DOI:10.16016/j.1000-5404.202107145

TLR9-JNK 信号通路调控缺氧诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖

吴启建[1,3],张二龙[1,3],孙滨达[1,3],徐 刚[1,3],黄 缄[2,3],高钰琪[1,3] 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],高原生理学与病理学教研室[2],极端环境医学教育部重点实验室[3]

[**摘要**] **目的** 研究 Toll 样受体-9(toll-like receptor 9,TLR9)在缺氧诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞(rat pulmonary artery smooth muscle cells,RPASMCs)增殖中的作用及机制。**方法** 采用 MTT、Western blot、PCR 法检测 RPASMCs 的相对增殖水平、蛋白表达水平、mRNA 转录水平。①3% O_2,36 h 处理 RPASMCs,构建缺氧诱导 RPASMCs 增殖的细胞模型,检测细胞相对增殖水平、TLR9、磷酸化 c-jun 氨基末端激酶(phosphorylated c-jun N-terminal kinase,p-JNK)蛋白表达水平。②缺氧条件下分别使用小干扰 RNA 序列(small interfering RNA sequence, siRNA)或 20 μmol/L TLR9 激动剂 ODN 1826 敲低或活化 TLR9,检测 RPASMCs 的细胞增殖水平和 c-jun 氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK)磷酸化水平。③缺氧时使用 5 μmol/L JNK 抑制剂 SP600125 处理 RPASMCs,检测缺氧条件下细胞相对增殖水平。④缺氧时复合使用 20 μmol/L TLR9 激动剂 ODN 1826 和 5 μmol/L JNK 抑制剂 SP600125 处理 RPASMCs,检测 RPASMCs 的 JNK 磷酸化水平和相对增殖水平。**结果** 缺氧组 RPASMCs 的相对增殖水平[(1.30±0.07),$P<0.01$]以及 TLR9 蛋白水平[(1.70±0.22),$P<0.05$]和 JNK 磷酸化[(1.83±0.18),$P<0.01$]都显著高于常氧组。敲低 TLR9 显著抑制缺氧诱导的 RPASMC 增殖[(0.64±0.09),$P<0.01$]并减少 JNK 磷酸化[(0.49±0.01),$P<0.001$]。TLR9 激动剂显著促进 RPASMCs 增殖[(2.01±0.08),$P<0.001$]且增加 JNK 的磷酸化[(2.11±0.33),$P<0.01$]。JNK 抑制剂抑制 RPASMCs 增殖[(0.70±0.06),$P<0.05$]。与缺氧+TLR9 激动剂组相比,缺氧+TLR9 激动剂+JNK 抑制剂组 RPASMCs JNK 磷酸化[(0.82±0.14) *vs* (1.59±0.30),$P<0.001$]和相对增殖水平[(1.08±0.05) *vs* (1.35±0.02),$P<0.001$]都显著降低。**结论** 缺氧时 TLR9 通过激活 JNK 通路促进大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖。

[**关键词**] Toll 样受体-9;磷酸化 c-jun 氨基末端激酶;大鼠肺动脉平滑肌细胞;缺氧;细胞增殖
[**中图法分类号**] R332.121; R329.28; R363.22 [**文献标志码**] A

TLR9-JNK signaling pathway regulates hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells

WU Qijian[1,3], ZHANG Erlong[1,3], SUN Binda[1,3], XU Gang[1,3], HUANG Jian[2,3], GAO Yuqi[1,3] [1]Department of Medicine and Equipment for High Altitude Region, [2]Department of High Altitude Physiology and Pathology, [3]Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role and mechanism of Toll-like receptor 9 (TLR9) in hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells (RPASMCs). **Methods** MTT assay, Western blotting and PCR were adopted to measure cell proliferation level, protein and mRNA levels of following molecules in RPASMCs. ① After RPASMCs were treated with 3% O_2 for 36 h to establish a hypoxic model, the cell proliferation and expression levels of TLR9 and phosphorylated c-jun N-terminal kinase (p-JNK) were detected at the same time. ② After TLR9 was knocked down using small interfering RNA

[**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

1000-5404/Copyright © 2021, 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/)

sequence (siRNA) or activated by 20 μmol/L TLR9 agonist, ODN 1826, under hypoxia, the proliferation and p-JNK level were examined. ③RPASMCs were treated with 5 μmol/L JNK inhibitor SP600125 under hypoxia, and the proliferation was assayed. ④ Under hypoxia, 20 μmol/L ODN 1826 combined with 5 μmol/L SP600125 were administered to RPASMCs, and the proliferation and level of p-JNK were measured. **Results** The proliferation of RPASMCs (1.30±0.07, $P<0.01$) and protein levels of TLR9 (1.70±0.22, $P<0.05$) and p-JNK (1.83±0.18, $P<0.01$) were significantly higher in the hypoxia group than the normoxia group. Knock-down of TLR9 significantly inhibited hypoxia-induced proliferation of RPASMC (0.64±0.09, $P<0.01$) and reduced the JNK phosphorylation (0.49±0.01, $P<0.001$). TLR9 agonist, ODN 1826, significantly promoted the proliferation of RPASMCs (2.01±0.08, $P<0.001$) and increased JNK phosphorylation (2.11±0.33, $P<0.01$). JNK inhibitor SP600125 inhibited the proliferation (0.70±0.06, $P<0.05$). Compared with hypoxia+TLR9 agonist group, the level of p-JNK (0.82±0.14 *vs* 1.59±0.30, $P<0.001$) and cell proliferation (1.08±0.05 *vs* 1.35±0.02, $P<0.001$) were both decreased significantly in hypoxia+TLR9 agonist+JNK inhibitor group. **Conclusion** TLR9 promotes the proliferation of RPASMCs by activating the JNK pathway under hypoxia.

