DOI:10.16016/j.2097-0927.202107134

缺氧诱导线粒体 DNA 释放后激活 cGAS-STING 通路促进肺动脉平滑肌细胞增殖

韦汉南[1,2],陈德伟[2,3],张二龙[1,2],高钰琪[1,2] 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)高原军事医学系:高原特需药品与器材研究室[1],极端环境医学教育部重点实验室[2],病理生理学教研室[3]

[**摘要**] **目的** 探究线粒体 DNA(mitochondrial DNA,mtDNA)释放在缺氧诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞(rat pulmonary arterial smooth muscle cells,RPASMCs)增殖中的作用及可能机制。**方法** ①1%O_2缺氧处理 RPASMCs 分 3 组($n=3$):常氧组、缺氧 24 h 组、缺氧 48 h 组。②环孢素 A(CsA)抑制线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore,MPTP)分为 3 组($n=3$):常氧组、缺氧 48 h 组、缺氧 48 h+CsA 处理组。③siRNA 敲低干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes,STING)表达分为 3 组($n=3$):常氧+NC 组、缺氧 48 h+NC 组、缺氧 48 h+si-STING 组。④采用 CCK-8 检测细胞增殖,RT-qPCR、Western blot 检测环状 GMP-AMP 合酶(cyclic GMP-AMP synthase,cGAS)、STING、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)的基因与蛋白表达,qPCR 检测细胞质 mtDNA 释放,ELISA 检测细胞培养上清中 CXC 趋化因子配体 10(C-X-C motif chemokine ligand 10,CXCL10)水平。**结果** 缺氧可诱导 RPASMCs 释放 mtDNA($P<0.01$),显著上调 cGAS、STING、PCNA 的表达($P<0.05$),并增强 CXCL10 的分泌($P<0.01$),进而促进 RPASMCs 增殖(0.44±0.02 *vs* 0.72±0.03)($P<0.05$)。抑制 MPTP 可阻断 mtDNA 释放($P<0.01$),显著下调 cGAS、STING、PCNA 的表达($P<0.01$),降低 CXCL10 的分泌水平($P<0.01$),并显著抑制缺氧诱导的 RPASMCs 增殖(0.74±0.12 *vs* 0.43±0.06)($P<0.01$)。敲低 STING 可显著下调 PCNA 的表达($P<0.05$),降低 CXCL10 的分泌水平($P<0.01$),并显著抑制缺氧诱导的 RPASMCs 增殖(0.68±0.03 *vs* 0.58±0.01)($P<0.01$)。**结论** 缺氧可诱导平滑肌细胞释放 mtDNA,介导缺氧诱导的平滑肌细胞增殖,其机制可能与 cGAS-STING 通路的激活有关。

[**关键词**] mtDNA 释放;cGAS-STING 通路;肺动脉平滑肌细胞;缺氧;增殖

[**中图法分类号**] R322.121; R329.28; R394.2 [**文献标志码**] A

Hypoxia-induced mitochondrial DNA release promotes proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells *via* activating cGAS-STING pathway

WEI Hannan[1,2], CHEN Dewei[2,3], ZHANG Erlong[1,2], GAO Yuqi[1,2] [1]Department of Medicine and Equipment for High Altitude Region, [2]Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education, [3]Department of Pathophysiology, Faculty of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and possible mechanism of mitochondrial DNA (mtDNA) release in the proliferation of rat pulmonary arterial smooth muscle cells (RPASMCs) induced by hypoxia. **Methods** ① RPASMCs were divided into normoxia group, hypoxia 24-hour group and hypoxia 48-hour group ($n=3$ for each groups), and the latter 2 groups were exposed to 1% O_2 for 24 or 48 h respectively. ② Cyclosporine A (CsA) was used to inhibit the mitochondrial permeability transition pore

[**基金项目**] 国家自然科学基金重点项目(81830062)

[**通信作者**] 高钰琪,E-mail:gaoy66@yahoo.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

(MPTP), and then the RPASMCs were divided into normoxia, simple hypoxia 48-hour and hypoxia 48-hour+CsA groups ($n=3$ for each). ③ SiRNA was adopted to knockdown the expression of stimulator of interferon genes (STING), and the cells were subsequently divided into normoxia+NC, hypoxia 48-hour+NC and hypoxia 48-hour+si-STING ($n=3$ for each). ④ The proliferation of the cells was measured by CCK-8 assay. The expression of cyclic GMP-AMP synthase (cGAS), STING and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) at mRNA and protein levels was detected by RT-qPCR and Western blotting, respectively. Cytosolic mtDNA release was determined by qPCR, and the level of C-X-C motif chemokine ligand 10 (CXCL10) in the culture supernatant was tested by ELISA. **Results** Hypoxia induced RPASMCs to release mtDNA ($P<0.01$), significantly up-regulated the expression of cGAS, STING and PCNA ($P<0.05$), enhanced the secretion of CXCL10 ($P<0.01$), and thus promoted the proliferation of RPASMCs (0.44 ± 0.02 *vs* 0.72 ± 0.03, $P<0.05$). However, inhibition of MPTP blocked mtDNA release ($P<0.01$), down-regulated cGAS, STING and PCNA ($P<0.01$), and decreased CXCL10 level ($P<0.01$) and hypoxia-induced proliferation of RPASMCs (0.74 ± 0.12 *vs* 0.43 ± 0.06, $P<0.01$). The knockdown of STING also suppressed PCNA expression ($P<0.05$), reduced CXCL10 secretion ($P<0.01$), and inhibited the proliferation of RPASMCs (0.68 ± 0.03 *vs* 0.58 ± 0.01, $P<0.01$). **Conclusion** Hypoxia can induce smooth muscle cells to release mtDNA and promote the proliferation of RPASMCs, which may be related to the activation of the cGAS-STING pathway.

