

ATF6基因对低氧状态下肺动脉平滑肌表型转化的调控作用

唐为安^{1,2} 王芳² 杨俊俊^{2*} 徐兴祥^{1,2*}

(¹中南大学湘雅二医院呼吸内科, 长沙 410013; ²扬州大学苏北人民医院, 扬州 225001)

摘要 肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASMCS)表型转化是低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)早期重要的病理生理过程。目前关于低氧刺激表型转化的机制尚未完全清楚。该文为了探究了PASMCS中活化转录因子6(activated transcription factor, ATF6)对表型转化标志物 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的影响, 研究了ATF6参与低氧诱导表型转化的调节机制。实验先观察在低氧刺激下ATF6通路和表型转化标记蛋白的变化, 免疫荧光结果显示, 低氧24 h ATF6向细胞核转位; Western blot结果显示, 低氧48 h组ATF6表达量为低氧0 h组的146%($P<0.05$), 低氧48 h组 α -SMA为低氧0 h组的35%($P<0.05$)。以上结果说明, 在低氧刺激下成功构建了表型转化模型。为了验证ATF6对表型转化的影响, 该文采用siRNA转染将ATF6敲低后, 观察低氧刺激下表型转换标志物 α -SMA的表达变化, 结果显示, 低氧+ATF6敲低组 α -SMA蛋白表达为低氧对照组的162%($P<0.05$)。此结果提示, 敲低ATF6基因抑制低氧诱导的 α -SMA蛋白下调。上述结果表明, 低氧导致PASMCS表型转化很可能受到ATF6激活的影响, 提示ATF6可能成为治疗HPH的潜在靶点。

关键词 低氧性肺动脉高压; ATF6; α -SMA; 表型转化

ATF6 Influences Phenotypic Switch Induced by Hypoxia in Rat Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells

Tang Weian^{1,2}, Wang Fang², Yang Junjun^{2*}, Xu Xingxiang^{1,2*}

(¹The Second Affiliated Hospital of Xiangya, Central South University, Changsha 410013, China;

²Northern Jiangsu Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Abstract Phenotypic switch of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCS) is an important pathophysiological process in hypoxic pulmonary hypertension (HPH). The specific mechanisms of phenotypic switch under hypoxia are not yet fully understood. This study investigated relations between activated transcription factor 6 (ATF6) and phenotypic switch marker α -smooth muscle actin (α -SMA) under hypoxia condition. The first set of questions aimed to detect changes of ATF6 pathway and phenotypic switch at different hypoxia periods, so we cultured PASMCS (pulmonary artery smooth muscle cells) under hypoxia 0 h, 24 h, 48 h, 72 h. Immunofluorescence showed that ATF6 didn't express in nucleus at hypoxia 0 h, but it expresses at hypoxia 24 h. Western blot showed that ATF6 expression rose up to 146% in hypoxia 48 h compared with hypoxia 0 h group ($P<0.05$), expression levels of α -SMA in hypoxia 48 h group decreased to 35% that of hypoxia 0 h group ($P<0.05$). This results indicated

收稿日期: 2018-01-30 接受日期: 2018-05-21

2016年江苏省自然科学基金青年科学基金(批准号: BK20160451)资助的课题

*通讯作者。Tel: 18051060044, E-mail: xiaojun_87624@126.com; Tel: 15651059501, E-mail: xuxx63@sina.com

Received: January 30, 2018 Accepted: May 21, 2018

This work is supported by Jiangsu Youth Science Foundation of Natural Science Foundation (2016) (Grant No. BK20160451)

*Corresponding authors. Tel: +86-18051060044, E-mail: xiaojun_87624@126.com; Tel: +86-15651059501, E-mail: xuxx63@sina.com

网络出版时间: 2018-07-25 11:32:16 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180725.1132.010.html>

that hypoxia stimulated ATF6 pathway activation and phenotypic switch. In order to assess influences of ATF6 on phenotypic switch, we knocked down ATF6 by siRNA transfection, Western blot showed that α -SMA levels in hypoxia+ATF6 knockdown group were 162% compared with hypoxia control group ($P<0.05$), it indicated that hypoxia-induced α -SMA reduction was inhibited by knockdown of ATF6 gene. This above results indicated that hypoxia might lead to phenotypic switch by ATF6 pathway, ATF6 might be a potential target for treatments of HPH.

Keywords hypoxic pulmonary hypertension; ATF6; α -SMA; phenotypic switch

肺动脉高压是指肺动脉压力升高超过一定界值的血流动力学和病理状态,在我国属于一类极难治愈的疾病,肺动脉高压容易导致患者心力衰竭,致残率和死亡率增高,症状出现后平均生存期为1.9年^[1]。肺动脉血管平滑肌细胞(pulmonary artery vessel smooth muscle cells, PAMSCs)表型转化是肺动脉高压早期重要病理生理过程,表型转化使得PAMSCs由收缩型向合成型转化^[2], α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)是平滑肌细胞的收缩型表型转化标志物,主要组成平滑肌细肌丝部分^[3]。研究显示,平滑肌细胞表型转化导致细胞肥大增生、细胞增殖和分泌能力增强^[4]、血管壁增厚^[5]、纤维基质分泌增加、血管顺应性下降^[6],最终造成疾病不可逆转。低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)是指低氧为主要原因造成的肺动脉高压。HPH的患者发病具有隐匿性,患病期漫长而不明显,其早期诊断和治疗仍是一个难题。尽管目前低氧性肺动脉高压诊断和治疗取得了很大进展,但大多数肺动脉高压患者发病十分隐匿,许多平均压低于诊断标准的患者无法及时得以治疗^[7]。低氧导致肺动脉高压的发病机制仍然不清楚,有待我们进一步探索。

活化转录因子6(activated transcription factor 6, ATF6)属于未折叠蛋白反应(unfold protein response, UPR)通路蛋白之一。研究表明,UPR被激活时,ATF6与葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, GRP78)分离并从内质网转移到高尔基体,被高尔基体酶切割后,其N-末端翻译因子进入细胞核^[8],诱导下游基因CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)的表达^[9],并促进GRP78的表达^[10]。既往有研究显示,中药黄芪可以抑制ATF6向细胞核内的转位^[11],同时另一项研究发现,黄芪还具有抑制血管重塑的作用^[12],但ATF6是否影响平滑肌细胞表型转化,目前尚无相关报道。因此,ATF6是否参与低氧调节表型转化的机制引起

