

# 骨桥蛋白通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路调控低氧诱导的肺动脉平滑肌细胞自噬和增殖的机制探讨

丁琦<sup>1</sup>, 刘川川<sup>2</sup>, 王泽<sup>3</sup>, 周锐<sup>1</sup>, 刘辉琦<sup>1</sup>, 陈辛玲<sup>4</sup>, 王生兰<sup>1</sup>

<sup>1</sup>青海大学医学部, 青海西宁 810001; <sup>2</sup>青海大学附属医院包虫病实验室, 青海西宁 810001; <sup>3</sup>中国人民武装警察部队河北省总队医院, 河北石家庄 050011; <sup>4</sup>重庆市开州区人民医院, 重庆 405499

**摘要:**背景 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)可参与低氧引起的血管重塑,使肺动脉压力升高。但 OPN 调控低氧诱导的肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PSMCs)自噬在低氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)形成中的作用机制尚不明确。目的 探讨低氧条件下 OPN 对 PSMCs 增殖及通过 PI3K/AKT/mTOR 通路对 PSMCs 自噬的调控作用。方法 原代分离 PSMCs,采用免疫细胞化学法进行平滑肌细胞鉴定。将细胞分为常氧对照组(Normoxia)、低氧对照组(Hypoxia)、低氧+OPN 干扰空病毒组(H+OPN EV)、低氧+OPN 干扰慢病毒组(H+OPN shRNA)、低氧+PI3K 抑制剂 LY294002 组(H+LY)。各组分别用 EdU 阳性标记率法检测细胞增殖能力;Western blot 法检测各组 PSMCs 中的 OPN、PI3K、AKT、mTOR 及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3B 的表达;透射电镜、免疫荧光法观察各组 PSMCs 自噬情况。结果 与 Normoxia 组相比, Hypoxia 组 OPN、PI3K、AKT、mTOR、Beclin1、LC3B 蛋白表达量升高( $P<0.05$ ),细胞增殖能力增强( $P<0.05$ ),自噬小体数量增多,LC3B、Beclin1 红色荧光强度增强( $P<0.05$ )。与 Hypoxia 组相比, H+OPN EV 组各项指标无统计学差异( $P>0.05$ ),而 H+OPN shRNA 组和 H+LY 组 OPN、PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达量降低( $P<0.05$ ), Beclin1、LC3B 蛋白表达量升高( $P<0.05$ ),细胞增殖能力减弱( $P<0.05$ ),自噬小体数量增多,LC3B、Beclin1 红色荧光强度增强( $P<0.05$ )。结论 在低氧条件下,OPN 可促进 PSMCs 增殖并通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制 PSMCs 自噬。

**关键词:** 低氧;骨桥蛋白;细胞自噬;细胞增殖;PI3K/AKT/mTOR 信号通路

中图分类号: R544.1

文献标志码: A

文章编号: 2095-5227(2023)05-0533-09

DOI: 10.3969/j.issn.2095-5227.2023.05.015

引用本文: 丁琦, 刘川川, 王泽, 等. 骨桥蛋白通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路调控低氧诱导的肺动脉平滑肌细胞自噬和增殖的机制探讨 [J]. 解放军医学院学报, 2023, 44 (5): 533-540, 548.

## OPN regulates hypoxia-induced autophagy and proliferation in pulmonary artery smooth muscle cells through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

DING Qi<sup>1</sup>, LIU Chuanchuan<sup>2</sup>, WANG Ze<sup>3</sup>, ZHOU Rui<sup>1</sup>, LIU Huiqi<sup>1</sup>, CHEN Xinling<sup>4</sup>, WANG Shenglan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Medical Department of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China; <sup>2</sup>Hydatidosis Laboratory, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China; <sup>3</sup>Hebei Province Corps Hospital of Chinese Armed Police Force, Shijiazhuang 050011, Hebei Province, China; <sup>4</sup>Chongqing Kaizhou District People's Hospital, Chongqing 405499, China

Corresponding author: WANG Shenglan. Email: [zlw6996@163.com](mailto:zlw6996@163.com)

**Abstract: Background** Osteopontin (OPN) can participate in the vascular remodeling induced by hypoxia and increase the pulmonary artery pressure. However, the mechanism of OPN regulating autophagy of hypoxic induced pulmonary artery smooth muscle cells (PSMCs) in the formation of hypoxic pulmonary hypertension (HPH) remains unclear. **Objective** To study the role of OPN in PSMCs proliferation and autophagy through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway at the hypoxia condition. **Methods** PSMCs were isolated and smooth muscle cells were identified by immunocytochemistry. The cells were divided into Normoxia control group (Normoxia), Hypoxia control group (Hypoxia), Hypoxia + OPN interference empty virus group (H + OPN EV), Hypoxia + OPN interference lentivirus group (H + OPN shRNA), Hypoxia + PI3K inhibitor LY294002 group (H + LY). EdU positive labeling rate was used to detect cell proliferation. The expression levels of OPN, PI3K, AKT, mTOR and autophagy-related proteins Beclin1 and LC3B in PSMCs were detected by Western blot. The autophagy of PSMCs in each group was observed by transmission electron microscopy and immunofluorescence. **Results** Compared with the Normoxia group, the expression levels of OPN, PI3K, AKT, mTOR, Beclin1 and LC3B significantly increased in the Hypoxia group ( $P<0.05$ ), the proliferation of PSMCs was enhanced ( $P<0.05$ ), the number of autophagosomes increased, and the red fluorescence intensity of LC3B, Beclin1 was also enhanced ( $P<0.05$ ). Compared with the Hypoxia group, all indicators in H + OPN EV group had no statistically significant difference ( $P>0.05$ ), while the expression levels of OPN, PI3K, AKT and mTOR in the H + OPN shRNA group and H + LY group

收稿日期: 2022-09-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81860076); 青海省“昆仑英才 高端创新创业人才”项目(2023)

作者简介: 丁琦, 女, 在读硕士。研究方向: 慢性高原发病机制。Email: [1244939963@qq.com](mailto:1244939963@qq.com)

通信作者: 王生兰, 女, 硕士, 教授, 教研室主任。Email: [zlw6996@163.com](mailto:zlw6996@163.com)

decreased ( $P<0.05$ ), the expression levels of Beclin1 and LC3B increased ( $P<0.05$ ), the proliferation of PASMCs decreased ( $P<0.05$ ), the number of autophagosomes increased, and the red fluorescence intensity of LC3B, Beclin1 was enhanced ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Under hypoxia condition, OPN can promote the proliferation of PASMCs and inhibit autophagy in PASMCs through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

**Keywords:** hypoxia; osteopontin; autophagy; proliferation; PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

**Cited as:** Ding Q, Liu CHCH, Wang Z, et al. OPN regulates hypoxia-induced autophagy and proliferation in pulmonary artery smooth muscle cells through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. Acad J Chin PLA Med Sch, 2023, 44 (5) : 533-540, 548.