[**Key words**] Toll-like receptor 9; c-jun N-terminal kinase; rat pulmonary artery smooth muscle cells; hypoxia; cell proliferation

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

缺氧性肺动脉高压(hypoxic pulmonary artery hypertension,HPH)是一组由缺氧引起的肺动脉压力持续增高并伴有右心室肥大的慢性进行性疾病[1-4]。以肺远端中小动脉血管壁增厚为特征的肺血管重建是其主要的结构变化及重要的致病机理。缺氧条件下肺动脉平滑肌细胞过度增殖是肺血管重建的关键环节,在缺氧性肺动脉高压的发生、发展中起着重要作用[5-6]。因此,研究缺氧引起肺动脉平滑肌细胞增殖的机制对防治缺氧性肺动脉高压起着至关重要的作用。近年越来越多的文献报道,肺动脉高压的发生发展与炎症密切相关[7-10],肺血管周围炎症程度与肺动脉高压的血流动力学、肺血管重建和临床结果相关[11],提示缺氧条件下的炎症是缺氧性肺血管重建的关键因素;但是炎症参与缺氧性肺血管重塑的具体分子机制仍待进一步阐明。

缺氧可激活 Toll 样受体-9(toll-like receptor 9,TLR9)介导的炎症通路;亦可导致线粒体功能不足或受损,尤其是骨骼肌、心肌、脑等组织中的线粒体结构、功能受损更明显[12-14]。损伤后的线粒体释放包括线粒体 DNA 在内的多种内容物到细胞质或细胞外。线粒体 DNA 是一类重要的线粒体来源的损伤相关分子模式,含有大量与细菌 DNA 类似的未甲基化 CpG 序列,能被 TLR9 等多种受体识别,进而激活炎症通路[15]。细胞自噬溶酶体中的 TLR9 识别线粒体 DNA 后激活的炎症反应不仅参与了包括动脉粥样硬化[16]、左心衰[17]、自发性高血压[18]、非酒精性脂肪性肝炎[19]、急性肾损伤[20]、血管炎[21]在内的一系列心血管疾病的发生,还在肿瘤细胞的异常增殖中发挥重要作用。有研究[22]指出:缺氧时肝癌细胞中的 TLR9 表达增高从而促进肝癌细胞增殖。缺氧性肺动脉高压是一种缺氧条件下以肺动脉平滑肌异常增殖为关键致病机制的肺血管疾病,我们假设 TLR9 可能在其发生、发展中发挥着重要作用。因此,本研究以大鼠肺动脉平滑肌细胞(rat pulmonary artery smooth muscle cells,RPASMCs)为研究对象,通过缺氧诱导细胞增殖,应用小干扰 RNA 等技术探索 TLR9 在缺氧诱导的 RPASMCs 增殖中的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 原代 RPASMCs 购买自齐氏(上海)生物科技有限公司。胎牛血清购自美国 HyClone 公司;DMEM/F-12 培养基购自广州鼎国生物技术有限公司(GF3115),细胞冻存液购自广州赛业生物科技有限公司,PBS 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,胰蛋白酶 EDTA 消化液购自美国 HyClone 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 小干扰 RNA 序列和阴性对照(negative control,NC)序列均购自上海吉玛制药技术有限公司,TLR9 干扰序列的靶序列为 GCUCCACACGCUGCACCUUTT。Lipofectamine RNAiMAX(货号:13778 150)、Opti-MEM Ⅰ减血清培养基(货号:31985062)均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。TLR9 激动剂 CpG ODN1826 购自美国 InvivoGen 公司(货号:tlrl-1826),JNK 小分子抑制剂 SP600125(货号:

HY-12041)购自 MCE。TLR9 抗体(货号:ab62577)、JNK(货号:ab208035)、p-JNK 抗体(货号:ab76572)均购自英国 Abcam 公司;α-Tubulin(货号:2125s)抗体购自美国 CST 公司。PBS、TBS、封闭蛋白干粉购自博士德公司;细胞组织裂解液(RIPA)、PMSF、磷酸酶抑制剂、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 均购自碧云天公司;RNA 提取试剂盒(货号:R6834 02)购自美国 OMEGA 公司,反转录试剂盒和 SYBR Green 试剂购自日本 TaKaRa 公司,大鼠 TLR9 上游引物 5′-CGAGTGCTTGATGTGGGTGG-3′,下游引物 5′-TTGGAGTTCAGCGAGTGGAGA-3′,大鼠 β-actin 上游引物 5′-CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3′,下游引物 5′-ACCAGAGGCATACAGGGACAAC-3′,引物由美国 Invitrogen 公司设计合成。MTT 试剂购自碧云天公司。低氧工作站购自英国 Baker Ruskinn 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 RPASMCs 采用含 10%胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基常规培养,细胞置于常氧(体积分数 21% O_2、5% CO_2、74% N_2 的混合气体,37 ℃)培养箱中培养。每 2~3 天换液传代,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 细胞饥饿及缺氧处理 低血清饥饿培养细胞能将细胞阻滞于 G_0/G_1 期,起到同步化细胞周期的作用[23]。为更好地体现缺氧对 RPASMCs 增殖的影响,所有实验在细胞缺氧处理前均对其进行低血清饥饿处理:RPASMC 种板后,用含 10%胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基培养,待其贴壁稳定生长后换液,用含 0.2%胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基饥饿培养 12 h 后换液,用含 10%胎牛血清的 DMEM/F-12 培养基继续培养,进行后续缺氧或给药处理。3% O_2 缺氧处理:将经过相应处理后的细胞置于 3% O_2 低氧工作站(体积分数 3% O_2、5% CO_2、92% N_2 的混合气体,37℃)培养 36 h。