了我们的关注,我们推测ATF6调控了平滑肌表型转化。深入研究ATF6在表型转化中的作用对于进一步认识HPH发病机制和靶向治疗具有重要的意义。

在本研究中,我们通过低氧刺激平滑肌ATF6通路激活和构建表型转化模型,Western blot和免疫荧光观察低氧对于ATF6通路和表型转化的影响,随后siRNA转染敲低ATF6基因,再次检测低氧对表型转化的影响。本文探讨了ATF6基因与低氧诱导PAMSCs表型转化的关系,为进一步阐明ATF6基因在HPH发病中的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 细胞与主要试剂

大鼠PAMSCs购自长沙赢润生物技术有限公司。DMEM/高糖细胞培养基、胎牛血清(货号:10099-141-FBS)购自美国赛默飞世尔科技公司。青霉素/链霉素双抗溶液购自上海碧云天生物技术有限公司。TRIzol RNA提取试剂(货号:15596026)、cDNA反转录试剂盒(货号:K1622)购自美国赛默飞世尔科技公司。荧光半定量PCR试剂盒(货号:Q111-02/03)购自南京诺唯赞生物科技有限公司。ATF6、GAPDH引物购自上海拓然生物有限公司。24孔板爬片购自美国Corning公司。细胞裂解液(货号:89901)购自美国赛默飞世尔科技公司。蛋白酶抑制剂购自罗氏生物科技有限公司。0.22 μ m、0.45 μ m PVDF膜购自美国Milipore公司。转染siRNA包括ATF6-siRNA、NC-siRNA、CY3-siRNA均购自上海拓然生物有限公司。HRP-山羊抗小鼠抗体(货号:BA1050)、HRP-山羊抗兔抗体(货号:BA1054)购买武汉博士德生物有限公司。GRP78兔抗大鼠单克隆抗体(货号:RLT5858)、 α -SMA单克隆抗体(货号:RLM3365)购自苏州睿瀛生物有限公司。ATF6兔抗大鼠多克隆抗体(货号:ab203119)购自美国Abcam公司。Chop单克隆抗体(货号:2895)购自美国CST公司。GAPDH单克隆抗体(货号:TDY042)购自北京天德悦生物

科技有限公司。CY3山羊抗小鼠(货号: CW0145)、CY3山羊抗兔(货号: CW0159)荧光二抗购自北京康为世纪生物科技有限公司。

1.2 细胞培养和实验分组

将大鼠PASMCS培养于含10%胎牛血清、1%青/链霉素双抗的高糖DMEM培养基中,常氧条件置于37 °C、21% O₂、5% CO₂培养箱中,低氧条件置于37 °C、1% O₂、5% CO₂培养箱中。第一部分实验按照低氧时间不同共分为四组,分别为低氧0 h组(对照组)、低氧24 h组、低氧48 h组、低氧72 h组。第二部分按照转染siRNA不同共分为五组,分别为空白转染组、阴性siRNA转染组、ATF6siRNA1组、ATF6siRNA2组、ATF6siRNA3组。第三部分按照ATF6敲低和低氧两种因素影响,共分为六组,分别为常氧对照组、常氧+NCsiRNA组、常氧+ATF6敲低组、低氧对照组、低氧+NCsiRNA组、低氧+ATF6敲低组。

1.3 方法

1.3.1 siRNA转染 首先将生长为合适汇合度的细胞取出,将旧培养基更换为无抗生素的新鲜培养基。取两个1.5 mL无酶EP管,将200 μL的OPTI-MEM无血清培养基转移至无酶EP管中,分别将罗氏X-tremeGENE转染试剂20 μL和siRNA 10 μg稀释于EP管中,静置5 min,将两管中的液体混合后再次静置20 min,最后将转染混合物均匀滴入到培养皿中,将siRNAs转染至细胞。siRNA序列如下所示,大鼠Rn-ATF6-si-1正义链: 5'-GCA CAU GAG ACU UAC GAA A-3', 反义链: 5'-CGU GUA CUC UGA AUG CUU U-3'; 大鼠Rn-ATF6-si-2正义链: 5'-GGA CUU GUU GUC UAG UUC U-3', 反义链: 5'-CCU GAA CAA CAG AUC AAG A-3'; 大鼠Rn-ATF6-si-3正义链: 5'-GCA GUC GAU UAU CAG UAU A-3', 反义链: 5'-CGU CAG CUA AUA GUC AUA U-3'; 阴性对照siRNA正义链: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U-3', 反义链: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA A-3'。转染后48 h通过qRT-PCR和Western blot分别测定ATF6 mRNA和蛋白抑制率。

1.3.2 转染后qRT-PCR检测ATF6 mRNA抑制率 使用TRIzol提取剂从培养的细胞中收集总RNA,通过荧光酶标仪测定RNA纯度为1.7~2.0后,采用赛默飞世尔科技公司cDNA反转录试剂盒进行反转录,具体步骤按照说明书提供的方法进行。获得

cDNA后按照诺唯赞生物科技有限公司荧光半定量PCR说明书配好反应产物,在StepOnePlus实时PCR系统中设定反应条件为: 95 °C预变性5 min; 95 °C变性10 s, 60 °C延伸30 s, 共60个循环; 熔解曲线95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s, 进行PCR反应,以GAPDH用作内部参照,采用2^{-ΔΔCT}法测定mRNA表达水平。PCR的引物如下,大鼠ATF6正向引物: 5'-GAT TGT GGG CGT CAC TTC TCG-3', 反向引物: 5'-TGG GAT FCC AAT GTT AGC CTG-3'; 大鼠GAPDH正向引物: 5'-GTG CCA AAA GGG TCA TCA TCT C-3', 反向引物: 5'-GGT TCA CAC CCA TCA CAAACA TG-3'。