低氧性肺动脉高压 (hypoxic pulmonary hypertension, HPH) 是指因低氧导致肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs) 过度增殖而引起血管重构, 进而使其压力升高, 最终发展为右心衰竭的病理生理学过程<sup>[1-2]</sup>。骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 在血管重构中发挥重要调节作用<sup>[3]</sup>。OPN 是由 Spp1 编码的一种具有多种生理功能的整合素结合蛋白, 广泛表达于骨细胞、神经细胞、上皮细胞、内皮细胞、血管平滑肌细胞等各种细胞<sup>[4]</sup>。其生理功能与细胞增殖、自噬、黏附、迁移和血管生成等密切相关<sup>[5]</sup>。研究发现, OPN 可使 PASMCs 由收缩表型转变为合成表型, 使 PASMCs 增殖, 引起血管重塑, 导致肺动脉压力升高<sup>[6]</sup>。但在低氧条件下 OPN 调控 PASMCs 自噬在低氧性肺动脉高压形成中的作用机制尚未不明确。因此, 本研究以 OPN 通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路调控细胞自噬为切入点, 探讨 OPN 在低氧条件刺激下对 PASMCs 自噬、增殖的影响及其机制。

## 材料与方 法

**1 动物、主要材料及仪器** 6周 SPF级雄性 SD大鼠 10只 (130~150g, 由北京华阜康生物科技股份有限公司提供, 合格证号: 110322220100347884)。II型胶原酶 (C8150) 购于北京索莱宝公司; DMEM培养基 (PM150210) 购于武汉 Procell 公司; 免疫组化试剂盒 (E-IR-R215) 购于 Elabscience 公司; EdU-488 细胞增殖检测试剂盒 (C0071S)、EdU-555 细胞增殖检测试剂盒 (C0075S) 购于上海碧云天公司; 胎牛血清 (10099-141C) 购于美国 Gibco 公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (23227) 购于 Thermo Fisher Scientific 公司; OPN shRNA 干扰慢病毒 (VPSLV22 0223CHH1) 由赛业生物科技有限公司合成并包装;  $\beta$ -actin 内参抗体 (AC026) 购于武汉 Abclonal 公司; OPN(ab63856)、PI3K(ab191606)、Beclin1(ab207612)、LC3B(ab192890) 购于 Abcam 公司。超净工作台 (京东联哈尔公司, DL-CJ-INDII); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (美国 ThermoFisher 公司, Thermo HERAcell 150i);

三气培养箱 (德国 BINDER 公司, CB53); 蛋白电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司, 1645050), 台式离心机 (德国 Sigma 公司, 3K15); 倒置荧光显微镜 (德国蔡司 Zeiss 公司, Ax10 Axio)。

**2 原代 PASMCs 分离培养** 大鼠经 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后颈椎脱臼安乐死, 置于 75% 乙醇中消毒 3 min。在超净工作台中打开胸腔取出心肺组织, 置于盛有 4℃ 预冷无菌 PBS 的培养皿中。去除心脏并用 PBS 清洗肺组织, 将肺组织固定于含浮漂培养皿中。沿肺动脉主干向下逐级分离出二、三级肺动脉。将其转移至新的培养皿中, 清洗后纵向剪开肺小动脉, 用手术刀轻轻刮除内皮细胞, 用眼科镊分离外膜和中膜。将中层平滑肌组织剪成 1 mm<sup>3</sup> 大小的组织块, 随后将组织块转移至含有 1~2 mL 0.2% II 型胶原酶的 15 mL 离心管中, 将离心管置于 37℃ 水浴锅消化 1 h 左右, 观察组织块变为絮状时即可结束消化。消化结束后细胞用含有 20% FBS 和 1% PS 的 DMEM 培养基重悬, 置于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 湿润培养箱中培养。待细胞生长至培养瓶 70% 左右时, 用差速贴壁法纯化细胞。免疫细胞化学法进行鉴定, 第 3~5 代细胞用于后续实验研究。

**3 免疫细胞化学法鉴定 PASMCs** 对数生长期 PASMCs 用 0.2% 的胰蛋白酶消化, 将  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 6 孔细胞培养板。细胞贴壁后, 弃去原有培养基, 用 PBS 洗涤两次, 加入 4% 多聚甲醛室温固定细胞 15 min。后续按二步法免疫组化试剂盒步骤操作。用苏木素复染细胞核, 在荧光显微镜下观察拍照。

**4 细胞慢病毒转染和分组** 对数生长期 PASMCs 接种于 25 mm<sup>2</sup> 培养瓶中, 待细胞长至 30%~40% 时进行细胞转染 (干扰序列见表 1)。常氧对照组 (Normoxia) 加 DMEM 基础培养基; 低氧对照组 (Hypoxia) 加 DMEM 基础培养基; 低氧 + OPN 干扰空病毒组 (H + OPN EV) 加 OPN 空病毒; 低氧 + OPN 干扰慢病毒组 (H + OPN shRNA) 加 OPN 干扰慢病毒; 低氧 + PI3K 抑制剂 LY294002 组 (H + LY) 加含 PI3K 抑制剂 LY294002 的基础培养基。

转染 12 h 后在荧光显微镜下观察, 转染成功后更换培养液, 将细胞置于低氧培养箱 (37℃, 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>) 中培养 48 h。收集各组细胞用于后续实验。

表 1 干扰序列

Tab. 1 Interference sequence

名称	序列 (5'-3')
OPN 干扰序列	GATGTCCCTGACGGCCGAGGT ACCTCGGCCGTCAGGGACATC

**5 Western blot 检测 LC3B、Beclin1、OPN、PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达** 收集各组细胞, 加入适量 RIPA 裂解液在冰上裂解后收集上清。用 BCA 法检测蛋白浓度。以每孔 30 μg 蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 将目的蛋白转膜至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。将膜与 LC3B(1:1000)、Beclin1(1:1000)、OPN(1:1000)、PI3K(1:1000)、AKT(1:1000)、mTOR(1:1000)、β-actin(1:1500) 抗体 4℃ 冰箱孵育过夜。次日 TBST 洗膜 3 次后加入二抗室温孵育 1 h。洗涤后用 ECL 超敏发光液在凝胶成像仪中显影并保存图像, 用 Image J 软件分析条带灰度值, 以 β-actin 为内参计算蛋白相对表达量。

**6 细胞免疫荧光染色** 对数生长期 PSMCs 接种于激光共聚焦专用培养皿, 待细胞贴壁后根据分组进行干预。收集 5 组细胞, PBS 洗涤后加入 4% 多聚甲醛室温固定 15 min。PBS 洗去多聚甲醛后, 加入 0.25% Triton X-100 通透液室温通透 30 min。随后滴加 3% BSA 封闭室温封闭 30 min。弃去封闭液, 加入 Beclin1(1:200)、LC3B(1:200) 一抗 4℃ 孵育过夜。次日, 细胞经 PBS 洗涤后加入 Cy3 标记山羊抗兔二抗 (1:200) 室温避光孵育 1 h。PBS 洗涤后滴加 DAPI 避光染细胞核 5 min。PBS 洗去多余的 DAPI, 在激光共聚焦显微镜下观察并采集图像。