[**Key words**] mitochondrial DNA release; cGAS-STING pathway; pulmonary arterial smooth cells; hypoxia; proliferation

Supported by the Key Program of National Natural Science Foundation of China (81830062). Corresponding author: GAO Yuqi, E-mail: gaoy66@yahoo.com

肺动脉高压(pulmonary artery hypertension,PH)是一种表现为异常肺血管收缩,进行性肺血管重塑,持续性肺动脉压力升高,最终导致右心衰竭的难治性致命性疾病。目前,肺动脉高压的治疗主要集中在扩血管药物,改善肺血流动力学,但不针对其发病机理。肺动脉高压的5年生存率仅为50%左右[1]。缺氧作为肺动脉高压的重要病因,可引起肺动脉平滑肌细胞、内皮细胞、炎症细胞等发生一系列适应性改变参与肺血管重塑[2]。其中缺氧诱导的平滑肌细胞过度增殖在肺血管重塑中发挥了重要作用。以往研究发现,骨形态发生蛋白信号通路、炎症反应、自噬、p53信号通路等介导了平滑肌细胞的异常增殖[3-5],参与肺动脉高压的形成过程。然而,缺氧促进肺动脉平滑肌细胞增殖的确切分子机制尚未完全阐明,对平滑肌细胞异常增殖机制的深入研究,可为缺氧性肺动脉高压的防治提供理论依据。

线粒体作为细胞的能量工厂,是有氧呼吸的主要场所,主要负责ATP的产生,同时参与氧感知、炎症反应、细胞信号转导、自噬调控、增殖凋亡等多种细胞生命活动[6]。越来越多的研究表明线粒体动力学异常、线粒体代谢重编程、线粒体来源的损伤相关分子参与肺动脉高压的发生、发展[7]。线粒体应激释放的mtDNA,作为重要的线粒体损伤相关分子,广泛参与急性肾损伤、心血管疾病、关节炎等多种疾病进展[8-10]。cGAS是一种细胞质DNA感受器,通过结合细胞质内DNA而发生活化,催化产生cGMP。cGMP作为第二信使激活下游STING,参与自噬、炎症、免疫等多种病理过程[11]。缺氧可导致线粒体应激、线粒体结构功能受损、ROS生成增多等一系列病理改变。缺氧能否诱导mtDNA释放,同时释放的mtDNA与增殖有无关系未见报道。因此本研究拟通过小干扰RNA、CsA处理等技术探讨mtDNA释放在缺氧诱导的肺动脉平滑肌增殖中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

大鼠原代肺动脉平滑肌细胞(RPASMC)购自齐氏生物公司,DMEM/F12培养基购自Genview公司,Opti-MEM培养基购自Gibico公司,胎牛血清购自HyClone公司。小干扰RNA由吉玛基因生物公司合成,STING干扰序列:si-STING的靶序列为CCAUGUCACAG-GAUGGCAATT。cGAS抗体(货号:ab179785)购自英国Abcam公司;STING抗体(货号:19851-1-AP)、PCNA抗体(货号:10205-2-AP)、α-Tubulin抗体(货号:11224-1-AP)均购自美国Proteintech公司。PBS、TBS、封闭蛋白干粉均购自博士德公司;细胞组织裂解

液(RIPA)、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 均购自上海碧云天公司。HEPES Buffer 购自天恩泽公司;Digitonin 购自德国默克公司;CXCL10 ELISA 试剂盒(货号:ml003081)购自酶联公司;CCK-8 试剂盒(货号:CK04)购自日本同仁公司;RNA 提取试剂盒(货号:R6834-02)购自美国 OMEGA 公司;引物由美国 Invitrogen 公司合成;DNA 提取试剂盒(货号:51104)购自德国 QIAGEN 公司;LipofectamineRNAiMAX(货号:13778-150)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;低氧工作站购自英国 Baker Ruskinn 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理 RPASMCs 在含 10% FBS、1%青-链霉素的 DMEM/F12 培养基中常规培养。至汇合度 90%左右,适量胰酶消化细胞,吹打混匀制成单细胞悬液,待细胞贴壁后,换液,进行后续实验。缺氧处理 RPASMCs 分 3 组:常氧组、缺氧 24 h 组、缺氧 48 h 组。研究干扰 Sting 表达对缺氧肺动脉平滑肌细胞增殖的影响时分 3 组:常氧+NC 组、缺氧 48 h+NC 组、缺氧 48 h+si-STING 组,脂质体法进行细胞转染,按照说明书进行。转染 12 h 后,换液,置于低氧工作站中缺氧(1% O_2)培养 48 h,进行后续检测。CsA 处理分 3 组:常氧组、缺氧 48 h 组、缺氧 48 h+CsA 处理组,细胞贴壁后,缺氧前 30 min 予以 CsA 5 μmol/L[12] 预处理,随后放低氧工作站中缺氧(1%O_2)培养 48 h 后进行后续实验。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 总 RNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA,测定 RNA 浓度和纯度,取 1 μg 总 RNA,使用反转录试剂盒反转录后得到 cDNA。10 μL 体系进行定量 PCR 反应,TB Green 5 μL、cDNA 2.5 μL、DEPC 水 1.5 μL、上下游引物各 0.5 μL,每个样本设 3 个复孔。以 β-actin 为内参,$2^{-\triangle\triangle Ct}$ 计算各基因的相对表达,引物序列见表 1。

