

氯化钴诱导低氧与气体低氧对大鼠原代肺动脉平滑肌细胞增殖作用的比较研究

胡月迪¹ 朱洁^{1,2,3*} 张璐² 王小乐² 童佳兵^{2,3,4} 成伟业¹ 李泽庚^{2,3}

(¹安徽中医药大学中西医结合学院, 合肥 230012; ²安徽省中医药科学院中医呼吸病防治研究所, 合肥 230031;

³新安医学教育部重点实验室, 合肥 230012; ⁴安徽中医药大学第一附属医院, 合肥 230031)

摘要 该研究比较了氯化钴(cobalt chloride, CoCl₂)诱导低氧与气体低氧对大鼠原代肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs)增殖及氧化应激的影响。采用不同剂量(25 μmol/L、50 μmol/L、100 μmol/L、200 μmol/L、400 μmol/L) CoCl₂诱导细胞或将细胞置于低氧培养箱中,通过MTT、CCK-8和EdU检测比较CoCl₂诱导低氧与气体低氧对大鼠原代PSMCs增殖的影响,并通过Western blot、流式细胞术比较CoCl₂诱导低氧与气体低氧对低氧敏感蛋白低氧诱导因子1α(hypoxia inducible factor-1α, HIF-1α)表达量和细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量的影响。结果显示,CoCl₂或气体低氧刺激细胞24 h均可增加PSMCs增殖活力、HIF-1α蛋白表达量和ROS含量。气体低氧下PSMCs增殖活力显著高于低(25 μmol/L)、中(200 μmol/L)、高(400 μmol/L)剂量CoCl₂组,且HIF-1α蛋白表达、ROS含量显著上调。中剂量CoCl₂诱导的PSMCs增殖活力、ROS含量显著高于低、高剂量组;随着CoCl₂剂量增加,HIF-1α蛋白表达量增加。结果表明,CoCl₂能一定程度诱导低氧,引起细胞内氧化应激,促进大鼠原代PSMCs增殖,并呈一定的剂量、时间依赖性,但其增殖效应不及气体低氧。

关键词 氯化钴; 低氧; 肺动脉平滑肌细胞; 增殖

Comparative Study on Effects of Hypoxia Induced by Cobalt Chloride and Gas Hypoxia on Proliferation of Rat Primary Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells

HU Yuedi¹, ZHU Jie^{1,2,3*}, ZHANG Lu², WANG Xiaole², TONG Jiabing^{2,3,4}, CHENG Weiye¹, LI Zegeng^{2,3}

(¹School of Integrated Chinese and Western Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

²Institute of Traditional Chinese Medicine Prevention and Control on Respiratory Disease, Anhui Academy of Chinese Medicine, Hefei 230031, China; ³Key Laboratory of Xin'An Medicine, Ministry of Education, Hefei 230012, China;

⁴First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

Abstract The purpose of this study was to compare the effects of CoCl₂ (cobalt chloride) and gas hypoxia on proliferation and oxidative stress of rat primary PSMCs (pulmonary artery smooth muscle cells). PSMCs were stimulated by different concentrations of CoCl₂ (25 μmol/L, 50 μmol/L, 100 μmol/L, 200 μmol/L, 400 μmol/L), or

收稿日期: 2021-10-01 接受日期: 2021-11-29

国家自然科学基金(批准号: 81974569)、国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点支持项目(批准号: U20A20398)、中国博士后基金面上资助项目(批准号: 2018M640345)和安徽中医药大学校级科学研究基金(批准号: 2020zrzd08)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15905691917, E-mail: janezhutcm@foxmail.com

Received: October 1, 2021 Accepted: November 29, 2021

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81974569), the National Natural Science Foundation of China, Joint Fund for Regional Innovation and Development (Grant No.U20A20398), the China Postdoctoral Science Foundation (Grant No.2018M640345), and the Study Foundation of Anhui University of Chinese Medicine (Grant No.2020zrzd08)

*Corresponding author. Tel: +86-15905691917, E-mail: janezhutcm@foxmail.com

were placed in a hypoxic incubator. The effects of CoCl_2 and gas hypoxia on the proliferation of PASMCs were compared by MTT assay, CCK-8 assay, and EdU assay. Under CoCl_2 or gas hypoxia, the expression of hypoxic sensitive protein HIF-1 α (hypoxia inducible factor-1 α) and intracellular ROS (reactive oxygen species) were detected by Western blot and Flow cytometry. The results showed that the cell proliferation, expression of HIF-1 α and ROS increased in PASMCs stimulated by CoCl_2 or gas hypoxia for 24 h. Compared with low (25 $\mu\text{mol/L}$), medium (200 $\mu\text{mol/L}$), and high (400 $\mu\text{mol/L}$) concentrations of CoCl_2 groups, the cell proliferation, the expression of HIF-1 α protein, and intracellular ROS content were markedly augmented under gas hypoxia. Compared with low and high concentrations of CoCl_2 groups, medium concentration group could significantly upregulate the cell proliferation and intracellular ROS content; CoCl_2 could increase the protein expression of HIF-1 α in a concentration-dependent manner. The results indicate that CoCl_2 can induce hypoxia to a certain extent, facilitate intracellular oxidative stress, and promote the cell proliferation of primary PASMCs in a dose and time-dependent manner. Additionally, the proliferation effect of CoCl_2 is weaker than gas hypoxia.