**7 透射电镜** 收集 5 组细胞, 加入 3% 戊二醛固定液于 4℃ 固定 24 h, 加入 1% 四氧化锇再固定 2 h。将固定好的样品浸入丙酮逐级脱水, 脱水完成后用环氧树脂包埋。将样品制备成 50 nm 切片, 切片用柠檬酸铅染色后置于 JEM-1400FLASH 透射电镜下观察并采集图像。自噬体特征: 双层或多层膜滤泡状结构, 内含细胞质成分。

**8 EdU 检测细胞增殖** 将对数生长期 PSMCs 用 0.2% 胰蛋白酶消化, 将 4 × 10<sup>3</sup> 个细胞接种于 24 孔细胞培养板, 待细胞贴壁后进行相应干预处理, 每组设置 3 个复孔。培养 48 h 后, 每孔加入

200 μL 终浓度为 10 μmol/L EdU 工作液, 置于培养箱中继续孵育 2 h。随后, 用 4% 多聚甲醛室温固定细胞 15 min, 后续按 EdU 细胞增殖检测试剂盒说明书操作。在荧光显微镜下观察, 每组随机选择 5 个视野拍照。

**9 统计学分析** 实验结果采用 Graph Pad Prism 8.0.2 软件进行统计分析和图形绘制。服从正态分布数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 结果

**1 PSMCs 的免疫学鉴定** 免疫细胞化学染色结果显示, 观察到细胞呈典型的峰谷样生长, 99% 的细胞均能表达 α-SMA, 表明培养的细胞为平滑肌细胞。见图 1。

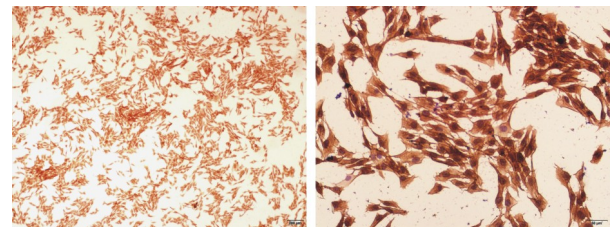


图 1 α-SMA 免疫细胞化学染色鉴定

Fig.1 α-SMA Immunocytochemical staining

**2 干扰 OPN 表达后 PSMCs 中 OPN、Beclin1、LC3B、PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达水平** Western blot 实验结果表明, 与 Normoxia 组相比, 低氧处理的 PSMCs 中 OPN、PI3K、AKT、mTOR 及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3B 的蛋白表达水平均升高 (P < 0.05); 与 Hypoxia 组相比, H + OPN EV 组 OPN、PI3K、AKT、mTOR 及自噬相关蛋白 Beclin1、LC3B 的蛋白表达水平无统计学差异 (P > 0.05), H + OPN shRNA 组 OPN、PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达降低 (P < 0.05), 自噬相关蛋白 Beclin1、LC3B 表达增加 (P < 0.05)。见图 2。

**3 使用 PI3K 抑制剂后 PSMCs 中 OPN、Beclin1、LC3B、PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达水平** Western blot 实验结果表明, 与 Hypoxia 组相比, 低氧下加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后, OPN、PI3K、AKT、mTOR 表达降低 (P < 0.05), 自噬相关蛋白 Beclin1、LC3B 表达增加 (P < 0.05)。见图 3。

**4 细胞免疫荧光法观察各组细胞自噬蛋白表达的情况** 为进一步观察各组细胞自噬相关蛋白变化情况, 免疫荧光染色法检测 PSMCs 中 LC3B、Beclin1 表达。结果显示, 5 组 PSMCs 中 LC3B、Beclin1 阳性均定位于细胞质。与 Normoxia 组相

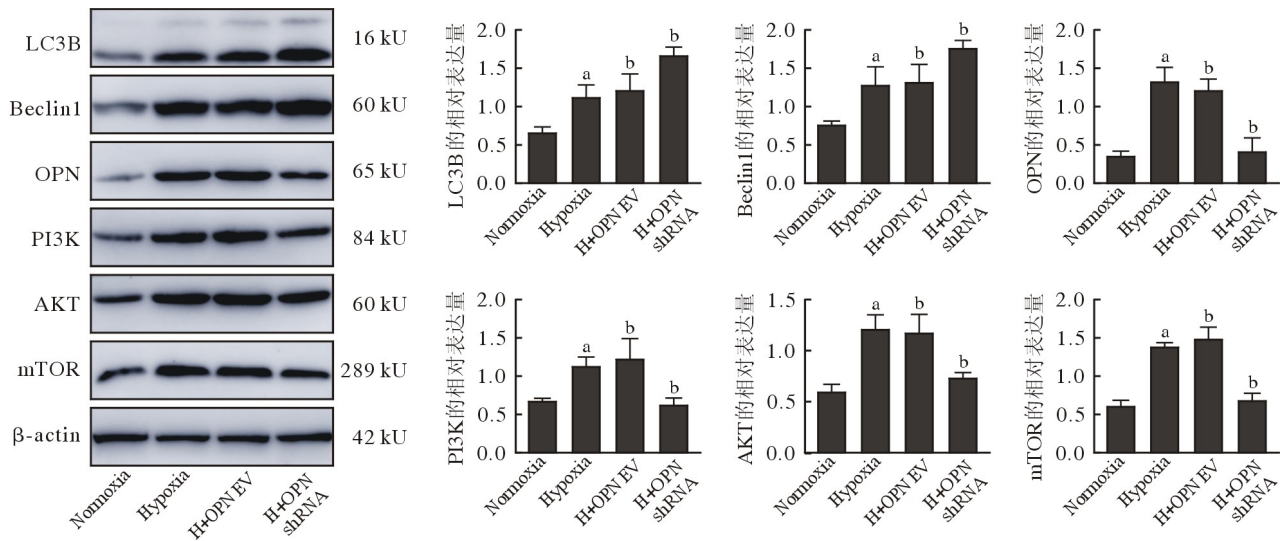


图 2 各组细胞 PI3K、AKT、mTOR、OPN 及自噬相关蛋白表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 常氧对照组; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs 低氧对照组

Fig.2 Expression levels of PI3K, AKT, mTOR, OPN and autophagy-related proteins in each group ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs Normoxia group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs Hypoxia group

