

成纤维细胞生长因子9抑制PDGF-BB诱导的肺血管平滑肌细胞表型转化

郑艳 彭琳茜 董永洁 黄玮*

(重庆医科大学附属第一医院, 心血管内科, 重庆 400016)

摘要 该研究探讨了成纤维细胞生长因子9(fibroblast growth factor 9, FGF9)在肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)及肺血管平滑肌细胞表型转化中的作用。建立野百合碱(monocrotaline, MCT)诱导的大鼠肺动脉高压模型, Western blot检测大鼠肺组织中FGF9的表达情况。血小板衍生生长因子-BB(platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)诱导肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)表型转化, Western blot检测PSMCs中FGF9的表达情况。重组人成纤维细胞生长因子9(recombinant human fibroblast growth factor 9, rhFGF9)干预PSMCs, 通过划痕实验检测细胞迁移能力, Western blot检测细胞表型相关蛋白[α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)及血小板衍生生长因子受体 β (platelet-derived growth factor receptor β , PDGFR- β)的表达水平。siRNA抑制FGF9后, Western blot检测PSMCs表型与PCNA蛋白水平。结果显示, 大鼠肺组织及PSMCs中FGF9的表达显著降低($P<0.05$); PDGF-BB下调PDGFR- β 与收缩表型标志物 α -SMA的表达($P<0.05$), 同时上调PCNA与合成表型标志物OPN的表达($P<0.05$), 且细胞的迁移能力增加; rhFGF9抑制PDGF-BB诱导的细胞表型转化和细胞迁移, 而不影响PCNA与PDGFR- β 的表达; 下调FGF9可降低 α -SMA($P<0.05$)的表达, 而PCNA与OPN的表达无显著改变, 即下调FGF9后, 平滑肌细胞的收缩表型发生改变。总之, rhFGF9抑制PDGF-BB诱导的平滑肌细胞表型转化和迁移, 下调FGF9能改变平滑肌细胞的收缩表型, 提示FGF9可能参与肺动脉高压的病理过程。

关键词 肺动脉高压; 成纤维细胞生长因子9; 表型转化; 血小板衍生生长因子-BB

Fibroblast Growth Factor 9 Inhibits PDGF-BB-Induced Phenotypic Phenotype Switch of Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cells

ZHENG Yan, PENG Linqian, DONG Yongjie, HUANG Wei*

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract The purpose of this study is to investigate the role of FGF9 (fibroblast growth factor 9) in PAH (pulmonary arterial hypertension) and phenotype switch of pulmonary vascular smooth muscle cells. Rat model

收稿日期: 2021-03-04 接受日期: 2021-05-20

重庆市卫生健康委员会“中青年医学高端人才工作室”项目(批准号: ZQNYXGDRCGZS2019001)和重庆市卫生健康委医学科计划项目(批准号: 2016HBRC001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13638309211, E-mail: weihuangcq@gmail.com

Received: March 4, 2021

Accepted: May 20, 2021

This work was supported by the Chongqing Municipal Health Commission's "High-End Medical Talent Studio Project for Young and Middle-Aged Medical Professionals" (Grant No.ZQNYXGDRCGZS2019001) and the Chongqing Municipal Health Commission's Medical Research Program Project (Grant No.2016HBRC001)

*Corresponding author. Tel: +86-13638309211, E-mail: weihuangcq@gmail.com

of pulmonary arterial hypertension was induced by MCT (monocrotaline), and the expression of FGF9 in lung tissue was detected by Western blot. PDGF-BB (platelet-derived growth factor-BB) induced phenotype switch of PASMCs (pulmonary artery smooth muscle cells) and then Western blot was used to detect the expression of FGF9. Exogenous rhFGF9 (recombinant human fibroblast growth factor 9) interfered with PASMCs. Then scratch assay and Western blot were used to measure cell migration, the expression of phenotype-related proteins [α -SMA (α -smooth muscle actin), OPN (osteopontin)], PCNA (proliferating cell nuclear antigen) and PDGFR- β (platelet-derived growth factor receptor β), respectively. After knock-down of *FGF9* by siRNA, Western blot was used to analyze the expression of phenotypic markers and PCNA of PASMCs. The results showed that the expression of FGF9 in the lung tissue and PASMCs of rats were significantly reduced ($P < 0.05$). The expression of PDGFR- β and α -SMA (contractile phenotype marker) was down-regulated ($P < 0.05$), while the protein levels of PCNA and OPN (synthetic phenotypic marker) were increased in PASMCs treated with PDGF-BB ($P < 0.05$), and migration of PASMCs induced by PDGF-BB. The changes in cell migration and expression of α -SMA and OPN were blocked by rhFGF9, while rhFGF9 did not affect the expression of PDGFR- β and PCNA. Knock-down of *FGF9* reduced the expression of α -SMA without affecting the expression of PCNA and OPN, which suggested that FGF9 was related to the contractile phenotype of PASMCs. In summary, rhFGF9 represses the phenotype switch and migration of PASMCs induced by PDGF-BB, and the contractile phenotype of PASMCs was regulated by silencing *FGF9*. Therefore, FGF9 may participate in the pathogenesis of PAH.

