

· 实验研究 ·

环氧二十碳三烯酸、5-羟色胺与缝隙连接蛋白在慢性缺氧性肺动脉高压形成中的作用

宋新婷 尹宁

【摘要】 目的 探讨环氧二十碳三烯酸(EET)、5-羟色胺(5-HT)、缝隙连接蛋白 40(Cx40)和 43(Cx43)在慢性缺氧性肺血管收缩所致肺动脉高压中的作用。**方法** 选择 SPF 级 BALB/c 小鼠 40 只,8 周龄,体重 25~29 g。实验一:采用随机数字表法将小鼠分为两组:对照组(O 组, $n=8$)和慢性缺氧模型组(H 组, $n=32$)。所有小鼠正常饮食, O 组在正常环境喂养 4 周, H 组予低氧舱(每天吸入 10% 氧气 10 h)喂养 4 周后, 监测 MAP 和平均肺动脉压(mPAP)。随后处死小鼠, 取心肺组织称量并计算右心室肥厚指数。实验二: O 组和 H 组于显微操作下用胶原酶消化法分离远端肺小动脉血管, 采用荧光免疫组化法鉴定肺动脉内皮细胞(PAEC)和肺动脉平滑肌细胞(PASMC)。采用随机数字表法将 H 组分离得 PAEC 和 PASMC 进一步分为三组: 缺氧+si-Cx40 组(H40 组)、缺氧+si-Cx43 组(H43 组)和缺氧+无义 siRNA 组(HN 组), H40 组和 H43 组 PAEC 和 PASMC 分别接受 Cx40 基因和 Cx43 基因的特异性 siRNA 脂质体 siPORTNeoFX 转染, HN 组接受无义 siRNA 转染。所有细胞在 10% 氧气条件下进行传代培养。采用 qPCR 检测 Cx40 和 Cx43 mRNA 表达量, MTT 实验检测细胞增殖情况, ELISA 法检测 EET 和 5-HT 浓度, 免疫组织化学法检测 PASMC 中 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、平滑肌蛋白-22 α (SM22 α)和 2r 骨形态发生蛋白(BMP2r)含量。**结果** 实验一: H 组 MAP、mPAP 和右心室肥厚指数均明显高于 O 组($P<0.05$)。实验二: 与 HN 组比较, H40 组 PAEC 和 PASMC 中 Cx40 mRNA 表达量明显降低($P<0.05$); H43 组 PAEC 和 PASMC 中 Cx43 mRNA 表达量明显降低($P<0.05$); H43 组和 H40 组 PAEC 中 EET 浓度明显升高($P<0.05$), PASMC 中 EET 和 5-HT 浓度、 α -SMA 和 SM22 α 含量明显降低($P<0.05$), PASMC 中 BMP2r 含量明显升高($P<0.05$)。与 H40 组比较, H43 组 PAEC 中 EET 浓度明显升高($P<0.05$), PASMC 中 EET 和 5-HT 浓度、 α -SMA 和 SM22 α 含量明显降低($P<0.05$), PASMC 中 BMP2r 含量明显升高($P<0.05$)。**结论** PAEC 感受缺氧信号, 合成分泌增加的 EET、5-HT 通过 Cx40 和 Cx43 转移至 PASMC 中, 促进平滑肌细胞的增殖和收缩蛋白 α -SMA、SM22 α 的表达。通过阻断缝隙连接之间 EET、5-HT 的转运, 有助于减轻缺氧性肺血管收缩和肺动脉高压。

【关键词】 肺动脉高压; 缺氧性肺血管收缩; 缝隙连接蛋白; 环氧二十碳三烯酸; 5-羟色胺; 慢性缺氧

Role of epoxy eicosatrienoic acid, 5-hydroxytryptamine, gap junction protein in the formation of chronic hypoxic pulmonary hypertension SONG Xinting, YIN Ning. Department of Anesthesiology,

