

TGF- β 1/Smads通路参与内皮-间质转分化在低氧高二氧化碳性肺动脉高压中的调控作用

张晶晶^{1,2#} 黄丹娜^{1#} 武垣伶¹ 高慧¹ 楼国强¹ 周卓琳¹ 施凌方³ 王万铁^{1*}

(¹温州医科大学病理生理学教研室, 温州 325035; ²温州医科大学附属第二医院病理科, 温州 325035;

³斯坦福大学医学院呼吸与重症监护医学系, 斯坦福 CA94305-5236, 美国)

摘要 该文主要探讨转化生长因子- β 1(TGF- β 1)/Smads通路与低氧高二氧化碳性肺动脉高压及内皮-间质转分化(endothelial-mesenchymal transition, EndoMT)的关系。采用CD31和 α -SMA免疫荧光双标法鉴定大鼠肺动脉内皮细胞; CCK-8法测细胞活力; Transwell小室法检测细胞迁移; 逆转录-PCR和Western blot分别检测细胞CD31、 α -SMA、TGF- β 1、Smad2/3 mRNA和蛋白质的表达情况。结果显示, 低氧高二氧化碳环境下, 细胞 α -SMA、TGF- β 1和Smad2/3的mRNA水平上调, α -SMA、TGF- β 1和p-Smad2/3蛋白质表达水平上调, 而CD31 mRNA和蛋白质表达水平下调, 细胞活力降低而迁移增多; 使用rhTGF- β 1可促进低氧高二氧化碳环境下的上述作用; 而使用SB-431542则逆转低氧高二氧化碳环境下rhTGF- β 1的作用。结果提示, 低氧高二氧化碳能促进RPAECs发生EndoMT; 抑制TGF- β 1/Smads通路能抑制EndoMT, 缓解低氧高二氧化碳性肺动脉高压。

关键词 低氧高二氧化碳; 内皮-间质转分化; TGF- β 1/Smads通路; 肺动脉内皮细胞

Role of TGF- β 1/Smads Pathway in Regulation of Endothelial-Mesenchymal Transition in Hypoxia-Hypercapnia Pulmonary Hypertension

ZHANG Jingjing^{1,2#}, HUANG Danna^{1#}, WU Yuanling¹, GAO Hui¹, LOU Guoqiang¹, ZHOU Zhuolin¹,
SHI Lingfang³, WANG Wantie^{1*}

(¹Department of Pathophysiology, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

²Department of Pathology, Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

³Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Stanford University Medical School, Stanford CA94305-5236, USA)

Abstract This article aims to investigate the relationship between transforming growth factor β 1 (TGF- β 1)/Smads pathway and hypoxia-hypercapnia pulmonary hypertension and endothelial-mesenchymal transition (EndoMT). Rat pulmonary artery endothelial cells were identified by CD31 and α -SMA immunofluorescence double labeling. Cell viability was detected by CCK-8 assay. Cell migration was detected by Transwell chamber assay. mRNA and protein expression levels of CD31, α -SMA, TGF- β 1 and Smad2/3 were detected by reverse transcription-PCR and Western blot, respectively. The results showed that the expression levels of α -SMA, TGF- β 1

收稿日期: 2019-04-08 接受日期: 2019-07-25

浙江省中医药重点研究计划(批准号: 2018ZZ018)、温州市高层次人才创新技术重点资助项目(批准号: 2016-07)和温州市引智项目(批准号: 604090355/033)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 0577-86689817, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

Received: April 8, 2019 Accepted: July 25, 2019

This work was supported by Zhejiang Key Research Program of Traditional Chinese Medicine (Grant No.2018ZZ018), the Key Funding Projects of Innovative Technology for High-Level Talents of Wenzhou (Grant No.2016-07) and Wenzhou Intellectual Introduction Project (Grant No.604090355/033)

#These authors contributed equally to this paper

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689817, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

网络出版时间: 2019-11-12 12:25:50

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20191112.1013.002.html>

and *Smad2/3* mRNA were up-regulated, and expression levels of α -SMA, TGF- β 1 and p-Smad2/3 protein were up-regulated, while the expression levels of CD31 mRNA and protein were down-regulated, and the cell viability was decreased while cell migration level was increased under hypoxia-hypercapnia environment. It also showed that the use of rhTGF- β 1 promoted the above effects in a hypoxia-hypercapnia environment, whereas the use of SB-431542 reversed the effects of rhTGF- β 1 in a hypoxia-hypercapnia environment. The results suggested that hypoxia-hypercapnia can promote the occurrence of EndoMT in RPAECs. And inhibition of TGF- β 1/Smads pathway can inhibit EndoMT and alleviate hypoxia-hypercapnia pulmonary hypertension.

Keywords hypoxia-hypercapnia; endothelial-mesenchymal transition; TGF- β 1/Smads pathway; pulmonary artery endothelial cells

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一种由心肺疾病引起的常见而复杂的病征。引起PH的常见原因之一是慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD),因此临床上这类患者通常伴随肺泡和血液中CO₂分压升高。由于PH机制尚未完全明晰,现有的治疗药物(如前列环素及其衍生物、磷酸二酯酶抑制剂、他汀类药物等)还不能完全治愈PH^[1-2]。

PH的特点是表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的平滑肌样细胞大量沉积在肺动脉壁中,引起肺血管重构(pulmonary vessel structural remodeling, PVSR),导致更高的肺动脉血管阻力和右心衰竭^[3]。内皮-间质转分化(endothelial-mesenchymal transition, EndoMT)是胚胎发育的核心过程,即内皮细胞“转化”为间质细胞的过程^[4-5]。最近研究发现通过EndoMT,成年大鼠的内皮细胞(endothelial cells, ECs)可以表达 α -SMA促进血管重构^[6],那EndoMT是否参与低氧高二氧化碳性肺动脉高压PVSR尚不清楚。

转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)及其下游的Smad2/3构成的信号通路是EndoMT过程中重要的分子机制,可使基质合成增多、降解减少,引起肿瘤、肝脏纤维化等具有血管重构特点的疾病进一步发展^[7]。但是,该信号通路在低氧高二氧化碳性PH中的作用鲜有报道。因此,本实验将建立大鼠低氧高二氧化碳性PH体外模型,明确TGF- β 1/Smads通路与EndoMT对低氧高二氧化碳性PH的影响,以为PH的治疗提供充分的理论基础。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

