

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.09.007

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250521.1113.004\(2025-05-21\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250521.1113.004(2025-05-21))

尼可地尔基于 BMP9/BMPR2/SMAD 通路对 LPS 诱导人肺微血管内皮细胞损伤的保护作用及机制^{*}

周磊^{1,2}, 吴常裕², 唐雷鸣³

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310000; 2. 舟山市妇女儿童医院急诊科, 浙江舟山 316000;

3. 舟山市食品药品检验检测研究院, 浙江舟山 316012)

[摘要] **目的** 研究尼可地尔基于骨形态发生蛋白 9(BMP9)/骨形态发生蛋白受体 2(BMPR2)/母亲抗肢瘫同系物(SMAD)通路对脂多糖(LPS)诱导的人肺微血管内皮细胞(HPMVECs)损伤的保护作用及作用机制。**方法** 建立 LPS(100 ng/mL)诱导的 HPMVECs 损伤模型,将正常培养的 HPMVECs 设为 NC 组,其余模型细胞分别设为模型组(LPS 组),尼可地尔低、中、高浓度组(尼可地尔 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)及 si-NC+尼可地尔高浓度组、si-BMP9+尼可地尔高浓度组。MTT 法检测细胞增殖活性;流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞内活性氧(ROS)水平;微量法检测细胞丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)水平;ELISA 法检测细胞内 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平;RT-qPCR 法检测细胞内 BMP9、BMPR2、SMAD1 mRNA 水平;Western blot 检测细胞内 BMP9、BMPR2、SMAD1、B 细胞淋巴瘤 2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)蛋白表达。**结果** 与 NC 组比较,LPS 组 HPMVECs 增殖活性,SOD、CAT 水平,Bcl-2 蛋白表达水平,BMP9、BMPR2、SMAD1 mRNA 及蛋白表达水平下降($P<0.05$);细胞凋亡率及 Bax 蛋白表达水平,ROS、MDA、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平上升($P<0.05$)。与 LPS 组比较,尼可地尔低、中、高组的 HPMVECs 增殖活性,SOD、CAT 水平,Bcl-2 蛋白表达水平,BMP9、BMPR2、SMAD1 mRNA 及蛋白表达水平上升($P<0.05$);细胞凋亡率及 Bax 蛋白表达水平,ROS、MDA、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平明显下降($P<0.05$)。与尼可地尔高浓度组比较,si-BMP9+尼可地尔高浓度组与 LPS 组呈相同趋势,si-BMP9 可以一定程度逆转尼可地尔高浓度组对于 LPS 诱导的 HPMVECs 损伤的保护作用。**结论** 尼可地尔通过上调 BMP9/BMPR2/SMAD 通路表达,减轻 HPMVECs 因 LPS 导致的氧化应激、炎症反应和细胞凋亡,抑制 LPS 诱导的 HPMVECs 损伤。

[关键词] 尼可地尔;人肺微血管内皮细胞;氧化损伤;炎症;BMP9/BMPR2/SMAD 通路

[中图分类号] R563

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2025)09-2032-09

Protective effect and mechanism of nicorandil based on the BMP9/BMPR2/SMAD pathway against LPS-induced pulmonary microvascular endothelial cell injury^{*}

ZHOU Lei^{1,2}, WU Changyu², TANG Leiming³

(1. Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang 310000, China;

2. Department of Emergency, Zhoushan Municipal Women and Children's Hospital, Zhoushan,

Zhejiang 316000, China; 3. Zhoushan Municipal Institute of Food and Drug Inspection and Testing, Zhoushan, Zhejiang 316012, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of nicorandil on lipopolysaccharide (LPS)-induced human microvascular endothelial cells (HPMVECs) injury based on BMP9/BMPR2/SMAD pathway and its mechanism. **Methods** The HPMVECs injury model induced by LPS (100 ng/mL) was established. The normal cultured HPMVECs were set as the NC group, and other model cells were set as the model group (LPS group), low, medium and high concentrations nicorandil groups (nicorandil 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$), si-NC+high nicorandil group, and si-BMP9+high nicorandil group. MTT assay was used to detect the cell proliferation activity; the apoptosis and intracellular ROS level were detected by flow cytometry; the levels of MDA, SOD and CAT in cells were detected by the micro assay; the levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in cells were detected by ELISA; the mRNA levels of BMP9, BMPR2 and SMAD1 were detected by RT-qPCR; and the expression of BMP9, BMPR2, SMAD1, Bcl-2, Bax proteins in cells was detected by Western blot. **Results** Compared with the NC group, the proliferation activity of HPMVECs, SOD, CAT levels, Bcl-2 protein,

^{*} 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(2018KY857)。

BMP9, BMPR2, SMAD1 mRNA and protein expression levels in the LPS group were decreased ($P < 0.05$), the apoptosis rate and the Bax protein expression level, ROS, MDA, TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels were increased ($P < 0.05$). Compared with the LPS group, the proliferation activity of HPMVECs, SOD, CAT levels, Bcl-2 protein level, BMP9, BMPR2, SMAD1 mRNA and protein expression levels in the low, middle and high concentrations nicorandil groups were increased, the apoptosis rate and the Bax protein level, ROS, MDA, TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels were decreased obviously ($P < 0.05$); compared with the high concentration nicorandil group, the si-BMP9+high nicorandil group and LPS group showed the same trend, si-BMP9 was able to reverse the protective effect of high nicorandil group on LPS induced HPMVECs injury to some extent.

Conclusion Nicorandil could reduce the oxidative stress, inflammatory reaction and cell apoptosis induced by LPS in HPMVECs and inhibit LPS induced HPMVECs injury by up-regulating the expression of BMP9/BMPR2/SMAD pathway.