1.3.3 Western blot检测相关蛋白水平 使用预冷PBS清洗细胞后,通过蛋白裂解液提取总蛋白,采用BCA测定蛋白浓度,将提取的蛋白裂解液与上样缓冲液按照4:1比例混合后煮沸5 min。通过微量上样器按40 μg/孔加入到配好的SDS-PAGE胶中,以浓缩胶60 V分离30 min、分离胶120 V分离90 min电泳分离蛋白。然后通过100 V电转2 h将蛋白转移至PVDF膜。室温下用5%脱脂奶粉封闭1 h后,将膜与一抗于4 °C孵育过夜。第二天用TBST洗膜后,在室温下孵育与一抗对应种属的HRP二抗1 h, TBST洗膜,将条带上覆盖ECL发光液于暗室通过ChemiDoc化学发光系统检测靶蛋白。使用ImageJ软件进行蛋白灰度值分析。

1.3.4 免疫荧光检测ATF6、α-SMA细胞内分布 将处于对数生长期的细胞以1×10⁴/片的密度种植到24孔板爬片上,过夜培养等待细胞贴壁后,给与对应的低氧刺激和siRNA转染后,将爬片取出,用预冷PBS进行清洗,采用预冷4%多聚甲醛固定15 min,用PBS洗涤后,用0.3% Triton X-100透化10 min,再次PBS清洗后,使用2%牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)来封闭非特异性结合位点,将爬片与一抗4 °C孵育过夜,第二天取出爬片,通过PBS洗涤后,室温下与FITC荧光二抗孵育1 h。经过PBS洗涤,用DAPI染色细胞核,用抗荧光淬灭剂封片后,采用荧光高分辨率显微镜拍摄图像。

1.4 统计学分析

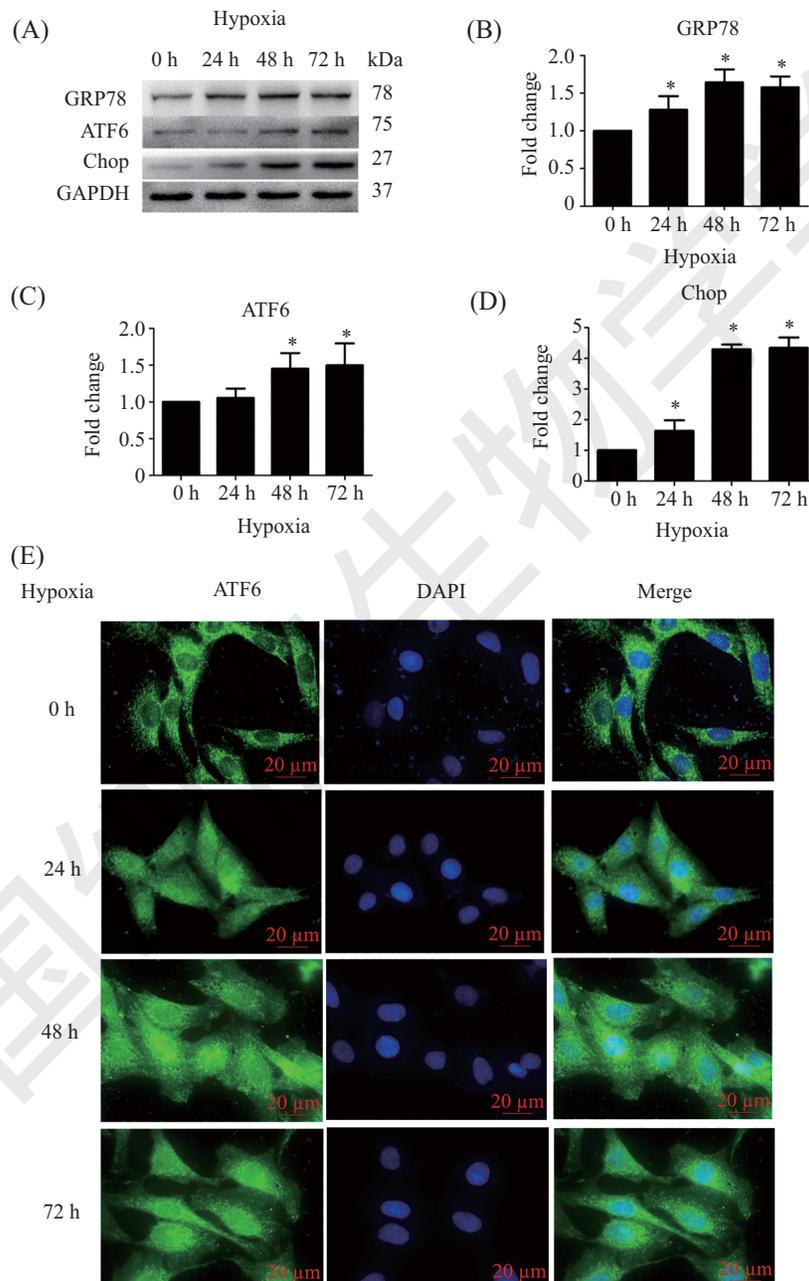
所有数据采用SPSS 23.0软件进行统计学分析,实验数据采用均数±标准差表示,每个独立实验重复至少3次。各组之间的比较采用ANOVA单因素方差分析,*P*<0.05表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ATF6通路在低氧刺激下激活

为了检测ATF6通路在低氧不同时间的变化,我们将细胞放在低氧环境下0 h、24 h、48 h、72 h,观察ATF6通路蛋白的表达变化。如图1所示,Western blot分析显示,GRP78的蛋白表达随着低氧时间延长升高,在低氧48 h达到最大,为对照组的164%,具

有统计学差异($P<0.05$)。ATF6蛋白表达随着低氧时间的延长增高,低氧48 h处明显增高,为对照组的146%,具有统计学差异($P<0.05$)。Chop蛋白表达随着低氧时间的延长增高,低氧48 h处明显增高,为对照组的429%,具有统计学差异($P<0.05$)。免疫荧光显示,在对照组中细胞核中无ATF6表达,在低氧刺激的作用下,ATF6向细胞核内转移,低氧24 h细胞