大鼠肺动脉内皮细胞购自上海拜力生物科技

有限公司;胎牛血清购自美国Gibco公司;DMEM高糖培养基购自美国Gibco公司;TGF- β 受体激动剂rhTGF- β 1购自美国peprotech公司;TGF- β 受体抑制剂SB-431542购自美国MedChemExpress公司;兔抗大鼠Smad2/3和兔抗大鼠p-Smad2/3一抗购自美国CST公司;兔抗大鼠 α -SMA和兔抗大鼠TGF- β 1一抗购自英国Abcam公司;小鼠抗大鼠CD31一抗购自英国Abcam公司;50 bp DNA Marker购自上海捷瑞生物工程有限公司;逆转录-PCR引物购自上海捷瑞生物工程有限公司和日本TaKaRa生物技术有限公司;TRITC标记山羊抗兔抗体和FITC标记山羊抗小鼠抗体购自上海博蕴生物科技有限公司;CCK-8试剂盒购自日本同仁化学研究所;逆转录试剂盒购自美国Thermo公司;BCA蛋白测定试剂盒购自美国Thermo公司;TRIzol[®]试剂购自美国Ambion公司。

1.2 细胞培养

使用含10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和含1%青/链霉素的DMEM高糖培养基培养大鼠肺动脉内皮细胞(rat pulmonary artery endothelial cells, RPAECs),常规置于常氧培养箱中(5% CO₂、21% O₂、37 °C)培养。待细胞密度约为75%时即可进行细胞造模。

1.3 细胞模型制备及药物干预

将RPAECs随机分为6组:常氧对照(NC)组、低氧高二氧化碳(HH)组、TGF- β 受体激动剂rhTGF- β 1(HH+rhTGF- β 1)组、TGF- β 受体抑制剂SB-431542(HH+SB431542+rhTGF- β 1)组、溶剂柠檬酸(HH+citric acid)组和溶剂DMSO(HH+DMSO+citric acid)组。本实验参考其他学者的研究^[8-10]和预实验结果制备肺动脉高压细胞模型并且确定药物浓度。

待RPAECs密度约为75%时,各组细胞换用无FBS的DMEM高糖培养基处理24 h。随后,NC组和HH

组换用新鲜的DMEM高糖培养基; HH+rhTGF- β 1组换用含10 ng/mL rhTGF- β 1的DMEM高糖培养基; HH+SB431542+rhTGF- β 1组换用含10 μ mol/L SB-431542和10 ng/mL rhTGF- β 1的DMEM高糖培养基; HH+citric acid组换用含柠檬酸的DMEM高糖培养基(终浓度小于0.05%, 且与激动剂组溶剂终浓度一致); HH+DMSO+citric acid组换用含DMSO和柠檬酸的DMEM高糖培养基(两种溶剂终浓度均小于0.05%, 且与抑制剂组溶剂浓度一致)。将NC组置于常氧培养箱中培养24 h, 其余各组于低氧高二氧化碳培养箱(1% O₂、6% CO₂、37 °C)中培养24 h。

1.4 CD31和 α -SMA免疫荧光双标法鉴定大鼠肺动脉内皮细胞

用爬片专用玻片制备细胞爬片, 待RPAECs密度达到75%, 进行细胞模型制备。造模结束后, 在4 °C条件下, 用4%多聚甲醛固定30 min, 0.1% Triton静置20 min打孔, 5% BSA溶液封闭30 min。滴加1% BSA溶液配制的一抗(含兔抗大鼠 α -SMA一抗和小鼠抗大鼠CD31一抗, 稀释比例均为1:100), 另取一张细胞爬片滴加PBS溶液作为空白对照, 4 °C孵育过夜。第二天将玻片取出, 在暗室里滴加二抗(含TRITC标记山羊抗兔抗体和FITC标记山羊抗小鼠抗体, 稀释比例均为1:100), 室温孵育30 min, 滴加DAPI染色液复染5 min。滴加防荧光淬灭剂于细胞上并封片, 在正置荧光显微镜下观察细胞, 拍片并保存。

1.5 CCK-8法检测细胞活力

制备细胞密度为 5×10^4 个/mL的RPAECs悬液。按200 μ L/孔的比例在96孔板中接种RPAECs悬液, 每组设6个复孔。将96孔板置于常氧培养箱正常培

养, 待RPAECs密度约75%时, 进行细胞模型制备。造模结束后, 弃去旧液, 滴加220 μ L含CCK-8溶液的无血清培养基(含20 μ L CCK-8), 置于常氧培养箱孵育适当时间, 酶标仪测定492 nm处的吸光度。每组每次获得的6个值中删去最大值与最小值, 剩余4个数值进行统计分析。

1.6 Transwell小室法检测细胞迁移

用无FBS的DMEM高糖培养基制备细胞密度为 1×10^5 个/mL的RPAECs悬液。在Transwell小室的下室加入10% FBS和不同组别所需的药物(每孔共500 μ L), 在上室加入200 μ L上述RPAECs悬液, 置于培养箱内造模(省略细胞饥饿步骤)。20~24 h后取出小室, 弃去旧培养基。用干净的棉签轻轻拭去上室内底面未穿过膜的细胞, PBS溶液洗涤, 4%细胞组织固定液固定穿膜细胞30 min。PBS洗3遍后, 置于空气中自然干燥5 min。用结晶紫染液染色30 min, PBS溶液清洗数次, 室温下自然风干。用手术刀沿着上室边缘割下Transwell小室膜, 置于载玻片上, 盖上盖玻片。在盖玻片边缘涂一圈透明指甲油以固定盖玻片。在普通显微镜高倍视野下计数穿膜的细胞数, 实验重复3次。

1.7 逆转录-PCR检测RPAECs中CD31、 α -SMA、TGF- β 1和Smad2/3 mRNA表达水平

取出造模完毕的RPAECs, 加入TRIzol试剂, 按试剂说明书进行总RNA的提取。收集总RNA沉淀, 加入20 μ L DEPC水溶解, 并从中取出1 μ L进行总RNA浓度测定, 按照逆转录试剂盒说明书逆转录合成cDNA。CD31引物由日本TaKaRa公司合成, 其余引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 引物序列见表1。PCR扩增条件:

