

P22phox 通过调节 KLF4 的表达对缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞的作用*

古丽那扎尔 李倩 米娜瓦尔·胡加艾合买提 吴雷琪 阿加古丽·依米提

(新疆医科大学第一附属医院全科医学科, 新疆 乌鲁木齐 830054)

【摘要】 目的 探讨 P22phox 对缺氧诱导的人肺动脉平滑肌细胞(HPASMCs)的作用及其可能的作用机制。方法 体外常氧或者缺氧培养 HPASMCs,将 HPASMCs 随机分为空白对照组、si-NC+oe-NC 组、si-P22phox+oe-NC 组和 si-P22phox+oe-KLF4 组,按照分组进行细胞转染,随后进行缺氧培养。CCK-8 实验检测细胞活力;EdU 实验检测细胞增殖能力;细胞划痕实验检测细胞迁移;Transwell 实验检测细胞迁移;qRT-PCR 和 Western blot 检测细胞 P22phox 和 KLF4 的表达。结果 与常氧组相比,缺氧组细胞活力、EdU⁺ 细胞数、划痕愈合率和迁移细胞数显著升高,P22phox 和 KLF4 mRNA 表达以及 P22phox 和 KLF4 蛋白表达显著升高(均 $P < 0.05$)。与空白对照组相比,si-NC+oe-NC 组细胞各指标差异无统计学意义($P > 0.05$);与 si-NC+oe-NC 组相比,si-P22phox+oe-NC 组细胞 P22phox 和 KLF4 mRNA 表达显著降低,P22phox 和 KLF4 蛋白表达显著降低,细胞活力、EdU⁺ 细胞数、划痕愈合率和迁移细胞数显著降低(均 $P < 0.05$);与 si-P22phox+oe-NC 组相比,si-P22phox+oe-KLF4 组细胞 P22phox mRNA 和蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$),KLF4 mRNA 和蛋白表达显著升高,细胞活力、EdU⁺ 细胞数、划痕愈合率和迁移细胞数显著升高(均 $P < 0.05$)。结论 P22phox 通过上调 KLF4 的表达,促进缺氧诱导的 HPASMCs 增殖和迁移。

【关键词】 缺氧;肺动脉平滑肌细胞;P22phox;KLF4

【中图分类号】 R543.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.01.007

The effect of P22phox on hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cells by regulating the expression of KLF4

Gulinazhaer, LI Qian, MINAWAER Hujiaihemaiti, WU Leiqi, AJIAERGULI·Yimiti

(Department of General Medicine, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of P22phox on human pulmonary artery smooth muscle cells (HPASMCs) induced by hypoxia and its possible mechanism. **Methods** HPASMCs were cultured under normoxia or hypoxia in vitro. HPASMCs were randomly divided into blank control group, si-NC+oe-NC group, si-P22phox+oe-NC group and si-P22phox+oe-KLF4 group, The cells are transfected according to the grouping and then cultured under hypoxia. CCK-8 experiment was used to detect cell viability. EdU experiment was used to detect cell proliferation ability. Cell scratch experiment was used to detect cell migration. Transwell experiment was used to detect cell migration. qRT-PCR and Western blot were used to detect the expression of P22phox and KLF4 in cells. **Results** Compared with the normoxic group, the cell viability, EdU⁺ cell number, scratch healing rate and number of migrating cells in the hypoxia group were significantly increased ($P < 0.05$), and the expression of P22phox and KLF4 mRNA and the expression of P22phox and KLF4 protein were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the si-NC+oe-NC group had no significant difference in cell indicators ($P > 0.05$). Compared with the si-NC+oe-NC group, the expression of P22phox and KLF4 mRNA in si-P22phox+oe-NC group was significantly reduced ($P < 0.05$), the expression of P22phox and KLF4 protein was significantly reduced ($P < 0.05$), cell viability, EdU⁺ cell number,

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2019D01C013)

通信作者:米娜瓦尔·胡加艾合买提,主任医师,硕士生导师,E-mail:ray20180101@163.com

引用本文:古丽那扎尔,李倩,米娜瓦尔·胡加艾合买提,等.P22phox 通过调节 KLF4 的表达对缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞的作用[J].西部医学,2022,34(1):33-39. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.01.007

scratch healing rate and number of migrating cells were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the si-P22phox + oe-NC group, the expression of P22phox mRNA and protein in the si-P22phox + oe-KLF4 group was not statistically different ($P > 0.05$), while the expression of KLF4 mRNA and protein was significantly increased ($P < 0.05$), cell viability, EdU+ cell number, scratch healing rate and number of migrating cells were significantly increased ($P < 0.05$).

Conclusion P22phox promotes the proliferation and migration of HPASMCs induced by hypoxia by up-regulating the expression of KLF4.