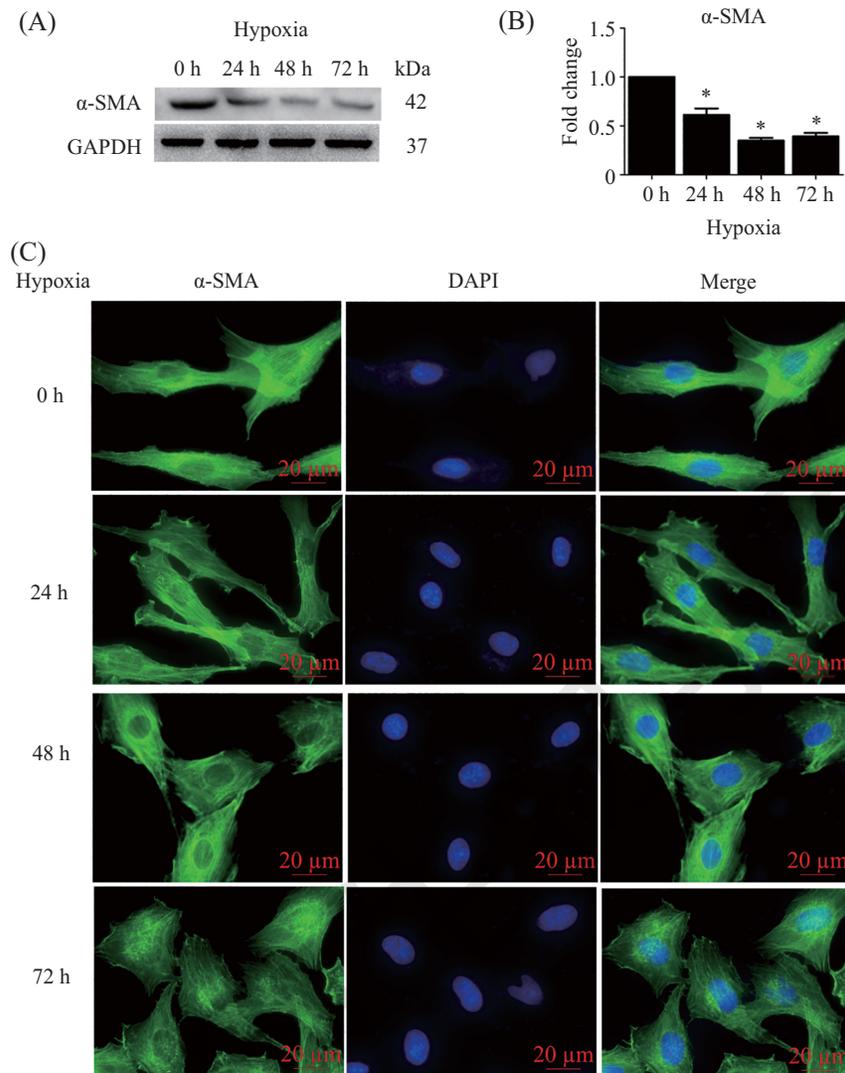


A: Western blot检测低氧0 h、24 h、48 h、72 h时蛋白GRP78、ATF6、Chop表达; B-D: 蛋白灰度分析, $*P<0.05$, 与对照组(0 h)相比; E: 免疫荧光检测低氧不同时间ATF6(绿色)的分布变化, DAPI(蓝色)细胞核染色。

A: determination of GRP78, ATF6, Chop protein levels at hypoxia 0 h, 24 h, 48 h, 72 h by Western blot; B-D: gray-value of proteins expression at hypoxia, $*P<0.05$ vs the hypoxia 0 h group; E: distribution of ATF6 (green) by immunofluorescence at hypoxia 0 h, 24 h, 48 h, 72 h. Nuclear staining by DAPI (blue).

图1 低氧对ATF6通路蛋白GRP78、ATF6、Chop的影响

Fig.1 The effects of hypoxia on GRP78, ATF6, Chop proteins expression



A: Western blot检测低氧0 h、24 h、48 h、72 h时 α -SMA蛋白水平变化; B: 蛋白灰度分析, $*P < 0.05$, 与对照组相比; C: 免疫荧光检测低氧不同时间 α -SMA(绿色)表达的变化, DAPI(蓝色)细胞核染色。

A: determination of α -SMA protein level at hypoxia 0 h, 24 h, 48 h, 72 h by Western blot; B: gray-value of α -SMA protein level, $*P < 0.05$ vs the hypoxia 0 h group; C: distribution of α -SMA (green) at hypoxia 0 h, 24 h, 48 h, 72 h by immunofluorescence; nuclear staining by DAPI (blue).

图2 低氧对表型转化蛋白 α -SMA的影响

Fig.2 The effects of hypoxia on α -SMA protein expression

核内开始出现ATF6表达, 低氧48 h组和低氧72 h组细胞核内ATF6持续表达。此项结果提示, 低氧刺激ATF6通路激活具有时间依赖性。

2.2 构建低氧诱导表型转化模型

为了构建低氧表型转化模型, 我们通过低氧刺激PASCs 0 h、24 h、48 h、72 h, 观察表型转化标记蛋白 α -SMA随低氧的变化情况。Western blot结果显示, 低氧导致 α -SMA蛋白表达下调, 低氧48 h最为明显, 为对照组的35%, 具有统计学差异($P < 0.05$)。免疫荧光检测显示, 在低氧0 h细胞呈长梭形, α -SMA呈清楚肌丝结构; 低氧24 h, PASCs体积变大, 形态不规则, 细胞内 α -SMA分布开始紊乱; 在低

氧48 h和低氧72 h细胞形态仍为不规则型, α -SMA肌丝变得模糊分散, 低氧导致 α -SMA蛋白从呈丝状分布转变为模糊分散, 细胞形态从长梭型向不规则型转变。此次结果提示, 低氧刺激表型转化模型的建立, 在低氧48 h最为明显(图2)。

