

# 野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压对大鼠肺 Hippo 信号通路相关分子表达的影响\*

朱宁, 陈皓, 赵旭勇, 赵玮, 姜文兵<sup>△</sup>, 王毅<sup>△</sup>

(温州医科大学温州市第三临床学院, 温州市人民医院心血管内科, 浙江温州 325000)

**[摘要]** **目的:** 研究野百合碱诱导大鼠肺动脉高压时肺 Hippo 信号通路相关分子表达的变化, 探讨 Hippo 信号通路对肺动脉高压发生发展的意义。**方法:** 45 只 SD 大鼠随机分为对照组 ( $n = 15$ ) 和模型组 ( $n = 30$ ), 模型组一次性给予颈部皮下注射野百合碱 (60 mg/kg) 建立肺动脉高压模型, 对照组注射相同剂量的生理盐水。4 周后通过右心导管术检测右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP), 计算右心室肥厚指数 (right ventricular hypertrophy index, RVHI) 和右心室质量指数 (right ventricular mass index, RVMI); HE 染色观察肺小动脉重构, 计算中膜厚度百分比 (medial thickness/external diameter, M/E%); Masson 染色检测肺组织纤维化; 免疫组化检测肺小动脉中 Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP)、tafazzin (TAZ) 和 TEAD 蛋白表达的变化; Western blot 和 RT-qPCR 检测肺组织中 YAP、TAZ 和 TEAD 蛋白和 mRNA 表达的变化。**结果:** 与对照组相比, 模型组大鼠的血管壁显著增厚, M/E% 明显增高 ( $P < 0.01$ ), 肺组织纤维化明显, 模型组的 RVSP、RVHI 和 RVMI 均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ); 免疫组化染色结果提示模型组肺小动脉 YAP、TAZ 和 TEAD 的蛋白水平显著高于对照组, Western blot 和 RT-qPCR 结果显示肺组织 YAP、TAZ 和 TEAD 的蛋白和 mRNA 水平同样高于对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论:** Hippo 信号分子的激活可能促进了肺小动脉的重构, 进而介导了野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压的发生发展。

**[关键词]** 肺动脉高压; Hippo 信号通路; 血管重构; 野百合碱

**[中图分类号]** R544.1<sup>+</sup>6; R363.2 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.07.029

## Effects of monocrotaline-induced pulmonary hypertension on expression of Hippo signaling pathway-related molecules in rat lung

ZHU Ning, CHEN Hao, ZHAO Xu-yong, ZHAO wei, JIANG Wen-bing, WANG Yi

(Department of Cardiology, The Third Clinical Institute Affiliated to Wenzhou Medical University, Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325000, China. E-mail: wangy8187800@126.com; jiangwb919@163.com)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the expression of Hippo signaling pathway-related molecules in the lung tissues of the rats with pulmonary hypertension induced by monocrotaline for exploring the significance of Hippo signaling pathway in the development of pulmonary hypertension. **METHODS:** SD rats ( $n = 45$ ) were randomly divided into control group ( $n = 15$ ) and model group ( $n = 30$ ). The rats in model group was given neck subcutaneous injection of monocrotaline at 60 mg/kg to establish pulmonary hypertension model, and the rats in control group was injected with the same volume of normal saline. Four weeks later, right ventricular systolic pressure (RVSP) was measured by right cardiac catheterization, and right ventricular hypertrophy index (RVHI) and right ventricular mass index (RVMI) were calculated. The remodeling of the pulmonary arterioles was observed by HE staining, and medial thickness/external diameter (M/E%) was evaluated. The fibrosis of lung tissues was detected by Masson staining. The protein expression of Yes-associated protein (YAP), tafazzin (TAZ) and TEAD was detected by immunohistochemistry, and the protein and mRNA levels of YAP, TAZ and TEAD in lung tissues were determined by Western blot and RT-qPCR. **RESULTS:** Compared with control group, the vascular wall in model group was thickened significantly, the M/E% was increased ( $P < 0.01$ ), the pulmonary fibrosis was obvious, and the RVSP and RVHI in model group were significantly higher than those in control group ( $P < 0.01$ ). The immunohistochemical staining showed that the protein expression of YAP, TAZ and TEAD in the pulmonary arterioles in model group was significantly higher than that in control group. The YAP, TAZ and TEAD protein and mRNA levels in