Sir Run Run Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 211100, China

Corresponding author: YIN Ning, Email: yinning882000@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of epoxy eicosapentaenoic acid (EET), 5-hydroxytryptamine (5-HT), connexin 40 (Cx40) and 43 (Cx43) in pulmonary arterial hypertension induced by chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction. **Methods** Forty SPF BALB/c mice were selected, aged 8 weeks, weighing 25–29 g. In experiment 1, mice were randomly divided into two groups: normoxic control group (group O, $n=8$) and chronic hypoxia model group (group H, $n=32$). The mice in group O were kept in normoxic environment, and the mice in group H were placed in low oxygen chamber (10% oxygen concentration) for 10 hours every day. Four weeks later, MAP, mean pulmonary artery pressure (mPAP) were monitored. After recording the data, all the mice were sacrificed and its left and right ventricular tissue was weighted separately to calculate the right ventricular hypertrophy index. In experiment 2, the

DOI:10.12089/jca.2022.07.013

基金项目:南京市科技局项目(201803068)

作者单位:211100 南京医科大学附属逸夫医院麻醉科

通信作者:尹宁, Email: yinning882000@126.com

distal pulmonary arterioles of all mice in groups O and H were isolated by collagenase digestion under microscope, pulmonary artery endothelial cells (PAEC) and pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) were identified by fluorescence immunohistochemistry. The identified PAEC and PASMC in group H were randomly divided into three subgroups: hypoxia + si-Cx40 group (group H40), hypoxia + si-Cx43 group (group H43) and hypoxia+nonsense siRNA group (group HN). PAEC and PASMC in groups H40 and H43 were transfected with Cx40 gene and Cx43 gene specific siRNA liposome siPORTNeoFect, respectively, and group HN was transfected with nonsense siRNA. Cells were subcultured under 10% oxygen. The expression of Cx40 and Cx43 mRNA were detected by qPCR; the proliferation of PAECs and PASMCs were detected by MTT assay; ELISA was used to detect the concentration of EET and 5-HT; immunohistochemistry was used to detect the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), smooth muscle-22 α (SM22 α) protein and bone morphogenetic protein 2r (BMP2r) in PASMC. **Results** Experiment 1 revealed MAP, mPAP and right ventricular hypertrophy index in group H were significantly higher than that in group O ($P < 0.05$). Experiment 2 indicated that compared with group HN, the expression of Cx40 mRNA in PAEC and PASMC were significantly down-regulated in group H40 ($P < 0.05$); the expression of Cx43 mRNA in PAEC and PASMC were significantly down-regulated in group H43 ($P < 0.05$); the concentrations of EET in PAEC were significantly increased ($P < 0.05$), the concentrations of EET and 5-HT in PASMC, the expression of α -SMA and SM22 α in PASMC were significantly reduced ($P < 0.05$), the expression of BMP2r in PASMC were significantly increased in groups H40 and H43 ($P < 0.05$). Compared with group H40, the concentrations of EET in PAEC were significantly increased ($P < 0.05$), the concentrations of EET and 5-HT in PASMC and the expression of α -SMA and SM22 α in PASMC were significantly reduced ($P < 0.05$), the expression of BMP2r in PASMC were significantly increased in group H43 ($P < 0.05$). **Conclusion** PAEC senses hypoxic signals and transfers EET and 5-HT to PASMC via Cx40 and Cx43, up-regulating the expression of α -SMA and SM22 α resulting in sustained pulmonary vasoconstriction and remodeling. Blocking the transport of EET and 5-HT between gap junctions may help to alleviate hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary arterial hypertension.

【Key words】 Pulmonary arterial hypertension; Hypoxic pulmonary vasoconstriction; Gap junction protein; Epoxy eicosapentaenoic acid; 5-hydroxytryptamine; Chronic hypoxia

缺氧性肺血管收缩(hypoxic pulmonary vasoconstriction, HPV)是肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)形成的诱因之一,其死亡率高、预后差^[1]。缺氧通过影响神经内分泌等多个方面调节肺动脉内皮细胞(pulmonary artery endothelial cell, PAEC)和肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC)的增殖和收缩^[2-3]。PAEC分泌的转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等多种细胞因子对血管平滑肌细胞起调节作用,使 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和平滑肌蛋白-22 α (smooth muscle-22 α , SM22 α)含量下降,促使平滑肌细胞向合成表型转化,增加肺血管收缩和增殖肌化等^[4]。缝隙连接在PAH大鼠模型中起到重要作用^[5]。环氧二十碳三烯酸(epoxy eicosapentaenoic acid, EET)、5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)在PAH小鼠模型肺组织中浓度升高^[6],参与了PAEC和PASMC之间的信号交流并调控PASMC的分化与成熟^[7]。本实验研究通过特异性干扰PAEC与PASMC之间的缝隙连接蛋白40(connexin 40, Cx40)和43(connexin 43, Cx43),观察EET和5-HT