Keywords cobalt chloride; hypoxia; pulmonary artery smooth muscle cells; proliferation

肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH)是一种以肺血管阻力升高、肺血管重构为特征的临床综合征^[1]。低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)是PH中最常见的类型之一,低氧是其直接诱导因素^[2]。低氧诱导细胞内缺氧诱导因子(hypoxia inducible factors, HIFs)表达量增加,引起氧化应激,进而导致肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCs)增殖等病理性改变^[3-4]。因此,可控的低氧环境是体外实验研究PH分子机制的重要条件。

目前,低氧培养箱是细胞低氧培养的常见方法。由于低氧培养箱价格昂贵、消耗氮气量大等因素,国内外学者亦有采用化合物构建细胞所需的低氧条件,其中,氯化钴(cobalt chloride, CoCl_2)是一种最为常用的缺氧模拟物,其被证实可诱导人PASMCs的增殖,但 CoCl_2 并不能使空气中氧气减少,且作用于不同的研究对象所发挥的作用也有较大差异^[5-7]。本研究拟用 CoCl_2 和气体低氧刺激PASMCs,以比较两种低氧方式对PASMCs增殖和氧化应激效应的影响,探讨不同低氧方式存在效应差异的可能原因,为PH体外实验低氧方式的选择提供一些思路 and 参考。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂

SD雄性大鼠,体质量约为120 g,购自山东省实验动物中心(动物许可证号SCXK(鲁)20190003); $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 购自美国Sigma-Aldrich公司;MTT[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium

bromide]溶液购自合肥臻沃生物医药科技有限公司;CCK-8(Cell Counting Kit-8)试剂盒购自美国AbMole BioScience公司;细胞增殖EdU分析试剂盒(Cell Proliferation EdU Image Kit)购自亚科因(武汉)生物技术有限公司;DAPI染色液、青霉素-链霉素溶液(100 $\times$)、活性氧检测试剂盒均购自碧云天生物技术有限公司;DME/F-12培养基购自美国Hyclone公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司;二甲基亚砷(methyl sulfoxide, DMSO)购自上海润捷化学试剂有限公司;羊抗兔IgG抗体、羊抗鼠IgG抗体、内参GAPDH均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;HIF-1 α 抗体购自美国Proteintech公司。

1.2 PASMCs原代培养

无菌条件下剥离大鼠肺动脉并分离肺动脉中膜平滑肌,组织块培养法培养PASMCs并进行鉴定。采用含20% FBS、1%青霉素-链霉素的DME/F-12培养基进行细胞培养。于细胞培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、21% O_2)中孵育细胞。第3~6代PASMCs用于细胞实验研究。该研究已通过安徽中医药大学伦理委员会审核批准。

1.3 细胞增殖检测

1.3.1 MTT实验 PASMCs按 2×10^5 个/mL的密度接种于96孔板,每组设6个复孔。待细胞生长至70%融合时,无血清同步化培养12 h,用常氧细胞培养箱、低氧细胞培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、3% O_2)、不同剂量 CoCl_2 (25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ 、400 $\mu\text{mol/L}$)处理4 h、6 h、12 h、24 h、48 h。依据MTT溶液说明书,向每孔加100 μL 的5 mg/mL的MTT溶液后继续孵育4 h,每孔加150 μL DMSO,室温水平

缓慢振荡 15 min, 酶标仪于 490 nm 波长处测各孔吸光度(*D*)值。

1.3.2 CCK-8实验 PASCs按 2×10^5 个/mL的密度接种于96孔板, 每组设6个复孔, 观察细胞生长至70%融合时, 无血清同步化培养 12 h, 利用常氧细胞培养箱、低氧细胞培养箱、不同剂量 CoCl_2 处理 24 h。按照CCK-8试剂盒说明书, 每孔加入10 μL 的CCK-8溶液, 继续孵育 1 h, 用酶标仪于450 nm波长处测定各孔吸光度值。

1.3.3 EdU实验 将PASCs按 5×10^5 个/mL密度接种于6孔板的无菌盖玻片上, 待细胞融合度为50%时, 利用常氧细胞培养箱, 低氧细胞培养箱, 低(25 $\mu\text{mol/L}$)、中(200 $\mu\text{mol/L}$)、高(400 $\mu\text{mol/L}$)剂量 CoCl_2 处理 24 h, 加入20 $\mu\text{mol/L}$ 的EdU培养液 37 $^\circ\text{C}$ 孵育细胞 16 h; 依据EdU试剂盒说明书进行细胞固定和透化; 按400 μL /孔标准加入DAPI进行核染色, 荧光显微镜下摄片分析。