2.3 siRNA转染效率和转染后抑制ATF6 mRNA和蛋白表达

为了验证siRNA的转染效率和ATF6敲低效果, 我们通过带有CY3荧光的siRNA转染, 通过免疫荧光观察转染效率, 通过PCR和Western blot观察转染后ATF6 mRNA和蛋白的抑制率。通过荧光显微镜观察发现, $>95\%$ 的细胞被成功转染siRNA, 转染效率

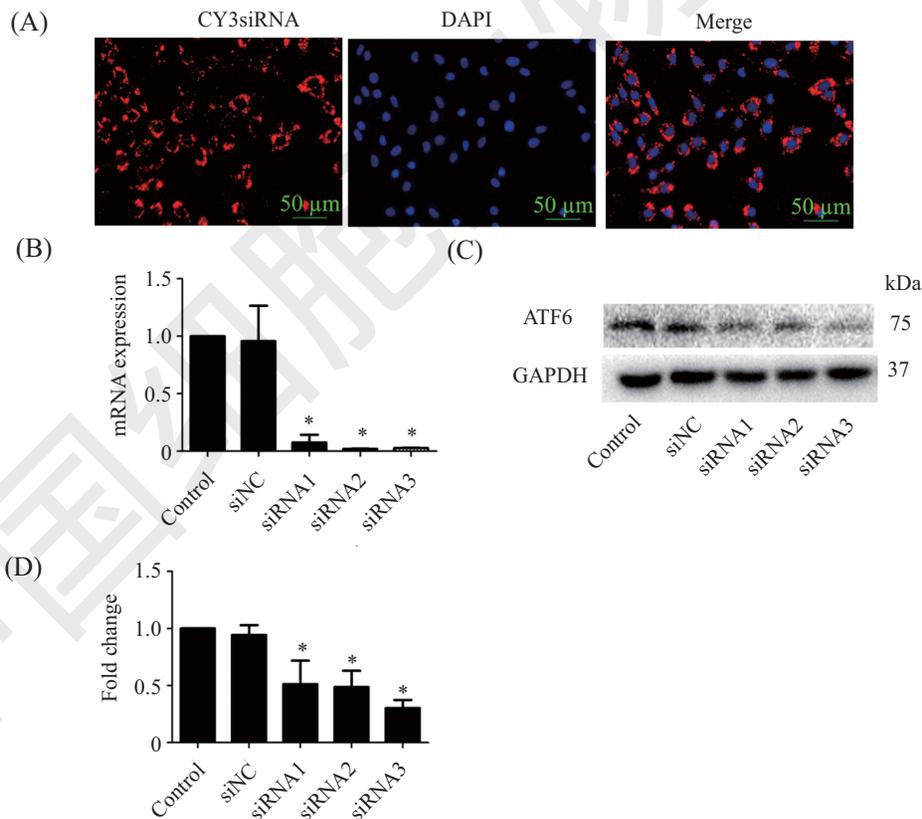
较佳。PCR检测显示, siRNA1、siRNA2、siRNA3的mRNA抑制率分别为92.4%、97.9%、97.3%,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot检测显示, siRNA1、siRNA2、siRNA3的ATF6蛋白抑制率分别为48.7%、51.4%、69.7%,与对照组相比差异具有统计学意义($P < 0.05$)。上述结果提示, 转染siRNA3综合抑制效果最佳, 后续实验采用siRNA3作为转染siRNA, 命名为ATF6siRNA(图3)。

2.4 敲低ATF6后GRP78、Chop表达降低

为了进一步验证ATF6的敲除效果, 我们观察敲低ATF6后对于下游蛋白GRP78和Chop的影响。Western blot结果显示, 低氧无法促进ATF6敲低组的GRP78、Chop蛋白的表达升高, 低氧+ATF6siRNA组的GRP78、Chop与常氧对照组相比无明显改变, 不具有统计学差异($P > 0.05$)(图4)。结果表明, 转染抑制了ATF6下游基因的表达, 进一步验证了ATF6的敲低效果, 证实转染细胞可用于后续实验。

2.5 敲低ATF6后抑制低氧导致的表型转化

为了探究ATF6对于低氧诱导表型转化的调控机制, 我们按照转染siRNA分为三组: 未转染组、NC转染组、ATF6siRNA组, 并分别置于常氧条件下和低氧条件下培养。Western blot结果显示, 无论是否敲低ATF6, 低氧都能够导致 α -SMA的表达降低, 低氧对照组、低氧+ATF6siRNA组的 α -SMA蛋白表达分别下降为常氧对照组的47%和77%, 具有统计学差异($P < 0.05$)。但是敲低ATF6能够抑制低氧导致的 α -SMA表达降低, 低氧+ATF6siRNA组为低氧对照组的162%, 具有统计学差异($P < 0.05$)。通过免疫荧光检测发现, 敲低ATF6抑制了低氧导致的 α -SMA形态变化, 在常氧对照组中可以观察到明显的肌丝结构, 细胞呈长梭型。在低氧对照组中, α -SMA分布模糊分散, 无法观察到明显的细胞肌丝, 细胞形态变大并且不规则。低氧+ATF6siRNA组仍然可以清楚地看到呈细丝状, 细胞为长梭型(图5)。结果提示, 敲低