[收稿日期] 2018-09-18 [修回日期] 2018-12-17

\* [基金项目] 温州市科技局公益性社会发展 (医疗卫生) 科技项目 (No. Y20170247)

<sup>△</sup> 通讯作者 王毅 Tel: 13605775858; E-mail: wangy8187800@126.com; 姜文兵 Tel: 13957701220; E-mail: jiangwb919@163.com

the lung tissues were also higher than those in control group ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** The activation of Hippo signaling molecules may promote the remodeling of pulmonary arterioles and further regulate the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension.

[**KEY WORDS**] Pulmonary hypertension; Hippo signaling pathway; Vascular remodeling; Monocrotaline

动脉性肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 的一个亚型, 以肺小动脉重塑为特征, 导致肺血管阻力增加和肺动脉压增高<sup>[1]</sup>。PAH 是一种进行性发展的疾病, 最终导致右心室衰竭和死亡。据报道, PAH 在成人中约为每百万人中有 12 ~ 50 万人最终死亡。肺动脉重构主要是由于平滑肌细胞的异常生长、过度增殖和抗凋亡能力减弱所致<sup>[2]</sup>。因此, 抑制肺小动脉平滑肌细胞 (pulmonary arteriole smooth muscle cells, PASMCs) 增殖或诱导平滑肌细胞凋亡是 PAH 的有效治疗策略。研究调控 PASMCs 增殖和凋亡的关键分子, 能为 PAH 的防治提供有效的药物靶点。

近 20 年的多模型生物研究已经确立了 Hippo 通路作为器官大小和组织稳态的关键调控信号途径。通过抑制 Hippo 通路下游的 Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP) 和 tafazzin (TAZ), Hippo 途径能够调节细胞增殖、凋亡和干性<sup>[3]</sup>。目前许多研究已经表明 Hippo 通路的失调对肿瘤的发展有重要影响<sup>[4]</sup>。在心血管疾病方面, Hippo 通路也受到了越来越多的重视。但尚无研究表明 Hippo 通路在 PAH 中的表达情况以及探讨可能的作用。因此, 本实验通过观察野百合碱 (monocrotaline, MCT) 诱导的 PAH 大鼠肺 Hippo 通路相关蛋白的表达, 探讨 Hippo 通路在 PAH 发生发展中可能的作用和机制。

## 材 料 和 方 法

### 1 试剂

MCT 购自 Sigma; 抗 YAP、TAZ、PCNA、GAPDH 和 TEAD 抗体以及鼠和兔 II 抗均购自 Cell Signaling Technology; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购自 Sigma; HE 及 Masson 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; TRIzol 购自国药集团化学试剂有限公司; AMV 逆转录试剂盒购自 Promega; PCR 引物购自 TaKaRa; BCA 蛋白检测试剂盒及 3, 3'-二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 购自碧云天公司。

### 2 方法

**2.1 动物模型与分组** 45 只健康雄性 SD 大鼠购自上海动物实验中心, 合格证编号为 SCXK (浙) 2008-0033。随机分为 2 组: 对照组 (control 组,  $n = 15$ ) 和模型组 (model 组,  $n = 30$ )。造模组所有大鼠

给予一次性颈部皮下注射 60 mg/kg MCT (将 0.2 g MCT 溶解于 1 mol/L HCl 中, 加入 1 mol/L NaOH 调整 pH 至 7.2 ~ 7.4, 生理盐水定容至 10 mL); 对照组大鼠注射等量的生理盐水。