等生物效应分子在细胞中的变化和肺血管收缩增殖情况,为进一步研究HPV致PAH提供潜在治疗靶点。

材料与方法

实验动物 本实验研究经南京医科大学动物实验伦理委员会批准。选择SPF级BALB/c小鼠40只,8周龄,体重25~29 g。所有小鼠正常饮食,维持饲养温度20~26℃,湿度40%~70%,12 h/12 h昼夜明暗交替的屏障环境。

实验一

实验分组与处理 采用随机数字表法将小鼠分为两组:对照组(O组, $n=8$)和慢性缺氧模型组(H组, $n=32$)。所有小鼠正常饮食, O组在正常环境喂养4周, H组予低氧舱, 每天吸入10%氧气10 h, 喂养4周制备缺氧性肺血管收缩型肺动脉高压(HPV-PAH)模型^[8]。测量小鼠平均肺动脉压(mean pulmonary artery pressure, mPAP) > 20 mmHg、右心室肥厚形成则认为建模成功。本实验研究中H组所有小鼠建模成功。

血流动力学监测 小鼠喂养4周后, 麻醉小鼠并行气管切开插管, 使用动物呼吸机行机械通气,

设置 V_T 6 ml/kg, RR 12 次/分。于小鼠主动脉根部、颈静脉进行置管,连接换能器监测 MAP 和 CVP,开胸后经右心室插管至肺动脉监测 mPAP。根据小鼠心脏解剖结构用组织剪剪出对应的左右心室,生理盐水冲洗滤纸吸干后称量小鼠右心室(RV)、左心室及室间隔(LV+S)重量,计算右心室肥厚指数 $= [RV / (LV + S)]$ 。

实验二

实验分组与处理 O 组和 H 组于显微操作下采用胶原酶消化法分离远端肺小动脉血管,采用荧光免疫组化法鉴定 PAEC 和 PASM。采用随机数字表法将 H 组 PAEC 和 PASM 进一步分为三组:缺氧+si-Cx40 组(H40 组)、缺氧+si-Cx43 组(H43 组)和缺氧+无义 siRNA 组(HN 组),H40 组和 H43 组 PAEC 和 PASM 分别接受 Cx40 基因和 Cx43 基因的特异性 siRNA 脂质体 siPORTNeoFX 转染,HN 组接受无义 siRNA 转染。所有细胞在 10% 氧气条件下进行传代培养。

细胞培养 PAEC 和 PASM 均培养在 M199 培养基中,含 10% 胎牛血清、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μ g/ml,在 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO_2 的细胞培养箱生长至 80%~90% 时,去除培养基,加入 PBS 洗 1~2 次,去除 PBS 后加入胰酶 1 ml 消化 1~3 min 后,加入完全培养基 3 ml 中和胰酶,终止消化。将消化的细胞转移至 15 ml 离心管中,1 000 r/min,离心 5 min。倒掉上清后加入培养基 3 ml 重悬细胞,1:3 传代至培养皿中培养。将长到培养皿 80%~90% 的细胞用胰酶消化,1 000 r/min 离心,去除上清,加入完全培养基重悬细胞,将细胞分别种在 6 孔板中,每孔种 1×10^6 个细胞。

siRNA 转染 待 PAEC 和 PASM 贴壁后,使用脂质体转染 si-Cx40、si-Cx43。用不含血清培养基 Opti-MEM 50 μ l 稀释 siRNA 至 100 nmol/L,轻轻混匀,室温孵育 5 min;用不含血清培养基 Opti-MEM 50 μ l 稀释 Lipo3000,轻轻混匀,室温孵育 5 min。将上述两个稀释液轻轻混匀,室温孵育 20 min,加入 6 孔板中(每孔脂质体转染混合液 100 μ l),放入培养箱培养。

