分类号：R56 密级：一般

U DC：616.2 编号：2010310159



**博士学位论文**

**HIF-1 上调大鼠肺动脉平滑肌细胞内 TRPC**

**表达的机制研究**

**研究生**： 付 欣

**导** **师**： 王 健 教授

**申请学位级别：**医学博士 **年** **级：**二零一零级

**学** 位 **专 业：**内科学 **研 究** 方 **向：**肺动脉高压

**论文提交日期：**2014 年 5 月 **论文答辩时间：**2014 年 5 月

**学 位 类** **型：**学术型 **学位授予单位：**广州医科大学

2014 年 5 月

**答辩委员会主席： 评 议 人：**



**博士学位论文**

**HIF-1 上调大鼠肺动脉平滑肌细胞内 TRPC**

**表达的机制研究**

**The mechanism of HIF1 upregulates TRPC expression in rat pulmonary arterial smooth muscle cells**



**研究生:** 付 欣

**导** 师：王 健 教授 **专** 业：呼吸内科学

广州医科大学·广州

2014 年 5 月

**目** 录

[中英文对照词汇表 1](#_bookmark0)

[中文摘要 3](#_bookmark1)

[英文摘要 7](#_bookmark2)

[前 言 12](#_bookmark3)

[第一部分 在慢性缺氧的大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中，HIF1 对 BMP4 表达的影响 16](#_bookmark4)

[材料与方法 16](#_bookmark5)

[结 果 30](#_bookmark6)

[讨 论 38](#_bookmark7)

[第二部分 HIF1 通过与 BMP4 5’-侧翼区 HRE 元件的结合调节 BMP4 表达 41](#_bookmark8)

[材料与方法 41](#_bookmark9)

[结 果 60](#_bookmark10)

[讨 论 65](#_bookmark11)

[第三部分 在慢性缺氧的大鼠 PASMCs 中，BMP4 调节 TRPC1，6 信号通路的研究 67](#_bookmark12)

[材料与方法 67](#_bookmark13)

[结 果 73](#_bookmark14)

[讨 论 86](#_bookmark15)

[第四部分 在慢性缺氧的人肺动脉平滑肌细胞中，HIF1、BMP4 对 TRPC1，6 表达的调节 89](#_bookmark16)

[材料与方法 89](#_bookmark17)

[结 果 95](#_bookmark18)

[讨 论 101](#_bookmark19)

[结 论 103](#_bookmark20)

[参考文献 104](#_bookmark21)

[综 述 112](#_bookmark22)

[在校期间发表论文 122](#_bookmark23)

[致 谢 123](#_bookmark24)

[学位论文原创性声明 124](#_bookmark25)

[学位论文知识产权权属声明 124](#_bookmark26)

[关于学位论文使用授权的说明 124](#_bookmark27)

中英文对照词汇表

**中英文对照词汇表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |
| CHPH | Chronic hypoxic pulmonary hypertension | 慢性低氧性肺动脉高  压 |
| COPD | Chronic obstructive pulmonary disease | 慢性阻塞性肺疾病 |
| PASMCs | Pulmonary arterial smooth muscle cells | 肺动脉平滑肌细胞 |
| [Ca2+]i | Intracellular Calcium concentration | 细胞内钙离子浓度 |
| TRPC | Transient receptor potential canonical channel | 经典瞬时受体电位通  道 |
| SOCC | Store-operated calcium channel | 钙池操纵性钙通道 |
| SOCE | Store-operated calcium entry | 钙池操纵性钙内流 |
| HIF-1α | Hypoxia Inducible Factor 1α | 缺氧诱导因子 1α |
| BMP4 | Bone Morphogenetic Protein 4 | 骨形态发生蛋白 4 |
| CH | Chronic hypoxia | 慢性缺氧 |
| HRE | Hypoxia response element | 缺氧反应元件 |
| dNTPs | Deoxynucleoside triphosphate | 脱氧三磷酸核苷 |
| PBS | Phosphate buffered saline | 磷酸盐缓冲盐液 |
| h | Hour | 小时 |
| DTT | Dithiothreitol | 二硫苏糖醇 |
| HEPES | 4-2-hydroxyethyL-1-piperazine  -ethanesulfonieacid | 4(2-羟乙基)-1-哌嗪乙烷磺酸 |
| BMPRII | Bone morphogenetic protein type II  receptor | 骨形态形成蛋白 II 型  受体 |
| ddH20 | Water distillated two times | 双蒸水 |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide | 二甲基亚砜 |
| DEPC | Diethyl pyrocarbonate | 焦碳酸二乙酯 |
| ER | Endoplasmic reticulum | 内质网 |
| siRNAs | Small interfering RNA | 小分子干扰 RNA |

1

广州医科大学博士学位论文

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| FBS | Fetal bovine serum | 胎牛血清 |
| BSA | Bovine serum albumin | 牛血清白蛋白 |
| ERK1/2 | Extracellular signal-regulated kinase | 胞外信号调节激酶 |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase | 细胞有丝分裂原活化  蛋白激酶 |
| kD | Kilodalton | 千道尔顿 |
| mRNA | Message RNA | 信使 RNA |
| HEK293 cell | Human embryo kidney 293 cell | 人胚肾 293 细胞 |
| SPSS | Statistical Package for Social Science | 社会科学统计学软件  包 |
| h | Hour | 小时 |
| min | Minute | 分钟 |
| rpm | Ration per minute | 每分钟转速 |
| EB | Ethidium bromide | 溴化乙锭 |
| TBST | Tris buffer saline plus tween 20 | Tris 缓冲液加吐温 20 |
| EMSA | Electrophoretic mobility shift assay | 电泳迁移率变动分析 |
| CHIP | Chromatin immunoprecipitation assay | 染色体免疫共沉淀 |
| Kb | Kilobase | 千碱基 |
| HRP | Horseradish peroxidase | 辣根过氧化物酶 |
| TEMED | Tetrametyl ethylenediamine | 四甲基乙二胺 |

2

**HIF-1上调大鼠肺动脉平滑肌细胞内TRPC**

**表达的机制研究**

**专业名称：呼吸内科研究生：付 欣**

**导 师：王 健 教授**

**中文摘要**

【研究背景】

肺动脉高压（pulmonary arterial hypertension, PAH）是一种以持续的肺动脉压力和血管重塑为特征的进行性疾病。前期研究表明，由SOCC所介导的钙离子内流所致的肺动脉平滑肌细胞（pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs）内钙离子浓度失衡是缺氧性肺动脉高压发病的关键环节，而SOCC是由经典瞬时受体电位通道（Transient Receptor Potential Canonical Channels,

TRPC）所组成。TRPC属于瞬时受体电位（Transient Receptor Potential, TRP）超家族，目前已经发现的TRPC蛋白有TRPC1-TRPC7七种亚型，其中在大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中表达的是TRPC1、TRPC4和TRPC6，而在缺氧下仅TRPC1和TRPC6表达上调。缺氧诱导因子1（hypoxia inducible factor 1, HIF1）是一个对缺氧敏感的转录因子，由HIF1α和HIF1β两个亚基组成的异二聚体，其中HIF1β是组成性组成，而HIF1α在常氧下可被泛素-蛋白酶体降解。在缺氧时，HIF1α稳定表达，迅速入核，与HIF1β结合成异二聚体，并与靶基因上游的缺氧反应元件（hypoxia response element, HRE）结合，从而激活靶基因的表达。骨形态发生蛋白（Bone morphogenetic protein 4, BMP4）是BMPs亚家族的成员之一，最近研究发现BMP4在促进肺动脉平滑肌细胞增殖与迁移过程中发挥作用，且BMP4下游信号的异常也与肺动脉高压的发生发展相关。BMP4作为配体，与BMP4的I型和II型丝氨酸/苏氨酸激酶受体结合，从而激活其下游的Smad-依赖型和Smad-非依赖型信号通路，调节靶基因的表达。我们的前

3

期研究证明了HIF1和BMP4可以通过上调TRPC1和TRPC6的表达来上调细胞内SOCE以及细胞内基础钙离子浓度。

【研究目的】

本研究旨在：1、原代培养大鼠远端肺动脉平滑肌细胞，明确HIF1是否可以调节BMP4表达。2、HIF1是否是通过结合BMP4上游调控序列中的HRE元件调节BM4表达。3、BMP4是通过其下游的哪种信号通路来调节rPASMCs中TRPC1、TRPC6以及基础钙的表达。4、验证在人PASMCs中TRPC1,6对细胞内基础钙离子浓度，细胞增殖、迁移的影响，以及HIF1, BMP4对TRPC1,6表达的调节。

【研究方法】

1、大鼠远端肺动脉平滑肌细胞的培养

雄性成年SD大鼠（250-350g）被用于分离大鼠远端肺动脉（PA，4级以下），分离的PA纵向剪开后刮去内皮细胞，用I型胶原酶消化。消化后的细胞接种于

35mm培养皿，用含10%血清的低糖DMEM培养5-6天。PASMCs用免疫荧光检测α-actin，荧光显微镜下细胞计数，计算细胞纯度。

2、荧光定量PCR

Trizol法提取PASMCs RNA, 逆转录反应根据TAKARA公司RT试剂盒进行，荧光定量PCR反应也是根据TAKARA公司荧光定量PCR试剂盒说明书建立。反应产物的特异性通过溶解曲线为单峰来判断。

3、免疫印迹实验

经不同处理的细胞中加入预冷的含PMSF的RIPA试剂，然后用细胞刮把细胞刮下来。并离心收集蛋白液。蛋白浓度用BCA法测定，然后等量蛋白上样，10-12% SDS-PAGE胶分离，分离后的蛋白转到PVDF膜上，用含5%奶粉的TBST封闭，然后加入一抗4°C孵育过夜，TBST洗涤三次，加入二抗室温孵育1小时，洗掉二抗，加入ECL曝光。

4

4、siRNA转染

siRNA序列均由上海吉玛公司合成，转染方法均按照Invitrogen公司lipofectamine RNAiMAX试剂说明书进行。细胞转染前换上无血清无抗生素的培养基，转染后12h换上完全培养基。然后进行后续实验。

5、细胞内钙离子浓度检测：原代培养的PASMCs中加入7.5μM Fura 2-AM，

37°C 培养箱孵育1小时，将玻片放入小室，然后将小室放入倒置显微镜下用PSS

灌流，灌流后10 分钟开始用荧光显微镜检测细胞内Fura2 荧光信号，然后用

InCyte软件检测细胞信号，细胞内钙离子浓度由Fura2荧光比值计算获得。

6、细胞增殖实验

向96孔板中加入2500个细胞/孔，24小时后向每孔细胞中加入100μl CCK8试剂，37°C生化培养箱继续孵育2小时，然后在450nm波长处测定细胞吸光度值。

7、细胞迁移实验

向Transwell的下室中加入700μl 无血清培养基，然后向Transwell上加入

20000个细胞，在常氧和缺氧条件下继续培养24小时，然后用甲醇固定，并用结晶紫染色，染色后用棉签小心刮去上层细胞，用扫描显微镜拍照，并计数迁移细胞数。

【实验结果】

1、HIF1可以上调TRPC1、TRPC6、BMP4在大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中的表达，并且BMP4抑制剂noggin可以抑制HIF1诱导的TRPC1、TRPC6的表达。

2、HIF1可通过与BMP4上游的HRE元件的结合来调节BMP4表达。

3、在慢性缺氧的rPASMCs中，BMP4可以激活经典的Smad通路及非Smad依赖的p38，ERK1/2旁路，只是缺氧条件下以p38，ERK1/2信号通路激活更为敏感。特异性沉默Smad，p38和ERK1/2信号通路均能抑制TRPC1, 6的表达及细胞

5

内基础钙离子浓度。

4、缺氧条件下人肺动脉平滑肌细胞中TRPC1、TRPC6、BMP4表达增高，沉默HIF1、BMP4可以抑制TRPC1、TRPC6的表达。抑制TRPC1、TRPC6的表达可以抑制肺动脉平滑肌细胞内钙离子浓度，细胞增殖及迁移。

【实验结论】

1、HIF1可通过与BMP4 5'-侧翼区的HRE元件的结合来调节BMP4表达。

2、BMP4可激活Smad, p38及ERK1/2信号通路来上调TRPC1/6的表达，但在缺氧条件下是以激活p38和ERK1/2信号通路为主。

3、TRPC1、TRPC6参与了调节缺氧条件下人肺动脉平滑肌细胞的基础钙离子浓度失衡以及细胞增殖与迁移，而HIF1、BMP4可以调节TRPC1,6的表达。

【关键词】： 肺动脉高压； 经典瞬时受体电位通道蛋白1； 6； 缺氧诱导因子； 骨形态形成蛋白； 肺动脉平滑肌细胞

6

**The mechanism of HIF1 upregulates TRPC expression in rat pulmonary arterial smooth muscle cells**

Major: Respiratory Medicine Ph. D. Candidate: Xin Fu Supervisor: Prof. Jian Wang

**Abstract**

**【BACKGROUD】**

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive disease characterized by a sustained increase in pulmonary arterial pressure and vascular remodeling. We have previously found that Ca2+ influx through store-operated calcium channels (SOCC), likely contribute to the pathogenic development of chronic hypoxic pulmonary hyper

-tension. SOCC are composed of a subgroup members of transient receptor potential (TRP) superfamily, termed canonical transient receptor potential proteins (TRPC). Of the seven TRPC (TRPC1-7) isoforms identified so far, we recently demonstrated that only TRPC1, TRPC4, and TRPC6 are substantially expressed in rat distal pulmonary artery smooth muscle. And when exposed to hypoxia, only the expression of TRPC1 and TRPC6 is up-regulated. HIF1 is a hypoxia-senstitive transcription factor. HIF-1 exists as a heterodimer, consisting of HIF-1αand HIF-1ßsubunits. HIF-1ßis ubiquitously overexpressed, whereas HIF-1αis found in low levels under normoxic conditions because of ubiquitination and proteasomal degradation. During hypoxia,

HIF-1αprotein is rapid stabilized, and followed by accumulation in the nucleus,

Where HIF-1αdimerizes with HIF-1ßand binds to the HRE element, resulting in the transactivation of numerous target genes. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4), a member of BMPs, was recently recognized as an important factor promoting PASMC

7

Proliferation and migration. Recent evidence has identified multiple abnormalities in BMP signaling associated with pulmonary arterial hypertension (PAH). The signaling of BMP4 involves binding to its type I and type II serine/threonine kinase receptors and subsequent activation of Smad-dependent and Smad-independent pathways, resulting in regulation of a plethora of target genes. We previously demonstrated that HIF1 and BMP4 up-regulated TRPC1 and TRPC6 expression, leading to enhance SOCE and elevate basal [Ca2+] i in distal PASMCs.

**【OBJECTS】**

In this study, the rat distal pulmonary arterial smooth muscle cell (PASMC) was cultured to determine: 1. Whether HIF1 can regulate BMP4 expression. 2. Whether HIF1 can regulate BMP4 expression via binding to the HRE element, which locate on upstream regulatory sequence of BMP4. 3. Whether BMP4 downstream signaling pathways may modulate the expression of TRPC1, TRPC6 and the concentration of basic calcium in rat distal PASMCs. 4. Human pulmonary artery smooth muscle cells(hPASMCs) is cultured to verify TRPC1, TRPC6 effect on the intracellular calcium concentration, cell proliferation and migration. Furthermore, HIF1 and BMP4 regulate on TRPC1, TRPC6.

**【METHODS】**

Rat distal PASMCs culture

Adult male SD rats (250–350g) were used to isolate distal pulmonary artery (PA, > 4th generations), the endothelium was denuded by opening the vessel longi

-tudimally and rubbing the luminal surface. Then the PA tissue was digested; cells were plated onto 35-mm dishes, and cultured for 3~4 days in low-glucose DMEM media contain -ing 10% serum. The cellular purity of PASMCs in all the experiments was assessed to be> 95% byα-actin immuno-staining and cell counting under fluorescent micros -copy.

RNA extraction and quantitative real-time PCR

8

Total RNA was extracted from rat distal PASMCs using Trizol reagent accord

-ing to the manufacturer's instruction. Reverse transcription was performed using TAKARA RT Kit. Synthesized complementary DNA was amplified by a standard PCR protocol using Takara PCR kit. The specificity of amplification was confirmed by running melting curve following each PCR run.

Western blot analysis

Cells were lysed with RIPA lysis buffer supplemented with PMSF. Cell lysate proteins were separated by 10-12% SDS-PAGE and then transferred to PVDF mem

-brane. Membranes were blocked with TBST contained 5% milk. The proteins on membrane were blotted with primary antibodies. Membranes were Washed with TBST for three times, and blotted with secondary antibodies, and the signals were developed by ECL reagents.

SiRNA transfection

After 24 hours quiescence in low-glucose DMEM media containing 0.3% serum, PASMCs were transfected with 90 nM siRNA using lipofectamine RNAiMAX trans

-fection reagent according to the manufacturer's instruction. siRNA were designed and synthesized by GenePharma Ltd. Just before transfected, the media was changed by serum and antibiotic-free media. And after culture for 6 hour in serum-free media, the media was changed by medie containing 10% serum.

Measurement of intracellular Ca2+ concentration

The basal intracellular Ca2+ concentration ([Ca2+] i) in PASMCs was measured using Fura-2 dye and fluorescent microscopy. Primary cultured PASMCs were loaded with 7.5μM Fura-2 AM for 1 hour at 37°C under the atmosphere of 5% CO2- 95% air. The loaded cover slips with PASMCs were mounted in a closed chamber on the stage of a inverted microscope, and perfused for 10 min with PSS, Fura-2 fluorescence was measured by an imaging camera. protocol was executed and data was collected online with InCyte software.

9

Proliferation assays

2500 cells were added to the wells of a 96-well palte. After 24h, 100μl CCK8 was added to the cells, and cultured for 2h at 37°C under the atmosphere of 5% CO2- 95% air. The absorbance read at 450nm in a microtitre plate spectrophotometer.

Migration assays:

700μl sersum-free media was added to the down of the polycarbonate transeel filters, and PASMCs were added to the top of the filters. Following exposed to normoxia or hypoxia for 24h, the cells were fixed and stained. The cells were then scraped off the top of the filter and the bottom layer counter.

**【RESULTS】**

1. HIF can increase the expression of TRPC1、TRPC6 and BMP4 in rat distal pulmonary artery smooth muscle cells, and BMP4 inhibitor noggin can inhibit HIF1-induced TRPC1、TRPC6 expression.

2. HIF1 can regulate the expression of BMP4 by binding the HRE element, which located on the upstream of the BMP4.

3. BMP4 can induce the activation of canonical smad pathway and smad-independent pathway including p38 and ERK1/2 signaling in rat distal PASMCs. Under hypoxia, p38 and ERK1/2 signaling are more sensitive to BMP4. The specificity siRNA of p38, ERK1/2 and smad1/5/8 can abolished the hypoxia-induced increase of TRPC1 or TRPC6 exprssion. Knockdown of p38 and ERK1/2 can also eliminate the hypoxia-induced elevation of [Ca2+] i in PASMCs.

4. Under the hypoxic conditions, TRPC1, TRPC6 and BMP4 expression are increased in distal human PASMCs, and these increases can be inhibited by the specific HIF siRNA or BMP4 siRNA. Hypoxia-induced the increases of [Ca2+] i, proliferation and migartion in distal human PASMCs were inhibited by knockdown of TRPC1 or TRPC6 using its specific siRNA.

10

**【CONCLUSION】**

1. HIF1 can regulate the expression of BMP4 by binding the HRE element of BMP4 5'-flanking regions.

2. Smad, p38 and ERK1/2 kinases pathways participates in regulation of Ca2+

Signaling in PASMCs by modulating TRPC1/6 expression. but hypoxia mainly induced activation of p38 and ERK1/2 signaling.

3. TRPC1, TRPC6 participates in regulation of [Ca2+] i, proliferation and migartion in distal human PASMCs. HIF1 and BMP4 can modulate TRPC1, TRPC6 expression.

**【KEY WORDS】**：pulmonary arterial hypertension (PAH); transient receptor potential canonical channel 1, 6 (TRPC1, 6); hypoxia-inducible factor 1 (HIF1); bone mophogenetic protein 4(BMP4); pulmonary arterial smooth muscle cells(PASMCs)

11

前 言

肺动脉高压(Pulmonary Arterial Hypertension, PAH)是一种以肺血管阻力和肺动脉压力进行性升高，并最终导致右心功能进行性衰竭的临床疾病。其主要病理改变为肺小动脉闭塞及有效循环血管床数量的锐减，肺血管内皮细胞损伤引起血管收缩反应增强和肺动脉平滑肌细胞增生、肥厚，外周小血管肌化，以及细胞外基质的增多，导致肺血管重构。我国目前尚未有关于PAH的流行病学统计数据，但是研究表明我国40岁以上人群慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmona

-ry disease, COPD）患病率高达8.2%，其死亡率在我国农村居第3位，城市第四位

[1]. 同时，我国慢性肺源性心脏病（肺心病）的发病率约为0.47%。而大量研究

表明，这些肺心病患者大多是由COPD经长期慢性低氧发展而来[2, 3]。由此可见，

PAH的发病率不容轻视。而阐明慢性缺氧性肺动脉高压(chronic hypoxic pulmonary hypertension, CHPH)的发病机制对有效防治COPD发展为肺心病具有重要意义。

人们对PAH的研究虽然有上百年，但其发病机制仍未明了。目前认为，PAH的发病机制主要集中在以下四个方面：炎症机制，血管活性物质失衡机制，遗传学机制，离子通道机制。

研究认为多种细胞因子参与的炎症机制是肺动脉高压发生的重要原因。缺氧、自身免疫性抗体、病原微生物等多种因素可以导致促炎症因子表达升高。

Voelkel等[4]认为低氧性PAH患者病理血管周围炎症明显，这些炎症因子的激活，导致其下游诱导的信号通路降低或上调，从而引起肺血管内皮损伤，肺动脉平滑肌细胞增殖肥大，肺血管阻力增加，最终致肺动脉高压。

肺血管收缩和舒张是由肺血管内皮分泌的收缩因子和舒张因子共同调控的。前者主要为血栓素（TX）和内皮素-1(ET-1)等，后者主要是前列环素（PGI2）和一氧化氮(NO)等。内皮受损必将导致收缩和舒张因子失去平衡。已有研究表明

PGI2和NO缺乏可引起肺动脉高压；肺动脉高压时ET1表达增加，且其浓度与肺动脉高压的严重性和预后相关[5]；特发性肺动脉高压患者右心室血栓素（TX）受体密度增加，TX抑制剂可适度改善肺部血流动力学。

Dresdale等[6]在1954年首次发现特发性肺动脉高压（idiopathic pulmonary art

-erial hypertension, IPAH）患者有遗传倾向。后来一项系列研究发现6%的IPAH

12

患者呈家族性发病，而且其临床和病理学特点与散发的IPAH患者完全一致。由1997-2000年期间，经过Morse等[7]、Nichols等[8]、Deng等[9]与Lane等[10]四个课题组的分析结果，将IPAH易感基因确定为骨形成蛋白II型受体(bone morphogenetic protein receptor II, BMPR2). BMPR2是BMPs家族成员的受体，它是一种组成型丝/苏氨酸受体激酶。目前认为BMPR2基因突变引起BMPR2的功能缺陷是IPAH的重要发病机制。功能研究表明BMPR2突变时BMPR2表达下调或者其功能受抑制，使BMP信号下游的两个受体BMPRII和BMPRI不能形成异聚体或丧失激酶活性而阻断下游信号通路，导致细胞过度增殖以及凋亡受抑制，引起血管重塑和

PAH的形成。BMPR2基因的突变类型主要包括错义突变，无义突变，移码突变，剪接位点突变和基因重复/缺失突变等类型。突变分布于BMPR2的多个外显子及功能区域，以激酶区域最集中。此外，有学者在少数患遗传型出血性毛细血管扩张症的肺动脉高压患者中，发现转化生长因子-β（Transforming growth factor beta，

TGF-β）受体家族里另外一种类型激动素受体样激酶-1（activin-receptor -like

kinase1, ALK1）发生突变，和BMPR2变异一样，ALK1受体发生的突变也被认为是通过smad信号传导途径影响细胞增殖[11] 。

BMPs属于转化生长因子（TGF-β）超家族，具有调节多种细胞增殖、分化。凋亡的重要作用。研究表明，在慢性缺氧的大鼠肺动脉平滑肌细胞中，BMP4表达上调。BMP4上调可以直接促进肺小动脉平滑肌细胞的增殖[12, 13]；可抑制肺小动脉平滑肌细胞的凋亡[13]；可通过诱导TGF-β家族信号途径下的多种靶基因的表达，从而引起肺血管重塑[14]。但是，BMP4作为生长因子对血管内皮细胞和平滑肌细胞的作用具有多样性，且作用效果依赖于环境和发育背景，以及他们所结合的BMP受体[15]。本课题组研究发现过表达BMP4可以增加大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中基础钙离子浓度，SOCE、TRPC1/6表达均增高[16]。

钾离子和钙离子通道在PAH的发病机制中起重要作用，其中电压依赖性钾离子通道（Kv）是研究最多、结论最明确的一种。Kv对于维持膜电位以及调节细胞内游离钙离子浓度来说十分重要。如果抑制Kv会使细胞内钾离子积聚，导致膜电位升高而去极化，激活L型电压门控钙离子通道，钙离子进入细胞内导致血管收缩并启动平滑肌细胞增殖，参与血管壁重构。

而钙离子通道在肺动脉高压的发病机制中起关键作用。在低氧性肺动脉高压

13

中，低氧引起一系列的信号通道变化并导致了细胞内钙离子浓度浓度增加，使肺血管收缩，肺动脉平滑肌细胞肥大和增殖[17, 18, 19]。特发性肺动脉高压患者采用血管扩张剂和Ca2+通道拮抗剂进行治疗，其中25%的患者可有肺血管阻力和肺动脉压力均值降低（约15-25%）。

真核细胞主要通过以下两种途径增加Ca2+浓度：一种是通过各种钙通道介导的胞外Ca2+内流，然后通过Ca2+-Mg2+ATP酶泵泵出；另一种方式是通过Ca2+释放通道从内质网（endouplasmicreticulum, ER）和肌浆网（sarcoplasmic reticulum, SR）释放出来，通过Ca2+-Mg2+ATP酶泵将Ca2+泵入ER/SR[20]。其中细胞膜上的Ca2+通道有以下三种：1）电压依赖性钙通道（Voltage-dependent calcium channel, VDCC）,其调节通过膜电位的改变而实现，当细胞膜电位升高而发生去极化时，VDCC开放，从而使从细胞外Ca2+进入细胞内；2）受体-操纵性钙通道（Receptor-operated calcium channel, ROCC）,也称为配体门控Ca2通道，该途径是依赖于受体与相应的配体结合而激活，如去甲肾上腺素、5-羟色胺和抗利尿素等配体与相应受体结合，就能激活ROCC；3）钙池操纵性钙通道（store-operator calcium channel, SOCC）,本通路是由于肌浆网中Ca2+的耗尽而激活细胞外Ca2+内流[21]。通过SOCC介导的

Ca2内流也称为容积性Ca2内流（store-operated calcium entry, SOCE）在增加Ca2+浓度的同时也使得耗竭的钙池重新充盈。目前，有关SOCC的分子组成及其激活作用机制被越来越多的研究者所关注。

SOCE能调节细胞的各种功能，如凋亡、分泌以及基因转录等[22]。而且SOCE在激动剂介导的肺动脉收缩的过程中发挥了极为重要的作用[23]。本研究小组和其它研究人员都发现慢性缺氧可造成平滑肌细胞[Ca2+] i升高，并且，这一升高主要是由于钙离子通过钙池操纵性钙通道（SOCC）进行的钙池操纵性钙离子内流

（SOCE）增加所引起的。因此，SOCE是低氧引起肺动脉平滑肌细胞内钙离子失衡的关键原因。

Brueggemann等利用抗体抑制，反义RNA和小干扰RNA等多项技术证实，存在于多种血管平滑肌细胞上的TRPC是SOCC的重要组成部分。TRPC属于TRP家族，是位于细胞膜上的一类重要的阳离子通道超家族。TRPC亚家族共有TRPC 1-7七个成员。其中在大鼠、小鼠和人的肺动脉平滑肌表达TRPC1，TRPC4, TRPC6