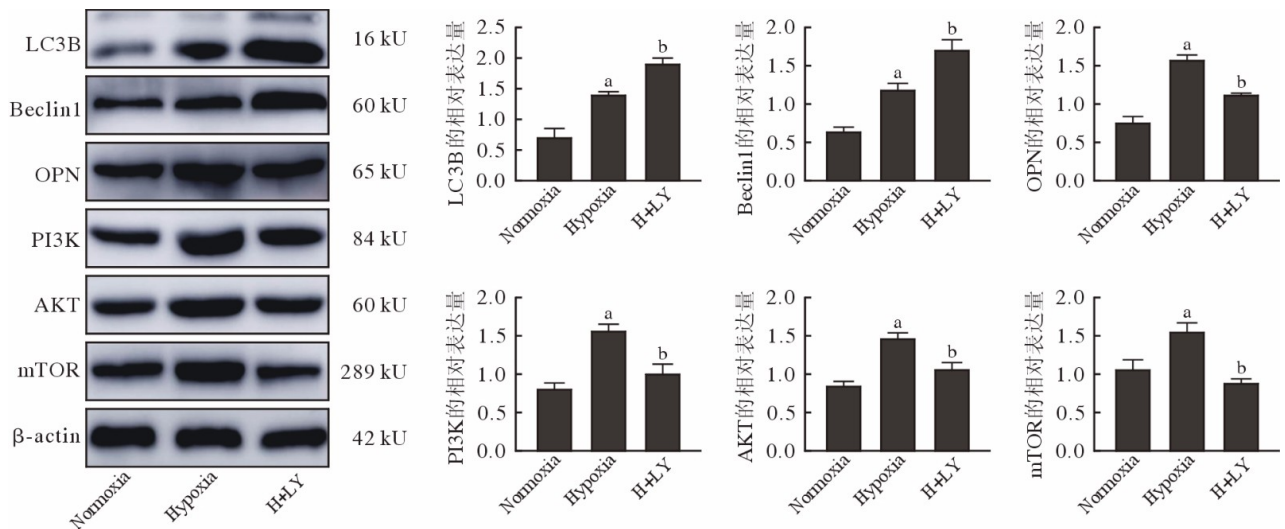


图 3 各组细胞 PI3K、AKT、mTOR、OPN 及自噬相关蛋白表达量 ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 常氧对照组; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs 低氧对照组

Fig.3 Expression levels of PI3K, AKT, mTOR, OPN and autophagy-related proteins in each group ( $\bar{x} \pm s, n=4$ )

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs normoxia; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs hypoxia

比, 低氧处理的 PSMCs 中 LC3B、Beclin1 红色荧光强度增强 ( $P < 0.05$ ); 与 Hypoxia 相比, H + OPN EV 组 LC3B、Beclin1 红色荧光强度无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), H + OPN shRNA 组 LC3B、Beclin1 红色荧光强度增强 ( $P < 0.05$ ), H + LY 组 LC3B、Beclin1 红色荧光强度增强 ( $P < 0.05$ )。见图 4、图 5。

**5 透射电镜观察各组细胞自噬小体形成情况** 为更加直观地观察各组细胞自噬的变化情况, 采用透射电镜观察各组细胞自噬小体形成情况。结果表明, Normoxia 组中存在少量自噬小体 (↑), 粗面内质网轻度扩张 (↑); Hypoxia 组中自噬小体数量

较 Normoxia 组增多 (↑), 粗面内质网扩张呈囊状 (↑); H + OPN EV 组与 Hypoxia 组中自噬小体数量无统计学差异, 粗面内质网轻度扩张 (↑); H + OPN shRNA 组细胞质内有大量自噬小体 (↑), 线粒体轻度肿胀 (↑), 粗面内质网扩张呈囊状 (↑); H + LY 组细胞质内有大量自噬小体 (↑), 粗面内质网扩张呈囊状 (↑)。见图 6。

**6 各组细胞增殖能力** 为检测各组 PSMCs 增殖能力变化, 使用 EdU 细胞增殖检测试剂盒检测各组细胞增殖情况。结果显示, 与 Normoxia 组相比, Hypoxia 组细胞增殖能力增强 ( $P < 0.05$ ); 与

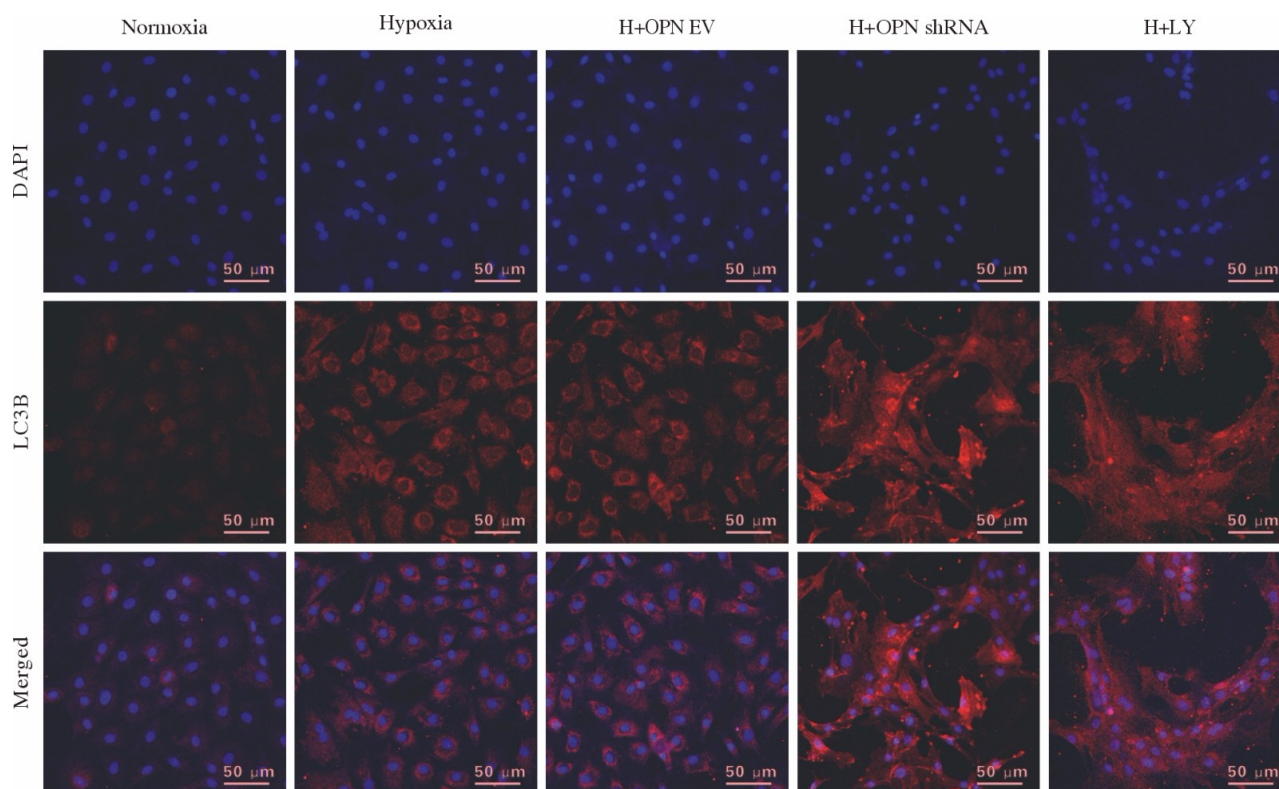


图4 细胞免疫荧光观察各组 PSMCs LC3B 表达情况

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 常氧对照组; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs 低氧对照组

Fig.4 LC3B expression of PSMCs in each group was observed by immunofluorescence

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs Normoxia group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs Hypoxia group

Hypoxia 组相比, H + OPN EV 组细胞增殖能力无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), H + OPN shRNA 组、H + LY 组细胞增殖能力均降低 ( $P < 0.05$ )。见图 7。