【Key words】 Hypoxia; Pulmonary artery smooth muscle cells; P22phox; KLF4

肺动脉高压 (Pulmonary arterial hypertension, PAH) 是一种严重的病理生理综合征^[1]。缺氧是诱导 PAH 最重要的因素之一。在缺氧条件下,肺动脉平滑肌细胞 (Pulmonary artery smooth muscle cells, PSMCs) 的异常增殖和肥大是 PAH 肺血管重构的主要病理改变^[2]。因此,抑制 PSMCs 的异常增殖和迁移,在逆转 PAH 肺血管重塑中尤为重要。P22phox 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶 (Oxidase, NOX) 的一个亚基^[3]。Kraçun 等^[4]发现敲低 p22phox 可抑制地塞米松慢性给药导致的肺动脉高压和肺血管重塑,该研究结果提示,靶向抑制 p22phox 可能是改善 PAH 的一个潜在治疗策略。Krüppel 样因子 4 (Krüppel-like factor4, KLF4) 是一种含锌指的转录因子,参与体内许多重要的病理生理过程^[5]。有研究发现, KLF4 在缺氧性肺动脉高压小鼠和肺动脉高压患者肺小动脉平滑肌细胞中高表达。尽管该研究结果进一步揭示了缺氧诱导因子 1 α (Hypoxia-inducible factor 1 α , HIF1 α) 诱导的内皮细胞来源的血小板衍生生长因子-BB (Platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 促进了平滑肌细胞中 KLF4 水平的升高^[6],但低氧是否以及如何刺激 PSMCs 中 KLF4 基因表达的问题仍未得到阐明。因此,本研究旨在探讨 P22phox 和 KLF4 对缺氧诱导的 PSMC 的影响及其可能的作用机制,以期明确 PAH 的发病机制及开发新的 PAH 治疗靶点提供新的科学资料。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人肺动脉平滑肌细胞 (Human pulmonary artery smooth muscle cells, HPASMCs) 购自宁波明舟生物科技有限公司;平滑肌细胞专用培养基购自北京裕恒丰科技有限公司;P22phox siRNA 序列 (si-P22phox)、siRNA 阴性对照 (si-NC)、KLF4 过表达载体 (oe-KLF4) 及其阴性对照 (oe-NC) 购自武汉金开瑞生物工程有限公司;LipofectamineTM 2000 转染试剂购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;CCK-8 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;EdU 细胞增殖检测试剂盒购自上海索莱宝生物科技有限公司;PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser

(Perfect Real Time) 购自宝日医生物技术 (北京) 有限公司;2xSYBR Green qPCR MasterMix 购自美国 Bimake;P22phox 抗体和 KLF4 抗体购自英国 Abcam;GAPDH 抗体购自美国 GeneTex。

1.2 细胞培养及缺氧处理 将冻存的 HPASMCs 取出,37℃ 温水快速解冻,800 rpm 离心 3 min 后,弃去细胞上清液。含 10% FBS 的平滑肌细胞专用培养基重悬细胞沉淀,并将细胞悬液转移至培养皿中,常氧组细胞置于 37℃、21% O₂、5% CO₂、74% N₂ 培养箱中培养。缺氧组细胞置于 37℃、3% O₂、5% CO₂、92% N₂ 培养箱中培养。收集常氧培养的细胞及缺氧处理 24 h 的细胞进行后续实验操作。

1.3 细胞转染 将对数期生长的 HPASMCs 接种于 6 孔细胞培养板中,其中每孔细胞数量为 5×10^5 个。细胞于常氧条件下继续培养 24 h 后,弃去细胞旧培养基,重新添加含 10% FBS 的平滑肌细胞专用培养基,将细胞随机分为空白对照组 (不进行转染操作)、si-NC + oe-NC 组 (转染 si-NC 和 oe-NC)、si-P22phox + oe-NC 组 (转染 si-P22phox 和 oe-NC) 和 si-P22phox + oe-KLF4 组 (转染 si-P22phox 和 oe-KLF4),根据 LipofectamineTM 2000 转染试剂说明书进行转染操作。细胞继续培养 48 h 后,将细胞置于缺氧条件下培养 24 h,随后进行后续实验操作。

1.4 CCK-8 实验检测细胞活力 将对数期生长的 HPASMCs 接种于 96 孔细胞培养板中,其中每孔细胞数量为 5×10^3 个。细胞继续培养 24 h 后,根据 1.3 所示进行转染操作,转染 48 h 后,细胞置于缺氧条件下培养 24 h。随后根据 CCK-8 试剂盒说明书所示,向每孔细胞中加入 10 μ L CCK-8 溶液,细胞置于 37℃ 培养箱中孵育 4 h。用酶标仪测定各孔在 450 nm 处的光密度 (OD) 值。

1.5 EdU 实验检测细胞增殖能力 将对数期生长的 HPASMCs 接种于 96 孔细胞培养板中,其中每孔细胞数量为 5×10^3 个。细胞继续培养 24 h 后,根据 1.3 所示进行转染操作,转染 48 h 后,细胞置于缺氧条件下培养 24 h。弃去细胞旧培养基,加入 50 μ mo/L EdU 的培养基 37℃ 孵育 2 h。4% 多聚甲醛室温固定细胞 30 min。2 mg/mL 的甘氨酸,室温孵育 5 min,

PBS 清洗细胞。0.5% TritonX-100 室温孵育 10 min 后, PBS 清洗细胞。加入 1×Apollo 染色反应液, 室温避光孵育 30 min 后, 弃去反应液, 加入 0.5% TritonX-100 清洗细胞, DAPI 染核。荧光显微镜观察细胞发光情况。红色荧光为 EdU 阳性着色, 蓝色荧光为 DAPI 阳性着色。