MTT 增殖实验 PAEC 和 PASM 培养 6 h 后更换完全培养基培养,将培养皿放入培养箱中培养。培养 48 h 后,用胰酶将细胞消化下来,1 000 r/min 离心,去上清,加入完全培养基重悬细胞,用血球计数板对细胞进行计数,96 孔板中每孔种 5 000 个细胞,设置 3 个复孔,待细胞贴壁后,放入培养箱

中培养 24 h,往培养基中加入 MTT 10 μ l (5 mg/ml),在细胞培养箱中继续培养 3 h。去除培养基,每孔加入 DMSO 150 μ l,摇晃均匀,在 570 nm 波长测定吸光度,检测 PAEC 和 PASM 增殖活性。

qPCR 法 PAEC 和 PASM 培养 48 h 后提取 RNA 于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。逆转录实验步骤按照逆转录试剂盒说明书操作(货号:RR047),进行定量 PCR 检测(表 1),95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,共 40 个循环,后 95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s 绘制溶解曲线。根据仪器收集的数值对数据进行分析,测定 PAEC 和 PASM Cx40、Cx43 mRNA 表达量。

表 1 qPCR 引物序列

基因	扩增引物序列
GAPDH	上游 5'-CCAGTATGACTCCACTCAGC-3'
	下游 5'-GACTCCACGACATACTCAGC-3'
Cx40	上游 5'-CTGTCCCCACCCAGTCAA-3'
	下游 5'-CCGTTTGTCACTATGGTAGC-3'
Cx43	上游 5'-TACCACGCCACCACGGGCCA-3'
	下游 5'-GGCATTTTGGCTGTCGTCAGGGAA-3'

ELISA 法 PAEC 和 PASM 培养 48 h 后,用 PBS 去除培养基,收集细胞。采用 ELISA 法在酶标仪 450 nm 波长处检测各孔光密度值,通过绘制标准曲线,计算 PAEC 和 PASM 中 EET 浓度和 PASM 中 5-HT 浓度。

免疫组织化学染色 PASM 培养 48 h 后,将细胞从 6 孔板取出,用预冷的 PBS 洗 3 次,加入多聚甲醛常温固定 30 min, PBS 洗 3 次。加入 3% H_2O_2 ,室温孵育 10 min,蒸馏水冲洗, PBS 洗 3 次。加入 1% Triton X-100-PBS,室温孵育 10 min, PBS 洗 3 次。加入山羊血清封闭非特异性结合位点以消除非特异性染色,室温孵育 30 min。加入 α -SMA、SM22 α 、2r 骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein 2r, BMP2r)抗体(1:100),4 $^{\circ}$ C 湿盒孵育过夜, PBS 洗 3 次,加入被辣根过氧化物酶标记的相应二抗 50~100 μ l,4 $^{\circ}$ C 孵育 50 min, PBS 洗 3 次。去除 PBS 液,每张切片加新鲜配制 DAB 溶液 50~100 μ l,显微镜控制显色,显色完全后用蒸馏水冲洗,苏木素复染,1% 盐酸酒精分化,蒸馏水冲洗,氨水返蓝,流水冲洗。在盖玻片上加入中性树胶,在 200 倍显微镜下拍照,采用 ImageJ 软件计算 PASM 中

α -SMA、SM22 α 、BMP2r 蛋白相对含量。

统计分析 采用 SPSS 25.0 软件进行分析。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

实验一 H 组 MAP、mPAP 和右心室肥厚指数均明显高于 O 组($P<0.05$,表 2)。

表 2 两组小鼠 MAP、mPAP 和右心室肥厚指数的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	MAP (mmHg)	mPAP (mmHg)	右心室肥厚 指数
O 组	8	42.87 $\pm$ 0.83	16.75 $\pm$ 1.03	0.26 $\pm$ 0.03
H 组	32	46.12 $\pm$ 1.95 ^a	25.00 $\pm$ 3.11 ^a	0.30 $\pm$ 0.04 ^a