1.2.3 Western blot 检测 冰上提取缺氧后细胞总蛋白,BCA 试剂盒检测蛋白浓度,40 μg 蛋白行 SDS-PAGE 凝胶电泳,恒压转膜(100 V,70 min),5%脱脂牛奶常温封闭 1.5 h。STING 抗体(1∶1 000)、cGAS 抗体(1∶500)、PCNA 抗体(1∶2 000)、α-Tubulin 抗体(1∶1 000)4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次后加入二抗(1∶2 000)室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,ECL 化学发光法显影。由于 PCNA 与 STING 蛋白分子量接近,因此 STING 显完影,使用一抗二抗去除液洗脱,进行封闭等后续操作。使用 Image J 软件进行灰度分析,以目的蛋白灰度值与 α-Tubulin 灰度值比值表示目的蛋白相对表达量。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
Sting	上游:ACCTGAAGCTGATCTTGCCA
	下游:CTCAGATCATCAGGCACCCC
Cgas	上游:GACGGGAGTCCGAGTTCAAA
	下游:AGCTCGATTCTGGGGACTTC
*Cxcl*10	上游:TGCAAGTCTATCCTGTCCGC
	下游:TGACCTTCTTTGGCTCACCG
β-actin	上游:CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT
	下游:ACCAGAGGCATACAGGGACAAC
*Nd*1	上游:ATGGCCTTCCTCACCCTAGT
	下游:GTTAGGGGGCGTATGGGTTC
Dloop	上游:TCCCCAAGCATATAAGCATGTAA
	下游:TGGTGCATGTCTAATAACACAGA

1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖 细胞培养至汇合度达 90%时,加入适量胰酶消化细胞,细胞计数,每孔 3 000 个细胞接种 96 孔板,每组设 5 个复孔,待细胞贴壁后予以给药、转染和缺氧处理。去除培养基,PBS 清洗,每孔加入 CCK-8 和 PBS 按 1∶10 比例混合液 100 μL,37 ℃、5%CO_2 培养箱继续培养 2 h,酶标仪 450 nm 测定光密度值[D(450)]。

1.2.5 细胞质 mtDNA 定量 RPASMCs(1×10^6)重悬于 170 μL digitonin 缓冲液(150 mmol/L NaCl,50 mmol/L HEPES pH= 7.4,25 μg/mL digitonin),摇床上室温孵育 10 min,4 ℃ 16 000×g 离心 25 min。分离上清与沉淀,分别表示细胞质与总的 DNA 组分。DNA 试剂盒分别提取上清与沉淀部分 DNA,采用 mtDNA 特异的引物进行 PCR 定量,每个样本细胞质 mtDNA 与总的 mtDNA 进行标准化。引物序列见表 1。

1.2.6 ELISA 检测 设置标准品孔、空白孔和样本孔,样本孔加入不同浓度的标准品 50 μL,样本孔加入待测样本 50 μL,空白孔加入样本稀释液 50 μL。空白孔、标准品孔和样本孔中每孔加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的 CXCL10 检测抗体 100 μL,用封板膜封住反应孔,37 ℃恒温箱孵育 60 min。弃去液体,吸水纸上拍干,每孔加洗涤液 350 μL,静置 1 min,弃液体,吸水纸拍干,重复洗 5 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μL,37 ℃避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50 μL,15 min 以内,450 nm 波长测定各孔 D(450)值,以细胞总蛋白浓度对 D(450)值进行校正。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 23.0 软件进行统计学分析,各组计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间的比较采用独立样本 t 检验,多组间的均数比较采用方差分析,不符合正态分布时采用非参数检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

