

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.09.019

论著·实验研究

过表达 KyoT2 对哮喘小鼠气道平滑肌 细胞增殖和迁移的影响

赵龙 刘翠翠 石晓岚 王宁

(西安市儿童医院呼吸哮喘科, 陕西 西安 710003)

[摘要] **目的** 研究 KyoT2 对哮喘小鼠气道平滑肌细胞 (ASMC) 增殖和迁移的影响。**方法** 卵白蛋白 (OVA) 诱导 BALB/c 小鼠建立哮喘气道重塑模型后, 行 ASMC 分离和培养, 并以原代培养的正常小鼠 ASMC 作为对照组。检测对照组和哮喘组小鼠 ASMC 中 KyoT2 的表达。哮喘小鼠 ASMC 转染 pCMV-Myc (空载体组) 和过表达 KyoT2 质粒 pCMV-Myc-KyoT2 (KyoT2 过表达组) 48 h 后, 采用 RT-PCR 和 Western blot 方法检测各组 KyoT2 mRNA 和蛋白表达; 采用 MTT 法和 BrdU 法检测 ASMC 增殖; 采用 Transwell 法检测 ASMC 的迁移。Western blot 用于检测过表达 KyoT2 对 RBP-J κ 、PTEN 和 AKT 蛋白表达水平的影响。**结果** 与对照组比较, 哮喘组 ASMC 中 KyoT2 表达下调, KyoT2 过表达组 ASMC 中 KyoT2 表达显著上调 ($P<0.05$)。与空载体组比较, KyoT2 过表达抑制细胞增殖和细胞迁移 ($P<0.05$); 且 KyoT2 过表达能下调 RBP-J κ 和 AKT 的表达, 上调 PTEN 的表达 ($P<0.05$)。**结论** KyoT2 抑制哮喘 ASMC 增殖和迁移, 其机制可能是通过负调控 RBP-J κ /PTEN/AKT 信号通路来实现。
[中国当代儿科杂志, 2016, 18(9): 885-890]

[关键词] KyoT2; 气道平滑肌细胞; 增殖; 迁移; RBP-J κ /PTEN/AKT 信号通路; 小鼠

Inhibitory effect of KyoT2 overexpression on proliferation and migration of airway smooth muscle cells in mice with asthma

ZHAO Long, LIU Cui-Cui, SHI Xiao-Lan, WANG Ning. Department of Asthma, Children's Hospital of Xi'an, Xi'an 710003, China (Email: hbo_liu@126.com)

Abstract: Objective To investigate the effect of KyoT2 on the proliferation and migration of airway smooth muscle cells (ASMCs) in mice with asthma. **Methods** Ovalbumin (OVA) was used to establish the asthmatic model of airway remodeling in BALB/c mice. ASMCs were isolated and cultured, and primarily cultured ASMCs were used as the control group. The expression of KyoT2 in ASMCs was measured in the control and asthma groups. After the ASMCs from asthmatic mice were transfected with pCMV-Myc (empty vector group) or pCMV-Myc-KyoT2 plasmid with overexpressed KyoT2 (KyoT2 expression group) for 48 hours, RT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of KyoT2, the MTT assay and BrdU assay were used to measure the proliferation of ASMCs, and Transwell assay was used to measure the migration of ASMCs. Western blot was used to determine the effect of KyoT2 overexpression on the protein expression of RBP-J κ , PTEN, and AKT. **Results** Compared with the control group, the asthma group had significantly downregulated expression of KyoT2 in ASMCs, and the KyoT2 expression group had significantly upregulated expression of KyoT2 in ASMCs ($P<0.05$). Compared with the empty vector group, overexpressed KyoT2 significantly inhibited cell proliferation and migration, downregulated the expression of RBP-J κ and AKT, and upregulated the expression of PTEN. **Conclusions** Overexpressed KyoT2 can inhibit the proliferation and migration of ASMCs through the negative regulation of RBP-J κ /PTEN/AKT signaling pathway.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(9): 885-890]

Key words: KyoT2; Airway smooth muscle cell; Proliferation; Migration; RBP-J κ /PTEN/AKT signaling pathway; Mice

哮喘是常见的慢性呼吸道疾病之一，其发病率近年明显增加，目前仍是全球性的主要公共卫生问题^[1]。据估计全球有约3亿哮喘患者，且儿童哮喘患病率高于成人，严重威胁青少年身体健康^[2]。积极防治小儿支气管哮喘可防止气道不可逆性狭窄和气道重塑。