注:与 O 组比较,^a $P<0.05$

实验二 与 O 组比较,HN 组、H40 组和 H43 组 PAEC 增殖活性明显降低($P<0.05$),PASMC 增殖活性明显升高($P<0.05$)。与 HN 组比较,H40 组 PAEC 增殖活性和 H43 组 PASMC 增殖活性明显降低($P<0.05$)。与 H40 组比较,H43 组 PAEC 增殖活性明显升高($P<0.05$),PASMC 增殖活性明显降低($P<0.05$,表 3)。

表 3 四组 PAEC 和 PASMC 增殖活性的比较(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	PAEC	PASMC
O 组	3	106.7 $\pm$ 4.4	79.1 $\pm$ 4.6
HN 组	3	84.6 $\pm$ 1.3 ^a	136.2 $\pm$ 1.3 ^a
H40 组	3	54.6 $\pm$ 2.2 ^{ab}	135.0 $\pm$ 3.5 ^a
H43 组	3	77.5 $\pm$ 1.2 ^{ac}	90.6 $\pm$ 0.6 ^{abc}

注:与 O 组比较,^a $P<0.05$;与 HN 组比较,^b $P<0.05$;与 H40 组比较,^c $P<0.05$

与 O 组比较,HN 组 PAEC 中 Cx40 mRNA 表达量明显降低($P<0.05$),PASMC 中 Cx43 mRNA 表达量明显升高($P<0.05$);H40 组 PAEC 和 PASMC 中 Cx40 mRNA 表达量明显降低($P<0.05$);H43 组 PAEC 和 PASMC 中 Cx43 mRNA 表达量明显降低($P<0.05$)。与 HN 组比较,H40 组 PAEC 和 PASMC 中 Cx40 mRNA 表达量明显降低($P<0.05$),H43 组 PAEC 和 PASMC 中 Cx43 mRNA 表达量明显降低($P<0.05$,表 4)。

表 4 四组 PAEC 和 PASMC Cx40、Cx43 mRNA 表达量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	Cx40 mRNA 表达量		Cx43 mRNA 表达量	
		PAEC	PASMC	PAEC	PASMC
O 组	3	100.0 $\pm$ 10.0	100.0 $\pm$ 4.5	100.0 $\pm$ 5.6	100.0 $\pm$ 4.7
HN 组	3	84.6 $\pm$ 0.8 ^a	95.8 $\pm$ 1.4	99.5 $\pm$ 5.9	114.4 $\pm$ 6.0 ^a
H40 组	3	28.9 $\pm$ 9.2 ^{ab}	26.0 $\pm$ 12.1 ^{ab}	-	-
H43 组	3	-	-	43.2 $\pm$ 5.0 ^{ab}	43.0 $\pm$ 7.5 ^{ab}

注:与 O 组比较,^a $P<0.05$;与 HN 组比较,^b $P<0.05$

与 O 组比较,HN 组、H40 组和 H43 组 PAEC 中 EET 浓度均明显降低($P<0.05$),PASMC 中 EET 浓度均明显升高($P<0.05$)。与 HN 组比较,H40 组和 H43 组 PAEC 中 EET 浓度明显升高($P<0.05$),PASMC 中 EET 浓度明显降低($P<0.05$)。与 H40 组比较,H43 组 PAEC 中 EET 浓度明显升高($P<0.05$),PASMC 中 EET 浓度明显降低($P<0.05$,表 5)。

表 5 四组 PAEC 和 PASMC 中 EET 浓度的比较(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

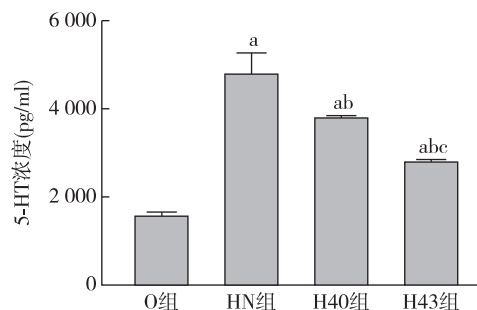
组别	孔数	PAEC	PASMC
O 组	3	457.2 $\pm$ 27.0	2 127.3 $\pm$ 236.9
HN 组	3	206.7 $\pm$ 14.1 ^a	6 078.8 $\pm$ 184.8 ^a
H40 组	3	323.6 $\pm$ 54.4 ^{ab}	4 915.5 $\pm$ 504.9 ^{ab}
H43 组	3	396.4 $\pm$ 14.6 ^{abc}	4 041.8 $\pm$ 130.6 ^{abc}