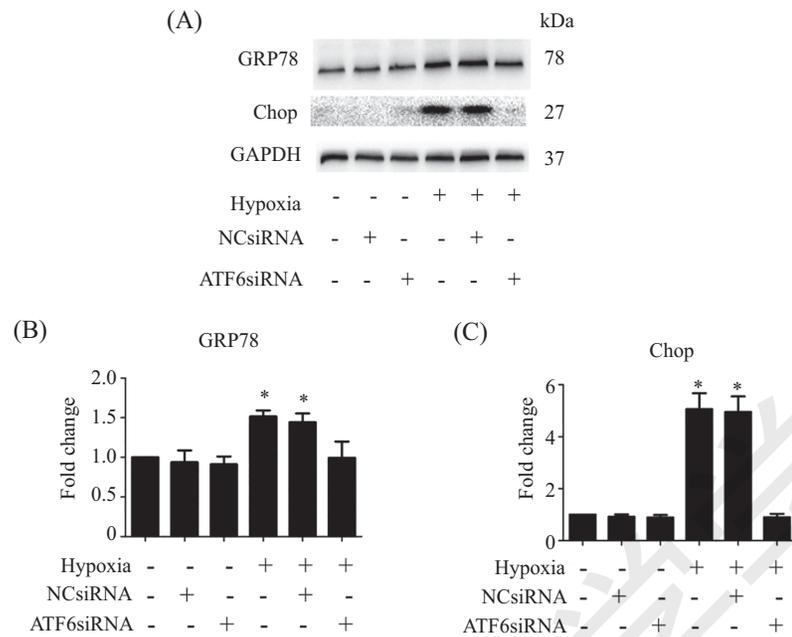


A: 免疫荧光检测CY3siRNA(红色)转染效率, DAPI(蓝色)细胞核染色; B: PCR检测ATF6 mRNA抑制率, $*P < 0.05$, 与对照组相比; C: Western blot检测ATF6蛋白抑制率; D: 灰度分析ATF6蛋白变化; $*P < 0.05$, 与对照组相比。

A: CY3siRNA (red) transfection efficiency by immunofluorescence, nuclear staining by DAPI (blue); B: inhibition rate of ATF6 mRNA by PCR after transfection, $*P < 0.05$ vs control group; C: determination of ATF6 protein level by Western blot after transfection; D: gray-value of ATF6 protein, $*P < 0.05$ vs control group.

图3 siRNA转染效率以及ATF6 mRNA、蛋白抑制率

Fig.3 The siRNA transfection efficiency and the inhibition rates of ATF6 mRNA and protein level



A: 敲低ATF6后Western blot检测后低氧导致的蛋白GRP78、Chop变化; B、C: 灰度分析蛋白GRP78、Chop表达变化, * $P < 0.05$, 与常氧对照组相比。
A: determination of GRP78, Chop protein levels by Western blot after ATF6 knockdown; B: gray-value of GRP78, Chop protein levels; * $P < 0.05$ vs the normoxia group.

图4 敲低ATF6后低氧对GRP78、Chop的影响

Fig.4 The effects of hypoxia on GRP78 and Chop protein levels after ATF6 knockdown