**2.2 血流动力学和心室肥厚检测** MCT 注射造模 4 周后, 称量 2 组大鼠体重 (body weight, BW), 水合氯醛 (4 mL/kg) 腹腔注射麻醉, 连接压力换能器, 将微导管 (PE50) 沿着大鼠颈外静脉插入右心室, 此时可见振幅较大的右心室波, 并记录右心室收缩压 (right ventricular systolic pressure, RVSP)。处死动物后取出心肺组织, 去除心房及大血管, 分离右心室和左心室以及室间隔, 滤纸吸干组织并称量, 计算右心室肥厚指数 (right ventricular hypertrophy index, RVHI) =  $RV / (LV + S)$ ; 计算右心室质量指数 (right ventricular mass index, RVMI; mg/g) =  $RV / BW$ 。肺组织标本一部分迅速存放于液氮中, 后于 -80 °C 冻存, 剩余部分用福尔马林固定。

**2.3 肺小动脉重构的检测** 肺组织石蜡切片常规脱蜡至水, HE 染色, 脱水透明后, 中性树脂封片, 显微镜选取肺小动脉 (直径 50 ~ 200  $\mu\text{m}$ ) 观察形态变化。采集图像后采用 ImageJ 软件分析, 根据公式计算中膜厚度百分比:  $M/E\%$  (medial thickness/external diameter) = 中膜厚度/外径  $\times 100\%$ 。Masson 染色同样参照说明书, 肺组织石蜡切片常规脱蜡至水, 依次在 Masson 染液进行染色, 中性树脂封片。光镜下观察蓝色的胶原纤维。

**2.4 Western blot 检测蛋白表达** 从 -80 °C 冰箱取出肺组织, 生理盐水漂洗, 滤纸吸干, 每只称量 0.1 g, RIPA 裂解液裂解, 静置 30 min 后离心取上清, BCA 法测定蛋白浓度。经过 SDS-PAGE, 半干式法转膜, BSA 封闭, 放入相应的 I 抗 4 °C 冰箱过夜, 经漂洗, 最后用辣根过氧化物酶标记的 II 抗孵育。FluorChem FC3 凝胶成像系统摄像并分析, 检测条带灰度值。GAPDH 作为内参照, 统计数据做归一化处理。

**2.5 免疫组织化学染色检测蛋白表达** 肺组织石蜡切片常规脱蜡至水, 过氧化氢 (30 g/L) 封闭 10 min 去除内源性过氧化物酶活性, PBS 孵育 3 次, 每次 5 min, 置于有柠檬酸钠液高压锅中煮沸修复抗原, PBS 孵育 3 次, 每次 5 min, 37 °C 用 I 抗孵育 1 h, 滴加生物素标记的 II 抗, 37 °C 孵育 30 min, PBS 孵育 3 次, 每次 5 min, DAB 显色剂显色 1 ~ 2 min。苏

木精复染细胞核,脱水透明后,中性树胶封片。光镜下观察蛋白的表达。

**2.6 RT-qPCR 检测 mRNA 表达** 所用引物参照已发表文献,序列见表 1。TRIzol 法提取肺组织总 RNA,提取总 RNA,20  $\mu$ L 体系中进行反转录为 cDNA,50  $\mu$ L 体系中进行扩增。反应完成后,软件将自动分析所有标本的记录曲线,计算出 Ct 值。GAPDH 作为内参照,统计数据做归一化处理。

**表 1 RT-qPCR 实验所用 YAP、TAZ、TEAD 和 GAPDH 的引物序列**

Table 1. The primer sequences of YAP, TAZ, TEAD and GAPDH for RT-qPCR

Name	Sequence (5' -3')
YAP	Forward: TACACCCACAGCTCAGCATC
	Reverse: GCCATGTTGTGTCTGATCG
TAZ	Forward: GGAGAGAGAAAAGATTCCAATGC
	Reverse: TGTCGACAGAGGCCAGCTT
TEAD	Forward: CCACCAAAGTTTGTCTCTTTGGGA
	Reverse: ACTTCAAACACACAGGCCATGCAG
GAPDH	Forward: GCAGATTACCAGCCAACGTCA
	Reverse: CGCCAGTAGACTCCACGACATA

