DOI:10.16016/j.1000-5404.201909154

2019 年度重庆市出版专项资金资助栏目论文

缺氧对大鼠肺成纤维细胞甲酰肽受体 1 表达的影响

李晓栩[1,2,3*],黄 缄[1,2,3*],矫 力[1,2,3],崔 宇[1,2,3],杨诚忠[1,2,3],魏 铭[4] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)高原军事医学系:高原生理学与病理学教研室[1],极端环境医学教育部重点实验室[2];全军高原医学重点实验室[3];400016 重庆,重庆医科大学基础医学院干细胞与组织工程研究室病理生理学教研室[4]

[**摘要**] **目的** 研究缺氧对大鼠肺成纤维细胞甲酰肽受体 1(formyl peptide receptor 1, FPR1)表达的影响。**方法** 分离大鼠肺成纤维细胞,用 48 孔 Boyden 趋化小室观察大鼠成纤维细胞在不同浓度(0、10、100、1 000 nmol/L 组)的 FPR 激动剂(fMLF)作用下的趋化能力。将细胞置于低氧培养箱中培养(1% O_2,5% CO_2,94% N_2,37 ℃)24 h,取细胞培养上清,结合 FPR 特异性拮抗剂 tBoc 处理,检测缺氧培养上清中 FPR 介导的趋化活性。将细胞分为常氧组[普通培养箱(5% CO_2,95% 空气,37 ℃)]和缺氧组[置低氧培养箱中培养(1% O_2,5% CO_2,94% N_2,37 ℃)2、12、24 h],用免疫印迹、PCR 检测大鼠肺成纤维细胞 FPR1 和 FPR 激活物膜联蛋白 A1(annexin A1, AnxA1)的蛋白、mRNA 水平。不同浓度 fMLF 作用下细胞中 FPR1、AnxA1 的蛋白水平。使用 tBoc 预处理细胞并缺氧 24 h 后,检测 FPR1、AnxA1 的蛋白水平。**结果** fMLF 可明显引起大鼠肺成纤维细胞趋化 100 nmol/L 组引起趋化至膜下侧的细胞数增多最为显著($P<0.05$)。缺氧后的细胞培养上清趋化活性显著高于常氧组($P<0.05$),加入 tBoc 后其趋化活性显著降低($P<0.05$),降低程度显著高于常氧组。缺氧 12 h,肺成纤维细胞的 FPR1 蛋白水平显著增加($P<0.05$)。缺氧 12、24 h 与缺氧 0 h 组相比较,AnxA1 的蛋白水平显著增加($P<0.05$)。与常氧组相比较肺成纤维细胞的 FPR1、AnxA1 的 mRNA 水平显著增加($P<0.05$);随着 fMLF 浓度的升高,FPR1 和 AnxA1 的蛋白表达水平逐渐增加,100、1 000 nmol/L 组与 0 nmol/L 组相比,具有显著性差异($P<0.05$)。甲酰肽受体拮抗剂 tBoc 可以显著削弱此效应。**结论** 原代培养的大鼠肺成纤维细胞表达 FPR1,缺氧促进大鼠肺成纤维细胞 FPR1 及其激活物表达与分泌,FPR1 激活可进一步增强受体及其激活物的表达与分泌。

[**关键词**] 成纤维细胞;缺氧;趋化;甲酰酞受体

[**中图法分类号**] R322.35; R363.22; R364.4 [**文献标志码**] A

Effects of hypoxia on expression of formyl peptide receptor 1 in rat lung fibroblasts *in vitro*

LI Xiaoxu[1,2,3], HUANG Jian[1,2,3], JIAO Li[1,2,3], CUI Yu[1,2,3], YANG Chengzhong[1,2,3], WEI Ming[4] [1]Department of High Altitude Physiology and Pathology; [2]Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education; [3]Key Laboratory of High Altitude Medicine of PLA, Facalty of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038; [4]Department of Pathophysiology, Department of Stem Cell and Tissue Engineering, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To study the effect of hypoxia on the expression of formyl peptide receptor 1 (FPR1) in rat lung fibroblasts. **Methods** We tested the chemotactic activity of 10, 100, and 1 000 nmol/L

[**基金项目**] 军队医学科技青年培育计划(20QNPY002),军队后勤科研项目-1226 工程(BWS17J031)

*: 同等贡献者

[**通信作者**] 黄 缄,E-mail: huang3red@163.com

FPR agonist (fMLF) for lung fibroblasts isolated from adult female SD rats using Boyden chemotaxis chamber assay. The cells were cultured in a hypoxic incubator (1% O_2, 5% CO_2, and 94% N_2) at 37 ℃ for 24 h, and the culture supernatant was collected and treated with the FPR-specific antagonist tBoc before assessing fibroblast chemotactic activity mediated by FPR. Rat lung fibroblasts cultured in a normoxic condition or in a hypoxic incubator (1% O_2) for 2, 12, and 24 h were tested for mRNA and protein levels of FPR1 and FPR agonist annexin A1 (AnxA1) using real-time PCR and Western blotting. The protein levels of FPR1 and AnxA1 were also examined in cells treated with different concentrations of fMLF and in cells treated with tBoc prior to hypoxia for 24 h. **Results** fMLF induced obvious chemotactic migration of rat lung fibroblasts, and 100 nmol/L exhibited the strongest chemotactic activity for the fibroblasts ($P<0.05$). The supernatant of the cells with hypoxic exposure showed a significantly higher chemotactic activity than that of the cells cultured in a normoxic condition ($P<0.05$); the addition of tBoc significantly decreased in the chemotactic activity of the supernatants, and the reduction was more obvious with the hypoxic cell culture supernatant ($P<0.05$). Hypoxia for 12 h significantly increased FPR1 protein expression in the lung fibroblasts ($P<0.05$); hypoxia for 12 and 24 h significantly enhanced the protein expression of AnxA1 in the fibroblasts ($P<0.05$). The mRNA levels of FPR1 and AnxA1 increased significantly in the lung fibroblasts after hypoxia for 2, 12, and 24 h ($P<0.05$); increasing the concentration of fMLF in the cell culture resulted in progressively increased protein levels of FPR1 and AnxA1, and their increments became significant after treatment with fMLF at 100 and 1 000 nmol/L ($P<0.05$); this effect was significantly attenuated by the application of the FPR antagonist tBoc. **Conclusion** FPR1 is expressed in primary cultured rat lung fibroblasts. Hypoxia promotes the expression and secretion of FPR1 and its agonists in rat lung fibroblasts, and FPR1 activation further enhances the expression and secretion of the receptor and its agonists.