## 讨论

HPH 是一种以肺血管收缩和血管重构为主要特征的病理过程,其发病机制复杂,目前未完全阐明。研究发现其发病机制包括炎症介质因素、细胞因素(增殖、凋亡、自噬)、细胞外神经体液因素(神经递质、血管活性肽、细胞因子、生长因子等)、离子通道(钙通道、钾通道)和基因表达等<sup>[7-9]</sup>。

OPN 是一种多功能蛋白质,具有免疫调节、参与细胞的增殖和转移等作用<sup>[6]</sup>。OPN 经细胞释放后,其 RGD 序列可与靶细胞表面整合素受体结合,从而激活细胞内特异性信号传导系统,介导细胞间的自噬、炎症与免疫、增殖和凋亡,进而诱发各种疾病<sup>[3,10]</sup>。Wohlleben 等<sup>[11]</sup>研究发现,低氧可以诱导结直肠癌细胞 OPN 表达上调,放射抗性增加。Bellan 等<sup>[12]</sup>研究发现,结缔组织病引起肺动脉高压患者的 OPN 血浆值显著高于单纯结缔组织病患者,OPN 可能作为肺动脉高压的非侵入性疾病生物标志物发挥作用。Mura 等<sup>[13]</sup>研究表明,在重症肺动脉高压患者的肺组织中 OPN 表达升高,并可促进 PSMCs 增殖、增强血管重塑,且 OPN 表达水平与疾病严重程度相关。这与本研究结果一致,低氧条件下 PSMCs 内 OPN 表达增加,且 OPN 可以促进低氧诱导的 PSMCs 增殖。

自噬是指通过一系列途径将细胞质内的某些物质转移至溶酶体中进而被降解的过程<sup>[14]</sup>。自噬体的形成由Ⅲ类磷酸肌醇 3-激酶和自噬相关基因 6 (也称为 Beclin1, BECN1)启动<sup>[15]</sup>。自噬过程中,LC3 II 可参与自噬体形成并可与溶酶体融合,故作为自噬体的标记,且 LC3 II 的水平从某种程度上反映了自噬体的数量<sup>[16]</sup>。Beclin1、LC3 II 的含量可作为监测自噬活动的强度指标<sup>[15-16]</sup>。自噬与肺动脉高压的机制研究发现,自噬激活的程度可能

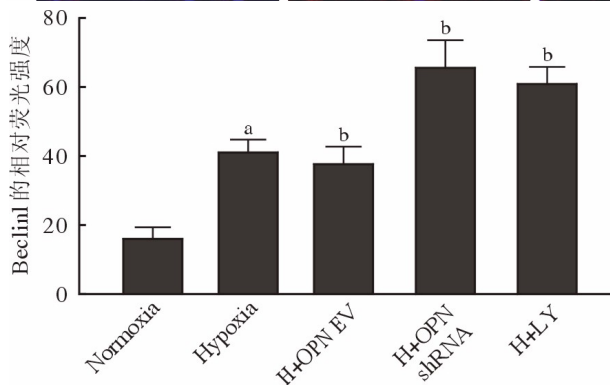
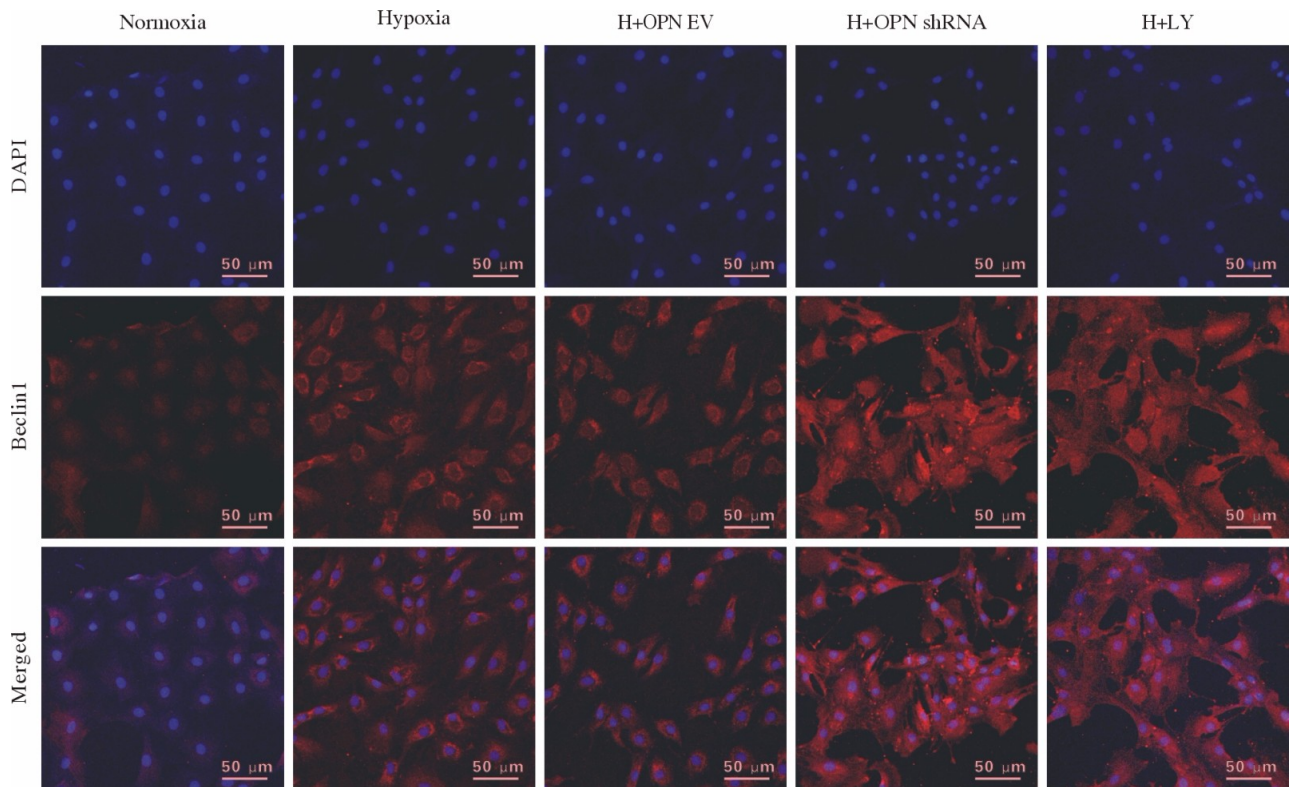


图 5 细胞免疫荧光观察各组 PASCs Beclin1 表达情况

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 常氧对照组; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs 低氧对照组

Fig.5 Beclin1 expression of PASCs in each group was observed by immunofluorescence

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs Normoxia group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs Hypoxia group

决定自噬是抑制因子还是启动子,在不同的实验条件下,自噬可能是肺动脉高压发展的一把双刃剑<sup>[16]</sup>。Yamanaka 等<sup>[17]</sup>研究发现,TP53 诱导的糖酵解和凋亡调节剂可以减弱 PASCs 自噬,能够