1.4 Western blot检测蛋白表达

PASCs接种于25 cm^2 培养瓶中, 利用常氧细胞培养箱, 低氧细胞培养箱, 低、中、高剂量 CoCl_2 处理 24 h后, 收集细胞, 加入RIPA细胞裂解液, 12 000 r/min离心, 收集上清液即为总蛋白, 经蛋白变性、上样、电泳、转膜、一抗(稀释比为1:2 000)4 $^\circ\text{C}$ 孵育、二抗(稀释比为1:20 000)室温孵育后, 用ECL法检测HIF-1 α 的表

达。使用ImageJ分析蛋白灰度值, 并进行统计分析。

1.5 细胞内ROS含量检测

收集常氧细胞培养箱, 低氧细胞培养箱, 低、中、高剂量 CoCl_2 各组细胞并调整细胞浓度至 5×10^6 个/mL。转染探针: 加入10 $\mu\text{mol/L}$ 的DCFH-DA, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育20 min, 每隔5 min混匀一次; PBS清洗细胞两次, 去除未进入细胞内的DCFH-DA; 流式细胞仪检测ROS含量。

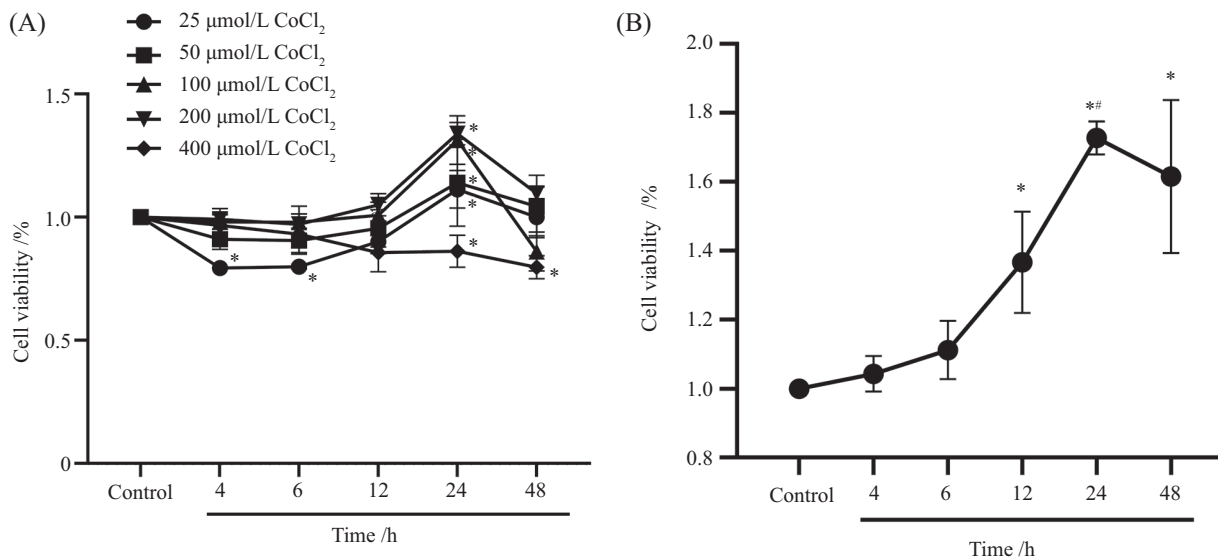
1.6 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0.2及SPSS 26.0软件进行数据分析, 计量资料采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$), 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD-*t*检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CoCl_2 、气体低氧对PASCs增殖活力的影响

2.1.1 不同剂量 CoCl_2 、气体低氧处理PASCs不同时间后的细胞活力存在差异 400 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 诱导PASCs 24 h(0.861 ± 0.065)、48 h(0.797 ± 0.047)后的细胞活力, 以及25 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 诱导PASCs 4 h(0.793 ± 0.012)、6 h(0.799 ± 0.010)后的细胞活力均低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图1A); 25 $\mu\text{mol/L}$ (1.113 ± 0.076)、50 $\mu\text{mol/L}$ (1.140 ± 0.177)、



A: PASCs在经25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ 、200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 处理24 h后增殖明显增强; B: 气体低氧诱导PASCs 24 h具有最佳增殖效应。* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与低氧组其他时间相比。

A: PASCs proliferation is significantly enhanced after treatment with 25 $\mu\text{mol/L}$, 50 $\mu\text{mol/L}$, 100 $\mu\text{mol/L}$, 200 $\mu\text{mol/L}$ concentrations of CoCl_2 for 24 h; B: gas hypoxia induced PASCs for 24 h has the best proliferation effect. * $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with other times of hypoxia groups.