Keywords pulmonary arterial hypertension; fibroblast growth factor 9; phenotype switch; platelet derived growth factor-BB

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种预后较差的恶性肺血管疾病, PAH患者的5年存活率只有59%^[1]。PAH的诊断标准为在静息状态下通过右心导管测得平均肺动脉压力(mean pulmonary artery pressure, mPAP) ≥ 25 mmHg, 肺动脉楔压(pulmonary artery wedge pressure, PAWP) ≤ 15 mmHg^[2-3]。在肺动脉高压的病理过程中, 肺血管平滑肌细胞的增殖及内皮细胞的功能障碍, 导致肺小动脉管腔进行性狭窄, 从而使肺血管阻力增加, 最终导致右心衰竭甚至死亡^[4]。随着对肺动脉高压研究的深入, 一些肺动脉高压的靶向药物已经应用于临床, 改善了肺动脉高压患者的临床症状并提高了患者的生活质量, 然而目前的治疗策略尚不能逆转肺血管的重构, PAH患者的长期预后仍不容乐观。因此, 我们需要进一步探索逆转肺血管重构的新靶点。

成纤维细胞生长因子9(fibroblast growth factor 9, FGF9)属于成纤维细胞生长因子家族第九个成员, 是一种自分泌或旁分泌因子, 最初在人胶质细胞瘤系中被发现, 它广泛分布于组织细胞中, 参与了血管形成^[5]、骨骼发育^[6]、组织修复^[7]及肿瘤生长^[8-11]等多种生理病理过程。研究发现, 在神经退行性疾病中FGF9通过ERK信号通路发挥抗氧化作用^[12]; 在

心脏纤维化中, FGF9作为lncRNA FAF的直接靶标, 通过TGF- β -Smad途径发挥抗心脏纤维化的作用^[13]。在一些肿瘤疾病, 如膀胱癌^[9]、肝癌^[10]及胃癌^[14]中, FGF9促进肿瘤细胞的增殖及侵袭。还有研究表明, 在大鼠的主动脉平滑肌细胞中, microRNA-182通过FGF9抑制平滑肌细胞表型转化^[15]。在肺动脉高压中FGF9的研究较少, 因此本研究探讨了FGF9在肺动脉高压的血管重构中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物SD(Sprague Dawley)大鼠由重庆医科大学动物实验中心提供; 野百合碱(monocrotaline, MCT)购自Mingbio(China, Chongqing)公司; DMEM/F12培养基购自美国Hyclone公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自德国PAN公司; 0.25%胰酶、青霉素-链霉素(penicillin-streptomycin, PS)购自武汉Servicebio公司; FGF9一抗、重组人FGF9(recombinant human fibroblast growth factor 9, rh-FGF9)购自英国Abcam公司; GAPDH、PCNA、 β -actin、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和骨桥蛋白(osteopontin, OPN)一抗购自美国Proteintech

公司;重组人血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor BB, PDGF-BB)购自美国R&D公司;FGF9 siRNA购自Tsingke公司;Lipofectamine™ 3000、Opti-MEM购自Invitrogen公司;光学显微镜购自德国Leica公司;酶标仪购自美国Thermo Fisher公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 本研究采用MCT诱导的肺动脉高压动物模型。MCT溶于无水乙醇和生理盐水(2:8)配制成的溶液中,最终浓度为10 mg/mL。20只SD大鼠由重庆医科大学动物实验中心提供,体质量180~200 g,大鼠随机分成两组,实验组($n=12$)腹腔注射MCT(55 mg/kg),Control组($n=8$)注射生理盐水,21天后取肺组织用于后续研究。所有动物操作流程已经重庆医科大学动物实验伦理委员会批准(许可证编号:SYXK 2020-404)。

1.2.2 肺组织苏木精-伊红染色 将肺组织浸泡于4%多聚甲醛中,置于4℃冰箱过夜,然后石蜡包埋切片,组织切片经苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,染色后的组织切片于显微镜下观察并拍片。

1.2.3 肺动脉平滑肌细胞培养 配制含20% FBS+2% PS的DMEM/F12培养液;配制含2% PS的磷酸盐缓冲液;所需器械用高压蒸汽灭菌锅灭菌。一只180~200 g的SD大鼠,麻醉处死后浸泡于75%的酒精中3 min,用组织剪剪开胸腔得到肺组织,肺组织浸没于含PS和磷酸盐缓冲液(phosphate buffersaline, PBS)的培养皿中,将培养皿转移至超净台内分离肺动脉,分离出的肺动脉用PBS洗净血管内血凝块,用眼科剪纵行剪开血管,组织镊轻轻刮拭内膜去除内皮细胞层。将血管转移至新的干燥的培养皿内,将血管剪成1 mm³大小的组织块,均匀分布于培养皿内,将培养皿放于细胞培养箱内待组织块贴壁(约10 min),然后向培养皿加入5 mL DMEM/F12培养液并于培养箱内培养,根据具体情况更换培养液,待组织块周围的细胞融合成片时,即可传代。用 α -SMA对获得的肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)进行鉴定,传代培养获得的第三代至第八代细胞用于体外实验。

1.2.4 PDGF-BB干预肺动脉平滑肌细胞 将PSMCs接种于6孔板内,用DMEM/F12培养液(含10% FBS+2% PS)培养,当PSMCs生长至密度为60%左右时,无血清培养基饥饿处理6 h,然后更换为饥饿处理之前的DMEM/F12培养液,将PSMCs分

为两组,即正常Control组和PDGF-BB组,PDGF-BB处理细胞的终浓度为20 ng/mL,细胞置于37℃、5% CO₂的恒温孵育箱内培养24 h。

1.2.5 重组人FGF9干预肺动脉平滑肌细胞 将PSMCs分为四组:Control组、PDGF-BB组、rh-FGF9组、PDGF-BB+rhFGF9组,先用rhFGF9预处理PSMCs 30 min,然后再用PDGF-BB处理, rhFGF9处理细胞的终浓度为25 ng/mL,细胞置于37℃、5% CO₂的恒温孵育箱内培养24 h。

1.2.6 划痕试验 将PSMCs接种于6孔板内,当细胞生长至密度为60%左右时,用无菌的200 μ L枪头在6孔板内自上而下划过单层细胞,去除部分单层细胞,形成一道划痕,吸净培养皿内的培养基,无菌PBS清洗3次,然后向培养皿内加入含10% FBS的DMEM/F12培养基,在倒置显微镜下获得细胞图像,拍照完成后将细胞分为四组:Control组、PDGF-BB组、rhFGF9组、PDGF-BB+rhFGF9组, rhFGF9预处理后再用PDGF-BB处理,细胞培养12 h后再次于倒置显微镜下观察并获得细胞图像。