1.6 细胞划痕实验检测细胞迁移 将对数期生长的 HPASMCs 接种于 6 孔细胞培养板中, 其中每孔细胞数量为 5×10^5 个。按照 1.3 所示进行转染操作, 转染 48 h 后, 用枪头沿着直尺垂直于培养板划线, PBS 清洗细胞, 重新加入无血清平滑肌细胞专用培养基, 显微镜观察并拍照, 此为 0 h 图片。细胞置于缺氧条件下培养 24 h 后, 显微镜观察并拍照, 此为 24 h 图片。Image J 软件分析细胞划痕面积, 细胞划痕愈合率 (%) = $(1 - \text{划痕面积}_{24\text{h}} / \text{划痕面积}_{0\text{h}}) \times 100\%$ 。

1.7 Transwell 实验检测细胞迁移 将 Transwell 小室放入 24 孔培养板中。无血清平滑肌细胞专用培养基重悬 HPASMCs, 取 2×10^4 个 HPASMCs 接种于 Transwell 小室中, 下室加入 800 μL 含 10% FBS 的平滑肌细胞专用培养基。细胞置于缺氧条件下培养 24 h 后, 取出小室, 800 μL 4% 多聚甲醛室温固定 30 min。1% 结晶紫染液室温染色 20 min。PBS 清洗细胞, 显微镜观察计数。

1.8 qRT-PCR 检测细胞 P22phox 和 KLF4 mRNA 表达 收集转染后的 HPASMCs, Trizol 法提取细胞总 RNA。根据 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) 说明书所示, 将提取的 RNA 进行反转录操作, 得到 cDNA。按照 2×SYBR Green qPCR MasterMix 使用说明书所示, 进行 qRT-PCR 实验。qRT-PCR 反应程序为: 95°C 2 min; 95°C 15 s, 58°C 15 s, 72°C 30 s, 40 个循环; 72°C 5 min。以 GAPDH mRNA 表达量为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 P22phox 和 KLF4 mRNA 表达。实验所

需引物见表 1。

表 1 qRT-PCR 实验所需引物序列

Table 1 The sequence of primers required for qRT-PCR experiment

引物名称	引物序列(5'-3')
P22phox-Forward primer	AGAGAATTCGGTGTGCGCAGGGTCC TCGTC
P22phox-Reverse primer	AGAGGATCCGCTGTAGACAGCCACT GAAGG
KLF4-Forward primer	AGGGAGAAGACACTGCGTCA
KLF4-Reverse primer	ACGATCGTCTTCCCCTCTTT
GAPDH-Forward primer	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT
GAPDH-Reverse primer	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT

1.9 Western blot 检测细胞 P22phox 和 KLF4 蛋白表达 收集转染后的 HPASMCs, 加入蛋白裂解液重悬细胞, 冰上裂解细胞 30 min。12000 rpm 离心 20 min 收集细胞上清液, BCA 法测定上清液蛋白浓度。取 25 μg 蛋白加入加样孔中, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 进行转膜操作, 将凝胶中的蛋白转印至 PVDF 膜上, 5% BSA 室温孵育 2 h。加入 P22phox 抗体(1:2000)、KLF4 抗体(1:1000)和 GAPDH 抗体(1:2000), 4°C 条件下孵育过夜。加入特异性二抗(1:5000)室温孵育 1 h。PVDF 膜经清洗后, 向膜上均匀滴加 ECL 发光液, 暗室曝光。以 GAPDH 为内参, 应用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度分析。

1.10 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件进行数据统计分析。计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验; 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, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧对 PASMCS 增殖的影响 CCK-8 实验和 EdU 实验检测细胞活力和增殖能力, 结果显示, 与常氧组相比, 缺氧组细胞活力显著升高, EdU⁺ 细胞数显著升高(均 $P < 0.05$), 见图 1。

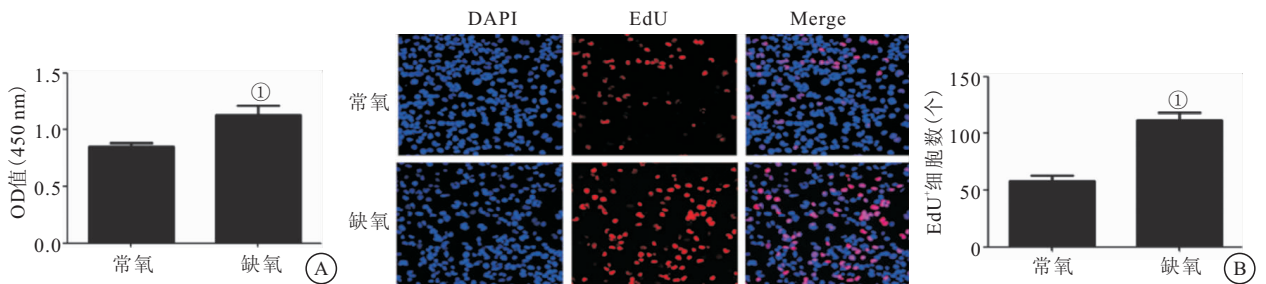


图 1 缺氧对肺动脉平滑肌细胞增殖的影响

Figure 1 The effect of hypoxia on the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells

注: A. CCK-8 检测细胞活力; B. EdU 实验检测细胞增殖(100×)。与常氧组比较, ① $P < 0.05$

2.2 缺氧对 PASMCS 迁移的影响 细胞划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移, 结果显示, 与常氧组相

比, 缺氧组细胞划痕愈合率显著升高, 迁移细胞数显著升高(均 $P < 0.05$), 见图 2。

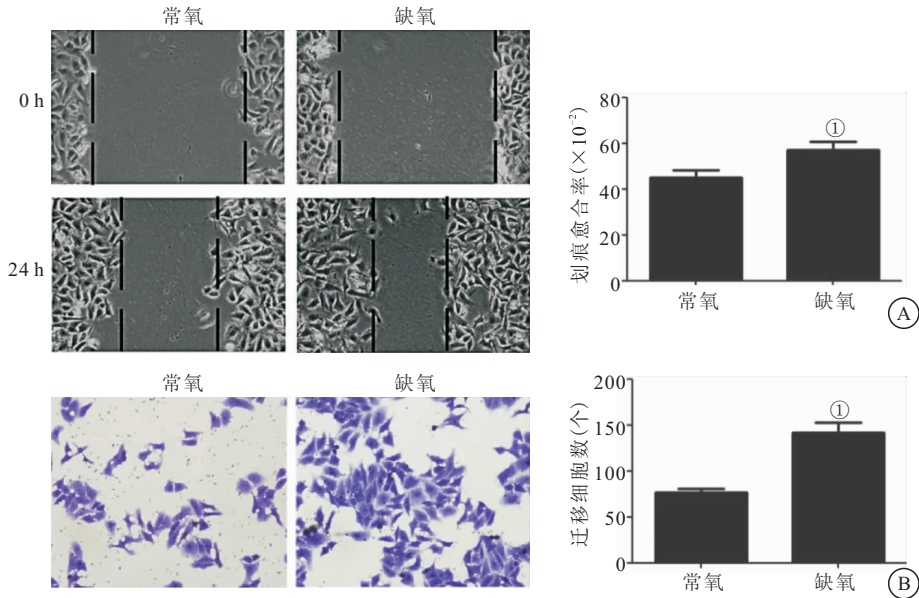


图2 缺氧对 PAMSCs 迁移的影响

Figure 2 The effect of hypoxia on the migration of pulmonary artery smooth muscle cells

注: A. 细胞划痕实验检测细胞迁移能力(200×); B. Transwell 实验检测细胞迁移能力(200×)。与常氧组比较, ① $P < 0.05$

2.3 缺氧对 PAMSCs 中 P22phox 和 KLF4 表达的影响 qRT-PCR 和 Western blot 检测细胞中 P22phox 和 KLF4 表达, 结果显示, 与常氧组相比, 缺

氧组细胞中 P22phox 和 KLF4 mRNA 表达显著升高, P22phox 和 KLF4 蛋白表达显著升高(均 $P < 0.05$), 见图 3。

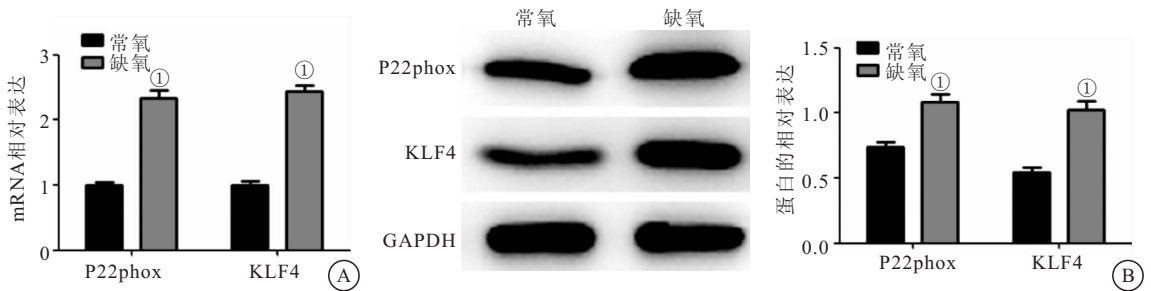


图3 缺氧对肺动脉平滑肌细胞 P22phox 和 KLF4 表达的影响

Figure 3 The effect of hypoxia on the expression of P22phox and KLF4 in pulmonary artery smooth muscle cells

注: A. qRT-PCR 检测细胞 P22phox 和 KLF4 mRNA 表达; B. Western blot 检测细胞 P22phox 和 KLF4 蛋白表达。与常氧组比较, ① $P < 0.05$

2.4 敲低 P22phox 对缺氧肺动脉平滑肌细胞中 KLF4 表达的影响 qRT-PCR 和 Western blot 检测细胞中 P22phox 和 KLF4 表达, 结果显示, 与空白对照组相比, si-NC + oe-NC 组细胞 P22phox 和 KLF4 mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), P22phox 和 KLF4 蛋白表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 si-NC + oe-NC 组相比, si-P22phox + oe-NC 组细胞 P22phox 和 KLF4 mRNA 表达显著降低, P22phox 和 KLF4 蛋白表达显著降低(均 $P < 0.05$); 与 si-P22phox + oe-NC 组相比, si-P22phox + oe-KLF4 组细胞 P22phox mRNA 和蛋白表达差异无统计学意义 ($P >$