[**Key words**] fibroblast; hypoxia; chemotaxis; formyl peptide receptor

Supported by the Medical Science Young Talents Cultivation Program of PLA (20QNPY002) and the Military Logistics Research Project-1226 Project (BWS17J031). LI Xiaoxu and HUANG Jian contribated equally to the article. Corresponding author: HUANG Jian, E-mail: huang3red@163.com

围绕氧平衡的组织重塑是机体适应缺氧的重要反应,但是过度重塑也会引起多种疾病。缺氧时,肺动脉压增高、呼吸膜增宽变薄等习服表现均是组织重塑的结果。肺动脉壁的过度重塑,引起肺血管壁硬度增加,是引起缺氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary hypertension,HPH)的关键机制。HPH 患者或动物的肺动脉外膜层存在大量成纤维细胞等间质细胞[1-3]。肺血管过度重塑导致 HPH 持续恶化和难以逆转,其发病机制还不完全清楚[4]。在 HPH 形成过程中炎症细胞可以从外膜层之外浸润进入外膜层[5]。在动物的肺动脉高压模型中,外膜成纤维细胞能够招募和激活巨噬细胞,部分通过旁分泌 IL-6,从而激活 STAT3 和 HIF1 信号通路,因此,肺成纤维细胞在 HPH 有着十分重要的作用。另外,多项研究表明肺成纤维细胞可通过释放多种介质促进其他细胞增殖分化,产生大量的细胞外基质,如Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原[6],在组织重塑中发挥重要作用。

甲酰肽受体(formyl peptide receptors,FPRs)是一个七次跨膜的 G 蛋白偶联受体(G protein-coupled chemokine receptors,GPCRs)[7-8],它主要有三个成员,FPR1,FPR2 和 FPR3[9]。FPR1 能介导细胞的趋化和细菌甲酰化趋化肽的激活,参与广泛的病理生理过程,包括炎症、伤口愈合、胶质母细胞瘤的发展和宿主对丙型肝炎病毒感染的防御等[7]。FPRs 被激活后,不仅可以强烈地介导趋化反应,而且可以促进细胞增殖、分化与分泌。但是,在缺氧条件下,FPR1 及其激活物在成纤维细胞中的变化特点目前尚未见报道,在本研究中,我们利用大鼠肺成纤维细胞为模型,从 FPRs 激活、FPRs 的激活物等方面研究了这一问题,探讨缺氧对大鼠成纤维细胞 FPR1 及其激活物表达的影响,为 HPH 形成的机制提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠抗 β-actin 抗体、兔抗 FPR1 抗体(Santa cruz 公司),小鼠抗 Annexin A1 抗体(Santa cruz 公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG+IgM、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG+IgM(中杉金桥生物有限公司),总 RNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司),PrimeScript cDNA Synthesis Kit 和 PCR 相关产品(宝生

物大连工程有限公司),细胞培养用 DMEM 高糖培养基、胰酶、胎牛血清(Gibco 公司),HE 染色试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),fMLF 和 tBoc (Sigma-Aldrich 公司),其余常规试剂为国产分析纯。Boyden 趋化小室(美国 Neuro Probe 公司),超净工作台(苏州净化设备厂),CO_2 培养箱(NUAIR 公司),低氧培养箱(Thermo Scientific 科技中国有限公司);PCR 仪(Bio-Rad 公司)。

1.2 实验动物及大鼠肺成纤维细胞的原代培养

利用组织块法分离大鼠肺成纤维细胞。取 9 周龄雌性 SD 大鼠(由陆军军医大学实验动物中心 SPF 级动物房提供),腹主动脉放血后处死,无菌术开胸。取肺组织,置于含有 100 U/mL 青链霉素的 PBS 中反复冲洗 4 次,去除血液、脂肪和结缔组织。用眼科剪剪去肺门处的支气管和血管,用含有青链霉素的 PBS 冲洗 1 遍,再用组织块剪成 1 mm×1 mm×1 mm 大小,用眼科镊将组织块均匀放置于培养皿中,每小块间隔 5 mm 左右。用含 10%胎牛血清的 DMEM、100 U/mL 青链霉素配制成 DMEM 完全培养基,每 48 h 换液 1 次。贴块贴壁 72 h 后,镜下可见大量成纤维细胞爬出,将组织块去除,继续培养 2~3 d,待细胞长满,即可用 0.25%胰酶常规消化传代。传代完成后,采用差速贴壁法纯化细胞,细胞贴壁 1 h 后(即绝大部分成纤维细胞都已经贴壁),弃去未贴壁的细胞和培养液,更换新的培养液,取第 3~5 代细胞用于实验。

