

尼可地尔对肺动脉平滑肌细胞增殖、迁移能力和Hippo/YAP信号通路的影响[△]

陈枫楠^{1*}, 郎廷元², 吴常裕¹, 俞晓军³, 石新木¹, 沈凯¹, 杨海燕^{1#}(1.舟山市妇女儿童医院内二科, 浙江舟山 316004; 2.重庆大学附属肿瘤医院妇科肿瘤中心, 重庆 400030; 3.浙江省舟山医院心内科, 浙江舟山 316021)

中图分类号 R361⁺.3;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)22-2736-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.22.09

摘要 目的:体外评价尼可地尔对肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖、迁移能力和Hippo/YAP信号通路的影响。方法:将人原代PASMCs分为正常对照组、模型组和尼可地尔低、中、高浓度组(50、100、200 μmol/L),每组设3个复孔。除正常对照组外,其余各组细胞均接种在凝胶包被的培养板上,模拟肺动脉高压环境,以建立肺动脉硬化(AS)细胞模型;随后,各药物组加入相应药物,正常对照组和模型组加入同等体积生理盐水,培养48 h。采用CCK-8法检测各组细胞的增殖能力(以光密度计),Transwell方法检测细胞迁移能力,实时定量聚合酶链式反应技术检测细胞中YAP靶基因[结缔组织生长因子(CTGF)、双向调节蛋白(AREG)] mRNA的表达水平,Western blotting法检测细胞中CTGF、AREG蛋白的表达水平。结果:与正常对照组比较,模型组细胞的光密度显著升高,每视野迁移细胞数显著增加,细胞中CTGF、AREG mRNA及蛋白的表达水平均显著增强($P<0.01$)。与模型组比较,尼可地尔低、中、高浓度组细胞的光密度、每视野迁移细胞数和细胞中CTGF、AREG mRNA及蛋白的表达水平均显著降低,且成浓度依赖性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:尼可地尔可抑制AS模型PASMCs的增殖和迁移,其作用机制可能与抑制Hippo/YAP信号通路有关。

关键词 尼可地尔;肺动脉高压;肺动脉硬化;肺动脉平滑肌细胞;Hippo/YAP信号通路

Effects of Nicorandil on the Proliferation, Migration Ability and Hippo/YAP Signaling Pathway of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells

CHEN Fengnan¹, LANG Tingyuan², WU Changyu¹, YU Xiaojun³, SHI Xinmu¹, SHEN Kai¹, YANG Haiyan¹
(1.Dept. Two of Internal Medicine, Zhoushan Women and Children Hospital, Zhejiang Zhoushan 316004, China; 2. Gynecological Oncology Center, Chongqing University Cancer Hospital, Chongqing 400030, China; 3. Dept. of Cardiology, Zhoushan Hospital of Zhejiang Province, Zhejiang Zhoushan 316021, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the effects of nicorandil on the proliferation, migration ability and Hippo/YAP signaling pathway of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). METHODS: Human primary PASMCs were divided into normal control group, model group, nicorandil low, medium and high concentration groups (50, 100, 200 μmol/L), with 3 holes in each group. In addition to the normal control group, the rest of the cells were inoculated on the gel coated medium to simulate the pulmonary hypertension environment, so as to establish AS cell model. Then, each drug group was added with corresponding drugs, and the normal control group and model group were added with the same volume of normal saline, and cultured for 48 h. CCK-8 assay and Transwell assay were used for the examination of cell proliferation (by light density) and migration ability, respectively. mRNA expression of YAP target factors (CTGF and AREG) were examined by qRT-PCR. Western blotting assay was used to detect the protein expression of CTGF and AREG. RESULTS: Compared with normal control group, light density of cells was increased significantly in model group; the number of migration cells per field of view increased significantly; mRNA and protein expression of CTGF and AREG were significantly increased ($P<0.01$). Compared with model group, light density, the number of migration cells per field of view, mRNA and protein expression of CTGF and AREG in nicorandil low, medium and high concentration groups were decreased significantly, in concentration-dependent manner ($P<0.05$ or $P<0.01$).

[△] 基金项目:重庆市科技局技术创新与应用发展面上项目(No. cstc2019jcsx-msxmX0174);浙江省医药卫生科技计划面上项目(No.2018241273)

* 住院医师。研究方向:心血管。电话:0580-2065131。E-mail: 343070302@qq.com

通信作者:主任医师。研究方向:肺动脉高压。电话:0580-2065131。E-mail: yanghaiyan1975@163.com

CONCLUSIONS: Nicorandil can inhibit the proliferation and migration of PASMCs in AS model, the mechanism of which may be associated with the Hippo/YAP signaling pathway.