[Key words] nicorandil; pulmonary microvascular endothelial cells; oxidative injury; inflammation; BMP9/BMPR2/SMAD pathway

急性肺损伤是临床发病率较高的肺部炎症性疾病, 容易导致急性呼吸窘迫综合征, 病死率较高^[1-2]。急性肺损伤以进行性低氧血症、呼吸窘迫为主要临床表现, 临床症状包括炎症细胞浸润、肺水肿和动脉低氧血症, 损伤血管内皮和肺泡上皮, 降低肺功能, 严重时可导致呼吸衰竭和死亡^[3-4]。已有研究发现, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量积累会导致细胞发生过度氧化应激和炎症反应, 加重肺损伤^[5]。尼可地尔属于新型血管扩张剂, 具有抗氧化、抗炎作用, 可以降低内皮细胞中的 ROS 水平, 减轻急性冠状动脉综合征患者的炎症情况, 对内皮细胞生成的扩血管物质无依赖性, 临床无须对患者间断给药, 安全性好^[6-8]。骨形态发生蛋白 9(bone morphogenetic protein 9, BMP9)/骨形态发生蛋白受体 2(bone morphogenetic protein receptor type 2, BMPR2)/母亲抗肢瘫痪同系物(mothers against decapentaplegic homolog, SMAD)通路具有相关性。其中, BMP9 作为转化生长因子 β 家族成员, 是肺血管稳态的重要调节因子, 可以和 BMPR2 结合, 调节 SMAD 生成, 促进 SMAD1 磷酸化, 维持血管内皮屏障, 对于保持肺内皮完整性具有重要作用^[9]。BMPR2/SMAD 通路失调可导致小鼠肺纤维化和肺动脉高压, 通过介导该通路调控下游细胞因子和蛋白的表达, 可使肺纤维化和肺动脉高压得以缓解^[10]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是导致急性肺损伤的因素之一, 而人肺微血管内皮细胞(human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMVECs)是肺部气体交换的主要场所, 其病理损伤也与急性肺损伤病理过程密切相关, 将 HPMVECs 暴露于 LPS 中, 会引发炎症和细胞凋亡^[11]。因此, 本研究建立体外 LPS 诱导 HPMVECs 损伤的模型, 观察尼可地尔通过调节 BMP9/BMPR2/SMAD 通路发挥保护作用的效果, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

HPMVECs、ROS 检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; LPS 购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 胎牛血清、杜尔贝科改良伊格尔(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养基、青链霉素双抗、LipofectamineTM 2000 试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司; ELISA 检测试剂盒(TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6)购于上海酶联生物科技有限公司; RT-qPCR 试剂盒购于上海康朗生物科技有限公司; B 细胞淋巴瘤 2(B-cell lymphoma 2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)、BMP9、BMPR2、SMAD1、磷酸化 SMAD1(p-SMAD1)购于艾博抗(上海)贸易有限公司。罗氏 LightCycler480 II qPCR 仪购于上海土森视觉科技有限公司; Attune NxT 流式细胞仪、SorvallTM ST8 小型台式离心机购于赛默飞世尔科技中国有限公司; SpectraMax iD3 多功能酶标仪购于美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组与处理

将 HPMVECs 培养在 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素双抗)内, 于 37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养至对数期。不使用 LPS 处理的细胞组为 NC 组; 采用 LPS 诱导建立 HPMVECs 损伤模型^[12-13], 使用 100 ng/mL 的 LPS 处理培养至对数期的 HPMVECs 24 h, 作为模型组(LPS 组)。取部分模型组 HPMVECs, 分别加入尼可地尔 50、100、200 μ mol/L 培养, 作为尼可地尔低、中、高浓度组; 取部分模型组 HPMVECs, 分别转染 si-NC、si-BMP9 6 h, 加入 200 μ mol/L 尼可地尔继续培养, 作为 si-NC+尼可地尔高浓度组、si-BMP9+尼可地尔高浓度组。NC 组和 LPS 组加入生理盐水处理细胞。所有分组设置 6 个复孔。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖活性

按照 1.2.1 方法,分别培养各组细胞 24、48、72 h,收集细胞,在对应时间段内,弃去培养液,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,PBS)重悬细胞后,每孔加入 150 μ L DMEM 培养基和 20 μ L 的 MTT 溶液,继续培养 4 h 后,弃去培养液。加入 150 μ L 二甲基亚砷,混匀后,用酶标仪读取 570 nm 下吸光度 [$A_{(570)}$], $A_{(570)}$ 越高,表明细胞活性越强。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡

按照 1.2.1 方法,分别培养各组 48 h,收集细胞,弃去培养液,加入不含乙二胺四乙酸的胰酶消化细胞,PBS 重悬细胞后,收集单细胞悬液,离心弃上清液,加入 500 μ L 结合缓冲液,再分别加入 5 μ L 的膜联蛋白-V(Annexin-V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)孵育 15 min、碘化丙啶(propidium iodide,PI)染色液,收集细胞至流式管,待流式细胞仪检测。

1.2.4 细胞 ROS 水平检测

按照 1.2.1 方法,分别培养各组细胞 24 h,重悬细胞,加入浓度为 10 μ mol/L 的 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯,在细胞培养箱内继续培养 20 min,然后用 PBS 冲洗细胞,采用流式细胞仪检测二氯荧光素的荧光强度表示细胞内 ROS 水平。

1.2.5 细胞 MDA、SOD、CAT 水平检测

按照 1.2.1 方法,分别培养各组细胞 48 h,收集细胞,弃去培养液,向裂解后的细胞中加入 MDA、SOD、CAT 对应试剂盒的工作液,采用微量法检测其水平。

1.2.6 细胞炎症因子水平检测

按照 1.2.1 方法,分别培养各组细胞 48 h,收集细胞,弃去培养液,采用 ELISA 法检测肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α),IL-6,IL-1 β 水平,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.7 RT-qPCR 检测 BMP9、BMPR2、SMAD1 mRNA 表达

按照 1.2.1 方法,分别培养各组细胞 48 h,加入 TRIzol 试剂提取总 RNA,然后利用逆转录试剂盒将其逆转录为 cDNA。PCR 扩增条件:95 $^{\circ}$ C 5 min 预变性,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,共 45 个循环。引物设计方面,以 GAPDH 为内参,mRNA 相对表达水平计算公式为 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。引物序列:BMP9 引物正向序列为 5'-ACG ATC TGT TTC CCC TCA TCT-3',反向序列为 5'-ATG CAG GGA TGA TGT TCT G-3';BMPR2 引物正向序列为 5'-GAG CCC TCC CTG GAC TTG-3',反向序列为 5'-ATA TCG ACC CCG TCC AAT C-3';SMAD1 引物正向序列为 5'-GGC AGG ATG TTT CCA GCT A-3',反向序列为 5'-GCA GTC CAC AGA CCA TGT CA-3';GAPDH 引物正向序列为

5'-CTG GGC TAC ACT GAG CAC C-3',反向序列为 5'-AGT GGT CGT TGA GGG CAA TG-3'。

1.2.8 Western blot 检测蛋白表达

按照 1.2.1 方法,分别培养各组细胞 48 h,加入放射免疫沉淀法裂解液提取总蛋白,双缩脲比色法试剂盒测定蛋白表达水平后,取 30 μ g 蛋白上样,电泳并等量转移至聚偏氟乙烯膜,脱脂牛奶封闭,洗膜,加入一抗 Bcl-2(1:1 000)、Bax(1:1 000)、BMP9(1:1 000)、BMPR2(1:1 000)、SMAD1(1:1 000)、p-SMAD1(1:1 000)、内参 GAPDH(1:500),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜后加入二抗(1:5 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,增强型化学发光显色,利用条带灰度值计算蛋白相对表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS26.0 软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两间比较采用 SNK- q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 尼可地尔对 HPMVECs 增殖活性的影响

