α 蛋白的翻译和稳定性, 包括促进 HIF-1 α 蛋白泛素化, 增强泛素/26S 蛋白酶体途径对其降解, 缩短蛋白的半衰期, 以及干预蛋白翻译组件的磷酸化从而影响 HIF-1 α 蛋白的翻译等^[22, 23]。因此, 结合本研究结果, 我们推测白藜芦醇可能主要影响低氧条件下 PSMCs 中 Hif-1 α 的转录后调控。

此外本研究结果还显示, 白藜芦醇和 NOXs 抑制剂 VAS2780 还能显著减少低氧诱导的 ROS 产生, 同时 VAS2780 也能显著抑制低氧诱导的 PSMCs 细胞增殖和氧化应激, 表明低氧条件下 NOXs 介导的 ROS 生成可能与白藜芦醇抑制 PSMCs 的增殖作用有关。有研究表明, NOXs 是 ROS 的重要来源, 在正常条件下 NOXs 产生的 H₂O₂ 和超氧阴离子 (O₂⁻) 水平较低, 但在各种缺血、低氧、高糖和高血压等病理条件下被急性激活^[14]。NOXs 家族中的 NOX4 可直接产生 H₂O₂, 而其他 NOX 亚型直接生成的是 O₂⁻。有研究显示, 在体外培养的人 PSMCs 中, HIF-1 α 可以在 NOX4 启动子低氧反应元件 (hypoxia response element, HRE) 处结合, 从而增强低氧下