1.2.7 Western blot 用RIPA裂解液获得组织和细胞蛋白,BCA试剂盒测定蛋白浓度,向蛋白溶液加入蛋白上样缓冲液,然后将含有蛋白上样缓冲液的蛋白样品于沸水中煮5~10 min,将获得的变性蛋白样品用于SDS-PAGE电泳,电泳分离得到的蛋白转至PVDF膜上,5%的脱脂牛奶室温封闭90 min,一抗孵育过夜:FGF9(1:1 000)、PCNA(1:5 000)、OPN(1:2 000)、 α -SMA(1:2 000)、PDGFR(1:1 000)、GAPDH(1:20 000)、 β -actin(1:10 000),二抗(1:10 000)室温孵育90 min后进行显色。

1.2.8 细胞免疫荧光 细胞于24孔板内的爬片上生长,当细胞密度生长至50%~60%时,用PDGF-BB干预细胞,处理后的PSMCs置于恒温孵育箱(37℃、5% CO₂)中培养。24 h后取出细胞, PBS漂洗3次后,经过免疫染色固定、免疫染色强力通透液透膜、免疫染色液封闭、抗体孵育、染核及封片等步骤,于正置荧光显微镜下观察并获得细胞图片。

1.2.9 FGF9-siRNA转染 细胞接种于6孔板内,细胞分为以下三组:正常Control组、NC-siRNA组和FGF9-siRNA组。转染时按每孔5 μ L lipo-fectamine™ 3000和125 μ L Opti-MEM配制混合液①,按每孔5 μ L FGF9-siRNA和125 μ L Opti-MEM配制混合液②,然后将①和②混匀,室温静置10 min。弃去旧的培养液,

将转染复合物加入6孔板内并添加新的培养液,轻摇混匀,6 h后更换培养液,细胞置于恒温孵育箱(37 °C、5% CO₂)中培养48 h。

1.2.10 统计学分析 所有数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用Graph Pad Prism Software Version 8.0统计软件进行统计学分析,两样本均数的比较采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 野百合碱诱导肺血管重构

为了评估野百合碱是否成功构建肺动脉高压大鼠模型,我们通过肺组织HE染色观察肺血管重构情况。结果显示,与正常Control组相比,MCT组大鼠的肺血管管腔狭窄增加明显,血管壁肌层明显增厚(图1)。

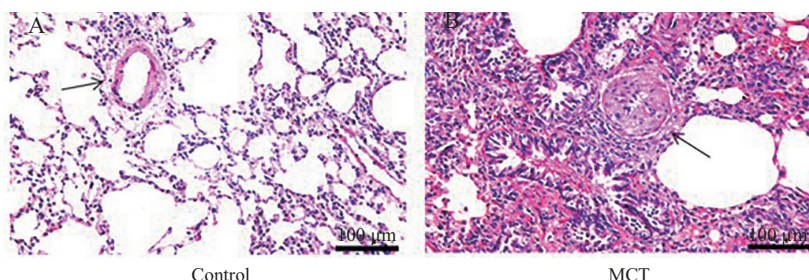
2.2 FGF9在PAH大鼠中表达下调

我们通过建立MCT诱导的肺动脉高压动物模型,比较Control组和MCT组大鼠肺组织中FGF9的表达情况。Western blot结果显示,与Control组相比,MCT组FGF9的表达水平明显降低($P<0.001$)(图2)。

2.3 PDGF-BB下调肺动脉平滑肌细胞中FGF9的表达

在MCT-PAH大鼠肺组织中检测到FGF9的表达下调。接下来我们探讨了PDGF-BB是否可以影响PASMCs中FGF9蛋白的表达。Western blot结果显示,与Control组相比,PDGF-BB处理PASMCs后FGF9的表达显著降低($P<0.001$);此外,我们还检测了PASMCs的收缩表型标志物 α -SMA的表达,与Control组相比,PDGF-BB处理PASMCs后 α -SMA的表达明显降低($P<0.01$)(图3A和图3B)。

为了进一步研究FGF9在PASMCs中的表达和分布变化,我们进行了免疫荧光实验和Western blot检测。荧光结果显示,正常情况下,细胞中FGF9的表达较多且主要存在于细胞质中,与Control组相比,PDGF-BB刺激后细胞质中FGF9的荧光信号减弱($P<0.001$);细胞核蛋白Western blot结果显示,与Control组相比,PDGF-BB刺激后细胞核中FGF9无明显改变,差异无统计学意义,提示PDGF-BB可以显著降低FGF9的表达但并不明显诱导FGF9向细胞核

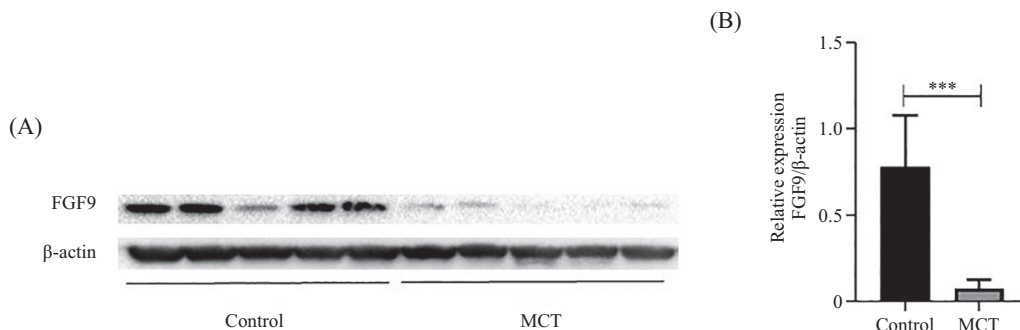


A: 正常Control组大鼠肺动脉,箭头所示正常Control组肺动脉无明显重构; B: MCT诱导的肺动脉高压大鼠肺动脉,箭头所示MCT-PAH组肺动脉发生明显重构。

A: pulmonary artery of rats in the normal Control group, there was no increase of the thickness of pulmonary arterial wall in the normal Control shown by the arrow; B: pulmonary artery in rats with pulmonary hypertension induced by MCT, the increase of the thickness of pulmonary arterial wall in the MCT-PAH can be observed shown by the arrow.