KyoT是一种 LIM 结构域蛋白，有两种类型：KyoT1 和 KyoT2 蛋白，其中 KyoT2 可与 RBP-Jκ 相互作用^[3]。有研究表明，在哮喘型小鼠中，过表达 KyoT2 抑制气道重塑^[4]。气道平滑肌细胞（airway smooth muscle cells, ASMC）增殖和迁移参与哮喘的发生发展，是哮喘过程中重要的病理学变化^[5]。KyoT2 对 ASMC 的增殖和迁移作用尚未见报道。本研究拟通过卵白蛋白（ovalbumin, OVA）建立小鼠哮喘模型，观察 KyoT2 在哮喘小鼠 ASMC 中的表达；分离正常和哮喘小鼠的 ASMC，探讨 KyoT2 对哮喘小鼠 ASMC 增殖和迁移的作用及可能的机制，为 KyoT2 防治哮喘气道重塑提供实验依据并奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

OVA (Sigma 公司, 美国), 胎牛血清 (Hyclone, 美国), 0.25% 胰蛋白酶和 D-Hanks 液 (JRH 公司, 美国), MTT 试剂盒 (上海碧云天公司), BrdU 试剂盒 (Roche 公司, 瑞士), AKT、p-AKT、Myc 和 PTEN 抗体 (Cell Signaling 公司, 美国), KyoT2 抗体 (Abcam 公司, 美国), RBP-Jκ (Santa Cruz 公司, 美国), HRP 标记的二抗 (北京中杉金桥公司), Transwell 小室 (Corning 公司, 美国)。

1.2 哮喘动物模型建立

3 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠 16 只，体重 18~22 g，由西安交通大学医学院实验动物中心提供，随机分成对照组和哮喘组，每组 8 只。小鼠哮喘动物模型的建立参照文献^[6]后略加改动，哮喘组小鼠于第 0 天和第 14 天腹腔注射致敏液 0.1 mL/只，致敏液中含 20 μg OVA 和 0.1 mL 氢氧化铝凝胶；第 21~27 天以 0.5% 的 OVA 溶液雾化激发，每次 20 min。对照组给予相同体积的生理盐水致敏、雾化。两组小鼠于最后 1 次雾化吸入后 24 h 颈椎脱臼处死，取气管作 ASMC 分离培养

实验。

1.3 小鼠 ASMC 分离及培养

运用组织贴块分离培养 ASMC。小鼠经断颈处死，迅速分离气管部分，置入含有青霉素的 D-Hanks 溶液中，剥离外膜并刮除内膜，将气管小心剪成约 1 mm³ 组织块，贴于培养皿底部，加入含 20% 胎牛血清的完全培养基。显微镜下观察组织块外缘细胞融合度达 80% 时，进行首次传代，按照 1:2 传代。

1.4 细胞转染

过表达 KyoT2 的质粒 pCMV-Myc-KyoT2 和对照质粒 pCMV-Myc 由上海生工生物公司提供。将哮喘组 ASMC 接种于培养皿中，随机分为空载体组（转染 pCMV-Myc 的哮喘组 ASMC）和 KyoT2 过表达组（转染 pCMV-Myc-KyoT2 的哮喘组 ASMC）。无血清培养 24 h，采用 lipo2000 试剂将 pCMV-Myc 和 pCMV-Myc-KyoT2 转入 ASMC 中，5 h 后换上完全培养基继续培养 48 h，收样后检测 KyoT2 转染效率。

1.5 MTT 法检测 ASMC 增殖

ASMC 经 0.25% 胰蛋白酶消化后，以 $1 \times 10^7/L$ 的密度接种于 96 孔培养板中。细胞分为对照组（对照组 ASMC）、哮喘组（哮喘组 ASMC）、空载体组（转染 pCMV-Myc 的哮喘组 ASMC）和 KyoT2 过表达组（转染 pCMV-Myc-KyoT2 的哮喘组 ASMC），每组设置 3 个复孔。每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μg，培养 3.5 h 后弃培养液，加入 150 μL 培养液，震荡 10 min，选择 570 nm 波长，采用酶标仪检测各孔 490 nm 处的吸光度值（OD）。实验独立重复 6 次。