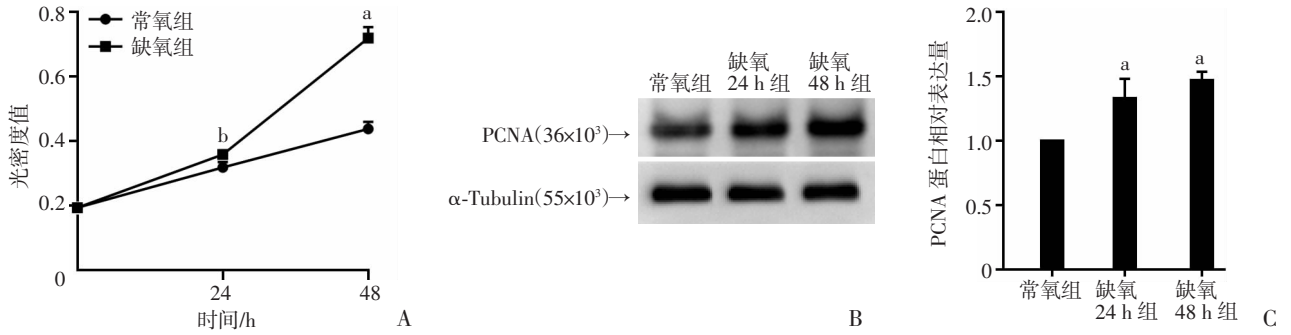
2 结果

2.1 缺氧对大鼠原代肺动脉平滑肌细胞增殖的影响

采用CCK-8和PCNA蛋白表达检测1%O_2缺氧处理对RPASMCs增殖的影响,结果显示,与常氧组相比,缺氧暴露24 h和48 h可显著增强RPASMCs增殖($P<0.05$,图1A),PCNA表达水平显著上调($P<0.01$,图1B、C)。其中,缺氧48 h对增殖影响更为显著。

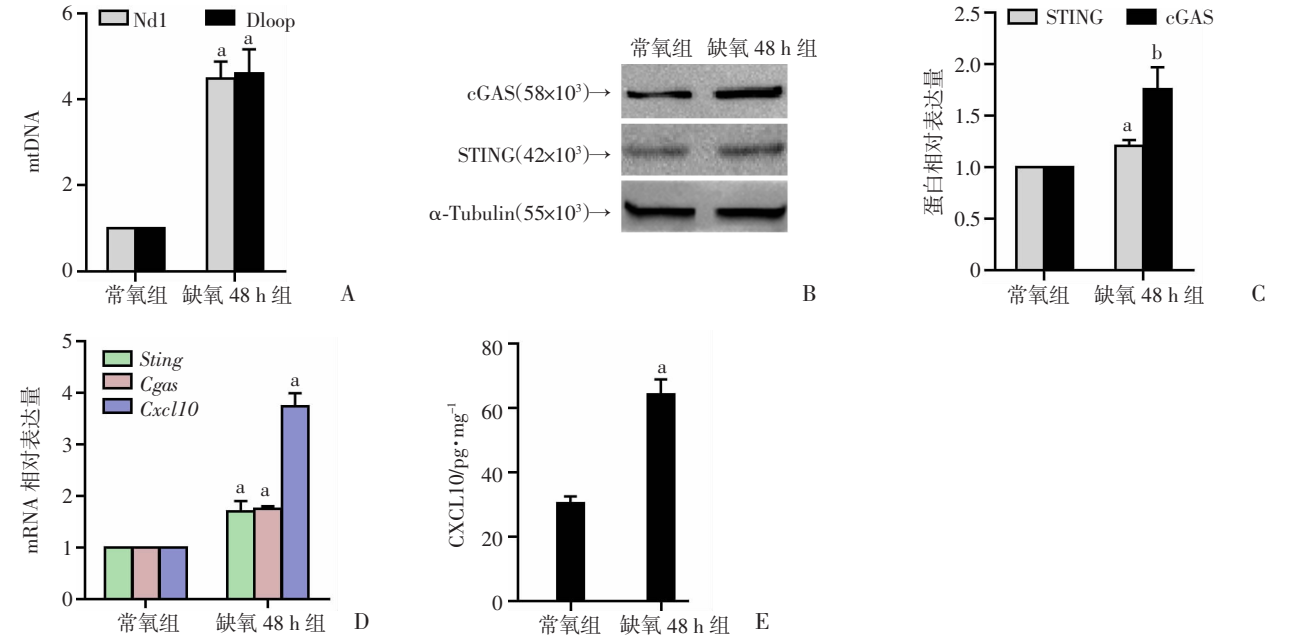
2.2 缺氧对细胞质mtDNA释放,cGAS、STING表达以及CXCL10分泌的影响

为了探究缺氧诱导平滑肌细胞增殖的机制,1%O_2缺氧处理RPASMCs 48 h,采用qPCR检测细胞质中编码基因Nd1(mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 1)以及非编码区序列Dloop的变化来反映mtDNA变化,RT-qPCR及Western blot检测STING和cGAS表达,ELISA检测细胞培养上清CXCL10水平。结果显示,与常氧组比较,缺氧48 h细胞质mtDNA释放显著增加($P<0.01$),STING和cGAS的蛋白水平显著上调($P<0.05$)。*Sting*、*Cgas*、下游炎症因子*Cxcl*10 mRNA水平显著上调($P<0.01$)。细胞上清CXCL10水平显著升高($P<0.01$)。提示缺氧诱导的mtDNA释放,激活cGAS-STING通路。见图2。



A:CCK-8检测缺氧对细胞增殖的影响 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与常氧组比较;B、C:Western blot检测缺氧对PCNA蛋白表达的影响 a:$P<0.01$,与常氧组比较