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物大小/bp Product size /bp
CD31	Left: CTC CCA GAA CAT GGA TGT GGA GTA Right: GTG CAT CTG CCT TGG CTG TC	112
α -SMA	Left: GAG TGA TGG TTG GAA TGG Right: GTG ATG ATG CCG TGT TCT	106
TGF- β 1	Left: ATT CCT GGC GTT ACC TTG Right: CCC TGT ATT CCG TCT CCT	118
Smad2/3	Left: CAT CTT GCC ATT CAC TCC Right: TTC ACA CCA CTT TTC TTC CT	118
GAPDH	Left: TCT CTG CTC CTC CCT GTT C Right: ACA CCG ACC TTC ACC ATC T	87

94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s; 64.5 °C(CD31)/54 °C(α -SMA)/52 °C(TGF- β 1)/54 °C(Smad2/3)/60 °C(GAPDH) 30 s(退火, 32个循环); 72 °C延伸1 min; 72 °C终止延伸5 min。在恒压100 V条件下, 将获得的cDNA进行电泳, 时间为30~40 min, 上样量为5 μ L。电泳结束后曝光成像。用ImageJ软件分析各组电泳条带, 用目的基因与GAPDH基因灰度值之比表示目的基因的表达水平, 实验重复3次。

1.8 Western blot检测RPAECs中CD31、 α -SMA、TGF- β 1、Smad2/3、p-Smad2/3蛋白质表达水平

取造模完毕的RPAECs加入含PMSF的RAPI裂解液(PMSF:RAPI=1:100), 用细胞刮充分研磨细胞。12 000 r/min离心20 min, 4 °C离心后收集上清, 按照说明书方法用BCA蛋白浓度测定试剂盒检测总蛋白浓度。用RIPA裂解液和上样缓冲液将蛋白样品稀释成2 μ g/mL, 100 °C水浴10 min。配制SDS-PAGE凝胶进行电泳, 随后将蛋白电转至PVDF膜, 10%脱脂奶粉室温下封闭1.5 h。取稀释后的一抗溶液浸没PVDF膜(CD31、 α -SMA、p-Smad2/3、Smad2/3、TGF- β 1、GAPDH稀释比例均为1:1 000), 4 °C冰箱孵育过夜。 α -SMA、p-Smad2/3、Smad2/3、TGF- β 1、GAPDH蛋白用辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗室温孵育PVDF膜1 h, CD31蛋白用HRP标记的山羊抗小鼠二抗室温孵育PVDF膜1 h, 所用二抗稀释比均为1:10 000。孵育结束后, 置于曝光仪中, 避光滴加ECL化学发光试剂(溶液A:溶液B=1:1), 曝光并保存条带。用ImageJ软件分析条带, p-Smad2/3与Smad2/3蛋白灰度值之比表示p-Smad2/3蛋白的表达水平, 其余蛋白用目的蛋白与GAPDH蛋白灰度值之比表示目的蛋白的表达水平, 实验重复3次。

1.9 统计学处理

采用SPSS 17.0软件对各组实验结果进行分析, 均进行正态性检验, 数据结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组样本组间比较均数采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)法, 先检验方差齐性, 若方差齐则两两比较采用LSD法, 若方差不齐则使用Dunnett's 3检验, 以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞CD31和 α -SMA免疫荧光标记

CD31属于内皮细胞特异性标志物, α -SMA

属于间质细胞特异性标志物。本实验免疫荧光图中标记CD31的荧光呈绿色, 标记 α -SMA的荧光呈红色, 荧光强度代表各自表达量(图1)。结果显示, NC组可见RPAECs的CD31荧光强度高, 而 α -SMA几乎无荧光。与NC组相比, HH组细胞CD31荧光强度减弱($P<0.01$), α -SMA荧光强度增加($P<0.01$)。与HH组相比, 溶剂组HH+citric acid组和HH+DMSO+citric acid组的CD31荧光强度无明显差别($P>0.05$), α -SMA荧光强度也无差别($P>0.05$)。与HH组相比, HH+rhTGF- β 1组细胞CD31荧光强度减弱($P<0.05$), α -SMA荧光强度明显增加($P<0.01$)。与HH+rhTGF- β 1组相比, HH+SB431542+rhTGF- β 1组细胞CD31荧光强度增加($P<0.01$), α -SMA荧光强度减弱($P<0.01$)。

2.2 各组细胞活力测定

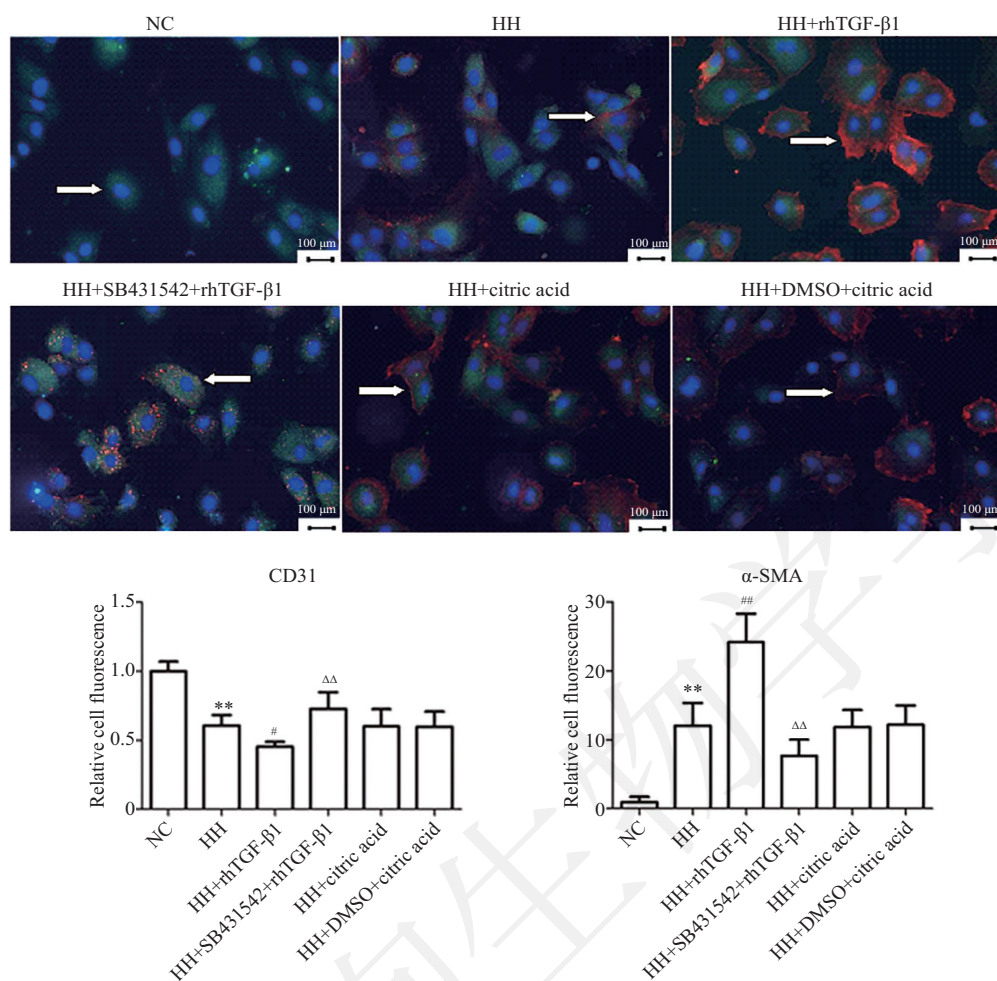
本实验结果图2显示, 与NC组相比, HH组细胞活力减弱($P<0.01$)。与HH组相比, HH+citric acid组和HH+DMSO+citric acid组细胞活力差异无统计学意义($P>0.05$)。与HH组相比, HH+rhTGF- β 1组细胞活力减弱($P<0.01$)。与HH+rhTGF- β 1组相比, HH+SB431542+rhTGF- β 1组细胞活力增强($P<0.01$)。