1.2.3 实验分组 体外培养原代 RPASMCs,常氧(21% O_2)或缺氧(3% O_2)处理 36 h,实验分组如下:①构建缺氧诱导细胞增殖模型,细胞分为 2 组:常氧组和缺氧组。以下干预实验均在细胞缺氧条件下进行。②使用 siRNA 敲低 TLR9 表达,细胞分为 2 组:si-NC(阴性对照)组和 si-TLR9 组。③给予 TLR9 激动剂 CpG ODN1826 细胞(20 μmol/L,36 h)分为 2 组:缺氧组、缺氧+TLR9 激动剂组。④采用 JNK 抑制剂 SP600125 处理细胞(5 μmol/L ,36 h)分为 2 组:缺氧组、缺氧+JNK 抑制剂组。⑤TLR9 激动剂 CpG ODN1826 复合 JNK 抑制剂 SP600125 处理 RPASMCs 分为 3 组:缺氧组、缺氧+TLR9 激动剂组(20 μmol/L CpG ODN1826,36 h)、缺氧+TLR9 激动剂+JNK 抑制剂组(20 μmol/L CpG ODN1826 + 5 μmol/L SP600125,36 h)。所有实验均独立重复 3 次。

1.2.4 荧光定量 PCR 检测 TLR9 的 mRNA 表达水平 用 RNA 提取试剂盒提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度和纯度,用总量 1 μg 的 RNA 反转录得到 cDNA 后,以 cDNA 为模板,根据 *Taq* PCR Master Mix 试剂盒说明书,在 iQ™ SYBR Green Supermix PCR 体系中进行 qPCR 反应,反应体系总体积为 10 μL。PCR 反应程序为:95 ℃预变性 3 min,95 ℃变性 10 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 60 s,共进行 39 个循环,结果选用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 TLR9 相对定量数据。实验独立重复 3 次。

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达量 收取以上各组细胞,加入适量 RIPA 强裂解液+PMSF+磷酸酶抑制剂,低温超声,离心收取细胞总蛋白,BCA 试剂盒测蛋白浓度。将总蛋白与 5×loading buffer 4∶1混匀,100 ℃变性 10 min,-80 ℃保存。每泳道取 30 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后恒压电转至 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭 1.5 h, TLR9(1∶1 000),JNK(1∶2 000),p-JNK(1∶500),α-Tubulin(1∶1 000)一抗分别与相应蛋白条带孵育,4 ℃摇床过夜,TBST 洗 3 次,10 min/次,二抗(1∶2 000)37 ℃孵育 2 h,TBST 洗 3 次,10 min/次。化学发光法显影,分析结果。实验独立重复 3 次。

1.2.6 MTT 法检测细胞活率 将细胞按每孔 3×10^3 接种于 96 孔板施加实验处理因素结束后,吸净每孔中培养基,每孔再加入 20 μL 5 mg/mL MTT 和 80 μL 培养基,继续培养 4 h,吸净孔内液体,每孔加入 150 μL DMSO,置于 37 ℃孵箱 10 min,溶解甲臜,酶标仪于 490 nm 处检测光密度值 $D(490)$。设调零孔:既无细胞也不给药的孔。设对照孔:有细胞但不给药的孔。所有组设 5 个平行复孔。细胞活率 = [$D(490)_{处理组}$ - $D(490)_{调零孔}$]/[$D(490)_{对照组}$ - $D(490)_{调零孔}$]。以细胞活率反映相对细胞相对增殖水平。实验独立重复 3 次。

1.2.7 小干扰 RNA 转染 RPASMCs 将 siRNA 配成 20 μmol/L 的工作液,以 6 孔板为例(96 孔板按比例计算),取 450 μL Opti-MEM 血清,加入 5 μL siRNA 工作液,7.5 μL Lipofectamine RNAiMAX,混匀后室温静置 10 min,然后加入细胞孔中,培养箱内继续培养 36 h 后,换液,进行后续相应处理及检测。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学分析

不同组间的细胞的相对增殖水平、蛋白相对表达量、mRNA 相对表达量均为计量资料,均以 $\bar{x}\pm s$ 表示。应用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。两组间平均数差异比较采用独立样本 t 检验,多组间差异比较采用方