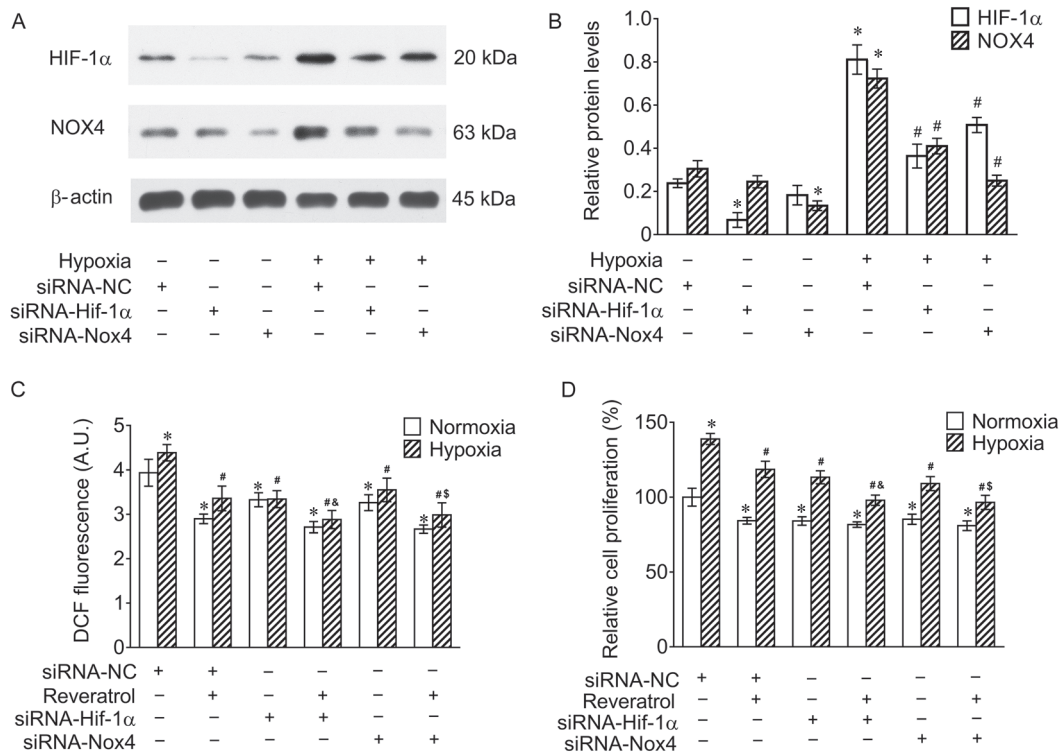


图 3. 沉默Hif-1α或Nox4基因后，低氧诱导的大鼠PASMCS细胞增殖和ROS聚集均显著降低，且二者能被白藜芦醇进一步抑制

Fig. 3. After the knocking down of Hif-1α or Nox4 with siRNA, hypoxia-induced cell proliferation and ROS accumulation were significantly decreased, and both were further inhibited by resveratrol treatment. *A*: Effects of Nox4 siRNA and Hif-1α siRNA on protein levels of HIF-1α and NOX4 detected by Western blot. *B*: Statistical result of Western blot. *C*: Effects of Nox4 siRNA, Hif-1α siRNA plus resveratrol (40 μmol/L) on intracellular ROS levels in rat PSMCs detected by DCFH-DA detection. *D*: Effects of Nox4 siRNA, HIF-1α siRNA plus resveratrol (40 μmol/L) on cell proliferation of rat PSMCs detected by CCK-8 assay. siRNA-NC: non-targeting control siRNA. Mean ± SD. *n* = 3 (*B*); *n* = 6 (*C*, *D*). **P* < 0.05 vs siRNA-NC; #*P* < 0.05 vs Hypoxia + siRNA-NC; &*P* < 0.05 vs Hypoxia + siRNA-Hif-1α; §*P* < 0.05 vs Hypoxia + siRNA-Nox4.

NOX4 启动子的活性^[20]。还有研究证明 NOX1、NOX4 分别参与了不同刺激因素（野百合碱和低氧）诱导的肺血管重塑^[18, 19]。本研究结果显示，白藜芦醇能有效阻止低氧诱导的大鼠 PASMCS NOX4 表达水平上调，但对 NOX1 无明显影响，说明 NOX4 是主要参与白藜芦醇抑制低氧诱导的 PASMCS 增殖的 NOXs 家族成员。

为确定白藜芦醇在低氧条件下调节 PASMCS 中 NOX4 的信号通路，我们采用 siRNA 分别敲低 Hif-1α 和 Nox4 基因，结果显示，Hif-1α siRNA 可显著抑制低氧诱导的 Nox4 表达上调，而有趣的是，Nox4 siRNA 亦能减少低氧诱导的 HIF-1α 蛋白累积；同时两者均能有效抑制低氧诱导的 PASMCS 细胞增殖和 ROS 生成，而沉默 Hif-1α 和 Nox4 后，白藜芦醇还能更进一步地阻止低氧诱导的细胞增殖和 ROS 产生。我们推测，Hif-1α 表达下降后其下游结

合的 Nox4 启动子活性下降，导致 NOX4 的蛋白水平和产生的 ROS 水平下降，进而影响细胞增殖。而 NOX4 表达降低后将直接导致 ROS 生成减少，有研究显示，ROS 能够通过不同途径介导 HIF-1α 的稳定性，例如 ROS 可通过直接抑制氧依赖的脯氨酰羟化酶 (oxygen-dependent prolyl hydroxylases, PHD) 来稳定 HIF-1α，也可通过 SO₂ 和 NO 之间过亚硝化过程对 HIF-1α 蛋白进行翻译后修饰^[24]；还有学者认为 NOX4 生成的 H₂O₂ 可以作为第二信使，激活 HIF-1α^[11]。因此，白藜芦醇所致的 HIF-1α 蛋白水平降低，还有可能是因为下调了 NOX4 表达，使 ROS 水平降低，导致 ROS 维护 HIF-1α 蛋白稳定性和激活的作用减少，从而使 HIF-1α 的蛋白聚集进一步减少。

综上所述，本研究表明白藜芦醇通过阻断 HIF-1α/NOX4/ROS 信号通路及其正反馈环路，调节细

胞氧化应激水平，进而抑制低氧诱导的大鼠 PSMCs 细胞增殖（图 4）。未来的研究可使用在肺部过表达或敲除 Nox4 基因的工具鼠，结合白藜芦醇的体内干预，进一步明确该通路在 PAH 形成中的作用机制，并为白藜芦醇的临床应用提供理论依据。