1.3 趋化实验检测大鼠肺成纤维细胞上 FPRs 的功能性表达

使用 48 孔趋化小室(AP48,美国 Neuro Probe 公司)来评估细胞的趋化活性。利用不同浓度(0、10、100、1 000 nmol/L)的 FPR 激动剂(fMLF)30 μL 作为趋化剂,趋化上室加入 50 μL 肺成纤维细胞悬液(1×10^6/mL),上室与下室之间通过 10 μm 孔径的聚碳酸酯膜(美国 Neuro Probe 公司)分离,5% CO_2、37 ℃趋化 2 h 后取下膜刮去上室面细胞,对下室面细胞进行 HE 染色,用光学显微镜拍照(×400),计算穿过的细胞数,每孔随机选取 3 个视野取平均值,最后将数据转换为趋化指数(chemotaxis index, CI,即实验组细胞数与 0 nmol/L 组细胞数的比值)[10]。

1.4 趋化实验检测缺氧对大鼠肺成纤维细胞 FPR 激活物趋化活性的影响

将细胞分为常氧组,缺氧组,分别置常氧培养箱(5% CO_2,95% 空气,37 ℃)和低氧培养箱(1% O_2,5% CO_2,94% N_2, 37 ℃)中培养 24 h,取其培养上清离心去除细胞备用。在趋化下室加入常氧和缺氧各组细胞培养上清 30 μL 作为趋化剂,趋化上室加入 50 μL 肺成纤维细胞悬液(1×10^6/mL),并加入 tBoc,后续步骤同 1.3。我们使用 C 表示常氧组或缺氧组的趋化指数,T 表示常氧+tBoc 组或缺氧+tBoc 组的趋化指数,按下面公式计算细胞趋化抑制率(CIFA):CIFA = (C−T)/C×100%,分别得到常氧和缺氧细胞的趋化抑制率。

1.5 细胞缺氧与处理

肺成纤维细胞在含 10%胎牛血清、100 U/mL 青链霉素的 DMEM 高糖培养基中进行培养,以 5×10^5/mL 的密度进行传代培养,接种于 60 mm 培养皿中,待培养皿中细胞长至约 80%后,分别进行以下几种处理:FPR 激动剂实验,使用不同浓度(0、10、100、1 000 nmol/L)的 FPR 激动剂(fMLF),在常氧培养箱中(95% 空气,5% CO_2, 37 ℃)孵育 30 min 后进行后续实验;细胞缺氧实验,将细胞分为缺氧 0、2、12、24 h 组,缺氧 0 h 组细胞置常氧培养箱(95% 空气、5% CO_2、37 ℃)培养,其余各组细胞置低氧培养箱(1% O_2、5% CO_2、94% N_2)中培养后进行后续实验;tBoc 抑制实验,将配制好的 tBoc 加入细胞中,在常氧培养箱中(95% 空气、5% CO_2、37 ℃)孵育 2 h,然后将细胞分为常氧组和缺氧组,分别放入常氧培养箱和低氧培养箱中进行后续实验。

1.6 Western blot 检测 FPR1、AnxA1 蛋白表达水平

细胞经 Western blot 及 IP 裂解液裂解后(碧云天)提取总蛋白,12 000×*g*,4 ℃离心 10 min 后取上清,用 BCA 法测定蛋白浓度。加入 1/4 体积的 5×loading buffer,100 ℃水浴锅中变性 10 min 后取 40 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳(12%的分离胶,5%的浓缩胶),采用湿转将蛋白转移到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温(25 ℃)封闭 1 h,分别剪下相应条带加入一抗 4 ℃孵育过夜,其中抗 β-actin 抗体(1∶500),抗 FPR1 抗体(1∶500),抗 AnAX1 抗体(1∶500),TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗(1∶1 000),室温(25 ℃)摇床孵育 1 h,孵育完成后,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 ECL 进行显影,使用凝胶成像系统进行曝光。实验结束后,用 Image J 图像分析软件对条带进行分析。

1.7 PCR 检测 FPR1、AnxA1 mRNA 水平

使用总 RNA 提取试剂盒(天根)提取成纤维细胞总 RNA,用反转录试剂盒(TaKaRa)将 mRNA 反转录为 cDNA,再利用 PCR 试剂盒进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为(反应体系为 20 μL):95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 25 s,72 ℃延伸 25 s,35 个循环后再 72 ℃延伸。1.5%的琼脂糖凝胶电泳后观察结果。引物设计如下,FPR1 的上游引物为 5′-CACCTTTGTGCTTGGAGTCT-3′,下游引物为 5′-TAAAATGGCAAAGTG-

GAGGTG-3′,139 bp;AnxA1 上游引物为 5′-TCA-TCT-GTTCCAAGTCCCT-3′,下游引物为 5′-CCTACCCTTC-CTTCAATCC-3′,289 bp;β-actin 的上游引物为 5′-GT-GGGCCGCCCTAGGCACCA-3′,下游引物为 5′-CGGTT-GGCCTTAGGGTTCAGAGGG-3′,245 bp。

1.8　统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组均数比较采用单因素方差分析或双因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-t 检验。