KEYWORDS Nicorandil; Pulmonary arterial hypertension; AS; Pulmonary arterial smooth muscle cells; Hippo/YAP signaling pathway

肺动脉高压(Pulmonary arterial hypertension, PAH)是我国临床常见的重大疾病之一,具有较高的致死、致残率^[1-3]。随着人们生活水平的提高,PAH的风险因素也日益增加^[4-6],给患者家庭和社会带来严重的经济负担。PAH发病机制复杂,从分子病理学角度看,其是由肺动脉平滑肌细胞(Pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)异常增殖和迁移导致肺动脉重建所引起的,目前尚未开发针对其分子病理进展的有效药物,可见研究PAH的疾病分子机制并开发有效的治疗方法是生物医药领域的重要工作。

肺动脉重建是PAH的重要过程,PSMCs可通过异常增殖、迁移等方式诱导肺动脉重建,导致肺动脉硬化(Arterial stiffness, AS)和PAH,进而使患者产生劳力性呼吸困难、严重供氧不足等症状,最终可导致其心力衰竭,甚至死亡^[7-9]。可见,阻止肺动脉重建是治疗PAH的潜在途径,干预PSMCs异常的增殖、迁移是阻止肺动脉重建的有效手段。若能成功干预PSMCs的异常增殖和迁移,将有可能阻止肺动脉重建和患者劳力性呼吸困难、严重供氧不足等症状恶化,还有可能达到治疗PAH的目的。

已有研究证明,Hippo/YAP信号通路在PSMCs中异常激活,从而增强了细胞的增殖、迁移能力,是肺动脉重建的主要因素之一。因此,Hippo/YAP信号通路为抑制肺动脉重建的主要治疗靶点之一^[10]。尼可地尔是治疗PAH的传统用药^[11],但该药是否具有抑制Hippo/YAP信号通路等分子生物学功效仍少有研究。基于此,笔者研究了尼可地尔对PSMCs增殖、迁移能力和Hippo/YAP信号通路中结缔组织生长因子(CTGF)、双向调节蛋白(AREG)的影响,旨在为阐明药物作用机制以及寻找PAH新治疗策略提供理论基础。

1 材料

1.1 仪器

BB15型细胞培养箱、Invitrogen E-Gel Imager型凝胶成像系统、Multiskan Sky型全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司);5702型低速离心机、5425R型高速离心机(德国Eppendorf公司);7500 Fast型实时聚合酶链式反应(PCR)系统(美国ABI公司);DMil型显微镜(德国Leica公司)。

1.2 药品与试剂

尼可地尔对照品(美国Sigma公司,批号:N3539,纯度:≥98%);磷酸盐缓冲液(PBS,批号:70011069,pH 7.4)、DMEM培养基(批号:12491015)、胎牛血清(FBS,批号:16000044)、Super Script II 阴性逆转录酶(批号:18064002)、荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)检测

试剂盒(批号:11781200)、RIPA裂解液(批号:89901)、疏水化试剂Surfasil(批号:TS-42800)、I型胶原蛋白(批号:A1048301)、胰蛋白酶/乙二胺四乙酸(EDTA)消化液(批号:R001100)均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;CCK-8试剂盒(日本Dojindo公司,批号:CK04);RNeasy Mini Kit(德国Qiagen公司,批号:74104);兔源CTGF(批号:ab6992)、AREG(批号:ab180722)、β-肌动蛋白(β-actin,批号:ab8227)多克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(批号:ab7090)、BCA蛋白检测试剂盒(批号:ab102536)以及ECL显色液(批号:ab133406)均购自英国Abcam公司;十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)相关试剂[生工生物工程(上海)股份有限公司];细胞培养板(美国Corning公司);引物由生工生物工程(上海)股份公司设计、合成;其余试剂均为分析纯,水为灭菌超纯水。