在 24、48、72 h 各时间点,与 NC 组比较,LPS 组 HPMVECs 的 $A_{(570)}$ 下降($P < 0.05$);与 LPS 组比较,尼可地尔低、中、高浓度组 HPMVECs 的 $A_{(570)}$ 依次上升,其中尼可地尔高浓度组 HPMVECs 的 $A_{(570)}$ 最高($P < 0.05$);与尼可地尔高浓度组比较,si-NC+尼可地尔高浓度组 HPMVECs 的 $A_{(570)}$ 差异无统计学意义($P > 0.05$),si-BMP9+尼可地尔高浓度组 HPMVECs 的 $A_{(570)}$ 下降($P < 0.05$),见表 1。

2.2 尼可地尔对 HPMVECs 凋亡及 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平的影响

与 NC 组比较,LPS 组 HPMVECs 凋亡率及 Bax 蛋白表达水平上升,Bcl-2 蛋白表达水平下降($P < 0.05$);与 LPS 组比较,尼可地尔低、中、高浓度组 HPMVECs 凋亡率及 Bax 蛋白表达水平下降,Bcl-2 蛋白表达水平上升,其中尼可地尔高浓度组 HPMVECs 凋亡率最低($P < 0.05$);与尼可地尔高浓度组比较,si-NC+尼可地尔高浓度组 HPMVECs 凋亡率及 Bax、Bcl-2 蛋白表达水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$),si-BMP9+尼可地尔高浓度组 HPMVECs 凋亡率及 Bax 蛋白表达水平上升、Bcl-2 蛋白表达水平下降($P < 0.05$),见图 1~2,表 2。

2.3 尼可地尔对 HPMVECs 氧化应激损伤的影响

与 NC 组比较,LPS 组 HPMVECs 内 ROS、MDA 水平上升,SOD、CAT 水平下降($P < 0.05$);与 LPS 组比较,尼可地尔低、中、高浓度组 HPMVECs 内 ROS、MDA 水平下降,SOD、CAT 水平上升($P < 0.05$);与尼可地尔高浓度组比较,si-NC+尼可地尔高浓度组 HPMVECs 内 ROS、MDA、SOD、CAT 水

平差异无统计学意义($P>0.05$),si-BMP9+尼可地尔高浓度组 HPMVECs 内 ROS、MDA 水平上升、SOD、CAT 水平下降($P<0.05$),见图 3、表 3。

2.4 尼可地尔对 HPMVECs 炎症因子水平的影响

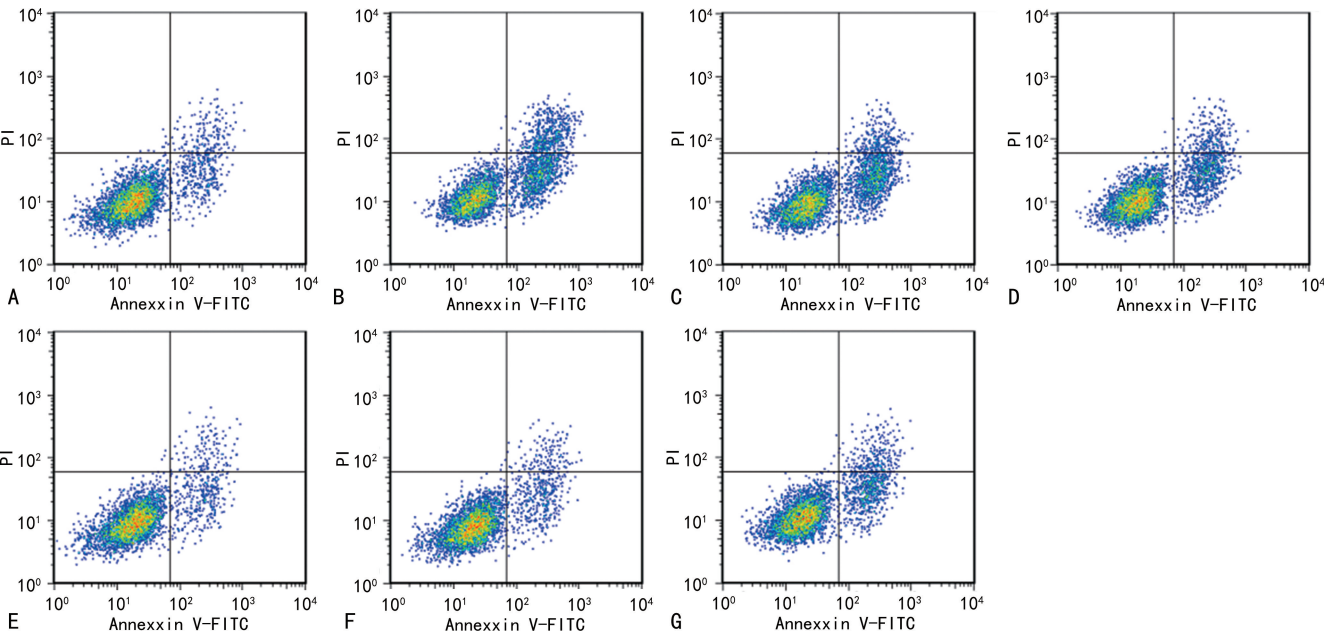
与 NC 组比较,LPS 组 HPMVECs 中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平上升($P<0.05$);与 LPS 组比较,尼可地尔低、中、高浓度组 HPMVECs 中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β

水平下降,其中尼可地尔高浓度组 HPMVECs 中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平最低($P<0.05$);与尼可地尔高浓度组比较,si-NC+尼可地尔高浓度组 HPMVECs 中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平差异无统计学意义($P>0.05$),si-BMP9+尼可地尔高浓度组 HPMVECs 中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平上升($P<0.05$),见表 4。