2.3 各组迁移细胞数

本实验结果图3显示, 与NC组迁移细胞数相比, HH组迁移细胞数明显增多($P<0.01$)。与HH组相比, HH+citric acid组和HH+DMSO+citric acid组迁移细胞数差异均无统计学意义($P>0.05$)。与HH组相比, HH+rhTGF- β 1组迁移细胞数增多($P<0.05$)。与HH+rhTGF- β 1组相比, HH+SB431542+rhTGF- β 1组迁移细胞数减少($P<0.01$)。

2.4 各组细胞CD31、 α -SMA、TGF- β 1和Smad2/3 mRNA表达情况

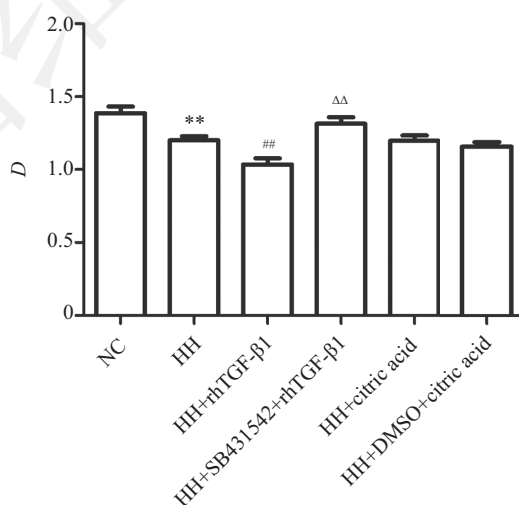
本实验结果图4显示, 与NC组比, HH组CD31 mRNA表达水平降低($P<0.01$), α -SMA、TGF- β 1和Smad2/3 mRNA表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与HH组比, HH+citric acid组和HH+DMSO+citric acid组CD31、 α -SMA、TGF- β 1和Smad2/3 mRNA表达水平均无明显变化($P>0.05$)。与HH组比, HH+rhTGF- β 1组CD31 mRNA表达水平降低($P<0.01$), α -SMA、TGF- β 1和Smad2/3 mRNA表达水平升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与HH+rhTGF- β 1组相比, HH+SB431542+rhTGF- β 1组CD31 mRNA水平升高($P<0.01$), α -SMA、TGF- β 1和Smad2/3 mRNA水平降低($P<0.01$)。



箭头所指为变化明显的区域。** $P < 0.01$, 与NC组相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 HH组相比; ^{ΔΔ} $P < 0.01$, 与HH+rhTGF-β1组相比。
The arrow points to the area with obvious changes. ** $P < 0.01$ vs NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs HH group; ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs HH+rhTGF-β1 group.

图1 各组大鼠肺动脉内皮细胞免疫荧光变化

Fig.1 Changes of immunofluorescence in rat pulmonary artery endothelial cells in each group