1.3 细胞系

人原代PSMCs系(编号:ATCC[®] PCS-100-023TM)购自美国ATCC公司。

2 方法

2.1 AS细胞模型的建立

2.1.1 凝胶包被培养板的制备 首先将一个15 mm玻璃盖玻片硅烷化,再在一个玻璃板上制备疏水面。配制含0.075%过硫酸铵、0.015%焦亚硫酸钠、0.15%四甲基乙二胺的水溶液,并按12:0.24(V/V)与丙烯酰胺-双丙烯酰胺溶液(7.5:0.24,V/V)混合,制备成凝胶。将该凝胶覆盖于玻璃板的疏水面上,再以盖玻片的烷基化面覆盖,组合成上、中、下层分别为硅烷化盖玻片、凝胶、疏水玻璃板的“三明治”结构。待该“三明治”结构凝固后小心剥离盖玻片和凝胶,弃去玻璃板,将盖玻片和凝胶置于培养板上,微波灭菌,用PBS清洗后,用0.05 mg/mL I型胶原蛋白覆盖培养板孔底部,室温孵育20 min,活化后用PBS清洗即可接种细胞的凝胶包被培养板。

2.1.2 建模 根据Dieffenbach P等^[10]于2017年发表的文献方法,以“2.1.1”项下所得凝胶包被的培养板为载体,通过将人原代PSMCs接种于凝胶上,于37℃、5% CO₂的培养箱中培养12 h,待细胞贴壁,以此模拟PAH环境,获得AS细胞模型。

2.2 分组与给药

将人原代PSMCs分为5组,分别为正常对照组、模型组和尼可地尔低、中、高浓度组,每组设3个复孔。正常对照组细胞按1×10⁴个/孔接种于24孔培养板上,每孔含20% FBS的DMEM培养基600 μL,待培养12~24 h至贴壁后,采用同等体积溶剂(生理盐水)处理。后4组

细胞按 1×10^4 个/孔接种于按“2.1.1”项下所制备的24孔凝胶包被培养板上,每孔含有20% FBS的DMEM培养基600 μL ,再按“2.1.2”项下方法模拟PAH环境,获得AS细胞模型;待培养12~24 h至贴壁后,模型组细胞采用同等体积溶剂(生理盐水)处理,尼可地尔低、中、高浓度组细胞分别采用50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 尼可地尔处理(根据前期预试验结果,选择可抑制PASMCs生长且仍可进行分子水平研究的尼可地尔浓度,以生理盐水为溶剂);所有组别均于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养48 h。

2.3 细胞增殖能力检测

采用CCK-8法检测。取“2.2”项下分组、处理、继续培养48 h的细胞,弃去培养基,用PBS清洗后,每孔加入CCK-8试剂10 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续孵育40 min,使用酶标仪检测450 nm波长处的光密度(OD值),OD值与增殖能力成正相关。试验重复3次。

2.4 细胞迁移能力检测

采用Transwell法检测。取“2.2”项下分组、处理、继续培养48 h的细胞,经消化后,用无血清的DMEM培养基重悬并稀释成 1×10^5 个/mL的细胞悬液。于Transwell小室上层加入细胞悬液200 μL ,下层中加入含20% FBS的DMEM培养基500 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养24 h。取出小室,用PBS洗去培养基,结晶紫染色10 min,用PBS清洗3次,用棉签将上层接种侧的细胞擦除干净,于显微镜下随机选取5个视野,进行细胞计数。试验重复3次。

2.5 细胞中CTGF和AREG mRNA表达的检测

采用qRT-PCR法检测。取“2.2”项下分组、处理、继续培养48 h的细胞,用RNeasy Mini Kit提取细胞总RNA,采用Super Script II阴性逆转录酶合成cDNA。将cDNA和CTGF、AREG引物与qRT-PCR检测试剂盒中的Master mix混合,应用实时PCR系统进行扩增。反应体系(共15 mL): Master mix(终浓度为 $1 \times$)7.5 mL,引物混合物0.6 mL(终浓度为0.4 mmol/L,上、下游引物比例为1:1),cDNA模板1.5 mL(不超过总体积10%),ddH₂O 5.4 mL;扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火15 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 s,循环40次。以GAPDH为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算CTGF、AREG mRNA的表达量,再以模型组为参照,计算各指标表达水平。试验重复3次。引物序列见表1。

2.6 细胞中CTGF和AREG蛋白表达的检测

采用Western blotting法检测。取“2.2”项下分组、处理、继续培养48 h的细胞,用RIPA溶液裂解,4 $^{\circ}\text{C}$ 下14 000 r/min离心20 min,提取总蛋白,测定蛋白含量。总蛋白经沸水煮5 min变性后通过SDS-PAGE分离,转