差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2　结果

2.1　缺氧上调 TLR9 蛋白表达和 JNK 磷酸化水平、促进 RPASMCs 增殖

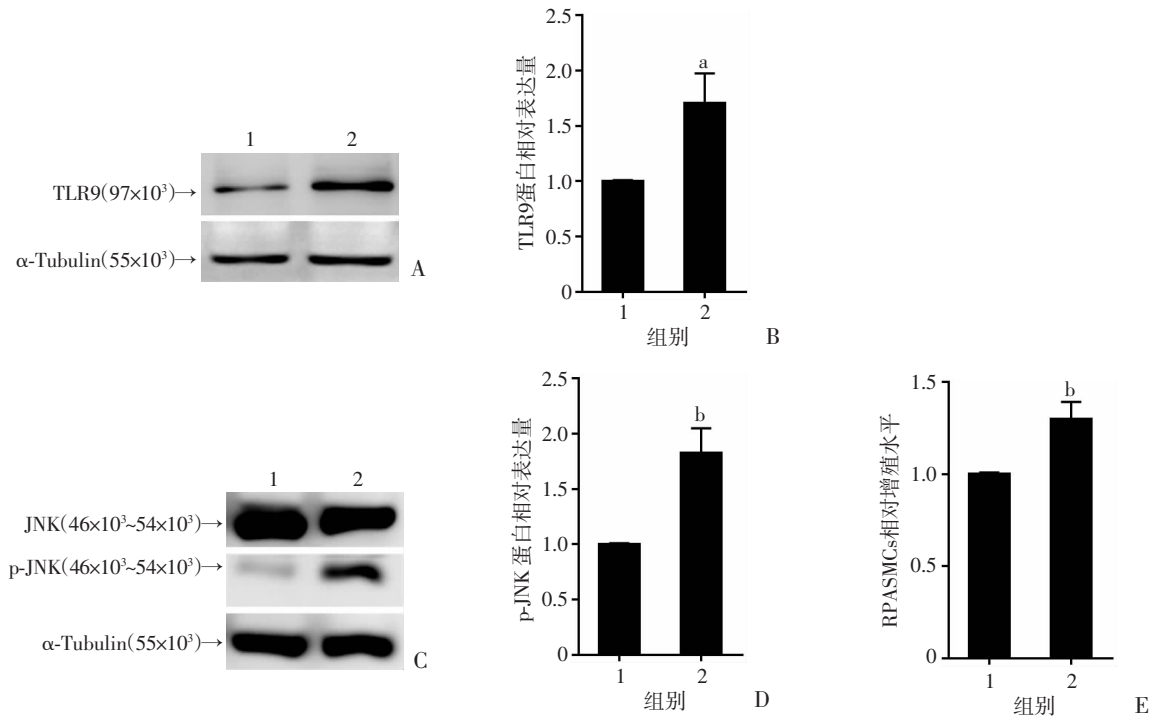
Western blot 结果显示:与常氧对照组相比,缺氧组 TLR9 蛋白的表达量显著增加(图 1A、B,$t=4.528$,$P<0.05$),JNK 磷酸化增多(图 1C、D,$t=6.416$,$P<0.01$)。MTT 结果显示,缺氧组细胞相对增殖水平显著高于常氧对照组(图 1E,$t=5.634$,$P<0.01$)。表明 3% O_2 缺氧处理 RPASMCs 36 h 能诱导其增殖,同时上调 TLR9 和 p-JNK 蛋白的表达,提示 TLR9、JNK 可能参与缺氧诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞的增殖。

2.2　敲低 TLR9 下调 JNK 磷酸化水平,抑制缺氧时 RPASMCs 的增殖

为探究 TLR9 是否参与缺氧诱导 RPASMCs 增殖,我们使用 TLR9 特异性 siRNA 下调 RPASMCs 中 TLR9 的表达,MTT 法检测下调 TLR9 对缺氧引起的细胞增殖的影响。荧光定量 PCR 结果显示,与 NC 组相比,si-TLR9 组细胞缺氧后 TLR9 mRNA 显著减少(图 2A,$t=39.21$,$P<0.001$);Western blot 结果显示,si-TLR9 显著减少细胞缺氧后 TLR9 蛋白的表达量(图 2B、C,$t=9.711$,$P<0.001$),且减少 JNK 磷酸化水平(图 2D、E,$t=55.21$,$P<0.001$);MTT 结果显示,敲低 TLR9 后,RPASMCs 增殖受到显著抑制(图 2F,$t=5.989$,$P<0.01$)。结果显示缺氧诱导的 TLR9 表达上调促进了 RPASMCs 的增殖,并且 TLR9 可正向调控 JNK 的磷酸化,但是 TLR9 是否通过 p-JNK 途径参与 RPASMCs 的增殖尚需进一步研究。