图1 1%O_2缺氧处理对RPASMCs增殖的影响 ($n=3$,$\bar{x}\pm s$)



A:qPCR检测缺氧对细胞质mtDNA释放的影响;B、C:Western blot检测缺氧对STING、cGAS蛋白表达的影响;D:RT-qPCR检测缺氧对*Sting*、*Cgas*、*Cxcl*10基因表达;E:ELISA检测缺氧对细胞CXCL10分泌的影响 a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与常氧组比较

图2 缺氧诱导细胞质mtDNA释放,激活cGAS-STING通路 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.3　抑制 MPTP 对 mtDNA 释放、cGAS-STING 通路激活、平滑肌细胞增殖与 CXCL10 分泌的影响

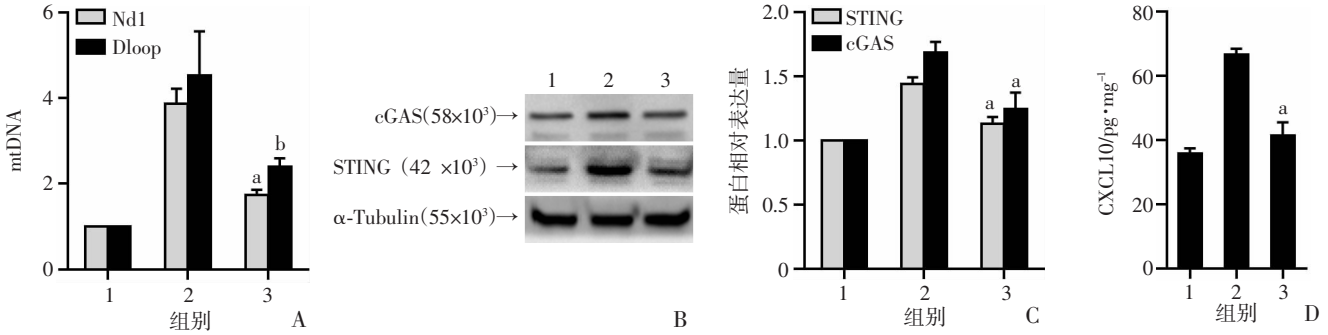
采用 qPCR 检测细胞质 mtDNA 释放,Western blot 检测 STING、cGAS 和 PCNA 表达,CCK-8 检测细胞增殖,ELISA 检测细胞培养上清 CXCL10 水平。结果显示,CsA 可显著抑制缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞细胞质 mtDNA 释放($P<0.01$),同时逆转缺氧引起 STING、cGAS、PCNA 表达上调($P<0.05$),下调细胞上清 CXCL10 水平($P<0.01$),并显著抑制缺氧诱导的平滑肌细胞增殖($P<0.01$)。提示 mtDNA 激活的 cGAS-STING 通路可能参与调控平滑肌细胞增殖。见图 3、4。

2.4　下调 STING 基因对缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖以及 CXCL10 分泌的影响

采用 CCK-8 和 PCNA 蛋白表达检测 RPASMCs 增殖,结果显示,干扰 STING 表达后,可显著抑制平滑肌细胞增殖($P<0.01$),PCNA 蛋白表达显著下降($P<0.05$),细胞上清 CXCL10 水平显著降低($P<0.01$)。提示缺氧条件下 cGAS-STING 通路的激活参与缺氧诱导的平滑肌细胞增殖。见图 5。

3　讨论

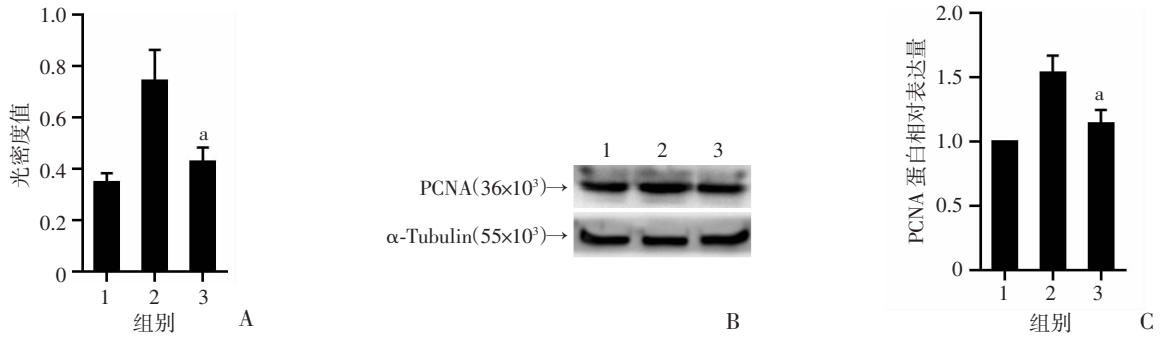
缺氧可引起肺血管重塑,过度的肺血管重塑引起肺动脉高压,持续的肺动脉高压最终导致右心衰,严重者可导致死亡。肺血管重塑是缺氧性肺动脉高压、高原心脏病的重要病理基础,缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖是肺血管重塑的关键环节。对缺氧肺动脉高压小鼠肺组织病理观察,过度增生的肺动脉中膜肥厚,管腔狭窄,呈丛样改变,严重者导致血管堵塞[12]。进一步研究表明,诱导平滑肌细胞增殖可加重缺氧诱导的肺动脉高压,对增殖进行干预可减轻缺氧诱导的肺动脉高压[13-14]。本研究结果与既往研究一致,体外培养原代肺动脉平滑肌细胞,缺氧处理 24、48 h 均可显著增强肺动脉平滑肌细胞增殖。对肺动脉平滑肌细胞增殖进行靶向干预,可为缺氧性肺动脉高压防治提供重要的理论依据。