预防肺动脉高压。Zhai 等<sup>[18]</sup>发现,激活磷酸腺苷活化蛋白激酶可以通过抑制 NF- $\kappa$ B 介导的自噬来阻止野百合碱诱导的 PAH。Liu 等<sup>[19]</sup>研究发现,与正常大鼠相比,低氧大鼠肺动脉中 BECN-1 和 LC3B-II/I 比值显著增加,且二甲双胍可能通过抑制自噬来阻止低氧诱导的肺动脉高压的发展。这些文献报道表明,自噬可能参与了 HPH 形成。这与本研究结果一致,在低氧诱导的 PASCs 内自噬相关蛋白 LC3B、Beclin1 表达升高。

细胞自噬的发生受多种基因和信号通路的调控。目前相关文献显示 OPN 在不同的细胞中对自噬的调控有所不同,既可促进细胞自噬,也可抑制细胞自噬。Sun 等<sup>[20]</sup>研究发现,在大鼠模型中给予重组 OPN 可以激活蛛网膜下腔出血后神经元的自噬,此过程可能与 FAK-ERK 信号通路有关。Lin 等<sup>[21]</sup>在研究心房纤维化中发现,OPN 可以通过激活 AKT/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin 信号通路和抑制自



图 6 电镜观察各组 PASCs 超微结构变化 (20000 $\times$ )

N: 细胞核; Mi: 线粒体; RER: 粗面内质网; GB: 高尔基体; Atg: 自噬小体

Fig.6 Ultrastructural changes of PASCs in each group were observed by electron microscopy (20000 $\times$ )

N: nucleus; Mi: mitochondrion; RER: rough endoplasmic reticulum; GB: Golgi body; Atg: autophagosome

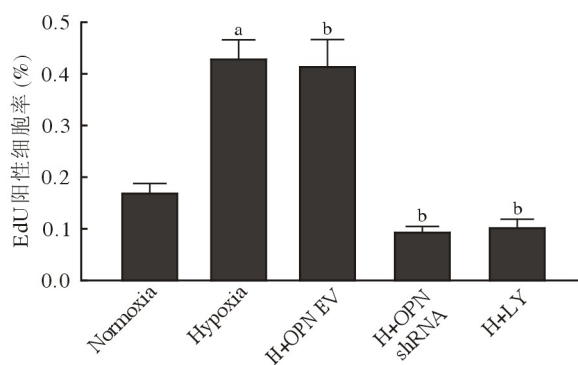
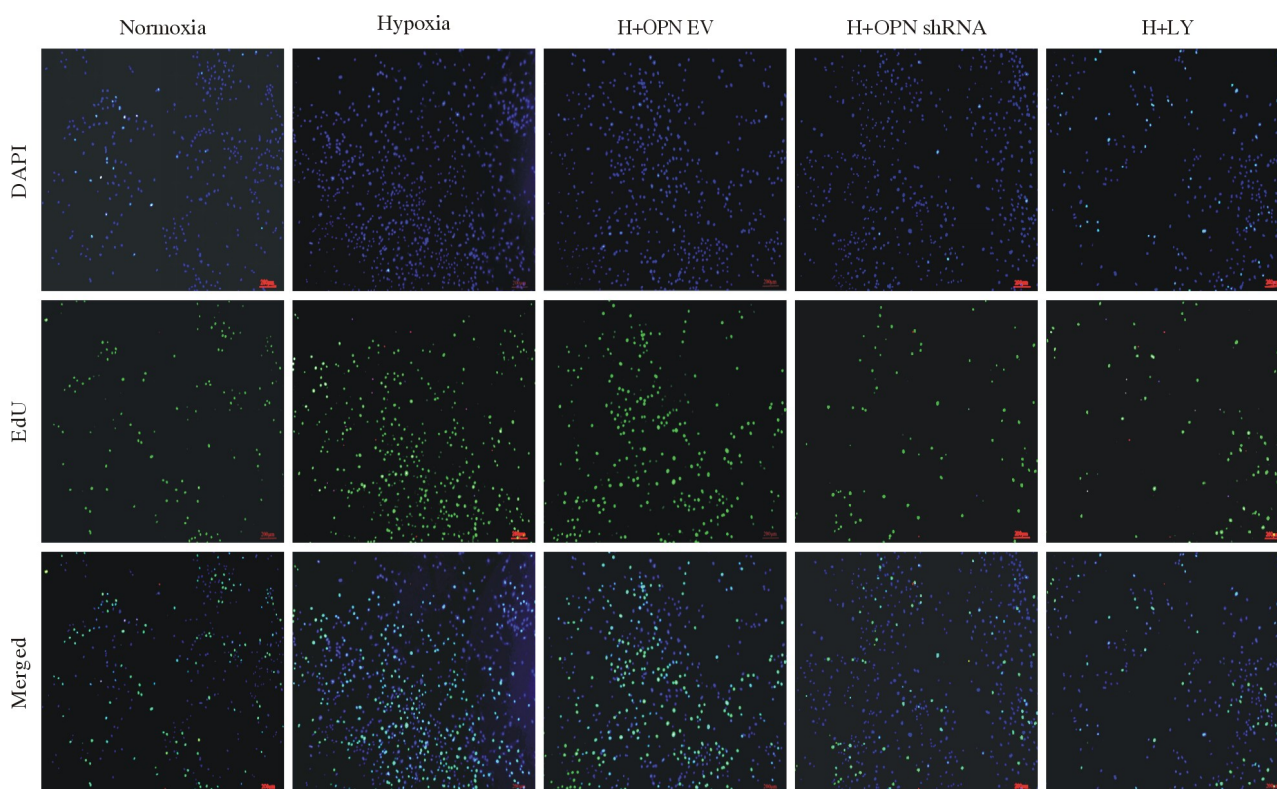


图 7 EdU 检测细胞增殖 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs 常氧对照组; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs 低氧对照组

Fig.7 Cell proliferation detected by EdU assay ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs Normoxia group; <sup>b</sup> $P < 0.05$ , vs Hypoxia group

噬, 实现促纤维化作用。Tang 等<sup>[22]</sup>在研究非酒精性脂肪性肝病的发病过程中发现, OPN 可作为自噬的负调节因子, 抑制自噬成熟, 加速脂质积累。本实验在低氧条件下使用 OPN 干扰慢病毒降低 OPN 表达后, 自噬相关指标表达升高, 说明 OPN 可以抑制低氧诱导的 SD 大鼠 PSMCs 自噬。

大量研究显示, OPN 可能通过多种信号转导通路调节细胞自噬。其中包括 p38MAPK、PI3K/AKT/mTOR、CD44 等途径<sup>[23-24]</sup>。其中最典型的是 PI3K/AKT/mTOR 信号通路。PI3K/AKT/mTOR 信号传导通路的活化可诱导细胞生长、增殖、迁移, 加快细胞周期, 抑制细胞凋亡, 调控细胞自