表 1 各组 HPMVECs 增殖活性比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	$A_{(570)}$		
		24 h	48 h	72 h
NC 组	6	0.43 $\pm$ 0.09	0.89 $\pm$ 0.12	1.46 $\pm$ 0.18
LPS 组	6	0.20 $\pm$ 0.04 ^a	0.41 $\pm$ 0.04 ^a	0.75 $\pm$ 0.10 ^a
尼可地尔低浓度组	6	0.28 $\pm$ 0.03 ^b	0.47 $\pm$ 0.04 ^b	0.88 $\pm$ 0.09 ^b
尼可地尔中浓度组	6	0.38 $\pm$ 0.04 ^{bc}	0.62 $\pm$ 0.08 ^{bc}	1.11 $\pm$ 0.10 ^{bc}
尼可地尔高浓度组	6	0.47 $\pm$ 0.06 ^{bcd}	0.86 $\pm$ 0.10 ^{bcd}	1.40 $\pm$ 0.15 ^{bcd}
si-NC+尼可地尔高浓度组	6	0.45 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.07	1.42 $\pm$ 0.13
si-BMP9+尼可地尔高浓度组	6	0.32 $\pm$ 0.04 ^e	0.60 $\pm$ 0.06 ^e	1.05 $\pm$ 0.10 ^e

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与 LPS 组比较;^c: $P<0.05$,与尼可地尔低浓度组比较;^d: $P<0.05$,与尼可地尔中浓度组比较;^e: $P<0.05$,与尼可地尔高浓度组比较。



A:NC 组;B:LPS 组;C:尼可地尔低浓度组;D:尼可地尔中浓度组;E:尼可地尔高浓度组;F:si-NC+尼可地尔高浓度组;G:si-BMP9+尼可地尔高浓度组。

图 1 流式细胞仪检测 HPMVECs 凋亡率

2.5 尼可地尔对 HPMVECs 中 BMP9、BMPR2、SMAD1 mRNA 表达水平的影响

与 NC 组比较,LPS 组 HPMVECs 中 BMP9、BMPR2、SMAD1 mRNA 表达水平下降($P<0.05$);与 LPS 组比较,尼可地尔低、中、高浓度组 HPMVECs 中 BMP9、BMPR2、SMAD1 mRNA 表达水平上升($P<0.05$);与尼可地尔高浓度组比较,si-NC+尼可地尔高浓度组 BMP9、BMPR2、SMAD1 mRNA 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),si-BMP9+

尼可地尔高浓度组 HPMVECs 中 BMP9、BMPR2、SMAD1 mRNA 表达水平下降($P<0.05$),见表 5。

2.6 尼可地尔对 HPMVECs 中 BMP9/BMPR2/SMAD1 通路蛋白表达水平的影响

与 NC 组比较,LPS 组 HPMVECs 中 BMP9、BMPR2、SMAD1 及 p-SMAD1 蛋白表达水平下降($P<0.05$);与 LPS 组比较,尼可地尔低、中、高浓度组 HPMVECs 中 BMP9、BMPR2、SMAD1 及 p-SMAD1 蛋白表达水平上升($P<0.05$);与尼可地尔

高浓度组比较, si-NC+尼可地尔高浓度组 BMP9、BMPR2、SMAD1 及 p-SMAD1 蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$), si-BMP9+尼可地尔高浓度组

HPMVECs 中 BMP9、BMPR2、SMAD1 及 p-SMAD1 蛋白表达水平下降($P<0.05$), 见图 4、表 6。

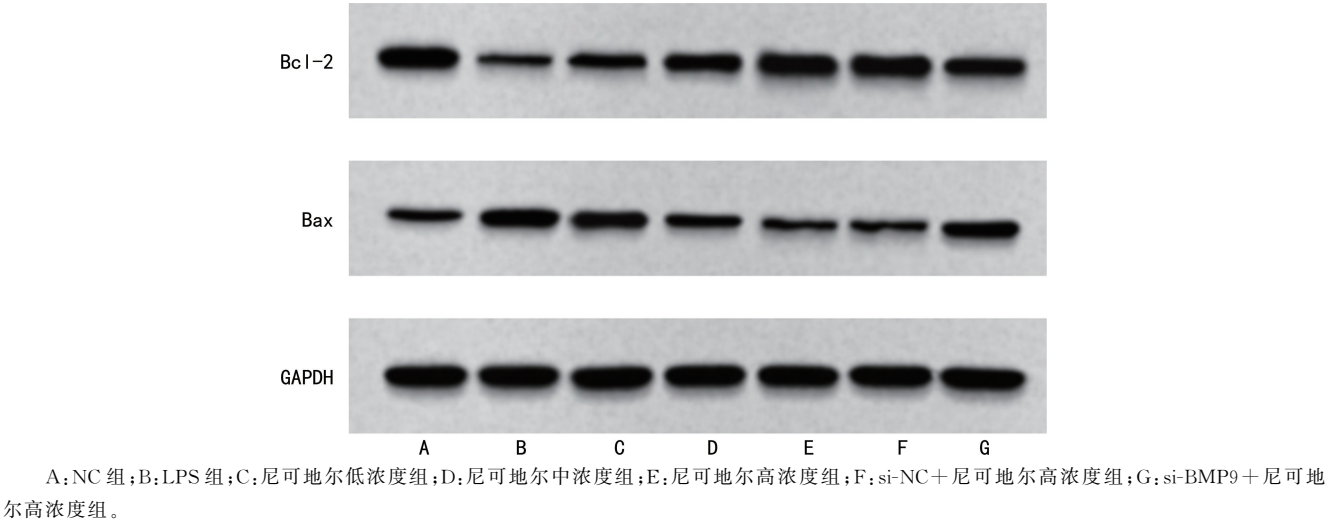


图 2 各组 HPMVECs 中 Bcl-2、Bax 蛋白条带

表 2 各组 HPMVECs 凋亡率及 Bcl-2、Bax 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	凋亡率(%)	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH
NC 组	6	10.23±1.03	0.94±0.15	0.42±0.10
LPS 组	6	38.46±3.98 ^a	0.36±0.06 ^a	0.92±0.15 ^a
尼可地尔低浓度组	6	33.21±3.15 ^b	0.47±0.05 ^b	0.71±0.13 ^b
尼可地尔中浓度组	6	22.10±2.76 ^{bc}	0.65±0.08 ^{bc}	0.54±0.13 ^{bc}
尼可地尔高浓度组	6	9.78±1.45 ^{bcd}	0.89±0.12 ^{bcd}	0.33±0.08 ^{bcd}
si-NC+尼可地尔高浓度组	6	10.49±1.26	0.85±0.09	0.39±0.07
si-BMP9+尼可地尔高浓度组	6	20.38±2.03 ^e	0.60±0.07 ^e	0.67±0.09 ^e