图1 肺组织HE染色

Fig.1 HE staining of lung tissue



A、B: Western blot 检测到MCT-PAH中FGF9蛋白表达降低。 $n=5$; *** $P<0.001$ 。

A,B: the expression of FGF9 reduced in MCT-PAH by Western blot. $n=5$; *** $P<0.001$ 。

图2 肺组织中FGF9蛋白的表达变化

Fig.2 Change of FGF9 protein expression in lung tissue

转移(图3C~图3F)。

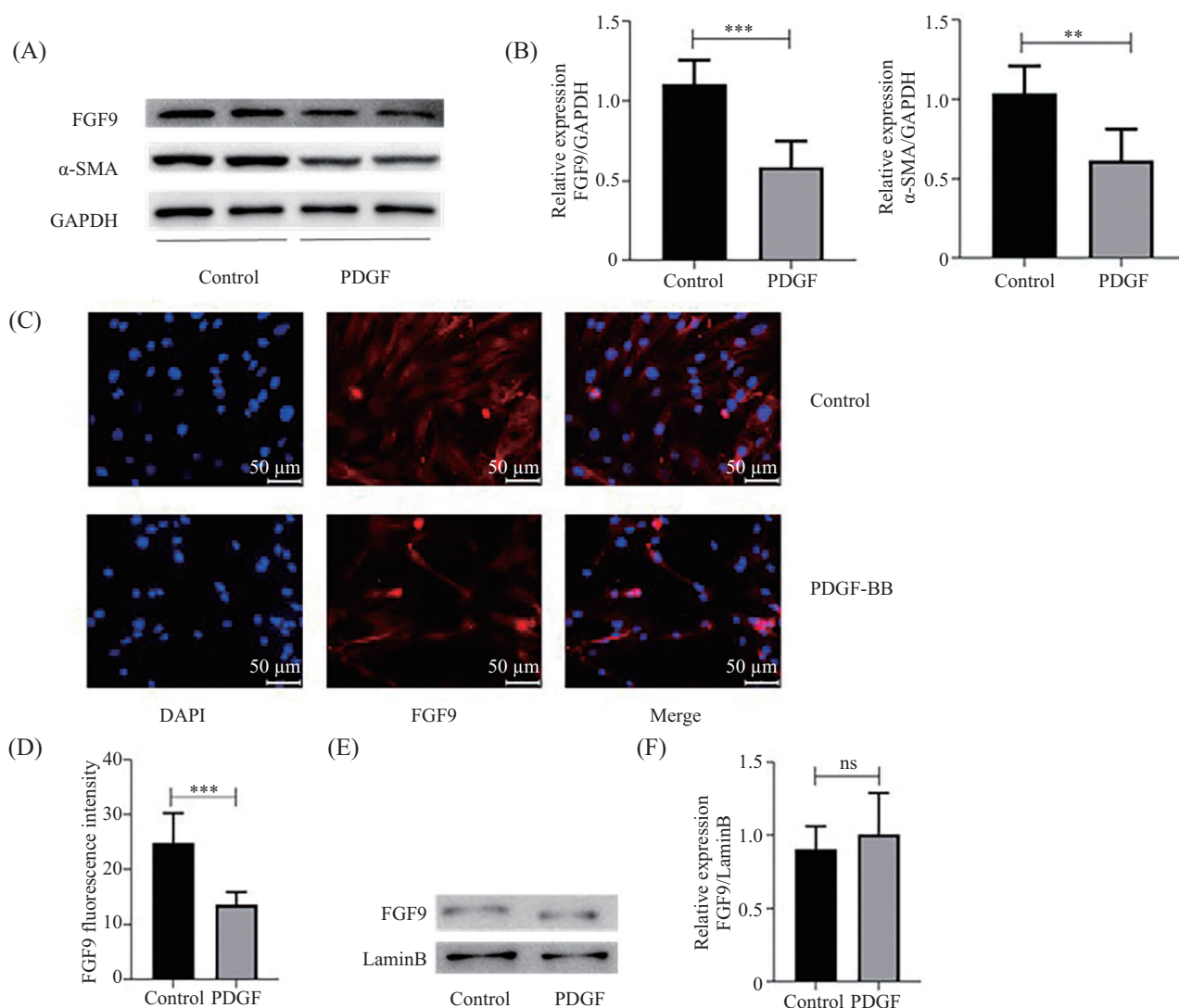
2.4 rhFGF9 抑制PDGF-BB诱导的肺动脉平滑肌细胞表型转化

我们进一步研究了FGF9对肺动脉平滑肌细胞表型的影响, rhFGF9干预PASCs后检测细胞收缩表型标志物 α -SMA和合成表型标志物OPN的变化。Western blot结果显示, 与Control组相比, PDGF-BB组的 α -SMA表达明显降低($P<0.01$), OPN的表达显著上升($P<0.01$); rhFGF9组的 α -SMA与OPN的表达无明显变化; 与PDGF-BB组相比, PDGF-

BB+rhFGF9组的 α -SMA的表达显著上升($P<0.05$), OPN的表达明显下降($P<0.05$)(图4A和图4B)。

2.5 rhFGF9不影响PDGF-BB激活PDGFR- β 受体

本实验中我们已经证实 rhFGF9抑制 PDGF-BB 诱导的 PASCs 表型转化, 那么 rhFGF9 是否与 PDGFR- β 有关, 我们接下来探讨了 rhFGF9 对 PDGFR- β 的影响。Western blot 结果显示, 与 Control 组相比, PDGF-BB 组的 PDGFR- β 的表达水平降低($P<0.001$), rhFGF9 组的 PDGFR- β 的表达无明显改变, 差异无统计学意义; 与 PDGF-BB 组相比, PDGF-