**3 统计学处理**

所有实验数据用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。实验结果均以均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示。组间比较用非配对 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**结 果**

**1 造模大鼠存活率**

4 周时实验组 30 只大鼠中 11 只因病重死亡,2 只麻醉后死亡,最终存活大鼠 17 只,存活率为 56.6%,基本与之前的文献报道符合。对照组全部大鼠没有死亡。

**2 血流动力学和心室肥厚的比较**

与对照组相比,模型组大鼠体重增长明显不如对照组,而且 RVSP、RVHI 和 RVMI 均显著增高 (*P* < 0.01),提示 PAH 造模成功,见表 2。

**表 2 右心室收缩压、右心室肥厚指数和右心室质量指数的结果**  
Table 2. The results of RVSP, RVHI and RVMI (Mean  $\pm$  SD. *n* = 6)

Group	RVSP (mmHg)	RVHI (%)	RVMI (%)
Control	19.90 $\pm$ 1.92	29.08 $\pm$ 2.28	0.61 $\pm$ 0.01
Model	58.26 $\pm$ 6.01 **	64.96 $\pm$ 4.93 **	1.68 $\pm$ 0.17 **

\*\* *P* < 0.01 vs control group.

**3 肺小动脉重构的检测**

HE 染色结果显示模型组中小肺动脉血管内中膜和外层纤维层均明显增厚,管腔显著狭窄,甚至可见血管腔几乎完全闭塞等血管丛样改变,见图 1。造模组 M/E% 明显大于对照组 (*P* < 0.01),见图 2。Masson 染色结果显示模型组血管外层代表胶原纤维的蓝色明显多于对照组,见图 1。

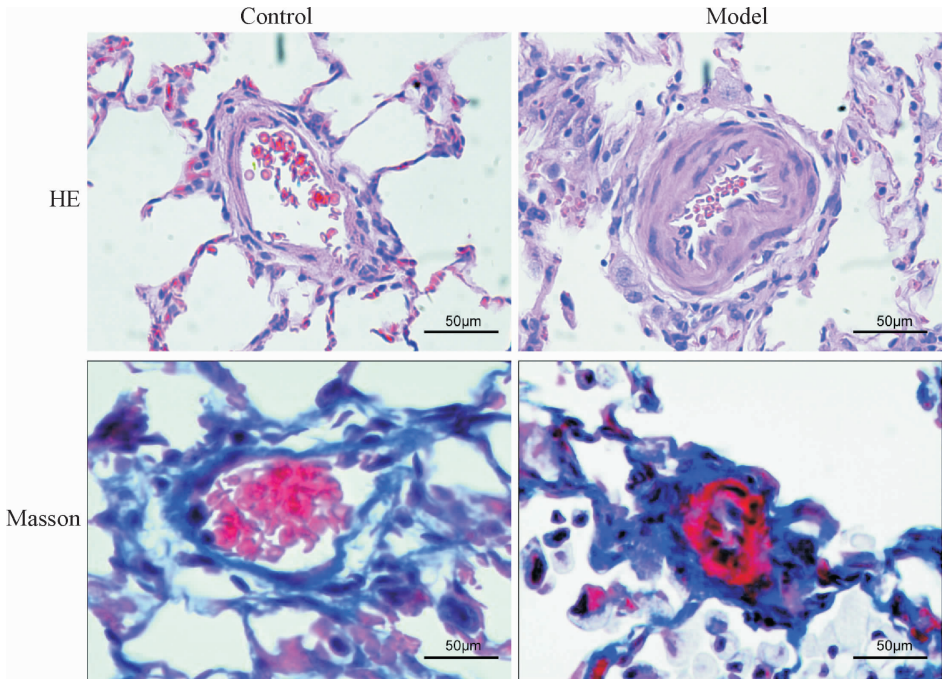


Figure 1. Observation of pulmonary arterial remodeling by HE staining and Masson staining ( $\times 400$ ).