注:与 O 组比较,^a $P<0.05$;与 HN 组比较,^b $P<0.05$;与 H40 组比较,^c $P<0.05$

与 O 组比较,HN 组、H40 组和 H43 组 PASMC 中 5-HT 浓度明显升高($P<0.05$)。与 HN 组比较,H40 组和 H43 组 PASMC 中 5-HT 浓度明显降低($P<0.05$)。与 H40 组比较,H43 组 PASMC 中 5-HT 浓度明显降低($P<0.05$,图 1)。

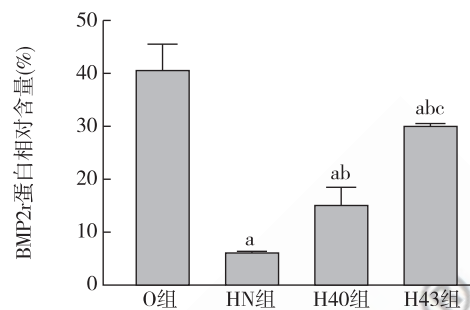
与 O 组比较,HN 组、H40 组和 H43 组 PASMC 中 α -SMA 蛋白含量明显升高($P<0.05$)。与 HN 组比较,H40 组和 H43 组 PASMC 中 α -SMA 蛋白含量明显降低($P<0.05$)。与 H40 组比较,H43 组 PASMC 中 α -SMA 蛋白含量明显降低($P<0.05$,图 2)。

与 O 组比较,HN 组、H40 组和 H43 组 PASMC 中 SM22 α 蛋白含量明显升高($P<0.05$)。与 HN 组



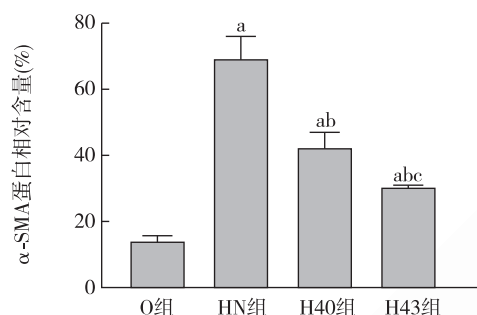
注:与 O 组比较,^a $P<0.05$;与 HN 组比较,^b $P<0.05$;与 H40 组比较,^c $P<0.05$

图 1 四组 PASM C 中 5-HT 浓度



注:与 O 组比较,^a $P<0.05$;与 HN 组比较,^b $P<0.05$;与 H40 组比较,^c $P<0.05$

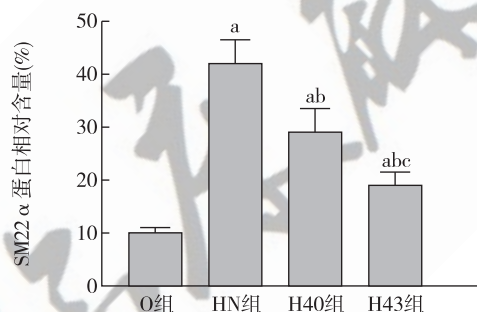
图 4 四组 PASM C 中 BMP2r 蛋白相对含量



注:与 O 组比较,^a $P<0.05$;与 HN 组比较,^b $P<0.05$;与 H40 组比较,^c $P<0.05$

图 2 四组 PASM C 中 α-SMA 蛋白相对含量

比较,H40 组和 H43 组 PASM C 中 SM22α 蛋白含量明显降低($P<0.05$)。与 H40 组比较,H43 组 PASM C 中 SM22α 蛋白含量明显降低($P<0.05$,图 3)。