[24,25,26]. 我们课题组和其他研究人员证实，在缺氧性肺动脉高压的大鼠模型中，

14

TRPC1和TRPC6在肺动脉组织及其平滑肌细胞中的表达显著高于正常大鼠。研究表明，肺动脉平滑肌细胞中TRPC蛋白通道不仅参与了兴奋剂介导的血管收缩[26]，同时也参与了有丝分裂酶原介导的细胞增殖。

研究发现，缺氧诱导因子-1（HIF1）是缺氧时机体产生的一种重要的蛋白质调节因子，能在转录水平调节多种缺氧反应性基因，广泛参与哺乳动物细胞中低氧诱导的特异性应答，与低氧条件下组织细胞中各种细胞因子、生长因子的表达调控密切相关，通过转录调控一系列的缺氧反应基因的表达，从而调节能量代谢、血管收缩、细胞增殖、血管重塑或生产等。HIF1是介导机体对缺氧发生基因表达的重新调整以及肺血管收缩反应和肺血管重建形成的重要中心环节[27]。

HIF1是由HIF1α和HIF1β组成的二聚体[28]，其中HIF1β是组成性表达，而HIF1

α的表达受氧浓度调控，常氧下由于泛素化而被蛋白酶体降解[29]，因此无法检测到。在缺氧条件下，由于其氧依赖性降解结构域受阻而持续表达。因此，HIF1α是HIF1的功能亚基。研究表明，低氧条件下各种肺组织中HIF1α表达水平明显增加，HIF1α与DNA结合能力显著增强。我们课题组研究发现，HIF1α杂合型小鼠在低氧6周后较野生型小鼠相比，肺动脉压力，肺血管构型重建以及右心室肥大等病变状态均减轻。此外，我们课题组早期研究还发现常氧条件下过表达HIF1α也能增加TRPC1/6的表达以及钙离子内流[24]。因此，HIF1α在肺动脉高压的形成过程中发挥着重要的调控作用。

由此可见，在大鼠缺氧性肺动脉高压中，HIF1α与BMP4都可以调节TRPC的表达以及基础钙浓度和钙离子内流。因此，本课题拟分析在大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中HIF1α与BMP4之间是否有从属关系。二者之间若有关系，那么这种关系是否是通过顺式作用元件与反式作用因子之间的结合发生调控。同时，我们也准备观察BMP4是通过下游的哪种信号转导通路来调节TRPC1/6的表达及基础钙的浓度。最后，基于对疾病的研究最终都要落实在人体细胞的研究，所以，本课题最终还将在缺氧的人肺动脉平滑肌细胞（hPASMCs）中观察TRPC1/6的表达及作用，同时也了解HIF1与BMP4对hPASMCs内TRPC1/6的表达调控。通过以上一系列观察，希望能对低氧性肺动脉高压的发病机制的研究提供更深入的证据。

15

**第一部分在慢性缺氧的大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中，**

**HIF1对BMP4表达的影响**

**材料与方法**

## 一、 主要材料

（一） 实验动物，细菌和病毒

SPF级雄性SD 大鼠（250-350g），购于广东省实验动物中心，所有动物处理规范均经广州医科大学第一附属医院动物使用委员会批准通过。

（二） 主要试剂及耗材

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| HEK293 细胞 |  | 广州医科大学实验医学研究中心保存 |
| AdCA5.0 病毒 |  | 由美国霍普金斯大学赠送 |
| LacZ 病毒 |  | 由美国霍普金斯大学赠送 |
| I 型胶原酶 |  | 美国 Sigma 公司 |
| 木瓜酶 |  | 美国 Sigma 公司 |
| DMEM 低糖培养基 |  | 美国 Gibco 公司 |
| 胎牛血清 |  | 美国 Gibco 公司 |
| 戊巴比妥钠 |  | 广州威佳生物科技公司 |
| NaCl |  | 广州化学试剂厂 |
| KCl |  | 广州化学试剂厂 |
| MgCl2·6H 20  HEPES |  | 广州化学试剂厂  广州化学试剂厂 |
| 葡萄糖 |  | 广州化学试剂厂 |
| 无水 CaCl2  BSA |  | 广州威佳生物科技公司  广州威佳生物科技公司 |
| DTT |  | 广州化学试剂厂 |
| 青、链霉素 |  | 吉诺生物医药技术公司 |
| PBS |  | 吉诺生物医药技术公司 |
|  | 16 |  |

0.25%胰酶（含EDTA）美国GIBCO公司

Cy3-偶联的ft羊抗小鼠IgG 美国Jackson公司

小鼠抗大鼠平滑肌α-actin单克隆抗体 美国Sigma公司

YO-PRO-1 美国 Invitrogen 公司

35mm 细胞培养皿 美国 Corning 公司

2.5cm圆形盖玻片 美国Invitrogen公司

Trizol Reagent 美国Invitrogen公司

无核酶水 TaKaRa 公司

PrimeScript RT Reagent Kit TaKaRa 公司

SYBR Green qPCR Master Mix 试 剂盒 TaKaRa 公司还原型 5×SDS 上样缓冲液 碧云天公司

30%丙烯酰胺凝胶溶液 美国 Sigma 公司三羟甲基氨基甲烷（Tris） 广州威佳生物科技公司

十二烷基硫酸钠（SDS）广州威佳生物科技公司

甘氨酸（Gly）广州威佳生物科技公司

Tween20 广州威佳生物科技公司

过硫酸胺（AP）广州威佳生物科技公司

四甲基二乙胺（TEMED）广州威佳生物科技公司

显影液、定影液 广州威佳生物科技公司

甲醇广州化学试剂厂

脱脂奶粉广州威佳生物科技公司

预染的蛋白分子量标准品（marker）美国Bio-Rad公司

BCA蛋白浓度测定试剂盒美国Pierce公司

ECL化学发光液美国Bio-Rad公司

0.22um聚偏二氟乙烯膜（PVDF）膜美国Bio-Rad公司

BMP4鼠源性单克隆抗体美国MILLIPORE公司

HI1α鼠源性单克隆抗体美国Abcam公司

Anti TRPC1 抗体 Alomone Labs 公司

Anti TRPC6 抗体 Alomone Labs 公司

17

beta-actin小鼠源性单克隆抗体美国Santa Cruz公司羊抗兔IgG二抗 博士德公司

羊抗小鼠IgG二抗博士德公司

3M定性滤纸美国Bio-Rad公司

X光底片柯达公司

蛋白印迹膜再生液康为世纪

Adeno-X Maxi Purification Kit美国Clontech公司

人BMP4重组蛋白（hBMP4）美国R& D公司

Noggin美国R& D公司

（三） 主要仪器

微量移液器美国Eppendorf公司

高压灭菌锅日本Hirayama公司

0.1mm直头显微镊上海金钟手术器械厂

维纳斯剪

Zhi ku quan 20150807

上海金钟手术器械厂

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 体式显微镜 |  | 重庆奥特光学仪器有限责任公司 |
| 倒置相差显微镜 共聚焦荧光显微镜  低温离心机 |  | 德国 Leica 公司日本 Nikon 公司  德国 Sigma 公司 |
| 恒温水浴锅 |  | 常洲澳华仪器有限公司 |
| 超净工作台 |  | 苏州净化设备有限公司 |
| 二氧化碳培养箱超低温冰箱  超纯水制备机电子分析天平  微型核酸蛋白定量仪荧光定量PCR 仪  全自动酶标仪  垂直电泳及转膜系统 |  | 美国 Thermo 公司美国 Thermo 公司  美国 MILLIPORE 公司瑞士 Mettlet Toledo 公司美国 Thermo 公司  美国Stratagene 公司美国 Thermo 公司美国 Bio-Rad 公司 |
|  | 18 |  |

脱色摇床海门麒麟仪器厂

2100XL扫描仪EPSON公司

（四） 主要溶液的配置

1、HBSS溶液：7.60g NaCl、0.38g KCl、0.25gMgCl2·6H 2O、2.24g HEPES和1.8g葡萄糖，溶于1000ml超纯水，用1M NaOH调PH至7.2，用0.22um过滤器过滤除菌，每次使用前半个小时前现配现用。

2、有钙HBSS溶液：用移液枪吸取150 u1 1M的CaCl2溶液加入100ml HBSS

溶液中混匀，现配现用。

3、胶原酶消化酶：31mg I型胶原酶、2mg木瓜酶、10mg牛血清白蛋白和

0.7mg二硫苏糖醇，溶于5mlHBSS溶液，经0.22um滤膜过滤除菌，现用现配。

4、10%胎牛血清的DMEM培养基配制：DMEM低糖培养基250ml，胎牛血清28ml，青、链霉素双抗(100×) 2. 8ml

5、0.5%胎牛血清的DMEM培养基配制：DMEM低糖培养基250ml，胎

牛血清1.5ml，青、链霉素双抗(100×) 2. 5ml

Zhi ku quan 20150807

6、75%乙醇：10ml DEPC水加入30ml无水乙醇（1:3），混匀，现用现配。

7、引物溶液：先将合成回来的引物8000rpm离心5min，加入适量无核酶水溶解，配制为100uM的母液，使用时用DEPC水将上下游引物稀释为2uM工作液，-20℃保存备用。

8、RIPA蛋白裂解液：1ml RIPA buffer中加入10ulPMSF。

9、1M Tris. HCl (pH6.8): 秤取Tris121.1g，加双蒸水800ml，用浓盐酸调节

PH至6.8，加蒸馏水定容至1L，高温高压后室温保存。

10、1.5M Tris. HCl(pH8.8)：秤取Tris181.65g，加双蒸水800ml，用浓盐酸调节PH至8.8，加蒸馏水定容至1L，高温高压后室温保存。

11、10%SDS：电泳级SDS 10g，加双蒸水90ml，用浓盐酸调节PH至7.2，加蒸馏水定容至100ml，分装备用。

12、10%分离胶10ml: 3.3 ml 30%丙烯酰胺凝胶液，2.5 ml 1.5M Tris-HCl

（pH8.8），0.1 ml 10%SDS, 0.1ml 10%过硫酸铵，4μl TEMED, 4.0 ml dd H2O。

13、5％浓缩胶5 ml: 0.83 ml 30%丙烯酰胺凝胶液，0.63ml 0.5M Tris-HCl

19

（pH6.8），50μl 10%SDS，50μl 10%过硫酸铵，5μl TEMED, 3.4ml dd H2O。

14、10×Western blot储备缓冲液：Tris碱30.3g，甘氨酸144 g，加900ml ddH2O

充分溶解，并定容至1L。

15、Western blot电泳缓冲液：取10×电泳缓冲液100ml，10%SDS10ml，加水至1L混匀。

16、Western blot转膜缓冲液：取10×电泳缓冲液100ml，甲醇100ml，加水至1L混匀。

17、10×TBS: Tris碱24.2g, Nacl 80g，加900ml ddH2O 充分溶解，用HCL

调整PH值至7.6，并定容至1L。

18、TBST缓冲液(Wash buffer): 1×TBS 1000ml，加入Tween-20 1ml混匀后使用，现用现配。

19、Western blot封闭缓冲液（Blocking buffer）:10×TBS 10 ml，dd H2O 90 ml，脱脂奶粉5 g，Tween-20为100μl溶解。

## 二、 实验方法：

Zhi ku quan 20150807

（一） 大鼠远端肺动脉平滑肌细胞（**rPASMCs**）的原代培养

1、取雄性250-350g SD大鼠，腹腔注射50mg/kg戊巴比妥钠麻醉。

2、打开胸腔将心脏和肺脏一起取出，放于冰的含1.5mM钙的HBSS溶液中。

3、选择4-5级气道伴行的主要肺动脉在于显微镜下分离。

4、将分离出的肺动脉血管除外膜后纵向剖开暴露内腔，用细胞刮仔细刮去内皮。将动脉放入冰的含1.5mM钙的HBSS溶液中20分钟（minutes, min）。

5、再将组织放入没有钙离子的HBSS液中室温下20min。

6、取分离好的动脉平滑肌组织，用无血清DMEM低糖培养基清洗一到两次，放入事先配好的消化酶溶液中（每个标本的动脉约用酶溶液1ml），置于37℃水浴箱内消化约20min，至组织成一定破碎状取出。

7、加入1ml有血清的培养基中和酶，停止消化，1000r/min离心5min，使细胞沉淀，小心吸弃上清液，视细胞量的多少加入适量的10%胎牛血清DMEM低糖培养基，用枪头小心吹打15次左右，使细胞悬浮；

8、将细胞悬液接种至35mm培养皿中让细胞自然下沉贴壁半小时，然后小

20

心在旁边补足培养液，放入37oC, 5% CO2培养箱培养。

（二） 大鼠远端肺动脉平滑肌细胞的鉴定

1、将在含盖玻片的35mm培养皿中生长的rPASMCs用PBS清洗3次。

2、用冰预冷的95%乙醇固定细胞30分钟。

3、用含4%羊血清的PBS封闭细胞20分钟。

4、α-actin一抗（1:50稀释）37 oC孵育2小时。

5、用PBS洗涤3次，每次5分钟。

6、用Cy3标记的鼠二抗（1:100）37℃孵育1小时，同时加入YO-PRO-1染料（3.5ul/ml）用于染核。

7、用PBS洗涤3次，每次5分钟。

8、干燥盖玻片10分钟。

9、在共聚焦显微镜下分别用488nm、543nm波长激发，观察平滑肌细胞纯度，低倍镜下计算细胞纯度，每张玻片随机取5个视野，每个视野至少检测100个细胞。计算每个视野中α-actin表达阳性细胞占该视野总细胞数的比例，即为平滑肌细胞纯度。

（三）慢性缺氧诱导**rPASMCs**中**BMP4**的表达

1、原代培养大鼠远端PASMCs共6皿，待细胞融合度为70-80%时，将完全培养基换成含0.5%FBS的低糖DMEM，分别于24h，36h，60h，72h，78h后取其中一皿细胞放入缺氧培养箱（37℃, 5% CO2, 4%O2）中，再过6h后将缺氧箱中全部5皿细胞以及常氧对照的一皿细胞同时取出，留取对照及缺氧60h细胞的上层培养基后，将所有细胞上清弃去，用PBS洗涤细胞三次后，吸干，加入蛋白裂解液，提取蛋白，同时用磁珠法收集并提取留取的细胞培养基中蛋白。

2、缺氧不同时间点rPASMCs细胞裂解液或培养基上清中BMP4蛋白的表达

（western blot方法）

#### 2.1 细胞培养基中蛋白沉淀

(1)将留取的细胞培养基4℃，2000g离心5min以去除培养基中的漂浮的细胞或细胞碎片。

21

(2)培养基中BMP4被肝素-丙烯小珠给分离下来。

(3)用PBS洗涤两次，然后用煮沸的Laemmli样品缓冲液将BMP4从小珠上分解下来，并用SDS-PAGE胶电泳分离。

(4)分离的蛋白质转移至PVDF膜，等待进行进一步的western blot分析。

#### 2.2 细胞总蛋白的提取

(1)预先配制细胞裂解液：向1×RIPA细胞裂解液中加入1%体积的稀PMSF，混匀；

(2)迅速将经常氧或缺氧处理的rPASMCs从培养箱中取出，用预冷的PBS洗涤细胞3次；

(3)向每个35mm的培养皿加入60μl的细胞裂解液，放置于摇床上，冰上孵育30min；

(4)用细胞刮收集细胞，转移至预冷的1.5ml的离心管，冰上孵育10min；

（5）4℃，13000g离心30min；

（6） 小心吸取上清转移至新的离心管，-80°C保存。

#### 2.3 细胞总蛋白浓度的检测（Pierce BCA Protein Assay Kit）

从收集的细胞蛋白提取物中取5ul进行蛋白定量，具体步骤如下：

(1)制备下列浓度梯度的BSA 标准品：0μg/ml、250μg/ml、500μg/ml、

750μg/ml、1000μg/ml、1500μg/ml、2000μg/ml。

(2)配制BCA工作液：将试剂A与试剂B以50: 1的比例混合；

(3)取BCA标准品或待检样品5μl加入到96孔板，然后向其中加入200μl的

BCA工作液，震荡混匀30s，然后将96孔板置于37oC孵育30分钟；

(4)在波长562nm处测量吸光值。根据标准品建立标准曲线，待测样品的蛋白浓度根据BSA标准曲线的回归方程和实测OD值计算。

#### 2.4 BMP4蛋白的Western blot分析：

(1)聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE胶）的配制：先将玻璃板洗净，用双蒸水冲洗，然后按照Bio-Rad公司的试剂配方配制10%的分离胶和5%的浓缩胶，先灌注分离胶，待其聚合后灌注浓缩胶，插入加样梳。密封放置4oC过夜确保凝胶充分聚合。使用前拔除加样梳，用蒸馏水反复冲洗加样孔后加样。

(2)加样：吸取上样蛋白样品30μg至EP管中，加入5×SDS上样缓冲液至

22

其终浓度为1×，二者充分混匀后，于100oC水浴5分钟以使蛋白充分变性，冷却后逐孔加样，每孔加样体积均为40μl。同时取5μl和2μl蛋白预染Marker加入样品前后的上样孔，以明确上样顺序。

(3)电泳：用Bio-Rad垂直电泳系统进行电泳，浓缩胶电压为80V，蛋白进入分离胶后采用130V，电泳缓冲液为1×Tris -甘氨酸-SDS电泳缓冲液。待溴酚蓝指示剂到达分离胶底部后停止电泳。

(4)转膜：电泳结束后取下凝胶，切除分离胶部分，置于转移缓冲液浸泡。裁剪2张与凝胶大小一样的3M滤纸和一张PVDF膜，其中PVDF膜在甲醇中浸泡20s后，和滤纸一起转移至转膜缓冲液中。从正极到负极按海绵-滤纸-PVDF膜-凝胶-滤纸-海绵的顺序叠放整齐，置于Bio-Rad公司的湿转夹板上，于4oC环境下以0.35mA恒流转膜1小时，取出PVDF膜，剪去一小角作方位标记。

(5)免疫反应：将转膜成功的PVDF膜先置于1×TBS液中漂洗5分钟。后转至含5%的脱脂奶粉的1×TBS T溶液中室温封闭1小时。再将膜在60KD左右剪断成上下两张，分别放入用5%的脱脂奶粉稀释的BMP4一抗稀释液中4oC孵育过夜，一抗以1: 1000稀释。次日将膜取出，用1×TBS -T洗涤3次，每次10分钟。然后加入用5%的脱脂奶粉以1: 4000稀释的辣根过氧化物酶（HRP）偶联的抗小鼠二抗，室温孵育1小时，1×TBS -T洗涤3次，每次10分钟。

(6)化学发光法检测目的蛋白：将增强的化学发光系统试剂盒中的化学发光液A和B等体积混合，将膜浸泡于其中暗室孵育5分钟，取出PVDF膜，用保鲜膜包好并去除多余液体后，将X光底片做标记后覆盖于膜上，以不同时间点曝光，将X胶片显影定影后，晾干。

(7)图片扫描，保存，用ImageJ图像分析软件分析免疫印迹灰度值。

(8)曝光后的PVDF膜用TBS浸泡约3分钟后，于脱色摇床上用蛋白膜再生洗脱液洗脱18分钟，洗脱后用TBST洗涤3次，每次10分钟。洗完后用5%脱脂奶粉室温封闭1小时，然后可以接着用于孵育内参蛋白β-actin（以1: 2500稀释），孵育过夜后用TBST洗涤三次，抗小鼠二抗室温孵育1h，再次TBST洗涤三次，并曝光。

（四）过表达HIF1α时**BMP4**的表达

1、 HIF1α过表达病毒AdCA5.0的扩增

23

1.1复苏HEK293细胞

(1)从干冰中取出细胞冻存管，迅速放入37℃水浴箱，边摇动使其尽快融解；

(2)室温，1000rpm离心5分钟，弃上清；

(3)加入培养基1ml，吹打重悬细胞，并移入培养瓶，加培养基至4ml，置于

5%CO2，37℃恒温培养箱中培养，次日换液。

1.2细胞传代

(1)弃培养瓶中的细胞培养液，PBS洗细胞3次；

(2)加入含EDTA的0.25%胰酶消化液500μl，置于37℃培养箱消化2分钟，此时胞质回缩、细胞间隙增大，轻轻摇晃后部分细胞脱落，立即加入细胞培养液终止消化；

(3)加入3ml细胞培养液，用吸管轻轻吹打瓶壁上细胞，形成细胞悬液；

(4)将细胞悬液分装至2个培养瓶，分别加培养基至4ml，置于5%CO2, 37℃恒温培养。

1.3病毒感染

第一天，将HEK293细胞接种至6孔板，第二天细胞融合度为70%左右时，换成含0.3%FBS的培养液，24h后将美国霍普金斯大学赠送的HIF1α过表达病毒AdCA5.0以及对照病毒lacZ加入细胞中感染细胞，大约3-5天可以观察到细胞独立现象。并且可以观察到细胞被病毒感染后所带的绿色荧光。

#### 1.4 收集病毒

将含有病毒的细胞消化离心后收集至15ml Corning离心管中，离心，另取一管收集上清。往细胞沉淀中加入3ml PBS，然后37℃，液氮罐中反复快速冻融三次使细胞裂解释放病毒，离心，收集上清。

#### 1.5 病毒的扩大培养

取新鲜制备的病毒PBS液10μl加入到接种于100mm皿的HEK293细胞中，感染3-5天后按照上述方法大量收集病毒。

#### 1.6 腺病毒的纯化

(1)将收集的病毒上清液倒入带有玻璃纤维滤膜的滤器中过滤。

(2)估计已过滤的含有病毒的培养基的大概体积，按照0.5μl/ml的比例加入

25U/μl Benzonase，然后37℃水浴30分钟。

24

(3)与此同时，组装病毒滤过装置并加入30mlEQ/Wash buffer。

(4)向步骤（2）中处理好的病毒培养基内加入1/10体积10×Dilution Buffer，混合均匀。

(5)用试剂盒内的10ml注射器吸取3ml Elution buffer以及7ml空气，放在一边待用。

(6)取30ml Equilibration-Wash Buffer通过病毒吸附装置，以起到平衡作用。

(7)向病毒吸附装置内反复加入含有病毒的培养基，直至全部培养基过滤。

(8)吸取50ml Equilibration-Wash Buffer通过病毒吸附装置，以清洁病毒吸附装置。

(9)把第（5）步中的注射器连到病毒吸附装置，收集所有过滤的含病毒的液体。

(10) A260测定病毒液内的颗粒数（25μl病毒液溶于975μl 10mM Tris, PH7.4）。1OD260=1.1×1012 particles per ml，OD260×40×1.1×1012= particles per ml of

virus。

2、 细胞处理

原代培养大鼠远端PASMCs后，将细胞分成两种，待细胞融合度为70-80%时，将细胞培养基换成含0.5%FBS的低糖DMEM培养基，24h后其中一组加入

AdCA5.0病毒感染细胞，另一组加入对照组病毒lacZ，感染后48h收集总RNA或者总蛋白，检测其中HIF1α，BMP4的表达。

3、 HIF1α过表达后BMP4 mRNA检测

#### 3.1 大鼠远端PASMCs总RNA提取

(1)取待处理大鼠PASMCs，用PBS洗三次，然后吸干PBS，加入1ml TRIZOL

试剂/35mm细胞培养皿，室温静置5分钟。

(2)向每1ml TRIZOL中加氯仿0.2m1，摇振15秒（seconds, s）充分混匀，置室温2～3min。

（3）4℃离心，12,000g×15分钟。

(4)仔细吸取上层水相，移至另一Ep管中。

(5)加0.5ml异丙醇，混匀，置室温10分钟。

（6）4℃离心，12,000g×10分钟。

25

(7)弃上清，加冰预冷的75％乙醇1m1，轻轻摇振，充分洗涤沉淀，4℃离心，

7500g×5分钟。

(8)弃上清，空气干燥10分钟，加入50μl无RNase水重悬沉淀。

(9)核酸定量或电泳检测。多余样品-70℃保存备用。

#### 3.2 荧光定量方法检测BMP4的表达

3.2.1 cDNA的合成

(1)用RNA定量仪对所提取的RNA定量后，取500ngRNA样品进行逆转录。

(2)建立10ul反应体系如下：

组分加入量

5×primerscript buffer 2.0μl

Primescript RT Enzyme mixI 0.5μl

Oliga dT primer 0.5μl

Random 6mer 0.5μl

Total RNA 500ng

补nuclease-free水至总体积为10ul

（3）反应条件：37℃，15分钟，85℃5秒，4℃5分钟。

3.2.2用病毒感染细胞后大鼠BMP4及内参β-actin mRNA荧光定量PCR

(1)所有引物设计后均由TAKARA公司合成。引物列表如下：

表1 荧光定量PCR检测大鼠PASMCs中BMP4表达的引物

| Gene and  species | Primer Sequence (Forward/ reverse) | Product Size,  bp | Source  sequence |
| --- | --- | --- | --- |
| BMP4 | 5'-CAGAGCCAACACTGTGAGGA -3'  5'-GGGATGCTGCTGAGGTTAAA -3' | 108 | BC078901  (477-584) |
| β-actin | 5'-ACGGTCAGGTCATCACTATC-3'  5'-TGCCACAGGATTCCATACC-3' | 90 | NM\_031144  （812-901） |

(2)将cDNA稀释4倍，即加水至50ul。

(3)建立qPCR反应体系如下：

组分 加入量

26

qPCR mixture 10.0μl

Primer(2μΜ) 2.0μl

RT products 4.0μl

ROX 0.4μl

ddH2O 3.6μl

（4）反应条件：95℃，，15分钟，95℃5秒，60℃15秒，后两步骤循环40次。同时以95℃1分钟，60-95℃做熔解曲线。

4、 HIF1α、BMP4蛋白表达检测

将处理所得的总蛋白按照等量上样电泳后，按照前面所提的Western blot方法进行操作，其中HIF1α和BMP4一抗均以1: 1000稀释。

（四） HIF1α过表达时加**BMP4**抑制剂**noggin**后**PASMCs**中**TRPC1**、**TRPC6**的表达

原代培养大鼠远端PASMCs三皿，待细胞融合度为80%左右时，换上0.3%FBS低糖DMEM培养基继续培养24小时，将细胞分成三组，其中一组用lacZ感染细胞，第二组用AdCA5.0感染细胞，第三组用AdCA5.0感染细胞的同时加入BMP4的抑制剂noggin（200ng/μl）处理细胞，60h后收集总RNA或者总蛋白，检测TRPC1、

TRPC6的mRNA及蛋白表达（具体方法同前），其中β-actin荧光定量PCR引物见表

1，TRPC1，TRPC6的荧光定量PCR引物见表2。

表2 荧光定量PCR检测大鼠PASMCs中TRPC1，TRPC6、BMP4表达的引物

| Gene and  species | Primer Sequence (Forward/ reverse) | Product Size,  bp | Source sequence |
| --- | --- | --- | --- |
| BMP4 | 5'-CAGAGCCAACACTGTGAGGA -3'  5'-GGGATGCTGCTGAGGTTAAA -3' | 108 | BC078901  (477-584) |
| TRPC1 | 5'-AGCCTCTTGACAAACGAGGA-3'  5'-ACCTGACATCTGTCCGAACC-3' | 146 | NM\_053558  (797-942) |
| TRPC6 | 5'-TACTGGTGTGCTCCTTGCAG-3'  5'-GAGCTTGGTGCCTTCAAATC-3' | 141 | NM\_053559  (1267-1407) |

27

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| HIF1α | 5’-TGCTTGGTGCTGATTTGTGAACC-3’  5’- TGTCCTGTGGTGACTTGTCC-3’ | 258 | NM024359  （681-983） |

（五） HIF1α沉默后**BMP4**、**TRPC1**、**TRPC6**的表达

1、 HIF1α的沉默

原代培养大鼠肺PASMCs，待细胞融合度为50%左右时，将细胞换上0.5% FBS低糖DMEM培养基，继续培养24h，用invitrogen公司的siRNA转染试剂盒转染小分子siRNA，包括作为阴性对照的NC siRNA(NTsi)、沉默HIF1α的HIF1αsiRNA(HIF1 si)。转染后60h提取细胞总RNA，用qPCR方法检测沉默效率。

#### 1.1 siRNA由江苏吉玛公司设计合成，合成后的siRNA用150μlDEPC水溶解成

20μM的使用浓度合成序列如表2。

表3 沉默大鼠PASMCs中hif1α的HIF1αsiRNA序列

| Gene and species | Primer Sequence (Forward/ reverse) | Source sequence |
| --- | --- | --- |
| HIF1α siRNA | 5'-GCCUCUUCGACAAGCUUAATT-3'  5′- UUAAGCUUGUCGAAGAGGCTT-3′ | NM024359  (1180-1198) |
| NC siRNA | 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'  5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3' |  |