1.6 BrdU 法检测 ASMC 增殖

细胞处理及分组情况同 1.5 小节，每组设置 3 个复孔。收样前 8~10 h，每孔加入 BrdU 10 μL。收样时弃上清，加入 200 μL/孔 Fix Denat 室温反应 30 min，弃上清，加入 100 μL/孔 anti-BrdU-POD 工作液，室温反应 90 min，弃上清，清洗 4 次，加入 100 μL 底物溶液，室温反应 15 min。2 mol/L 硫酸终止反应。实验独立重复 6 次。

1.7 Transwell 检测细胞迁移

Transwell 板上室和下室之间的聚碳酸酯膜采用 I 型胶原溶液于 4℃ 过夜反应。ASMC 经转染 pCMV-Myc 和 pCMV-Myc-KyoT2 48 h 后，消化细胞

并计数,用含10%胎牛血清的培养基调整细胞密度为 $1 \times 10^5/L$,Transwell上室中加入各组细胞悬液100 μL ,下室中加入600 μL 含10%胎牛血清的培养基。将Transwell小室于37 $^{\circ}C$ 孵育6 h,擦去微孔膜上未穿膜的细胞,膜下面的ASMC采用甲醇固定,结晶紫染色10 min,封片,在倒置显微镜下,每组观察4张切片,每张切片随机选取5个视野进行计数,取平均值计算。实验独立重复6次。

1.8 Real-Time PCR

ASMC接种于6孔板中,分为对照组、空载体组和KyoT2过表达组。每组设3个平行样本,采用TRIzol提取各组细胞的总RNA。以总RNA为模板,采用逆转录试剂盒合成cDNA,引物由上海生工生物工程公司合成。KyoT2上游引物:5'-GACCAGAACGTGGAGTACAA-3',下游引物:5'-AGTCAGGGCAATACACCTGC-3'; β -actin上游引物:5'-TGCTGTCCCTGTATGCCTCT-3',下游引物:5'-TTGATGTCACGCACGATTC-3'。各组取5 μg cDNA为模板,选择25 μL 的反应体系,94 $^{\circ}C$ 预变性2 min;94 $^{\circ}C$ 变性15 s,60 $^{\circ}C$ 退火30 s,72 $^{\circ}C$ 延伸30 s,共40个循环。每个基因用内参基因 β -actin校准。目的基因的相对表达水平依据 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算。实验独立重复6次。

1.9 Western blot 法检测 RBP-J κ 、PTEN 和 AKT 蛋白表达

ASMC接种于6孔板中,分为哮喘组、空载体组和KyoT2过表达组。每组设3个平行样本,

提取各组总蛋白。采用BCA试剂盒测定蛋白浓度,每组50 μg 蛋白经SDS-PAGE电泳、转膜后,5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入一抗4 $^{\circ}C$ 反应过夜。加入HRP标记的二抗,室温反应1 h,采用化学发光液进行显色。采用Image J软件分析各个条带的OD值。实验重复6次。

1.10 统计学分析

采用SPSS 11.0统计学软件对数据进行统计学分析,计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KyoT2 在哮喘 ASMC 中的表达

RT-PCR和Western blot用于检测KyoT2的表达。哮喘组ASMC中KyoT2 mRNA表达较对照组显著下降($P < 0.05$) (图1A)。将Myc-KyoT2转染至哮喘组ASMC中48 h,结果表明哮喘组ASMC中KyoT2蛋白表达较对照组下调($P < 0.05$) (图1B)。

2.2 KyoT2 转染效率

采用RT-PCR法检测KyoT2 mRNA表达水平。结果显示,与空载体组比较,过表达KyoT2显著上调其mRNA(图2A, $P < 0.05$)和蛋白表达水平(图2B, $P < 0.05$)。

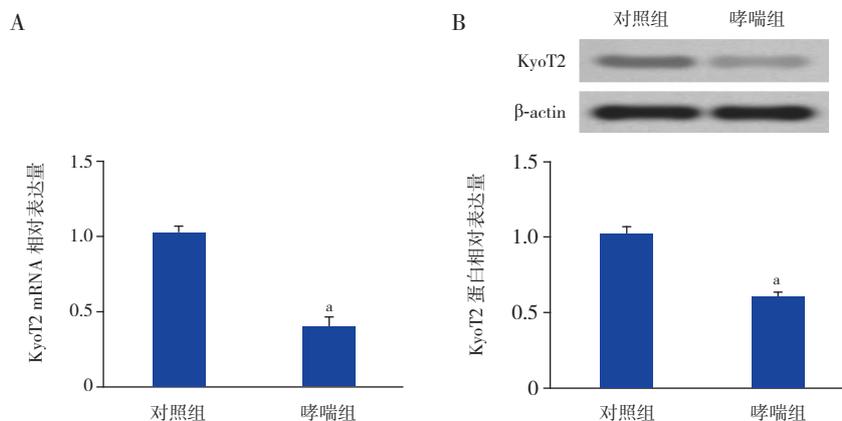


图1 KyoT2在OVA诱导的哮喘小鼠ASMC中的表达 A: RT-PCR检测KyoT2 mRNA表达水平($n=3$); B: Western blot检测KyoT2蛋白表达水平($n=3$)。a示与对照组相比, $P < 0.05$ 。

