

• 论著·实验研究·

# 辛伐他丁通过 PI3K/Akt 通路上调血红素加氧酶-1 表达对抗脂多糖诱导的 RLE-6TN 细胞损伤

张佩迪<sup>1</sup> 魏捷<sup>1</sup> 刘培钊<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的:观察辛伐他丁(SIM)对脂多糖(LPS)诱导的大鼠肺泡 II 型上皮细胞(RLE-6TN)损伤的保护作用及机制。方法:以离体培养 RLE-6TN 细胞为研究对象,观察 SIM 对 RLE-6TN 细胞血红素加氧酶-1(HO-1)表达的影响及机制。在 HO-1 表达最高时间点建立 LPS 炎症损伤模型,通过检测细胞活力和培养液中乳酸脱氢酶(LDH)含量,观察 SIM 对 LPS 诱导的 RLE-6TN 细胞炎症损伤的保护作用。结果:与正常对照组相比,SIM 组 Akt 磷酸化水平显著增加,并在处理后 2 h 达到峰值。SIM 可显著上调 RLE-6TN 细胞 HO-1 表达,mRNA 和蛋白分别在处理后 6 h 和 12 h 到达峰值。PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 可显著抑制 SIM 对 RLE-6TN 细胞 HO-1 的上调作用。LPS 处理可降低 RLE-6TN 细胞活力和增加培养液中 LDH 含量。SIM 可显著减轻 LPS 对 RLE-6TN 的损伤,但这种保护作用可以被 HO-1 抑制剂 Zn-pp 显著抑制。结论:SIM 可通过 PI3K/Akt 通路上调 HO-1 表达并抵抗 LPS 诱导的 RLE-6TN 细胞损伤。

**[关键词]** 辛伐他丁;RLE-6TN;血红素加氧酶-1;PI3K/Akt

doi: 10.13201/j.issn.1009-5918.2017.12.012

**[中图分类号]** R563.6 **[文献标志码]** A

## Simvastatin protect RLE-6TN cells from LPS induced injury via HO-1 up-regulation through PI3K/Akt pathway

ZHANG Peidi<sup>1</sup> WEI Jie<sup>1</sup> LIU Peizhao<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Emergency, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430060, China; <sup>2</sup>Medical Team, Chinese People's Liberation Army 71872 Troops)

Corresponding author: ZHANG Peidi, E-mail: peidier@126.com

**Abstract Objective:** To observe the protective effects and mechanisms of Simvastatin (SIM) on lipopolysaccharide (LPS) induced alveolar epithelial cells type II (RLE-6TN) injury. **Method:** The expression of HO-1 and the phosphorylation of Akt after SIM treatment in RLE-6TN were detected by RT-QPCR and/or western blot. Using lactate dehydrogenase release assay and cell counting kit-8 assay, the injury induced by LPS was determined and compared among RLE-6TN treated with SIM with or without HO-1 inhibitor. **Result:** The phosphorylation of Akt after SIM treatment was significantly increased. RT-QPCR results showed that the mRNA levels of HO-1 significantly increased and reached highest at 6 h and western blot further showed that HO-1 significantly increased and reached highest at 12 h following SIM treatment and reversed by PI3K/Akt inhibitor LY294002. SIM significantly increased the cell viability and decreased the medium lactate dehydrogenase content in cultures treated with LPS. Pretreatment with zinc protoporphyrin IX, a specific inhibitor of HO-1, significantly blocked the protective effects of SIM. **Conclusion:** These results suggested that SIM could protect RLE-6TN against LPS injury mostly by up-regulating of HO-1 expression through PI3K/Akt pathway.

**Key words** Simvastatin; RLE-6TN; heme oxygenase-1; PI3K/Akt

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种以肺血管内皮细胞及肺上皮细胞的广泛损伤为病理特点,临床上表现为肺部弥漫性渗出和难以用单纯吸氧纠正的低氧血症,是临床上常见危重症<sup>[1]</sup>。炎症细胞的激活、炎性因子的释放、肺内过度的炎症

反应等造成的肺泡 II 型上皮细胞(alveolar epithelial cells type II, AEC II)损伤在其中发挥重要作用<sup>[1-2]</sup>。研究发现,临床上广泛应用的降低血清胆固醇药物辛伐他丁(Simvastatin, SIM)能通过诱导血红素加氧酶-1(Heme oxygenase-1, HO-1)发挥抗炎、抗氧化以及抗凋亡等作用<sup>[3-6]</sup>。本研究的目的是观察 SIM 对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的大鼠肺泡 II 型上皮细胞(RLE-6TN)损伤的保护效应以及机制。