1.2转染：转染方法参考试剂盒说明书，具体步骤如下：

(1)转染前将细胞换上无抗生素的10%FBS培养基；

(2)取150μl opti-MEM I于一1.5mlEP管，加入9μl Lipofectamine RNAiMAX Reagent；

(3)另取150μl opti-MEM I于一1.5ml另一EP管，加入4.5μl 20uM siRNA;

(4)将两者混合，室温放置5分钟；

(5)取混合液300μl逐滴加入细胞中，轻轻摇动孔板，混匀。

(6)待转染后48h提取RNA做沉默效率检测。

#### 1.3 转染HIF1αsiRNA及NC siRNA后用q-PCR方法检测HIF1α及内参β-actin的表达。内参β-actin荧光定量引物见表1，HIF1α荧光定量引物见表2，总RNA提取方法及RT-qPCR方法同前。

2、 检测HIF1α沉默时BMP4、TRPC1、TRPC6的表达

28

原代培养大鼠PASMCs共4皿，将细胞分成两组，每组分别转染NC siRNA和HIF1αsiRNA，转染后12h将其中一组细胞放入缺氧箱继续培养60h，收集细胞，提取总RNA或者总蛋白检测HIF1α沉默后的BMP4、TRPC1、TRPC6的mRNA（用荧光定量PCR方法，所用BMP4、TRPC1、TRPC6引物见表2，具体操作同前）或蛋白表达（用western blot方法，具体操作同前，其中TRPC1，TRPC6一抗稀释比例均为1: 1000）。

（六） 统计学分析

所有结果运用*x*±s表示，两个样本均数的比较采用t检验，多组均数比较采用单因素方差分析（one way-ANOVA）。P<0.05被认为有统计学意义。

29

**结果**

**一、大鼠远端肺动脉平滑肌细胞的原代培养**

在倒置相差显微镜下观察原代培养的rPASMCs，发现细胞接种后24小时内即可贴壁，并开始分裂增殖。细胞形态呈长梭形，中间凸起的部分，可见细胞核（如图1A所示）。待细胞继续至融合度达90%以上时（需要5-7天），细胞表现为血管平滑肌细胞生长的典型特点，即呈“峰谷”状生长（如图1B所示）。

**A B**

****

****

图1 倒置相差显微镜下原代培养的大鼠远端PASMCs （40×）

A．rPASMCs培养3天后的图像，细胞呈长梭形，细胞中间凸起的部分为细胞核。

B．rPASMCs培养6天后的图像，细胞基本融合，并呈现“峰谷”状生长。

**二、免疫荧光鉴定大鼠远端肺动脉平滑肌细胞纯度**

在激光共聚焦显微镜下观察细胞，其中细胞核被YO-PRO1标记，显示为绿色荧光。平滑肌α-actin被Cy3标记，且仅平滑肌细胞呈阳性反应，发红色荧光。在平滑肌细胞浆中平行于细胞长轴呈细丝状表达（见图2A）。在未加一抗的阴性对照细胞内，仅可检测到YO-PRO-1标记的细胞核所发出的绿色荧光（见图2B）。随机观察五个视野，进行计数，计算肺动脉平滑肌细胞的纯度。按照本研究方法培养的大鼠远端肺动脉平滑肌细胞纯度达到90%以上。

30

**A B**

****

****

图2 免疫荧光染色鉴定大鼠远端肺动脉平滑肌细胞,红色为α-actin肌丝，绿色为细胞核

（40×）

A．大鼠远端PASMC，α-actin免疫荧光染色呈阳性反应，表现为带红色荧光，并可见典型的纤维沿细胞长轴并行排列。细胞核染绿色荧光。

B．阴性对照组的大鼠PASMCs，α-actin免疫荧光染色呈阴性反应，仅检测到YO-PRO-1标记的呈绿色荧光的细胞核。

## 三、 缺氧诱导的大鼠远端**PASMCs**中**BMP4**的表达

在缺氧不同时间点将原代培养的大鼠远端PASMCs放入缺氧箱中，最后统一收集细胞裂解液中蛋白及缺氧0h和缺氧60h细胞上清蛋白，进行Western blot分析发现缺氧后6h细胞裂解液中BMP4较常氧无变化，缺氧12h p-BMP4已经表现出增高，但不具有显著性意义。而缺氧24h，48h和60h细胞裂解液中BMP4表达均较常氧下显著性增加，而且缺氧60h后的细胞培养基中BMP4表达量较常氧条件下也有显著性增高（如图3所示）。

A B



Time (h) 0 6 12 24 48 60

p-BMP4



细胞

裂m-BMP4

解液



Actin

m-BMP4

培养基上清



N CH

31

C D

p-BMP4

m-BMP4

350

p-BMP4 protein in rPASMCs

300

250

200

150

100

50

0

0H 6h 12h 24h 48h 60h

300

250

＊

＊

＊

m-BMP4 protein in rPASMCs

200

150

100

50

0

＊ ＊

＊

0H 6h 12h 24h 48h 60h

**E**

250

＊

BMP4 protein(/actin %of N)

200

150

100

50

0

N CH

**图3** **缺氧诱导的BMP4蛋白表达**

在不同的时间点将细胞放入培养箱后，检测不同缺氧时间BMP4蛋白的表达情况。

A：图片显示缺氧不同时间点PASMCs细胞裂解液中BMP4的蛋白前体或成熟体的表达。B：图片显示缺氧60h后PASMCs细胞培养液中分泌的BMP4蛋白。C：柱状图用均数±标准差显示缺氧不同时间点前体BMP4蛋白相较于常氧对照的表达百分比。D：柱状图用均数±标准差显示缺氧不同时间点成熟的BMP4蛋白相较于常氧对照的表达百分比。E：柱状图用均数±标准差显示缺氧60h后PASMCs细胞培养液中分泌的BMP4蛋白相较于常氧对照的表达百分比。＊表示与常氧对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异，n=3。

## 四、 过表达HIF1α时**BMP4**的表达情况

用AdCA5.0和对照腺病毒lacZ感染PASMCs后48h检测HIF1α的过表达情

32

况，结果如图4所示，AdCA5.0病毒感染组肺动脉平滑肌细胞中HIF1α表达较对照组显著增加，由对照组的100%±0增至200%左右。HIF1α过表达病毒感染肺动脉平滑肌细胞后，肺动脉平滑肌细胞内BMP4前体（p-BMP4）及BMP4成熟体（m-BMP4）表达均显著增加（见4图C, D, E）。说明过表达HIF1α能上调

BMP4的表达。

250

200

150

100

50

0

LacZ

CA5

＊

**A B**

HIF1α protein(/actin %of lacZ)

HIF1α

Actin



lacZ CA5



**C D**

BM P4

Lacz CA5.0

160

BMP4 mRNA(/actin %of control)

140

120

100

80

60



p-BMP4

m-BMP4



＊

40

20

0

LacZ CA5

**E**

200

180

160

140

120

100

80

60

40

20

0

＊

＊

p-bmp4 m-bmp4

lacZ

CA5.0

BMP4 protein in rPASMCs/actin

Actin

33

**图4** **HIF1α过表达后对BMP4蛋白表达的影响**

A：扩增的AdCA5.0病毒过表达HIF1α的情况。B：柱状图用均数±标准差显示AdCA5.0病毒感染细胞后HIF1α相较于对照组的表达百分比。C：柱状图用均数±标准差显示HIF1α过表达后BMP4 mRNA的表达。D：图片显示HIF1α过表达后BMP4前体及成熟体的表达。E：柱状图用均数±标准差显示HIF1α过表达后BMP4前体及成熟体相较于对照组的表达百分比。＊表示与对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异，n=3。

## 四、 HIF1α过表达时加**BMP4**抑制剂**noggin**后**PASMCs**中**TRPC1**、**TRPC6**

**的表达**

原代培养大鼠远端PASMCs三皿，分别加入HIF1α的过表达病毒AdCA5.0及对照病毒lacZ感染细胞，以及AdCA5.0感染同时加入BMP4的抑制剂noggin处理细胞，60h后收集总RNA或者总蛋白，检测其中TRPC1、TRPC6的表达。以对照组

lacZ病毒感染细胞中TRPC1/6表达作为100%，其他组相较于对照组的表达情况。结果如图5所示，AdCA5.0感染的细胞较对照组TRPC1, TRPC6 mRNA及蛋白表达均增高，但是加入BMP4抑制剂后，这种由于HIF1α过表达所致的增高被抑制。

**A B**

200

TRPC1 mRNA(/beta-actin,%of control)

180

160

140

120

100

80

60

40

20

0

TRPC1

＊

#

LacZ CA5 CA5 nog

250

200

TRPC6 mRNA(/beta-actin %of control)

150

100

50

0

TRPC6

＊

#

LacZ CA5 CA5 nog

**C** D TRPC1



＊

#

250

TRPC1 TRPC6

Actin



LacZ CA5 CA5+nog

34

200

150

TRPC1 protein(/actin %of control)

100

50

0

LacZ CA5 CA5 nog

**E** TRPC6

＊

#

250

200

TRPC1 protein(/actin %of control)

150

100

50

0

LacZ CA5 CA5 nog

**图5** **HIF1α过表达后对BMP4蛋白表达的影响**

A： 柱状图用均数±标准差显示TRPC1 mRNA表达。B：柱状图用均数±标准差显示TRPC6

mRNA表达。C：达后BMP4 mRNA的表达。D：图片显示TRPC1、TRPC6及内参Actin的蛋白表达。E：柱状图用均数±标准差显示TRPC1蛋白表达。B：柱状图用均数±标准差显示TRPC6蛋白表达。＊表示与对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异，n=3. #表示与缺氧对照相比P＜0.05，结果有统计学差异。

## 五、 HIF1α沉默后**BMP4**、**TRPC1**，**TRPC6**的表达

用荧光定量PCR方法筛选出有效的HIF1αsiRNA序列，并将有效的HIF1α

siRNA转染大鼠远端PASMCs，降低PASMCs中的HIF1α表达，然后检测在常氧条件下（20%O2, 5%CO2）和缺氧条件下（4%O2, 5%CO2）HIF1α敲低对BMP4、

TRPC1、TRPC6的表达影响。结果如图所示，与转染的对照NTsi相比，HIF1α

siRNA能降低80%以上的HIF1α mRNA水平（见图6A）。并且，HIF1α的沉默可以使缺氧条件下的BMP4、TRPC1、TRPC6表达显著性降低，但对常氧下BMP4、

TRPC1、TRPC6的表达没有显著性影响（见图6B-6I）。

**A B**

120

100

80

60

40

＊

20

0

NTsi

hif siRNA

TRPC1

250

200

150

100

50

0

NTsi N hif si N NTsi CH hif si CH

hif1 mRNA(% knockdown of NC)

TRPC1 mRNA(/actin %of NTsiN)

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| ＊ | | | | | | | |
|  |  | | | |  |  | # |
|  |
|  | |  | # |  |  |

35

**C D**

TRPC6

180

160

140

120

100

80

60

40

20

0

＊

#

#

NTsi N hif si N NTsi CH hif si CH

BM P4

250

200

150

100

50

0

NTsi N hif si N NTsi CH hif si CH

＊

#

#

TRPC6 mRNA(/actin %of NTsiN)

BMP4 mRNA(/actin %of NTsiN)

**E F**

**E**

**F**

NTsi HIF1αsi

TRPC1

TRPC1 TRPC6

P-bmp4 m-bmp4 actin

N CH N CH

300

250



TRPC1 protein(/actin %of NTsiN)

200



150



100

50



0

＊

#

#

NTsi N NTsi CH hif si N hif si CH

**G H**

TRPC6 p-BM P4

250

TRPC6 protein(/actin %of NTsiN)

200

150

100

50

0

NTsi N NTsi CH hif si N hif si CH

160

＊

#

#

140

p-BMP4 protein(/actin %of NTsiN)

120

100

80

60

40

20

0

＊

#

#

NTsi N NTsi CH hif si N hif si CH

36

**I**

M-BM P4

\*

#

#

350

m-BMP4 protein(/actin %of NTsiN)

300

250

200

150

100

50

0

NTsi N NTsi CH hif si N hif si CH

**图6** **特异性沉默HIF1α后rPASMCs中BMP4、TRPC1、TRPC6的表达**

大鼠远端PASMCs中转染特异性的HIF1αsiRNA后对HIF1α的沉默效率及HIF1α沉默后对PASMCs中BMP4、TRPC1、TRPC6表达的影响。

A：柱状图用均数±标准差显示沉默的HIF1αmRNA相较于对照组的表达百分比。B：柱状图用均数±标准差显示HIF1α沉默后相较于对照组TRPC1 mRNA的表达百分比。C：柱状图用均数±标准差显示HIF1α沉默后相较于对照组TRPC6 mRNA的表达百分比。D：柱状图用均数±标准差显示HIF1α沉默后相较于对照组BMP4 mRNA的表达百分比。E：图片显示hif1α沉默后TRPC1、TRPC6、BMP4前体及成熟体的表达。F：柱状图用均数±标准差显示HIF1α沉默后相较于对照组TRPC1蛋白的表达百分比。G：柱状图用均数±标准差显示HIF1α沉默后相较于对照组TRPC6蛋白的表达百分比。H：柱状图用均数±标准差显示HIF1α沉默后相较于对照组BMP4前体蛋白的表达百分比。I：柱状图用均数±标准差显示HIF1α沉默后相较于对照组BMP4成熟体蛋白的表达百分比。n=3，＊与常氧对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异。#表示与缺氧对照相比P＜0.05，结果有统计学差异。

37

**讨论**

在慢性缺氧性肺动脉高压中，钙离子浓度（calcium concentration, [Ca2+] i）浓度增高是使肺血管收缩和血管增殖肥大的决定性因素[29-31]。我们课题组前期研究表明，SOCC所介导的钙离子内流（SOCE）是低氧下肺动脉平滑肌细胞内钙离子浓度升高及肺血管收缩的决定因素[33-34]. SOCC是由瞬时受体电位通道（TRPC）蛋白所构成[25]。在小鼠和大鼠肺动脉及肺动脉平滑肌细胞中存在的TRPC蛋白有

TRPC1、TRPC4、TRPC6[35]。在暴露于缺氧下的大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中

TRPC1、TRPC6以及SOCE和细胞内基础[Ca2+] i均显著增加。而一旦用特异性的

siRNA降低TRPC1、TRPC6的表达，PASMCs中缺氧所诱导的SOCE及基础钙离子浓度不再增加[36]。这说明慢性缺氧所诱导的基础钙离子浓度的增高很大程度上是依赖于TRPC1、TRPC6所构成的SOCC引起的钙内流的增加。所以通过观察不同基因对TRPC1、TRPC6表达的影响就可以明确这些基因在缺氧性肺动脉高压中的作用。

肺泡组织缺氧是导致缺氧性肺动脉高压病理变化的始动环节。研究表明，肺泡组织慢性缺氧时，肺组织HIF1表达明显增高，而部分缺失HIF1的小鼠其形成肺动脉高压的时间延长且程度降低。更多的研究认为，HIF1参与了HPH形成机制中离子通道的紊乱、血管活性物质的失衡、炎症的加重、肺血管的重构等过程。因此，HIF1在HPH的发生发展中起着重要作用。HIF1可以下调肺血管平滑肌细胞中KV1.5和KV2.1，导致细胞膜去极化，从而使Ca2+内流，胞浆内Ca2+浓度升高

[83]. HIF1也可以直接调节肺动脉平滑肌细胞中钙离子浓度，我们课题组前期研

究发现低氧条件下，野生型缺氧小鼠体内TRPC1、TRPC6、SOCE及基础钙水平均显著上调，但这种上调在HIF1α基因敲除HIF1α（+/-）小鼠中缺如，并且以HIF1α的过表达病毒载体（AdCA5.0）感染原代培养的大鼠远端肺动脉平滑肌细胞后可以观察到在常氧下TRPC1、TRPC6表达增加[24]。由于特异性沉默HIF1α比其过表达更能说明问题，并且之前的HIF1α基因敲除是小鼠来源的，所以，在本实验中，我们补充了特异性的HIF1α的沉默后观察原代培养的大鼠远端肺动脉平滑肌细

胞中TRPC1、TRPC6基因表达的影响。结果如图5所示，特异性沉默HIF1α的表达后可抑制TRPC1、TRPC6的表达，结果与基因敲除鼠结果保持一致。

38

BMP4属于BMPs家族，BMPs是多功能细胞因子，广泛存在于机体许多组织器官中，对细胞的分化和其后的器官形成期重要作用[37]。Frank[38]等发现BMP4在成年大鼠肺组织中广泛表达，主要定位在平滑肌细胞和内皮细胞，在低氧的小鼠肺动脉平滑肌细胞中发现BMP4表达上调，BMP4的表达上调可促进血管平滑肌细胞增殖、迁移、重塑，并最终导致肺动脉高压。BMP4（+/-）基因敲除鼠可保护缺氧诱导的肺动脉压力的升高，肺血管增殖及重塑[84]。文献表明HIF1可以上调BMPs家族BMP2和TGF-β的表达[85-86]，HIF2α的激活与成血管基因BMP4的表达上调有关，而且HIF1是胚胎血管发育过程的关键转录调控元件。我们课题组前期研究发现与慢性缺氧下反应相似，以重组的BMP4蛋白处理大鼠远端肺动脉平滑肌细胞，也可以引起TRPC1、TRPC6表达的上调，SOCE和基础钙离子浓度增高。这种发现也与HIF1在PASMCs中的作用一致。基因以上原因，我们推测HIF1与BMP4之间是否存在串联的关系。而经本部分实验首先证明了在缺氧的大鼠肺动脉平滑肌细胞中缺氧24h后就可以表现出BMP4前体或成熟体均较常氧下升高。这种增高延续到缺氧48h或者60h仍然存在，同时也能检测到缺氧60h的细胞上清培养基中BMP4表达也增高（见图3）。进一步实验发现在大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中，过表达HIF1α可以上调BMP4前体及成熟体的表达（见图4）。而特异性抑制HIF1α，则缺氧条件下所诱导的BMP4表达的升高也会缺如（见图6）。本结果说明HIF1是BMP4的上游调控基因。

HIF1α可以调节BMP4、TRPC1、TRPC6的表达，为进一步说明HIF1与BMP4之间的关系，我们在PASMCs过表达HIF1α的同时加入BMP4的抑制剂noggin，结果发现HIF1α过表达可增加大鼠肺动脉平滑肌细中TRPC1、TRPC6的表达，并且这种表达可被BMP4的抑制剂noggin部分抑制（见图5），这就说明HIF1α是通过或者部分通过BMP4的介导来调节TRPC1、TRPC6的表达。Noggin是32KD的分泌型糖蛋白，可以高亲和地结合BMP4，从而阻止BMP4与其受体的结合，抑制其蛋白功能[42-43]。

此外，不得不提到的一个问题是我们所选用的细胞是原代培养的大鼠远端肺动脉平滑肌细胞而非近端平滑肌细胞。在慢性缺氧性肺动脉高压发生发展过程中，虽然大鼠远端和近端肺动脉都有不同程度的重塑，但是二者之间结构的改变以及其发生的分子机制是不一样的[44]。因为远端的肺小动脉在缺氧条件下更容易

39

发生结构的改变，他们是所有肺血管系统中最早发生血管收缩的部位[45-49]。另外，许多因子如PDGF，TGF-β等在近端和远端平滑肌细胞中的增殖作用也是有差异的[50]。缺氧条件下诱导的钙离子浓度以及电压-门控钾通道和SOCC的改变均不同[51-53]。人的近端和远端肺动脉平滑肌细胞对BMP4的刺激表现出相反的增殖反应，在前者中是抑制增殖，而在后者中可促进增殖[54]。与这一致的结果是，在BMP4基因缺陷BMP4（+/-）的小鼠中，暴露于缺氧下所致的肺远端小血管的增生可被抑制[38]。另外还有实验证明原代培养的大鼠远端肺动脉平滑肌细胞，其第一代和第二代细胞能被BMP4刺激表现出显著增殖，第三代细胞就增殖就已经显著减弱，但培养到第三代之后的细胞，BMP4刺激就表现为生长抑制。所以本实验所用的大鼠细胞原代培养时选择分离的是远端血管，并且细胞实验都是用原代或者转染时用第二代细胞。

综上所述，我们成功培养了大鼠远端肺动脉平滑肌细胞，并且发现在缺氧条件下，HIF1可以上调TRPC1、TRPC6、BMP4在大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中的表达，HIF1对TRPC1、TRPC6的上调依赖于或者部分依赖于BMP4的作用。那么，在下一部分中，我们将探索HIF1α对BMP4的表达上调是否是通过直接与BMP4上游调控序列中的HRE元件结合。

40

**第二部分HIF1通过与BMP4 5'-侧翼区HRE元件的结合调**

**节BMP4表达**

**材料与方法**

## 一、 主要材料

（一） 质粒和细菌

pGEM-T载体系统美国Promega公司

pMD18-T载体TAKARA公司

pGL3-enhancer质粒美国Promega公司

PRL-SV40海肾内参表达载体美国Promega公司大肠杆菌菌株Top10北京百泰克生物技术公司

（二） 主要试剂及耗材

胰蛋白胨 英国 Oxoid 公司

酵母提取物 英国 Oxoid 公司

PCR试剂：KOD FX日本Toyobo公司

LA Taq 酶 TAKARA 公司

质粒提取试剂盒：QIAprep Spin Miniprep Kit德国Qiagen公司

胶回收试剂盒：QIAquick Gel Extraction Kit德国Qiagen公司

T4 DNA连接酶、限制性内切酶美国NEB公司

DNA 分子量标准（15000Marker、2000Marker） 大连宝生物工程公司琼脂糖 西班牙 Biowest 公司

琼脂粉 美国 Sigma 公司

TransIT-2020转染试剂美国Mirus公司

双荧光素酶分析试剂盒：Luciferase Assay System 美国 Promega 公司细胞核蛋白提取试剂盒：Nuclear Extract Kit 美国 Active motif 公司微量蛋白浓度测定试剂盒 美国 Pierce 公司

EMSA试剂盒：DIG Gel Shift Kit德国Roche Applied Science公司

41

小鼠来源的HIF1α一抗美国Abcam公司

37%甲醛美国Sigma公司

CHIP试剂盒美国Active motif公司

10cm、15cm细胞培养皿美国Corning公司

（三） 主要仪器

普通PCR仪美国Bio-Rad公司

水平电泳仪北京六一

生化培养箱上海一恒仪器厂

Forma Orbital Shaker恒温振荡器美国Thermo公司

凝胶成像系统美国Bio-Rad公司

GLO MAX™96 Microplate luminometr美国Promega公司紫外透射交联仪英国UVP公司

超声破碎仪美国Sonic& Materials公司

（四） 主要溶液的配置

1、5×TAE电泳缓冲液：24.2克Tris碱，5.71ml冰醋酸，10ml 0.5M EDTA

溶于1000ml双蒸水中。

2、1%琼脂糖凝胶：0.5g琼脂糖溶于50ml TAE，微波炉加热充分溶解后，加入25μg溴化乙锭（EB），灌胶用于DNA电泳、PCR产物和质粒酶切产物鉴定。

3、LB培养液：10g胰蛋白胨，5g酵母提取物和5g NaCl溶于1000ml双蒸水中，高压消毒。

4、LB固体培养基：10g胰蛋白胨，5g酵母提取物，5g NaCl和15g琼脂粉溶于1000ml双蒸水中，高压消毒。

6、5×TBE储备液：27.5g硼酸，54g Tris-base, 2.92g EDTA，在900ml双蒸水溶解后，定容至1L，调PH至8.0.

7、TEN缓冲液：1.211g Tris, 0.292g EDTA, 5.845g NaCl，在900ml双蒸水溶解后，定容至1L，调pH至8.0.

8、马来酸缓冲液：11.607g马来酸，8.7675g NaCl，在900ml双蒸水溶解后，

42

定容至1L，调PH至7.5。

9、Detection缓冲液：12.11g Tris-HCl, 5.845g NaCl，在900ml双蒸水溶解后，定容至1L，调PH至9.5.