2　结果

2.1　大鼠肺成纤维细胞上 FPR 的趋化活性

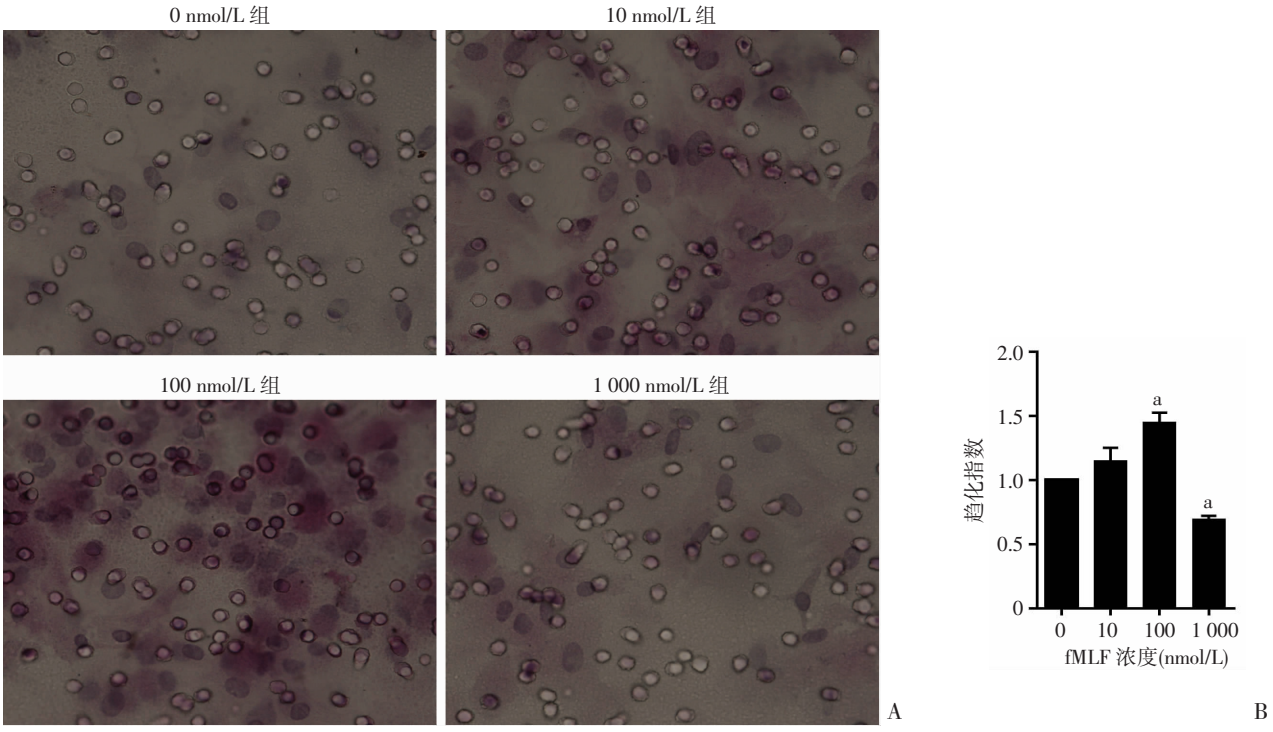
细胞趋化实验显示,FPR 激动剂可引起大鼠成纤维细胞明显的趋化反应。10 nmol/L 组趋化的细胞数是 0 nmol/L 组的(1.145±0.318)倍,无统计学意义($P>0.05$);100 nmol/L 组引起的趋化反应最强。100、1 000 nmol/L 组趋化的细胞数分别是 0 nmol/L 组的(1.445±0.235)倍和(0.690±0.091)倍,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 1)。

2.2　缺氧促进大鼠肺成纤维细胞分泌 FPR 激活物

大鼠肺成纤维细胞缺氧处理后,其培养上清趋化的细胞数是常氧上清组的(1.362±0.199)倍,差异具有统计学意义($P<0.05$)。常氧+tBoc 组的培养上清趋化的细胞数较常氧组虽减少,减少 8.40%,但无统计学意义($P>0.05$);缺氧+tBoc 组的培养上清趋化的细胞数较缺氧组显著减少($P<0.05$),减少 16.94%,使用 FPR 拮抗剂 tBoc 处理,缺氧上清减少程度与常氧上清减少程度之间的差异具有统计学意义($P<0.05$,图 2)。

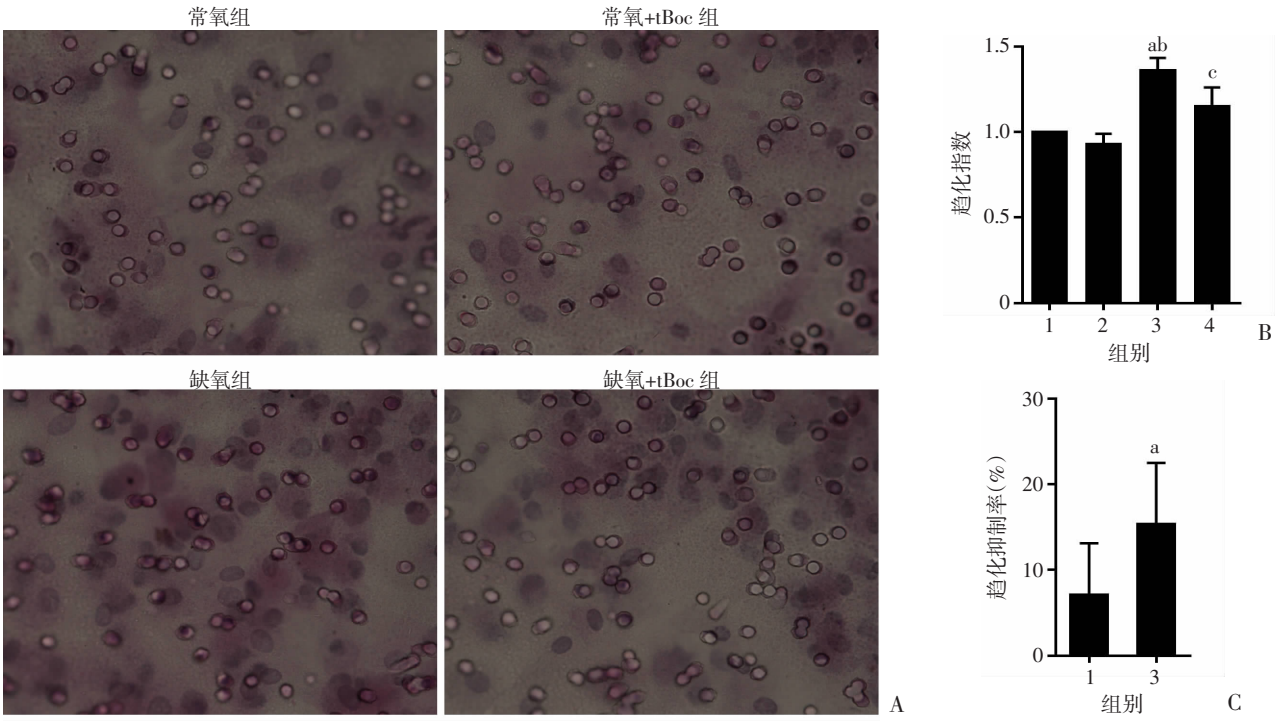
2.3　缺氧上调大鼠肺成纤维细胞 FPR1、AnxA1 蛋白水平和 mRNA 水平