<sup>1</sup> 武汉大学人民医院急诊科(武汉,430060)

<sup>2</sup> 中国人民解放军第 71872 部队卫生队

通信作者:张佩迪, E-mail: peidier@126.com

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验对象

RLE-6TN 购自美国 ATCC 细胞库,用含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 完全培养进行培养,每 2 天半量换液,所有实验均选用对数生长期细胞。

#### 1.2 辛伐他丁处理

辛伐他丁购自美国 Sigma 公司,在使用前溶于 DMSO 中,使用终浓度为 10 μm。

#### 1.3 LPS 炎症损伤模型

LPS 购自美国 Sigma 公司,使用浓度终浓度为 1 μg/ml。在 HO-1 表达最高时间点(SIM 处理后 12 h),向培养基中加入 LPS,并在培养箱中继续培养 12 h。

#### 1.4 细胞活力和 LDH 含量检测

细胞活力检测:RLE-6TN 细胞 LPS 处理结束后,弃去培养基,加入 CCK-8 工作液 100 μl,在细胞培养箱中孵育 2 h。孵育结束后用酶标仪检测 450 nm 吸光度。

LDH 含量检测:RLE-6TN 细胞 LPS 损伤结束后收集培养液,按照 LDH 检测试剂盒说明书,测定培养基中 LDH 含量。

#### 1.5 RT-QPCR

按照 Trizol 说明书提取细胞样本 RNA,以其为模板逆转录合成 cDNA:HO-1 上游引物:5' ACAACCCACCAAGTTCAA 3';下游引物:5' GCGGTCTTAGCCTCTTCTGT 3';β-Actin 上游引物:5' CACTATCGGCAATGAGCGGTTCC 3';下游引物:5' CAGCACTGTGTTGGCATAGAGGT 3'。按说明书构建 RT-QPCR 反应体系,反应条件为:95℃ 30 s 热启动,95℃ 5 s,60℃ 30 s 扩增 40 各循环。

#### 1.6 Western blot

SIM 干预结束后弃培养基,用含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液(检测磷酸化 AKt 时加入磷酸酶抑制剂)制备蛋白样本。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中电泳结束,转入 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,电化学发光液显影,采用 Image J 软件进行灰度扫描。

#### 1.7 统计学分析

应用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理分析,计量资料以均数±标准差(SD)表示, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

#### 2.1 SIM 可显著上调 RLE-6TN 细胞 HO-1 表达

与正常对照组相比,SIM(10 μm)处理组 RLE-6TN 细胞 HO-1 mRNA 水平显著升高,并在 SIM 处理后 6 h 达到峰值(图 1a);HO-1 蛋白含量在