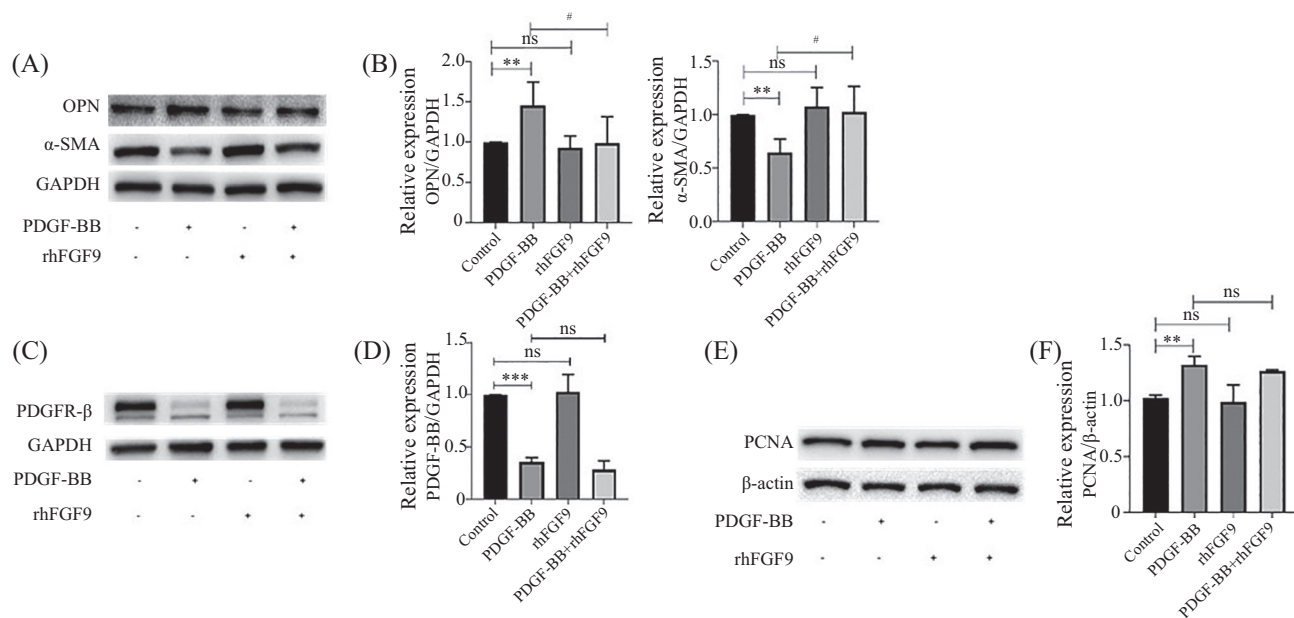


A, B: Western blot检测到PDGF-BB干预细胞后FGF9和 α -SMA蛋白表达降低; C, D: 免疫荧光检测到PDGF-BB干预细胞后FGF9荧光信号减弱; E, F: Western blot检测到PDGF-BB干预细胞后, 细胞核中FGF9蛋白表达无显著改变。n=4; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns $P>0.05$ 。

A,B: the expression of FGF9 and α -SMA reduced after treated with PDGF-BB by Western blot; C,D: the fluorescence intensity of FGF9 was faded after treated with PDGF-BB, as assessed by immunofluorescence staining; E,F: the expression of FGF9 in the nucleus was not correlated with the PDGF-BB by Western blot. n=4; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns $P>0.05$ 。

图3 Western blot和免疫荧光检测PASCs中FGF9与 α -SMA的表达

Fig.3 The expression of FGF9 and α -SMA in PASCs was detected by Western blot and immunofluorescence



A、B: Western blot检测到PDGF-BB干预细胞后, OPN表达升高而 α -SMA表达降低, rhFGF9抑制PDGF-BB诱导的细胞表型转化; C~F: Western blot检测到rhFGF9不影响PDGFR- β 与PCNA蛋白的表达。n=4; $^{\#}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{ns}P>0.05$ 。

A、B: the expression of OPN increased but α -SMA decreased after treatment with PDGF-BB by Western blot. rhFGF9 inhibited PDGF-BB-induced cell phenotype switch by Western blot; C-F: exogenous rhFGF9 did not affect the expression of PDGFR- β and PCNA by Western blot. n=4; $^{\#}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{ns}P>0.05$ 。

图4 rhFGF9对PSMCs表型与增殖的影响

Fig.4 The effects of rhFGF9 on PSMCs phenotype and proliferation

BB+rhFGF9组的PDGFR- β 的表达无明显改变, 差异无统计学意义。此外, 我们还检测了rhFGF9对PCNA蛋白的影响, Western blot结果显示, 与Control组相比, PDGF-BB组的PCNA的表达水平升高($P<0.01$), rhFGF9组的PCNA的表达无显著改变, 差异无统计学意义; 与PDGF-BB组相比, PDGF-BB+rhFGF9组的PCNA的表达无显著改变, 差异无统计学意义。提示rhFGF9对PDGFR- β 无影响且不抑制PDGF-BB通过其受体促进细胞增殖(图4C~图4F)。

2.6 rhFGF9抑制PDGF-BB诱导的肺动脉平滑肌细胞的迁移

我们进一步研究了rhFGF9对PSMCs迁移能力的影响。与Control组相比, PDGF-BB组细胞迁移能力增加, rhFGF9组细胞的迁移能力无明显改变; 与PDGF-BB组相比, PDGF-BB+rhFGF9组细胞的迁移能力降低(图5)。