0.05), KLF4 mRNA 和蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 见图 4。

2.5 P22phox/ KLF4 轴对缺氧肺动脉平滑肌细胞增殖的影响 CCK-8 实验和 EdU 实验检测细胞活力和增殖能力, 结果显示, 与空白对照组相比, si-NC + oe-NC 组细胞活力表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), EdU⁺ 细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 si-NC + oe-NC 组相比, si-P22phox + oe-NC 组细胞活力显著降低, EdU⁺ 细胞数显著降低(均 $P < 0.05$); 与 si-P22phox + oe-NC 组相比, si-P22phox + oe-KLF4 组细胞活力显著升高, EdU⁺ 细胞数显著升高(均 $P < 0.05$), 见图 5。

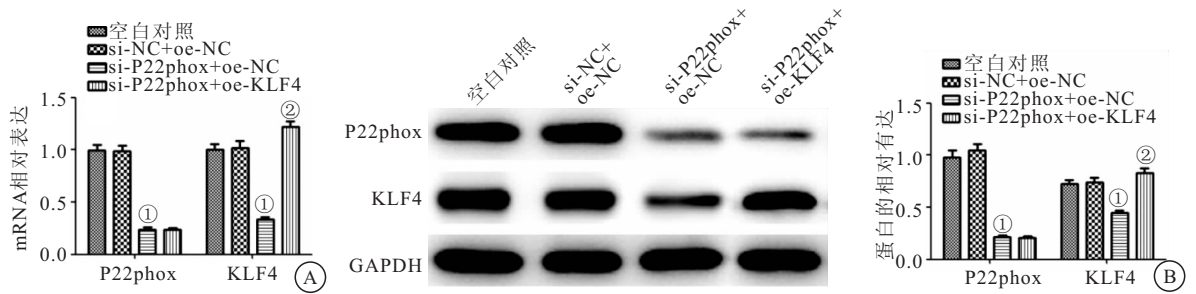


图 4 敲低 P22phox 对缺氧肺动脉平滑肌细胞中 KLF4 表达的影响

Figure 4 The effect of knocking down P22phox on the expression of KLF4 in hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells

注: A. qRT-PCR 检测缺氧细胞 P22phox 和 KLF4 mRNA 表达; B. Western blot 检测缺氧细胞 P22phox 和 KLF4 蛋白表达。与 si-NC+oe-NC 组比较, ① $P < 0.05$; 与 si-P22phox+oe-NC 组比较, ② $P < 0.05$

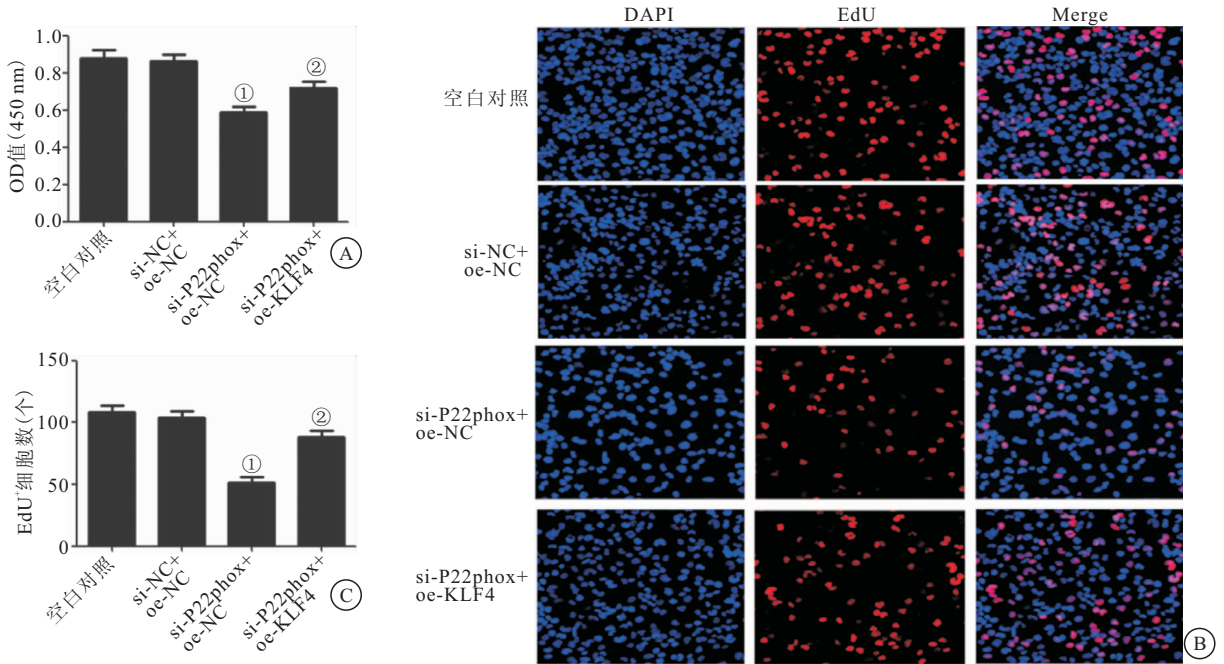


图 5 P22phox/ KLF4 轴对缺氧肺动脉平滑肌细胞增殖的影响

Figure 5 The effect of P22phox/ KLF4 axis on the proliferation of hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells

注: A. CCK-8 检测缺氧细胞活力; B~C. EdU 实验检测缺氧细胞增殖能力(100 \times)。与 si-NC+oe-NC 组比较, ① $P < 0.05$; 与 si-P22phox+oe-NC 组比较, ② $P < 0.05$

2.6 P22phox/ KLF4 轴对缺氧肺动脉平滑肌细胞迁移的影响 细胞划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移, 结果显示, 与空白对照组相比, si-NC+oe-NC 组细胞划痕愈合率和迁移细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 si-NC+oe-NC 组相比, si-P22phox+oe-NC 组细胞划痕愈合率和迁移细胞数显著降低 ($P < 0.05$); 与 si-P22phox+oe-NC 组相比, si-P22phox+oe-KLF4 组细胞划痕愈合率和迁移细胞数显著升高 ($P < 0.05$), 见图 6。

3 讨论

PAH 血管功能障碍的主要特征包括血管收缩、血管壁重塑和原位血栓形成, 从而导致肺血管阻力增加。血管病变主要通过内膜增生、中膜肥大、外膜增

生、炎症、血栓形成和丛状病变的发展影响远端肺动脉^[7]。缺氧诱导的 PSMCs 的过度增殖和迁移被认为是干预 PAH 相关血管重塑的一个有前途的靶点^[8-9], 因此有必要研究 PSMCs 增殖和迁移相关的分子机制, 以期开发 PAH 治疗靶点提供新的科学资料。

内皮细胞和其他血管细胞中的超氧化物歧化酶和过氧化氢等活性氧的一个主要来源是 NOX 家族。这个蛋白家族的第一个成员 NOX2 与 P22phox 一起形成细胞色素 b558, 作为 NOX 的催化核心^[10]。目前的研究结果表明, 对氧磷可通过上调血管中 P22phox 的表达导致血管内皮功能障碍^[11]。Pena 等^[12]的研究结果显示, 慢性间歇性低压缺氧可诱导大鼠心肌组织

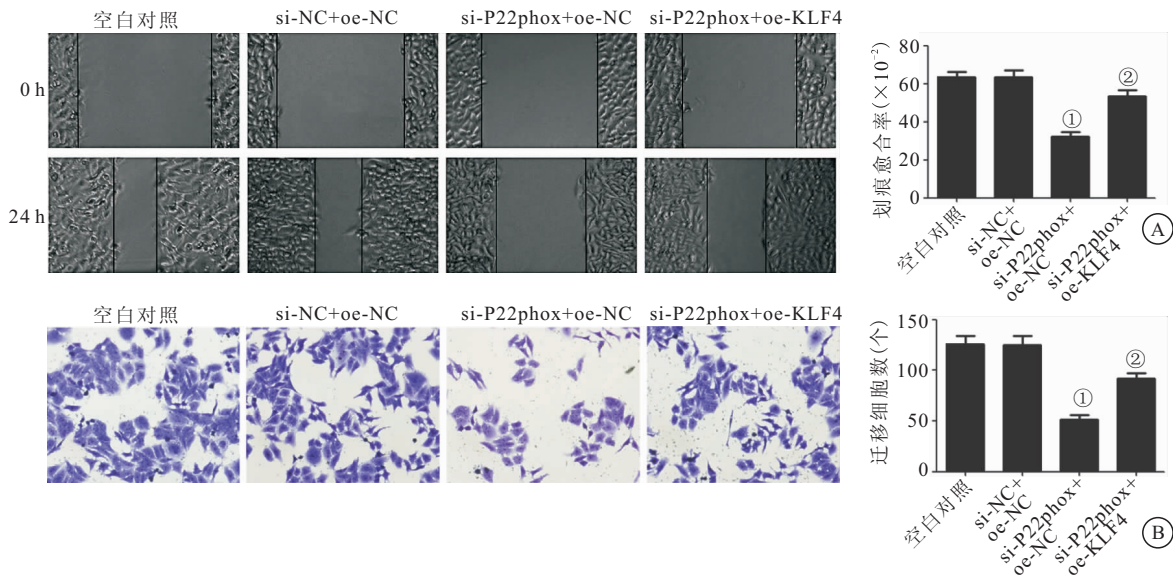


图 6 P22phox/ KLF4 轴对缺氧肺动脉平滑肌细胞迁移的影响

Figure 6 The effect of P22phox/ KLF4 axis on the migration of hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells

注：A. 细胞划痕实验检测缺氧细胞迁移能力(200×)；B. Transwell 实验检测缺氧细胞迁移能力(200×)。与 si-NC+oe-NC 组比较，①P<0.05；与 si-P22phox+oe-NC 组比较，②P<0.05