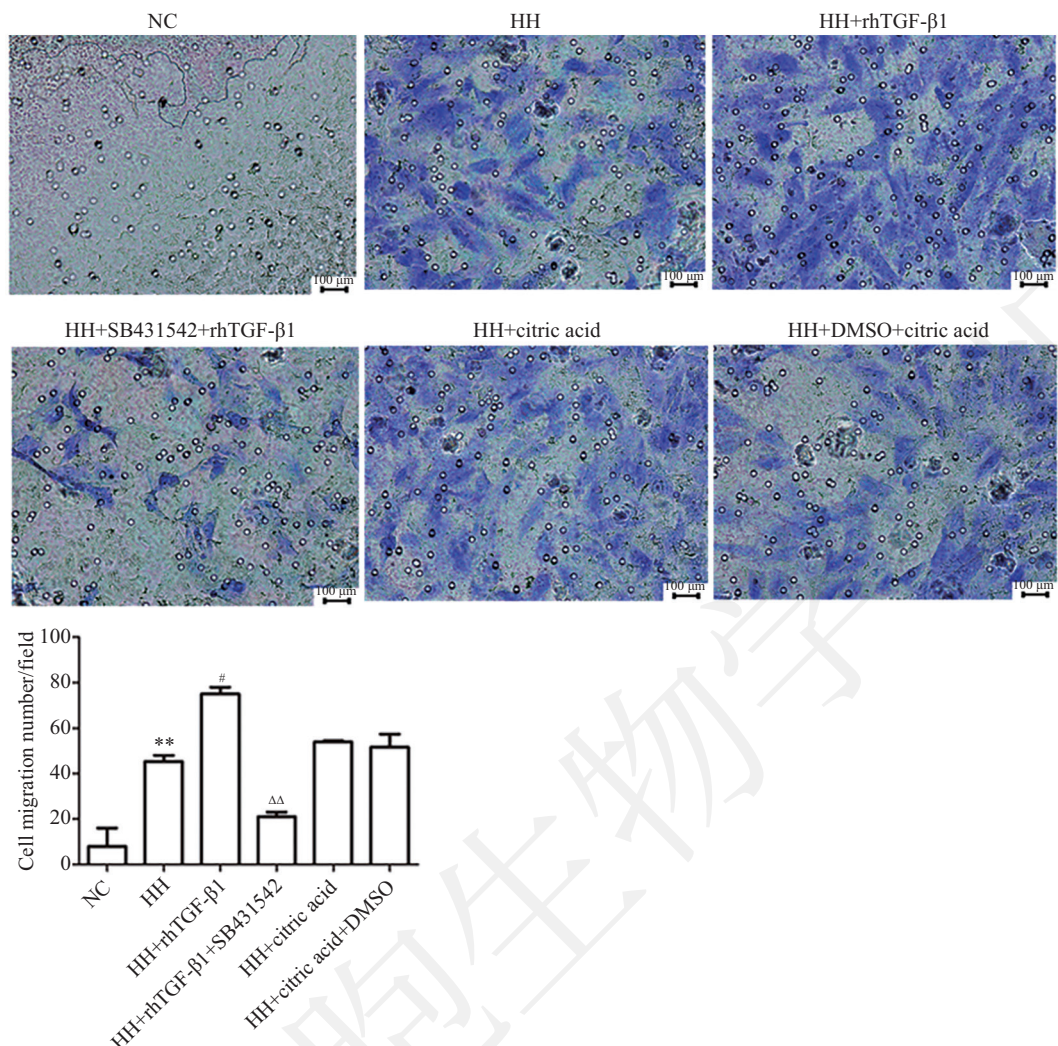


** $P < 0.01$, 与NC组相比; ## $P < 0.01$, 与 HH组相比; ^{ΔΔ} $P < 0.01$, 与HH+rhTGF-β1组相比。

** $P < 0.01$ vs NC group; ## $P < 0.01$ vs HH group; ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs HH+ rhTGF-β1 group.

图2 各组大鼠肺动脉内皮细胞活力变化

Fig.2 Changes of rat pulmonary artery endothelial cells viability in each group



** $P<0.01$, 与NC组相比; # $P<0.05$, 与HH组相比; $\Delta\Delta P<0.01$, 与HH+rhTGF-β1组相比。
** $P<0.01$ vs NC group; # $P<0.05$ vs HH group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs HH+rhTGF-β1 group.

图3 各组大鼠肺动脉内皮细胞迁移数变化

Fig.3 Changes of migration number of rat pulmonary artery endothelial cells in each group

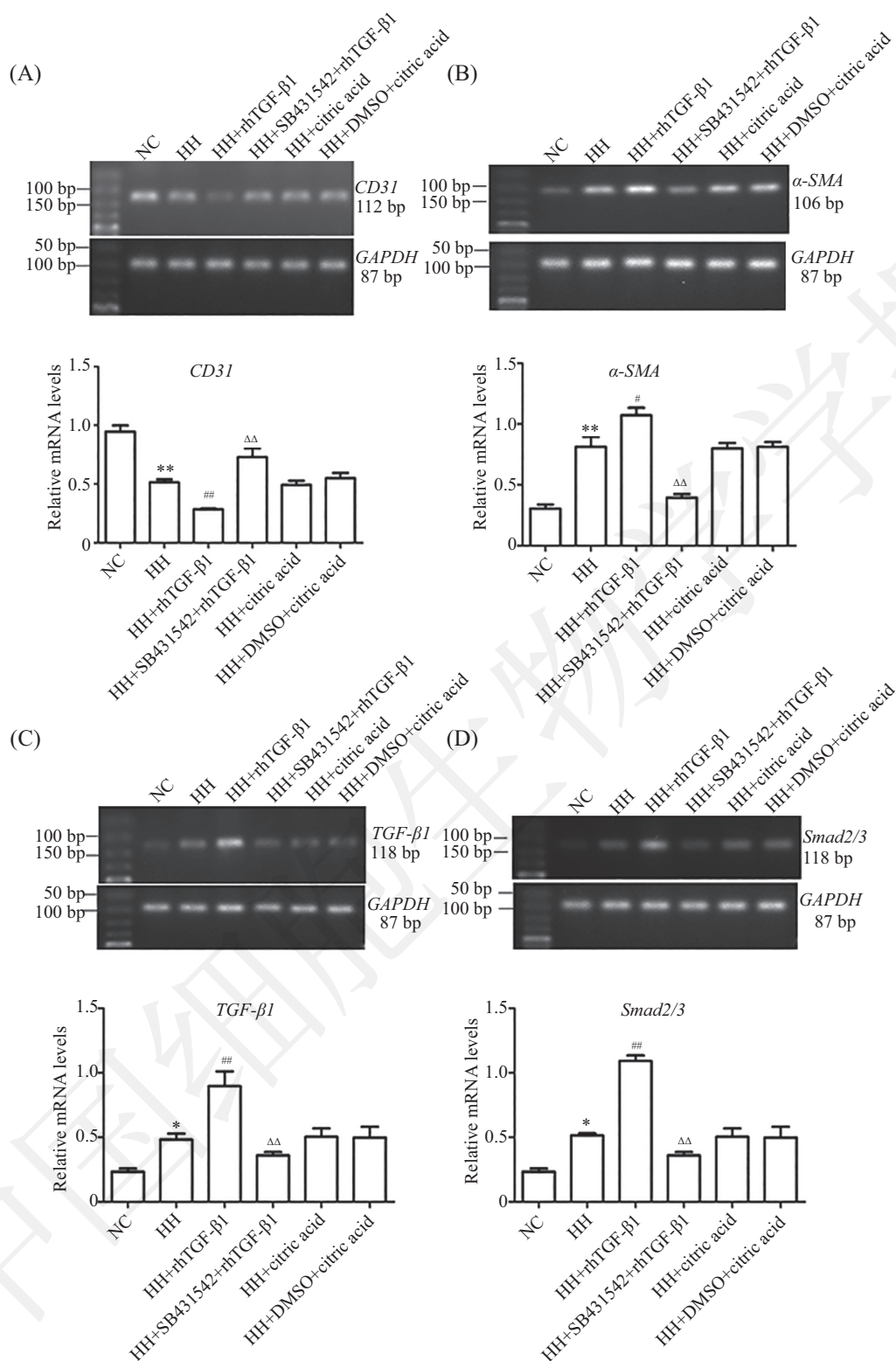
2.5 各组细胞CD31、α-SMA、TGF-β1和p-Smad2/3蛋白质表达