2.7 FGF9-siRNA干预细胞, α -SMA表达下调

为了明确FGF9与细胞表型的关系, 我们进行了FGF9-siRNA转染细胞, 然后检测 α -SMA和OPN的变化。Western blot结果显示, 与Control组相比, FGF9-siRNA组细胞中 α -SMA的表达显著降低($P<0.05$), 提

示下调FGF9后可以显著降低 α -SMA的表达; 但细胞中OPN的表达无显著改变, 差异无统计学意义(图6A和图6B)。我们还检测了PCNA蛋白的表达情况, 探究了FGF9与增殖的关系。Western blot结果显示, 与Control组相比, FGF9-siRNA组细胞中PCNA蛋白无显著改变, 差异无统计学意义(图6C和图6D)。

3 讨论

本研究在肺动脉高压动物及肺动脉平滑肌细胞水平检测了FGF9蛋白的表达变化情况, 并证实FGF9参与了肺动脉平滑肌细胞表型的转化。肺血管主要由内皮细胞和平滑肌细胞及成纤维细胞组成, 正常生理状态下, 内皮细胞在血管壁通透性的维持、血管生成、平滑肌细胞的收缩调控等方面发挥作用, 平滑肌细胞主要参与了血管的收缩与舒张, 维持血管血流动力学的稳定^[16]。正常血管壁中的平滑肌细胞呈静止收缩状态, 细胞呈典型的纺锤形态, 细胞质内有许多与细胞长轴平行的肌丝结构, 如 α -SMA、肌球蛋白重链(smooth muscle myosin heavy chain, SMM-HC)等, 参与维持血管的收缩能力。当血管的正常生理状态受到破坏后, 血管平滑肌细胞

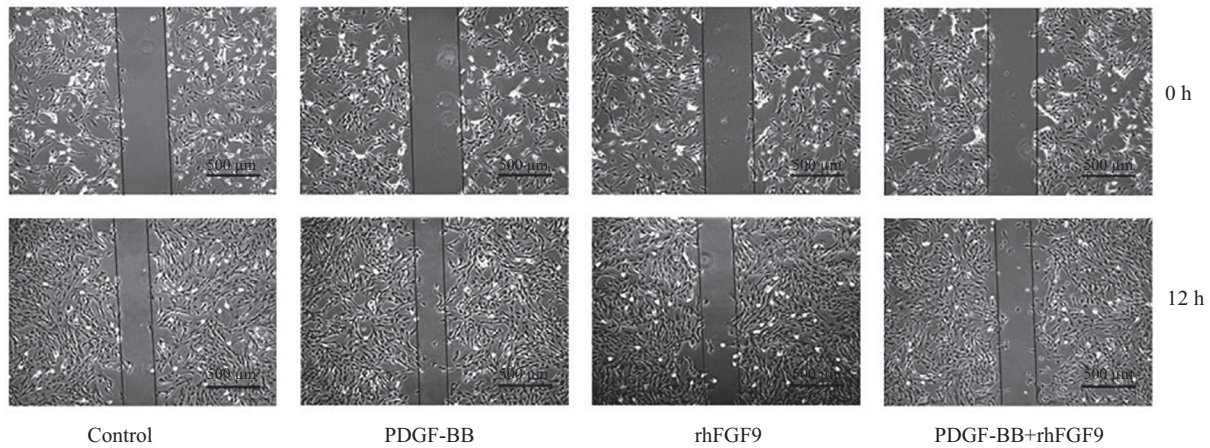
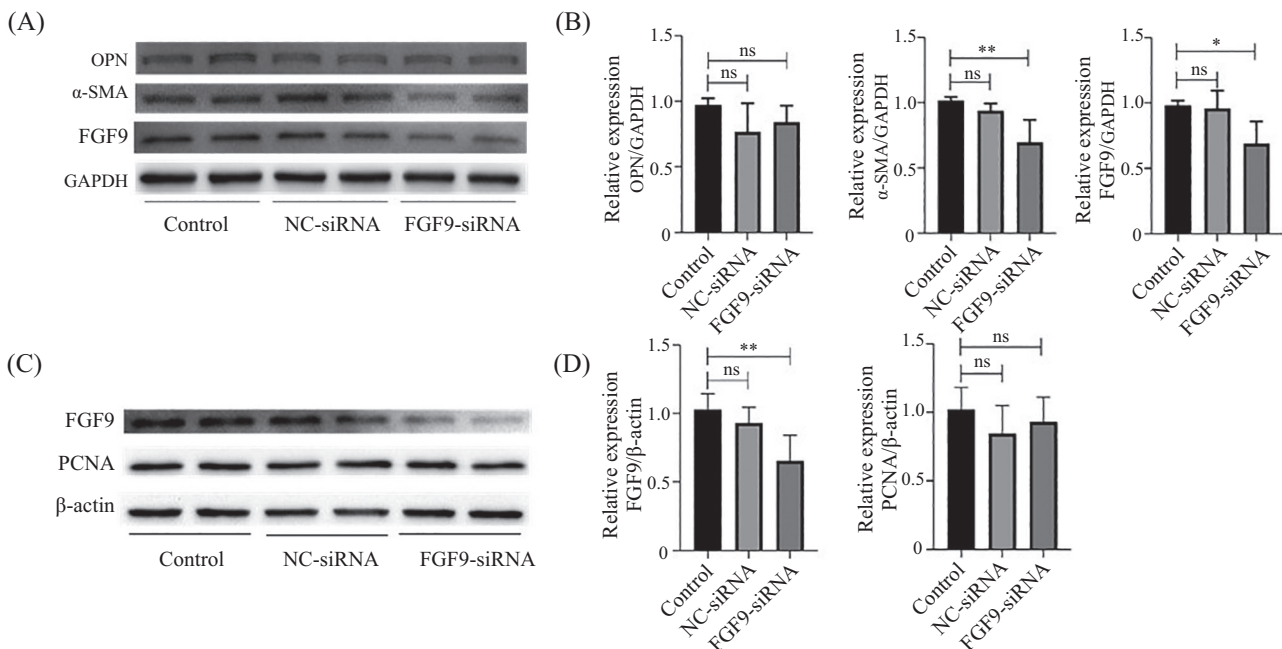