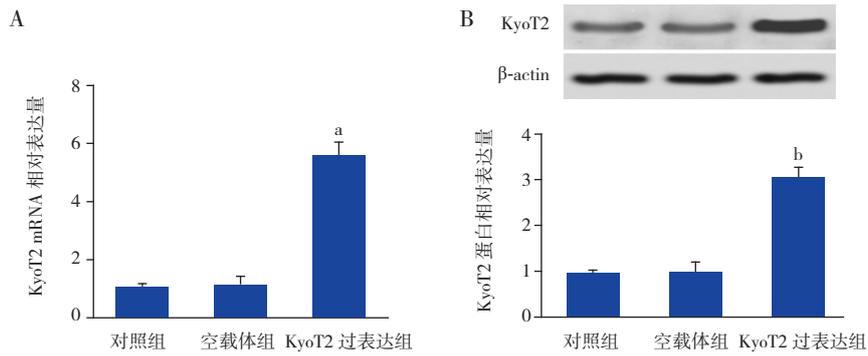


图2 KyoT2的转染效率 A: RT-PCR检测KyoT2 mRNA表达水平($n=3$); B: Western blot检测KyoT2蛋白表达水平($n=3$)。a示与空载体组相比, $P<0.01$; b示与空载体组相比, $P<0.05$ 。

2.3 过表达 KyoT2 抑制 ASMC 增殖

分别采用MTT法和BrdU法检测ASMC增殖。结果显示, KyoT2过表达组细胞增殖速度较空载体

组下降(图3A, $P<0.05$)。采用BrdU法进一步验证, KyoT2过表达组细胞BrdU掺入量较空载体组显著减少(图3B, $P<0.05$)。

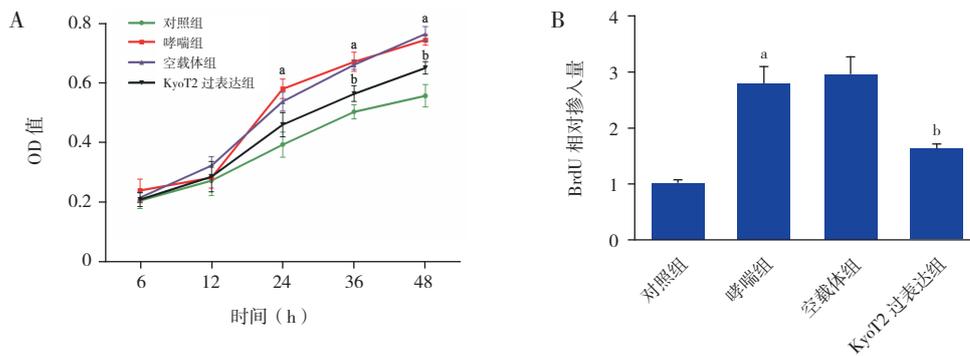


图3 过表达 KyoT2 抑制 ASMC 增殖 A: MTT法检测ASMC增殖($n=3$); B: BrdU法检测ASMC增殖($n=3$)。a示与对照组相比, $P<0.05$; b示与空载体组相比, $P<0.05$ 。

2.4 过表达 KyoT2 抑制 ASMC 迁移

Transwell法用于检测过表达KyoT2对哮喘组ASMC迁移的作用,结果如图4所示,哮喘组细胞迁移能力较对照组显著增强,而过表达KyoT2明显抑制OVA诱导的细胞迁移($P<0.05$)。

2.5 过表达 KyoT2 负调控 RBP-J/PTEN/AKT 通路

KyoT2能负调控RBP-J κ 的活性及表达^[7],同时RBP-J κ 能与PTEN的启动子结合进一步调控PTEN的表达及下游信号通路^[8]。本研究结果显示,在ASMC中过表达KyoT2能显著抑制RBP-J κ (图5A和B)和p-AKT(图5A和D)的表达而上调PTEN的表达(图5A和C)($P<0.05$)。