噬, 参与新生血管形成<sup>[24-26]</sup>。Peng 等<sup>[27]</sup>研究发现, NPS2390 可通过抑制下游 PI3K/AKT/mTOR 信号通路, 降低自噬蛋白和合成表型标记蛋白 OPN 的表达, 提高收缩表型标记蛋白  $\alpha$ -SMA 和钙调蛋白的表达。Zhang 等<sup>[28]</sup>研究发现, 在乳腺癌中 OPN 通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路调控细胞自噬, 且当 OPN 基因敲低后会抑制  $\alpha$ v $\beta$ 3 诱导的细胞迁移和迁徙, 而使 PI3K/AKT/mTOR 途径失活。本实验在低氧条件下使用 OPN 慢病毒降低 OPN 表达后, PI3K、AKT、mTOR 蛋白表达降低, 自噬相关指标表达升高; 当在低氧条件下加入 PI3K 抑制剂 LY294002 后, 自噬相关指标表达升高。这些结果表明 OPN 可能通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制低氧诱导的 PSMCs 自噬。

细胞增殖与细胞自噬之间具有密切联系<sup>[29]</sup>。有研究发现, eIF2 $\alpha$  可以通过加速自噬途径促进野百合碱诱导的 PAH 大鼠 PSMCs 的增殖和血管重塑<sup>[30]</sup>。刘琦<sup>[31]</sup>研究发现, 葛根素可能通过抑制自噬的活化而减轻低氧诱导的 PSMCs 异常增殖。商萍等<sup>[32]</sup>研究发现, 伞形酮在抑制低氧诱导的 PSMCs 自噬时可通过防止 PSMCs 的过度增殖减缓 HPAH 发展。Li 等<sup>[33]</sup>研究发现, mTOR 抑制剂可以上调 Beclin1 表达并激活 AMPK-ULK1 信号通路, 上调自噬标志 LC3 II/LC3 I 以激活细胞的自噬活动, 抑制 PSMCs 增殖。王莹等<sup>[34]</sup>研究发

现, 安石榴昔可以通过抑制 AKT/NF- $\kappa$ B/Cyclin D1 通路增强细胞自噬, 抑制大鼠气道平滑肌细胞增殖并诱导其凋亡。由此可知细胞自噬与细胞增殖紧密相关, 且当不同的因子调控细胞自噬时细胞增殖变化不同。本实验结果显示, OPN 可抑制低氧诱导的 PSMCs 自噬, 促进低氧诱导的 PSMCs 增殖。但在低氧条件下 OPN 调控的细胞自噬与增殖是否存在关系尚未明确, 有待进一步研究。

综上所述, 低氧环境下 OPN 可促进 PSMCs 增殖, 并且通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制 PSMCs 自噬。

**致谢** 感谢青海大学高原医学研究中心实验室提供实验平台。

**作者贡献** 丁琦: 细胞培养, 实验指标检测, 实验数据分析处理, 论文撰写; 陈辛玲、周锐: 细胞培养; 王泽: 实验数据分析处理; 王生兰、刘川川: 实验设计, 文章校对; 刘辉琦: 文章校对。

**利益冲突** 所有作者声明无利益冲突。

**数据共享声明** 本篇论文相关数据可依据合理理由从作者处获取, Email: 1244939963@qq.com。

#### 参考文献

- Sun L, Lin PR, Chen Y, et al. miR-182-3p/Myadm contribute to pulmonary artery hypertension vascular remodeling via a KLF4/p21-dependent mechanism [J]. *Theranostics*, 2020, 10 (12): 5581-5599.
- Liu CL, Chen X, Guo G, et al. Effects of intermittent normoxia on chronic hypoxic pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy in rats [J]. *High Alt Med Biol*, 2021, 22 (2): 184-192.
- Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin [J]. *Clin Biochem*, 2018, 59: 17-24.
- Lok ZSY, Lyle AN. Osteopontin in vascular disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019, 39 (4): 613-622.
- Lamort AS, Giopanou I, Psallidas I, et al. Osteopontin as a link between inflammation and cancer: the Thorax in the spotlight [J]. *Cells*, 2019, 8 (8): 815.
- Pei HW, Zhang HY, Tian C, et al. Proliferative vascular smooth muscle cells stimulate extracellular matrix production via osteopontin/p38 MAPK signaling pathway [J]. *Cardiology*, 2021, 146 (5): 646-655.
- Dong HR, Li XC, Cai MS, et al. Integrated bioinformatic analysis reveals the underlying molecular mechanism of and potential drugs for pulmonary arterial hypertension [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13 (10): 14234-14257.
- Barman SA, Li XY, Haigh S, et al. Galectin-3 is expressed in vascular smooth muscle cells and promotes pulmonary hypertension through changes in proliferation, apoptosis, and fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316 (5): L784-L797.
- Bussotti M, Marchese G. High altitude pulmonary hypertension [J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2018, 18 (3): 187-198.
- Vay SU, Olschewski DN, Petereit H, et al. Osteopontin regulates proliferation, migration, and survival of astrocytes depending on their activation phenotype [J]. *J Neurosci Res*, 2021, 99 (11): 2822-2843.
- Wohlleben G, Hauff K, Gasser M, et al. Hypoxia induces differential expression patterns of osteopontin and CD44 in colorectal carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39 (1): 442-448.
- Bellan M, Piccinino C, Tonello S, et al. Role of osteopontin as a potential biomarker of pulmonary arterial hypertension in patients with systemic sclerosis and other connective tissue diseases (CTDs) [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14 (5): 394.
- Mura M, Cecchini MJ, Joseph M, et al. Osteopontin lung gene expression is a marker of disease severity in pulmonary arterial hypertension [J]. *Respirology*, 2019, 24 (11): 1104-1110.
- Deng JY, Yang C, Wang Y, et al. Inositol pyrophosphates mediated the apoptosis induced by hypoxic injury in bone marrow-derived mesenchymal stem cells by autophagy [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2019, 10 (1): 159.
- Li W, Zhang LN. Regulation of ATG and autophagy initiation [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 41-65.
- Chen R, Jiang MP, Li B, et al. The role of autophagy in pulmonary hypertension: a double-edge sword [J]. *Apoptosis*, 2018, 23 (9/10): 459-469.
- Yamanaka R, Hoshino A, Fukai K, et al. TIGAR reduces smooth muscle cell autophagy to prevent pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2020, 319 (5): H1087-H1096.
- Zhai C, Shi W, Feng W, et al. Activation of AMPK prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by suppression of NF- $\kappa$ B-mediated autophagy activation [J]. *Life Sci*, 2018, 208: 87-95.
- Liu Y, Xu Y, Zhu JQ, et al. Metformin prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase [J]. *J Vasc Res*, 2019, 56 (3): 117-128.
- Sun CM, Enkhjargal B, Reis C, et al. Osteopontin-enhanced autophagy attenuates early brain injury via FAK-ERK pathway and improves long-term outcome after subarachnoid hemorrhage in rats [J]. *Cells*, 2019, 8 (9): 980.
- Lin RJ, Wu SH, Zhu D, et al. Osteopontin induces atrial fibrosis by activating Akt/GSK-3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway and suppressing autophagy [J]. *Life Sci*, 2020, 245: 117328.
- Tang M, Jiang Y, Jia HY, et al. Osteopontin acts as a negative regulator of autophagy accelerating lipid accumulation during the development of nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2020, 48 (1): 159-168.
- Bai RJ, Liu D, Li YS, et al. OPN inhibits autophagy through CD44, integrin and the MAPK pathway in osteoarthritic chondrocytes [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 919366.
- Feng FB, Qiu HY. Effects of Artesunate on chondrocyte proliferation, apoptosis and autophagy through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in rat models with rheumatoid arthritis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 1209-1220.
- 陈玲珑, 武垣伶, 张赛, 等. 三七总皂苷通过激活 PI3K/AKT/mTOR 信号通路调控低氧高二氧化碳环境下大鼠 PSMCs 的自噬和增殖 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37 (7): 1246-1251.