图1 不同剂量 CoCl_2 、气体低氧诱导PASCs 4 h、6 h、12 h、24 h、48 h后的细胞活力

Fig.1 The cell viability of PASCs induced by different concentrations of CoCl_2 or gas hypoxia for 4 h, 6 h, 12 h, 24 h, and 48 h

100 $\mu\text{mol/L}$ (1.313 ± 0.098)、200 $\mu\text{mol/L}$ (1.339 ± 0.045) CoCl_2 诱导 PSMCs 24 h 后的细胞活力均高于对照组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图1A); 气体低氧诱导 PSMCs 12 h (1.366 ± 0.147)、24 h (1.727 ± 0.048) 及 48 h (1.616 ± 0.222) 后的细胞活力均高于对照组, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图1B); 气体低氧诱导 PSMCs 24 h (1.727 ± 0.048) 后的细胞活力明显高于其他时间组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图1B)。这些说明 24 h 是 CoCl_2 或气体低氧最佳的增殖诱导时间。

2.1.2 不同剂量 CoCl_2 、气体低氧诱导 PSMCs 24 h 后的细胞活力存在差异 用气体低氧 (1.757 ± 0.222)、100 $\mu\text{mol/L}$ (1.248 ± 0.182) 和 200 $\mu\text{mol/L}$ (1.291 ± 0.182) CoCl_2 作用 PSMCs 24 h 后的细胞活力高于对照组, 200 $\mu\text{mol/L}$ 组的细胞活力高于 25 $\mu\text{mol/L}$ 组 (1.054 ± 0.035)、50 $\mu\text{mol/L}$ 组 (1.133 ± 0.106)、100 $\mu\text{mol/L}$ 组 (1.248 ± 0.182) 和 400 $\mu\text{mol/L}$ 组 (0.946 ± 0.072), 低氧组的细胞活力高于 200 $\mu\text{mol/L}$ 组, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图2)。说明相较于其他剂量, 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 诱导的 PSMCs 具有最佳增殖效应; 相较于 200 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组, 气体低氧具有更佳增殖效应。

2.1.3 不同剂量 CoCl_2 、气体低氧诱导 PSMCs 24 h 的增殖存在差异 气体低氧诱导 PSMCs

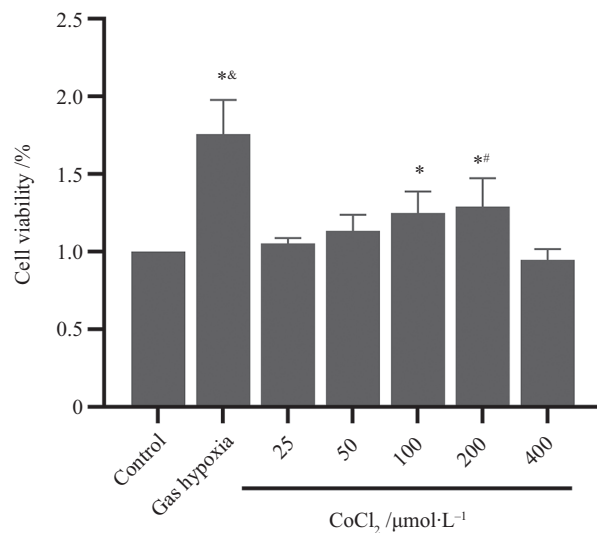
24 h 后的 EdU 相对阳性细胞数 (1.068 ± 0.072) 多于不同剂量 CoCl_2 组, 中剂量 CoCl_2 组的 EdU 相对阳性细胞数 (0.989 ± 0.019) 多于低 (0.948 ± 0.071)、高 (0.563 ± 0.133) 剂量 CoCl_2 组, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图3)。这说明在诱导 PSMCs 增殖效应上, CoCl_2 不及气体低氧, 低、高剂量 CoCl_2 不及中剂量 CoCl_2 。

2.2 不同剂量 CoCl_2 、气体低氧对 PSMCs 中 HIF-1 α 蛋白表达的影响

不同剂量 CoCl_2 、低氧组 HIF-1 α 蛋白表达量均高于对照组, 低氧组 HIF-1 α 蛋白表达量 (0.661 ± 0.092) 高于 25 $\mu\text{mol/L}$ (0.330 ± 0.063)、200 $\mu\text{mol/L}$ (0.422 ± 0.035)、400 $\mu\text{mol/L}$ (0.526 ± 0.091) CoCl_2 组, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$, 图4)。这说明不同剂量 CoCl_2 、气体低氧均能促进 PSMCs 中 HIF-1 α 蛋白表达, 且气体低氧具有更强的促 HIF-1 α 蛋白表达的效应。