表1 引物序列及产物长度

Tab 1 Primer sequence and product length

基因	引物序列	产物长度, bp
CTGF	上游: 5'-AAAAGTGCATCCGTACTCCCA-3'	89
	下游: 5'-CCGTCGGTACATACTCCACAG-3'	
AREG	上游: 5'-GAGCCGACTATGACTACTCAGA-3'	100
	下游: 5'-TCACTTTCGGTCTGTGTTTGGG-3'	
GAPDH	上游: 5'-CTGGGCTACTGAGCACC-3'	81
	下游: 5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'	

至PVDF膜上,以5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加入CTGF、AREG、 β -actin一抗(稀释比例均为1:1 000),在4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下封闭过夜;TBST清洗10 min \times 3次,加入二抗(稀释比例为1:1 000),室温孵育2 h;TBST清洗10 min \times 3次,ECL显色后应用凝胶成像系统成像并采用Image Lab 5.2.1软件分析。以 β -actin作为内参,目标蛋白CTGF、AREG与内参条带的灰度值比值作为目标蛋白的表达水平。试验重复3次。

2.7 统计学方法

采用SPSS 13.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用Student's *t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 尼可地尔对PASMCs增殖能力的影响

与正常对照组比较,模型组细胞OD值显著升高($P < 0.01$),表明PASMCs增殖明显,提示AS模型细胞建立成功。与模型组比较,尼可地尔低、中、高浓度组细胞OD值均显著降低,且尼可地尔中、高浓度组显著低于低浓度组,高浓度组显著低于中浓度组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示尼可地尔可抑制PASMCs的增殖,且抑制能力随浓度的增加而增强。各组细胞OD值的检测结果见表2。

表2 各组细胞OD值的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Determination results of OD values of cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	给药浓度, $\mu\text{mol/L}$	OD值
正常对照组		1.46 \pm 0.05
模型组		1.85 \pm 0.02**
尼可地尔低浓度组	50	1.68 \pm 0.04##
尼可地尔中浓度组	100	1.58 \pm 0.03 ^{#A}
尼可地尔高浓度组	200	1.35 \pm 0.03 ^{##A}

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,## $P < 0.01$;与尼可地尔低浓度组比较,^A $P < 0.05$,^{AA} $P < 0.01$;与尼可地尔中浓度组比较,^{##} $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$; vs. model group, ## $P < 0.01$; vs. nicorandil low concentration group, ^A $P < 0.05$, ^{AA} $P < 0.01$; vs. nicorandil medium concentration group, ^{##} $P < 0.01$

3.2 尼可地尔对PASMCs迁移能力的影响

与正常对照组比较,模型组每视野迁移细胞数显著

增加($P<0.01$),表明PASMCs迁移增多,提示AS模型细胞建立成功。与模型组比较,尼可地尔低、中、高浓度组每视野迁移细胞数均显著减少,且尼可地尔中、高浓度组显著少于低浓度组,高浓度组显著少于中浓度组($P<0.01$),提示尼可地尔可抑制PASMCs的迁移,且抑制能力随浓度的增加而增强。各组细胞迁移细胞数的检测结果见表3。

表3 各组细胞迁移细胞数的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Determination results of the number of migration cells in each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	给药浓度, $\mu\text{mol/L}$	细胞迁移数, 个/视野
正常对照组		53.00 \pm 3.61
模型组		129.67 \pm 5.69**
尼可地尔低浓度组	50	102.00 \pm 5.29**
尼可地尔中浓度组	100	79.00 \pm 3.61*** Δ
尼可地尔高浓度组	200	63.00 \pm 3.61*** $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ** $P<0.01$;与尼可地尔低浓度组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与尼可地尔中浓度组比较, $\Delta\Delta P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, ** $P<0.01$; vs. nicorandil low concentration group, $\Delta\Delta P<0.01$; vs. nicorandil medium concentration group, $\Delta\Delta P<0.01$

3.3 尼可地尔对PASMCs中CTGF、AREG mRNA表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中CTGF、AREG mRNA的表达水平均显著升高($P<0.01$),表明PASMCs中CTGF、AREG mRNA表达明显上调,提示AS模型细胞建立成功。与模型组比较,尼可地尔低、中、高浓度组细胞中CTGF、AREG mRNA的表达水平均显著降低,且尼可地尔中、高浓度组显著低于低浓度组,高浓度组显著低于中浓度组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示尼可地尔可抑制PASMCs中CTGF、AREG mRNA的表达,且抑制能力随浓度的增加而增强。各组细胞中CTGF、AREG mRNA表达水平的检测结果见表4。