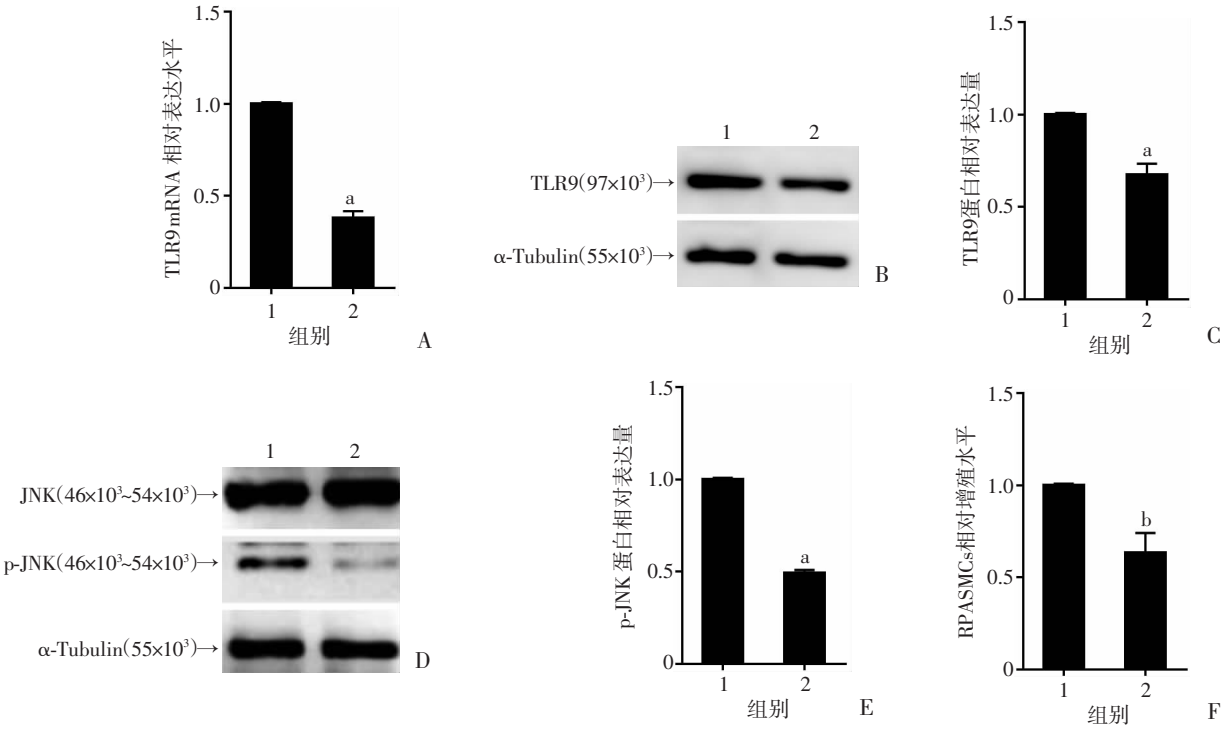
2.3　TLR9 激动剂增加 JNK 磷酸化,促进缺氧时 RPASMCs 的增殖

为进一步明确 TLR9 参与对缺氧诱导的 RPASMCs 增殖的调控,我们在 3% O_2 缺氧条件下,使用 TLR9 激动剂 CpG-ODN1826 处理 RPASMCs 36 h,检测其对细胞增殖的影响。Western blot 和 MTT 结果分别显示,与单纯缺氧对照组相比,缺氧+TLR9 激动剂组细胞中 JNK 磷酸化增加(图 3A、B,$t=4.725$,$P<0.01$),且细胞增殖显著增强(图 3C,$t=18.40$,$P<0.001$)。结果提示:TLR9 激动剂 CpG-ODN1826 增强了 TLR9 下游 JNK 的磷酸化和缺氧条件下 RPASMCs 的增殖,进一步证实了 TLR9 参与调控缺氧诱导的 RPASMCs 增殖。



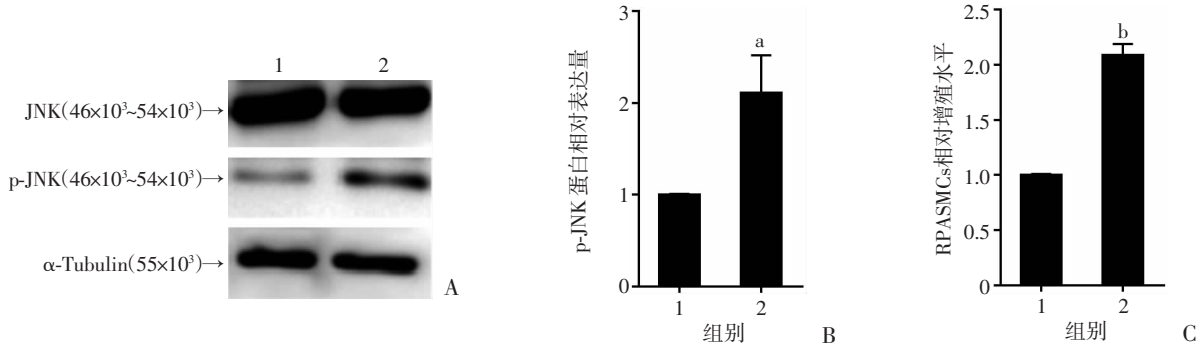
A: Western blot 检测缺氧对 TLR9 蛋白表达的影响;B:TLR9 半定量分析结果;C:Western blot 检测缺氧对 JNK 磷酸化的影响;D:p-JNK 半定量分析;E:MTT 检测两组细胞相对增殖水平　1:常氧组;2:缺氧组; a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与常氧组比较

图 1　缺氧对 RPASMCs TLR9、p-JNK 蛋白表达量和相对增殖水平的影响



A:荧光定量 PCR 检测 siRNA 对 TLR9 mRNA 水平的敲低效果;B:Western blot 检测 siRNA 对 TLR9 蛋白水平的敲低效果;C:TLR9 半定量结果;D:Western blot 检测 siRNA 敲低 TLR9 对 p-JNK 蛋白表达的影响;E:敲低 TLR9 后 p-JNK 蛋白半定量结果;F:MTT 检测敲低 TLR9 对 RPASMCs 增殖的影响 1:si-NC 组,2:si-TLR9 组;a:$P<0.001$,b:$P<0.01$,与 si-NC 组比较

图 2 siRNA 敲低 TLR9 对 RPASMCs JNK 磷酸化和相对增殖水平的影响



A:Western blot 检测 TLR9 激动剂对 JNK 磷酸化的影响;B:p-JNK 半定量结果;C:MTT 法检测两组 RPASMCs 的相对增殖水平 1:缺氧组;2:缺氧+TLR9 激动剂组;a:$P<0.01$,b:$P<0.001$,与缺氧组比较