注:与 O 组比较,^a $P<0.05$;与 HN 组比较,^b $P<0.05$;与 H40 组比较,^c $P<0.05$

图 3 四组 PASM C 中 SM22α 蛋白相对含量

与 O 组比较,HN 组、H40 组和 H43 组 PASM C 中 BMP2r 蛋白含量明显降低($P<0.05$)。与 HN 组比较,H40 组和 H43 组 PASM C 中 BMP2r 蛋白含量明显升高($P<0.05$)。与 H40 组比较,H43 组 PASM C 中 BMP2r 蛋白含量明显升高($P<0.05$,图 4)。

讨 论

PAH 是一种难治且致死率很高的疾病^[9]。其中由持续缺氧诱导的 HPV-PAH 的主要病理改变是肺动脉平滑肌增生、肥厚,导致肺动脉管壁增厚、管腔缩小、结构重塑^[10]。PASM C 是导致血管收缩、出现 HPV 病理症状的主要效应细胞,PAEC 是缺氧的感受细胞,PAEC 能通过多种方式将感受到的生物信息传递给 PASM C。其中,缝隙连接是细胞间传递生物信息的重要方式之一。HPV 起源于肺泡毛细血管上皮层,缺氧的信号需要内皮细胞与内皮细胞之间的 Cx40 作为信号通路,引起内皮细胞去极化,最终导致细胞内 EET 浓度改变,EET 作用于血管平滑肌细胞膜,使细胞膜超极化,从而抑制电压依赖性钙通道开放,减少胞浆游离钙,引起 PASM C 舒张和收缩^[11]。McNair 等^[12]研究表明,Cx43 参与了缺氧时肺血管重构相关的异常细胞增殖。此外,BMP 家族在 PAH 中具有重要的作用,其受体基因突变与遗传相关性 PAH 及特发性 PAH 相关,在 HPV-PAH 动物模型中也发现了 BMP 受体表达的改变。BMP2r 可以改变细胞间缝隙连接蛋白表达,恢复细胞凋亡和增殖的平衡状态,改善肺血管重构^[13-14]。

本实验研究通过检测 PASM C 中 5-HT、EET、α-SMA、SM22α、BMP2r 含量变化以及细胞增殖活性的高低体现缝隙连接与 HPV-PAH 之间的关系。本实验研究结果显示,与常氧条件下饲养的小鼠比较,转染无义 siRNA 的 HPV-PAH 小鼠 PASM C 中 EET 浓度明显升高,5-HT 浓度和 α-SMA、SM22α 蛋白含量升高,BMP2r 蛋白含量降低。当 Cx40、Cx43 表达被干扰时,小鼠 PASM C 中上述效应分子变化趋势均被抑制,且与低氧环境下 PAEC 和 PASM C 增殖活性的变化趋势相一致。可能原因为 PAEC 感受

低氧信号后,合成分泌增加的 EET、5-HT 通过 Cx40 和 Cx43 实现细胞间的信号交流,促使 PASMCM 增殖活跃。此外, Si 等^[15]研究表明,慢性低氧刺激会降低 PAEC 的 Cx40 表达,本实验研究结果与其一致,但其研究的主要结论是下调 Cx40 的表达可通过减弱肺动脉远端小动脉内皮依赖性超极化介导的舒张,导致 PAH,表明 Cx40 在慢性缺氧条件下导致肺血管收缩和舒张的双重性。Bouvard 等^[16]研究表明, Cx43 作为细胞间通道的一部分,在低氧诱导的 PAH 患者中表达增加。另一方面,本实验研究结果中,细胞增殖与 EET 浓度变化趋势一致, PASMCM 合成 α -SMA、SM22 α 蛋白含量与 5-HT 浓度变化趋势一致,均与 Cx43 的表达状态相关,显示 Cx43 是一个非常重要的治疗靶点,需要进一步深入研究。

本实验研究仍有不足之处:(1)没有从药理学层面进行正反表型验证,继续探究 Cx40/Cx43 是作为整体还是顺序发挥作用;(2)细胞增殖与 EET 浓度未做相关性研究;(3)Cx43 在缺氧情况下表达上调,而 Cx40 表达下调,两者变化趋势不一致的原因以及 Cx40 在慢性缺氧条件下导致肺血管收缩和舒张的双重性还需未来进一步研究;(4)本实验研究在感受器细胞 PAEC 和效应器细胞 PASMCM 之间选择了仅检测效应器细胞 PASMCM;另外,转染了特定的 siRNA 的细胞只检测了相应的缝隙连接蛋白表达是否下调,没有明确干扰 Cx40 或 Cx43 表达这一操作对 Cx43 或 Cx40 表达的影响。