^a: $P<0.05$, 与 NC 组比较; ^b: $P<0.05$, 与 LPS 组比较; ^c: $P<0.05$, 与尼可地尔低浓度组比较; ^d: $P<0.05$, 与尼可地尔中浓度组比较; ^e: $P<0.05$, 与尼可地尔高浓度组比较。

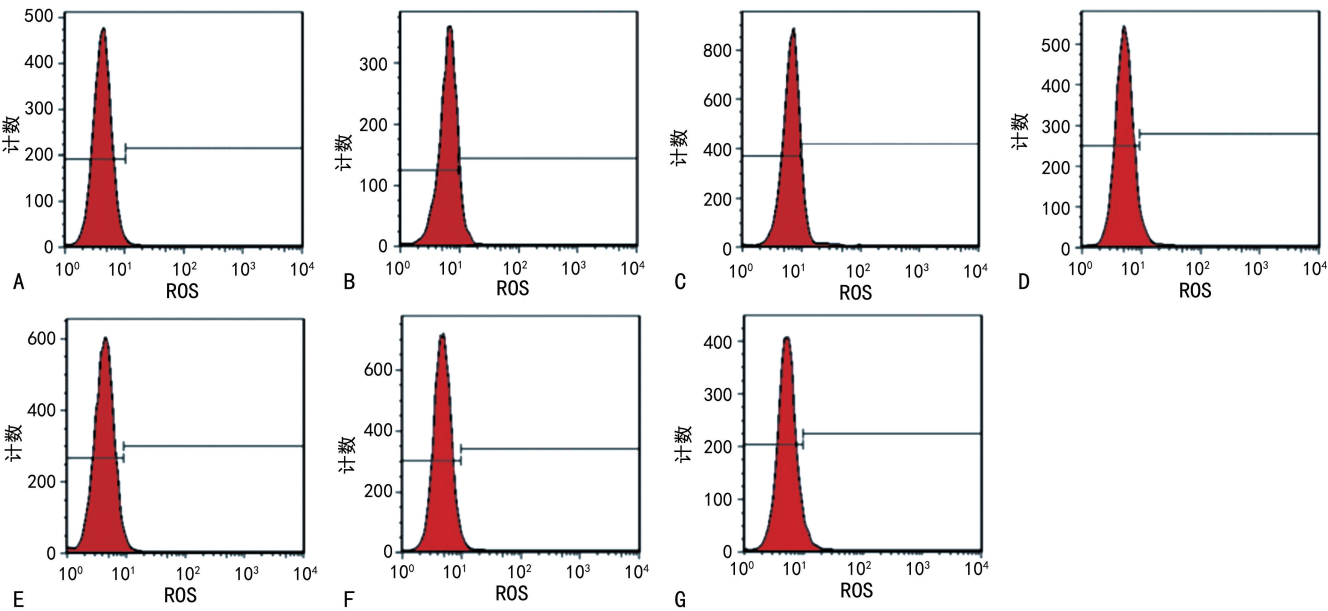


图 3 流式细胞仪检测 HPMVECs 中 ROS 水平

表 3 各组 HPMVECs 中氧化应激因子水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	ROS	MDA(mol/mg)	SOD(U/mg)	CAT(U/mg)
NC 组	6	0.97±0.13	5.01±0.85	322.15±13.45	26.88±1.32
LPS 组	6	3.82±0.65 ^a	16.78±1.34 ^a	105.32±11.14 ^a	5.41±0.78 ^a
尼可地尔低浓度组	6	3.01±0.46 ^b	13.45±1.03 ^b	144.38±11.27 ^b	11.02±0.83 ^b
尼可地尔中浓度组	6	2.25±0.40 ^{bc}	10.07±1.05 ^{bc}	206.24±12.01 ^{bc}	18.94±1.28 ^{bc}
尼可地尔高浓度组	6	1.13±0.28 ^{bcd}	6.32±0.91 ^{bcd}	295.12±13.01 ^{bcd}	25.10±1.00 ^{bcd}
si-NC+尼可地尔高浓度组	6	1.20±0.26	6.40±0.87	290.15±13.43	26.01±1.15
si-BMP9+尼可地尔高浓度组	6	2.31±0.32 ^e	11.52±1.01 ^e	197.32±12.48 ^e	17.46±1.03 ^e

^a:*P*<0.05,与 NC 组比较;^b:*P*<0.05,与 LPS 组比较;^c:*P*<0.05,与尼可地尔低浓度组比较;^d:*P*<0.05,与尼可地尔中浓度组比较;^e:*P*<0.05,与尼可地尔高浓度组比较。

表 4 各组 HPMVECs 中炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	TNF-α(pg/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)
NC 组	6	60.46±10.03	38.12±3.25	128.36±8.01
LPS 组	6	152.18±13.41 ^a	145.32±11.06 ^a	195.69±10.35 ^a
尼可地尔低浓度组	6	129.21±11.24 ^b	121.35±10.25 ^b	180.14±9.25 ^b
尼可地尔中浓度组	6	101.10±9.72 ^{bc}	92.46±9.78 ^{bc}	152.00±10.13 ^{bc}
尼可地尔高浓度组	6	62.42±8.47 ^{bcd}	55.18±6.10 ^{bcd}	112.58±8.45 ^{bcd}
si-NC+尼可地尔高浓度组	6	63.47±9.26	58.32±7.09	116.74±9.07
si-BMP9+尼可地尔高浓度组	6	105.58±10.36 ^e	96.12±8.27 ^e	160.18±11.19 ^e

^a:*P*<0.05,与 NC 组比较;^b:*P*<0.05,与 LPS 组比较;^c:*P*<0.05,与尼可地尔低浓度组比较;^d:*P*<0.05,与尼可地尔中浓度组比较;^e:*P*<0.05,与尼可地尔高浓度组比较。