图 3 TLR9 激动剂对 RPASMCs JNK 磷酸化和相对增殖水平的影响

2.4 JNK 抑制剂 SP600125 抑制缺氧时 RPASMCs 的增殖

为明确 TLR9 是否通过 JNK 调控缺氧 RPASMCs 的增殖,我们首先研究了 JNK 蛋白是否也参与缺氧时 RPASMCs 增殖,我们在 3% O_2 缺氧条件下使用 JNK 小分子抑制剂 SP600125 处理 RPASMCs 36 h,检测 JNK 磷酸化水平和细胞的增殖水平。结果显示:与缺氧组相比,缺氧+JNK 抑制剂组 JNK 的磷酸化减少(图 4A、B,$t=4.563$,$P<0.01$),RPASMCs 相对增殖水平降低(图 4C,$t=7.598$,$P<0.05$)。结果证明 JNK 抑制剂抑制细胞增殖,JNK 参与调控缺氧时 RPASMCs 的增殖。

2.5 JNK 抑制剂 SP6001265 抑制 TLR9 激动剂对 RPASMCs 的促增殖作用

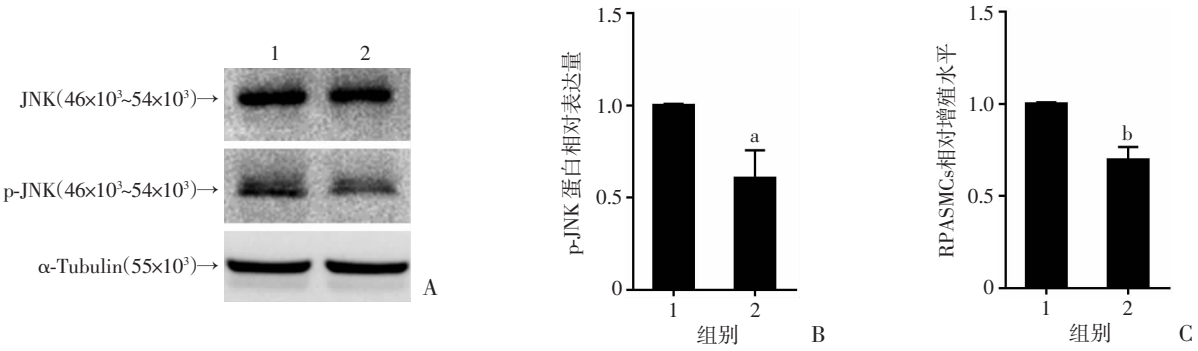
为了证明 TLR9 通过激活 JNK 来调控缺氧时 RPASMCs 的增殖,我们在 3% O_2 缺氧条件下,使用 TLR9 激动剂 CpG-ODN1826 复合 JNK 抑制剂 SP600125 处理 RPASMCs,检测细胞 JNK 磷酸化水平

和相对增殖水平。结果显示,与缺氧对照组相比,缺氧+TLR9 激动剂组细胞 JNK 磷酸化增加(图 5A、B,$q=4.393$,$P<0.05$),细胞增殖增强(图 5C,$q=14.98$,$P<0.001$),与前述实验结果一致;与缺氧+TLR9 激动剂组相比,缺氧+TLR9 激动剂+JNK 抑制剂组细胞的 p-JNK 蛋白表达量减少(图 5A、B,$q=5.742$,$P<0.05$),细胞增殖受到显著抑制(图 5C,$q=11.58$,$P<0.001$)。结果显示 JNK 抑制剂能减弱 TLR9 激动剂对细胞的促增殖作用,证明 p-JNK 作为 TLR9 的下游效应分子参与调控缺氧时 RPASMCs 的增殖,TLR9-JNK 通路参与缺氧诱导的 RPASMCs 增殖。

3　讨论

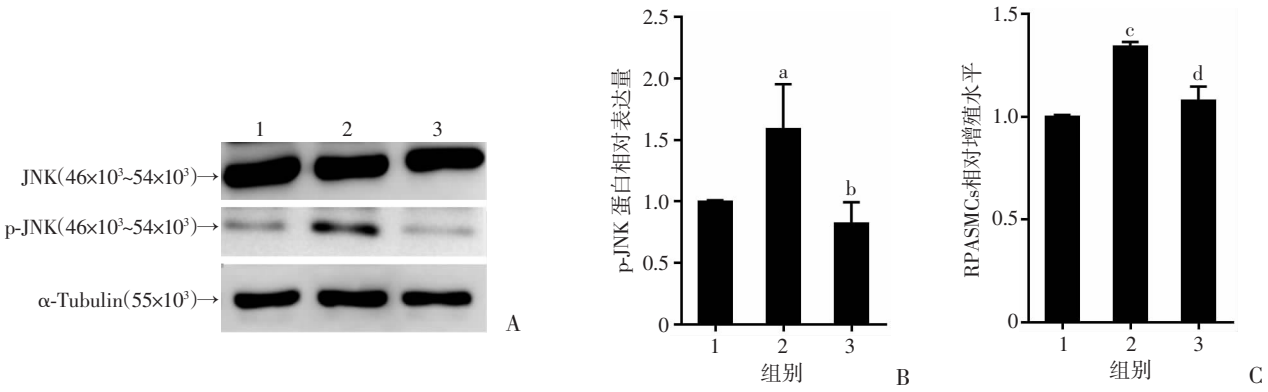
高原缺氧等恶劣环境可以引起缺氧性肺动脉高压、高原心脏病,严重威胁高原居民和官兵的生命健康。目前,缺氧性肺动脉高压尚无特效的治疗措施,其原因在于引起缺氧性肺动脉高压的分子机制尚不清楚。