2.3 不同剂量 CoCl_2 、气体低氧对 PSMCs 中 ROS 水平的影响

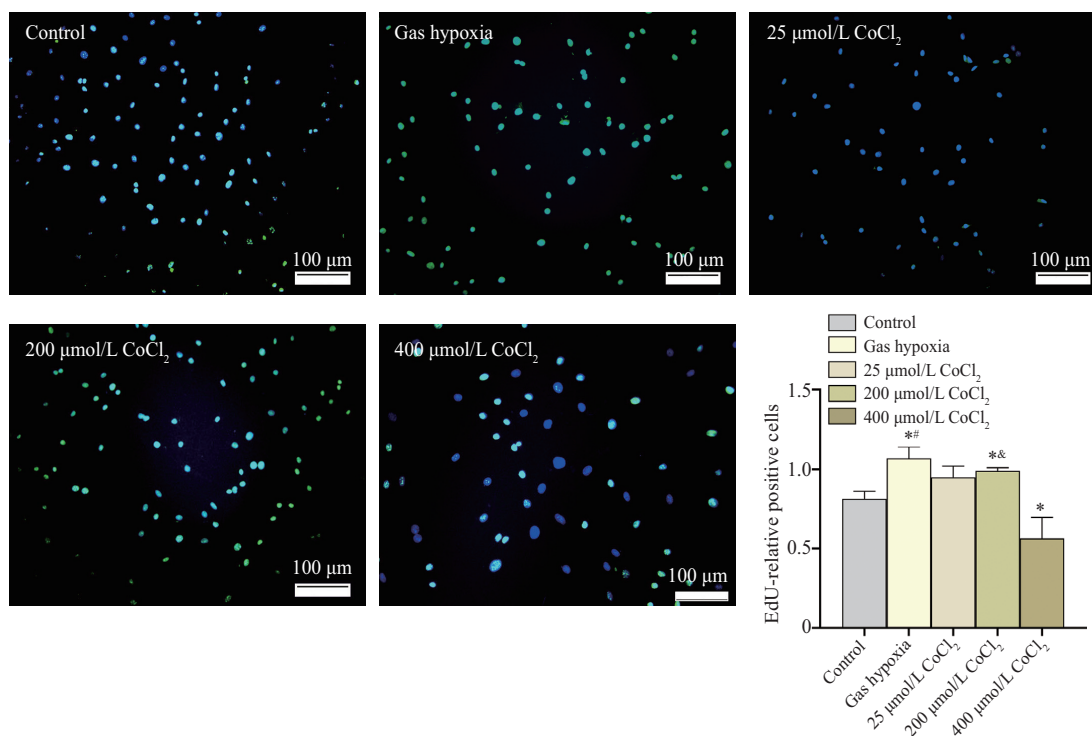
不同剂量 CoCl_2 、气体低氧诱导 PSMCs 24 h 后的 ROS 含量均高于对照组, 低氧组 ROS 的含量 ($116.520.300 \pm 1.150.994$) 高于不同剂量 CoCl_2 组, 中剂量 CoCl_2 组 ROS 含量 ($29.816.67 \pm 1.414.302$) 高于低剂量 CoCl_2 组 ($13.944.000 \pm 490.562$)、高剂量 CoCl_2 组 ($26.108.33 \pm 1.540.819$), 差异均具有统计



气体低氧诱导 PSMCs 24 h 具有最佳增殖效应; $*P < 0.05$, 与对照组相比, $^{\#}P < 0.05$, 与 CoCl_2 其他剂量组相比; $^{\&}P < 0.05$, 与 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 组相比。Hypoxia induced PSMCs for 24 h has the best proliferation effect; $*P < 0.05$ compared with control group; $^{\#}P < 0.05$ compared with other concentrations of CoCl_2 groups; $^{\&}P < 0.05$ compared with 200 $\mu\text{mol/L}$ CoCl_2 group.

图2 不同剂量 CoCl_2 、气体低氧诱导 PSMCs 24 h 后的细胞活力

Fig.2 The cell viability of PSMCs induced by different concentrations of CoCl_2 or gas hypoxia for 24 h