中 P22phox 表达上调，P22phox 可能在缺氧诱导的相关病理生理过程中发挥重要作用。已有相关的证据显示，P22phox 在缺氧条件下可促进内皮细胞增殖、迁移和血管生成。体内实验结果显示，低氧诱导的 PAH 小鼠肺和心脏组织中 P22phox 表达增加，而敲低 P22phox 对低氧诱导的 PAH 小鼠具有保护作用^[13]。此外，Nagaraj 等^[14]的研究结果显示，在慢性阻塞性肺疾病患者中，P22phox 的表达与平均肺动脉压、氧合指数呈正相关。在慢性缺氧环境下，P22phox 缺失与右心室功能改善和肺血管重塑减少有关。本研究结果显示，缺氧可诱导 HPASMCs 增殖和迁移，还可上调细胞中 P22phox 的表达。进一步实验结果显示，敲低 P22phox 可抑制缺氧诱导的 HPASMCs 增殖和迁移。该研究结果表明，P22phox 可促进缺氧条件下 HPASMCs 增殖和迁移，可能是治疗 PAH 肺动脉重塑的重要靶点。

KLF4 与许多重要的细胞过程有关，如细胞增殖、分化和炎症等其他生物学活动^[15]。以前的研究已经证明，KLF4 参与调控血管平滑肌细胞表型转化，并能促进细胞增殖和迁移能力^[16]。下调细胞中 KLF4 的表达可抑制血管平滑肌细胞异常增殖和迁移^[17-18]。目前，已有证据显示，长期缺氧可导致血管平滑肌细胞增殖速度大于凋亡，最终导致不可逆的肺血管重塑^[19]。而在缺氧条件下血管平滑肌细胞中 KLF4 表达增加，敲低 KLF4 可抑制血管平滑肌细胞的迁移^[20]。目前，已有相关研究证明，KLF4 在香烟烟雾

提取物诱导的 PAH 大鼠的肺动脉中表达上调，敲低 KLF4 可以预防和改善大鼠 PAH 的进展^[21]。本研究结果显示，缺氧诱导的 HPASMCs 中 KLF4 表达上调。另外，已有研究表明，敲低 P22phox 通过下调 KLF4 表达抑制血管紧张素 II 诱导的血管平滑肌细胞增殖和迁移^[22]。本研究结果显示，在缺氧诱导的 HPASMCs 中，敲低 P22phox 可下调细胞中 KLF4 表达。进一步实验结果表明，过表达 KLF4 可逆转敲低 P22phox 对缺氧 HPASMCs 的作用，促进 HPASMCs 增殖和迁移。本研究结果还表明，P22phox 可通过上调 KLF4 表达促进缺氧条件下 HPASMCs 增殖和迁移，P22phox/ KLF4 轴可能是治疗 PAH 肺动脉重塑的重要靶点。

4 结论

本研究结果显示，缺氧可诱导 HPASMCs 增殖和迁移，还可上调 HPASMCs 中 P22phox 和 KLF4 的表达。P22phox 可通过上调 KLF4 表达促进缺氧条件下 HPASMCs 增殖和迁移。该研究结果为明确 PAH 血管重塑分子机制及开发新的 PAH 治疗靶点提供了新的科学依据。

【参考文献】

[1] 朱珊英,朱国斌.肺动脉高压发病机制新进展[J].心血管病学进展,2020,41(3):292-295.
 [2] 周琴怡,龚邵新,彭琴,等.肺动脉平滑肌细胞:肺动脉高压的关键治疗靶点[J].中国动脉硬化杂志,2021,29(6):543-547.
 [3] BELAMBRI SA, ROLAS L, RAAD H, et al. NADPH oxidase