SIM 处理后同样显著升高( $P < 0.05$ ),并在 SIM 处理后 12 h 达到峰值(图 1b)。

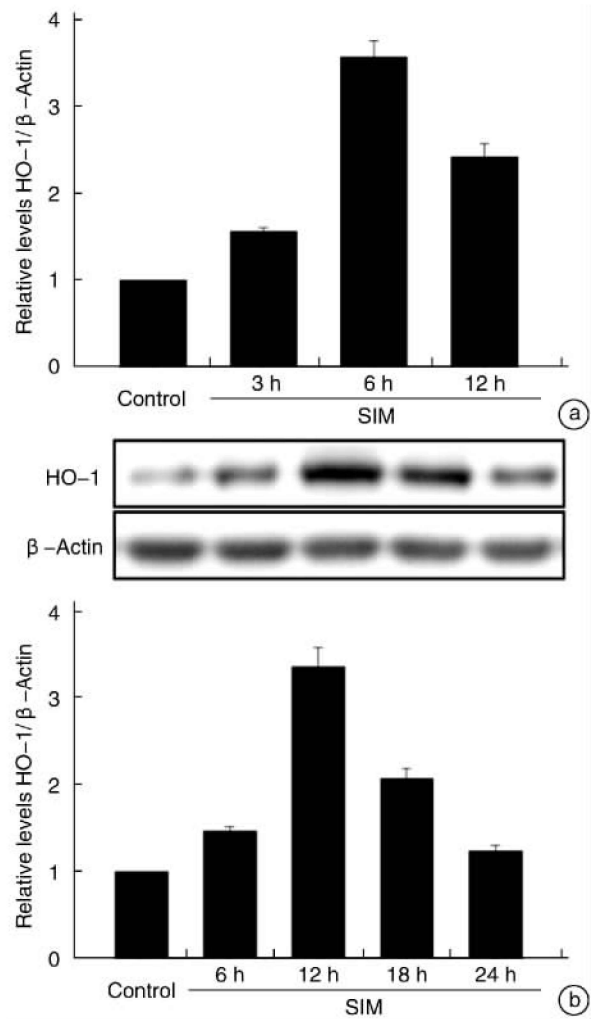


图 1 SIM 对 RLE-6TN 细胞 HO-1 表达的影响

#### 2.2 SIM 可显著对抗 LPS 对 RLE-6TN 细胞的损伤作用

与正常对照组相比,LPS 处理组 RLE-6TN 细胞活力显著降低,培养基中 LDH 含量显著升高( $P < 0.01$ );与 LPS 组相比,SIM 加 LPS 组 RLE-6TN 细胞活力显著升高,培养基中 LDH 含量显著降低( $P < 0.01$ );与 SIM 加 LPS 组相比,SIM 加 LPS+Zn-pp 组 RLE-6TN 细胞活力显著降低,培养基中 LDH 含量显著升高( $P < 0.01$ )。见图 2。

#### 2.3 SIM 上调 RLE-6TN 细胞 HO-1 表达通过激活 PI3K/Akt 通路

为进一步研究 SIM 上调 RLE-6TN 细胞 HO-1 表达的机制,研究中检测了 SIM 处理后 0.5、1.0、2.0、4.0 h 时信号分子 Akt 的磷酸化变化。SIM 处理后 Akt 磷酸化水平显著升高( $P < 0.01$ ),并在 SIM 处理后 2 h 时达到峰值(图 3a),给予 Akt 抑制剂,能显著抑制 HO-1 的 mRNA(图 3b)和蛋白

水平(图 3c)。

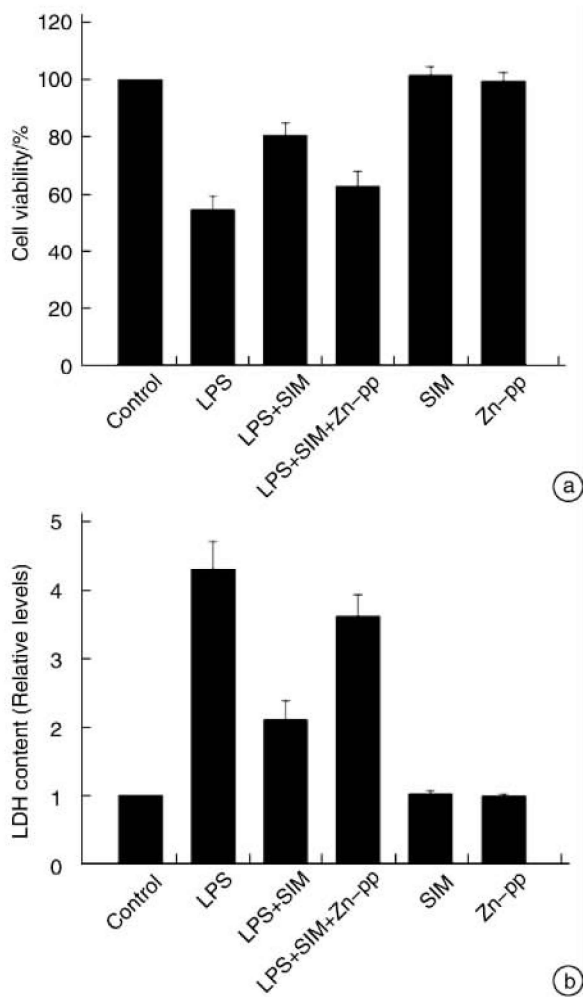


图 2 SIM 对 RLE-6TN 细胞炎症损伤的保护作用

### 3 讨论

AEC II 细胞在肺组织内不但数量较多,而且具有非常重要的生物学功能。首先,AEC II 具有无限增殖的潜能,其既可以分化为 AEC I,也可以通过有丝分裂产生子代 AEC II 以维持自身的细胞群,在肺上皮细胞正常的更新和损伤修复过程中发挥重要作用。其次,AEC II 能合成和分泌肺泡表面活性物质,降低肺泡表面张力。再次,AEC II 具有重要的肺水转运功能,参与调控肺泡液的吸收和分泌。最后,AEC II 能够分泌多种抗菌成分(如溶菌素、补体等)以及表达多种受体(如 Toll 样受体等),参与对病原微生物的识别。AEC II 受损将影响肺泡气体交换,导致急性顽固性低氧血症,是 ALI 发病的重要原因。

研究表明,SIM 除能降低血清胆固醇外,还具有多种潜在的其他作用,包括抗炎、抗氧化、以及改善血管内皮功能等<sup>[3,7-8]</sup>。但是,SIM 浓度过高则会对细胞造成损伤。本研究在参阅前人研究的基础上选择了 10  $\mu\text{m}$  这一安全有效的浓度<sup>[4,9]</sup>。实验