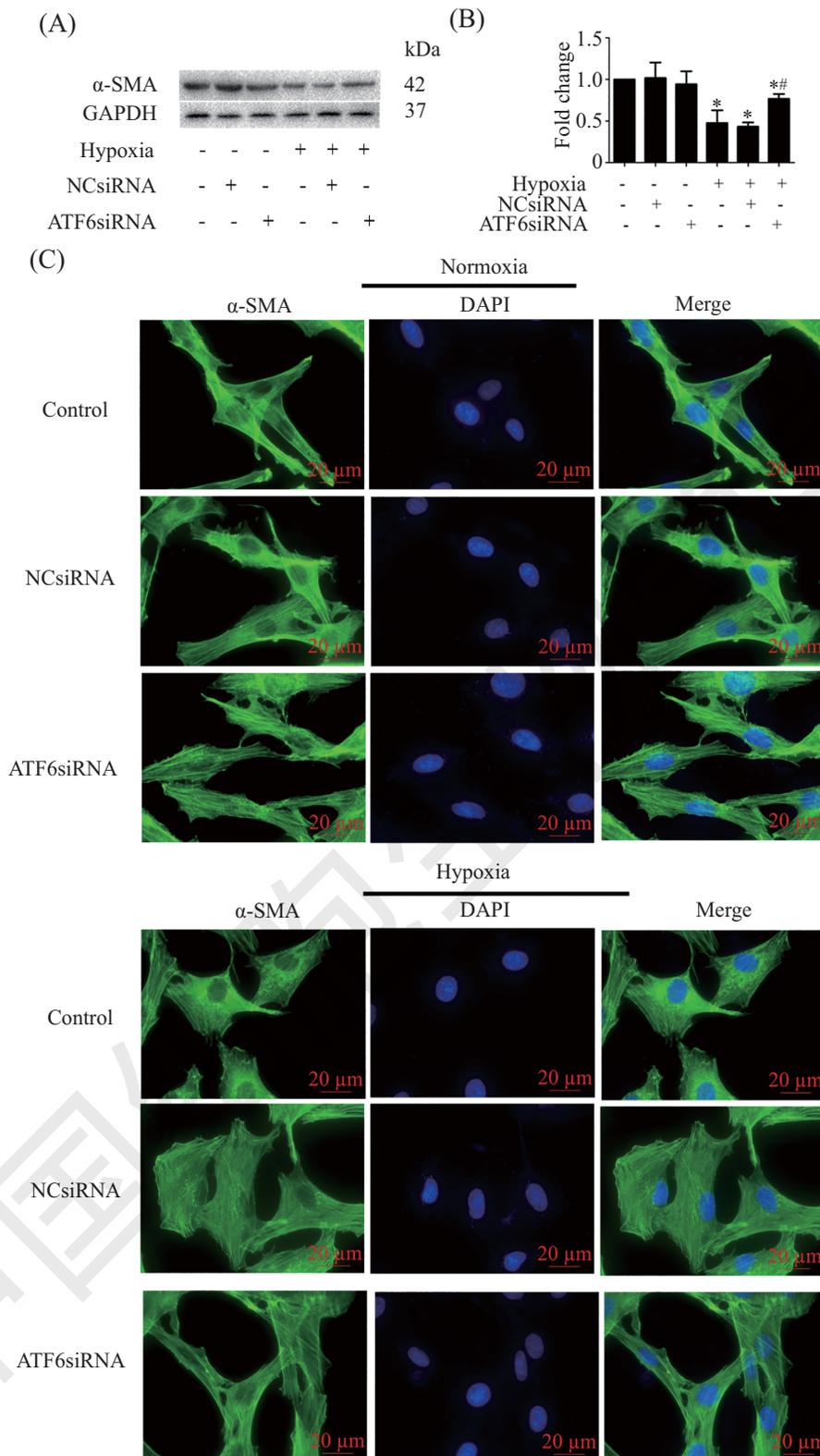
ATF6抑制了低氧诱导的表型转化。

3 讨论

肺动脉高压作为一类难治性疾病, 75%的患者死于诊断后五年之内, 原因是由于缺乏早期诊断和治疗的依据。平滑肌细胞表型转化属于HPH早期的病理过程, 探究表型转化的发生发展机制对于人们更进一步认识HPH具有重要作用。既往报道显示, 平滑肌细胞功能与UPR相关, 这些报道集中关注于UPR对于平滑肌细胞增殖和迁移功能的影响^[13]。但有研究表明, 在不同分布部位的细胞中和不同诱发因素的情况下, UPR对于平滑肌的影响存在差异^[14]。目前关于UPR对于平滑肌细胞功能影响的研究还比较局限, UPR具有多条通路, 每条通路对于平滑肌细胞功能的影响并不相同。本次实验尝试探究体外培养的PASMCs中ATF6与低氧诱导表型转化的关系, 阐明ATF6基因对于低氧状态下表型转化蛋白 α -SMA的影响。结果表明, 敲低ATF6基因能够抑制低氧诱导的表型转化。本次实验对低氧调节平滑肌细胞功能的机制进一步补充, 为推测ATF6基因在HPH发病中的作用提供了一定的理论基础。

既往的研究发现, UPR激活与低氧刺激相关^[15],

但目前ATF6通路在低氧不同时间的表达变化尚不清楚。在本实验中, 我们发现随着低氧时间的增加, ATF6的激活程度不断增加, 免疫荧光显示在低氧24 h ATF6向细胞核转移^[16], Western blot显示低氧48 h其蛋白表达量达到顶峰。此项结果与以往UPR动物模型的研究结果一致^[17]。但我们的结果表明了ATF6随着低氧的具体变化, 这有助于我们后续选择ATF6敲低的最佳时间点。GRP78属于UPR标志蛋白, 以前的研究显示, GRP78随着UPR激活, 与未折叠蛋白的疏水口袋端结合, 阻止这些未折叠蛋白聚合^[18]。Chop属于凋亡蛋白, 研究发现, 细胞未受到刺激时Chop表达极低^[19], 当UPR持续激活时, 细胞启动凋亡通路, 凋亡蛋白Chop开始表达^[20], 抑制细胞继续增殖并转向凋亡^[21]。我们的结果显示, 低氧促进GRP78不断增高, 低氧24 h表达量开始增高, 低氧48 h达到最大。我们结果显示, 当长时间的低氧刺激时, Chop蛋白表达增高, 低氧48 h时, Chop蛋白表达为对照组的429%, 可见当长时间低氧处理后, 此时细胞对于错误蛋白去除能力已经趋于饱和, 细胞启动凋亡通路。上述实验结果使我们了解ATF6通路蛋白在低氧不同时间下的表达变化, 有助于我们后续选择ATF6敲低的时间点。



A: 敲低ATF6后Western blot检测低氧对 α -SMA蛋白影响; B: 灰度分析 α -SMA蛋白水平; * P <0.05, 与常氧对照组相比; # P <0.05, 与低氧对照组相比; C: 免疫荧光检测 α -SMA(绿色)变化, DAPI(蓝色)细胞核染色。

A: determination of α -SMA protein level by Western blot after ATF6 knockdown; B: gray-value of α -SMA protein level, * P <0.05 vs the normoxia control group, # P <0.05 vs the hypoxia control group; C: distribution of α -SMA (green) by immunofluorescence, nucleus staining by DAPI (blue).

图5 敲低ATF6后低氧对 α -SMA表达的影响

Fig.5 The effects of hypoxia on α -SMA expressions after ATF6 knockdown

表型转化属于HPH早期的反应, α -SMA属于平滑肌细胞肌丝的主要成分, 在收缩型平滑肌细胞中大量表达^[22]。以前的研究显示, 当平滑肌细胞受到外界刺激时, 细胞向具有更强分泌增殖能力的合成型细胞转变, α -SMA的表达变少^[23]。我们的结果表明, α -SMA表达随着低氧时间延长不断下降, 在低氧24 h已经明显下调, 于低氧48 h达到最大。免疫荧光观察细胞在低氧刺激下形态由长梭型转为不规则型, 可见低氧刺激了PASMCs表型转化发生。这与之前研究表明的低氧导致 α -SMA表达下降相一致^[24]。此结果阐明了 α -SMA在不同低氧时间点的变化, 对于早期诊断HPH导致的表形转化提供了参考。目前的研究发现, α -SMA主要受到PDGF、TGF- β 等因素的调节^[25]。有研究显示, UPR也能够影响 α -SMA的表达, 但目前关于UPR对于平滑肌的影响研究集中在UPR其他通路, 如真核转录起始因子2 α (eukaryotic translation initiation factor 2 α , eIF2 α)。有研究发现, 在肾小球平滑肌细胞中eIF2 α 和 α -SMA具有一定的联系, 通过减弱eIF2 α 表达抑制蛋白翻译后降低了肾小球平滑肌细胞 α -SMA的表达^[26]。肺动脉平滑肌中ATF6对于表型转化蛋白 α -SMA的影响的研究非常少见。我们的结果表明, 在敲低*ATF6*基因后, 能够抑制低氧诱导的表型转化, α -SMA表达升高, 并且抑制了细胞形态由长梭型向不规则型转变。这与我们之前的推测相一致, 其原因可能为敲低*ATF6*导致UPR整体激活程度降低, UPR对细胞内蛋白的降解效率降低, 部分 α -SMA蛋白不会被迅速降解, 并且敲低*ATF6*抑制了凋亡蛋白Chop的产生, 其共同作用抑制低氧诱导的表型转化和 α -SMA蛋白下降。敲低*ATF6*是否同时影响了UPR其他通路(如eIF2 α)的表达, 这仍有待于人们进一步的研究。总体来说, *ATF6*通路能够抑制低氧诱导的表型转化, 这对于人们更完善的认识*ATF6*与表型转化的关系提供了新的依据。

综上所述, 本研究通过低氧构建了表型转化模型, 并观察到通过siRNA转染敲低*ATF6*后抑制低氧诱导的表型转化, 这对于后续进一步探讨低氧导致表型转化发生的机制提供了新的思路, *ATF6*可能成为治疗HPH新的基因靶点。