- (NGF) and NGF receptors in mesenchymal stem/stromal cells: impact on potential therapies [J]. *Stem Cells Transl Med*, 2021, 10 (7): 1008-1020.
- 7 Lee S, Hwang C, Marini S, et al. NGF-TrkA signaling dictates neural ingrowth and aberrant osteochondral differentiation after soft tissue trauma [J]. *Nat Commun*, 2021, 12 (1): 4939.
  - 8 Li Z, Meyers CA, Chang L, et al. Fracture repair requires TrkA signaling by skeletal sensory nerves [J]. *J Clin Invest*, 2019, 129 (12): 5137-5150.
  - 9 Liao L, Yang X, Su X, et al. Redundant miR-3077-5p and miR-705 mediate the shift of mesenchymal stem cell lineage commitment to adipocyte in osteoporosis bone marrow [J]. *Cell Death Dis*, 2013, 4 (4): e600.
  - 10 王雅迪, 张鹤扬, 秦巧臻, 等. 神经生长因子对小鼠颌骨骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化的影响 [J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2022, 23 (6): 407-414.
  - 11 崔国胜, 曾剑玉, 汤晓飞, 等. 神经生长因子对大鼠骨髓基质细胞成骨向分化的影响 [J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2012, 13 (5): 261-265.
  - 12 Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, et al. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives [J]. *Eur J Orthop Surg Traumatol*, 2018, 28 (3): 351-362.
  - 13 Ferro F, Spelat R, Shaw G, et al. Regenerative and anti-inflammatory potential of regularly fed, starved cells and extracellular vesicles in vivo [J]. *Cells*, 2022, 11 (17): 2696.
  - 14 Levi-montalcini R. Effects of mouse tumor transplantation on the nervous system [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1952, 55 (2): 330-344.
  - 15 Ho AD, Wagner W, Franke W. Heterogeneity of mesenchymal stromal cell preparations [J]. *Cytotherapy*, 2008, 10 (4): 320-330.
  - 16 Fang CN, Tan HQ, Song AB, et al. NGF/TrkA promotes the vitality, migration and adhesion of bone marrow stromal cells in hypoxia by regulating the Nrf2 pathway [J]. *Metab Brain Dis*, 2022, 37 (6): 2017-2026.
  - 17 Wang J, He C, Zhou T, et al. NGF increases VEGF expression and promotes cell proliferation via ERK1/2 and AKT signaling in Müller cells [J]. *Mol Vis*, 2016, 22: 254-263.
  - 18 Wei L, Cui L, Snider BJ, et al. Transplantation of embryonic stem cells overexpressing Bcl-2 promotes functional recovery after transient cerebral ischemia [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 19 (1/2): 183-193.
  - 19 Sortwell CE, Pitzer MR, Collier TJ. Time course of apoptotic cell death within mesencephalic cell suspension grafts: implications for improving grafted dopamine neuron survival [J]. *Exp Neurol*, 2000, 165 (2): 268-277.
  - 20 Wang LY, Zhang D, Ren YK, et al. Injectable hyaluronic acid hydrogel loaded with BMSC and NGF for traumatic brain injury treatment [J]. *Mater Today Bio*, 2022, 13: 100201.
  - 21 汤凯, 招文华, 尚奇, 等. 浓缩生长因子干预大鼠骨髓间充质干细胞的增殖、成骨分化及迁移 [J]. *中国组织工程研究*, 2022, 26 (31): 4935-4939.
  - 22 Xhima K, Markham-Coultes K, Hahn Kofoed R, et al. Ultrasound delivery of a TrkA agonist confers neuroprotection to alzheimer-associated pathologies [J]. *Brain*, 2022, 145 (8): 2806-2822.
  - 23 Tomlinson RE, Li Z, Zhang Q, et al. NGF-TrkA signaling by sensory nerves coordinates the vascularization and ossification of developing endochondral bone [J]. *Cell Rep*, 2016, 16 (10): 2723-2735.
  - 24 Rivera KO, Russo F, Boileau RM, et al. Local injections of  $\beta$ -NGF accelerates endochondral fracture repair by promoting cartilage to bone conversion [J]. *Sci Rep*, 2020, 10 (1): 22241.
  - 25 Kyeyune-Nyombi E, Lau KH, Baylink DJ, et al. 1, 25-Dihydroxyvitamin D3 stimulates both alkaline phosphatase gene transcription and mRNA stability in human bone cells [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 291 (2): 316-325.

(责任编辑: 施晓亚)

(上接第 540 页)

- 26 张馨怡, 刘文涛, 李利娟, 等. 氟通过AKT/mTOR/ULK1信号通路对破骨细胞自噬的影响 [J]. *解放军医学院学报*, 2022, 43 (9): 960-965.
- 27 Peng X, Wei C, Li HZ, et al. NPS2390, a selective calcium-sensing receptor antagonist controls the phenotypic modulation of hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells by regulating autophagy [J]. *J Transl Int Med*, 2019, 7 (2): 59-68.
- 28 Zhang H, Guo M, Chen JH, et al. Osteopontin knockdown inhibits  $\alpha$ ,  $\beta$ 3 integrin-induced cell migration and invasion and promotes apoptosis of breast cancer cells by inducing autophagy and inactivating the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 33 (4): 991-1002.
- 29 芮博文, 颜竞, 杨平珍. 细胞程序性死亡在血管平滑肌增殖中的研究进展 [J]. *解放军医学院学报*, 2020, 41 (9): 930-933.
- 30 Guo LY, Li YB, Tian Y, et al. eIF2 $\alpha$  promotes vascular remodeling via autophagy in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rats [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2799-2809.
- 31 刘琦. 葛根素通过抑制自噬对缺氧诱导的PASMCs增殖的影响 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨商业大学, 2020.
- 32 商萍, 孙帅波, 刘宝华. 伞形酮通过抑制RhoA/ROCK信号通路和自噬改善慢性低氧性肺动脉高压 [J]. *生理学报*, 2022, 74 (4): 555-562.
- 33 Li Y, Yang L, Dong L, et al. Crosstalk between the Akt/mTORC1 and NF- $\kappa$ B signaling pathways promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension by increasing DPP4 expression in PASMCs [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40 (10): 1322-1333.
- 34 王莹, 王荣环, 谢意. 安石榴苷通过Akt/NF- $\kappa$ B/Cyclin D1通路对幼龄哮喘大鼠气道平滑肌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2022, 43 (3): 376-380.

(责任编辑: 孟晓彤)