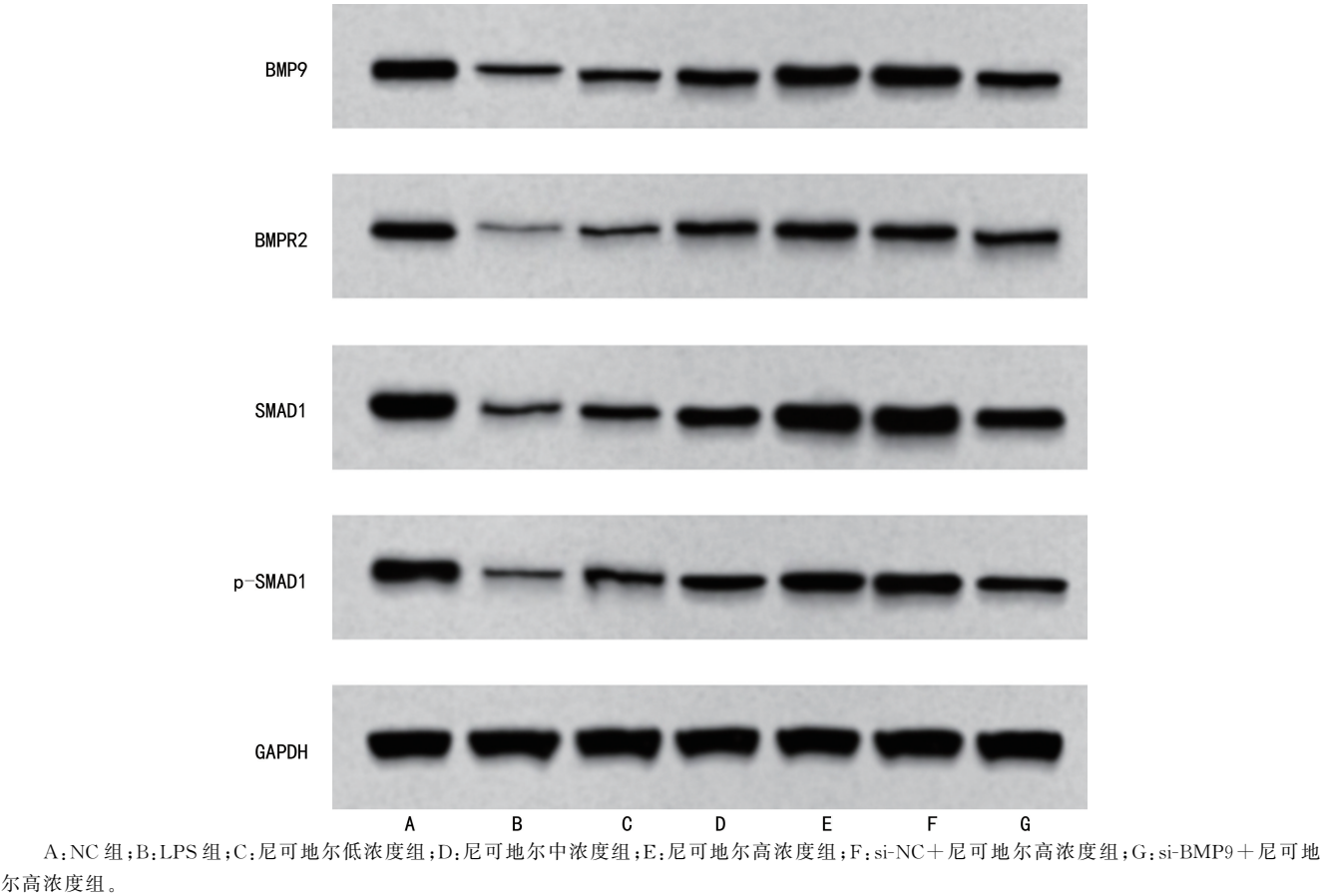


图 4 各 HPMVECs 中 BMP9、BMPR2、SMAD3 蛋白条带

表 5 各组 HPMVECs 中 BMP9、BMPR2、SMAD1 mRNA 表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	BMP9 mRNA	BMPR2 mRNA	SMAD1 mRNA
NC 组	6	1.45±0.09	1.02±0.05	2.40±0.25
LPS 组	6	0.70±0.11 ^a	0.36±0.06 ^a	0.87±0.15 ^a
尼可地尔低浓度组	6	0.79±0.10 ^b	0.47±0.05 ^b	1.23±0.21 ^b
尼可地尔中浓度组	6	0.97±0.12 ^{bc}	0.65±0.08 ^{bc}	1.69±0.20 ^{bc}
尼可地尔高浓度组	6	1.25±0.14 ^{bcd}	0.89±0.12 ^{bcd}	2.25±0.18 ^{bcd}
si-NC+尼可地尔高浓度组	6	1.21±0.13	0.85±0.09	2.21±0.17
si-BMP9+尼可地尔高浓度组	6	0.90±0.10 ^e	0.60±0.07 ^e	2.81±0.19 ^e

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与 LPS 组比较;^c: $P<0.05$,与尼可地尔低浓度组比较;^d: $P<0.05$,与尼可地尔中浓度组比较;^e: $P<0.05$,与尼可地尔高浓度组比较。

表 6 各组 HPMVECs 中 BMP9/BMPR2/SMAD1 通路相关蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	<i>n</i>	BMP9/GAPDH	BMPR2/GAPDH	SMAD1/GAPDH	p-SMAD1/GAPDH
NC 组	6	0.69±0.05	0.51±0.02	1.15±0.02	0.87±0.01
LPS 组	6	0.20±0.04 ^a	0.13±0.01 ^a	0.23±0.04 ^a	0.19±0.02 ^a
尼可地尔低浓度组	6	0.31±0.05 ^b	0.22±0.02 ^b	0.46±0.05 ^b	0.31±0.03 ^b
尼可地尔中浓度组	6	0.43±0.05 ^{bc}	0.34±0.03 ^{bc}	0.70±0.08 ^{bc}	0.50±0.04 ^{bc}
尼可地尔高浓度组	6	0.57±0.06 ^{bcd}	0.47±0.05 ^{bcd}	1.08±0.16 ^{bcd}	0.75±0.05 ^{bcd}
si-NC+尼可地尔高浓度组	6	0.60±0.06	0.43±0.04	1.04±0.17	0.78±0.05
si-BMP9+尼可地尔高浓度组	6	0.40±0.03 ^e	0.30±0.02 ^e	0.72±0.19 ^e	0.42±0.04 ^e

^a: $P<0.05$,与 NC 组比较;^b: $P<0.05$,与 LPS 组比较;^c: $P<0.05$,与尼可地尔低浓度组比较;^d: $P<0.05$,与尼可地尔中浓度组比较;^e: $P<0.05$,与尼可地尔高浓度组比较。