- activation in neutrophils: Role of the phosphorylation of its subunits[J]. *Eur J Clin Invest*, 2018, 48(2):e12951-12959.
- [4] KRAČUN D, KLOP M, KNIRSCH A, *et al*. NADPH oxidases and HIF1 promote cardiac dysfunction and pulmonary hypertension in response to glucocorticoid excess[J]. *Redox Biol*, 2020, 34(1):1015-1026.
- [5] 黄志华. KLF4 与炎症反应[J]. *国际泌尿系统杂志*, 2019(1): 190-193.
- [6] SHEIKH AQ, SADDOUK FZ, NTOKOU A, *et al*. Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Regulation of SMC Progenitors in Pulmonary Hypertension[J]. *Cell Rep*, 2018, 23(4): 1152-1165.
- [7] GALIÈ N, CHANNICK RN, FRANTZ RP, *et al*. Risk stratification and medical therapy of pulmonary arterial hypertension[J]. *Eur Respir J*, 2019, 53(1):1801-1808.
- [8] 曾闵, 易世江, 王野峰, 等. 硫化氢抑制缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖及迁移和促进凋亡的实验研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2020, 39(10):1258-1263.
- [9] 刘礼姣, 谢利剑. 丹参酮 II A 治疗肺动脉高压作用机制[J]. *儿科药理学杂志*, 2021, 27(6):60-63.
- [10] BUVELOT H, JAQUET V, KRAUSE KH. Mammalian NADPH Oxidases[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1982(3):17-36.
- [11] 刘玉玲, 汪煜华, 张秀芹, 等. 染料木素拮抗对氧磷诱导的大鼠胸主动脉组织 p22phox 表达上调[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(9):1292-1298.
- [12] PENA E, SIQUES P, BRITO J, *et al*. Nox2 Upregulation and p38 α MAPK Activation in Right Ventricular Hypertrophy of Rats Exposed to Long-Term Chronic Intermittent Hypobaric Hypoxia[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(22):8576-8588.
- [13] ZHANG Z, TRAUTZ B, KRAČUN D, *et al*. Stabilization of p22phox by Hypoxia Promotes Pulmonary Hypertension[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30(1):56-73.
- [14] NAGARAJ C, TABELING C, NAGY BM, *et al*. Hypoxic vascular response and ventilation/perfusion matching in end-stage COPD may depend on p22phox[J]. *Eur Respir J*, 2017, 50(1): 1601-1614.
- [15] 杨清媛, 黄拓, 吴健, 等. KLF4 对内皮细胞功能影响及其机制研究的进展[J]. *心血管康复医学杂志*, 2021, 30(1):64-67.
- [16] 张杰, 陆文强, 孟立平. miR-449a 通过靶向 KLF4 蛋白导致血管平滑肌细胞表型转化[J]. *中华病理学杂志*, 2020(2):180-181-182.
- [17] 何丽, 黄梅, 杨彩琴, 等. 松油烯-4-醇干预 KLF4 信号改善高糖诱导 VSMCs 氧化应激损伤的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(6):839-844.
- [18] 周静, 徐慧敏, 黄鑫涛, 等. 银杏叶提取物 (EGb761) 通过调控 AMPK/KLF4 途径抑制血管平滑肌细胞表型转化[J]. *中国药理学杂志*, 2020, 55(8):604-610.
- [19] 李宜桐, 李勇. 低氧性肺动脉高压肺血管重塑机制的研究[J]. *医学信息*, 2020, 33(15):26-29.
- [20] SHAN F, HUANG Z, XIONG R, *et al*. HIF1 α -induced upregulation of KLF4 promotes migration of human vascular smooth muscle cells under hypoxia[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(1): 141-150.
- [21] SUN D, DING D, LI Q, *et al*. The preventive and therapeutic effects of AAV1-KLF4-shRNA in cigarette smoke-induced pulmonary hypertension[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 25(2):1238-1251.
- [22] TANG Y, HUANG Q, LIU C, *et al*. p22phox promotes Ang-II-induced vascular smooth muscle cell phenotypic switch by regulating KLF4 expression[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 514(1):280-286.

(收稿日期:2021-05-13;修回日期:2021-11-18;编辑:郭翠)

(上接第 32 页)

- [15] ZHU N, CHEN H, ZHAO XY, *et al*. Effects of monocrotaline induced pulmonary hypertension on the expression of Hippo signaling pathway related molecules in rats [J]. *Chinese Journal of pathophysiology*, 2019, 35(7):1333-1338.
- [16] 程大艳, 吴美平. 血管平滑肌细胞表型对动脉硬化类疾病的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2018, 27(13):114-118.
- [17] 黎银焕, 张平, 陈卫民, 等. COPD 并发肺炎患者外周血内皮祖细胞数量和功能的变化及机制研究[J]. *广州医科大学学报*, 2020, 48(4):50-55.
- [18] 宋松松, 于复超, 张光昊, 等. 1-磷酸鞘氨醇在心血管疾病中的研究进展[J]. *实用老年医学*, 2017, 31(7):688-690, 700.
- [19] 任宇超, 张琳, 焦晓琪. 1-磷酸鞘氨醇通过 PI3K/Akt 信号通路对冠心病大鼠心肌细胞凋亡的调控作用研究[J]. *新中医*, 2020, 52(4):7-10.
- [20] 蔡学定, 陈马云, 李文雅, 等. 姜黄素通过 NLRP3/Caspase-1/IL-1 β 轴对低氧性肺动脉高压的干预作用[J]. *温州医科大学学报*, 2020, 50(2):16-19, 25.
- [21] 陈延伟, 艾文, 李一禄, 等. 1-磷酸鞘氨醇在慢性阻塞性肺疾病大鼠肺部炎症作用的研究[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2015(36):11-14.
- [22] 杨扬, 夏冬琴, 王维. 抑制剂 PD98059 阻断 MAPK/ERK 信号通路对结肠癌细胞增殖抑制和凋亡促进作用的研究[J]. *结肠直肠肛门外科*, 2019, 25(6):657-661, 667.
- [23] 刘敏, 谢巍伟, 郑维, 等. 雌二醇与 ESR1 靶向结合通过 ERK 信号通路调控软骨细胞的增殖[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(0):134-143.
- [24] 刘迪, 于子翔, 张寒雪, 等. 矢车菊素-3-O-葡萄糖苷干预 Caspase 级联反应抑制 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡[J]. *营养学报*, 2020, 42(4):63-67.
- [25] 赵龙, 李勇, 夏书月. 1-磷酸鞘氨醇信号对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺泡扩大作用的影响[J]. *国际呼吸杂志*, 2019, 39(20): 1526-1531.

(投稿日期:2020-12-29;修回日期:2021-02-06;编辑:郭翠)