图5 划痕实验检测rhFGF9对PSMCs迁移的影响

Fig.5 The effect of rhFGF9 on PSMCs migration by a wound healing assay



A~D: Western blot结果显示, siRNA敲减 $FGF9$ 后可降低 α -SMA的蛋白水平而不影响OPN与PCNA的表达。 $n=4$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $^{ns}P>0.05$ 。

A~D: Western blot showed that knock-down of $FGF9$ by siRNA reduced α -SMA protein level without affecting the expression of OPN and PCNA. $n=4$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, $^{ns}P>0.05$ 。

图6 FGF9-siRNA对平滑肌细胞表型的影响

Fig.6 The effect of FGF9-siRNA on phenotype of PSMCs

由收缩表型转变成合成表型,表现为收缩表型标志物表达下调而合成表型标志物表达增加,如骨桥蛋白、调宁蛋白等,分泌大量细胞外基质并获得增殖和迁移的能力^[17]。在生理状态下,肺血管具有低阻力和强顺应性,在肺动脉高压中,肺血管阻力增加导致右心功能障碍,病理改变主要为发育成熟的平滑肌细胞由静止的收缩表型向合成表型转化,平滑肌细胞增殖、迁移能力增加,肺血管发生重构导致管腔狭窄。在肺动脉高压的病理因素中,炎症、氧化

应激、遗传等均可导致平滑肌细胞的增殖,从而引起血管重构,远端肺动脉阻力增加,最终导致肺动脉高压形成。

野百合碱诱导的PAH动物模型被广泛认可,大鼠注射MCT后,损伤肺血管,导致PAH和右室肥厚^[18]。血小板衍生生长因子是一种重要的促有丝分裂原,通过受体PDGFR- β 参与了肺动脉平滑肌细胞的表型转化,引起肺动脉平滑肌细胞过度增殖,肺血管增厚^[19]。此外,PDGF-BB刺激PSMCs后可导致炎症小体

NLRC3[nucleotide-oligomerization domain (NOD)-like receptor subfamily C3]的改变进而促进PASMCs的增殖和迁移^[20]。在QUATREDENIERS等^[21]的研究中, PDGF-BB刺激肺动脉平滑肌细胞后, PDGFR- β 的表达降低, 但磷酸化的PDGFR- β 的表达升高, 进一步激活Src家族激酶的磷酸化而促进肺动脉平滑肌细胞的增殖和迁移。

研究报道在PDGF-BB处理细胞24 h时, PCNA与 α -SMA蛋白的表达变化最为显著, 因此在本实验中, 我们在24 h时检测FGF9的表达情况。PDGF-BB下调FGF9的表达, 为探究FGF9与PDGF-BB的关系, 实验中采用rhFGF9干预细胞, rhFGF9与PDGF-BB同属外源性蛋白, 为减少rhFGF9与PDGF-BB的相互影响, 故采用rhFGF9预处理细胞, 且rhFGF9预处理30 min, 细胞的表型发生明显变化。而在划痕实验中, 细胞培养12 h, 此时能清晰明了地观察到细胞迁移变化, 而细胞培养24 h时, 无法清晰明了地观察到划痕处细胞迁移的变化。无论是MCT诱导的肺动脉高压还是PDGF-BB诱导平滑肌细胞发生表型转化, 实质上都属于炎症反应。FGF9蛋白在肺动脉高压大鼠的肺组织以及PASMCs中表达降低, 我们认为其可能和炎症有关。FGF9作为一种肝素结合因子, 参与了多种生理及病理过程。以往的研究发现, PDGF-BB刺激膀胱平滑肌细胞后, FGF9蛋白表达降低^[22]。在食管炎的研究中, FGF9在食管炎患者中表达增加, 并证实了FGF9参与食管炎的病理过程^[23]。另外一些研究发现, 在神经退行性疾病中, FGF9被认为是一种与氧化应激有关的保护性因素^[12]。在本研究中FGF9的表达降低, 认为其可能是通过负反馈调节参与肺动脉高压的形成, 但是该科学假设还需进一步实验证明。本实验中rhFGF9对细胞的表型无明显影响, 认为rhFGF9可能是维持平滑肌细胞收缩表型的蛋白, 当平滑肌细胞处于收缩表型时, rhFGF9对收缩状态的平滑肌细胞无明显影响, 只有当细胞表型发生改变后, rhFGF9才会发挥作用。在PDGF-BB激活的PDGFR- β 信号通路中, rhFGF9不抑制PDGF-BB对其受体PDGFR- β 的改变, 且rhFGF9不抑制PDGF-BB促进细胞的增殖作用, 提示rhFGF9不抑制PDGF-BB/PDGFR- β 诱导的细胞增殖, 而FGF9对PASMCs表型的影响可能与其他信号通路激活有关。研究中PDGF-BB刺激PASMCs后, PDGFR- β 的表达下调, 可能与PDGFR- β 的磷酸化增加有关。

除此之外, 我们还通过siRNA抑制FGF9实验证实FGF9与平滑肌细胞表型有关, 最终结果也支持FGF9参与了肺动脉高压表型的转化。在筛选siRNA序列时, 发现siRNA干扰细胞48 h, FGF9蛋白显著下调, 故此时检测细胞表型标志物与PCNA蛋白。siRNA结果显示, α -SMA的表达降低而OPN的表达无明显改变, 我们认为siRNA干扰细胞48 h后, FGF9蛋白水平开始发生改变, 此时FGF9的改变还不足以彻底改变细胞表型, 并且FGF9影响细胞表型需要激活一系列细胞因子后才能引起表型发生改变, α -SMA作为细胞收缩表型比较灵敏的标志物, 当平滑肌细胞从收缩表型向合成表型转化时, 收缩表型标志物 α -SMA首先发生改变, 当 α -SMA减少到一定程度, 细胞的合成表型标志物才发生改变。在之前的研究结果中, microRNA-182通过FGF9/PDGFR- β 抑制主动脉平滑肌细胞表型转化, 而我们的研究结果与之相反, 除了可能与平滑肌细胞的来源不同和不同的病理状态有关外, 还可能与FGF9的抗氧化有关, 这需要进一步实验证明。