Western blot 结果显示(图 3),大鼠肺成纤维细胞表达 FPR1,在 1%的缺氧条件下缺氧 12 h 后 FPR1 的蛋白表达与缺氧 0 h 组相比显著增加,差异具有统计学意义($P<0.05$);缺氧 2、24 h 组与缺氧 0 h 组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。缺氧 12、24 h 与缺氧 0 h 组相,AnxA1 的蛋白表达显著增加,差异均具有统计学意义($P<0.05$);缺氧 2 h 与缺氧 0 h 组相比,虽然蛋白表达增加,但无统计学意义($P>0.05$)。PCR 结果显示(图 3),肺成纤维细胞缺氧 2、12、24 h 的 FPR1、AnxA1 的电泳条带与缺氧 0 h 组相比显著加深,而内参 β-actin 的变化不明显,通过灰度分析发现(图 3),缺氧 2、12、24 h 组 FPR1、AnxA1 的 mRNA 水平均较缺氧 0 h 组显著增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。



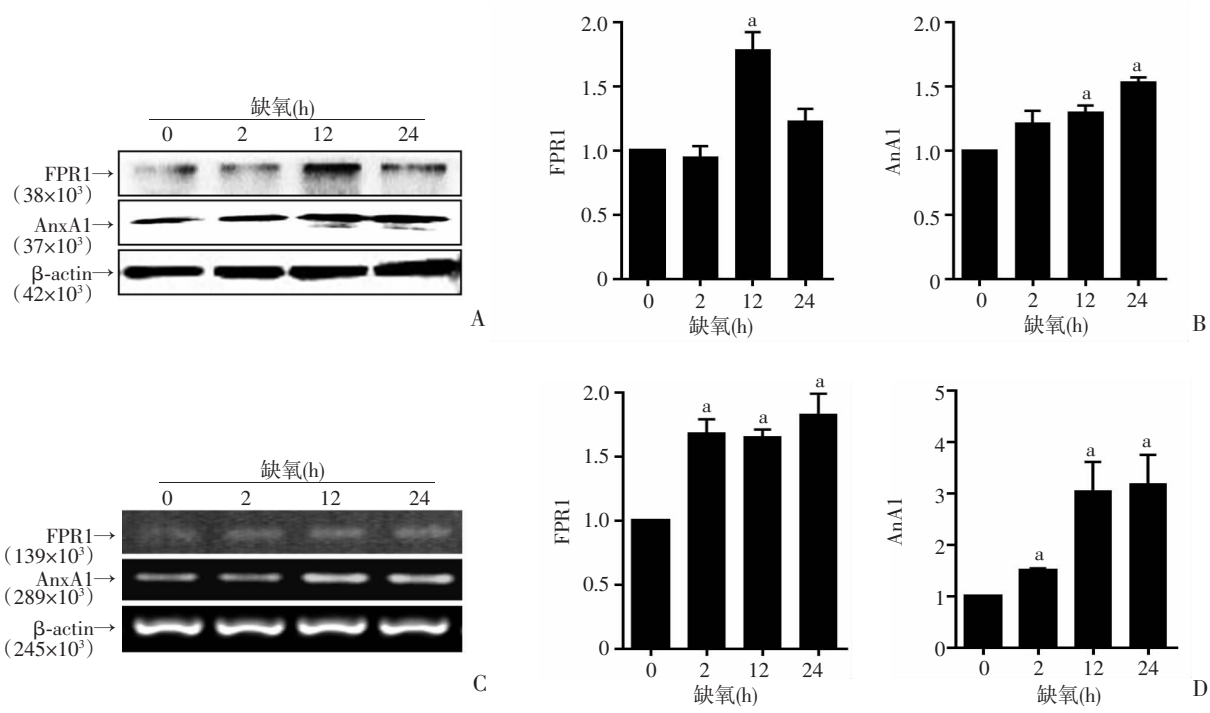
A:fMLF 诱导的趋化　B:趋化指数($n=9$, $\bar{x}\pm s$)　a:$P<0.05$,与常氧组相比较

图 1　细胞趋化实验检测大鼠肺成纤维细胞 FPR 的趋化活性



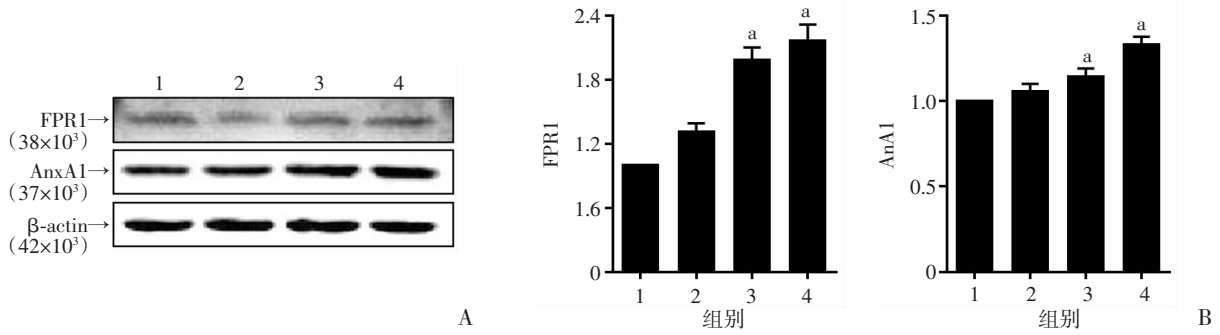
1:常氧组;2:常氧+tBoc 组;3:缺氧组;4:缺氧+tBoc 组; A:缺氧上清的趋化活性;B:趋化指数;C:趋化抑制率($n=9$, $\bar{x}\pm s$);
a: $P<0.05$,与常氧组比较; b: $P<0.05$,与常氧+tBoc 组比较; c:$P<0.05$,与缺氧组比较