本实验结果图5显示, 与NC组比, HH组CD31蛋白质表达水平降低($P<0.05$), 而α-SMA、TGF-β1和p-Smad2/3蛋白质表达水平明显升高($P<0.05$)。与HH组比, HH+citric acid组和HH+DMSO+citric acid组CD31、α-SMA、TGF-β1和p-Smad2/3蛋白质表达水平无明显变化($P>0.05$)。与HH组比, HH+rhTGF-β1组CD31蛋白质表达水平降低($P<0.01$), 而α-SMA、TGF-β1和p-Smad2/3蛋白质表达水平升高($P<0.01$)。与HH+rhTGF-β1组相比, HH+SB431542+rhTGF-β1组CD31蛋白质表达水平升高($P<0.01$), 而α-SMA、TGF-β1和p-Smad2/3蛋白质水平降低($P<0.05$)。

3 讨论

PH发生率逐渐升高, 而且使伴发PH的疾病预后不佳, 严重影响我国患者的生活品质。COPD是临床上常见的能诱发PH的疾病之一, 该类患者肺实质损伤并伴随肺泡缺氧, 引起低氧血症和高碳酸血症^[11]。由于临床上PH患者和/或PH并发症患者通常伴随肺泡和血液中CO₂分压升高, 因此, 本实验设计低O₂伴高CO₂混合气体制备的PH细胞模型更符合临床患者的发病情况。

目前, 已开发的防治策略难以根治PH, 其主要原因是PH发生机制未完全明晰。肺血管ECs增殖与凋亡异常, 生化代谢途径的改变被认为是PH发病的起始环节^[12]。因此, 深入研究ECs功能, 对防治PH有重要作用。肺动脉重构是PH的主要特征之一, 包括

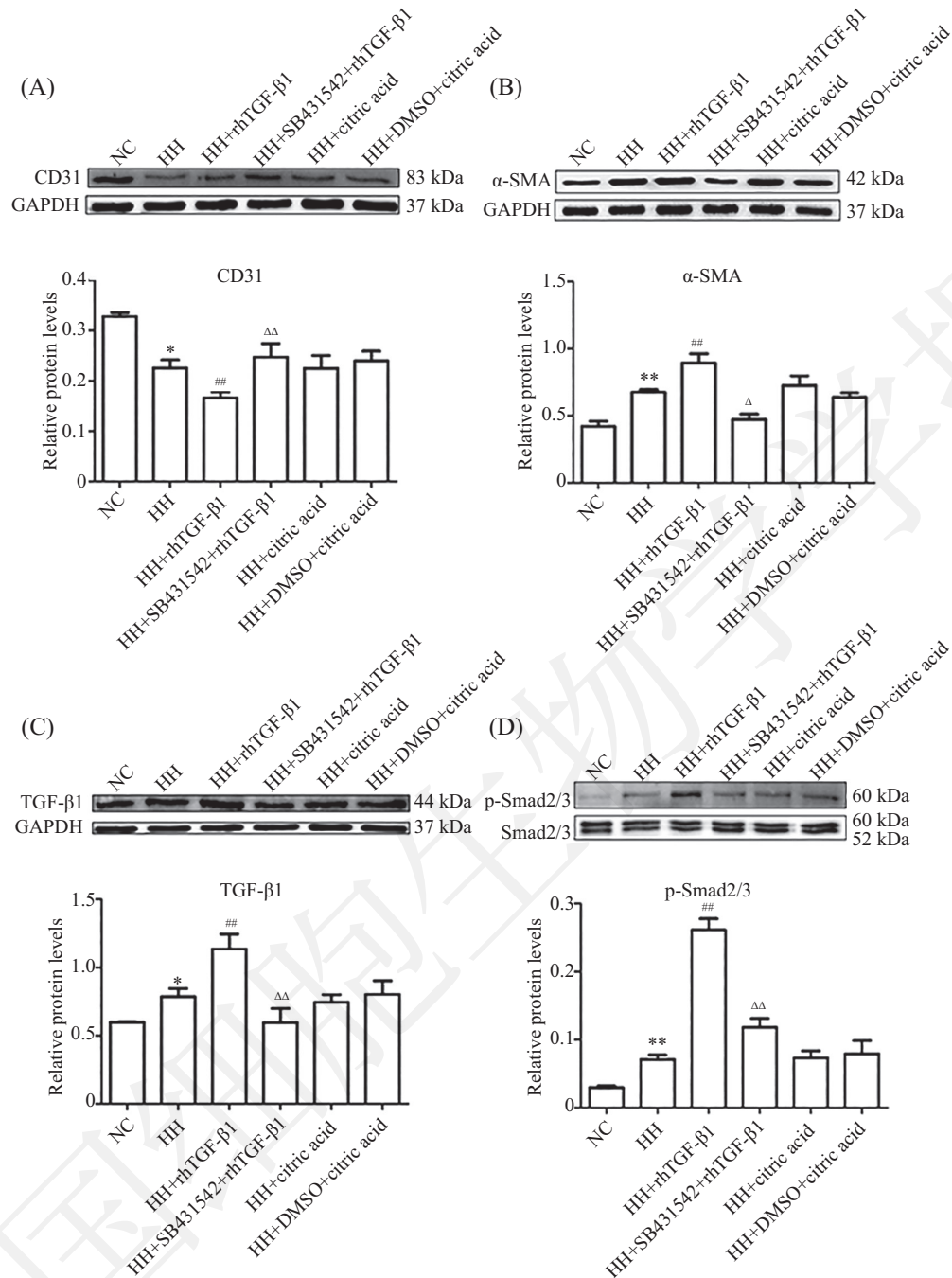


A: 各组细胞*CD31* mRNA的表达及相对水平; B: 各组细胞*α-SMA* mRNA的表达及相对水平; C: 各组细胞*TGF-β1* mRNA的表达及相对水平; D: 各组细胞*Smad2/3* mRNA的表达及相对水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与NC相比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与HH组相比; ^{ΔΔ} $P < 0.01$, 与HH+rhTGF-β1组相比。

A: the expression and relative levels of *CD31* mRNA in each group; B: the expression and relative levels of *α-SMA* mRNA in each group; C: the expression and relative levels of *TGF-β1* mRNA in each group; D: the expression and relative levels of *Smad2/3* mRNA in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NC group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs HH group; ^{ΔΔ} $P < 0.01$ vs HH+rhTGF-β1 group.