参考文献 (References)

1 Prins KW, Thenappan T. World health organization group I

- pulmonary hypertension: epidemiology and pathophysiology. *Cardiol Clin* 2016; 34(3): 363-74.
- 2 Aoshima D, Murata T, Hori M, Ozaki H. Time-dependent phenotypic and contractile changes of pulmonary artery in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Pharmacol Sci* 2009; 110(2): 182-90.
- 3 Wang TM, Chen KC, Hsu PY, Lin HF, Wang YS, Chen CY, *et al.* microRNA let-7g suppresses PDGF-induced conversion of vascular smooth muscle cell into the synthetic phenotype. *J Cell Mol Med* 2017; 21(12): 3592-601.
- 4 Sun HJ, Ren XS, Xiong XQ, Chen YZ, Zhao MX, Wang JJ, *et al.* NLRP3 inflammasome activation contributes to VSMC phenotypic transformation and proliferation in hypertension. *Cell Death Differ* 2017; 8(10): e3074.
- 5 Li YX, Run L, Shi T, Zhang YJ. CTRP9 regulates hypoxia-mediated human pulmonary artery smooth muscle cell proliferation, apoptosis and migration via TGF-beta1/ERK1/2 signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 490(4): 1319-25.
- 6 Zhu LH, Huang L, Zhang X, Zhang P, Zhang SM, Guan H, *et al.* Mindin regulates vascular smooth muscle cell phenotype and prevents neointima formation. *Clin Sci* 2015; 129(2): 129-45.
- 7 Maron BA, Brittain EL, Choudhary G, Gladwin MT. Redefining pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med* 2018; 6(3): 168-70.
- 8 Hampel M, Jakobi M, Schmitz L, Meyer U, Finkernagel F, Doehlemann G, *et al.* Unfolded protein response (UPR) regulator Cib1 controls expression of genes encoding secreted virulence factors in *Ustilago maydis*. *PLoS One* 2016; 11(4): e0153861.
- 9 Nishitoh H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. *J Biochem* 2012; 151(3): 217-9.
- 10 Hetz C, Papa FR. The unfolded protein response and cell fate control. *Mol Cell* 2018; 69(2): 169-81.
- 11 Lu Y, Xing QQ, Xu JY, Ding D, Zhao X. Astragalus polysaccharide modulates ER stress response in an OVA-LPS induced murine model of severe asthma. *Int J Biol Macromol* 2016; 93(Pt A): 995-1006.
- 12 Yuan LB, Hua CY, Gao S, Yin YL, Dai M, Meng HY, *et al.* Astragalus polysaccharides attenuate monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Am J Chin Med* 2017; 45(4): 773-89.
- 13 Furmanik M, Shanahan CM. Endoplasmic reticulum stress in arterial smooth muscle cells: A novel regulator of vascular disease. *Curr Cardiol Rev* 2017; 13(2): 94-105.
- 14 Koyama M, Furuhashi M, Ishimura S, Mita T, Fuseya T, Okazaki Y, *et al.* Reduction of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2014; 306(9): H1314-23.
- 15 Erguler K, Pieri M, Deltas C. A mathematical model of the unfolded protein stress response reveals the decision mechanism for recovery, adaptation and apoptosis. *BMC Syst Biol* 2013; 7: 16.
- 16 Chen M, Ma G, Yue Y, Wei Y, Li Q, Tong Z, *et al.* Downregulation of the miR-30 family microRNAs contributes to endoplasmic reticulum stress in cardiac muscle and vascular smooth muscle cells. *Int J Cardiol* 2014; 173(1): 65-73.

- 17 Xu D, Niu W, Luo Y, Zhang B, Liu M, Dong H, *et al.* Endogenous estrogen attenuates hypoxia-induced pulmonary hypertension by inhibiting pulmonary arterial vasoconstriction and pulmonary arterial smooth muscle cells proliferation. *Int J Med Sci* 2013; 10(6): 771-81.
- 18 Jia LX, Zhang WM, Li TT, Liu Y, Piao CM, Ma YC, *et al.* ER stress dependent microparticles derived from smooth muscle cells promote endothelial dysfunction during thoracic aortic aneurysm and dissection. *Clin Sci* 2017; 131(12): 1287-99.
- 19 Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nat Cell Biol* 2011; 13(3): 184-90.
- 20 Miyazaki-Anzai S, Masuda M, Demos-Davies KM, Keenan AL, Saunders SJ, Masuda R, *et al.* Endoplasmic reticulum stress effector CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein (CHOP) regulates chronic kidney disease-induced vascular calcification. *J Am Heart Assoc* 2014; 3(3): e000949.
- 21 Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP kinase. *Science* 1996; 272(5266): 1347-9.
- 22 Xu D, Gu JT, Yi B, Chen L, Wang GS, Qian GS, *et al.* Requirement of miR-9-dependent regulation of Myocd in PASMCs phenotypic modulation and proliferation induced by hepatopulmonary syndrome rat serum. *J Cell Mol Med* 2015; 19(10): 2453-61.
- 23 Ding Y, Zhang M, Zhang W, Lu Q, Cai Z, Song P, *et al.* AMP-activated protein kinase Alpha 2 deletion induces VSMC phenotypic switching and reduces features of atherosclerotic plaque stability. *Circ Res* 2016; 119(6): 718-30.
- 24 Zhang J, Hu H, Palma NL, Harrison JK, Mubarak KK, Carrie RD, *et al.* Hypoxia-induced endothelial CX3CL1 triggers lung smooth muscle cell phenotypic switching and proliferative expansion. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303(10): L912-22.
- 25 Vaillancourt M, Ruffenach G, Meloche J, Bonnet S. Adaptation and remodelling of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension. *Can J Cardiol* 2015; 31(4): 407-15.
- 26 John H, Nakajima S, Kato H, Yao J, Paton AW, Paton JC, *et al.* Unfolded protein response causes a phenotypic shift of inflamed glomerular cells toward redifferentiation through dual blockade of Akt and Smad signaling pathways. *Am J Pathol* 2012; 181(6): 1977-90.