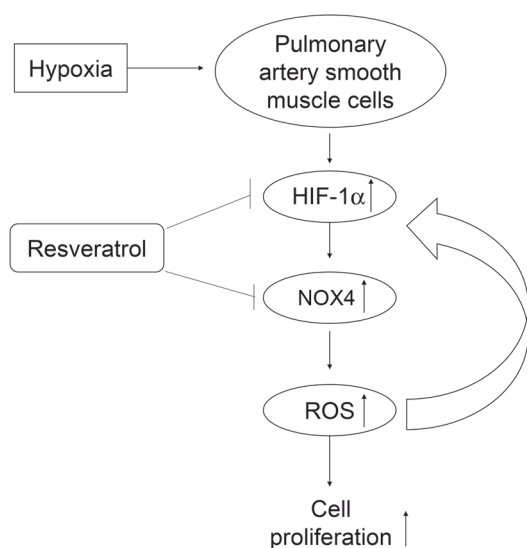


图 4. 白藜芦醇通过调控HIF-1 α /NOX4/ROS通路抑制低氧诱导的肺动脉平滑肌细胞氧化应激与增殖的示意图

Fig. 4. Presumed schematic diagram displaying the mechanisms of resveratrol's inhibitory effects on hypoxia-induced oxidative stress and cell proliferation in PSMCs. Under hypoxic conditions, the transcription factor hypoxic inducible factor 1 α (HIF-1 α) is stabilized and activates the expression of NADPH oxidase 4 (NOX4), therefore promotes the production of intracellular reactive oxygen species (ROS), and then the increased oxidative stress may lead to further stabilization of HIF-1 α in a positive feedback loop. Resveratrol inhibits NADPH oxidase-mediated production of ROS possibly by down-regulating the expression of NOX4 directly or through destabilizing HIF-1 α protein under hypoxia in PSMCs, thus inhibiting hypoxia-induced cell proliferation.

参考文献

- Tajsc T, Morrell NW. Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension. *Compr Physiol* 2011; 1(1): 295–317.
- Ball MK, Waypa GB, Mungai PT, Nielsen JM, Czech L, Dudley VJ, Beussink L, Dettman RW, Berkelhamer SK, Steinhorn RH, Shah SJ, Schumacker PT. Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 α . *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189(3): 314–324.
- Li H, Xia N, Hasselwander S, Daiber A. Resveratrol and vascular function. *Int J Mol Sci* 2019; 20(9): 2155.
- Cheang WS, Wong WT, Wang L, Cheng CK, Lau CW, Ma RCW, Xu A, Wang N, Huang Y, Tian XY. Resveratrol ameliorates endothelial dysfunction in diabetic and obese mice through sirtuin 1 and peroxisome proliferator-activated receptor delta. *Pharmacol Res* 2019; 139: 384–394.
- Feng L, Ren J, Li Y, Yang G, Kang L, Zhang S, Ma C, Li J, Liu J, Yang L, Qi Z. Resveratrol protects against isoproterenol induced myocardial infarction in rats through VEGF-B/AMPK/eNOS/NO signalling pathway. *Free Radic Res* 2019; 53(1): 82–93.
- Seo Y, Park J, Choi W, Ju Son D, Sung Kim Y, Kim MK, Yoon BE, Pyee J, Tae Hong J, Go YM, Park H. Antiatherogenic effect of resveratrol attributed to decreased expression of ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019; 39(4): 675–684.
- Diaz M, Degens H, Vanhees L, Austin C, Azzawi M. The effects of resveratrol on aging vessels. *Exp Gerontol* 2016; 85: 41–47.
- Yu L, Tu Y, Jia X, Fang K, Liu L, Wan L, Xiang C, Wang Y, Sun X, Liu T, Yu D, Cao W, Song Y, Fan Y. Resveratrol protects against pulmonary arterial hypertension in rats via activation of silent information regulator 1. *Cell Physiol Biochem* 2017; 42(1): 55–67.
- Guan Z, Shen L, Liang H, Yu H, Hei B, Meng X, Yang L. Resveratrol inhibits hypoxia-induced proliferation and migration of pulmonary artery vascular smooth muscle cells by inhibiting the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Mol Med Rep* 2017; 16(2): 1653–1660.
- Xu D, Li Y, Zhang B, Wang Y, Liu Y, Luo Y, Niu W, Dong M, Liu M, Dong H, Zhao P, Li Z. Resveratrol alleviate hypoxic pulmonary hypertension via anti-inflammation and anti-oxidant pathways in rats. *Int J Med Sci* 2016; 13(12): 942–954.
- Siques P, Brito J, Pena E. Reactive oxygen species and pulmonary vasculature during hypobaric hypoxia. *Front Physiol* 2018; 9: 865.
- Hansen T, Galougahi KK, Celermajer D, Rasko N, Tang O, Bubb KJ, Figtree G. Oxidative and nitrosative signalling in pulmonary arterial hypertension - Implications for development of novel therapies. *Pharmacol Ther* 2016; 165: 50–62.
- Zepeda AB, Pessoa A Jr, Castillo RL, Figueroa CA, Pulgar VM, Farias JG. Cellular and molecular mechanisms in the hypoxic tissue: role of HIF-1 and ROS. *Cell Biochem Funct* 2013; 31(6): 451–459.
- Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol Interv* 2011; 11(1): 27–35.
- Peng JJ, Liu B, Xu JY, Peng J, Luo XJ. NADPH oxidase: its potential role in promotion of pulmonary arterial hyperten-