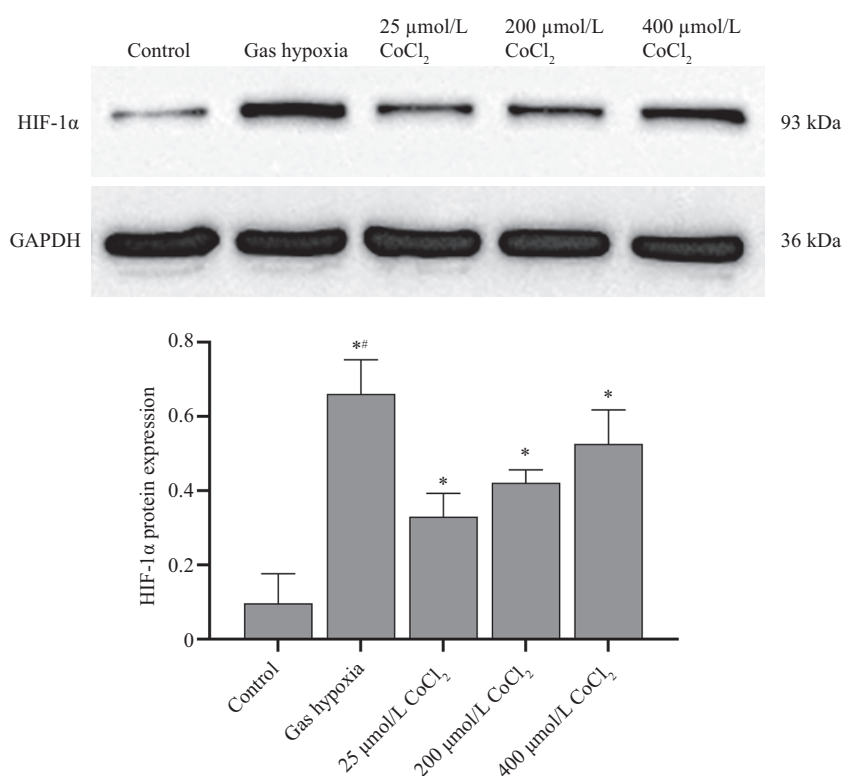


* $P < 0.05$, 与对照组比; [#] $P < 0.05$, 与不同剂量组相比; [&] $P < 0.05$, 与CoCl₂低、高剂量组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; [#] $P < 0.05$ compared with different concentrations of CoCl₂ groups; [&] $P < 0.05$ compared with low and high concentrations of CoCl₂ groups.

图3 不同剂量CoCl₂、气体低氧诱导PSMCs 24 h后的细胞增殖情况

Fig.3 The cell proliferation of PSMCs induced by different concentrations of CoCl₂ or gas hypoxia for 24 h

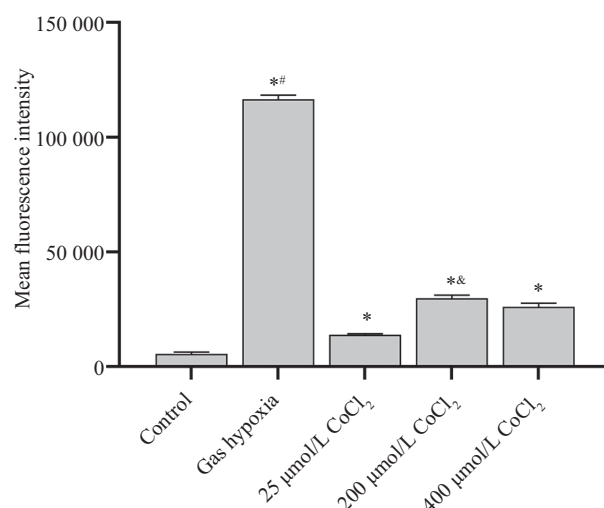


* $P < 0.05$, 与对照组相比; [#] $P < 0.05$, 与不同剂量组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; [#] $P < 0.05$ compared with different concentrations of CoCl₂ groups.

图4 不同剂量CoCl₂、气体低氧诱导PSMCs 24 h后的HIF-1α蛋白表达情况

Fig.4 The expression of HIF-1α protein in PSMCs induced by different concentrations of CoCl₂ or gas hypoxia for 24 h



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与低氧组相比; Δ $P < 0.05$, 与CoCl₂低、高剂量组相比。

* $P < 0.05$ compared with control group; # $P < 0.05$ compared with hypoxia group; Δ $P < 0.05$ compared with low and high concentrations of CoCl₂ groups.

图5 不同剂量CoCl₂、气体低氧诱导PASCs 24 h后的细胞内ROS含量

Fig.5 The intracellular ROS content in PASCs was induced by different concentrations of CoCl₂ or gas hypoxia in 24 h

学意义($P < 0.05$, 图5)。这提示不同剂量CoCl₂、气体低氧均能刺激PASCs引起ROS水平升高, 且低氧诱导具有更强的促ROS表达效应, 同时, 在不同剂量CoCl₂的诱导中, 中剂量CoCl₂具有更强的促ROS表达效应。

3 讨论

PASCs增殖所导致的肺血管中膜增厚、重塑是低氧性肺动脉高压重要的发病机制^[8]。在慢性阻塞性肺疾病和低氧性肺动脉高压的体外实验中, 低氧最常见的处理方式低氧细胞培养箱创造的缺氧环境, 然而受制于低氧培养箱的昂贵性、耗气量大和开关箱门所致氧气水平的不可控性等因素, 化学缺氧模拟物被越来越多地应用, CoCl₂即是化学缺氧最常用的化合物之一。从上世纪90年代科研人员行CoCl₂的缺氧研究至今^[9], 在面对不同的研究对象时, CoCl₂模拟的低氧是否与低氧培养箱创造的气体低氧功效一致仍存在争议^[5]。有文献报道, 两种低氧方式在对肺动脉成纤维细胞的增殖、迁移和表型转化的效应上存在差异^[7]。目前, 两种低氧方式在PASCs增殖中的作用是否存在差异鲜有报道。因此, 确定诱导PASCs增殖最佳的体外低氧方式十分必要。