本研究首次证明, FGF9抑制大鼠肺动脉平滑肌细胞由静止的收缩表型向合成表型的转化, 提示FGF9可能在肺动脉高压中具有潜在治疗作用, 但仍需在肺高压动物上进行验证, 并探讨其具体的作用机制及信号通路。

参考文献 (References)

- [1] GALIÈ N, HUMBERT M, VACHIER Y L, et al. 2015 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the joint task force for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) [J]. Eur Heart J, 2016, 37(1): 67-119.
- [2] FAYED H, COGHLAN J G. Pulmonary hypertension associated with connective tissue disease [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2019, 40(2): 173-83.
- [3] FUKUDA K, DATE H, DOI S, et al. Guidelines for the treatment of pulmonary hypertension (JCS 2017/JCPHS 2017) [J]. Circ J, 2019, 83(4): 842-945.
- [4] DUNLAP B, WEYER G. Pulmonary hypertension: diagnosis and treatment [J]. Am Fam Physician, 2016, 94(6): 463-9.
- [5] FRONTINI M J, NONG Z, GROS R, et al. Fibroblast growth factor 9 delivery during angiogenesis produces durable, vasoreponsive microvessels wrapped by smooth muscle cells [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(5): 421-7.
- [6] WANG J, LIU S, LI J, et al. The role of the fibroblast growth

- factor family in bone-related diseases [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2019, 94(4): 1740-9.
- [7] CAI J, WEN R, LI W, et al. Oil body bound oleosin-rhFGF9 fusion protein expressed in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) stimulates hair growth and wound healing in mice [J]. *BMC Biotechnol*, 2018, 18(1): 51.
- [8] LIANG Z, XU J, MA Z, et al. MiR-187 suppresses non-small-cell lung cancer cell proliferation by targeting FGF9 [J]. *Bioengineered*, 2020, 11(1): 70-80.
- [9] WU S, XU R, ZHU X, et al. The long noncoding RNA LINC01140/miR-140-5p/FGF9 axis modulates bladder cancer cell aggressiveness and macrophage M2 polarization [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(24): 25845-64.
- [10] PAUR J, VALLER M, SIENEL R, et al. Interaction of FGF9 with FGFR3-IIIb/IIIc, a putative driver of growth and aggressive behaviour of hepatocellular carcinoma [J]. *Liver Int*, 2020, 40(9): 2279-90.
- [11] LI L, ZHANG C, LI Y, et al. DJ-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition via enhancing FGF9 expression in colorectal cancer [J]. *Biol Open*, 2020, doi: 10.1242/bio.051680.
- [12] YUSUF I O, CHEN H M, CHENG P H, et al. FGF9 induces neurite outgrowth upon ERK signaling in knock-in striatal Huntington's disease cells [J]. *Life Sci*, 2020, 267: 118952.
- [13] SUN J, WANG Z, SHI H, et al. LncRNA FAF inhibits fibrosis induced by angiotensinogen II via the TGF β 1-P-Smad2/3 signalling by targeting FGF9 in cardiac fibroblasts [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(3): 814-20.
- [14] SUN C, FUKUI H, HARA K, et al. FGF9 from cancer-associated fibroblasts is a possible mediator of invasion and anti-apoptosis of gastric cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 333.
- [15] DONG N, WANG W, TIAN J, et al. MicroRNA-182 prevents vascular smooth muscle cell dedifferentiation via FGF9/PDGFR β signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(4): 791-8.
- [16] MARTÍN-BÓRNEZ M, GALEANO-OTERO I, DEL TORO R, et al. TRPC and TRPV channels' role in vascular remodeling and disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, doi: 10.3390/ijms21176125.
- [17] SAKAMOTO K, MURATA T, CHUMA H, et al. Fluvastatin prevents vascular hyperplasia by inhibiting phenotype modulation and proliferation through extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 and p38 mitogen-activated protein kinase inactivation in organ-cultured artery [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(2): 327-33.
- [18] 丘水林, 黄石安. 野百合碱诱导肺动脉高压动物模型机制研究[J]. *中国医学创新*(QIU S L, HUANG S A. Research on the mechanism of monocrotaline induced pulmonary hypertension in an animal model [J]. *Medical Innovation of China*), 2016, 13(17): 142-5.
- [19] FREDRIKSSON L, LI H, ERIKSSON U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(4): 197-204.
- [20] ZHA L H, ZHOU J, LI T Z, et al. NLRC3 inhibits MCT-induced pulmonary hypertension in rats via attenuating PI3K activation [J]. *J Cell Physiol*, 2019, doi: 10.1002/jcp.28255.
- [21] QUATREDENIERS M, NAKHLEH M K, DUMAS S J, et al. Functional interaction between PDGF β and GluN2B-containing NMDA receptors in smooth muscle cell proliferation and migration in pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316(3): L445-55.
- [22] LIFCHEZ S D, SANGER J R, GODAT D M, et al. The serratus anterior subslip: anatomy and implications for facial and hand reanimation [J]. *Plast Reconstr Surg*, 2004, 114(5): 1068-76.
- [23] MULDER D J, PACHECO I, HURLBUT D J, et al. FGF9-induced proliferative response to eosinophilic inflammation in oesophagitis [J]. *Gut*, 2009, 58(2): 166-73.