**图 1 HE 染色观察肺动脉重构的病理变化**

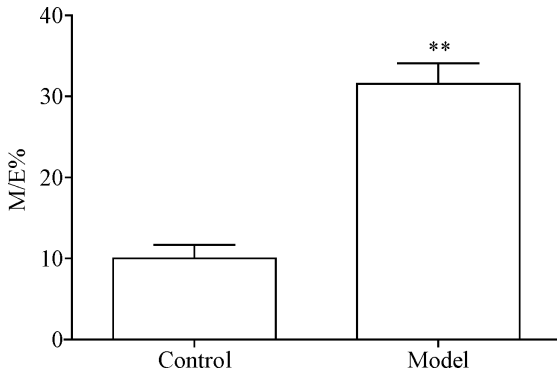


Figure 2. The quantitative analysis of M/E% in the pulmonary arterioles. Mean ± SD.  $n = 6$ . \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

图2 肺动脉中膜厚度/外径百分比的定量分析

#### 4 Hippo 信号通路相关分子的检测

免疫组化实验结果显示, YAP、TAZ 和 TEAD 蛋白主要在肺小动脉中层及外层中表达, 并且明显多于对照组, 见图3。同时 Western blot 及 RT-qPCR 结果提示全肺组织 YAP、TAZ 和 TEAD 蛋白及 mRNA 水平都明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 见图4 及表3。

#### 讨 论

本研究通过给予 MCT 诱导大鼠 PAH 模型的建立, 4 周后大鼠 RVSP 显著升高, RVHI 和 RVMI 明显增加, 肺小动脉增厚, 说明成功建立了 PAH 模型。Masson 染色提示肺组织纤维化炎症。与对照组相比, 免疫组化染色结果提示肺小动脉的 YAP、