在本研究中, CoCl₂在诱导细胞增殖效应中呈现出剂量和时间依赖性, 这与文献报道基本一致^[10-11]。低剂量(25 μmol/L) CoCl₂作用PASCs 4 h、6 h后的

细胞增殖活力普遍降低, 长时间(24 h、48 h)高剂量(400 μmol/L) CoCl₂的增殖效应也呈现减弱趋势。说明低剂量短时间、高剂量长时间的CoCl₂诱导均不能发挥很好的增殖效应, 甚至会抑制增殖。我们认为这可能是由于低剂量短时间CoCl₂并不足以刺激细胞生长, 而高剂量长时间又会产生细胞毒性作用。据文献报道, 当CoCl₂剂量达到200 μmol/L以上时, 不同的细胞类型会产生不同程度的药理毒性^[6,12]。本实验观察到24 h是CoCl₂模拟低氧和气体低氧最佳的增殖诱导时间。在不同剂量CoCl₂的诱导中, 200 μmol/L具有最佳的增殖效应, 但是CoCl₂并不能完全达到气体低氧诱导产生的增殖效应。为此, 我们进一步探究了CoCl₂和气体低氧产生差异性的可能原因, 即分别观察CoCl₂和气体低氧对PASCs中HIF-1α蛋白表达、ROS含量的影响, 结果发现不同组别中PASCs的HIF-1α蛋白表达、ROS含量变化与增殖效应变化基本一致。

HIFs家族主要包括HIF-1和HIF-2^[5]。HIF-1是与氧气调节密切相关的转录因子, HIF-1的活性主要受HIF-1α水平的影响^[13]。常氧条件下, 脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylases, PHDs)能够维持O₂浓度并促进HIF降解^[14]。气体低氧可以直接使PHDs和HIF抑制因子(factor inhibiting HIF, FIH)失活, 而CoCl₂通过使Co²⁺、Ni²⁺或Mn²⁺替代Fe²⁺, 间接阻断PHDs的表达^[5,15]。两种途径最终都会使HIF-1α聚集并移位至细胞核, 与HIF-1β形成异源二聚体^[3],

刺激包括促红细胞生成素、血管内皮生长因子在内的与缺氧反应元件相关的多个靶基因表达,增加红细胞生成量,促进细胞增殖^[16]。在本研究中,气体低氧下HIF-1 α 蛋白表达量明显高于各剂量CoCl₂组,说明两种低氧方式在低氧效率上存在差异,气体低氧相较于CoCl₂能更加稳定地维持HIF-1 α 的蛋白水平。两种低氧方式在HIF-1 α 蛋白表达上的差异性影响了细胞增殖效应。但是不同剂量CoCl₂诱导的增殖效应的变化与HIF-1 α 蛋白表达变化并不完全一致,我们认为这可能跟HIF-1 α 引起的细胞凋亡有关。有文献报道,HIF-1 α 的过表达会诱导低氧引起的凋亡^[17]。

此外,在低氧诱导的PASMCs过度增殖的分子机制中,ROS是重要的调节因子^[18-19]。低氧使生物体内超氧化物、过氧化氢等ROS因子大量聚集,引起氧化应激,而氧化应激参与包括PASMCs增殖在内的诸多病理发展过程^[20]。此前也有研究报道,作为第二信使的ROS,在缺氧条件下激活与增殖相关的信号通路[如PI3K/AKT(phosphatidylinositol-3-kinases/protein kinase B)、MAPK/ERK/STAT3(mitogen activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase/signal transducers and activators of transcription 3)等],引起PASMCs收缩,诱导增殖^[21-22]。因此,细胞内氧化应激水平决定了PASMCs的增殖效应,与本研究结果相一致。

综上所述,CoCl₂可以在一定程度上诱导低氧,促进PASMCs增殖,但其促增殖能力不及气体诱导的低氧,这可能是由细胞内氧化应激水平的差异性所导致的,然而其具体的作用机制仍有待进一步探索。本研究提示在PASMCs的低氧方式选择中,CoCl₂并不能完全替代气体低氧,同时,CoCl₂在增殖效应中的作用呈现浓度、时间差异性,需根据实验需求摸索合适的剂量和时间。

参考文献 (References)