3.4 尼可地尔对PASMCs中CTGF、AREG蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组细胞中CTGF、AREG蛋白的表达水平均显著升高($P<0.01$),表明PASMCs中CTGF、AREG蛋白表达明显上调,提示AS模型细胞建立成功。与模型组比较,尼可地尔低、中、高浓度组细胞中CTGF、AREG蛋白的表达水平均显著降低,且尼可地尔中、高浓度组显著低于低浓度组,高浓度组显著低于中浓度组($P<0.01$),提示尼可地尔可抑制PASMCs中CTGF、AREG蛋白的表达,且抑制能力随浓度的增加而增强。各组细胞中CTGF、AREG蛋白表达的电泳图见图1,检测结果见表5。

表4 各组细胞中CTGF、AREG mRNA表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Determination results of mRNA expression of CTGF and AREG in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	给药浓度, $\mu\text{mol/L}$	CTGF mRNA	AREG mRNA
正常对照组		0.45 \pm 0.03	0.38 \pm 0.05
模型组		1.00 \pm 0.16**	1.00 \pm 0.12**
尼可地尔低浓度组	50	0.62 \pm 0.05*	0.57 \pm 0.04**
尼可地尔中浓度组	100	0.44 \pm 0.05** Δ	0.35 \pm 0.04** $\Delta\Delta$
尼可地尔高浓度组	200	0.21 \pm 0.01** $\Delta\Delta\Delta$	0.21 \pm 0.02** $\Delta\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ** $P<0.05$, ** $P<0.01$;与尼可地尔低浓度组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与尼可地尔中浓度组比较, $\Delta\Delta P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, ** $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. nicorandil low concentration group, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$; vs. nicorandil medium concentration group, $\Delta\Delta P<0.01$

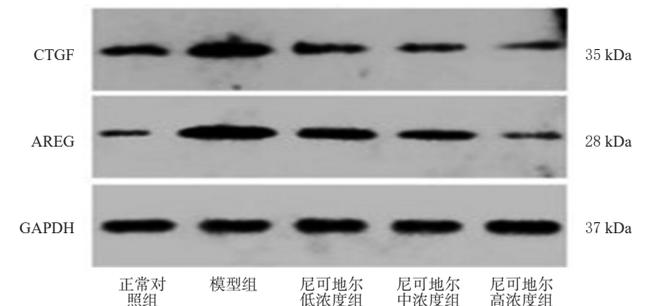


图1 各组细胞中CTGF、AREG蛋白表达的电泳图
Fig 1 Electrophoretogram of protein expression of CTGF and AREG in cells of each group

表5 各组细胞中CTGF、AREG蛋白表达水平的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 5 Determination results of protein expression of CTGF and AREG in cells of each group($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	给药浓度, $\mu\text{mol/L}$	CTGF	AREG
正常对照组		0.35 \pm 0.04	0.40 \pm 0.02
模型组		1.00 \pm 0.13**	1.00 \pm 0.10**
尼可地尔低浓度组	50	0.56 \pm 0.05**	0.59 \pm 0.05**
尼可地尔中浓度组	100	0.32 \pm 0.04** Δ	0.38 \pm 0.05** $\Delta\Delta$
尼可地尔高浓度组	200	0.18 \pm 0.02** $\Delta\Delta\Delta$	0.24 \pm 0.01** $\Delta\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, ** $P<0.01$;与尼可地尔低浓度组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与尼可地尔中浓度组比较, $\Delta\Delta P<0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P<0.01$; vs. model group, ** $P<0.01$; vs. nicorandil low concentration group, $\Delta\Delta P<0.01$; vs. nicorandil medium concentration group, $\Delta\Delta P<0.01$

4 讨论

PAH早期的分子机制是PASMCs的异常增殖和迁移,该异常可导致肺动脉异常重建,从而引发AS和PAH。PAH早期的分子病理现象与肿瘤早期的分子病理现象非常相似,同为细胞的增殖和迁移能力异常升