10、CHIP用固定液：加0.54ml37%甲醇（sigma）至20ml细胞基础培养基，置于室温使用前新鲜配制。

11、CHIP用1×PBS缓冲液：加2.33ml 10×PBS至21ml dH2O，混合，置冰上，使用前新鲜配制。

12、甘氨酸终止液：1ml10×甘氨酸缓冲液，1ml10×PBS，8ml dH2O，混合，置室温，使用前新鲜配制。

13、细胞刮离液：加0.6ml10×PBS至5.4ml dH2O，混合，置冰上，使用前新鲜配制。

## 二、 实验方法：

（一） 大鼠**BMP4**基因5’上游调控序列（约**3000bp**）的克隆及其荧火虫荧光素酶报告载体构建

1、 大鼠基因组DNA的提取

(1)取大鼠肝脏100mg加1ml细胞裂解液，用匀浆器匀浆；

(2)将匀浆液倒入2ml离心管中，加20μl蛋白酶K，再加SDS至终浓度为1％，上下颠倒混匀；

(3)混合液置于55℃水浴，水浴时间4~6h；

(4)水浴完毕后，按1: 1比例加酚/氯仿/异戊醇混合液(25: 24: 1)，轻轻震荡混匀1min，12000g离心5min；

(5)吸上层水相800μl于灭菌塑料离心管中，加入等体积酚/氯仿/异戊醇混合液，轻轻震荡混匀1min，12000g离心5 min；

(6)吸上层水相500μl于塑料离心管中，加入两倍体积的预冷的无水乙醇，

-20℃放置2h；

(7) 12000g离心5min，沉淀DNA,倾去上清液；

(8)于沉淀中加入75%乙醇溶液500μl，轻轻混匀后12000g离心5min，倾去上清液，室温凉干；

(9)向DNA沉淀中加200μlTE缓冲液，-20℃保存备用

43

2、 PCR扩增BMP4上游序列

(1)根据NCBI查询的大鼠BMP4上游启动子序列(NCBI登录号: AC-000083.1)，设计上下游引物（表4），于上下游引物分别引入MluⅠ、XhoⅠ酶切位点。

表4 PCR扩增大鼠BMP4基因上游约3000bp调控序列的引物

| 引物编号 | 核苷酸序列 (5＇→3＇) | 长度 (bp) |
| --- | --- | --- |
| BMP4F | ACGCGTCCTAGCAACCAGGAGGCAGAGACAGG | 32bp |
| BMP4R | CTCGAGCGGATGCCGAACTCACCTAGCTTCCG | 32bp |

(2) PCR扩增：在冰上配反应体系

2×PCR Buffer for KOD FX 25.0μl

2.5mMdNTP mix 10.0μl

Primer mix(各5uM) 3.0μl

KOD FX(1.0U/μl) 1.0μl

基因组DNA(500ng/μl) 1.0μl

ddH2O 10.0μl

(3)加样后设计PCR反应程序采用TDPCR，退火温度由68℃递减到62℃，每降低一度就循环两次，PCR循环总数为40次：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 95℃ |  | 5min |  |
| 95℃ |  | 30s |
| 68℃ |  | 30s |
| 72℃ |  | 45s | 共循环 2 次 |
|  |  |  |  |
| 95℃ |  | 30s |  |
| 67℃ |  | 30s | 共循环 2 次 |
| 72℃ |  | 45s |  |
| **…**  **…** |  | **…**  **…** |  |
| 95℃ |  | 30s |  |
| 62℃ |  | 30s | 共循环 24 次 |
| 72℃ |  | 45s |  |
| 72℃ |  | 10min |  |
|  | 44 |  |  |

3、 PCR产物的凝胶电泳分析鉴定

取5μl RNA样品进行琼脂糖凝胶电泳分析，电泳步骤如下：用1×TAE缓冲液配制1%琼脂糖凝胶，微波炉加热使之融化，当温度降低到约60℃，加入溴化乙锭至终浓度为0.5μg/ml，混匀后平铺于水平式电泳板中，待凝胶充分凝固。胶凝固后，将电泳板置于电泳槽中，加入1×TAE电泳缓冲液至覆盖凝胶表面，取5μl

PCR产物与1μl 6×上样缓冲液混匀，加入凝胶的上样孔内，同时于对照孔加入5μl DL15000 DNA Marker。电压设至9V/cm，电泳约30分钟后，将凝胶取出置于紫外凝胶成像系统摄影分析，判断PCR产物大小。

4、 PCR产物的回收与定量

将鉴定正确的PCR的全部剩余产物进行琼脂糖凝胶电泳，条件同上，在紫外线探照灯照下将分离开的目的条带切下，用胶回收试剂盒（Qiagen公司的QIAqui

-ck Gel Extraction Kit） 对PCR产物进行回收，具体操作试剂盒说明书进行回收：

(1)将切下含目的分子量大小的凝胶称重。

(2)每体积凝胶中加入3倍体积的Buffer QG(每100mg凝胶约等于100μl Buff

er)。

(3) 50℃水浴10分钟，每2-3分钟旋涡震荡混匀一次。

(4)加入一倍体积的异丙醇，混匀后将溶液倒入column管中，12000转离心1分钟。

(5)弃去离心后的液体，加500μl Buffer QG到column管中，12000转离心1

分钟。

(6)弃去离心后的液体，加入750μl Buffer PE，12000转离心1分钟。

(7)弃去离心后的液体，空管高速离心1分钟。

(8)加入30μl双蒸水，12000转离心1分钟，将回收的DNA收集到一个新的离心管中。

(9)对回收产物用微量核酸蛋白定量仪进行定量。

5、 重组质粒pGEM-T /BMP4

5.1 PCR产物与pGEM-T载体的连接按下表建立连接体系：

pGEM-T Vector 1.0μl

PCR 产物3.0μl

2×ligase buffer 5.0μl

45

ddH2O 1.0μl

反应总体积为10μl，16℃连接过夜。

5.2、连接产物的转化取已灭菌1.5ml的Eppendorf管，做好标志。将所有灭菌后的枪头、Eppendorf管均预冷5分钟。将步骤5的连接产物10μl和100μl的感受态细胞加入1.5ml的Eppendorf管中。轻轻混匀。于冰上冷却30分钟后。

42oC水浴90秒，迅速放回冰中，冷却2分钟，然后加入无抗生素的LB 900μl，混匀，37oC水浴1小时。4000rpm离心5分钟收集细菌，弃上清。将剩余的液体与细菌混合后均匀涂抹于琼脂平板上，干燥，倒置在37oC的温箱培养过夜。第二天将长出单克隆的平皿置于4oC冰箱放置。

#### 5.3 重组质粒pGEM-T /BMP4的鉴定

5.3.1 pGEM-T /BMP4重组质粒的提取挑取若干单个菌落接种于3ml含相应抗生素的LB培养基中，37oC，220rpm摇菌过夜，取2ml菌液按照OMEGA公司的小量质粒提取试剂盒说明书所示步骤进行质粒提取。具体步骤如下：取2ml菌液装入EP管中，10, 000rpm离心1分钟。弃去上清，加入试剂I 250μl，充分震荡重悬细菌沉淀；加入试剂II250μl，颠倒混匀管中液体；加入试剂III350μl，上下颠倒混匀管中液体，可见白色絮状物质形成。12, 000rpm高速离心10分钟。小心吸取上清，倒入到回收柱中，套上EP管，12, 000rpm离心1分钟。弃去离心液，加入500μl试剂HB，12, 000rpm离心1分钟洗柱一次。弃去离心液，空管12, 000 rpm离心1分钟以彻底甩干残留水份。将回收柱转移到另一干净的EP管中，在柱子中心滴入50μl 37°C预热的双蒸水，室温下放置1分钟，以溶解质粒

DNA.12, 000rpm离心1分钟，收获质粒DNA溶液。-20°C 冰箱保存。

5.3.2 pGEM-T /BMP4重组质粒的酶切鉴定及电泳选用引物上引进的酶切位点MluⅠ和XhoⅠ进行酶切以鉴定是否有正确大小的连接，酶切反应体系如下：反应总体系为20ul

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| DNA |  | 3.0μl |
| 10×Buffer |  | 2.0μl |
| MluⅠ |  | 0.5μl |
| XhoⅠ |  | 0.5μl |
| ddH2O | 46 | 14.0μl |

反应条件为37oC水浴2小时。酶切反应结束后，取全部反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，电泳参数同前。

5.3.3重组质粒的序列测定将酶切鉴定大小正确的阳性克隆送去测序，测序引物为pGEM-T载体的通用引物。将测序结果通过BLAST序列比较软件与

GeneBank上提供的核酸序列相比较。测序正确的质粒保存细菌。

6、 报告质粒pGL3-BMP4重组载体的构建

6.1连接片段的酶切消化将pGEM-T /BMP4质粒和pGL3-enhancer载体均用MluⅠ和XhoⅠ双酶切，酶切反应体系如下：

DNA 10.0μl（约3μg）

10×Buffer 5.0μl

MluⅠ2.0μl

XhoⅠ2.0μl

ddH2O 31.0μl

反应总体积50μl，37oC水浴4小时。

6.2酶切产物的回收将上述步骤中酶切消化的DNA片段用0.8%的琼脂糖凝胶进行电泳，在紫外胶联透射仪照射下切下BMP4上游调控序列以及pGL3-

enhancer载体的条带，然后按照QIAquick Gel Extraction Kit的说明书进行回收，具体步骤同前。

6.3连接反应将回收的BMP4上游调控序列以及pGL3- enhancer载体用T4 DNA Ligase连接，反应体系如下：

pGL3- enhancer 2.5μl BMP4 5.5μl

10×ligase buffer 1.0μl

T4 DNA Ligase 1.0μl

反应总体积10μl，16oC连接过夜。

#### 6.4 连接产物的转化具体步骤同前。

6.5重组质粒pGL3 /BMP4的鉴定

(1)挑取单克隆小量扩增过夜，然后收集细菌提取质粒DNA，具体步骤同5.3.1。

47

(2)重组质粒的鉴定对提取的质粒用MluⅠ和XhoⅠ对重组质粒进行双酶切，具体反应体系及操作同5.3.2。

(3)对酶切正确的质粒用pGL3- enhancer的通用引物进行测序。测序正确的质粒保存细菌。

（二） 大鼠**BMP4**基因上游调控序列缺失**HRE**元件的萤火虫荧光素酶报告载体的构建

1、 大鼠缺失HRE元件的BMP4上游调控序列的获取

用两轮PCR定点缺失的方法获取BMP4上游缺失HRE元件的调控序列。其原理如下（图1）：

①第一轮PCR：以正向引物P1和反向引物P2（含突变序列）为引物，进行PC

R1，得到含缺失位点及上游序列的片段；以正向引物P3（含缺失部分）和反向引物P4为引物，进行PCR2，得到含缺失位点及下游序列的片段；

②第二轮PCR: PCR产物分别回收纯化后，以PCR1和PCR2产物的混合物为模板，以正向引物P1和反向引物P4为引物，进行PCR扩增即可得到含缺失位点的目的片段。



图1 两轮PCR定点缺失/突变示意图(黑点为缺失部位)

#### 1.1 引物设计

根据大鼠BMP4上游3000bp启动子序列中的HRE位点，设计引物（表5），于上游引物引入XhoⅠ酶切位点。

表5 PCR扩增BMP4缺失HRE元件的引物

| 引物编号 | 核苷酸序列 (5＇→3＇) | 引物长度 (bp) |
| --- | --- | --- |

48

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |
|  | P1 | ACGCGTCCTAGCAACCAGGAGGCAGAGACAGG | 32bp |  |
|  | P2 | GCCTGGAGCGTATGCCCCTGG | 21bp |  |
|  | P3 | CCAGGGGCATACGCTCCAGGC | 21bp |  |
|  | P4 | CTCGAGCGGATGCCGAACTCACCTAGCTTCCG | 32bp |  |
|  | P5 | CCTGGGGACCACAAGAGGTACTAGAAAGC | 29bp |  |
|  | P6 | GCTTTCTAGTACCTCTTGTGGTCCCCAGG | 29bp |  |

#### 1.2 第一轮PCR扩增以pGL3-BMP4为模板，分别以P1+P2，P3+P4为引物进行第一轮PCR扩增HRE1(BMP4上游约1543bp处的HRE元件)，以P1+P5，

P6+P4为引物进行第一轮PCR扩增HRE2(BMP4上游约292bp处的HRE元件)，

PCR反应体系及程序如下：

2×LA PCR BufferII 25.0μl

2.5mM dNTP mix 8.0μl

Primer mix(各5uM) 4.0μl

LA Taq(5.0U/μl) 0.5μl

质粒DNA(50ng/μl) 0.5μl

ddH2O 12.0μl

反应程序：94℃预变性2min，98℃变性45s，62℃退火30s，68℃延伸2min，从第二步至第四步重复30个循环，然后68℃彻底延伸10min。

1.3对第一轮PCR产物电泳，切下PCR正确的条带，以QIAquick Gel Extraction Kit进行回收，具体步骤同前。

1.4分别将第一轮PCR中的HRE1和HRE2的回收产物混合作为模板，产物第二轮PCR，均以P1+P4为引物进行第二轮PCR扩增，获得分别缺失HRE1, HRE2的BMP4上游调控序列dHRE1、dHRE2. PCR反应体系及程序同第一轮PCR。

2、大鼠缺失HRE1、HRE2元件的BMP4基因上游调控序列的荧光素酶报告载体构建

具体构建步骤同pGL3-BMP4的构建。将上述获得的dHRE1、dHRE2序列进行琼脂糖凝胶电泳，并回收，将回收产物连接至pMD18-T载体上，以MluⅠ和

XhoⅠ酶切鉴定。将鉴定正确的pMD18-dHRE1、pMD18-dHRE2质粒及

pGL3-enhancer空载体以MluⅠ和XhoⅠ大量酶切，并电泳回收dHRE1、dHRE2和

49

pGL3-enhancer，然后将两个序列分与空载体以T4 DNA ligase进行连接，转化，并酶切鉴定（MluⅠ和XhoⅠ双酶切），测序证实，获得pGL3- dHRE1、pGL3-

dHRE2的重组质粒。

3、 大鼠同时缺失HRE1、HRE2元件的BMP4基因上游调控序列的荧光素酶报告载体构建

以pGL3- dHRE1为模板，以P1+P5，P6+P4为引物进行第一轮PCR扩增，其他实验方法与以pGL3- dHRE2的构建一致。最终经测序证实在pGL3- BMP4的基础上同时缺失了HRE1、HRE2的重组质粒，命名为pGL3- ddHRE。

（三） 缺氧对**pGL3- BMP4**及其**HRE**缺失体表达的影响

1、 原代培养rPASMCs，并于细胞融合度至80-90%时，将细胞接种至两块48

孔板，接种后18-24h进行转染，转染时细胞密度约为40-50%。

2、 将每块板中细胞分成五组，分别用于转染pGL3-enhancer空载体，pGL3-BMP4、pGL3-dHRE1、pGL3-dHRE2和pGL3-ddHRE，同时都共转染pRV-SV40作为内参。每组三个复孔。转染方法参考美国Mirus公司TransIT-2020转染试剂说明书，具体步骤如下：

(1)预热Trans IT2020试剂至室温。

(2)取26μl/孔opti-MEMI Reduced-serum medium于一无菌管。

(3)加入0.26μg/孔目的质粒DNA（即pGL3-enhancer或pGL3- BMP4）和

5.2ng/孔pRV-SV40（作为内参），轻轻吹打混匀。

(4)加0.78μl/孔Trans IT2020试剂至稀释的DNA混合液，轻轻吹打混匀。

(5)室温孵育15-30分钟（30分钟）使混合物形成

(6)在等待过程中，弃48孔板中的细胞培养基，用D-HANKS洗涤三次，加入263μl/孔无抗生素的7%FBS培养基。

（8）逐滴滴加混合物至培养基中，并前后左右轻摇孔板使混合物分配均匀。

3、 将加入转染试剂的孔板放置于细胞培养箱培养12h后，将其中一个48孔板转移至缺氧培养箱中继续培养，待48h后同时收集常氧（37℃，5%CO2）和缺氧箱（37℃，5%CO2，4%O2）中细胞进行萤火虫荧光素酶的检测。

4、 荧光素酶活性检测

50

荧光素酶活性检测按照Dual Luciferase Reporter Assay试剂盒的说明书进行操作。具体步骤如下：

(1)将5×细胞裂解液用双蒸水稀释至1×细胞裂解液，现配现用。

(2)取出细胞培养板，PBS液洗涤3次后吸干残余液体；

(3)每孔加入65μL的1×细胞裂解液，摇床上摇15min，使细胞充分裂解；

(4) 15min后，细胞刮反复刮孔板底部，收集裂解物，并转移至一个1.5mL EP

管中；

(5)漩涡振荡10s后。室温下12, 000 rpm，离心1min，将上清转移至另一个新的1.5ml离心管中；

(6)取出试剂盒的所有试剂置于避光溶解，配制1×的Stop& Glo®Buffer；

(7)各取5μL的裂解产物加至96孔白板中，每个样品设置3个复孔；

(8)于GLOMAX 96 microplate luminometer检测仪测值。检测程序为先每孔加入25μL的萤火虫荧光素酶底物，反应2s，测量10s获得萤火虫荧光素酶值，再每孔加入25μL的1×Stop & Glo®Buffer，反应2s，测量10s获得海肾荧光素酶的内参值。

5、 数据分析及统计学处理

所有计量数据用*x*±s表示，两组间的比较采用两独立样本的t检验，P<0.05认为差异有统计学意义。

（四） 过表达HIF1α对**pGL3- BMP4**及其**HRE**缺失体表达的影响

原代培养rPASMCs后，将细胞接种于两块48孔，待细胞融合度为70-80%时，分别用HIF1α的过表达腺病毒载体AdCA5.0和对照腺病毒载体AdlacZ感染细胞，感染24h后将每块板上的细胞分成5组，分别用于转染pGL3-enhancer空载体，pGL3-BMP4、pGL3-dHRE1、pGL3-dHRE2和pGL3-ddHRE，同时都共转染pRV-SV40作为内参，每组设立三个复孔。转染后48h检测在不同病毒处理条件下不同的转染质粒的萤火虫荧光素酶的表达。具体步骤同缺氧对pGL3-BMP4表达的影响。

（五） 应用电泳迁移率变动分析**(Electrophoretic mobility shift assay, EMSA)**

51

**和抗体胶移动实验（Supershift assay）分析HIF1α与HRE的结合**

1、 细胞处理：原代培养rPASMCs于100mm细胞培养皿，待细胞融合度为

70-80 %时，将细胞放置于缺氧培养箱（37℃, 5%CO2, 1%O2）中缺氧培养12h。

2、 细胞核蛋白的提取(按美国Active motif公司Nuclear Extract Kit说明书操作)

(1)收集细胞

①将细胞从缺氧箱中拿出，迅速倒去旧培养基，加5ml冰预冷的PBS/Phospha

-tase Inhibitors洗细胞，吸去液体，加入剩下的3ml冰预冷的PBS/Phosphatase Inhibitors；

②细胞刮轻轻刮取细胞，转移至冰预冷的15ml离心管中，4℃，500rpm离心5min，弃上清，将离心管置冰上。

(2)胞浆蛋白收集

①加入500μl 1×Hypotonic Buffer重悬细胞后，转移至冰预冷的离心管中，冰上15min；

②加入25μl的Detergent，涡旋10s，4度14000g离心30s；

③上清-80度保存（胞浆蛋白） 。

(3)核蛋白收集

①加入50μl Complete Lysis Buffer重悬细胞沉淀，涡旋10s；

②冰上150rpm摇晃30min；

③涡旋30s，4℃，14000g离心10min；

④上清转移至预冷的离心管中，-80度保存。

3、 核蛋白浓度的检测(按Pierce®微量蛋白定量试剂盒说明书操作)

取核蛋白4μl，用PBS稀释50倍至200μl，取150μl用于测定蛋白浓度，并于最后用吸光度值得到的蛋白浓度乘以5即可得到所提取核蛋白浓度。具体操作如下：

(1)制备微量蛋白定量所用的浓度梯度BSA 标准品：0μg/ml、0.5μg/ml、

1μg/ml、2.5μg/ml、50μg/ml、10μg/ml、20μg/ml、40μg/ml、200μg/ml。

(2)配制BCA工作液：将试剂MA:试剂MB:试剂MC按照25: 24: 1的比例混合。

(3)取BCA标准品或待检样品150μl加入到96孔板，然后向其中加入150μl的

BCA工作液，震荡混匀30s，然后将96孔板置于37oC孵育2小时。

(4)冷却到室温，在波长562nm处测量吸光值。根据标准品建立标准曲线，

52

待测样品的蛋白浓度根据BSA标准曲线的回归方程和实测OD值计算。

4、 EMSA实验

4.1准备探针于TAKARA公司合成BMP4上游的两个HRE元件(-1562\_

-1544和-298\_-278）核心序列的互补探针，并在3’端带上地高辛标记。将合成的互补单链探针溶解于TEN缓冲液，以1: 1的摩尔比混合，于PCR仪上95oC变性10分钟，待温度缓缓将至室温即成为DNA双链探针。合成的探针具体序列如表6。

表6 EMSA实验所需用到的HRE元件探针

| 探针编号 | 核苷酸序列 (5＇→3＇) | 长度 (bp) |
| --- | --- | --- |
| F1 | CAGGGGCATACGTGCGCTC | 19bp |
| R1 | GAGCGCACGTATGCCCCTG | 19bp |
| F2 | ACCTCTTGCACGTGGTCCC | 19bp |
| R2 | GGGACCACGTGCAAGAGGT | 19bp |

#### 4.2 反应体系的构建

按表7，在0.2ml的PCR管配制下列反应体系，于15～25℃下孵育20min，其中Supershift assay实验抗体先与核蛋白室温孵育30min后再加入探针进行实验。

表7 EMSA实验探针与核蛋白反应体系

|  | 自由探针反应 | 结合反应 | 竞争反应 | supershift |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Binding Buffer (5×) | 4μl | 4μl | 4μl | 4μl |
| Poly[d (I-C) ] (1μg/μl) | 1μl | 1μl | 1μl | 1μl |
| Poly-L-Lysine (0.1µg/µl ) | 1μl | 1μl | 1μl | 1μl |
| DIG标记的探针(1pmol/μl) | 2μl | 2μl | 2μl | 2μl |
| 细胞核蛋白 | ―― | 10μg | 10μg | 10μg |
| 未标记的探针(50pmol/μl) | ―― | ―― | 4μl | ―― |
| Hif1α抗体(1g/l) | ―― | ―― | ―― | 3μl |
| 双蒸水 | Up to 20μl | Up to 20μl | Up to 20μl | Up to 20μl |

#### 4.3 电泳及转膜

(1)于实验前一天配制6%聚丙烯胺凝胶：

53

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |
| 双蒸水 | 30%丙烯酰胺 | 5×TBE | 10%过硫酸铵 | TEMED | 总体积 |
| 13.84 ml | 4ml | 2 ml | 150μl | 10μl | 20 ml |

混匀后，灌入固定好的玻璃板中，避免产生气泡，插上加样梳，于4oC冰箱密封放过夜，使胶聚合完全，电泳前拔出加样梳，用双蒸水反复冲洗加样孔。

(2)预电泳：以10V/cm电压进行预电泳30min。

(3)电泳：于样品管中加入5μl Loading Buffer混匀后，上样，电泳电压为80

伏(10V/cm板长) ，电泳缓冲液为0.5×TBE，待溴酚蓝电泳至3/4时停止电泳。

(4)转膜：取下凝胶，切除多余部分凝胶，按凝胶大小裁剪3MM Whatman

滤纸和尼龙膜，在0.5×TBE缓冲液中浸泡3min，从正极到负极按海绵→3M滤纸

→尼龙膜→凝胶→3M滤纸→海绵叠放于转膜仪的夹板中，于0.5×TBE的冰冷缓冲液中以400mA转膜30min。

(5)紫外交联：待转膜结束后，做好标记，将尼龙膜含探针的一面朝上，置于紫外交联仪下强度120mJ交联3min。

#### 4.4 免疫化学发光

(1)将尼龙膜用Washing Buffer（含0.3% Tween-20的马来酸缓冲液） 于摇床上漂洗1～5min。

(2)于1×Bl ocking Solution 100ml室温孵育30min，于摇床上摇动。

(3)将尼龙膜转入20ml的Antibody solution室温孵育30min，于摇床上摇动；

(4) Washing Buffer洗膜2次，各洗15min。

(5)在20ml Detection buffer(0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, pH 9.5)中平衡

5 min，于摇床上摇动。

(6)于尼龙膜含有探针的一面小心滴加1ml的CSPD working Solution (组分为0.1mg/ml CSPD的储备液以1: 100稀释于Detection buffer中)，用保鲜膜将膜盖住尼龙膜以使CSPD工作溶液均匀分布，小心排除气泡，室温避光孵育5min。

(7)于化学发光成像系统曝光30min，拍下结果。

（六） 染色体免疫共沉淀（**CHIP**）检测HIF1α和**BMP4**上游**HRE**元件的结合

根据美国Active Motif公司的Chromatin Immunoprecipitation Kit 试剂盒

54

提供的实验方法进行**。**实验流程如图1所示：



**ChIP流程图**

1、细胞处理：以15cm皿培养细胞，待融合度为70-80%时，换0.5%FBS血清，缺氧箱中继续培养（37℃, 5%CO2, 1%O2）12h。

2、 细胞固定及破碎

2.2待细胞可以收集前，新鲜准备固定液、1×PBS、甘氨酸终止固定液和细胞刮离液。

2.3弃去细胞培养基，加20ml固定液，摇床上摇10分钟

2.4弃固定液，加10ml冰预冷的1×PBS，前后摇皿5分钟，弃PBS。

2.5加10ml甘氨酸终止固定液，旋转使液体覆盖整个皿，摇5分钟。

2.6弃甘氨酸终止固定液，加入10ml冰预冷的1×PBS，摇5秒。

2.7加30l 100mM PMSF（使用前配制）至细胞刮离液，加5ml冰预冷的细胞刮离液至15ml孔板，将细胞刮下。刮细胞时将板持一定角度将细胞刮至底部收

55

集，然后用1ml枪头将细胞转移至一15ml离心管。

#### 2.8 4oC，2500rpm（720RCF）离心10分钟。

2.9弃上清，加入1ul 100mM PMSF和1ul PIC，置-80 oC冻存。

3、 超声裂解细胞

3.1冰上解冻细胞，加入1ml冰预冷的裂解缓冲液，5l PIC, 5l PMSF，重悬细胞，冰上孵育30分钟。

3.2转移细胞至一杜恩斯组织匀浆器，置冰上匀浆10下以帮助核释放。

3.3转至一1.7ml离心管，5000rpm(2400RCF) 4oC离心10分钟。

3.4小心转移上清，弃去，用350l shearing buffer（补充1.75l PIC, 1.75l PMSF）轻轻混匀重悬，置冰上。

3.5超声：每超声20s，停30 s，共超声10次。

3.6离心，15000rpm(18000RCF) 4oC离心10分钟，将上清转移至一新的1.7ml

离心管，取50l观察超声破碎效率，剩余液体可以-80oC保存。

4、 超声效果检测

4.1取50l超声好的DNA样本至一新的离心管中，然后加入150l灭菌双蒸水、4.2 10l 5M NaCl，混匀后于65℃孵育4h。

4.3离心收集液体后，加入1l RNaseA，37℃孵育15min。

4.4加10l Proteinase K溶液并于42℃孵育1.5h。

4.5 DNA纯化：

a加200ul1:1混合的酚/氯仿，漩涡充分混匀，最大转速离心5min，

b转移上层水相至一新的EP管，加20ul3MNaAc(PH5.2)，加500ul无水乙醇，充分混匀，-80℃放置1h。

c 4℃最大转速离心10min。

d小心吸掉上层水相，加500ul 冰预冷的70%的乙醇，4℃最大转速离心

5min。

e弃上清，空气干燥沉淀。

f重悬沉淀于30uldH2O，并测定浓度，然后在1%的琼脂糖凝胶上电泳以检测DNA的剪切效果。

5、免疫沉淀

56

#### 5.1 取超声合格的染色体样品冰上解冻，从中取10　l 超声后的染色体至一

0.2ml离心管作为“Input DNA”放于－20℃保存。

5.2在2个1.7ml的硅化管按表8加入CHIP反应液，磁珠在使用前漩涡重悬，抗体最后加入反应体系。实验用抗体为hif1α，阴性对照抗体用IgG。

表8 CHIP实验免疫沉淀反应体系

| 试剂 一个反应的加入量 |
| --- |
| Protein G Magnetic 25.0l  CHIP buffer 1 10.0l  Sheared chromatin 8.0g  Protease inhibitor cocktail(PIC) 1.0l  ddH2O 54.0l  Hif1αorIgG antibody(1g/l) 2.0l |
| Total 100.0l |

#### 5.3 将离心管盖盖紧，放置于4℃、摇床上上下颠倒孵育过夜。

6、 磁珠洗涤

6.1第二天将EP管轻轻离心收集磁珠，然后放置于磁力架上待磁珠沉淀。小心弃去上清液（避免碰到磁珠）。

6.2向离心管中加800l ChIP Buffer 1，用枪头吹打重悬，然后置于磁力架上沉淀磁珠。

6.3小心弃去上清液，加800l ChIP Buffer 2，用枪头吹打重悬，然后置于磁力架上沉淀磁珠。

6.3小心弃去上清液，用800l ChIP Buffer 2重复洗涤一次。

6.4小心弃去上清液，并尽可能多的洗掉上清液而不吸走磁珠。

**7**、 DNA的洗脱和去交联

7.1用50l的ChIP Elution Buffer AM2重悬磁珠。

7.2在摇床上左右摇动离心管15分钟。

7.3轻轻离心收集磁珠。

7.4加50l Reverse Cross-link buffer，用枪头轻轻吹打混匀，将离心管置于磁力架上，待磁珠沉淀。

57

#### 7.5 转移上清至一新的0.2ml PCR管。

#### 7.6 取10　l“Input DNA”冰上溶解，加入39.0　l ChIP Buffer 2和1.0　l NaCl

至终体积为100l。

7.7 95℃孵育7.5和7.6步骤中的溶液15分钟。

7.8将离心管恢复至室温，轻轻离心收集液体，加2l proteinase K，盖紧盖子，混合，37℃孵育1小时。

7.9将离心管恢复至室温，加2l proteinase K Stop Solution，盖紧盖子，轻轻离心收集液体，将收集的DNA－20℃保存。

8、 PCR分析

分别以Input DNA、IgG ChIP DNA为阳性和阴性对照，以hif1αantibody ChIP

DNA为分析样品，进行PCR扩增BMP4基因的启动子上游包括HRE1（-1685~

-1455），HRE2(-405~-223)区域的序列。

#### 8.1 引物序列如表9所示：

表9 CHIP验证hif1α与BMP4上游序列结合所用PCR引物

| 引物编号 | 核苷酸序列 (5＇→3＇) | (bp) |
| --- | --- | --- |
| HRE1F | GTTACAGTGGACCAGTGGAGTC | 22bp |
| HRE1R | CCTGTATTCTACCGGCCAGAGAC | 23bp |
| HRE2F | TCATCAGTTTGGGCAGCAGTTACTC | 25bp |
| HRE2R | CTCAGTTGCCACCTTGGCTG | 20bp |

#### 8.2 PCR反应体系及反应条件：

10×PCR Buffer 2.50μl

2.5mM dNTP mix 2.0μl

Primer mix(各5uM) 2.0μl

Taq(5.0U/μl) 0.5μl

DNA 5.0μl

ddH2O 13.0μl

反应程序：94℃预变性4min，95℃变性30s，54℃退火30s，72℃延伸30s，从第二步至第四步重复36个循环，然后72℃彻底延伸6min。

8.3加完样后，离心数秒，置PCR仪中进行扩增反应。

58

#### 8.4 1.5 %的琼脂糖凝胶电泳，并用用凝胶成相仪分析，拍照。

（七） 统计学分析

所有结果运用*x*±s表示，两个样本均数的比较采用t检验。P<0.05被认为有统计学意义。

59

**结果**

## 一、 大鼠**BMP4**基因5’上游调控序列（约**3000bp**）的荧火虫荧光素酶报告载体的酶切鉴定

pGL3-BMP4、pGL3-dHRE1、pGL3-dHRE2、pGL3-ddHRE经MluⅠ和XhoⅠ双酶切后，均应出现大小为5050bp（载体片段）和3047bp左右（插入的BMP4基因5’上游调控序列）两条带。酶切后的产物用0.8%的琼脂糖凝胶电泳观察发现与预期结果一致（如图7所示）。将酶切结果正确的重组质粒送往上海英骏公司，用pGL3-enhancer空载体上的通用引物测序，并将测序结果用bioedit软件与pubmed上所查的BMP4上游序列相比较，证实pGL3-BMP4测序正确（含BMP4基因5’上游包含调控序列）。且与pGL3-BMP4相比较，pGL3-dHRE1缺失了-1543bp处的HRE1，pGL3-dHRE2缺失了-292bp处的HRE2，pGL3-ddHRE同时缺失了-1543bp和-292bp处的HRE（如图8所示）。



**图7** **pGL3-BMP4及其HRE缺失体经MluⅠ和XhoⅠ双酶切鉴定图**

M: 15000bp Marker,由上往下条带依次为(bp): 15000, 10000, 7500, 5000, 2500, 1000, 250；A: pGL3-BMP4（1）经MluⅠ和XhoⅠ双酶切鉴定；

B: pGL3-dHRE1(2)、pGL3-dHRE2（3）经MluⅠ和XhoⅠ双酶切鉴定；C: pGL3-ddHRE（4）经MluⅠ和XhoⅠ双酶切鉴定；

60





HRE1 HRE2

**图8** **pGL3-BMP4及其HRE缺失体测序结果比较**

将pGL3-BMP4，pGL3-dHRE1，pGL3-dHRE2，pGL3-ddHRE测序后与网上所查到的BMP4上游调控序列（即图中的control）相比较，结果pGL3-BMP4与control序列基本能够重合。pGL3-dHRE1, pGL3-dHRE2, pGL3-ddHRE序列除了缺失的HRE元件，其他碱基与pGL3-BMP4完全一致。图8中将HRE1和HRE2所在位置截图出来，说明pGL3-dHRE1成功缺失了HRE1，pGL3-dHRE2成功缺失了HRE2，pGL3-ddHRE同时缺失了HRE1和HRE2.