- [1] ALI M K, ICHIMURA K, SPIEKERKÖETTER E. Promising therapeutic approaches in pulmonary arterial hypertension published online ahead of print [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2021, 59: 127-39.
- [2] YOUNG J M, WILLIAMS D R, THOMPSON A A R. Thin air, thick vessels: historical and current perspectives on hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Front Med*, 2019, 6: 93.
- [3] ARAI M A, SAKURABA K, MAKITA Y, et al. Evaluation of naturally occurring HIF-1 inhibitors for pulmonary arterial hypertension [J]. *Chembiochem*, 2021, 22(18): 2799-804.
- [4] STENMARK K R, FAGAN K A, FRID M G, et al. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms [J]. *Cir Res*, 2006, 99(7): 675-91.
- [5] MUÑOZ-SÁNCHEZ J, CHÁNEZ-CÁRDENAS M E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model [J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(4): 556-70.
- [6] WEI C, LI H Z, WANG Y H, et al. Exogenous spermine inhibits the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells caused by chemically-induced hypoxia via the suppression of the ERK1/2- and PI3K/AKT-associated pathways [J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(1): 39-46.
- [7] 柴晓宇, 许慧莹, 刘钟松, 等. 氯化钴化学模拟低氧与低氧环境对大鼠肺动脉成纤维细胞的作用比较 [J]. *重庆医学* (CHAI X Y, XU H Y, LIU Z H, et al. Effects comparison of chemical hypoxia induced by cobalt chloride and hypoxia environment on rat pulmonary arterial fibroblasts [J]. *Chongqing Medicine*), 2017, 46(21): 2889-91,94.
- [8] BOURGEOIS A, OMURA J, HABBOUT K, et al. Pulmonary arterial hypertension: new pathophysiological insights and emerging therapeutic targets [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2018(104): 9-13.
- [9] MARI H H, JUNG H H, PFEILSCHIFTER J, et al. Hypoxia and cobalt stimulate lactate dehydrogenase (LDH) activity in vascular smooth muscle cells [J]. *Pflugers Arch*, 1994, 429(2): 216-22.
- [10] 唐萍, 陈文培, 陆紫琪, 等. 丹红化瘀口服液含药血清对氯化钴诱导EA.hy926细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. *中成药* (TANG P, CHEN W P, LU Z Q, et al. The protective effect of Dan Hong Hua Yu oral liquid containing serum on cobalt chloride induced hypoxic injury of EA.hy 926 cells [J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*), 2021, 43(3): 760-5.
- [11] 柴晓宇, 许慧莹, 刘钟松, 等. 氯化钴对原代大鼠肺动脉成纤维细胞的影响 [J]. *现代生物医学进展* (CHAI X Y, XU H Y, LIU Z H, et al. Effect of cobalt chloride on pulmonary arterial fibroblasts of rat [J]. *Progress in Modern Biomedicine*), 2017, 17(15): 2801-4.
- [12] SIMONSEN L, HARBAK H, BENNEKOU P. Cobalt metabolism and toxicology—a brief update [J]. *Sci Total Environ*, 2012, 432: 210-5.
- [13] LESTÓN PINILLA L, UGUN-KLUSEK A, RUTELLA S, et al. Hypoxia signaling in parkinson's disease: there is use in asking "What HIF?" [J]. *Biology*, 2021, 10(8): 723.
- [14] CHOUDHRY H, HARRIS A L. Advances in hypoxia-inducible factor biology [J]. *Cell Metab*, 2018, 27(2): 281-98.
- [15] KIM M H, GREEN S D, LIN C C, et al. Engineering tools for regulating hypoxia in tumour models [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(16): 7581-92.
- [16] MACKLIN P S, MCAULIFFE J, PUGH C W, et al. Hypoxia and HIF pathway in cancer and the placenta [J]. *Placenta*, 2017, 56: 8-13.
- [17] KRICK S, EUL B G, HÄNZE J, et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 32(5): 395-403.
- [18] DANEVA Z, LAUBACH V E, SONKUSARE S K. Novel regulators and targets of redox signaling in pulmonary vasculature [J]. *Curr Opin Physiol*, 2019, 9: 87-93.

- [19] PRASAD K. AGE-RAGE stress in the pathophysiology of pulmonary hypertension and its treatment [J]. *Int J Angiol*. 2019, 28(2): 71-9.
- [20] ADAV V R, SONG T, MEI L, et al. PLC γ 1-PKC ϵ -IP3R1 signaling plays an important role in hypoxia-induced calcium response in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(5): L724-35.
- [21] ALDOSARI S, AWAD M, HARRINGTON E O, et al. Subcellular reactive oxygen species (ROS) in cardiovascular pathophysiology [J]. *Antioxidants*, 2018, 7(1): 14.
- [22] JIN H, LIU M, ZHANG X, et al. Grape seed procyanidin extract attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting oxidative stress and pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation [J]. *J Nutr Biochem*, 2016, 36: 81-8.