图4 各组大鼠肺动脉内皮细胞*CD31*、*α-SMA*、*TGF-β1*和*Smad2/3* mRNA表达变化

Fig.4 The changes of *CD31*, *α-SMA*, *TGF-β1* and *Smad2/3* mRNA expression of rat pulmonary artery endothelial cells in each group



A: 各组细胞CD31蛋白质的表达及相对水平; B: 各组细胞 α -SMA蛋白质的表达及相对水平; C: 各组细胞TGF- β 1蛋白质的表达及相对水平; D: 各组细胞p-Smad2/3蛋白质的表达及相对水平。* P <0.05, ** P <0.01, 与NC组相比; ## P <0.01, 与HH组相比; Δ P <0.05, ΔΔ P <0.01, 与HH+rhTGF- β 1组相比。

A: the expression and relative levels of CD31 protein in each group; B: the expression and relative levels of α -SMA protein in each group; C: the expression and relative levels of TGF- β 1 protein in each group; D: the expression and relative levels of p-Smad2/3 protein in each group. * P <0.05, ** P <0.01 vs NC group; ## P <0.01 vs HH group; Δ P <0.05, ΔΔ P <0.01 vs HH+rhTGF- β 1 group.

图5 各组大鼠肺动脉内皮细胞CD31、 α -SMA、TGF- β 1和p-Smad2/3蛋白质表达变化

Fig.5 The changes of CD31、 α -SMA、TGF- β 1 and p-Smad2/3 protein expression of rat pulmonary artery endothelial cells in each group

内膜增大和/或内膜硬化与增厚, α -SMA表达升高, 胶原合成/沉积和炎症^[4]。近期研究发现, EndoMT可引起细胞外胶原蛋白堆积, α -SMA大量表达, 导

致肾脏纤维化^[13]、恶性肿瘤^[14]等具有血管重构特点的疾病。

EndoMT指ECs在缺氧、炎症等刺激因素持续

作用下向间质细胞转化的过程。在EndoMT发展进程中, ECs基因和蛋白主要变化是下调原有特异性标志物(如CD31、钙黏蛋白等), 开始逐步表达间质细胞标志物(如成纤维细胞特异蛋白1、波形蛋白、 α -SMA等)^[15]。ECs通过这种作用丧失其内皮特征并获得纺锤形的间质样表型, 其增殖、迁移及细胞相关信号通路也随之变化。EndoMT受到多种信号通路的调控, 如Smad依赖信号通路、非Smad依赖信号通路、Notch信号通路等。目前研究最多的是Smad依赖信号通路, 所以我们着重关注Smad依赖信号通路在低氧高二氧化碳性PH中发挥的作用。

TGF- β 在人体各细胞中均有表达, 在维持细胞内稳态和人体正常发育中发挥举足轻重的作用。当TGF- β 配体结合到TGF- β 受体(transforming growth factor- β receptor, TGFBR) II型上时, 可以招募并磷酸化TGFBR I型, 通过Smads转录调节因子介导下游信号的传递。Smads蛋白按照功能分三类: 受体激活的Smads(the receptor activated Smads, R-Smads, 包括Smad1、2、3、5和8)、常见介质Smads(包括Smad4)和抑制性Smads(包括Smad6和7)^[16]。R-Smads被磷酸化后, 可与Smad4构成复合体转入细胞核, 再与靶基因区域中的特定DNA位点联结, 从而激活或阻抑基因转录^[17]。在细胞实验中, Wang等^[18]给予人脐静脉ECs外源性TGF- β 1, 发现 α -SMA和波形蛋白表达水平同时升高, 且Smad2/3和Akt蛋白的磷酸化增加。使用人脐静脉ECs胶原3D培养模型时发现, TGF- β 1引起ECs小管结构丧失但仍可保持活性。在动物实验中, Cai团队^[19]的研究发现, 异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化大鼠 α -SMA和TGF- β 1表达水平增加, 而CD31表达水平降低, 使用松弛素和螺内酯可逆转上述表达结果, 改善心脏功能, 也提示了TGF- β 1参与的信号通路可能与EndoMT有关。

本实验免疫荧光结果显示, 与NC组相比, HH组RPAECs的 α -SMA蛋白表达量增多, CD31蛋白表达量降低。免疫印迹实验和逆转录-PCR实验也证实了 α -SMA mRNA和蛋白质表达水平上调, CD31 mRNA和蛋白质表达水平下调。同时, 结合Transwell小室法实验结果, 发现RPAECs迁移增多, 提示低氧高二氧化碳环境下, RPAECs发生EndoMT。低氧刺激ECs可引起ECs损伤、功能失调, 启动了PH的发生。有研究显示, 低氧可引起人肺动脉内皮细胞p53的表达, 从而诱导肺动脉内皮细胞凋亡增多、持

续性血管收缩和血管重构^[20]。低氧也可引起肺微血管ECs线粒体功能异常, LDH活力增加, 细胞膜脂质过氧化反应加剧, ECs活力下降^[21]。在本实验中, HH组RPAECs的活力与NC组相比有所下降, 与以往研究结果相一致。

本实验用rhTGF- β 和SB-431542分别作为TGFBR的激动剂和抑制剂干预低氧高二氧化碳环境下的大鼠肺动脉内皮细胞。研究结果显示, HH组、HH+citric acid组和HH+DMSO+citric acid组的检测指标差异均无统计学意义, 表明溶剂柠檬酸和溶剂DMSO对细胞影响不大。将HH+rhTGF- β 1组和HH组比较、HH+SB431542+rhTGF- β 1组和HH+rhTGF- β 1组比较, 我们发现, 在使用rhTGF- β 1激活TGFBR后, 细胞TGF- β 1和p-Smad2/3的蛋白质表达量升高; α -SMA表达量增多, CD31表达量降低; 抑制RPAECs活力而促进RPAECs迁移。而使用了TGFBR抑制剂SB-431542后则出现了相反的变化。上述结果提示, 激活TGFBR可以促进EndoMT水平, 引起ECs活力抑制而促进迁移, 加重肺血管重构; 而使用SB-431542抑制TGFBR则会抑制EndoMT, 缓解肺血管重构。Liu等^[22]报道低氧诱导人心脏微血管ECs向间质细胞转变, 并促进成管和细胞迁移, TGF- β 和Notch信号在EndoMT期间被激活, 这与本实验的研究结果相一致。