1:常氧组;2:缺氧 48 h 组;3:缺氧 48 h+CsA 组;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与缺氧 48 h 组比较

A:qPCR 检测 CsA 处理对细胞质 mtDNA 释放的影响;B、C:Western blot 检测 CsA 处理对 STING、cGAS 蛋白表达的影响;D:ELISA 检测 CsA 处理对细胞 CXCL10 分泌的影响

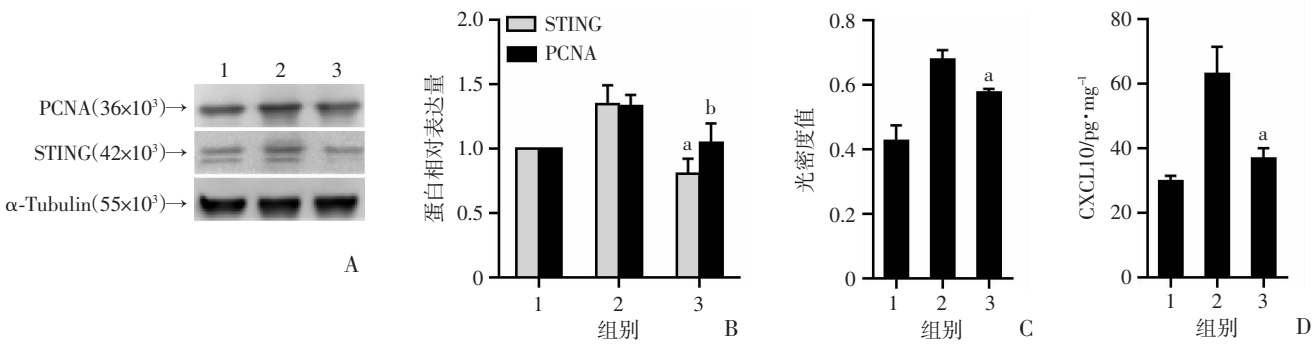
图 3　CsA 抑制 mtDNA 释放和 cGAS-STING 通路的激活　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



1:常氧组;2:缺氧 48 h 组;3:缺氧 48 h+CsA 组;a:$P<0.05$,与缺氧 48 h 组比较

A:CCK-8 检测 CsA 处理对细胞增殖的影响;B、C:Western blot 检测 CsA 处理对 PCNA 蛋白表达的影响

图 4　CsA 抑制缺氧诱导的平滑肌细胞增殖　($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



A、B:Western blot 检测干扰 STING 对 PCNA 蛋白表达的影响;C:CCK-8 检测干扰 STING 对细胞增殖的影响;D:ELISA 检测干扰 STING 对细胞 CXCL10 分泌的影响;1:常氧+NC 组;2:缺氧 48 h+NC 组;3:缺氧 48 h+si-STING 组;a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与缺氧 48 h +NC 组比较

图 5 下调 STING 基因抑制肺动脉平滑肌细胞增殖 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

近年来,线粒体在多种疾病的发生、发展中备受关注。线粒体自噬增强、线粒体过度分裂、线粒体生物合成失衡、线粒体代谢重塑、线粒体来源 ROS 改变等参与了肺动脉高压与肿瘤的疾病进程[15]。线粒体主要功能是通过有氧呼吸产生 ATP,偶联多种代谢活动。此外还参与信号转导、钙离子稳态、炎症反应、自噬凋亡等调控,对线粒体的靶向干预,可为缺氧性肺动脉高压防治提供新的更有效的策略。既往研究表明,缺氧可导致线粒体结构损伤,功能受损。线粒体损伤释放的损伤相关分子包括甲酰肽、mtDNA、ROS 等在多种炎症性疾病中被广泛报道[16-17]。线粒体是一种拥有独立遗传物质的半自主细胞器,正常情况下双链环状 DNA 形成类核高级结构,位于线粒体基质中。线粒体应激,释放 mtDNA 到细胞质,激活 cGAS-STING 通路启动自身炎症免疫反应,在肾脏疾病、系统性红斑狼疮、心血管疾病中被广泛报道。最新研究发现平滑肌细胞 cGAS-STING 通路的激活参与调控慢性肾脏病相关的血管斑块稳定性,平滑肌细胞作为炎症产生与效应细胞参与慢性肾脏病相关的心血管疾病发生发展[18],提示平滑肌细胞也可能作为炎症的启动细胞介导炎症反应。此外,有报道显示 STING 可调控自噬、自噬失衡或炎症反应,这些均参与肺动脉高压的病理过程[19-21]。本研究发现,mtDNA 作为一种损伤相关分子,缺氧可诱导其释放到细胞质,异常定位的 mtDNA 可激活 cGAS-STING 通路,介导缺氧诱导的平滑肌细胞增殖,敲低 STING 可逆转缺氧诱导的平滑肌细胞增殖。提示 mtDNA 的释放以及 cGAS-STING 通路可作为缺氧诱导平滑肌细胞增殖的重要干预靶点,值得进一步深入研究。