3 讨 论

急性肺损伤的关键特征是 HPMVECs 功能障碍,而 LPS 可以造成内皮细胞变形和间隙形成,引起肺病理损伤^[14-15],因此利用 LPS 诱导 HPMVECs 损伤,研究其屏障调节机制,对于改善急性肺损伤具有重要意义。LPS 诱导肺损伤时会导致肺气血屏障受损,分泌炎症细胞,并进一步刺激 ROS 和其他炎性介质过量产生,增加细胞血管通透性,导致上皮和内皮屏障破裂,炎症细胞外渗到肺泡中,加剧炎症状态并导致肺组织损伤,在炎症级联反应和气血屏障破裂之间形成恶性循环^[16-18]。在治疗 LPS 诱导的 HPMVECs 损伤时,抑制炎症和过量 ROS 生成极为重要。研究发现,在 LPS 诱导的急性肺损伤动物模型中,ROS 水平升高,SOD 水平下降,氧化应激强烈;Bax 蛋白表达水平升高,Bcl-2 蛋白表达水平下降,细胞凋亡增加^[19];LPS 还会诱发强烈的中性粒细胞浸润,产生 TNF-α、IL-6、IL-1β 等大量炎症因子,给肺组织带来严重不良影响^[20-21]。通过药物治疗,抑制其氧化应激和炎症反应,可以有效改善肺组织细胞凋亡^[22]。在本研究中,经过尼可地尔治疗后,细胞炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-1β 水平下降,氧化应激因子 ROS、MDA 水平下降,而 SOD、CAT 水平上升,细胞凋亡减少,说明尼可地尔发挥了抗炎和抗氧化作用,对 LPS 诱导的 HPMVECs 损伤具有保护作用。

在尼可地尔发挥抗炎和抗氧化作用、保护 HPM-

VECs 损伤的过程中,BMP9/BMPR2/SMAD 通路参与其中。BMP9 可以促进体外和体内的内皮细胞增殖,激活内皮 BMPR2 信号来改善肺动脉高压,抑制氧化应激带来的肺内皮损伤。已有研究证实,LPS 诱导细胞炎症反应会导致 BMP9 蛋白表达水平明显下降^[23]。BMP9 受体可以与 BMPR2 形成受体复合物,通过 SMAD1 磷酸化继续传导 BMP9 信号,形成良性循环,促进肺血管生成^[24-27]。SMAD 所诱导的通路肿瘤转移、免疫调节及肺纤维化等细胞的生长与发展密切相关^[28-30]。一项关于博来霉素诱导大鼠肺纤维化和肺动脉高压的研究发现,抑制 BMP9/BMPR2/SMAD 通路传导会导致肺动脉内皮损伤和细胞凋亡,加强该通路信号传导可能是治疗肺动脉高压的理想策略^[31]。本研究中,LPS 组 HPMVECs 中 BMP9、BMPR2、SMAD1 及 p-SMAD1 蛋白表达水平下调,通过尼可地尔治疗后各组 BMP9、BMPR2、SMAD1 及 p-SMAD1 蛋白表达水平均上调,且细胞炎症因子和过氧化产物(ROS、MDA)水平下调,抗氧化物质 SOD、CAT 水平上调,细胞凋亡减少,细胞增殖活性增强。沉默 BMP9 表达则使 HPMVECs 中炎症因子水平增加、氧化应激反应加剧、细胞凋亡增加、细胞增殖活性下降,说明沉默 BMP9 部分程度上逆转了尼可地尔对于 HPMVECs 损伤的保护作用,提示尼可地尔可能通过 BMP9 介导的 BMP9/BMPR2/SMAD 通路来发挥抗炎、抗氧化、抗凋亡作用。

综上所述,尼可地尔可以抑制 LPS 诱导 HPM-VECs 的炎症反应、氧化应激和细胞凋亡,增强细胞活性,发挥保护作用,且这种保护作用可能是通过增强 BMP9/BMP2/SMAD 通路信号传导实现的。由于增强 HPMVECs 活性、减少凋亡、维持内皮屏障功能的机制较为复杂,其中可能有其他蛋白信号参与,还需进一步研究,以期能为尼可地尔临床治疗急性肺损伤提供更多参考依据。

参考文献

- [1] GOUDA M M, BHANDARY Y P. Acute lung injury: IL-17A-mediated inflammatory pathway and its regulation by curcumin[J]. *Inflammation*, 2019, 42(4): 1160-1169.
- [2] COLUNGA-BIANCATELLI R M L, SOLOPOV P A, SHARLOW E R, et al. The SARS-CoV-2 spike protein subunit S1 induces COVID-19-like acute lung injury in K18-hACE2 transgenic mice and barrier dysfunction in human endothelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 321(2): 477-484.
- [3] LI Y C, CAO Y M, XIAO J, et al. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 inhibits ferroptosis and alleviates intestinal ischemia/reperfusion-induced acute lung injury[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(9): 2635-2650.
- [4] 王辉, 张珠, 王俊. 灵芝酸 A 对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的改善作用及机制[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(8): 1559-1565.
- [5] YUAN R Y K, LI Y Q, HAN S, et al. Fe-curcumin nanozyme-mediated reactive oxygen species scavenging and anti-inflammation for acute lung injury[J]. *ACS Cent Sci*, 2022, 8(1): 10-21.
- [6] WANG X Y, PAN J Y, LIU D, et al. Nicorandil alleviates apoptosis in diabetic cardiomyopathy through PI3K/Akt pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 5349-5359.
- [7] XU X L, LIU X L, YU L W, et al. Impact of intracoronary nicorandil before stent deployment in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention[J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(1): 137-146.
- [8] 詹鹏, 黄青, 王元芬, 等. 尼可地尔对老年急性心肌梗死后心搏骤停患者预后的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(1): 19-22.
- [9] LI W, LONG L, YANG X D, et al. Circulating BMP9 protects the pulmonary endothelium during inflammation-induced lung injury in mice[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2021, 203(11): 1419-1430.
- [10] 任维鑫, 王俊华, 柳梅, 等. 水飞蓟宾对小鼠肺纤维化及氧化应激的作用及其机制[J]. *解放军医学杂志*, 2022, 47(12): 1201-1208.
- [11] ZHANG J L, LIU L X. Anagliptin alleviates lipopolysaccharide-induced inflammation, apoptosis and endothelial dysfunction of lung microvascular endothelial cells[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6): 1472.
- [12] 陈玉琼, 谭文华, 刘海峰, 等. miR-29a 通过调控 PTEN 表达对脂多糖诱导人肺微血管内皮细胞损伤的保护作用研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2021, 41(5): 8-16.
- [13] 申意茹, 王祥瑞. 线粒体-NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 炎症小体通路在急性肺损伤中的作用[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2023, 44(2): 216-220.
- [14] 陈枫楠, 郎廷元, 吴常裕, 等. 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[J]. *中国药房*, 2020, 31(22): 2736-2740.
- [15] CAO Y M, CHEN X, LIU Y Q, et al. PIM1 inhibition attenuated endotoxin-induced acute lung injury through modulating ELK3/ICAM1 axis on pulmonary microvascular endothelial cells[J]. *Inflamm Res*, 2021, 70(1): 89-98.
- [16] 谢彤昕, 徐扬, 薛群, 等. 地塞米松对 LPS 诱导急性肺损伤小鼠早期肺部炎症及 VEGF 的影响[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(10): 1997-1998.
- [17] 马琳, 李艳梅, 李多. 熊果苷通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2024, 23(4): 264-270.
- [18] QIAO Q, LIU X, YANG T, et al. Nanomedicine for acute respiratory distress syndrome: the latest application, targeting strategy, and rational design[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(10): 3060-3091.
- [19] 宫帅, 赵爽, 张翔鹏, 等. 银马解毒颗粒调控急性肺损伤小鼠肺部炎症的效果[J]. *西北药学杂志*, 2024, 39(4): 39-45.
- [20] LI X Q, SHAN C, WU Z H, et al. Emodin alleviated pulmonary inflammation in rats with LPS-induced acute lung injury through inhibiting the mTOR/HIF-1 α /VEGF signaling pathway[J]. *Inflamm Res*, 2020, 69(4): 365-373.
- [21] 蒋饴, 张卓一, 杨洞洞, 等. 红景天对急性呼吸窘迫综合征小鼠肺内皮细胞 BMP9 表达的影响