## 二、 缺氧对pGL3-BMP4及其HRE缺失体表达的影响

将pGL3-enhancer、pGL3-BMP4及缺失HRE元件的pGL3-dHRE1、pGL3-

dHRE2、pGL3-ddHRE1转染大鼠PASMC细胞，转染后12h将其中一块板中的细胞缺氧箱继续培养，48h后裂解细胞检测荧光素酶活性。结果显示，作为对照的pGL3-enhancer空载体的萤火虫荧光素酶活性并不受缺氧条件的影响。pGL3-BMP4在缺氧条件下较常氧具有更高的萤火虫荧光素酶活性，并且二者之间存在显著性差异。而在缺失HRE1，HRE2，或者两个HRE同时缺失时，缺氧条件下的萤火虫荧光素酶活性不再有显著性变化（如图9所示）。

＊

N

CH

200

relative luciferase activity(%

180

160

140

120

100

80

60

40

20

0

BMP4-luc dHRE1-luc dHRE2-luc ddHRE-luc

**图9** **缺氧条件下pGL3-BMP4及其HRE缺失体萤火虫荧光素酶测定**

61

将pGL3-BMP4，pGL3-dHRE1，pGL3-dHRE2，pGL3-ddHRE分别转染大鼠远端PASMCs后，分别于常氧和缺氧下继续培养48h，裂解细胞并检测其中的萤火虫荧光素酶活性，结果以海肾荧光素酶校正后，缺氧后萤火虫荧光素酶活性相对常氧条件下萤火虫荧光素酶活性

（100%）的百分比，结果以均值±标准差表示，n=5，＊与对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异。

## 三、 过表达HIF1α对**pGL3- BMP4**及其**HRE**缺失体表达的影响

大鼠PASMC细胞被HIF1α过表达的腺病毒载体AdCA5.0或对照的腺病毒

AdlacZ载体感染后，分别转染萤火虫荧光素酶载体pGL3-enhancer、pGL3-BMP4及缺失HRE元件的pGL3-dHRE1、pGL3-dHRE2、pGL3-ddHRE1，转染后48h裂解细胞检测荧光素酶活性。结果显示，作为对照的pGL3-enhancer空载体的萤火虫荧光素酶活性并不受HIF1α过表达的影响。pGL3-BMP4在HIF1α过表达时表现出较对照具有更高的萤火虫荧光素酶活性，并且二者之间存在显著性差异。而在缺失HRE1，HRE2，或者两个HRE同时缺失时，被HIF1α过表达的腺病毒所感染的细胞中的萤火虫荧光素酶活性并没有显著性变化（如图10所示）。

＊

AdLacZ

AdCA5.0

200

relative luciferase activity(%

180

160

140

120

100

80

60

40

20

0

BMP4-luc dHRE1-luc dHRE2-luc ddHRE-luc

**图10** **HIF1α过表达时pGL3-BMP4及其HRE缺失体萤火虫荧光素酶测定**

将pGL3-BMP4，pGL3-dHRE1，pGL3-dHRE2，pGL3-ddHRE分别转染感染了AdCA5.0和AdlacZ的大鼠远端PASMCs后，常氧继续培养48h，裂解细胞并检测其中的萤火虫荧光素酶活性，结果以海肾荧光素酶校正后，缺氧后萤火虫荧光素酶活性相对常氧条件下萤火虫荧

62

光素酶活性（100%）的百分比，结果以均值±标准差表示，n=5，＊与对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异。

## 四、 **EMSA**和**Supershift assay**实验分析HIF1α与**HRE**元件的结合

将大鼠原代培养的远端PASMCs缺氧处理后，分别提取PASMCs核蛋白，进行EMSA和Supershift assay，检测HRE元件是否能与HIF1α特异性结合。结果如图

11所示，核蛋白能与标记探针HRE1，HRE2结合(lane 2, 6)，另外同时加入了50×的特异性DNA片段作为竞争试验，核蛋白-DNA结合带消失(lane 3, 7)，说明核蛋白与HRE的结合是特异的。将核蛋白与HIF1α特异性抗体孵育后再进行EMSA，即Supershift assay。结果显示在抗体与转录因子结合后，因空间位阻而影响了探针与转录因子的结合，EMSA条带消失或减弱(lane 4, 8)，表明HRE元件与转录因子HIF1α能特异结合。



Lane 1 2 3 4 5 6 7 8

**图11** **EMSA检测HIF1α与HRE元件的结合**

Lane1，5：自由探针；Lane2, 6：DIG标记的HRE探针，可见有HRE与HIF1α的结合条带；Lane3, 7：过量的未标记的自由探针竞争DIG标记的HRE与HIF1α的结合，使DIG标记的HRE与HIF1α的结合条带消失。Lane8, 9：supershift实验显示EMSA结合条带减弱。

## 五、 **CHIP**实验分析HIF1α与**HRE**元件的结合

将大鼠原代培养的远端PASMCs缺氧处理后，固定细胞后超声裂解分析其中

63

的内源性HIF1α与顺式作用元件HRE的结合情况。其中input为超声后的含有全部

DNA的阳性对照，所以PCR扩增能见到强的目的条带（HRE1预期扩增条带大小为230bp，HRE2预期扩增条带大小为182bp），IgG是阴性对照抗体沉淀DNA，能见到弱的目的条带，说明IgG与染色体DNA有少量的非特异性结合，N和CH是常氧和缺氧条件下的染色体DNA与HIF1α抗体的结合。PCR显示缺氧条件下HRE与

HIF1α有强结合条带。而常氧条件下只有较弱的结合带，表明缺氧条件下HIF1与

HRE元件的结合显著性增加。（结果如图12所示）。

**M** input IgG N CH

**(bp)**

**A 250**

**100**

**(Bp) 250**

**100**

HRE1

6

5

4

3

2

1

0

N

CH

＊

**B**

**M input IgG** N CH

**HRE1**



**HRE2**



HRE2

12＊

10

8

Fold to Nor

Fold to nor

6

4

2

0

N CH

**图12** **CHIP检测HIF1α与HRE元件的结合**

A：图片显示染色体免疫共沉淀产物以HRE1，HRE2处的引物进行PCR扩增的产物。

B：柱状图以均数±标准差表示常氧和缺氧条件下HRE1, HRE2 PCR产物的条带灰度值差异。

64

**讨论**

缺氧诱导因子-1（HIF1）是肺动脉高压发生发展中的一个重要的转录因子[55]，在缺氧性肺动脉高压中表达增加。而且研究表明，随着缺氧时间的延长，HIF1与相应DNA的结合活性也呈现一个增高趋势[56]。提示缺氧条件下HIF1对靶基因的转录作用增强。我们课题组前期研究工作也证明了在缺氧的大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中，BMP4前体及成熟体表达均增高，并且在第一部分中已经说明这种增高受HIF1的调控。那么，通过本部分研究，我们希望能明确HIF1是如何调节

BMP4的表达。

HIF1属于螺旋-环-螺旋（basic helix-loop-helix, bHLH）家族[57, 58]，经N-末端α-螺旋插入到DNA大沟中与其顺式作用元件结合。当细胞暴露在缺氧下时，

HIF1α亚基稳定表达，并转位入核，与HIF-1β（ARNT）亚基结合形成二聚体而被激活，激活的HIF1通过Ser22，Ala25，Arg30三个氨基酸特异性地识别顺式作用元件HRE（核心序列：5’(G/C/T) -ACGTGC-(G/T) 3’) 并与之结合，从而启动或促进其下游基因的转录调控[59,60]。在缺氧性肺动脉高压中，HIF1作为转录因子，可以调节有关红细胞增生，血管生成、糖酵解及细胞增殖等100多种与缺氧相关基因的表达。如可通过直接与结缔组织生长因子上游启动子序列中的HRE元件结合并促进其转录，促进胶原合成[39]。HIF1还可以与HRE上调血小板衍生因子（platelet-derived growth factor, PDGF）和间质细胞衍生因子（stromal cee-derived factor-1, SDF-1）的表达，通过PDGF和SDF-1参与血管的成熟和血管网的形成[40-41]等。HIF-1与HRE元件的结合的改变能引起相应靶基因表达的增高或降低[61]。

HIF1对BMP4的调节有以下两种可能，其一是通过调节HIF1下游靶基因或下游信号通路，而下游靶基因或者下游信号通路的改变可以调节BMP4的表达。其二是HIF1作为反式作用因子，直接与BMP4上游的HIF的特异性顺式作用元件结合，从而调节BMP4的转录，引起BMP4表达变化。所以，本研究首先用Genomatix软件分析了BMP4上游约3000bp的调控序列，发现有两个HRE元件，分别在BMP4上游约-1543（HRE1, 核心序列: GGGGCA**TACGTGCG**CTC）和-252 (HRE2，

核心序列：CTCTTG**CACGTG**GTCCC） 处。因此，HIF1与BMP4上游的HRE元

65

件结合就有可能。为分析缺氧时HIF1是否是通过与HRE元件的结合来直接调控

BMP4的表达，本研究构建了BMP4上游调控序列的荧光素酶报告载体

（pGL3-BMP4），并突变了其中的HRE元件（pGL3-dHRE1、pGL3-dHRE2、pGL3-ddHRE），然后在缺氧或者HIF1α过表达时观察这几个报告载体的萤火虫荧光素酶活性。结果显示在缺氧或HIF1α过表达时，萤火虫荧光素酶活性增加，而缺失HRE元件时，缺氧或HIF1α过表达所表现出的萤火虫荧光素酶的增加也消失。这些结果表明BMP4受缺氧和HIF1α调控，并且这种调控是与BMP4上游的

HRE元件相关的。

那么要证明缺氧时BMP4的调控是通过HIF1α和HRE元件的直接结合来调控的，我们选用了体外实验EMSA和体内实验CHIP来说明问题。EMSA是一种研究

DNA与蛋白质相互作用的常用技术。这项技术是基于DNA/蛋白质复合体在聚丙烯酰胺凝胶（PAGE）中有不同的迁移率的原理。当核转录因子与一条人工合成的特异性DNA（即探针）结合后，其在PAGE中的迁移率将小于未结合核蛋白转录的DNA，从而检测与DNA结合的蛋白转录因子。实验证明BMP4上游2个HRE探针与核蛋白混合反应后均能显示强的结合条带。表明HRE能与核蛋白中某转录因子结合。进一步用Supershift实验证明与HRE探针结合的元件就是HIF1α。染色体免疫共沉淀（CHIP）技术是目前唯一研究体内DNA与蛋白质相互作用的方法。该方法也证实了大鼠的肺动脉平滑肌细胞中存在有HIF1与HRE元件的结合。并且这种结合在缺氧条件下会显著增加。这种增加很可能是因为HIF1α在缺氧下表达增高以及缺氧下HIF1与其顺式作用元件HRE的结合能力增强所致。

综上所述，我们发现缺氧条件下，大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中HIF1通过与

BMP4上游调控序列中的HRE元件结合，从而调控BMP4的表达。

66

**第三部分在慢性缺氧的大鼠PASMCs中，BMP4调节**

**TRPC1, 6信号通路的研究**

**材料与方法**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **一、主要材料**  **（一）质粒和细菌**  pGEM-T 载体系统 |  | 美国 Promega 公司 |
| pMD18-T 载体  pGL3-enhancer 质粒  PRL-SV40 海肾内参表达载体大肠杆菌菌株 Top10  HEK293 细胞  AdCA5.0 病毒 |  | TAKARA 公司  美国 Promega 公司美国 Promega 公司  北京百泰克生物技术公司广州医科大学实验医学研究中心保存  由美国霍普金斯大学赠送 |
| **（二）主要试剂及耗材** |  |  |
| SiRNA 转染试剂  2.5cm 圆形盖玻片硝苯地平  CPA  Fura-2-AM  hBMP4 重组蛋白 |  | 美国 Invitrogen 公司美国 Invitrogen 公司美国 Sigma 公司  美国 Sigma 公司美国 Invitrogen 公司美国 R&D 公司 |
| **（三）主要仪器** |  |  |
| Incyte 细胞内钙浓度检测系统  Nikon TSE 100Ellipse 倒置显微镜  PH 计 |  | 美国 ROBERTS OXYGEN 公司  日本 Nikon 公司美国梅特勒-托利多公司 |
| **（四）主要溶液的配置** |  |  |
|  | 67 |  |

#### 1、 无钙的PSS溶液：MgCl20.284g、葡萄糖1.8g、8.25g NaCl、0.35gKCl、HEPES 2.38g，0.038gEGTA，加入1000ml超纯水，再用1M的NaOH溶液调至

PH=7.4.

#### 2、 无钙PSS溶液：含10uM CPA、5uM硝苯地平无钙PSS 50ml

30mM CPA 16.8μl

30mM硝苯地平8.4μl

#### 3、 有钙的PSS溶液：CaCl2.2H2O 0.265g、葡萄糖1.8g、8.25g NaCl、0.35gKCl、

MgCl20.114g、HEPES 2.38g，加入1000ml超纯水，再用1M的NaOH溶液调至PH=7.4.

#### 4、 有钙PSS溶液：含10uM CPA、5uM硝苯地平有钙PSS 50ml

30mM CPA 16.8μl

30mM硝苯地平8.4μl

## 二、 实验方法：

（一） 缺氧条件后**BMP4**对**smad**，**p38**，**ERK**信号通路的激活情况

1、 原代培养大鼠肺PASMCs共8皿，待细胞融合度为50-60%时，将细胞换上

0.5 % FBS低糖DMEM培养基，继续培养24h，将细胞分成2组，分别置于常氧和缺氧培养箱培养60h后，两组细胞各留取一皿加DMSO作为对照，另外六皿均加入hBMP4重组蛋白(50ng/ml)刺激细胞，刺激时间分别为10min，20min，30min，hBMP4刺激时细胞放置于常氧培养箱即可。刺激后的细胞提取总蛋白用于做western blot分析。

2、 检测磷酸化的总蛋白提取

(1)吸去培养基，用PBS洗涤细胞三次；

(2)加入1×SDS sample buffer 80μl，在每ml 1×SDS sample buffer中加入phosph-atase inhibitor cocktail 2和phosph-atase inhibitor cocktail 3各20μl，立即将细胞刮离下来，并转移至一新的预冷的1.5ml离心管中，置于冰上。

(3)冰上超声10-15秒。

68

(4) 13000rpm离心15分钟，取上清，并立即加入5×上样缓冲液，95℃煮沸5分钟。

(5)样品置于-80℃保存。

3、 western blot检测细胞裂解液中p38，ERK，smad蛋白水平。

（二） 沉默**p38**，**ERK**，**smad**信号通路对**TRPC1**、**TRPC6**表达的影响

1、 原代培养大鼠远端肺PASMCs，待细胞融合度为50%左右时，将细胞换上

0.5% FBS低糖DMEM培养基，继续培养24h，用invitrogen公司的siRNA转染试剂盒转染小分子siRNA，包括作为阴性对照的NT siRNA、沉默p38，ERK，smad信号通路中的p38 siRNA, ERK1 siRNA, ERK2 siRNA, smad1 siRNA, smad5 siRNA和smad8 siRNA. 转染后60h提取细胞总RNA，用qPCR方法检测的p38，ERK1，

ERK2，smad1，smad5，smad8的siRNA沉默效率。

#### 1.1 siRNA由江苏吉玛公司设计合成，合成后的siRNA用150μlDEPC水溶解成

20μM的使用浓度。siRNA序列见表10。

表10 沉默大鼠PASMCs中p38，ERK及smad的siRNA序列

| Gene and species | Primer Sequence (Forward/ reverse) | Source sequence |
| --- | --- | --- |
| P38 siRNA | 5'- GACCUCCUUAUAGACGAAUTT-3'  5'-AUUCGUCUAUAAGGAGGUCTT-3' | NM\_031020 |
| ERK1 siRNA | 5'-GCUACACCAAAUCCAUUGATT-3'  5'-UCAAUGGAUUUGGUGUAGCTT-3' | NM\_017347 |
| ERK2 siRNA | 5'-CCAGGAUACAGAUCUUAAATT-3'  5'-UUUAAGAUCUGUAUCCUGGTT-3' | NM\_053842 |
| Smad1 siRNA | 5'-GUGCUCUAUUGUGUACUAUTT-3'  5'-AUAGUACACAAUAGAGCACTT-3' | NM\_013130 |
| Smad5 siRNA | 5'-CCUCGUCACAACGAAUUCATT-3'  5'-UGAAUUCGUUGUGACGAGGTT-3' | NM\_021692 |
| Smad8 siRNA | 5'-CCCUCCAAUAACAGGAAUATT-3'  5'-UAUUCCUGUUAUUGGAGGGTT-3' | AF012347 |

#### 1.2 转染：转染方法参考试剂盒说明书，具体步骤如下：

(1)转染前将细胞换上无抗生素的无血清的FBS培养基；

(2)取150μl opti-MEM I于一1.5mlEP管，加入9μl Lipofectamine RNAiMAX Reagent；

(3)另取150μl opti-MEM I于一1.5ml另一EP管，加入4.5μl 20uM siRNA;

69

(4)将两者混合，室温放置5分钟；

(5)取混合液300μl逐滴加入细胞中，轻轻摇动孔板，混匀。

(6)转染后12h换上完全培养基。

(7)待转染后48h提取RNA做沉默效率检测。

1.3总RNA提取以及荧光定量方法参考第一部分，荧光定量所用引物见表

11，内参引物见表1。

表11 沉默效率检测所用到的荧光定量引物

| Gene | Primer Sequence (Forward/ reverse) | Source sequence |
| --- | --- | --- |
| p38 | 5'- GTCTGGGAGGTGCCCGAG-3'  5'-CCAACAGACCAATCACATTCTCGTGC -3' | NM\_031020 |
| ERK1 | 5'- CTGGCTTTCTGACCGAGTATGTGG-3'  5'- CAGCTCCTTCAGCCGCTCC -3' | NM\_017347 |
| ERK2 | 5'- TGAGCACCAGACCTACTGTCAGAG-3'  5'- GGTTGGAAGGCTTGAGGTCAC -3' | NM\_053842 |
| Smad1 | 5'-GGTGGAAACAGGGCGACGA-3'  5'-CAGGGAGCGAGGAATGGTGAC-3' | NM\_013130 |
| Smad5 | 5'-CCCTGCCAATAACAAGAGCCGC-3'  5'-GCTGGGAATCTTACAGACGGTGG-3' | NM\_021692 |
| Smad8 | 5'-CTGAAGCCCTTGGAATGCT-3'  5'-TGAAGCCATCTATGAGCACAC-3' | AF012347 |

2、 原代培养大鼠肺PASMCs，待细胞融合度为50-60%时，将细胞换上0.5%

FBS低糖DMEM培养基，继续培养24h，将细胞分成2组，转染经检测后沉默效率好的小分子siRNA，包括作为阴性对照的NT siRNA、沉默p38，ERK，smad信号的p38 siRNA, ERK1 siRNA, ERK2 siRNA, smad1 siRNA, smad5 siRNA和smad8

siRNA。转染后12h将两组细胞分别置于常氧（37℃, 5%CO2）和低氧（37℃，

5%CO2，4%O2）条件下继续培养48h。之后提取细胞总RNA或者总蛋白，检测p38，

ERK1，ERK2及smad1/5/8沉默后TRPC1、TRPC6的mRNA或蛋白表达情况。总

RNA提取，荧光定量qPCR方法，总蛋白提取，蛋白定量及western blot方法参照第一部分实验。siRNA转染转染方法同本部分1.2。

70

（三） 沉默**p38**，**ERK**信号通路对基础钙的影响

1、 原代培养大鼠细胞后，转染p38，ERK的siRNA，转染后12h将细胞分别置于常氧和缺氧培养箱继续培养48h，之后检测细胞的基础钙。具体细胞处理同上部分。

2、 大鼠肺动脉平滑肌细胞内钙离子浓度检测

2.1原理：

Fura-2-AM是一种可以穿透细胞膜的荧光染料，分子式为C44H47N3O24，分子量为1001.9，是最常用的检测细胞内钙离子浓度的荧光探针之一。Fura-2-AM进入细胞后可以被细胞质中的酯酶剪切形成Fura-2, Fura-2可与细胞内游离的

Ca2+以1: 1结合。在激发荧光波长为340nM左右时，当Fura-2结合Ca2+，其荧光强度F340随细胞内Ca2+增加而增强；而在激发荧光波长为380nM左右时，当它结合Ca2+时，荧光强度F380则随细胞内Ca2+增加而下降；在激发荧光波长为360nM时，fura-2的荧光强度F360与Ca2+浓度无关。这样，细胞内游离

Ca2+浓度可以直接由两个激发波长上的荧光强度的比值F340/F380来计算出来，即双激发波长荧光法。这种比值法可排除因Fura-2本身浓度的变化、光学通路的变化、以及仪器灵敏性的变化等因素引入的误差。

对于双波长的荧光指示剂，用比值信号来测定胞内游离Ca2+浓度，不必校正，用以下公式计算细胞内游离Ca2+浓度[Ca2+] i =Kd(Fd/Fs)(R-Rmin) /

（Rmax-R）。公式中Kd为荧光剂与Ca2+形成配合物的解离常数。Fd和Fs分别表示荧光剂没有结合Ca2+和被Ca2+饱和时在340-380nm (对于Fura-2)处的荧光强度。R为实验观察到的荧光比值，Rmin为胞内荧光剂量最小结合Ca2+时的荧光比值，Rmax为胞内荧光剂被Ca2+饱和时的荧光比值。Rmin和Rmax可通过实验测定。

2.2大鼠肺动脉平滑肌细胞内钙离子浓度检测具体步骤：

（1）向处理好的细胞培养皿内加入Fura-2，每2ml培养基加入5ul事先溶好的染料Fura-2（每支加20ulDMSO溶解，-20℃保存），轻摇培养基使染料均匀分布，孵育45-60min；

（2）准备好棉签、剪刀、注射器、适宜的针头和PBS液，调整好恒流泵的流速（灌流液流动速度为0.8-1.0ml/min）；

71

（3）取出细胞爬片，用纸巾吸除多余培养基，在细胞灌流器两面均涂上适量的高真空润滑脂，将有细胞面向上贴在灌流器下表面，用手轻压玻片边沿使其贴紧，马上向凹槽内加入少量培养基液，保持细胞处于湿润，再取一块玻片贴在上表面，使灌流腔处于封闭的状态，连接灌流装置，检查是否漏水，将灌流器安装在固定加热架上固定好；

（4）提前半小时预热氙灯，再打开荧光显微镜和电脑，将固定架放置于显微镜的载物台上，接好事先调好的灌流装置，打开恒流泵，先用含有钙离子的

PSS进行灌流，在镜下观察细胞形态，选取合适的视野，固定视野后进行操作；

（5）调整显微镜至荧光测定模式，打开InCytIm2软件，设置好参数，以有

Ca2+的PSS灌洗细胞15分钟，前10min不记录数据，后5min用360nM波长进行荧光激发，每30s照相测定荧光强度

（6）实时收集数据并分析。

2.3数据处理与统计分析

以200倍放大倍数视野下所有细胞为对象，对每一时间点全部细胞平均钙离子水平进行计算，做出钙水平曲线。用SPSS 13.0软件进行统计学分析。计量数据以*x*±s表示，两个样本均数的比较采用t检验，P<0.05被认为有统计学意义。

（四） 统计学分析

所有结果运用*x*±s表示，两个样本均数的比较采用t检验，多组均数比较采用单因素方差分析（one way-ANOVA）。P<0.05被认为有统计学意义。

72

**结果**

## 一、 **BMP4**下游信号通路的激活

原代培养大鼠肺动脉平滑肌细胞，分别于常氧和缺氧下培养60小时后，加

BMP4重组蛋白处理10，20，30分钟，收集蛋白做western blot检测t-p38, t-ERK1/2以及p-p38，p-ERK1/2，p-Smad的蛋白表达水平。检测结果如下：常氧或缺氧条件后，用BMP4刺激细胞，p38，ERK1/2总蛋白表达变化不大或者稍有下降（具体见图13）。而被BMP4所激活的蛋白磷酸化水平变化很大。在没有BMP4刺激情况下，p38，ERK1/2磷酸化蛋白缺氧后较常氧显著增加。而Smad磷酸化水平常氧和缺氧下不存在显著性差异。其中p-p38在缺氧下较常氧甚至能增加6倍左右，p-ERK1/2也能增加3倍左右。常氧条件下，单纯用BMP4重组蛋白刺激，p38，

ERK1/2，Smad的磷酸化水平都显著增加，并且在刺激10分钟就能表现出显著性差异，而且这种差异能在刺激30分钟后仍然维持。其中p-p38，p-ERK1/2的增加倍数在1.5-2左右，而p-Smad增加最高水平为常氧的25倍左右。缺氧60小时后，用BMP4刺激，p38，ERK1/2，Smad的磷酸化水平较单纯缺氧也能显著性增加，其中p-p38，p-ERK1在缺氧条件下较常氧下表现出对BMP4更为敏感，相较于常氧对照增加10倍以上。而Smad虽然在缺氧条件下也可以被BMP4所激活，但在缺氧条件下Smad的磷酸化水平较常氧下激活更少。说明缺氧条件下Smad对BMP4的刺激已经表现出激活障碍。缺氧后p38，ERK1/2，Smad的磷酸化水平在BMP4刺激30分钟后均开始下降（见图14）。

**A**

**N** CH



t-p38



t-ERK1/2



Actin

**10** 20  **30** 10 20  **30**

**C** BMP4 C BMP4

73

**B**

t-p38

0.80

0.70

t-p38 protein/actin

0.60

0.50

0.40

0.30

0.20

0.10

0.00

N

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | | | | | | | | | | | | | | |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  | |

N B4

10m

N B4

20m

N B4

30m

CH CH B4

10m

CH B4

20m

CH B4

30m

**C**

t-erk1

1.40

1.20

t-erk1 protein/actin

1.00

0.80

0.60

0.40

0.20

0.00

N N B4

10m

N B4

20m

N B4

30m

CH CH B4

10m

CH B4

20m

CH B4

30m

D

t-erk2

1.40

1.20

t-erk2 protein/actin

1.00

0.80

0.60

0.40

0.20

0.00

N N B4

10m

N B4

20m

N B4

30m

CH CH B4

10m

CH B4

20m

CH B4

30m

**图13** **BMP4下游信号激活后总蛋白表达**

74

原代培养大鼠远端rPASMCs后，常氧或缺氧条件下培养60h，以BMP4重组蛋白分别刺激10分钟，20分钟，30分钟。然后检测BMP4下游的p38，ERK1/2的总蛋白表达情况。