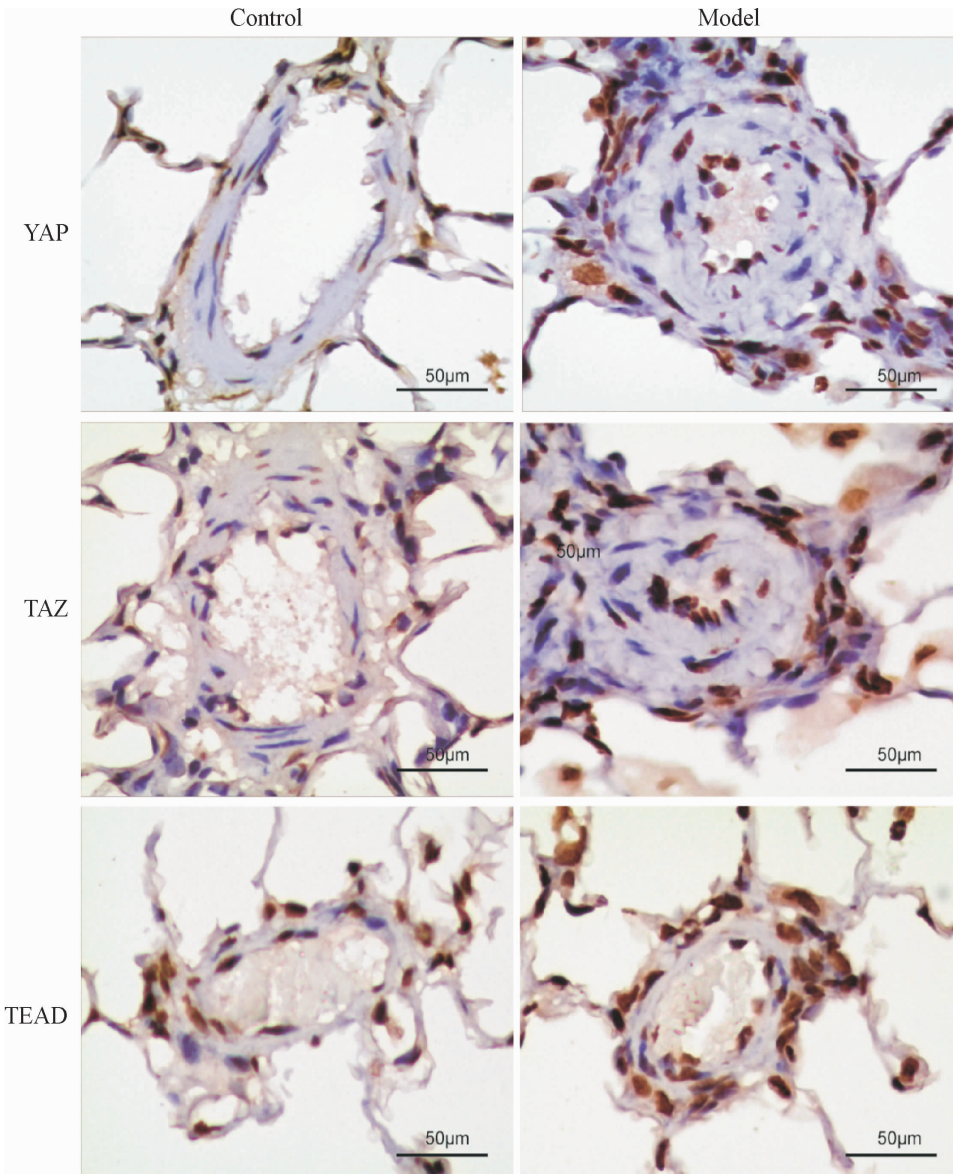


Figure 3. The results of YAP, TAZ and TEAD expression in the pulmonary arterioles detected by immunohistochemical staining ( $\times 400$ ).

图3 肺动脉 YAP、TAZ 和 TEAD 的免疫组化染色结果

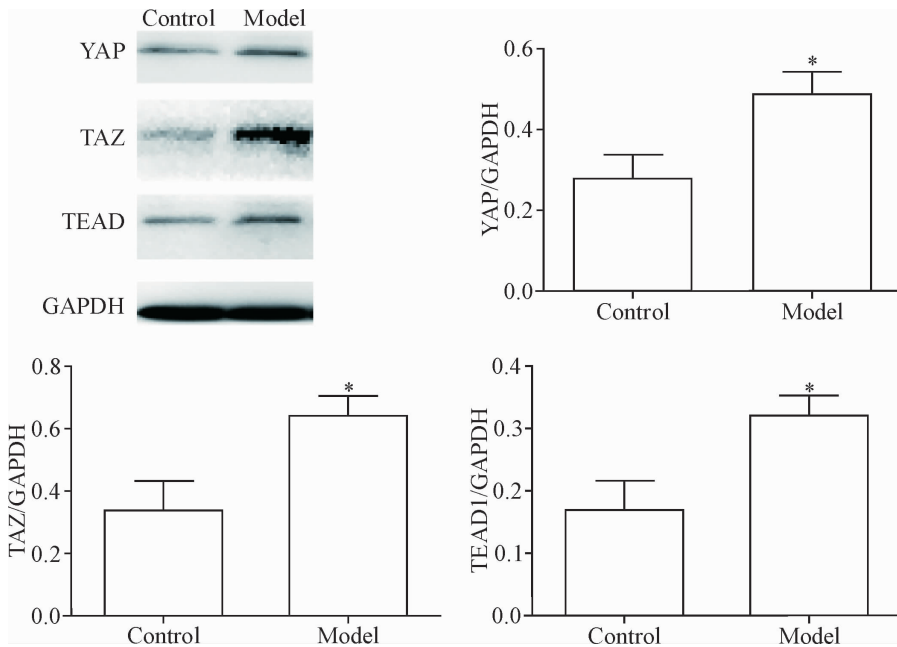


Figure 4. Western blot was used for determining the protein expression of YAP, TAZ and TEAD in the lung tissues. Mean  $\pm$  SD.  $n = 8$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