- sion. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2017; 390(4): 331–338.
- 16 Huetsch JC, Suresh K, Shimoda LA. Regulation of smooth muscle cell proliferation by NADPH oxidases in pulmonary hypertension. *Antioxidants (Basel)* 2019; 8(3): 56.
- 17 Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HH, Drummond GR. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther* 2008; 120(3): 254–291.
- 18 Veit F, Pak O, Egemnazarov B, Roth M, Kosanovic D, Seimetz M, Sommer N, Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F, Brandes RP, Schermuly RT, Weissmann N. Function of NADPH oxidase 1 in pulmonary arterial smooth muscle cells after monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling. *Antioxid Redox Signal* 2013; 19(18): 2213–2231.
- 19 Green DE, Murphy TC, Kang BY, Kleinhenz JM, Szyn-dralewicz C, Page P, Sutliff RL, Hart CM. The Nox4 inhibitor GKT137831 attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2012; 47(5): 718–726.
- 20 Diebold I, Petry A, Hess J, Gorlach A. The NADPH oxidase subunit NOX4 is a new target gene of the hypoxia-inducible factor-1. *Mol Biol Cell* 2010; 21(12): 2087–2096.
- 21 Han SX, He GM, Wang T, Chen L, Ning YY, Luo F, An J, Yang T, Dong JJ, Liao ZL, Xu D, Wen FQ. Losartan attenuates chronic cigarette smoke exposure-induced pulmonary arterial hypertension in rats: possible involvement of angiotensin-converting enzyme-2. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; 245(1): 100–107.
- 22 Zhang Q, Tang X, Lu QY, Zhang ZF, Brown J, Le AD. Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther* 2005; 4(10): 1465–1474.
- 23 Sun Y, Wang H, Liu M, Lin F, Hua J. Resveratrol abrogates the effects of hypoxia on cell proliferation, invasion and EMT in osteosarcoma cells through downregulation of the HIF-1 α protein. *Mol Med Rep* 2015; 11(3): 1975–1981.
- 24 Movafagh S, Crook S, Vo K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: new developments in an old debate. *J Cell Biochem* 2015; 116(5): 696–703.

*

*

*

*

勘误启事

应作者要求,本刊 2018 年第 70 卷第 2 期上刊登的文章《脑内高锰是阿尔茨海默病的危险因素》(作者:余琴,周远忠)作如下勘误:第 198 页右栏第 19 行“8166120272”更正为“81660552”。

特此更正!

《生理学报》编辑部

2020 年 10 月