综上所述,PAEC 感受缺氧信号,合成分泌增加的 EET、5-HT 通过 Cx40 和 Cx43 转移至 PASMCM 中促进平滑肌细胞的增殖和收缩蛋白 α -SMA、SM22 α 的表达,阻断缝隙连接之间 EET、5-HT 的转运可以减轻缺氧型肺血管收缩和重塑。

参 考 文 献

- [1] Xiao Y, Chen PP, Zhou RL, et al. Pathological mechanisms and potential therapeutic targets of pulmonary arterial hypertension: a review. *Aging Dis*, 2020, 11(6): 1623-1639.
- [2] Swenson ER. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *High Alt Med Biol*, 2013, 14(2): 101-110.
- [3] 钟士杰, 邓堂, 林开文, 等. 缺氧性肺动脉高压的治疗进展. *现代生物医学进展*, 2021, 21(18): 3596-3600.
- [4] Lee YU, Luo J, Sprague E, et al. Comparison of artery organ culture and co-culture models for studying endothelial cell migration and its effect on smooth muscle cell proliferation and migration. *Ann Biomed Eng*, 2010, 38(3): 801-812.
- [5] Billaud M, Dahan D, Marthan R, et al. Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension. *Respir Res*, 2011, 12: 30.
- [6] Kandhi S, Froogh G, Qin J, et al. EETs elicit direct increases in pulmonary arterial pressure in mice. *Am J Hypertens*, 2016, 29(5): 598-604.
- [7] Gairhe S, Bauer NN, Gebb SA, et al. Serotonin passes through myoendothelial gap junctions to promote pulmonary arterial smooth muscle cell differentiation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303(9): L767-L777.
- [8] Yang L, Yu D, Mo R, et al. The succinate receptor GPR91 is involved in pressure overload-induced ventricular hypertrophy. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147597.
- [9] 秦卫民, 尹宁, 范国祥, 等. 抑制 PAI-1 对大鼠左心疾病所致肺高压的影响. *临床麻醉学杂志*, 2020, 36(9): 905-908.
- [10] 丁兴, 孙莉, 王蓓. 低氧性肺动脉高压发病机制研究进展. *临床肺科杂志*, 2017, 22(7): 1318-1319, 1322.
- [11] Wang L, Yin J, Nickles HT, et al. Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction. *J Clin Invest*, 2012, 122(11): 4218-4230.
- [12] McNair AJ, Wilson KS, Martin PE, et al. Connexin 43 plays a role in proliferation and migration of pulmonary arterial fibroblasts in response to hypoxia. *Pulm Circ*, 2020, 10(3): 2045894020937134.
- [13] 张弋, 卢文菊, 杨凯, 等. 骨形成蛋白 2 对大鼠肺动脉平滑肌细胞经典瞬时受体电位蛋白表达和钙池操纵性钙内流及细胞内基础钙水平的影响. *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(1): 66.
- [14] 钟毅, 祝瑜, 路凯, 等. 骨形态发生蛋白-2 信号通路在右美托咪定所致大鼠房室结缝隙连接蛋白表达中的作用. *临床麻醉学杂志*, 2019, 35(12): 1214-1217.
- [15] Si R, Zhang Q, Cabrera J, et al. Chronic hypoxia decreases endothelial connexin 40, attenuates endothelium-dependent hyperpolarization-mediated relaxation in small distal pulmonary arteries, and leads to pulmonary hypertension. *J Am Heart Assoc*, 2020, 9(24): e018327.
- [16] Bouvard C, Genet N, Phan C, et al. Connexin-43 is a promising target for pulmonary hypertension due to hypoxaemic lung disease. *Eur Respir J*, 2020, 55(3): 1900169.

(收稿日期: 2021-09-11)