综上所述, 低氧高二氧化碳条件可以诱导RPAECs发生EndoMT, 促进PH的发展; 抑制TGF- β 1/Smads通路能抑制EndoMT, 从而缓解低氧高二氧化碳性肺动脉高压。因此, 本实验为临床上PH的防治提供了理论基础, 为防治PH药物的研究提供新的作用靶点。

参考文献 (References)

- 1 Pullamsetti SS, Schermuly R, Ghofrani A, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W. Novel and emerging therapies for pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189(4): 394-400.
- 2 Humbert M, Lau EM, Montani D, Jaïs X, Sitbon O, Simonneau G. Advances in therapeutic interventions for patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2014; 130(24): 2189-208.
- 3 Coll-Bonfill N, Musri MM, Ivo V, Barberà JA, Tura-Ceide O. Transdifferentiation of endothelial cells to smooth muscle cells play an important role in vascular remodelling. *Am J Stem Cells* 2015; 4(1): 13-21.
- 4 Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J*

- Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007; 293(1): L1-8.
- 5 Kovacic JC, Mercader N, Torres M, Boehm M, Fuster V. Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease. *Circulation* 2012; 125(14): 1795-808.
- 6 Zheng G, Cai J, Chen X, Chen L, Ge W, Zhou X, *et al.* Relaxin ameliorates renal fibrosis and expression of endothelial cell transition markers in rats of isoproterenol-induced heart failure. *Biol Pharm Bull* 2017; 40(7): 960-6.
- 7 Ji J, He L. Effect of kangxianling decoction on expression of TGF- β 1/Smads and extracellular matrix deposition. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019; 2019: 1-9.
- 8 郑梦晓, 赵美平, 张聪聪, 贾旭广, Wu Yiming, 陈锡文, 等. 低氧高二氧化碳对肺动脉平滑肌细胞TRPC1/4表达影响及其与细胞增殖、凋亡的关系. *中国细胞生物学学报*(Zheng Mengxiao, Zhao Meiping, Zhang Congcong, Jia Xuguang, Wu Yiming, Chen Xiwen, *et al.* The expression of TRPC1/4 and its relationship with proliferation and apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells under hypoxic and hypercapnic conditions. *Chinese Journal of Cell Biology*) 2016; 38(9): 1100-9.
- 9 Almudéver P, Milara J, De Diego A, Serrano-Mollar A, Xaubet A, Perez-Vizcaino F, *et al.* Role of tetrahydrobiopterin in pulmonary vascular remodelling associated with pulmonary fibrosis. *Thorax* 2013; 68(10): 938-48.
- 10 Takemoto N, Serada S, Fujimoto M, Honda H, Ohkawara T, Takahashi T, *et al.* Leucine-rich α -2-glycoprotein promotes TGF β 1-mediated growth suppression in the Lewis lung carcinoma cell lines. *Oncotarget* 2015; 6(13): 11009-22.
- 11 Seeger W, Adir Y, Barberà JA, Champion H, Coghlan JG, Cottin V, *et al.* Pulmonary hypertension in chronic lung diseases. *J Am Coll Cardiol* 2013; 62(25): 109-16.
- 12 Medici D. Endothelial-mesenchymal transition in regenerative medicine. *Stem Cells Int* 2016; 2016: 1-7.
- 13 张姣, 张佳幸, 熊一凡, 鲁路, 王明清, 刘思明, 等. 基于内皮细胞的内皮-间质转化筛选肾康丸活性成分. *南方医科大学学报*(Zhang Cha, Zhang Jiaxing, Xiong Yifan, Lu Lu, Wang Mingqing, Liu Siming, *et al.* Screening active ingredients of Shenkangwan that regulate endothelial-mesenchymal transition of endothelial cells in vitro. *J South Med Univ*)2018; 38(3): 312-17.
- 14 Ciszewski WM, Sobierajska K, Wawro ME, Klopocka W, Chefczyńska N, Muzyczuk A, *et al.* The ILK-MMP9-MRTF axis is crucial for EndMT differentiation of endothelial cells in a tumor microenvironment. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 2017; 1864(12): 2283-96.
- 15 周选芬, 戴爱国, 胡瑞成, 朱黎明, 蒋永亮. 肺动脉高压中内皮间质转化信号通路的研究进展. *临床与病理杂志*(Zhou Xuanfen, Dai Aiguo, Hu Ruicheng, Zhu Liming, Jiang Yongliang. Research progress on the signal pathway of endothelial to mesenchymal transition in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Pathol Res*) 2018; 38(4): 879-85.
- 16 Pardali E, Sanchez-Duffhues G, Gomez-Puerto MC. TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition in fibrotic diseases. *Int J Mol Sci* 2017; 18(10): 1-22.
- 17 Ten Dijke P, Arthur HM. Extracellular control of TGF β signaling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(11): 857-69.
- 18 Wang Z, Perez M, Lee ES, Kojima S, Griffin M. The functional relationship between transglutaminase 2 and transforming growth factor β 1 in the regulation of angiogenesis and endothelial-mesenchymal transition. *Cell Death Dis* 2017; 8(9): 1-12.
- 19 Cai J, Chen X, Chen X, Chen L, Zheng G, Zhou H. Anti-fibrosis effect of relaxin and spironolactone combined on isoprenaline-induced myocardial fibrosis in rats via inhibition of endothelial-mesenchymal transition. *Cell Physiol Biochem* 2017; 41(3): 1167-78.
- 20 Wang Z, Yang K, Zheng Q, Zhang C, Tang H, Babicheva A, *et al.* Divergent changes of p53 in pulmonary arterial endothelial and smooth muscle cells involved in the development of pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2019; 316(1): L216-28.
- 21 王萌, 李志超, 王剑波. 虎杖苷对低氧所致大鼠肺微血管内皮细胞损伤的保护作用. *西北药学杂志*(Wang Meng, Li Zhichao, Wang Jianbo. Protective effect of polydatin on hypoxia-induced injury in rat pulmonary microvascular endothelial cells. *Northwest Pharmaceutical Journal*) 2011; 26(3): 185-9.
- 22 Liu Y, Zou J, Li B, Wang Y, Wang D, Hao Y, *et al.* RUNX3 modulates hypoxia-induced endothelial-to-mesenchymal transition of human cardiac microvascular endothelial cells. *Int J Mol Med* 2017; 40(1): 65-74.