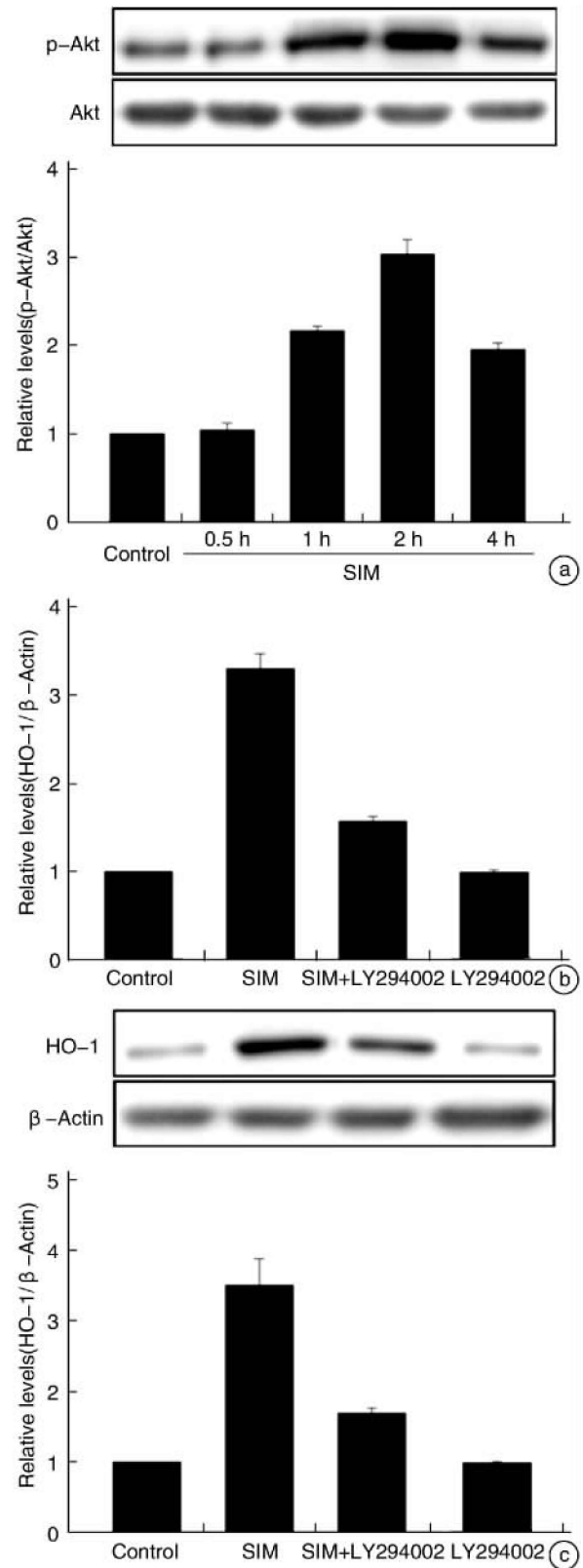


图 3 PI3k/Akt 通路在 SIM 诱导 RLE-6TN HO-1 表达中的作用

结果表明与正常对照组相比,10  $\mu\text{m}$  SIM 对 RLE-6TN 细胞细胞活力和培养液中 LDH 含量无显著影响,即该浓度 SIM 对 RLE-6TN 细胞活力无影响。

近期研究发现 SIM 抗炎、抗氧化等功能的发挥与 SIM 对机体 HO-1 的诱导作用密切相关<sup>[3-5]</sup>。Zhao 等<sup>[5]</sup>研究发现,长期给予 SIM 可通过上调肺组织 HO-1 表达可显著降低机械通气造成的肺部炎症反应。Hsu 等<sup>[3]</sup>研究发现 SIM 可通过增加 HO-1 活性,改善大鼠肺动脉高压。HO-1 是机体内血红素代谢的限速酶,可将血红素分解成 CO、Fe<sub>2</sub><sup>+</sup> 和胆绿素等产物,在机体对抗炎症损伤过程中发挥重要作用。CO 作为一个内源性气体信号分子可以通过与细胞内含有过渡金属的蛋白(例如可溶性鸟苷酸环化酶、细胞色素、NOS 等)等结合,并通过激活相应的信号转导通路,对抗细胞炎症损伤<sup>[10-11]</sup>。胆绿素在胆绿素还原酶的作用下生成胆红素,生理浓度的胆红素,不但具有较强的活性氧清除能力,而且还可通过减少白细胞滚动和黏附以及降低 P 和 E 选择素的表达发挥抗炎作用<sup>[12]</sup>。研究中首先检测了 SIM 处理后一定时间内 RLE-6TN 细胞 HO-1 mRNA 和蛋白水平的变化,结果发现 SIM 处理后 HO-1 mRNA 在 6 h 时达到峰值,而 HO-1 蛋白在 12 h 时达到峰值,提示 SIM 对 RLE-6TN 细胞 HO-1 表达的调节主要是在转录水平。明确 SIM 处理后 RLE-6TN 细胞 HO-1 表达规律后,在 HO-1 表达最高时间点建立了 LPS 炎症损伤模型,并选取细胞活力和培养液中 LDH 含量变化作为评价指标,观察了 SIM 对 RLE-6TN 炎症损伤的保护作用。实验结果发现,SIM 处理能显著对抗 LPS 诱导的 RLE-6TN 细胞损伤,并且这种保护作用可被 HO-1 抑制剂 Zn-pp 显著抑制。