图 2 细胞趋化实验检测大鼠肺成纤维细胞 FPR 的趋化活性



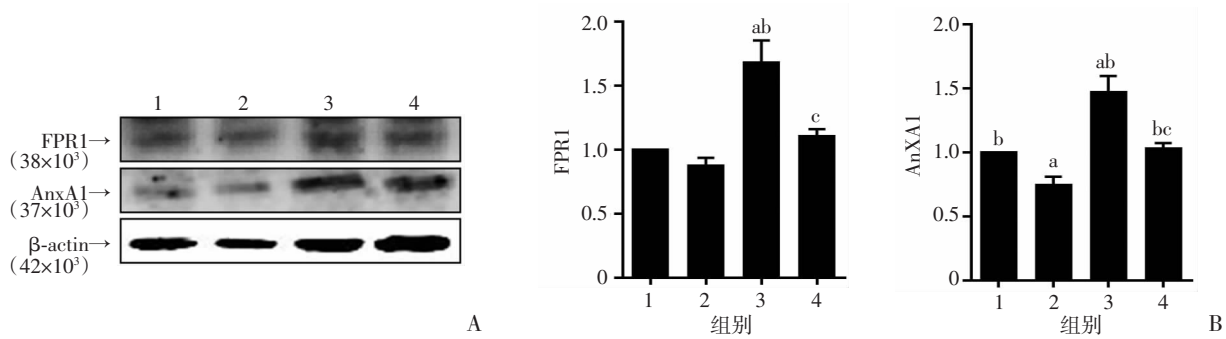
A:Western blot 检测结果;B:Western blot 电泳结果半定量分析; C: PCR 电泳结果;D:PCR 电泳半定量分析
a:$P<0.05$,与 0 h 组比较

图 3 缺氧对肺成纤维细胞 FPR1、AnxA1 表达的影响 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)



1:0 nmol/L 组;2:10 nmol/L 组; 3: 100 nmol/L 组; 4: 1 000 nmol/L 组 A:Western blot 检测结果;B:Western blot 电泳结果半定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与常氧组比较

图 4 Western blot 检测 fMLF 处理后细胞 FPR1、AnxA1 的蛋白表达水平



1:常氧组;2:常氧+tBoc 组;3:缺氧组;4:缺氧+tBoc 组; A:Western blot 检测结果;B:Western blot 电泳结果半定量分析($n=3$, $\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与常氧组比较; b: $P<0.05$,与常氧+tBoc 相比较; c:$P<0.05$,与缺氧组相比较

图 5 Western blot 检测缺氧和 FPR 拮抗剂对细胞 FPR1、AnxA1 的蛋白表达水平的影响

2.4 fMLF 上调肺成纤维细胞 FPR1、AnxA1 的蛋白水平

随着 fMLF 浓度的升高,FPR1 和 AnxA1 的蛋白表达水平逐渐增加,100、1 000 nmol/L 组与 0 nmol/L 组相比,具有显著性差异($P<0.05$);10 nmol/L 组与 0 nmol/L 组相比,差异无统计学意义($P>0.05$,图 4)。

2.5 FPR 拮抗剂 tBoc 对缺氧大鼠肺成纤维细胞 FPR1、AnxA1 表达的影响

与常氧组相比,缺氧组细胞中 FPR1 和 AnxA1 的蛋白水平升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);缺氧+tBoc 组与缺氧组相比,FPR1 和 AnxA1 表达水平显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);缺氧+tBoc 组与常氧+tBoc 组相比,差异无统计学意义($P>0.05$,图 5)。

3 讨论

趋化实验显示 FPR 特异性激动剂 fMLF 可以引起肺成纤维细胞的趋化反应,100 nmol/L 组的趋化反应最为强烈,这符合 fMLF 引起趋化反应时的典型“钟型”剂量效应曲线。可见,我们分离培养的大鼠肺成纤维细胞表达 FPR,且 FPR 具有介导趋化的功能。1 000 nmol/L 组反而使趋化的细胞数显著回降,而且低于 0 nmol/L 组,其原因可能至少有两种:首先,受体具有高浓度的趋化因子的饱和度,从而消除了任何有意义的梯度,因此降低了细胞的趋化性;第二,暴露于高浓度的激动剂会使化学引诱剂受体发生脱敏,导致对随后的激动剂刺激的反应性降低[11]。我们进一步通过免疫印迹和 PCR 实验证实,原代培养的大鼠肺成纤维细胞上表达 FPR1。FPRs 属于 G 蛋白偶联受体,是一种经典的趋化受体,能够介导强烈的趋化反应。最初发现其主要表达于有吞噬功能的白细胞[12],在肝细胞、星状细胞、肺上皮细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞和小胶质细胞中都有表达[13-15],提示 FPR 可能具有更复杂的功能。这些受体在宿主防御和炎症反应中起重要作用,当激动剂将其激活后,能使细胞活化,引起趋化运动和炎症介质的释放等生物学效应。缺氧后肺成纤维细胞 FPR1 表达上调可能与氧感受信号途径有关,也可能是肺成纤维细胞自分泌的其他物质作用的结果。