图4 Western blot 检测肺组织中 YAP、TAZ 和 TEAD 蛋白的表达

表3 YAP、TAZ 和 TEAD 的 mRNA 水平

Table 3. The mRNA levels of YAP, TAZ and TEAD (Mean  $\pm$  SD.  $n = 8$ )

Group	YAP	TAZ	TEAD
Control	0.46 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.02
Model	0.79 $\pm$ 0.06*	0.58 $\pm$ 0.05*	0.48 $\pm$ 0.04*

\*  $P < 0.05$  vs control group.

TAZ 和 TEAD 蛋白显著上调,在中层及外层均有明显表达,Western blot 和 RT-qPCR 结果显示肺组织的 YAP、TAZ 和 TEAD 蛋白和 mRNA 也明显升高。这提示 Hippo 信号通路可能促进 PSMCs 增殖以及肺小动脉重构,进而参与 PAH 的发生发展过程。

PAH 的主要特点是肺血管阻力增加,导致右心室肥厚(right ventricular hypertrophy, RVH)和最终的右心衰竭。在所有类型的 PAH 中,肺血管阻力增加的主要病理改变是肺动脉重塑,这主要归因于 PSMCs 的过度增殖和受损的细胞凋亡<sup>[5]</sup>。目前来说前列环素、内皮素和 5 型磷酸二酯酶抑制剂能提高 PAH 患者生活质量和改善临床症状,但是仍然无法提高长期获益以及改善生存率<sup>[6]</sup>。这些药物疗效的局限性通常是因为它们的作用机制主要是舒张肺小血管,尚不能真正改善血管重构。因此研究靶向 PSMCs 增殖的信号分子将为 PAH 患者带来改善生存率的治疗药物。

多细胞生物的出现是一个进化的里程碑。支持多细胞性的最基本机制是确保组织和器官的适当大小和形状以满足功能性需求。近年的研究揭示 Hip-

po 通路在器官大小的控制上具有重要的作用。Hpo、SAV、WTS 和 MAT 在基因和生理上相互作用,其突变引起显著的器官增大的表型在其他已建立的发育信号途径中是前所未有的;因此,它们被归类为一种新的信号转导模块:以河马的巨大体型命名的 Hippo 信号通路。转录共激活剂 YAP 和 TAZ 在许多细胞类型的生长调节中有关联。YAP/TAZ 是 Hippo 途径中进化保守的关键效应因子,目前认为正是 YAP/TAZ 通过调节基因转录来介导 Hippo 途径的生物学功能。YAP 同源物在果蝇中的过度表达导致了蝇类椎间盘的过度生长<sup>[7]</sup>,而过度表达 YAP 的转基因小鼠产生多个肿瘤<sup>[8]</sup>。同样,一些研究已经将 YAP 旁系 TAZ 的表达与许多细胞类型的生长调节有关。虽然 YAP 和 TAZ 可以与多个转录因子相互作用,但它们促进生长的作用主要通过转录因子 TEAD 家族成员的相互作用来介导。例如,沉默 TEAD 能阻断大部分 YAP 诱导的基因表达,并在很大程度上减弱 YAP 诱导的过度生长表型。此外,TEAD1/2 基因缺失小鼠的表型类似于 YAP 基因缺失的小鼠<sup>[9]</sup>。同样地,在果蝇中 TEAD 同源物介导 YAP 同源物过度生长的表型<sup>[10]</sup>。

越来越多的研究显示 Hippo 通路在心血管疾病中的重要作用,特别是对平滑肌细胞的调节作用。之前的研究已经表明,YAP 促进 VSMC 增殖的表型以及正向调控了小鼠颈动脉球囊损伤<sup>[11]</sup>。YAP 在小鼠心血管系统中的缺失导致胚胎致死,而 YAP 条件敲除小鼠表现为胚胎血管平滑肌细胞增殖受限,