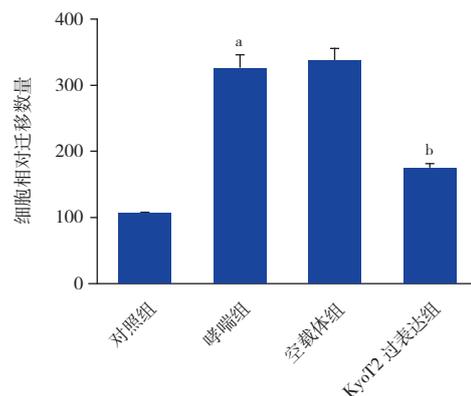


图4 过表达 KyoT2 抑制 ASMC 迁移($n=4$) a示与对照组相比, $P<0.05$; b示与空载体组相比, $P<0.05$ 。

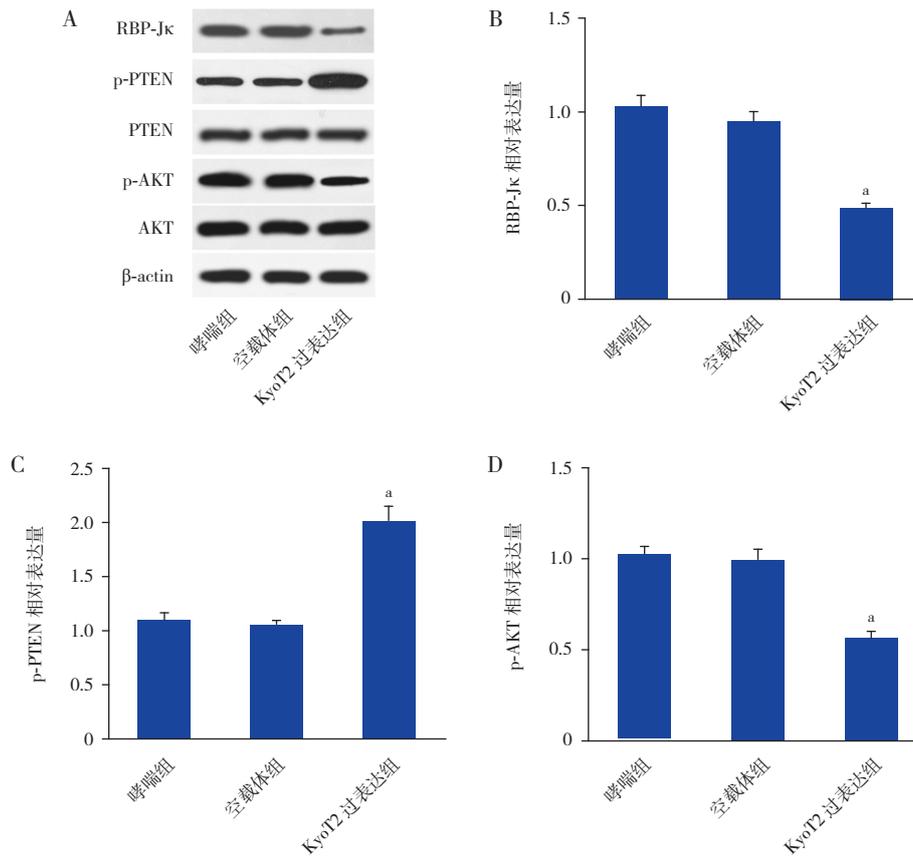


图 5 过表达 KyoT2 负调控 RBP-Jκ/PTEN/AKT 信号通路 A: Western blot 检测 RBP-Jκ、PTEN 和 AKT 蛋白表达水平 (n=3); B: RBP-Jκ 蛋白相对表达水平统计图 (n=3); C: p-PTEN 蛋白相对表达水平统计图 (n=3); D: p-AKT 蛋白相对表达水平统计图 (n=3)。a 示与空载体组相比, P<0.05。