肺成纤维细胞上的 FPR 在缺氧时发挥作用需要相应的激活物或配体进行激活。我们的研究结果发

现,成纤维细胞缺氧培养上清可以诱导强烈的趋化反应,而且此趋化反应可以被 FPR 拮抗剂所抑制,说明在缺氧时,大鼠肺成纤维细胞释放了 FPR 的激活物。在缺氧条件下,组织或细胞会释放大量的化学物质,无论是作为刺激主动分泌的物质,还是作为损伤因素被动释放的物质,都会对细胞产生一定的影响,如 HMGB1 和线粒体 DNA,可激活 Toll 样受体(TLR),从而诱导各种病理生理反应,包括高原习服、创伤愈合、动脉粥样硬化等。线粒体被认为是一种寄生在体内的古生菌进化而来的,具有细菌的属性。受损的线粒体或功能不足的线粒体,如果不被及时处理,可释放甲酰化肽,激活 FPRs 介导的信号通路[16]。因此,与其他化学引诱剂不同,N-甲酰肽可以是内源性的,如线粒体蛋白或破裂的宿主细胞。除此之外,其他内源性的蛋白或多肽也可以是 FPR 的激活物,如 AnxA1。有文献[17]报道,AnxA1 可释放到细胞外,参与炎症反应。在 1%的氧浓度下 12 h,大鼠肺成纤维细胞上的 AnxA1 表达增多,但是 AnxA1 的启动子区域没有缺氧反应元件,可能是其它原因。由于其在细胞培养上清中的含量很低,所以不能检测其在缺氧上清中的变化。除了 AnxA1 这种激活物以外,细胞是否还释放了其他 FPR 激活物?这些激活物发挥怎样的作用?另外,FPR 拮抗剂并没有完全消除缺氧对培养上清趋化活性的增强作用,说明缺氧还可刺激其他趋化活性物质的产生,这些物质是什么?均有待下一步的实验研究。

通过人工合成获得的 fMLF 是第一个外源性的 FPR 特异性激动剂。我们用 fMLF 刺激肺成纤维细胞,发现其可以上调 FPR1 与 AnxA1 的表达。而且,当用 FPR 特异性拮抗剂处理成纤维细胞后,缺氧对 FPR1、AnxA1 表达的上调作用被削弱。因此,我们认为细胞在缺氧条件下 FPR 可以被自分泌的激活物如 AnxA1 所激活,再进一步促进 FPR 与 AnxA1 的表达,形成正反馈,使 FPR 信号及功能活性放大。当激活物与 FPR 结合时,FPRs 会发生构象变化,通过 G 蛋白、酪氨酸蛋白激酶等介导的多种信号通路,如 AKT、PI3K、p38、ERK 等,在细胞向感染部位和炎症部位迁移以及细胞的增殖、分泌、分化等事件中发挥作用[18]。现已证明 AnxA1 能抑制核因子 NFκb 的激活和促炎性细胞因子的产生。据报道,使用 AnxA1(或由 AnxA1 的 N 末端包含残基 2-26 的肽 AC2-26)进行治疗可保持 AnxA1 蛋白的抗炎活性,从而对一系列炎症疾病提供保护,如内毒素血症、结肠炎、关节炎和缺血再灌注中心脏、肝脏、肾脏和大脑的损伤[19-20]。

缺氧可引起肺血管收缩,血流阻力增大,从而引起肺动脉压力增高。持续的肺动脉高压还伴有肺血管壁的结构改建,即血管壁增厚,管腔狭窄,从而引起肺动脉压进一步升高。在肺血管改建的过程中,除了通常认为的肺血管内皮细胞和平滑肌细胞外,肺成纤维细胞也在缺氧性肺血管收缩中发挥重要作用。肺成纤维细胞是组成肺血管的重要细胞,在刺激因素的作用下,能快速增殖、迁移,合成大量的细胞外基质,并分泌细胞因子和生长因子等。低氧可能会诱导其表型发生变化,使其分化为肌成纤维细胞,趋化迁移至炎症灶,同时合成的Ⅰ型胶原和Ⅲ型胶原增多,促进与其他细胞的相互作用,加速血管重塑和肺动脉高压的形成。我们的研究结果表明,在缺氧条件下,肺成纤维细胞上调 FPR 水平,并释放激活物,这些激活物可以激活自身或其他细胞上的 FPR,促进细胞表达或释放 FPR 激活物 AnxA1。后者进一步上调 FPR 及其激活物水平,放大 FPR 的作用。因此,我们认为缺氧时肺组织(包括常驻肺部的成纤维细胞)分泌多种 FPR 激活物,引起肺组织其他区域以及血液中的成纤维细胞、炎症细胞趋化至肺组织周围,在 FPR 的介导下,这些常驻的或外来的成纤维细胞、炎症细胞进一步增殖、分化,并分泌一些趋化因子募集更多的细胞参与炎症反应与组织重塑。成纤维细胞则可以合成分泌大量的细胞外基质。有研究[21]指出,缺氧时肺组织其他细胞(如血管内皮细胞)被激活,随之产生大量的活性物质,从而使肺成纤维细胞发生表型的转变,分泌细胞外基质成分。在缺氧时,肺血管内皮细胞、平滑肌细胞等来源的 FPR 激活物在肺成纤维细胞趋化至炎症灶,参与组织重塑过程中可能也发挥重要的作用。这些细胞产生哪些活性物质,是否含有 FPR 激活物,在哪一阶段发挥作用等,有待下一步的实验证实。成纤维细胞参与的组织重塑反应,如果适度,则产生对机体有利的效果;如果过度,则可产生不利效果;例如缺氧时肺血管外膜层积累大量成纤维细胞等间质细胞并产生大量细胞基质,会造成肺动脉壁硬化,形成缺氧性肺动脉高压。因此,针对 FPR 这一新靶点,可以设计相应干预措施,适时适度地控制成纤维细胞的数量与活性,对构建缺氧性肺动脉高压等疾病的防治措施有较好的实用价值。

参考文献:

[1] PUGLIESE S C, POTH J M, FINI M A, *et al*. The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308(3): L229-L252. DOI: 10.1152/ajplung.00238.2014.