- [J]. 浙江中西医结合杂志, 2024, 34(6): 495-500.
- [22] ZHOU J, PENG Z L, WANG J. Trelagliptin alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation and oxidative stress in acute lung injury mice [J]. *Inflammation*, 2021, 44(4): 1507-1517.
- [23] DUAN Q N, JIA Y, QIN Y, et al. Narciclasine attenuates LPS-induced acute lung injury in neonatal rats through suppressing inflammation and oxidative stress [J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 801-810.
- [24] WANG G L, WEN B Q, DENG Z C, et al. Endothelial progenitor cells stimulate neonatal lung angiogenesis through FOXF1-mediated activation of BMP9/ACVRL1 signaling [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2080.
- [25] MIRZA S L, UPTON P D, HODGSON J, et al. SEMA3G regulates BMP9 inhibition of VEGF-mediated migration and network formation in pulmonary endothelial cells [J]. *Vascul Pharmacol*, 2024, 155: 107381.
- [26] 冯嘉文, 黄恺, 景菲, 等. 扶正化瘀方调控 TGF- β /Smad 信号通路对博来霉素诱导小鼠肺纤维化的影响 [J]. *中成药*, 2024, 46(6): 2042-2047.
- [27] 黄如敬, 鲁洪岭, 吴超, 等. 甘草甜素调节 TGF- β /Smad 信号通路对肺癌荷瘤小鼠放射性肺损伤的影响 [J]. *临床肺科杂志*, 2024, 29(4): 566-571.
- [28] ARAKI M, HISAMITSU T, KINUGASA-KATAYAMA Y, et al. Serum/glucocorticoid-regulated kinase 1 as a novel transcriptional target of bone morphogenetic protein-ALK1 receptor signaling in vascular endothelial cells [J]. *Angiogenesis*, 2018, 21(2): 415-423.
- [29] HWAN K Y, VU P N, CHOE S W, et al. Overexpression of activin receptor-like kinase 1 in endothelial cells suppresses development of arteriovenous malformations in mouse models of hereditary hemorrhagic telangiectasia [J]. *Circ Res*, 2020, 127(9): 1122-1137.
- [30] 付蓓蓓, 陆雨琳, 陈萌檬, 等. TGF- β /Smad 信号通路在类风湿性关节炎相关的间质性肺纤维化小鼠中的作用 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(3): 483-488.
- [31] JIANG Q, LIU C L, LIU S Y, et al. Dysregulation of BMP9/BMP2/SMAD signalling pathway contributes to pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension induced by bleomycin in rats [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(1): 203-216.

(收稿日期: 2024-12-31 修回日期: 2025-04-11)

(编辑: 张芃捷)

(上接第 2031 页)

- 者症状及未来风险的影响 [J]. *天津中医药*, 2025, 42(3): 289-296.
- [24] 张文钰, 张琳. 从“风伏肾络”探讨尿毒症相关性皮肤瘙痒 [J]. *山东中医药大学学报*, 2023, 47(5): 599-602.
- [25] 王淑荣, 余进, 崔晗, 等. 铜砭刮痧法治疗风寒湿型肩周炎的临床观察 [J]. *中国中医急症*, 2025, 34(1): 77-80.
- [26] 马梦圆, 杨巧菊, 徐慧, 等. 寒湿痹阻型类风湿性关节炎患者行虎符铜砭刮痧效果观察 [J]. *护理学杂志*, 2023, 38(20): 52-55.
- [27] 张利娟, 吴遍, 郑静霞, 等. 应用铜砭刮痧治疗脓毒症外感高热的探讨 [J]. *中国中医急症*, 2024, 33(4): 729-731.
- [28] 郭荣娟, 姜荣荣. 刮痧疗法干预腰椎间盘突出症的分析 [J]. *护理研究*, 2024, 38(13): 2376-2382.
- [29] 孙杰, 李一北, 戈志强, 等. 从肺论治尿毒症皮肤瘙痒症的思路探讨 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2023, 18(12): 2527-2530.
- [30] 邓升华, 宫妍, 王东梅, 等. 铜砭刮痧疗法在尿毒症性皮肤瘙痒患者中的应用及效果观察 [J]. *护士进修杂志*, 2021, 36(24): 2261-2264.
- [31] 羊焱俊, 王祝雄, 辛熠, 等. 耳部全息铜砭刮痧治疗老年重症肺炎伴胃肠功能障碍的疗效观察 [J]. *中国中医药科技*, 2024, 31(5): 874-876.
- [32] 曹静, 陈建淮, 戴丽琴. 刮痧治疗睡眠相关阴茎痛性勃起临床疗效研究 [J]. *中国男科学杂志*, 2024, 38(4): 77-82.
- [33] 程静娴, 张建楠, 张婷, 等. 铜砭刮痧联合情志干预对带状疱疹后神经痛患者疼痛程度的影响 [J]. *河北中医*, 2025, 47(3): 484-487.
- [34] 姚心怡, 郑连雪. 刮痧在失眠治疗中的应用研究进展 [J]. *护理学报*, 2024, 31(23): 54-58.
- [35] 纪栓菊, 祝永福, 苗妹悦, 等. 虎符铜砭刮痧治疗肿瘤相关性失眠的效果观察 [J]. *现代临床护理*, 2024, 23(4): 41-46.

(收稿日期: 2025-04-08 修回日期: 2025-08-17)

(编辑: 张芃捷)