多项研究报道了 TLRs 参与肺动脉高压的形成,提示 TLRs 在肺动脉高压的发生中起着重要作用。BAUER 等[24]发现 TLR4 参与慢性缺氧引起的肺动脉高压:在小鼠中敲除 TLR4,有效降低了肺动脉压力和肺血管壁厚度。另有研究报道,HMGB1/TLR4 通过抑制 BMPR2 通路促进大鼠缺氧性肺动脉高压的发生[25]。FARKAS 等[26]发现,减少 TLR3 的表达可促进内皮细胞凋亡和肺血管重构。XIAO 等[27]通过转录组学分析证实了野百合碱诱导的大鼠肺动脉高压模型中 TLR2 表达升高。另有研究表明,在利用血红蛋白诱导的肺血管内皮细胞损伤模型中,受损伤的内皮细胞中的 TLR9 激活,通过 IL-6 促进肺动脉平滑肌的增殖和迁移[28];ISHIKAWA 等[29]发现,TLR9 可通过活化 NF-κB-IL-6 通路参与野百合碱诱导的肺动脉高压的发生,抑制 TLR9 可以降低肺动脉压力、逆转肺血管周围炎症。



A:Western blot 检测 JNK 抑制剂对 JNK 磷酸化的影响;B:p-JNK 半定量结果;C:MTT 法检测两组 RPASMCs 的相对增殖水平　1:缺氧组;2:缺氧组+JNK 抑制剂组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与缺氧组比较

图 4　JNK 抑制剂对 RPASMCs JNK 磷酸化和相对增殖水平的影响



A:Western blot 检测 3 组细胞 p-JNK 蛋白表达;B:p-JNK 半定量结果;C:MTT 法检测 3 组细胞的相对增殖水平
1:缺氧组;2:缺氧+TLR9 激动剂组;3:缺氧+TLR9 激动剂+JNK 抑制剂组;a:$P<0.05$,c:$P<0.001$,与缺氧组比较;b:$P<0.05$,d:$P<0.001$,与缺氧+TLR9 激动剂组比较

图 5　TLR9 激动剂复合 JNK 抑制剂对 RPASMCs JNK 磷酸化和相对增殖水平的影响

然而 TLR9 是否参与缺氧性肺血管重塑进而参与缺氧性肺动脉高压的发生尚待阐明。本研究发现,缺氧诱导 RPASMCs 增殖的同时上调了 TLR9 的蛋白表达,下调 TLR9 表达后抑制了缺氧条件下 RPASMCs 的增殖,而使用 TLR9 激动剂活化 TLR9 后,则进一步促进缺氧诱导的平滑肌细胞增殖,实验证实了 TLR9 参与调控缺氧诱导的 RPASMCs 增殖。

JNK 又被称为应激活化蛋白激酶,是哺乳类细胞中 MAPK 信号通路的一个亚类,在细胞周期、增殖、凋亡和细胞应激等多种细胞生命活动中发挥重要作用。JNK 与肺动脉高压也有密切关系。有研究表明,JNK 和 P38 途径可促进肺动脉高压患者的肺动脉平滑肌细胞的过度增生[30];在小牛缺氧性肺动脉高压模型中,缺氧可通过 PDGFβ 受体-JNK 途径促进肺血管纤维母细胞增殖[31];DAS 等[32]的研究发现,JNK 参与了小鼠缺氧性肺动脉高压中肺血管的重构。与文献报道一致,本研究中,缺氧时,RPASMCs 增殖增加,JNK 磷酸化增加,而使用 JNK 抑制剂可减少其磷酸化,降低细胞增殖水平,证明 JNK 参与缺氧诱导 RPASMCs 增殖。

JNK 的磷酸化受到包括 TLR9 在内的多种上游分子调控。在本研究中,缺氧条件下 TLR9 蛋白以及磷酸化的 JNK 均增多,使用小干扰 RNA 敲低 TLR9,JNK 磷酸化水平降低,而使用 TLR9 激动剂活化 TLR9,JNK 磷酸化水平增高,这说明缺氧时 TLR9 可调控 JNK 磷酸化。为进一步证明 TLR9 是通过 JNK 来调控缺氧时 RPASMCs 的增殖,我们在缺氧条件下使用上游分子 TLR9 的激动剂上调 TLR9 活性的同时给予下游分子 JNK 的抑制剂处理细胞,结果提示 p-JNK 作为 TLR9 的下游效应分子参与对缺氧引起 RPASMCs 增殖的调控,以此证明了 TLR9-JNK 信号轴调控缺氧诱导 RPASMCs 增殖。但要明确 TLR9-JNK 通路在缺氧性肺血管重塑及缺氧性肺动脉高压中的作用,尚需进一步的动物实验。

总之,本研究发现 TLR9-JNK 通路正向调控缺氧引起的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖,提示 TLR9 在缺氧性肺动脉高压中发挥重要作用,为进一步深入研究 TLR9 参与缺氧性肺动脉高压发生的具体分子机制奠定了实验基础,同时也提示 TLR9 可能成为防治缺氧性肺动脉高压的新靶点。

参考文献:

[1] 高钰琪.高原军事医学[M].重庆:重庆出版社,2005:54-74.
GAO Y Q. Plateau military medicine[M]. Chongqing: Chongqing Publishing House, 2005: 54-74.