A： 总蛋白p38，ERK1/2在BMP4刺激前后的表达图片；

B： 柱状图用均数±标准差显示t-p38蛋白在BMP4刺激后的蛋白表达情况。

C：柱状图用均数±标准差显示t-ERK1蛋白在BMP4刺激后的蛋白表达情况。

D：柱状图用均数±标准差显示t-ERK2蛋白在BMP4刺激后的蛋白表达情况。

n=3，结果无统计学差异。

**A**

**N** CH



**p-p38**



**p-ERK1/2**



**p-smad**



**Actin**

**10** 20 30 10  **20** 30

**C** BMP4 C BMP4

**B**

p-p38

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

16

14

p-p38 protein/actin

12

10

8

6

4

2

0

N N B4 10m N B4 20m N B4 30m CH CH B4

10m

CH B4

20m

CH B4

30m

75

**C** p-erk1

14.00

12.00

p-erk1 protein/actin

10.00

8.00

6.00

4.00

2.00

0.00

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

N N B4

10m

N B4

20m

N B4

30m

CH CH B4

10m

CH B4

20m

CH B4

30m

**D**

p-erk2

7.00

6.00

p-erk2 protein/actin

5.00

4.00

3.00

2.00

1.00

0.00

\*

\*

\*

\*

\*

\*

\*

N N B4

10m

N B4

20m

N B4

30m

CH CH B4

10m

CH B4

20m

CH B4

30m

p-erk2

**E**

7.00

n 6.00

i t c

a 5.00

/ n

e 4.00

i

t

o r

p 3.00

2

k r 2.00

e

- p 1.00

0.00

N N B4 N B4 N B4 CH CH B4 CH B4 CH B4

10m 20m 30m 10m 20m 30m

p-smad

30.00

\*

25.00

20.00

\*

\*

15.00

\*

\*

10.00 \*

5.00

0.00

N N B4 N B4 N B4 CH CH B4 CH B4 CH B4

10m 20m 30m 10m 20m 30m

p-smad protein/actin

万方数据

76

p-erk2

7.00

6.00

5.00

4.00

ein/actin

**图14** **BMP4下游信号的激活**

原代培养大鼠远端rPASMCs后，常氧或缺氧条件下培养60h，以BMP4重组蛋白分别刺激10分钟，20分钟，30分钟。然后检测BMP4下游的p38，ERK1/2，Smad的信号通路的磷酸化水平。

A： 磷酸化的p38，ERK1/2，Smad蛋白在BMP4刺激前后的表达图片

B： 柱状图用均数±标准差显示p-p38蛋白在BMP4刺激后的蛋白表达情况。

C：柱状图用均数±标准差显示p-ERK1蛋白在BMP4刺激后的蛋白表达情况。

D：柱状图用均数±标准差显示p-ERK2蛋白在BMP4刺激后的蛋白表达情况。

E：柱状图用均数±标准差显示p-Smad蛋白在BMP4刺激后的蛋白表达情况。

n=3，＊与常氧对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异。

## 二、 沉默**p38**，**ERK1/2**信号通路对**TRPC1**、**TRPC6**表达的影响

原代培养大鼠肺动脉平滑肌细胞，并转染NT siRNA, p38 siRNA, ERK1/2 siRNA, Smad1 siRNA, Smad5 siRNA和Smad8 siRNA，转染后用qPCR方法检测沉默效率，结果显示，相较于NT siRNA转染的对照组，用p38 siRNA, ERK1/2 siRNA, Smad1/5/8 siRNA,转染PASMC细胞后可以降低相应目的基因约80%的

mRNA表达，但不会改变非目的基因的表达（如图15A,16A,16B,17A,17B,17C所示）。并且p38，ERK1/2，Smad1/5/8沉默后，均可以降低缺氧所诱导的TRPC1，

TRPC6的mRNA与蛋白的表达水平（如图15B-F, 16C-16L, 17D-17N所示）。

**A B**

120

\*

100

MAPK mRNA(/actin %of NTsi)

80

NTsi

p38 siRNA

60

40

20

0

p38 ERK1

160

140

TRPC1 mRN(/actin %of NTsiN)

120

100

80

60

40

20

0

TRPC1

\*

#

#

NTsi N p38si N NTsi CH p38si CH

77

**C D**

TRPC6

\*

#

#

180

TRPC6 mRNA(/actin %of NTsiN)

160

140

120

100

80

60

40

20

0

NTsi N p38si N NTsi CH p38si CH

TRPC1 TRPC6

Actin

NTsi p38 si

N CH N CH



**E F**

TRPC1 TRPC6

160

140

120

TRPC1 protein/actin

100

80

60

40

20

0

NTsi N NTsi CH p38si N p38si CH

140

\*

#

#

120

100

TRPC6 protein/actin

80

60

40

20

0

\*

#

#

NTsi N NTsi CH p38si N p38si CH

**图15** **p38沉默后PASMCs中TRPC1、TRPC6的表达**

A： 柱状图用均数±标准差显示p38 mRNA沉默效率。

G： 柱状图用均数±标准差显示p38沉默后TRPC1 mRNA表达。

H： 柱状图用均数±标准差显示p38沉默后TRPC6 mRNA表达。

O：图片显示p38沉默后TRPC1、TRPC6蛋白表达。Actin作为内参。

P：柱状图用均数±标准差显示p38沉默后TRPC1蛋白表达。

Q： 柱状图用均数±标准差显示p38沉默后TRPC6 蛋白表达。

n=3，＊与常氧对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异。#表示与缺氧对照相比P＜0.05，结果有统计学差异。

78

**A B**

\*

\*

NTsi

ERK2 siRNA

120 120

100

ERK mRNA(/actin %of NTsi)

80

60

100

80

NTsi

ERK1 siRNA

ERK mRNA(/actin %of NTsi)

60

40 40

20 20

0

ERK1 ERK2

0

ERK2 ERK1

**C D**

TRPC1 TRPC6

180

TRPC1 mRNA(/actin %of NTsiN)

160

140

120

100

80

60

40

20

0

NTsi N erk1si N NTsi CH erk1si CH

160

\*

#

#

140

TRPC6 mRNA(/actin %of NTsiN)

120

100

80

60

40

20

0

\*

#

#

NTsi N erk1si N NTsi CH erk1si CH

**E F**

TRPC1 TRPC6

200

TRPC1 mRNA(/actin %of NTsiN)

180

160

140

120

100

80

60

40

20

0

NTsi N erk2si N NTsi CH erk2si CH

180

\*

#

#

160

TRPC6 mRNA(/actin %of NTsiN)

140

120

100

80

60

40

20

0

\*

#

#

NTsi N erk2si N NTsi CH erk2si CH

79

**G H**

NTsi ERK1 si N CH N CH



TRPC1 TRPC6



Actin

140.00

120.00

TRPC1 protein(/actin %of NTsiN)

100.00

80.00

60.00

40.00

20.00

0.00

TRPC1

\*

#

#

NTsi N NTsi CH erk1si N NTsi N

**I J**

TRPC6

160.00

140.00

120.00

100.00

80.00

60.00

40.00

20.00

0.00

NTsi N NTsi CH erk1si N NTsi N

\*

#

#

TRPC1

TRPC6 protein(/actin %of NTsiN)

NTsi ERK2 si N CH N CH



TRPC6



Actin

**K L**

TRPC1 TRPC6

180.00

TRPC1 protein(/actin %of NTsiN)

160.00

140.00

120.00

100.00

80.00

60.00

40.00

20.00

0.00

NTsi N NTsi CH erk2si N erk2si N

250

200

\*

#

#

TRPC6 protein(/actin %of NTsiN)

150

100

50

0

\*

#

#

NTsi N NTsi CH erk2si N erk2si N

**图16** **ERK1，ERK2沉默后PASMCs中TRPC1、TRPC6的表达**

A： 柱状图用均数±标准差显示ERK1 mRNA沉默效率。

B：柱状图用均数±标准差显示ERK2 mRNA沉默效率。

C：柱状图用均数±标准差显示ERK1沉默后TRPC1 mRNA表达。

80

D：柱状图用均数±标准差显示ERK1沉默后TRPC6 mRNA表达。

E：柱状图用均数±标准差显示ERK2沉默后TRPC1 mRNA表达。

F：柱状图用均数±标准差显示ERK2沉默后TRPC6 mRNA表达。

G：图片显示ERK1沉默后TRPC1、TRPC6蛋白表达。

H：柱状图用均数±标准差显示ERK1沉默后TRPC1蛋白表达。

I：柱状图用均数±标准差显示ERK1沉默后TRPC6 蛋白表达。

J：图片显示ERK2沉默后TRPC1、TRPC6蛋白表达。

K：柱状图用均数±标准差显示ERK2沉默后TRPC1蛋白表达。

L：柱状图用均数±标准差显示ERK2沉默后TRPC6蛋白表达。

n=3，＊与常氧对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异。#表示与缺氧对照相比P＜0.05，结果有统计学差异。

**A** B

140

120

100

80

60

40

20

\*

0

smad1

smad5

NTsi

s1 siRNA

120

100

80

60

40

20

0

smad5

smad1

NTsi

s5 siRNA

\*

smad1 mRNA(/actin %of NTsi)

smad5 mRNA(/actin %of NTsi)

**C** D

120

\*

smad8 mRNA(/actin %of NTsi)

100

80

60

40

20

0

smad8 smad1

180

160

TRPC1 mRNA(/actin %of NTsiN)

140

120

NTsi

s8 siRNA

100

80

60

40

20

0

TRPC1

NTsi N NTsi

\*

#

#

CH

s1si N s1si CH

81

**E** F

TRPC6

160

140

120

100

80

60

40

20

0

NTsi N

NTsi

CH

s1si N s1si CH

\*

#

#

TRPC1 TRPC6

TRPC6 mRNA(/actin %of NTsiN)

Actin

**G** H

NTsi smad1 si

\*

N CH N CH



160

TRPC1 protein(/actin %of NTsiN)

140

120

100

80

60

40

20

0

TRPC1

\*

#

#

NTsi N NTsi CH s1si N s1si CH

160

140

TRPC6 protein(/actin %of NTsiN)

120

100

80

60

40

20

0

TRPC6

\*

#

#

NTsi N NTsi CH s1si N s1si CH

**I** J

TRPC1

TRPC1 TRPC6

Actin

NTsi smad5 si N CH N CH

160

140

TRPC1 protein/actin(%of NTsi N)



120

100



80

60

40



20

0

NTsi N NTsi CH

\*

#

#

S5si N s5si CH

82

TRPC6

160

140

120

100

80

60

40

20

0

NTsi N NTsi CH s5si N s5si CH

\*

#

#

**K** L

TRPC1 TRPC6

TRPC6 protein/actin(%of NTsiN)

Actin

NTsi smad8 si

N CH N CH



**M** N

160

TRPC1 protein/actin(%of NTsiN)

140

120

100

80

60

40

20

0

TRPC1

\*

#

#

NTsi N NTsi CH s8si N s8si CH

160

140

TRPC6 protein/actin(%of NTsiN)

120

100

80

60

40

20

0

TRPC6

\*

#

#

NTsi N NTsi CH s8si N s8si CH

**图17** **分别沉默Smad1，Smad5，Smad8后PASMCs中TRPC1、TRPC6的表达**

A：柱状图用均数±标准差显示Smad1 mRNA沉默效率。

B：柱状图用均数±标准差显示Smad5 mRNA沉默效率。

C：柱状图用均数±标准差显示Smad8 mRNA沉默效率。

D：柱状图用均数±标准差显示Smad1沉默后TRPC1 mRNA表达。

E：柱状图用均数±标准差显示Smad1沉默后TRPC6 mRNA表达。

F：图片显示Smad1沉默后TRPC1、TRPC6蛋白表达。

G：柱状图用均数±标准差显示Smad1沉默后TRPC1蛋白表达。

H：柱状图用均数±标准差显示Smad1沉默后TRPC6蛋白表达。

I：图片显示Smad5沉默后TRPC1、TRPC6蛋白表达。

J：柱状图用均数±标准差显示Smad5沉默后TRPC1蛋白表达。

83

K：柱状图用均数±标准差显示Smad5沉默后TRPC6蛋白表达。

L：图片显示Smad8沉默后TRPC1、TRPC6蛋白表达。

M：柱状图用均数±标准差显示Smad8沉默后TRPC1蛋白表达。

N：柱状图用均数±标准差显示Smad8沉默后TRPC6蛋白表达。

n=3，＊与常氧对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异。#表示与缺氧对照相比P＜0.05，结果有统计学差异。

## 三、 沉默**p38**，**ERK**信号通路对基础钙离子浓度的影响

原代培养大鼠细胞后，转染NT，p38，ERK1/2的siRNA，转染后12h将细胞分别置于常氧和缺氧培养箱继续培养48h，之后检测细胞的基础钙离子浓度。结果显示相较于NTsi转染的对照组，使用siRNA序列使p38，ERK1/2表达降低后，能抑制缺氧所诱导的细胞内基础钙离子浓度的升高。（见图18）。

**A B**

\*

#

#

250 250

\*

#

#

200

150

basal [Ca2+]i

200

150

basal [Ca2+]i

100 100

50 50

0

NTsi N p38si N NTsi CH p38si CH

0

NTsi N erk1si N NTsi CH erk1si CH

C

\*

#

#

300

250

200

basal [Ca2+]i

150

100

50

0

NTsi N erk2si N NTsi CH erk2si CH

84

**图18** **p38，ERK1/2沉默后对基础钙离子浓度的影响**

A：柱状图用均数±标准差显示p38沉默前后细胞内基础钙离子浓度。

B：柱状图用均数±标准差显示ERK1沉默前后细胞内基础钙离子浓度。

C：柱状图用均数±标准差显示ERK2沉默前后细胞内基础钙离子浓度。

n=3，＊与常氧对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异。#表示与缺氧对照相比P＜0.05，结果有统计学差异

85

**讨论**

近年来，由于在原发性家族性肺动脉高压中的发现了骨形成蛋白受体2（bone morphogenetic protein receptor-2, BMPR-2）基因突变，BMPs和BMPs受体及其下游的信号转导通路成为肺动脉高压的研究热点。

BMPs激活下游信号通路有smad依赖性和smad非依赖性两种途径，后者包括

ERK1/2, JNK和p38MAPK激酶途径[62,63]。Xudong Yang等[64]发现在家族性肺动脉高压病人，BMP4可通过p38MAPK和ERK1/2信号通路促进肺动脉平滑肌细胞的增殖。Jin C等[65]也发现胰岛素样生长因子-1（insulin-like growth factor 1, IGF-1）能通过p38信号通路诱导iNOS的表达，从而抑制肺动脉平滑肌细胞的凋亡，引起肺血管重塑。在本实验中，我们不仅观察了常氧和缺氧条件下p38，ERK以及Smad的激活，同时也观察了常氧和缺氧条件下p38，ERK1/2，Smad通道对BMP4刺激的敏感性是否有变化。结果发现，在大鼠远端肺动脉平滑肌细胞中，BMP4在常氧或者缺氧条件下都能诱导其下游的三条信号通路激活，但单纯缺氧只能使p38和ERK的磷酸化水平增高，而Smad的磷酸化水平在缺氧前后并没有显著性差异。并且，缺氧能使BMP4对p38，ERK1/2信号通路的诱导增强，而对Smad信号通路的诱导减弱。所以，在缺氧的肺动脉平滑肌细胞中BMP4以激活p38和ERK1/2信号通路为主。

我们课题组前期研究还发现BMP4诱导PASMCs中TRPC1，TRPC6的表达，并通过TRPC通道促进细胞内SOCE，从而增加细胞内钙离子浓度，促进非血管的收缩和增殖，并最终导致肺动脉高压的形成[16, 81]。并且目前为止，虽然有很多文献报道了p38MAPK，ERK1/2或Smad信号通路在肺动脉高压中的作用，但是，并没有直接的证据证明p38MAPK，ERK1/2和Smad对TPRC1、TRPC6表达的影响。为此，本实验特异性的沉默了p38MAPK，ERK1/2，Smad1/5/8的表达，在常氧和缺氧条件下检测TRPC1、TRPC6的表达以及基础钙离子浓度。结果显示沉默

p38MAPK，ERK1/2，Smad1/5/8的表达后，可抑制缺氧所诱导的TRPC1和TRPC6

表达上升以及基础钙离子浓度升高。

由以上结论，我们也可以很好的解释在常氧下BMP4诱导的TRPC1, TRPC6

86

表达增高可能主要是由于Smad信号通路的激活，而在缺氧条件下，BMP4表达增高，此时虽然Smad信号通路没有被激活，但是p38和ERK1/2信号通路的激活能使肺动脉平滑肌细胞中TRPC1，TRPC6表达增高，从而使SOCE增加，细胞内基础钙离子浓度增高，引起肺血管收缩及重塑，从而导致慢性低氧性肺动脉高压。

BMP4是通过与细胞膜上的激酶受体结合发挥作用。BMP4受体有I型（BMPR I）和II型（BMPRII）受体[69]。这两种受体都有保守的丝氨酸/苏氨酸激酶区域[70]，并且二者之间存在固有的亲和力[71]。BMP4先与I型受体结合，然后募集并激活I型受体，从而将BMPs信号传递给下游信号分子（如Smad1/5/8, p38, ERK）。BMPs有三种I型受体，包括ALK2(ActR-IA)，ALK3(BMPR-1A)，ALK6 (BMPR-1B)。这三种受体在人的肺动脉平滑肌细胞中均有表达。有学者在少数患遗传型出血性毛细血管扩张症的肺动脉高压患者中发现ALK1发生突变，该受体发生的突变被认为是通过Smad信号传导途径影响细胞增殖[11]。也有研究发现在青少年息肉病患者中存在ALK3基因突变[72]。BMPs的II型受体也有三种形式，BMPR-II、ActR-II和ActR-IIB. BMPR-II基因突变可致家族性肺动脉高压。Paul Yu[73]等发现，在BM PR-II功能失调后，BMP与受体的结合方式，作用途径方式改变，可能弥补BMP4信号通路受损，且不同的BMP结合方式不同[80]。例如正常时BMP4与BMP4-II/

ALK3结合，突变后主要与ActR-IIa/ALK2或ActR-IIa/ALK3结合，而BMP6则通常结合于BMPR-II/ALK2或ActR-IIa/ALK3，突变时主要结合于ActR-IIa/ALK2. 所以，Paul Yu[73]等发现虽然BMPR-II缺陷时BMP4、BMP2功能抑制，但是BMP6，

BMP7功能增强，其下游的ERK和p38仍然保持高水平的磷酸化。所以，我们可以推测虽然在遗传学PAH的发病中BMPRII突变起着重要作用，但并不能由此认为在PHA中BMPs下游的信号通路也是抑制的。并且，有研究表明在CHPH的大鼠模型PA中，BMPRII表达降低。从特发性肺动脉高压病人或者肺动脉高压的动物模型中发现，降低BMPRII的表达可以减少Smad的磷酸化。近期研究发现BMPRII缺陷后，由BMP4诱导所致的PASMCs的增殖是由BMP4刺激MAPK信号途径所致。由此可见，缺氧所致的BMPRII很可能是慢性缺氧下Smad信号通路激活降低，但p38，ERK信号通路激活增加的主要原因。

综上所述，本部分实验观察到在大鼠远端PASMCs中，BMP4可以诱导p38，

ERK1/2及Smad信号通路的激活，但在缺氧条件下以激活p38，ERK1/2信号通路

87

为主，进一步研究发现特异性沉默的p38，ERK1/2和Smad均可以抑制缺氧所诱导的TPRC1、TRPC6的表达及细胞内基础钙离子浓度的增加。

88

**第四部分在慢性缺氧的人肺动脉平滑肌细胞中，HIF1、**

**BMP4对TRPC1, 6表达的调节**

**材料与方法**

## 一、 主要材料

（一） 质粒和细菌

人肺动脉平滑肌细胞（hPASMCs）美国ScienCell公司

（二） 主要试剂及耗材

SMCM基础培养基美国ScienCell公司

SMCM完全培养基美国ScienCell公司

CCK8试剂盒碧云天公司

Transwell chamber: 24-well, 8.0-μm pore membranes美国Corning公司甲醇广州化学试剂厂

结晶紫碧云天公司

（三） 主要仪器

全自动酶标仪美国Thermo公司

自动扫描荧光显微镜德国Zeiss公司

（四） 主要溶液的配置

1、Western Blot以及基础钙离子浓度测定所用溶液的配制请参考第一部分及第三部分。

2、结晶紫染液的配制：结晶紫1g，放入研钵中，先加入10ml蒸馏水研磨，待结晶紫完全溶解后，再补入90ml蒸馏水。即为1%的结晶紫溶液。

## 二、 实验方法：

（一） **hPASMCs**的培养

89

1、 细胞复苏

(1)从干冰中取出细胞冻存管，迅速放入37℃水浴箱，边摇动使其尽快融解；

(2)室温，1000rpm离心5分钟，弃上清；

(3)加入培养基1ml，吹打重悬细胞，并移入培养瓶，加培养基至4ml，置于

5%CO2，37℃恒温培养箱中培养，次日换液。

2、 细胞传代

(1)弃培养瓶中的细胞培养液，PBS洗细胞3次；

(2)加入含EDTA的0.25%胰酶消化液500μl，置于37℃培养箱消化2分钟，此时胞质回缩、细胞间隙增大，轻轻摇晃后部分细胞脱落，立即加入细胞培养液终止消化；

(3)加入3ml细胞培养液，用吸管轻轻吹打瓶壁上细胞，形成细胞悬液；

(4)将细胞悬液分装至2个培养瓶，分别加培养基至4ml，置于5%CO2, 37℃恒温培养。

3、 细胞冻存（25cm细胞培养瓶）

(1)取对数生长期细胞，加入含EDTA的0.25%胰酶消化液500μl，置于37℃培养箱消化2分钟后立即加入细胞培养液终止消化；

(2)加入3ml细胞培养液，用吸管轻轻吹打瓶壁上细胞，形成细胞悬液；

(3)将细胞悬液转移到离心管，平衡后，室温1000rpm离心7min；

(4)小心吸除上清液，加入900μl SMCM完全培养基，轻轻吹打重悬细胞；

(5)加入100μl DMSO溶液，轻轻吹打，使细胞分布均匀，转移至2ml冻存管中；

(6)将冻存管按顺序置于4℃冰箱30min，-20℃冰箱30min，最后放入液氮罐较上层保存以供实验使用；

(7)如需长期保存，可经过3小时后移入液氮罐较下层。

（二） 在低氧条件下，**hPASMCs**中**TRPC1**，**TRPC6**，**BMP4**表达的变化将对数生长期的hPASMCs传代至35mm孔径的细胞培养皿中，待细胞融合度至

70%左右，换上0.5%FBS培养基继续培养24h，之后将细胞分成2组，分别放入常氧（37℃, 5%CO2）和缺氧箱（37℃, 5%CO2, 4%O2）中继续培养60h，然

90

后提取细胞总蛋白，并测定蛋白浓度，运用western blot方法检测hPASMCs在常氧和缺氧条件下TRPC1(一抗稀释比例：1: 500)，TRPC6（一抗稀释比例：1: 500），

BMP4（一抗稀释比例：1: 1500）的表达。具体的总蛋白提取，蛋白浓度测定以及western blot方法见第一部分。

（三） 在低氧条件下沉默HIF1α对**hPASMCs**中**TRPC1**，**TRPC6**表达的影响

1、 人HIF1α沉默效率检测

1.1细胞处理将对数生长期的hPASMCs传代至35mm孔径的细胞培养皿中，待细胞融合度至50%左右，换上0.5%FBS培养基继续培养24h，准备转染

siRNA。

1.2人HIF1α沉默效率检测所有的siRNA序列均由江苏吉玛公司设计合成，合成后的siRNA用150μlDEPC水溶解成20μM的使用浓度。转染用invitrogen公司的siRNA转染试剂盒，具体步骤参照第三部分siRNA的转染。hPASMCs转染NC siRNA，hHIF1αsiRNA后60h提取细胞总RNA，用qPCR检测不同siRNA转染后的细胞中HIF1α的表达，从而获得HIF1αsiRNA的沉默效率。细胞总RNA提取及qPCR方法见第一部分。检测HIF1α沉默效率用的qPCR引物（由大连TAKARA公司合成）见表12。

表12 沉默HIF1α所用的siRNA序列及效率检测用荧光定量PCR引物

| 引物编号 | 核苷酸序列 (5＇→3＇) | 登录号. |
| --- | --- | --- |
| HHIF-1 siRNA | 5'-CCACCACUGAUGAAUUAAATT-3'  5'-UUUAAUUCAUCAGUGGUGGTT-3' | NM\_001530 |
| HIF1α | 5'-TGCTTGGTGCTGATTTGTGAACC-3'  5'-CTGTCCTGTGGTGACTTGTCC-3' | NM\_001530 |

2、 HIF1α沉默后hPASMCs内TRPC1，TRPC6的表达将对数生长期的

hPASMCs传代至35mm孔径的细胞培养皿中，待细胞融合度至50%左右，换上

0.5%FBS培养基继续培养24h，将细胞分成2组，分别转染NC siRNA，hHIF1α

siRNA后分别置于常氧和缺氧箱中，转染后60h提取细胞总蛋白，运用western

blot方法检测hPASMCs在常氧和缺氧条件下hHIF1α沉默后TRPC1, TRPC6 的

91

表达。具体的总蛋白提取，蛋白浓度测定以及western blot方法见第一部分。

（四） 在低氧条件下沉默**BMP4**对**hPASMCs**中**TRPC1**，**TRPC6**表达的影响

1、 人的BMP4沉默效率检测由江苏吉玛公司设计合成BMP4 siRNA序列，所有的细胞处理以及转染方法均同HIF1α沉默效率检测部分，BMP4 siRNA序列及检测BMP4沉默效率用的qPCR引物见表13。

表13 沉默BMP4所用的siRNA序列及效率检测用荧光定量PCR引物

| 引物编号 | 核苷酸序列 (5＇→3＇) | 登录号 |
| --- | --- | --- |
| HBMP4 siRNA | 5'-GGACUACAUGCGGGAUCUUTT-3'  5'-AAGAUCCCGCAUGUAGUCCTT-3' | NM\_001202 |
| hBMP4 | 5'-TGAGCCTTTCCAGCAAGTTT-3'  5'-CTTCCCCGTCTCAGGCATCA-3' | NM\_001202 |

2、 BMP4沉默后hPASMCs内TRPC1，TRPC6的表达将对数生长期的

hPASMCs传代至35mm孔径的细胞培养皿中，待细胞融合度至50%左右，换上

0.5%FBS培养基继续培养24h，将细胞分成2组，分别转染NC siRNA, hBMP4

siRNA后分别置于常氧和缺氧箱中，转染后60h提取细胞总蛋白，运用western blot方法检测hPASMCs在常氧和缺氧条件下BMP4沉默后TRPC1, TRPC6的表达。具体的总蛋白提取，蛋白浓度测定以及western blot方法见第一部分。

（五） 在缺氧条件下沉默**TRPC1**，**TRPC6**对**hPASMCs**内基础钙浓度、细胞增殖及迁移的影响

1、 人的hPASMCs的TRPC1，TRPC6的沉默效率检测

TRPC1、TRPC6 siRNA序列由江苏吉玛公司设计合成，所有的细胞处理以及转染方法均同HIF1α沉默效率检测部分，TRPC1、TRPC6 siRNA序列及检测

TRPC1、TRPC6沉默效率用的qPCR引物见表14。

表14 沉默TRPC1、TRPC6所用的siRNA序列及效率检测用荧光定量PCR引物

| 引物编号 | 核苷酸序列 (5＇→3＇) | 登录号 |
| --- | --- | --- |

92

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| hTRPC1 siRNA | 5'-GCCCACCUGUAAGAAGAUATT-3'  5'-UAUCUUCUUACAGGUGGGCTT-3' | NM\_001251845 |
| hTRPC6 siRNA | 5'-GCCACUCACUCAACGUUAATT-3' | NM\_004621 |
|  | 5'-UUAACGUUGAGUGAGUGGCTT-3' |  |
| hTRPC1 | 5'-AGCCTCTTGACAAACGGGGA-3' | NM\_001251845 |
|  | 5'-ACCCGACATCTGTCCAAACC-3' |  |
| hTRPC6 | 5'-GACAGCAGACAATGGCGGTC-3' | NM\_004621 |
|  | 5'-TGCTGCATGGAGCAAACCAGT-3' |  |