高,可见PAH可能与肿瘤拥有相同的治疗靶点。

Hippo/YAP信号通路在哺乳动物中具有高度保守的特性,且主要负责调控器官大小、发育和干细胞增殖。Hippo信号通路由MST1/2(Mammalian sterile20-like kinase 1 and 2)和LATS1/2(Largetumorsuppressor 1 and 2)两个激酶组成,MST1/2磷酸化LATS1/2并激活LATS1/2,激活后的LATS1/2磷酸化YAP并促进YAP降解,从而抑制YAP的转录活性;YAP的主要功能是作为共转录因子在细胞核中激活促进细胞增殖、迁移等功能的细胞生长正向调控基因。Hippo通路是肿瘤抑制通路,而YAP是癌基因,YAP的活性在多种肿瘤细胞中被激活,是肿瘤治疗的重要靶点^[12-14]。已有研究表明,在肿瘤发生和进展过程中,Hippo/YAP信号通路异常激活可增强肿瘤细胞的增殖、迁移能力以及细胞的干性^[15-16]。肺动脉重建和肿瘤发生进展的过程非常相似,均由细胞增殖和迁移能力异常升高引起,且肺动脉重建过程与器官大小的再调控非常类似,因此Hippo/YAP信号通路可能与PAH病理过程中PASCs增殖和迁移能力的异常升高密切相关。CTGF和AREG是YAP的主要下游靶因子,CTGF和AREG的表达与Hippo/YAP通路的活性成正比,在肿瘤组织中,检测CTGF和AREG可衡量Hippo/YAP通路的激活程度,从而反映肿瘤的恶性程度;同理,可预期CTGF和AREG的检测可预测肺动脉重建的程度并衡量肺动脉硬化和肺动脉高压的程度。基于此,本研究通过检测CTGF和AREG的mRNA水平和蛋白水平尝试鉴定Hippo/YAP通路的活性,结果显示,尼可地尔可显著抑制PASCs的增殖和迁移,下调细胞中CTGF和AREG蛋白及mRNA的表达,且成浓度依赖性,表明尼可地尔具有抑制AS模型PASCs细胞Hippo/YAP通路的活性。

综上所述,尼可地尔可抑制PASCs的增殖、迁移,其作用可能与抑制Hippo/YAP通路有关。本研究为建立PAH的新治疗策略提供了理论基础。

参考文献

- [1] THENAPPAN T,ORMISTON M,RYAN J, et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management[J]. *BMJ*, 2018. DOI:10.1136/bmj.j5492.
- [2] LAI YC,POTOKA K,CHAMPION H, et al. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome[J]. *Circ Res*, 2014,115(1):115-130.
- [3] MCLAUGHLIN V,MCGOON M. Pulmonary arterial hypertension[J]. *Circulation*, 2006,114(13):1417-1431.
- [4] MARON B,GALIE N. Diagnosis, treatment, and clinical

management of pulmonary arterial hypertension in the contemporary era: a review[J]. *JAMA Cardiol*, 2016, 1(9):1056-1065.

- [5] PURI A,MCGOON M,KUSHWAHA S. Pulmonary arterial hypertension: current therapeutic strategies[J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2007,4(6):319-329.
- [6] LATUS H,DELHAAS T,SCHRANZ D, et al. Treatment of pulmonary arterial hypertension in children[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015,12(4):244-254.
- [7] LAU E,HUMBERT M,CELERMAJER D. Early detection of pulmonary arterial hypertension[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015,12(3):143-155.
- [8] SCHERMULY R,GHOFRANI H,WIKINS M, et al. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011,8(8):443-455.
- [9] MONTANI D,GUNTHER S,DORFMULLER P, et al. Pulmonary arterial hypertension[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2013. DOI:10.1186/1750-1172-8-97.
- [10] DIEFFENBACH P,HAEGER C,CORONATA A, et al. Arterial stiffness induces remodeling phenotypes in pulmonary artery smooth muscle cells via YAP/TAZ-mediated repression of cyclooxygenase-2[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017,313(3):L628-L647.
- [11] ZUO X,WANG Q,CAO Q, et al. Nicorandil prevents right ventricular remodeling by inhibiting apoptosis and lowering pressure overload in rats with pulmonary arterial hypertension[J]. *PLoS One*, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0044485.
- [12] NISHIO M,GOTO H,SUZUKI M, et al. The hippo signaling pathway: a candidate new drug target for malignant tumors[J]. *Innovative Medicine: Basic Research and Development*, 2015. DOI:10.1007/978-4-431-55651-0_7.
- [13] BOOPATHY G,HONG W. Role of hippo pathway-YAP/TAZ signaling in angiogenesis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019. DOI:10.3389/fcell.2019.00049.
- [14] WHITE S,MURAKAMI S,YI C. The complex entanglement of Hippo-YAP/TAZ signaling in tumor immunity[J]. *Oncogene*, 2019,38(16):2899-2909.
- [15] VARELAS X. The hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease[J]. *Development*, 2014,141(8):1614-1626.
- [16] MOYA I,HALDER G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019,20(4):211-226.

(收稿日期:2020-08-06 修回日期:2020-09-27)

(编辑:邹丽娟)