[2] PUGLIESE S C, KUMAR S, JANSSEN W J, *et al*. A time- and compartment-specific activation of lung macrophages in

hypoxic pulmonary hypertension[J]. J Immunol, 2017, 198(12): 4802-4812. DOI: 10.4049/jimmunol.1601692.

[3] LUO Y, DONG H Y, ZHANG B, *et al*. MiR-29a-3p attenuates hypoxic pulmonary hypertension by inhibiting pulmonary adventitial fibroblast activation[J]. Hypertension, 2015, 65(2): 414-420. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04600.

[4] ZHANG N, DONG M Q, LUO Y, *et al*. Danshensu prevents hypoxic pulmonary hypertension in rats by inhibiting the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells via TGF-β-smad3-associated pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 820: 1-7. DOI:10.1016/j.ejphar.2017.12.010.

[5] EL KASMI K C, PUGLIESE S C, RIDDLE S R, *et al*. Adventitial fibroblasts induce a distinct proinflammatory/profibrotic macrophage phenotype in pulmonary hypertension[J]. J Immunol, 2014, 193(2): 597-609. DOI: 10.4049/jimmunol.1303048.

[6] WANG X, LIN L J, CHAI X Y, *et al*. Hypoxic mast cells accelerate the proliferation, collagen accumulation and phenotypic alteration of human lung fibroblasts[J]. Int J Mol Med, 2020, 45(1): 175-185. DOI: 10.3892/ijmm.2019.4400.

[7] ZHANG L, WANG H Y, YANG T S, *et al*. Formylpeptide receptor 1 mediates the tumorigenicity of human hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncoimmunology, 2016, 5(2): e1078055. DOI: 10.1080/2162402X.2015.1078055.

[8] LIU M Y, CHEN K Q, YOSHIMURA T, *et al*. Formylpeptide receptors mediate rapid neutrophil mobilization to accelerate wound healing[J]. PLoS ONE, 2014, 9(6): e90613. DOI: 10.1371/journal.pone.0090613.

[9] WANG G, ZHANG L, CHEN X X, *et al*. Formylpeptide receptors promote the migration and differentiation of rat neural stem cells[J]. Sci Rep, 2016, 6: 25946. DOI: 10.1038/srep25946.

[10] POISSONNIER A, LEGEMBRE P. Boyden chamber assay to study of cell migration induced by metalloprotease cleaved-CD95L[J]. Methods Mol Biol, 2017, 1557: 117-123. DOI: 10.1007/978-1-4939-6780-3_12.

[11] YE R D, BOULAY F, WANG J M, *et al*. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXIII. Nomenclature for the formyl peptide receptor (FPR) family[J]. Pharmacol Rev, 2009, 61(2): 119-161. DOI: 10.1124/pr.109.001578.

[12] LEE H Y, JEONG Y S, LEE M, *et al*. Intracellular formyl peptide receptor regulates naïve CD4 T cell migration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 497(1): 226-232. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.02.060.

[13] CHEN K Q, BAO Z Y, GONG W H, *et al*. Regulation of inflammation by members of the formyl-peptide receptor family[J]. J Autoimmun, 2017, 85: 64-77. DOI: 10.1016/j.jaut.2017.06.012.

[14] SCHEPETKIN I A, KHLEBNIKOV A I, GIOVANNONI M P, *et al*. Development of small molecule non-peptide formyl peptide receptor (FPR) ligands and molecular modeling of their recognition[J]. Curr Med Chem, 2014, 21(13): 1478-1504. DOI: 10.2174/09298673216613121809552l.

[15] HARIDAS V, SHETTY P, SARATHKUMAR E, *et al*. Reciprocal regulation of pro-inflammatory Annexin A2 and anti-inflammatory Annexin A1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis[J]. Mol Biol Rep, 2019, 46(1): 83-95. DOI: 10.1007/s11033-018-4448-5.

[16] CAI Y Q, HUANG J, XING H Y, *et al*. Contribution of FPR and TLR9 to hypoxia-induced chemoresistance of ovarian cancer cells[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12: 291-301. DOI: 10.2147/OTT.S190118.

[17] OKANO M, KUMAMOTO K, SAITO M, *et al*. Upregulated Annexin A1 promotes cellular invasion in triple-negative breast cancer[J]. Oncol Rep, 2015, 33(3): 1064-1070. DOI: 10.3892/or.2015.3720.

[18] LIAO W I, WU S Y, WU G C, *et al*. Ac2-26, an annexin A1 peptide, attenuates ischemia-reperfusion-induced acute lung injury[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(8): E1771. DOI: 10.3390/ijms18081771.

[19] ZOU Z, ZUO D, YANG J, *et al*. The ANXA1 released from intestinal epithelial cells alleviate DSS-induced colitis by improving NKG2A expression of Natural Killer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 478(1): 213-220. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.07.066.

[20] SENCHENKOVA E Y, ANSARI J, BECKER F, *et al*. Novel role for the AnxA1-Fpr2/ALX signaling Axis as a key regulator of platelet function to promote resolution of inflammation[J]. Circulation, 2019, 140(4): 319-335. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.039345.

[21] 刘艳华, 李宾公, 王裕勤, 等. 敲低 Runt 相关转录因子3(RUNX3)抑制低氧诱导的内皮细胞间质转分化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, 32(12): 1627-1631. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.007979.
LIU Y H, LI B G, WANG Y Q, *et al*. Knockdown of RUNX3 inhibits hypoxia-induced endothelial-to-mesenchymal transition of human cardiac microvascular endothelial cells[J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2016, 32(12): 1627-1631. DOI: 10.13423/j.cnki.cjcmi.007979.

(**收稿**:2019-09-20;**修回**:2019-10-17)

(编辑 黄 超)