CXCL10 作为趋化因子超家族的一种,与趋化因子受体 3(chemokine receptor 3,CXCR3)结合,广泛参与细胞免疫应答、血管生成、细胞增殖凋亡等生物学过程。研究报道 CXCL10 在肝细胞肝癌、乳腺癌、结直肠癌等多种肿瘤模型中参与肿瘤细胞的过度增殖与侵袭[22-24]。此外,CXCL10 还参与调控外周血 T 淋巴细胞的定向迁移,影响淋巴细胞增殖[25]。研究发现 CXCL10 同时也可参与平滑肌细胞增殖的调控,CXCL10 以浓度依赖性促进平滑肌细胞增殖参与血管重塑[26],CXCL10 还可通过 ERK1/2/CREB 信号通路促进平滑肌细胞增殖[27]。缺氧可促进心脏微血管内皮细胞分泌 CXCL10[28],本研究发现,缺氧也可以促进平滑肌细胞分泌 CXCL10。CXCL10 调控平滑肌细胞增殖与既往报道基本一致,通过 CsA、siRNA 等处理可抑制平滑肌细胞 CXCL10 的产生,抑制缺氧诱导的平滑肌细胞增殖。有研究表明,血清 CXCL10 水平与肺动脉高压患者病情的严重程度呈正相关[29],提示平滑肌细胞产生 CXCL10 可能通过自分泌、旁分泌的形式,作用于平滑肌细胞促进其增殖,参与介导肺动脉高压,但其具体作用机制需要进一步深入研究。

综上所述,本研究发现,缺氧导致肺动脉平滑肌细胞 mtDNA 异常释放,可激活 cGAS-STING 通路,参与缺氧诱导的平滑肌细胞过度增殖。抑制 STING 的激活和干预 mtDNA 的释放可显著抑制缺氧条件下平滑肌细胞的增殖。提示调控线粒体 mtDNA 释放及 cGAS-STING 通路可为解决缺氧性肺动脉高压提供新的策略。

参考文献:

[1] THENAPPAN T, ORMISTON M L, RYAN J J, *et al*. Pul-

monary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management[J]. BMJ, 2018, 360: j5492. DOI: 10.1136/bmj.j5492.

[2] 高钰琪, 高文祥, 袁志兵, 等. 低氧肺血管炎症反应是高原肺水肿和低氧性肺动脉高压形成的关键环节[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(10): 1903. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2015.10.343.
GAO Y Q, GAO W X, YUAN Z B, *et al*. Hypoxic pulmonary vascular inflammatory response is a key link in the formation of plateau pulmonary edema and hypoxic pulmonary hypertension[J]. Chin J Pathophysiol, 2015, 31(10): 1903. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2015.10.343.

[3] PI W F, GUO X J, SU L P, *et al*. BMP-2 up-regulates PTEN expression and induces apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells under hypoxia[J]. PLoS One, 2012, 7(5): e35283. DOI: 10.1371/journal.pone.0035283.

[4] WANG Z Y, YANG K, ZHENG Q Y, *et al*. Divergent changes of p53 in pulmonary arterial endothelial and smooth muscle cells involved in the development of pulmonary hypertension[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2019, 316(1): L216-L228. DOI: 10.1152/ajplung.00538.2017.

[5] GUI D, CUI Z, ZHANG L, *et al*. Salidroside attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation and apoptosis resistance by upregulating autophagy through the AMPK-mTOR-ULK1 pathway[J]. BMC Pulm Med, 2017, 17(1): 191. DOI: 10.1186/s12890-017-0477-4.

[6] DROMPARIS P, MICHELAKIS E D. Mitochondria in vascular health and disease[J]. Annu Rev Physiol, 2013, 75: 95-126. DOI: 10.1146/annurev-physiol-030212-183804.

[7] DASGUPTA A, WU D C, TIAN L, *et al*. Mitochondria in the pulmonary vasculature in health and disease: oxygen-sensing, metabolism, and dynamics[J]. Compr Physiol, 2020, 10(2): 713-765. DOI: 10.1002/cphy.c190027.

[8] COLLINS L V, HAJIZADEH S, HOLME E, *et al*. Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces *in vivo* and *in vitro* inflammatory responses[J]. J Leukoc Biol, 2004, 75(6): 995-1000. DOI: 10.1189/jlb.0703328.

[9] MAEKAWA H, INOUE T, OUCHI H, *et al*. Mitochondrial damage causes inflammation *via* cGAS-STING signaling in acute kidney injury[J]. Cell Rep, 2019, 29(5): 1261-1273.e6. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.09.050.

[10] OKA T, HIKOSO S, YAMAGUCHI O, *et al*. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure[J]. Nature, 2012, 485(7397): 251-255. DOI: 10.1038/nature10992.