导致严重的血管异常,包括血管壁变薄和头臂动脉的短或缺失<sup>[12]</sup>。YAP 通过与心肌蛋白(myocardin)的作用也能调节平滑肌细胞的表型转换<sup>[13]</sup>。最近的研究表明 YAP 和 TAZ 共同通过 TEAD 促进毛喉素介导的人主动脉平滑肌细胞的增殖<sup>[14]</sup>。

虽然 Hippo 通路中关键效应分子 YAP 和 TAZ 已经充分被证明在平滑肌细胞增殖以及平滑肌细胞参与的心血管疾病模型中的作用,但是尚没有研究表明它们在 PAH 中的作用。我们的研究结果提示 YAP、TAZ 和 TEAD 在野百合碱诱导的 PAH 大鼠肺小动脉中高表达;并且我们还发现这些蛋白分布于中层和外层,说明它们同时也促进血管外层成纤维细胞的增殖。研究结果说明 Hippo 通路中的 YAP 和 TAZ 可能通过 TEAD 介导 PASMCs 以及成纤维细胞的增殖,从而促进肺小动脉的重构,最终导致了 PAH 的形成。目前尚缺乏 YAP 和 TAZ 有效且安全的抑制剂,野百合碱诱导的 PAH 大鼠模型可作为为进一步靶向药物研究的实验载体。YAP、TAZ 亦或是 TEAD 有望成为肺动脉高压治疗的新途径。

[参 考 文 献]

[1] Chin KM, Rubin LJ. Pulmonary arterial hypertension[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 51(16):1527-1528.

[2] Tuder RM, Abman SH, Braun T, et al. Development and pathology of pulmonary hypertension [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(1 Suppl):S3-S9.

[3] Yu FX, Zhao B, Guan KL. Hippo pathway in organ size control, tissue homeostasis, and cancer[J]. Cell, 2015, 163(4):811-828.

[4] Lai ZC, Wei X, Shimizu T, et al. Control of cell proliferation and apoptosis by Mob as tumor suppressor, Mats [J]. Cell, 2005, 120(5):675-685.

[5] Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, et al. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension[J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 8(8):443-455.

[6] Majka S, Burnham E, Stenmark KR. Cell-based therapies in pulmonary hypertension: who, what, and when? [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011, 301(1):L9-L11.

[7] Huang J, Wu SJ, Matthews K, et al. The Hippo signaling pathway coordinately regulates cell proliferation and apoptosis by inactivating Yorkie, the *Drosophila* homolog of YAP[J]. Cell, 2005, 122(3):421-434.

[8] Dong J, Feldmann G, Huang J, et al. Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals[J]. Cell, 2007, 130(6):1120-1133.

[9] Sawada A, Kiyonari H, Ukita K, et al. Redundant roles of *Tead1* and *Tead2* in notochord development and the regulation of cell proliferation and survival[J]. Mol Cell Biol, 2008, 28(10):3177-3189.

[10] Plouffe SW, Hong AW, Guan KL. Disease implications of the Hippo/YAP pathway[J]. Trends Mol Med, 2015, 21(4):212-222.

[11] Wang X, Hu G, Gao X, et al. The induction of yes-associated protein expression after arterial injury is crucial for smooth muscle phenotypic modulation and neointima formation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(11):2662-2669.

[12] Wang Y, Hu G, Liu F, et al. Deletion of yes-associated protein (YAP) specifically in cardiac and vascular smooth muscle cells reveals a crucial role for YAP in mouse cardiovascular development [J]. Circ Res, 2015, 114(6):957-965.

[13] Xie C, Guo Y, Zhu T, et al. Yap1 protein regulates vascular smooth muscle cell phenotypic switch by interaction with myocardin [J]. J Biol Chem, 2012, 287(18):14598-14605.

[14] Kimura TE, Duggirala A, Smith MC, et al. The Hippo pathway mediates inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by cAMP[J]. J Mol Cell Cardiol, 2016, 90:1-10.

(责任编辑:陈妙玲,罗 森)