2、 TRPC1，TRPC6沉默后hPASMCs内基础钙浓度的改变将对数生长期的

hPASMCs传代至35mm孔径的细胞培养皿中，待细胞融合度至50%左右，换上

0.5 %FBS培养基继续培养24h，之后将细胞分成2组，分别转染NC siRNA及有效的TRPC1 siRNA, TRPC6 siRNA，然后将其中一组细胞放入缺氧箱（37℃，5%CO2，

4%O2）中，另一组常氧（37℃, 5%CO2）继续培养。60h后测定常氧和缺氧条件下对照组以及TRPC1或TRPC6沉默后的hPASMCs内基础钙的浓度。具体siRNA转染和基础钙测定方法同第三部分。

3、 TRPC1，TRPC6沉默后hPASMCs的增殖检测

(1)将对数生长期的hPASMCs传代至35mm孔径的细胞培养皿中，待细胞融合度至50%左右，转染NC, TRPC1 siRNA, TRPC6 siRNA；

(2)转染后48h，将细胞消化，用PBS和无血清培养基先后洗涤一次，用无血清培养基悬浮细胞，计数，调整浓度为2.5×10 4 /ml；

(3)将转染不同siRNA的细胞分别接种至两块96孔板，每种转染siRNA接种5个复孔。每孔接种100μl细胞。

(4)待细胞生长24后，向每孔中加入10μl CCK8试剂，然后在培养箱中孵育2h。

(5)用酶标仪在450nm处测定细胞吸光度值。

4、 TRPC1，TRPC6沉默后hPASMCs的迁移检测

(1)将对数生长期的hPASMCs传代至35mm孔径的细胞培养皿中，待细胞融合度至50%左右，转染NC, TRPC1 siRNA, TRPC6 siRNA；

(2)转染后48h，将细胞消化，用PBS和无血清培养基先后洗涤一次，用无

93

血清培养基悬浮细胞，计数，调整浓度为2.0×10 5 /ml。在消化前 将

Transwell chamber（2块）放在37℃温育；

(3)在Transwell的下室（即24孔板底部）加入700μl无血清的培养基，将转染了不同siRNA的细胞分别加入2块Transwell的上室，每孔加入150μl细胞悬液，然后将两块Transwell分别放于常氧和缺氧培养箱继续培养24小时；

(4)从培养箱中取出Transwell，用镊子小心取出chamber，吸干上室液体，转移到标记好的预先加入约800μl甲醇的24孔板中，室温固定30分钟；

(5)取出chamber，吸干上室固定液，移到预先加入约800μl结晶紫染液的孔中，室温染色15分钟；

(6)轻轻用清水冲洗浸泡数次，取出chamber，吸去上室液体，用湿棉棒小心擦去上室底部膜表面上的细胞；

(7)用小镊子小心揭下膜，底面朝上晾干，移至载玻片上用中性树胶封片；

(8)显微镜下随机选9个视野计数，统计结果。

94

**结果**

## 一、 在低氧条件下，**hPASMCs**中**TRPC1**，**TRPC6**，**BMP4**表达的变化

以western blot方法检测常氧和缺氧60h后hPASMCs中TRPC1、TRPC6、

BMP4 的表达。结果发现在缺氧后，hPASMC 细胞中TRPC1、TRPC6、BMP4

前体及成熟体蛋白表达水平均上调（如图19所示）。

**A B**

N CH

TRPC1

TRPC1 TRPC6 p-BMP4 m-BMP4



actin

**C D**

160

140

TRPC1 protein/actin(%of N)

120

100

80

60

40

20

0

\*

N CH

140

TRPC6 protein/actin(%of N)

120

100

80

60

40

20

0

TRPC6

N CH

\*

180

160

p-BMP4 protein/actin(%of N)

140

120

100

80

60

40

20

0

P-BM P4

\*

N CH

95

**E**

M-BM P4

200

\*

m-BMP4 protein/actin(%of N)

180

160

140

120

100

80

60

40

20

0

N CH

**图 19** **低氧条件下，hPASMCs中TRPC1、TRPC6、BMP4的表达**

A：图片显示低氧条件下TRPC1、TRPC6、BMP4及内参actin蛋白表达。

B：柱状图用均数±标准差显示低氧条件下TRPC1相对于常氧下蛋白表达百分比。

C：柱状图用均数±标准差显示低氧条件下TRPC6相对于常氧下蛋白表达百分比。

D：柱状图用均数±标准差显示低氧条件下BMP4前体相对于常氧下蛋白表达百分比。

E：柱状图用均数±标准差显示低氧条件下BMP4成熟体相对于常氧下蛋白表达百分比。

n=3，＊表示与常氧对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异。

## 二、 在低氧条件下沉默HIF1α对**hPASMCs**中**TRPC1**，**TRPC6**表达的影响如图20所示，转染阴性对照的HIF1αsiRNA组的hPASMCs中HIF1α 的

mRNA较转染NTsi组内HIF1αmRNA表达量显著下降，仅为对照组的2.9%±1.3。在转染了NTsi和HIF1αsiRNA后，转染NTsi的对照组hPASMCs内缺氧可致

TRPC1, TRPC6表达增高，但是转染了HIF1αsiRNA的细胞中，这种由于缺氧所致的TRPC1, TRPC6表达增高可被抑制。

**A B**

120

hif1 nRNA(/actin %of NTsi)

100

80

60

40

20

0

NTsi hhif1αsi

TRPC1

Actin TRPC6

\*

Actin

Hif1αsi NTsi

N CH N CH



96

160

140

120

100

80

60

40

20

0

hif1αsi N hif1αsi NTsi N NTsi CH

CH

\*

#

#

**C D**

160

\*

#

#

TRPC1 protein/actin(%of NTsiN)

TRPC6 protein/actin(%of NTsiN)

140

120

100

80

60

40

20

0

hif1αsi N hif1αsi

CH

NTsi N NTsi CH

**图 20** HIF1α**沉默后TRPC1、TRPC6的表达**

A：柱状图用均数±标准差显示HIF1α 相对于对照的mRNA沉默效率。

B：图片显示HIF1α沉默后TRPC1、TRPC6及内参actin蛋白表达。

C：柱状图用均数±标准差显示HIF1α沉默后相对于对照样品的TRPC1蛋白表达百分比。

D：柱状图用均数±标准差显示HIF1α沉默后相对于对照样品的TRPC6蛋白表达百分比。

n=3, \*表示与常氧对照相比有显著性差异，P＜0.05。#表示与缺氧对照相比有显著性差异，P＜0.05。

## 三、 在低氧条件下沉默**BMP4**对**hPASMCs**中**TRPC1**，**TRPC6**表达的影响如图21所示，转染BMP4 siRNA组的hPASMCs中BMP4的mRNA较转染

NTsi对照组内BMP4 mRNA表达量显著下降。用有效的BMP4 siRNA转染细胞后发现特异性沉默BMP4表达后，可降低缺氧所诱导的TPRC1, TRPC6的表达的增高。

**A B**

120

BMP4 mRNA(/actin %of NTsi)

100

80

60

40

20

0

NTsi hBM P4 si

TRPC1

Actin TRPC6

\*

Actin

NTsi BMP4si

N CH N CH



97

**C D**

160

TRPC1 protein/actin(%of NTsiN)

140

120

100

80

60

40

20

0

TRPC1

\*

#

#

NTsi N NTsi CH B4si N B4si CH

160

140

TRPC6 protein/actin(%of NTsiN)

120

100

80

60

40

20

0

TRPC6

\*

#

#

NTsi N NTsi CH B4si N B4si CH

**图 21** BMP4**沉默后TRPC1、TRPC6的表达**

A：柱状图用均数±标准差显示BMP4 相对于对照的mRNA沉默效率。

B：图片显示BMP4沉默后TRPC1、TRPC6及内参actin蛋白表达。

C：柱状图用均数±标准差显示BMP4沉默后相对于对照样品的TRPC1蛋白表达百分比。

D：柱状图用均数±标准差显示BMP4沉默后相对于对照样品的TRPC6蛋白表达百分比。

n=3, \*表示与常氧对照相比有显著性差异，P＜0.05。#表示与缺氧对照相比有显著性差异，P＜0.05。

## 四、 在缺氧条件下沉默**TRPC1**，**TRPC6**对**hPASMCs**内基础钙浓度、细胞增殖及迁移的影响

如图22A所示，转染阴性对照的TRPC1、TRPC6 siRNA组的hPASMCs 中

TRPC1或TRPC6的mRNA较转染NC siRNA组内TRPC1、TRPC6的mRNA

表达量显著下降，分别为对照组的11.7%±1.5和14.76%±1.1。和转染NTsi的对照细胞相比，转染了TPRC1或者TRPC6特异性siRNA的人肺动脉平滑肌细胞中由缺氧所诱导的细胞内基础钙离子增高消失。并且转染了TPRC1 siRNA或TRPC6 siRNA后，缺氧所诱导的细胞增殖和迁移的增高也被抑制（如图22C-22E所示）。

98

**A B**

120

TRPC1 mRNA(/actin %of NTsi)

100

80

60

40

20

0

NTsi hTRPC1si

120

100

\*

TRPC6mRNA(/actin %of NTsi)

80

60

40

20

0

\*

NTsi hTRPC6si

**C**

2.5

2

1.5

F340/F380

1

0.5

0

**D**

#

160

140

120

100

80

60

40

20

0

\*

#

#

NTsiN

hT1siN hT6siN NTsiCH

siRNA transfection

hT1siCH hT6siCH

proliferation(%of control) in hPASMCs

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| \* | | | | | | |
|  | |  |  | # # | | |
|  |  |  |
|  |  |  |  |

NTsiN NTsiCH hT1siCH hT6siCH siRNA transfection

99

**E**

\*

#

#

250

migration(%of control) in hPASMCs

200

150

100

50

0

NTsiN NTsi CH hT1si CH hT6si CH siRNA transfection

**图 22** TRPC1**、TRPC6沉默后细胞基础钙离子浓度，增殖及迁移的变化**

A：柱状图用均数±标准差显示TRPC1相对于对照组的mRNA沉默效率。

B：柱状图用均数±标准差显示TRPC6相对于对照组的mRNA沉默效率

C：柱状图用均数±标准差显示基础钙离子浓度变化，钙离子浓度以两个激发波长下的荧光强度比值F340/F380表示。

D：柱状图用均数±标准差显示TRPC1或TRPC6沉默后细胞的增殖情况。。

E：柱状图用均数±标准差显示TRPC1或TRPC6沉默后细胞的迁移情况。

n=3，＊与常氧对照组相比P＜0.05，结果有统计学差异。#表示与缺氧对照相比P＜0.05，结果有统计学差异

100

**讨论**

本课题实验都是以原代培养的大鼠远端肺动脉平滑肌细胞作为实验基础，而最终所有的实验结果都是要用于分析肺动脉高压病人的患病原因以及疾病发生发展的机制，从而制订最佳的用药方案。所以，在第四部分，我们在人肺动脉平滑肌细胞中观察了缺氧条件下TRPC1、TPRC6以及BMP4的蛋白表达变化，验证了TRPC1、TPRC6对人肺动脉平滑肌细胞内基础钙离子浓度，细胞增殖以及迁移的影响。同时，也证明了HIF1α、BMP4对TRPC1、TRPC6表达的影响。

在前期研究中，我们已经在大鼠肺动脉平滑肌细胞中证明特异性沉默

TRPC1、TRPC6可以使缺氧条件下的细胞内SOCE和基础钙离子浓度升高受到抑制。那么，在本部分研究中，我们观察到缺氧条件下，人肺动脉平滑肌细胞中

TRPC1、TRPC6以及BMP4表达均会增加。并且沉默TRPC1、TRPC6能降低缺氧所诱导的基础钙离子浓度，细胞增殖以及细胞迁移。在PAH病人的肺动脉平滑肌细胞中可以观察到经由SOCC内流的钙离子增加[74]。TRPC是组成SOCC的通道蛋白，已经有研究证实TRPC1、TRPC6与人的肺动脉平滑肌细胞的增殖重塑的发生发展相关[75,76,77]。Yu Y等[78]证明TRPC1、TRPC6的mRNA及蛋白表达在从IPAH 患者中分离的人的PASMCs 中表达增高。Wang C[79]等证明抑制

SOC/Ca2+/NFAT信号通路可以抑制人肺动脉平滑肌细胞的增殖。我们课题组是运用体外实验，将正常的人肺动脉平滑肌细胞分离后，暴露于缺氧条件下（仅考虑缺氧因素的影响）来观察缺氧对TRPC1、TRPC6及BMP4表达的影响。结果发现其检测结果与从PAH病人中分离的PASMCs的结果基本一致。并且与我们课题组前期在动物体内实验结果也是一致的，能满足转化医学的要求。

BMP4在PAH的发生发展中具有重要作用。Yang等[80]在人的远端肺动脉平滑肌细胞中证实BMP4 可以促进细胞增殖。那么在本实验中发现特异性抑制

BMP4的表达可以抑制TRPC1、TRPC6的表达。这与Lu wenju等[81]在大鼠中

PASMCs中进行的的实验结果是一致的。那么可以推测在人的肺动脉平滑肌细胞中或者是肺动脉高压病人当中，BMP4是通过上调TRPC1、TRPC6的表达来促进肺动脉平滑肌细胞的增殖与迁移。

HIF1 是细胞为适应缺氧环境和各种病理刺激所表达的核心调控因子，能调

101

控多种与低氧条件下细胞生存相关的靶基因的转录和信号转导，在缺氧性肺动脉高压、肿瘤、炎症、白血病等多种疾病的发生发展中起着重要作用。在慢性缺氧性肺动脉高压中，HIF1是调控细胞内基础Ca2+浓度增加的信号转导通路中的关键性上游调控因子。在大鼠及小鼠肺动脉平滑肌细胞中，HIF1可以调节TRPC1、

TRPC6的表达[24]，在人的心肌细胞中，HIF1可以通过诱导TRPC表达上调来导致心肌肥大[82]。在第一二部分的研究中也发现HIF1可以通过结合BMP4上游的

HRE元件调节BMP4表达，而BMP4又可以诱导TRPC表达上调。另外，对TRPC1和TRPC6上游调控序列中的结合元件用电子软件进行分析，发现二者上游都存在HRE元件。本部分实验中沉默HIF1α后，可观察到TRPC1、TRPC6表达也降低。由此可见，HIF1α可以在人肺动脉平滑肌细胞中调节TRPC1、TRPC6的表达，并且这种表达也可能是通过BMP4的介导，也有可能是直接与TRPC1和TRPC 6中上游调控序列中的HRE直接结合。那么下一步，我们可以扩增TRPC的上游调控序列进行实验分析，从而进一步明确HIF1对TRPC的调节方式。并且，基于TRPC在肺动脉高压发生发展中的重要作用，我们可以利用TRPC上游调控序列构建的报告基因来进行药物筛查，为肺动脉高压的治疗提供新的、可靠的途径。

102

结**论**

## 一、 在慢性缺氧的大鼠远端PASMCs中，HIF1通过上调BMP4介导

TRPC1, 6的表达。

## 二、 在慢性缺氧的大鼠远端PASMCs中，HIF1是通过与BMP4 5’-侧翼区中的HRE元件结合来调节BMP4的表达。

三、BMP4可以激活p38, ERK1/2, Smad信号通路来上调TRPC1, 6的表达及增加细胞内基础钙离子浓度，但在缺氧条件下是以激活p38, ERK1/2信号通路为主。

四、在慢性缺氧的人的PASMCs中，TRPC1, TRPC6及BMP4表达均上调，抑制细胞内TRPC1, TRPC6的表达能抑制缺氧诱导的细胞内基础钙离子浓度，细胞增殖以及迁移的增加。HIF1, BMP4参与了hPASMCs中TRPC1, TRPC6表达的调控。

103

参考文献

[1] 冉丕鑫. 慢性阻塞性肺疾病的患病危险因素及其预防[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2007（2）: 141-143.

[2] 实用内科学（第11版）, 1449.

[3] 内科学（第6版）, 86.

[4] Voelkel NF, Tuder RM, Bridges J, et a1． Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. Am J Respir Cell Mol Biol, 1994, 11: 664-675．

[5] Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, et al. Express ion of endothelin-1 in the lungs of patie-nts with pulmonary hypertension. N Engl J Med, 1993, 328( 24 ): 1732-1739.

[6] Dresdale DT, Miehtom RJ, Shultz M. Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance. Bull N Y Acad Med, 1954, 30 (3): 195-207

[7] Morse JH, Jones AC, Barst RJ, et aL. Mapping of familial primary pulmonary hypertension locus(PPHI) to chromosome 2q31-q32. Circulation, 1997, 95 (12 ): 2603-2606.

[8] Nichol WC, Koller DL, Slovis B, et al. Localization of the gene for familial primary pulmona-ry hypertension to chromosome 2q31-q32. Nat Genet, 1997, 15(3): 277-280.

[9] Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Familial primary pulmonary hypertension(gene PPHI) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. Am J Hum Genet, 2000, 67(3): 737-744.

[10] Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, et al. Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. Nat Genet, 2000, 26(1): 81-84.

[11] Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, et al. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic talangiectasia. N Engl J Med, 2001, 354(5): 325-334.

[12] Fantozzi I, Huang W, Zhang J, et al. Divergent effects of BMP2 on gene expression in pulmonary artery smooth cells from normal subjects and patients with idiopathic pulmonary104

Arterial hypertension. Exp Lung Res, 2005,31:783-806.

[13] Yang X, Long L, Southwood M, et al. Dysfunctional smad signaling contributes to abnormao smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. Circ Res, 2005.96: 1053-1063.

[14] Long L, Scott L, Stephens R, et al. Induction of gene expression in human pulmonary artery smooth muscle cells by bone morphogenetic protein. Thorax, 2001, 56(Suple III): iii76-III81.

[15] Loscalzo J. Genetic clues to the cause of primary pulmonary hypertension. N EngI J Med, 2001, 354(5): 367-371.

[16] Li Xiaoyan, Lu Wenju, Fu Xin, et al. BMP4 increase TRPC protein expression by activating p38MAPK and ERK1/2 signaling pathways in PASMC. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 49(2): 212-220.

[17] Zhang, S. et al. Upregulation of NA+/CA2+ exchanger contributes to the enhanced ca2+ entryin pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(6): p. C2297-2305.

[18] Hishikawa K, et al. Pressure promotes DNAsynthesis in rat cultured vascular smooth muscle cells. J Clin Invest, 1999, 93(5): p. 1975-1980.

[19] Li S, Tabar SS, Malec V, et al. NOX4 regulates ROS levels under normoxic and hypoxic conditions, triggers proliferation, and inhibits apoptosis in pulmonary artery adventitial fibroblasts. Antioxid Redox Signal, 2008, 10(10): 1687-1698.

[20] Blaustein M. P, Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca2+ stores and cell responsiveness. Am J Physiol, 1993, 264(6 Pt 1): p. C1367-87.

[21] Nelson, MT, et al. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. Am J Physiol, 1990, 259(1 Pt 1): p. C3-18.

[22] Sztrymf B, Yaici A, Girerd B, Humbert M. Genes and pulmonary hypertension. Respiration 2007; 74: 123–132.

[23] Yuan JXJ, Lewis RJ. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: the need for multiple hits. Circulation 2005; 111: 534–538.

[24] Wang J, Weigand L, Lu W, et al. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca2+ in pulmonary arterial smooth muscle cells. Circ Res. Jun 23; 98(12), 2006: 1528-1537.105

[25] Wang J, Shimoda LA, Sylvester JT. Capacitative calcium entry and TRPC channel proteins are expressed in rat distal pulmonary arterial smooth muscle. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 286(4), 2004: L848-858.

[26] Ng LC and Gurney AM. Store-operated channels mediate Ca2+ influx and contraction in rat pulmonary artery. Circ Res 89, 2001: 923-929.

[27] Semenza GL, Wang GL, A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis bind to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation[J]. Mol Cell Biol(S0270-7306), 1992, 12(12): 5447-5454.

[28] Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem. 1995, 270(3): 1230-1237.

[29] HöpﬂG, Ogunshola O, Gassmann M. HIFs and tumors-causes and consequences. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004; 286: R608–623.

[30] Lin MJ, Leung GP, Zhang WM, et al. Chronic hypoxia -induced upregulation of store-operated and receptor-operated ca2+ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: A novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. Circ Res 2004; 95 (5): 496-505.

[31] Shimoda LA, Wang J, Sylvester JT. Ca2+ channels and chronic hypoxia. Microcirculation 2006; 13(8): 657-670.

[32] Karaki H, Ozaki H, Hori M, et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. Pharmacol Rev 1997; 49(2): 157-230.

[33] Lu W, Wang J, Shimoda LA, Sylvester JT. Differences in stim1 and trpc expression in proxi-mal and distal pulmonary arterial smooth muscle are associated with differences in ca2+ respon -ses to hypoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008; 295(1): L104-113.

[34] Shimoda LA, Sham JS, Shimoda TH, Sylvester JT. L-type ca2+ channels, resting [ca2+] i, and ET-1-induced responses in chronically hypoxic pulmonary myocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2000; 279(5): L884-894.

[35] Remillard CV, Yuan JX. Trp channels, CCE, and the pulmonary vascular smooth muscle. Mi-crocirculation 2006; 13(8): 671-692.

[36] Lu W, Ran P, Zhang D, et al. Sildenafil inhibits chronically hypoxic upregulation of canonical transient receptor potential expression in rat pulmonary arterial smooth muscle. 106

Am J Physiol Cell Physiol 2010;298(1):C114-123.

[37] Massague J, Chen Y-G. Controlling TGF-βsignaling. Genes Dev 2000, 14: 627-644.

[38] Frank DB, Abtahi A, Yamaguchi DJ, et al. Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmo

-nary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. Circ Res, 2005, 97(5):496

-504.

[39] Higgins DF, Biju MP, Akai Y, et a1. Hypoxic induction of CTGF is directly mediated by HIF-1. Am J Physiol Renat Physiol, 2004, 287: F1223-F1232．

[40] Rankin EB. Giaccia AJ． The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis． Cell Death Differ, 2008.15: 678-685．

[41] Kleinman ME. Greives MR, Churgin SS, et a1. Hypoxia induced mediators of stem／rogenitor cell trafficking are increased in children with hemangioma． Artedoscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27: 2664-2670．

[42] Smith WC, Harland RN. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos. Cell, 1992, 70(5): 829-840.

[43] Lamb TM, Knecht AK, Smith WC, Stachel SE, et al. Neural induction by the secreted poly-peptide noggin. Science, 1993, 262(5134): 713-718.

[44] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: Cellul-ar and molecular mechanisms. Circ Res, 2006; 99(7): 675-691.

[45] Abraham AS, Kay JM, Cole RB, Pincock AC. Haemodynamic and pathological study of the effect of chronic hypoxia and subsequent recovery of the heart and pulmonary vasculature of the rat. Cardiovasc Res, 1971; 5(1): 95-102.

[46] Hislop A, Reid L. Changes in the pulmonary arteries of the rat during recovery from hypoxia-induced pulmonary hypertension. Br J Exp Pathol, 1977; 58(6): 653-662.

[47] Meyrick B, Reid L. The effect of chronic hypoxia on pulmonary arteries in young rats. Exp Lung Res, 1981; 2(4): 257-271.

[48] Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L. Rat pulmonary circulation aft-er chronic hypoxia: Hemodynamic and structural features. Am J Physiol, 1979; 236 (6): H818-827.

[49] Schwenke DO, Pearson JT, Umetani K, Kangawa K, Shirai M. Imaging of the pulmonary cir

-culation in the closed-chest rat using synchrotron radiation microangiography. J Appl

107

Physiol 2007;102(2):787-793.

[50] Stiebellehner L, Frid MG, Reeves JT, et al. Bovine distal pulmonary arterial media is compos-ed of a uniform population of well differentiated smooth muscle cells with low proliferative capa -bilities. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 285(4): L819-828.

[51] Bakhramov A, Evans AM, Kozlowski RZ. Differential effects of hypoxia on the intracellular ca2+ concentration of myocytes isolated from different regions of the rat pulmonary arterial tree. Experimental Physiology 1998; 83(3): 337-347.

[52] Archer SL, Wu XC, Thebaud B, et al. Preferential expression and function of voltage-gated, O2-sensitive k+ channels in resistance pulmonary arteries explains regional heterogeneity in hy -poxic pulmonary vasoconstriction: Ionic diversity in smooth muscle cells. Circ Res 2004; 95(3): 308-318.

[53]. Schulick AH, Taylor AJ, Zuo W, et al. Differences in stim1 and trpc expression in proximal and distal pulmonary arterial smooth muscle are associated with differences in ca2+ responses to hypoxia. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2008; 295(1): L104-113.

[54] Yang X, Long L, Southwood M, et al. Dysfunctional smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. Circ Res 2005; 96 (10): 1053-1063.

[55] Yu AY, Shimoda LA, Iyer NV, et al. Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest.* 1999; 103: 691–696.

[56] 潘坤, 戴爱国, 胡瑞成. HIF-1α结合活性及蛋白含量的表达变化在缺氧性肺动脉高压大鼠中的作用和意义[J]. 南华大学学报医学版, 2007, 35（3）: 308-312

[57] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92(12) 5510-5514.

[58] Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M. The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) DNA recognition site. Nucleic Acids Res. 1995, 23(22): 4542-4550.

[59] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol. 1992, 12(12): 5447-5454.108

[60] Michel G, Minet E, Ernest I, et al. A model for the complex between the hypoxia-inducible factor-1(HIF-1) and its consensus DNA sequence. J Biomol Struct Dyn. 2000, 18(2): 169-179.

[61] 潘坤, 戴爱国, 胡瑞成. 缺氧诱导因子家族蛋白的稳定性与转录活性的调节[J]. 医学分子生物学杂志, 2006, 3（1）: 44-47.

[62] Xudong Yang, Patty J. Lee, Lu Long et al. BMP4 induces HO-1 via a smad-independent, p38MAPK-dependent pathway in pulmonary artery myocytes. Am J Respir Cell Mol Biol, 2007, 37: 598-605.

[63] Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-βsignaling in tumor suppression and cancerprogression. Nat Genet, 2001, 29: 117-129.

[64] Xudong Yang, Lu Long, Mark Southood, et al. Dysfunctional smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. Circ Res. 2005, 96: 1053-1063.

[65] Nohe A, Keating E, Knaus P, Petersen NO. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors. Cell Signal 2004; 16: 291–299.

[66] L. Dewachter, S. Adnot, C. Guignabert, et al. Bone morphogenetic protein signaling in heritable versus idiopathic pulmonary hypertension. Eur Respir J, 2009, 34: 1100-1110.

[67] Jun Yang, Xiaohui Li, Rafia S, et al. Smad-dependent and Smad-independent induction of Id1 by prostacyclin analogues inhibits proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells in vitro and in vivo. Circ Res. 2010, 107: 252-262.

[68] Han C, Hong KH, Kim YH, et al. Smad1 deficiency in either endothelial or smooth muscle cells can predispose mice to pulmonary hypertension. Hypertension. 2013, 61(5): 1044-1052.

[69] Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF-βfamily and its composite receptors. Trends Cell Biol, 1994, 4(5): 172-178

[70] Mishina Y, Suzuki A, Golbert DJ, et al. Genomic organization and chromosomal location of the mouse type I BMP-2/-4 receptor. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 206(1): 310-317.

[71] Imamura T, Takase M, Nishihara A, et al. Smad6 inhibits signalling by the TGF2 superfamily. Nature, 1997, 389: 622-626.

[72] Howe JR, Bair JL, Sayed MG, et al. Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis. Nat Genet, 2001, 28: 184-187.

[73] Yu PB, Beppu H, Kawai N, et al. Bone morphogenetic protein(BMP) type II receptor deletion

109

Reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. J Biol Chem. 2005, 280(26):24443-24450.

[74] Zhang S, Patel HH, Murray F, et al. Pulmonary artery smooth muscle cells from normal subjects and IPAH patients show divergent cAMP-mediated effects on TRPC expression and capacitative Ca2+ entry. Am J Physio Lung Cell Mol Phydiol. 2007, 292(5): L-1202-1210.

[75] Remillard CV, Yuan JX. TRP channels, CCE, and the pulmonary vascular smooth muscle. Microcirculation. 2006, 13(8): 671-692.

[76] Fantozzi I, Zhang S, Platoshyn O, et al. Hypoxia increases AP-1 binding activity by enhancing capacitative Ca2+ entry in human pulmonary artery endothelial cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003, 285(6): L1233-1245.