[11] CAI X, CHIU Y H, CHEN Z J. The cGAS-cGAMP-STING pathway of cytosolic DNA sensing and signaling[J]. Mol Cell, 2014, 54(2): 289-296. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.040.

[12] KOVACS L, CAO Y P, HAN W H, *et al*. $PFKFB_3$ in smooth muscle promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2019, 200(5): 617-627. DOI: 10.1164/rccm.201812-2290OC.

[13] CHEN M X, DING Z Y, ZHANG F Y, *et al*. A20 attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension by inhibiting NF-κB activation and pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. Exp Cell Res, 2020, 390(2): 111982. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.111982.

[14] KWON M Y, HWANG N, PARK Y J, *et al*. NOD2 deficiency exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension and enhances pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation[J]. Oncotarget, 2018, 9(16): 12671-12681. DOI: 10.18632/oncotarget.23912.

[15] WU D, DASGUPTA A, READ A D, *et al*. Oxygen sensing, mitochondrial biology and experimental therapeutics for pulmonary hypertension and cancer[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 170: 150-178. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.12.452.

[16] WU G N, ZHU Q Q, ZENG J L, *et al*. Extracellular mitochondrial DNA promote NLRP3 inflammasome activation and induce acute lung injury through TLR9 and NF-κB[J]. J Thorac Dis, 2019, 11(11): 4816-4828. DOI: 10.21037/jtd.2019.10.26.

[17] RIBEIRO JUNIOR R F, DABKOWSKI E R, SHEKAR K C, *et al*. MitoQ improves mitochondrial dysfunction in heart failure induced by pressure overload[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 117: 18-29. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.012.

[18] BI X J, DU C H, WANG X M, *et al*. Mitochondrial damage-induced innate immune activation in vascular smooth muscle cells promotes chronic kidney disease-associated plaque vulnerability[J]. Adv Sci (Weinh), 2021, 8(5): 2002738. DOI: 10.1002/advs.202002738.

[19] GUI X, YANG H, LI T, *et al*. Autophagy induction *via* STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway[J]. Nature, 2019, 567(7747): 262-266. DOI: 10.1038/s41586-019-1006-9.

[20] JING X G, JIANG T C, DAI L L, *et al*. Hypoxia-induced autophagy activation through NF-κB pathway regulates cell proliferation and migration to induce pulmonary vascular remodeling[J]. Exp Cell Res, 2018, 368(2): 174-183. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.04.026.

[21] SAKUMA M, TOYODA S, INOUE T, *et al*. Inflammation in

pulmonary artery hypertension[J]. Vasc Pharmacol, 2019, 118/119: 106562. DOI: 10.1016/j.vph.2019.05.002.

[22] YOU N, LI J, HUANG X, *et al*. COMMD7 activates CXCL10 production by regulating NF-κB and the production of reactive oxygen species[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 6784-6788. DOI: 10.3892/mmr.2018.8706.

[23] NOZAKI E, KOBAYASHI T, OHNISHI H, *et al*. C-X-C motif receptor 3A enhances proliferation and invasiveness of colorectal cancer cells, and is mediated by C-X-C motif ligand 10[J]. Oncol Lett, 2020, 19(3): 2495-2501. DOI: 10.3892/ol.2020.11326.

[24] WU X M, SUN A Y, YU W F, *et al*. CXCL10 mediates breast cancer tamoxifen resistance and promotes estrogen-dependent and independent proliferation[J]. Mol Cell Endocrinol, 2020, 512: 110866. DOI: 10.1016/j.mce.2020.110866.

[25] FANG J X, WANG C, SHEN C, *et al*. The expression of CXCL10/CXCR3 and effect of the axis on the function of T lymphocyte involved in oral lichen planus[J]. Inflammation, 2019, 42(3): 799-810. DOI: 10.1007/s10753-018-0934-0.

[26] WANG X K, YUE T L, OHLSTEIN E H, *et al*. Interferon-inducible protein-10 involves vascular smooth muscle cell migration, proliferation, and inflammatory response[J]. J Biol Chem, 1996, 271(39): 24286-24293. DOI: 10.1074/jbc.271.39.24286.

[27] WANG H J, ZHOU Y, LIU R M, *et al*. IP-10/CXCR3 axis promotes the proliferation of vascular smooth muscle cells through ERK1/2/CREB signaling pathway[J]. Cell Biochem Biophys, 2017, 75(1): 139-147. DOI: 10.1007/s12013-017-0782-9.

[28] XIA J B, LIU G H, CHEN Z Y, *et al*. Hypoxia/ischemia promotes CXCL10 expression in cardiac microvascular endothelial cells by NFκB activation[J]. Cytokine, 2016, 81: 63-70. DOI: 10.1016/j.cyto.2016.02.007.

[29] GEORGE P M, OLIVER E, DORFMULLER P, *et al*. Evidence for the involvement of type I interferon in pulmonary arterial hypertension[J]. Circ Res, 2014, 114(4): 677-688. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302221.

(收稿:2021-07-21;修回:2021-10-05)

(编辑 栾 嘉)