PI3k/Akt 信号通路是调控细胞生长、增殖、分化和蛋白合成等生理过程的重要信号通路。近期研究发现 SIM 对细胞 HO-1 的诱导作用与该通路的激活密切相关<sup>[4,13]</sup>。本研究检测了 SIM 处理后 0.5、1.0、2.0、4.0 h 时 Akt 的磷酸化变化,结果发现 SIM 处理后 Akt 磷酸化水平逐渐升高并在 2 h 时达到峰值,进一步研究发现 PI3k/Akt 通路抑制剂 LY294002 可显著抑制 SIM 对 RLE-6TN 细胞 HO-1 诱导作用。

综上所述,研究结果表明 SIM 可通过激活 PI3K/Akt 通路诱导 RLE-6TN 细胞 HO-1 表达并有效对抗 LPS 诱导的炎症损伤,提示 SIM 可能是一种能有效预防 ALI 的药物。

#### 参考文献

[1] Standiford T J, Ward P A. Therapeutic targeting of acute lung injury and acute respiratory distress syn-

drome[J]. *Translational Res: J Lab Clin Med*, 2016, 167:183-191.

- [2] 李成恩,郝建,李树雯,等. 爆炸致家兔急性肺损伤及乌司他丁的保护作用[J]. *中国急救医学*, 2016, 36(9):842-845.
- [3] Hsu H H, Ko W J, Hsu J Y, et al. Simvastatin ameliorates established pulmonary hypertension through a heme oxygenase-1 dependent pathway in rats[J]. *Respiratory Res*, 2009, 10:32-32.
- [4] Jang H J, Hong E M, Kim M, et al. Simvastatin induces heme oxygenase-1 via NF-E2-related factor 2 (Nrf2) activation through ERK and PI3K/Akt pathway in colon cancer[J]. *Oncotarget*, 2016.
- [5] Zhao W, Song H, Huo W. Long-term administration of simvastatin reduces ventilator-induced lung injury and upregulates heme oxygenase 1 expression in a rat model[J]. *J Surg Res*, 2015, 199:601-607.
- [6] Lee T S, Chang C C, Zhu Y, et al. Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection[J]. *Circulation*, 2004, 110:1296-1302.
- [7] Zhang F, Sun D, Chen J, et al. Simvastatin attenuates angiotensin II-induced inflammation and oxidative stress in human mesangial cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11:1246-1251.
- [8] Zhao Y, Feng Q, Huang Z, et al. Simvastatin inhibits inflammation in ischemia-reperfusion injury[J]. *Inflammation*, 2014, 37:1865-1875.
- [9] Barnett M, Hall S, Dixit M, et al. Simvastatin attenuates oleic acid-induced oxidative stress through CREB-dependent induction of heme oxygenase-1 in renal proximal tubule cells[J]. *Pediatric Research*, 2016, 79:243-250.
- [10] Richards J A, Wigmore S J, Devey L R. Heme oxygenase system in hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *World J Gastroenterol: WJG*, 2010, 16:6068-6078.
- [11] Boczkowski J, Poderoso J J, Motterlini R. CO-metal interaction: Vital signaling from a lethal gas[J]. *Trends in biochemical sciences*, 2006, 31:614-621.
- [12] Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, et al. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress; role of bilirubin generated by the enzyme[J]. *Circ Res*, 1999, 85:663-671.
- [13] Kim K J, Kim K S, Kim N R, et al. Effects of simvastatin on the expression of heme oxygenase-1 in human RPE cells[J]. *Investigative Ophthalmol Visual Sci*, 2012, 53:6456-6464.

(收稿日期:2017-10-24)