[77] Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, et al. Classical transient receptor potential chammel 6(TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. Proc Natl Acad Sci USA. 2006, 103(50): 19093-19098.

[78] YuY, Fantozzi I, Remillard CV, et al. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004, 101: 13861-13866.

[79] Wang C, Li JF, Zhao L, et al. Inhibition of SOC/Ca2+/NFAT pathway is involved in the anti-proliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells. Respir Res. 2009, 10: 123.

[80] Yang X, Long L, Southwood M, et al. Dysfunctional smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. Circ Res 2005, 96 (10): 1053-1063.

[81] Lu W, Ran P, Zhang D, et al. Bone morphogenetic protein 4 enhances canonical transient receptor potential expression, store-operated Ca2+ entry and basal [Ca2+] i in rat distal pulmonary arterial smooth muscle cells. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 299(6): C1370-1378.

[82] Chu W, Wan L, Zhao D et al. Mild hypoxia-induced cardiomyocyte hypertrophy via up- regulation of HIF-1 mediated TRPC signalling. J Cell Mol Med, 2012, 16(9): 2022-2034.

[83] Whitman EM, Pisarcik S, Luke t, et al. Endothelin-1 mediates hypoxia-induced inhibition of voltage-gated K+ channel expression in pulmonary arterial myocytes. Am J Physiol Lung110

Cell Mol Physiol. 2008,294(2):L309-318.

[84] David B. F, Amir A, D. J. Yamaguchi, et al. Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. Circulation Research. 2005, 97: 496-504.

[85] Kamiva N, Shafer S, Oxendine I, et al. Acute BMP2 upregulation following induction of ischemix osteonecresis in immature femoral head. Bone. 2013, 53(1): 239-247.

[86] Basu RK, Hubchak S, Hayashida T, et al. Interdependence of HIF-1αand TGF-β/smad3 signaling in normoxic and hypoxic renal epithelial cell collagen expression. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 300(4): F898-905.

111

**综述**

**HIF的结构、调节及其在低氧性肺动脉高压中的临床展望**

缺氧诱导因子-1（hypoxia inducible factor-1, HIF1）是缺氧时机体产生的一种重要的蛋白质调节因子，能在转录水平调节多种缺氧反应性基因的二聚体核转录因子，广泛参与哺乳动物细胞中低氧诱导的特异性应答，与低氧条件下组织细胞中各种细胞因子、生长因子的表达调控密切相关，通过转录调控一系列的缺氧反应基因的表达，从而调节能量代谢、血管收缩、细胞增殖、血管重塑或生产等。

肺动脉高压是以肺血管阻力持续增加为特征的一组临床综合征，其病理变化主要包括肺血管收缩和重塑，肺血管平滑肌和内皮细胞异常增殖，血栓形成等[1]。缺氧是众所周知的刺激肺动脉高压发生发展的一个重要因素[2]。急性缺氧可诱导肺血管收缩，而慢性缺氧则可诱导细胞增殖，使血管壁增厚，肺血管重塑，并最终导致肺动脉高压及肺源性心脏病[3, 4]。近年来，随着分子水平研究的不断深入，低氧诱导因子与低氧性肺动脉高压形成机制的相关性越来越被重视。所以，以

HIF1作为靶点，对肺动脉高压进行治疗的研究也成为可能。

一、HIF1的结构

HIF1是由HIF1α和HIF1β两个亚基组成的异二聚体，二者均是bHLH-PAS家族成员[30, 31]。HIF1α最早是由Semenza等[12]于1992年在低氧诱导的肝癌细胞株Hep3B细胞的核提取物中发现的，广泛存在于哺乳动物和人体各个组织内。

HIF1α既是HIF1的调节亚基，也是HIF1的活性亚基。HIF1α和HIF1β在结构上有两个共同的结构域：螺旋-环-螺旋（bHLH）结构和PAS结构域。HIF1α经bHLH以及部分PAS结构域与HIF1β形成二聚体，经过bHLH结构域与特异性DNA元件HRE结合[32]。HIF1α含有两个反式激活域（TADs）：NH2末端的N-TAD（786-826号氨基酸）和COOH末端的C-TAD(531-575号氨基酸)。N-TAD与HIF1α的稳定性相关，而C-TAD与HIF1α的转录活性有关。在缺氧时，C-TAD能够与辅助

112

激活因子如环腺苷酸反应元件结合蛋白（CBP）/ p300结合，参与HIF1α在缺氧条件的转录活性的调节。HIF1α翻译后的调控也是通过这两个TAD结构域的羟基化，磷酸化，乙酰化，和/或氧化还原修饰介导的[7-11]. HIF1α还有一个氧依赖降解结构域（ODD），常氧下ODD结构域可被羟基化而引起HIF1α的降解[5-6]。

HIF1β又称为芳香烃受体核移位体（ARNT），没有TAD和ODD结构域，在细胞核中表达稳定，不受氧浓度的调节和影响，其功能可能与保持HIF1的结构稳定性及二聚体化引起的活性构象转变有关。HIF1α必须与HIF1β形成异二聚体才能成为有活性的HIF1。但HIF1α核定位现象只与HIF1α的过表达相关，而与

HIF1β无关。

二、HIF1α的调节

HIF1α的mRNA是组成性的广泛表达，与O2浓度无关，但HIF1α蛋白仅在缺氧条件下累积。常氧条件下，HIF1α的半衰期小于5分钟。所以，O2浓度是

HIF1α的第一大调节因素。在常氧情况下，HIF1αODD结构域的402和564的脯氨酸残基被脯氨酸羟化酶(PHD)所羟基化，羟基化的HIF1α 与肿瘤抑制蛋白

（von hippel landau protein, pVHL）特异性结合，pVHL能被E3泛素连接酶所识别，从而引起HIF1α的泛素化-蛋白酶体降解[13]。在VHL缺失时可致常氧条件下

HIF1α蛋白表达稳定，而重新恢复VHL的表达又可以使HIF1α蛋白降解[33]。近期研究发现，在局部缺血组织中，由于VHL被隔离于核仁中，使之不能与HIF1α结合，从而能在常氧的下检测到HIF1α的表达[34]。因此，PH依赖的VHL调节与氧依赖的HIF1的调节是相互关联的。

癌基因是影响HIF1α表达的第二大因素。pVHL就是抑癌基因的一种。另外，肿瘤抑制基因野生型p53能抑制HIF1α的表达水平及功能[14-16]，是HIF1α的一个负性调控蛋白。缺失p53不仅能增加HIF1α的稳定性以及HIF1依赖的转录活性，还能增加HIF1α与DNA的结合活性。研究表明，p53只有在长时间或严重缺氧时才会表达上调[35, 36]。较低表达的p53对HIF1α的抑制是通过p53竞争结合p300发挥作用，但是过表达p300并不能抑制p53所介导的对HIF1α的抑制。只有高表达的p53才能降解HIF1α蛋白[36]。也有报告提到单纯缺氧时p53并不会显著影响HIF1α的稳定性，只有在被DNA损伤试剂所诱导激活时，p53能才能加速

HIF1α的降解[37]。因此，p53与HIF1α之间的关系颇为复杂，仍有待进一步研究。

113

缺失肿瘤抑制因子PTEN也能够显著增加HIF1介导的基因的表达，而恢复

PTEN则能够抑制HIF1α的表达[38]。PTEN主要是通过抑制PI3K的激活来抑制

HIF1α的表达。

HIF1α 的第三大调节因素是生长因子和细胞因子，如表皮生长因子

（epidermal growth factor, EGF）[17]，转化生长因子（Transforming growth factor-α, TGF-α）[18],胰岛素生长因子（insulin-like growth factors 1, IGF-1）和IGF-2[19]，调蛋白[20]，以及白介素-1(interleukin-1)[21]。这些细胞因子不仅影响HIF1α蛋白的表达，HIF-1 DNA结合活性以及转录活性，也影响HIF-1下游靶基因的表达。但是，这些因子所诱导的HIF1α的表达与缺氧所诱导的HIF1α的表达有所差异，这些差异主要表现在：第一，相较于缺氧，生长因子或细胞因子所诱导的HIF1α的表达有一定的细胞特异性；第二，生长因子或细胞因子所诱导的HIF1α的表达主要是通过激活磷脂酰基醇-3-激酶（PI3K）或促分裂原活化蛋白激酶（MAPK）途径[26,27]。有文献表明，PI3K/AKt途径通过其下游的哺乳动物类雷帕霉素靶蛋白

（mTOR）促进HIF1α 的表达。MAPK 途径主要是通过激活Ras/Raf/MEK-1/

ERK1/2途径来上调HIF1α的表达。也有文献说ERK1/2是通过直接磷酸化HIF1α

来影响HIF1α的活性，但是不影响HIF1α的稳定性或与DNA的结合能力[28, 29]。此外，HIF1α还可通过翻译后修饰来进行的，如：羟基化，泛素化，乙酰化，

磷酸化等[22]。

HIF1α的402和564脯氨酸残基被2-酮戊二酸（OG）-依赖性双加氧酶所羟基化后才能与pVHL结合，从而诱导HIF1α的O2依赖的降解。人的HIF1α的双加氧酶被称为脯氨酸强化酶（PHD），目前已经报导的PHD有三种异构体，分别为PHD1，PHD2，PHD3，体外实验表明这三种脯氨酸羟化酶均能羟基化HIF1α，其活性为：PHD2>> PHD3> PHD1。在体内，PHD2是控制HIF1α表达的关键的限速酶[39,40]。PHD的活性需要O2的参与，在缺氧时，PHD激活受阻，pVHL 与

HIF1α的结合受阻，HIF1α表达稳定，表达水平增高，进入细胞核与HIF1β形成异二聚体，作用于辅助激活因子环腺苷酸反应元件结合蛋白CBP/P300，进而激活下游靶基因转录。

近期，在HIF1α发现了另外一个可被羟基化的位点——天冬酰胺酰基残基

803(Asn803)。Asn 803定位于C-TAD, 803并不直接参与HIF1α的O2依赖的

114

降解，但是氧依赖的Asn803的羟基化可以抑制HIF1α与其共激活因子CBP/p300的结合，从而抑制HIF1α的活化[23]。最早发现的天冬酰胺酰基羟化酶是缺氧诱导因子抑制因子1(Factor inhibiting HIF-1, FIH-1)。FIH-1主要分布在细胞浆中，也有小部分入核。FIH-1的转录活性与O2浓度无关，也不直接影响HIF1α的稳定性[43]。HIF1α是由pVHL-E3泛素复合物所介导的蛋白酶体的降解。用蛋白酶体抑制剂或者突变E1酶活性时，HIF1α可以在常氧下稳定表达。

HIF1α的表达也受乙酰化作用调节。HIF1α第532号赖氨酸残基（Lys532）定位于HIF1α的ODD结构域，当Lys532被一乙酰转移酶停滞缺陷蛋白1（ARD1）所乙酰化时，HIF1α与pVHL的结合能力更强，从而促进HIF1α的降解[41]。将

Lys532突变为精氨酸可以增加HIF1α的稳定性[42]。ARD1的活性不依赖于O2

浓度，但是在缺氧时，ARD1的mRNA及蛋白表达水平均降低。

蛋白的磷酸化是决定该蛋白是否有活性的关键步骤。MAPK在HIF1α的磷酸化中发挥重要作用。体内及体外实验均表明p42/44以及p38激酶可以磷酸化

HIF1α/HIF2α[44, 45]，磷酸化的HIF1α被激活，并最终能调控其靶基因如VEGF，红细胞生成素等的转录。抑制p42/44和p38的活性能阻断HIF1α所介导的报告基因的表达[46]。转染过激活的p42/44激酶能够激活HIF1α的转录活性，但是不影响HIF1α的稳定性。所以，磷酸化作用对HIF1α的调节表现在影响HIF1α的转录活性，而对其稳定性及与DNA的结合能力没有影响。

另外发现了一个不依赖于O2浓度，也不依赖于pVHL和HIF1α的羟基化作用的可调节HIF1α表达的蛋白——热休克蛋白90(Hsp90). Hsp90直接与HIF1α相互作用，改变HIF1α的构象，使之能与HIF1β结合[24]。在pVHL缺失的细胞系中，Hsp90抑制剂如GA也能抑制HIF1α的表达[25]。

三、HIF1α在肺动脉高压中的作用及临床展望

目前对缺氧性肺动脉高压的后天发病主要认为是与Ca2+浓度增高，血管活性物质失衡及炎症因子分泌相关。Wang 等发现在低氧条件下，Ca2+通道蛋白

TRPC1/6表达显著增高，且基础Ca2+浓度及SOCE也上调，但在缺失HIF1α的杂合小鼠内（HIF1α+/-），这些增高均被抑制[47]。HIF1α所调控的基因有100多种，其中包括内皮素（ET-1）、血栓素（TX）、血红素氧合酶1/诱导型一氧化氮合酶、环氧化酶2等，前二者与血管收缩相关，后二者则与血管的扩张有关。缺氧条件

115

下，HIF1α调控这些血管活性物质失衡，使血管收缩，且能促进血管细胞有丝分裂，使血管重塑。炎症机制在缺氧性肺动脉高压，特别是COPD相关性肺动脉高压中起着启动和促进作用。研究发现，低氧时，HIF1可以作为促炎因子促进炎症反应，反之炎症因子可以通过MAPK及PI3K介导途径增强HIF1的表达，二者之间存在着正反馈作用。HIF1能直接激活促血管生成因子（如VEGF）的表达，从而加速血管壁重塑。HIF1还可以促进促红细胞生成素的大量表达，使血管粘度增加，血小板聚集增多，肺动脉压力升高[48]。由此可见，HIF1α广泛参与缺氧诱导的肺动脉高压的发生发展。

既然HIF1与缺氧性肺动脉高压的关系如此密切，那么有没有可能以HIF1作为靶点进行基因治疗。目前，在肿瘤治疗中已经开始了以HIF1为靶点的治疗研究[49, 50]，那么，对肺动脉高压，我们也可以以降低HIF1的表达作为策略来展开一些研究工作。就是目前已经有多种以HIF1作为靶点的小分子抑制剂在肿瘤中进行研究，我们也可以有参考性就将这些HIF1抑制剂用于治疗肺动脉高压的研究中。这些抑制剂主要是从以下几方面来抑制HIF1，包括：1. 抑制HIF1的蛋白合成；2. 抑制HIF1α的折叠，稳定性以及核转位；3. 抑制HIF1α与其顺式作用元件HRE的结合活性；4. 抑制HIF1α的转录活性以及其下游的靶基因的表达。

我们可以用易于检测的荧光素酶报告基因针对HIF1的靶向治疗药物的高通量筛选。常用的萤火虫荧光素酶有萤火虫荧光素酶和海肾荧光素酶，二者由于进化来源不同，所以有着不同的酶结构并催化不同的底物发光。这使得同一体系中二者所发的荧光可以分别检测。因此我们利用双报告基因系统准确而快速的对

HIF的表达进行检测，从而满足高通量要求。HIF1的表达取决于HIF1α的表达，

HIF1α可以特异性的结合缺氧反应元件HRE，因此我们可以合成多拷贝的HRE的报告基因。然后将其转染入肺动脉平滑肌细胞或者肺动脉内皮细胞后，以可能的HIF1靶向的抑制剂进行刺激，筛选出有效的靶向药物后，再对这些有效药物做进一步做药理毒理实验。我们相信，随着研究的不断深入，以HIF1为靶点的药物将有可能有效的缓解和治疗低氧性肺动脉高压。

116

参考文献

[1] Schannwell CM, Steine r S, Straner BE. Diagnosties in pulmonary hypertension[J]. J Physiol Pharmacol, 2007, 58 Suppl 5IPt2): 591-602.

[2] Fishman AP. Hypoxia on the pulmonary circulation: how and where it acts. Circ Res 1976; 38: 221–231.

[3] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. Circ Res 2006; 99: 675–691.

[4] Kato M, Staub NC. Response of small pulmonary arteries to unilobar hypoxia and hypercapnia. Circ Res 1966; 19: 426–440.

[5] Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science 2001; 294: 1337–1340.

[6] Richard DE, Berra E, GothiéE, Roux D, Pouysségur J. p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J Biol Chem 1999; 274: 32631–32637.

[7] Aragonés J, Jones DR, Martin S, et al. Evidence for the involvement of diacylglycerol kinase in the activation of hypoxia-inducible transcription factor 1 by low oxygen tension. J Biol Chem 2001; 276: 10548–10555.

[8] Huang LE, Arany Z, Livingston DM, et al. Activation of hypoxia inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. J Biol Chem 1996; 271: 32253–32259.

[9] Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. Cell 2002; 111: 709–720.

[10] Huang LE, Gu J, Schau M, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin–proteasome pathway. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 7987–7992.

[11] Pugh CW, O'Rourke JF, Nagao M, et al. Activation of hypoxia-inducible factor-1; deﬁnition of regulatory domains within the alpha subunit. J Biol Chem 1997; 272: 11205–11214.

[12] SemeIlza GL, Wang G L． A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis

Binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional

117

Activation．Mol Cell Biol, 1992, 12: 5447—5454．

[13] HöpﬂG, Ogunshola O, Gassmann M. HIFs and tumors--causes and consequences. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2004; 286: R608–623.

[14] Perkins GR, Marshall CJ, Collins MK. The role of MAP kinase in interleukin-3 stimulation of proliferation. Blood 1996; 87: 3669–3675.

[15] Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis inﬁbroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. Science 1994; 265: 1582–1584.

[16] Bouvet M, Ellis LM, Nishizaki M, et al. Adenovirus-mediated wildtype p53 gene transfer down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in human colon cancer. Cancer Res 1998; 58: 2288–2292.

[17] Zhong H, Chiles K, Feldser D, et al. Modulation of hypoxiainducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. Cancer Res 2000; 60: 1541–1545.

[18] Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, et al. Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. Cancer Res. 2003; 63: 1138–1143.

[19] Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, et al, Van Obberghen E. Insulin stimulates hypoxia-inducible factor 1 through a phosphatidylinositol 3-kinase/target of rapamycin-dependent signaling pathway. J Biol Chem 2002; 277: 27975–27981.

[20] Laughner E, Taghavi P, Chiles K, Mahon PC, Semenza GL. HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. Mol Cell Biol. 2001; 21: 3995–4004.

[21] Stiehl DP, Jelkmann W, Wenger RH, Hellwig-Bürgel T. Normoxic induc tion of the hypoxia-inducible factor 1alpha by insulin and interleukin-1beta involves the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. FEBS Lett 2002; 512: 157–162.

[22] Brahimi-Horn C, Mazure N, Pouysségur J. Signalling via the hypoxia -inducible factor-1alpha requires multiple posttranslational modiﬁcations. Cell Signal 2005; 17: 1–9.

[23] M. Ema, K. Hirota, J. Mimura, H, et al. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signalinduced118

Interaction with CBP/p300, EMBO J. 18 (1999) 1905-1914.

[24] K. Gradin, J. McGuire, R. H. Wenger, I, et al. Functional interference between hypoxiaand dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor, Mol. Cell. Biol. 16 (1996) 5221-5231.

[25] J. S. Isaacs, Y. J. Jung, E. G. Mimnaugh, et al. Hsp90 regulates a von Hippel Lindau- independent hypoxia-inducible factor-1a-degradative pathway. J. Biol. Chem. 277 (2002) 29936-29944.

[26] C. C. Hudson, M. Liu, G. G. Chiang, D. M. Otterness,, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1a expression and function by the mammalian target of rapamycin, Mol. Cell. Biol. 22 (2002) 7004-7014.

[27] M. Alvarez-Tejado, S. Naranjo-Suarez, C. Jimenez, et al. Hypoxia induces the activation of the phosphatidylinositol-3-kinase/AKT cell survival pathway in PC12 cells. Protective role in apoptosis, J. Biol. Chem. 276 (2001) 22368-22374.

[28] N. Sang, D. P. Stiehl, J. Bohensky, I. Leshchinsky, V. Srinivas, J. Caro, MAPK signaling up-regulates the activity of hypoxia-inducible factors by its effects on p300, J. Biol. Chem. 278 (2003) 14013-14019.

[29] E. Hur, K. Y. Chang, E. Lee, S. K. Lee, H. Park, Mitogen-activated protein kinase kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha, Mol. Pharmacol.59 (2001) 1216-1224.

[30] Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem. 1995, 270(3): 1230-1237.

[31] Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci USA. 1995, 92(12) 5510-5514.

[32] Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL. Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem, 1996, 271(30): 17771-17778.

[33] Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW et al. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factor for oxygen-dependent proteolysis. Nature, 1999, 399(6733: 271-275.

[34] Mekhail K, Gunaratnam L, Bonicalzi ME, Lee S. HIF activation by PH-dependent nucleolar

119

Sequestration of VHL. Nat Cell Biol. 2004,6(7): 642-647.

[35] Hammond EM, Denko NC, Dorie MJ, et al. Hypoxia links ATR and p53 through replication arrest. Mol Cell Biol. 2002, 22(6): 1834-1843.

[36] Schmid T, Zhou J, Kohl R, Brune B. p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1(HIF1). Biochem J, 2004, 380(Pt1): 289-295.

[37] Kaluzova M, Kaluz S, Lerman MI, Stanbridge EJ. DNA damage is a prerequisite for p53-mediated proteasomal degradation of HIF-1 alpha in hypoxic cells and downregulation of the hypoxia marker carbonic anhydrase IX. Mol Cell Biol. 2004, 24(13): 5757-5766.

[38] Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. Cell Growth Differ 2001; 12: 363–369.

[39] Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS. Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. J Biol Chem 2002; 277: 39792–83900.

[40] Berra E, Benizri E, Ginouvès A, Volmat V, Roux D, Pouysségur J. HIF prolyl -hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. EMBO J 2003; 22: 4082–4090.

[41] Jeong JW, Bae MK, Ahn MY, et al. Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. Cell 2002; 111: 709–720.

[42] Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. EMBO J 2000; 19: 4298–309.

[43] Metzen E, Berchner-Pfannschmidt U, Stengel P, et al. Intracellular localisation of human HIF-1 alpha hydroxylases: implications for oxygen sensing. J Cell Sci 2003; 116: 1319–1326.

[44] Richard DE, Berra E, GothiéE, Roux D, Pouysségur J. p42/p44 mitogen -activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J Biol Chem 1999; 274: 32631–32637.

[45] Sodhi A, Montaner S, Patel V, et al. The Kaposi's sarcomaassociated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1alpha. Cancer Res 2000; 60: 4873–4880.120

[46] Hur E, Chang KY, Lee E, Lee SK, Park H. Mitogen-activated protein kinase inhibitor PD98059 blocks the trans-activation but not the stabilization or DNA binding ability of hypoxia-inducible factor-1alpha. Mol Pharmacol 2001; 59: 1216–1224.

[47] Wang J, Weigand I, Lu W, et a1. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca2+in pulmonary arterial smooth muscle cells. Circ Res. 2006, 98: 1528—1537．

[48] Ergorul C, Ray A, Huang W. et a1. Hypoxia inducible[actorlalpha(HIF一1alpha) and some HIF-1 target genes are elevated in experimental glaucoma． J Mol Neurosci, 2010. 42: 183—191．

[49] Melillo G. HIF-1: a target for cancer, ischemia and inﬂammation—too good to be trueCellCycle2004; 3: 154–155.

[50] Yeo EJ, Chun YS, Park JW. New anticancer strategies targeting HIF-1. Biochem Pharmacol 2004; 68: 1061–1069.

121

**在校期间发表论文**

1. Li Xiaoyan, Lu Wenju, **Fu X（并列第一作者）**，et al. BMP4 increase TRPC protein expression by activating p38MAPK and ERK1/2 signaling pathways in PASMC. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(2): 212-220.

2. Zhang K, Zeng x, Zhu C, Xu L, **Fu X**, Jiang H, Wang J, Lu W. Successful thrombolysis in postoperative patients with acute massive pulmonary embolism. Heart Lung Circ. 2012, 22(2),100-103.

3. Wang J, **Xin F（并列第一作者）**, et al. Hypoxia-inducible factor 1 upregulated bone morphogenetic protein 4 mediates chronic hypoxic pulmonary hypertension. EMBO J. (投稿中)

4. Qian Jiang, **Xin Fu**, Lichun Chen, Xiuqing Chen, Jie Zhang, Wenju Lu, Jian Wang. NOX4 mediates BMP4-induced upregulation of TRPC1,6 protein expressions in distal pulmonary arteriel smooth muscel cells. PLOS One.（投稿中）.

5. 陈豫钦，**付欣**，赵磊，刘蓉，江倩，张科东，张晨婷，王健，卢文菊. 小型动物肺脏灌流固定装置的研制和应用. 国际呼吸杂志.2013.33（8）：608-611

6. 陈豫钦，江倩，云昕，赵磊，**付欣**，王宁，叶婧美，卢文菊，王健.全自动缺氧动物模型饲养箱的研制和应用.国际呼吸杂志.2012.32（23）：1799-1803.

122

致**谢**

首先衷心感谢我的导师王健教授，是王老师给了我学习的机会，让我开阔了视野，提高了科研能力。王老师渊博的知识、严谨的治学态度、忘我的工作精神是我学习的楷模。在攻读博士学位的工作和学习中，王老师给予了我无限的关怀、教诲和鼓励。衷心感谢王老师在课题选择，实施和总结的每个环节所给予的悉心指导。在此向恩师表达我最衷心的感谢与最诚挚的祝福。

衷心感谢卢文菊老师在我课题研究思路和论文撰写中所提出的宝贵意见。卢老师务实忘我的工作作风，对科学孜孜不倦的探索精神是我永远追求的目标。

衷心感谢广医实验医学研究中心的李冰教授在我课题实施过程中所给予的指导。李老师高尚的人格，渊博的知识，严谨的治学态度是我一生学习的榜样。

衷心感谢实验医学研究中心的洪玮、周问渠、刘启才、邹东霆、强永刚、彭燕、邓小亮、赵路宁，感谢你们在我工作、学习和生活当中所给予的帮助和鼓励。

衷心感谢师妹师弟江倩，陈豫钦，贾婧，舒家泽在我实验过程中所给予的帮助。

衷心感谢我的同学朋友们，尤其是张波、徐磊、张科东、陈秀庆、王颖峰、李征途、云昕、张军、张杰、田丽春、徐小明、张晨婷、杨凯、王胜、陈泳华、王彦、李德富、曹敏娜、梁宇亭、梁志浩等同学在我四年的博士生涯中所给与的支持和帮助。

衷心感谢黄楚琴、李熹翀、蔡磊、李二毛、陈云芳等师弟师妹的帮助。衷心感谢研究生处的全体老师的辛勤工作。

衷心感谢我的家人多年来对我的关心、理解与支持，你们的的支持与理解是我前进的动力。

最后，再次衷心感谢所有帮助我，支持我，关心我的老师、同学和朋友们！你们的支持与帮助是我一生的财富！

123

**学位论文原创性声明**

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。文中依法引用他人的成果、对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中做出明确标注或得到许可。论文内容未包含法律意义上已属于他人的任何形式的研究成果，也不包含本人已用于其他学位申请的论文或成果。

本人如违反上述声明，愿意承担以下责任和后果：

1．交回学校授予的学位证书；

2．学校可在相关媒体上对作者本人的行为进行通报；

3．本人按照学校规定的方式，对因不当取得学位给学校造成的名誉损害，进行公开道歉。

4．本人负责因论文成果不实产生的法律纠纷。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

**学位论文知识产权权属声明**

本人在导师指导下所完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属广州医科大学及附属单位。广州医科大学及附属单位享有以任何方式发表、复制、公开阅览、借阅以及申请专利等权利。本人离校后发表或使用学位论文或与该论文直接相关的学术论文或成果时，署名单位仍然为广州医科大学及附属单位。任何其他收存和保管本论文的单位和个人，未经本论文作者、导师授权，不得将本论文转借他人、复制、抄录或以其他任何方式传播，否则，引起有碍作者的著作权益问题，将会追究相应的法律责任。

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

**关于学位论文使用授权的说明**

1、学校可以保留本学位论文的原件及复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复印手段保存、汇编学位论文；

2、本人授权学校向国家有关部门或机构送交学位论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。送交学位论文时间选择（请在下面相应栏内打“√” ）：

①答辩后即可送：是否

②延迟一年后送：

|  |
| --- |
|  |
|  |
|  |

③延迟二年后送：

④延迟三年后送：

论文作者签名： 日期： 年 月 日

导师签名： 日期： 年 月 日

124