3 讨论

近年来, 由于环境污染及社会因素, 哮喘发病率显著升高, 尤其儿童哮喘的发病率逐年上升^[9]。OVA 是常用哮喘致敏原, 一般分为单纯和复合两种方式致敏和诱导哮喘。氢氧化铝作为佐剂乳化 OVA, 多次经腹腔或者皮下致敏后, 再滴鼻或者雾化吸入诱导哮喘模型。哮喘作为一种反复性发作的疾病, 长期反复发作会使气道发生不可逆的缩窄和重塑^[10]。同时, 哮喘发生伴随着 ASMC 增殖并向气管腔内迁移, 进一步促进气道壁增厚^[11]。ASMC 的增殖和迁移导致哮喘的加重。KyoT2 是 Notch 1 信号的负性调控因子^[12], 能下调小鼠肺组织 Hes1 的表达, 减轻 OVA 诱导的哮喘模型小鼠气道上皮下胶原沉积, 减轻基底膜的厚度^[4]。本研究证实, 过表达 KyoT2 能抑制哮喘 ASMC 增殖和迁移, 其具体机制可能是通过负调控 RBP-Jκ/PTEN/AKT 通路实现。

KyoT2 是 Notch 信号通路的负性调控因子, 能与其下游分子 RBP-Jκ 结合抑制 Notch 信号通路^[13]。本研究发现过表达 KyoT2 下调 RBP-Jκ 的表达。同时, PTEN 是一个具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因, 对细胞的生长、增殖、分化、迁移和血管生长等均有明显的调控作用。研究表明过表达 PTEN 可通过下调 p-Akt 的表达, 抑制 HASMC 的增殖和迁移, 参与调控气道重塑^[14]。RBP-Jκ 能够与 PTEN 启动子结合调控 PTEN 基因的表达, 进一步调控其下游分子的表达^[8]。本研究结果显示过表达 KyoT2 显著上调 PTEN 的表达并抑制 p-AKT 表达。因此, 过表达 KyoT2 抑制 ASMC 增殖和迁移可能是通过负调控 RBP-Jκ/PTEN/AKT 通路实现。

综上所述, 过表达 KyoT2 抑制 ASMC 增殖和迁移, 其可能的机制是通过负调控 RBP-Jκ/PTEN/AKT 信号通路实现。提示 KyoT2 可能作为防治哮喘的靶分子, 为 KyoT2 预防哮喘气道重塑提供实验依据和新的思路。

[参 考 文 献]

- [1] To T, Stanojevic S, Moores G, et al. Global asthma prevalence in adults: findings from the cross-sectional world health survey[J]. BMC Public Health, 2012, 12: 204.
- [2] Gasana J, Dillikar D, Mendy A, et al. Motor vehicle air pollution and asthma in children: a meta-analysis[J]. Environ Res, 2012, 117: 36-45.
- [3] 李荣, 程轶梦, 陈蕾, 等. LIM 蛋白 KyoT 在小鼠胚胎发育中的表达 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(1): 95-98.
- [4] Hu M, Ou-Yang HF, Han XP, et al. KyoT2 downregulates airway remodeling in asthma[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(11): 14171-14179.
- [5] Li LH, Lu B, Wu HK, et al. Apigenin inhibits TGF- β 1-induced proliferation and migration of airway smooth muscle cells[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 12557-12563.
- [6] Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 156(3 Pt 1): 766-775.
- [7] Qin H, Wang J, Liang Y, et al. RING1 inhibits transactivation of RBP-J by Notch through interaction with LIM protein KyoT2[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(4): 1492-1501.
- [8] Whelan JT, Forbes SL, Bertrand FE. CBF-1 (RBP-J kappa) binds to the PTEN promoter and regulates PTEN gene expression[J]. Cell Cycle, 2007, 6(1): 80-84.
- [9] Von Mutius E. The microbial environment and its influence on asthma prevention in early life[J]. J Allergy Clin Immunol, 2016, 137(3): 680-689.
- [10] Ozdogan S, Tabakci B, Demirel AS, et al. The evaluation of risk factors for recurrent hospitalizations resulting from wheezing attacks in preschool children[J]. Ital J Pediatr, 2015, 41: 91.
- [11] Prakash YS. Airway smooth muscle in airway reactivity and remodeling: what have we learned[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 305(12): L912-L933.
- [12] 秦鸿雁, 韩骅. KyoT2 结合蛋白 KBP1 对 RBP-J 介导的转录活性的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(5): 544-547.
- [13] Borggreffe T, Oswald F. Keeping notch target genes off: a CSL corepressor caught in the act[J]. Structure, 2014, 22(1): 3-5.
- [14] 蓝海兵, 罗雅玲, 赖文岩, 等. 肿瘤抑制基因 PTEN 对人气道平滑肌细胞迁移和增殖的影响 [J]. 南昌大学学报 (医学版), 2015, 55(3): 14-18.

(本文编辑: 万静)