[2] HUMBERT M, GUIGNABERT C, BONNET S, *et al*. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives[J]. Eur Respir J, 2019, 53(1): 1801887. DOI:10.1183/13993003.01887-2018.

[3] THENAPPAN T, ORMISTON M L, RYAN J J, *et al*. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management[J]. BMJ, 2018, 360: j5492. DOI: 10.1136/bmj.j5492.

[4] DODSON M W, BROWN L M, ELLIOTT C G. Pulmonary arterial hypertension[J]. Heart Fail Clin, 2018, 14(3): 255-269. DOI:10.1016/j.hfc.2018.02.003.

[5] TUDER R M. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. Cell Tissue Res, 2017, 367(3): 643-649. DOI:10.1007/s00441-016-2539-y.

[6] SHIMODA L A, LAURIE S S. Vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. J Mol Med Berlin Ger, 2013, 91(3): 297-309. DOI:10.1007/s00109-013-0998-0.

[7] ULRICH S, NICOLLS M R, TARASEVICIENE L, *et al*. Increased regulatory and decreased $CD8^+$ cytotoxic T cells in the blood of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension[J]. Respiration, 2008, 75(3): 272-280. DOI:10.1159/000111548.

[8] BALABANIAN K, FOUSSAT A, DORFMULLER P, *et al*. CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(10): 1419-1425. DOI: 10.1164/rccm.2106007.

[9] ULRICH S, TARASEVICIENE-STEWART L, HUBER L C, *et al*. Peripheral blood B lymphocytes derived from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension express a different RNA pattern compared with healthy controls: a cross sectional study[J]. Respir Res, 2008, 9: 20. DOI: 10.1186/1465-9921-9-20.

[10] PERROS F, DORFMULLER P, SOUZA R, *et al*. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension[J]. Eur Respir J, 2007, 29(3): 462-468. DOI: 10.1183/09031936.00094706.

[11] STACHER E, GRAHAM B B, HUNT J M, *et al*. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(3): 261-272. DOI: 10.1164/rccm.201201-0164OC.

[12] 罗勇军, 刘福玉, 后显华, 等. 移居高原早期中性粒细胞的线粒体形态学变化[J]. 西南国防医药, 2011, 21(1): 12-14. DOI:10.3969/j.issn.1004-0188.2011.01.004.
LUO Y J, LIU F Y, HOU X H, *et al*. Early morphologic changes of neutrophil mitochondria in healthy young men after high-altitude migration[J]. Med J Natl Defending Forces Southwest China, 2011, 21(1): 12-14. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2011.01.004.

[13] 蔡明春, 柳君泽. 大鼠缺氧过程中脑线粒体超微结构变

化及形态计量学研究[J]. 高原医学杂志, 2000,10(2): 12-14, 66.
CAI M C, LIU J Z. Study on ultrastructural changes and morphometrics of brain mitochondria during hypoxia in rats [J]. J High Alt Med, 2000,10(2):12-14,66.

[14] 蔡明春, 黄庆愿, 高钰琪. 缺氧及缺氧复合运动大鼠骨骼肌线粒体功能的变化[J]. 西南国防医药, 2008, 18(4): 482-484. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2008.04.007.
CAI M C, HUANG Q Y, GAO Y Q. Effects of training in hypobaric hypoxia on rat muscle mitochondrial function[J]. Med J Natl Defending Forces Southwest China, 2008, 18(4): 482-484. DOI: 10.3969/j.issn.1004-0188.2008.04.007.

[15] BANOTH B, CASSEL S L. Mitochondria in innate immune signaling[J]. Transl Res, 2018, 202: 52-68. DOI: 10.1016/j.trsl.2018.07.014.

[16] ZHANG Z Y, MENG P, HAN Y J, *et al*. Mitochondrial DNA-LL-37 complex promotes atherosclerosis by escaping from autophagic recognition[J]. Immunity, 2015, 43(6): 1137-1147. DOI:10.1016/j.immuni.2015.10.018.

[17] 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.

[18] MCCARTHY C G, WENCESLAU C F, GOULOPOULOU S, *et al*. Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats[J]. Cardiovasc Res,2015, 107(1): 119-130. DOI: 10.1093/cvr/cvv137.

[19] GARCIA-MARTINEZ I, SANTORO N, CHEN Y, *et al*. Hepatocyte mitochondrial DNA drives nonalcoholic steatohepatitis by activation of TLR9[J]. J Clin Invest, 2016, 126(3): 859-864. DOI: 10.1172/JCI83885.

[20] HAN S J, LI H, KIM M, *et al*. Kidney proximal tubular TLR9 exacerbates ischemic acute kidney injury[J]. J Immunol,2018, 201(3): 1073-1085. DOI: 10.4049/jimmunol.1800211.

[21] HOLLE J U, WINDMOLLER M, LANGE C, *et al*. Toll-like receptor TLR2 and TLR9 ligation triggers neutrophil activation in granulomatosis with polyangiitis[J]. Rheumatology (Oxford),2013, 52(7): 1183-1189. DOI: 10.1093/rheumatology/kes415.

[22] LIU Y, YAN W, TOHME S, *et al*. Hypoxia induced HMGB1 and mitochondrial DNA interactions mediate tumor growth in hepatocellular carcinoma through Toll-like receptor 9[J]. J Hepatol,2015, 63(1): 114-121. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.02.009.

[23] TONG J J, SUN D D, YANG C, *et al*. Serum starvation and thymidine double blocking achieved efficient cell cycle synchronization and altered the expression of p27, p53, bcl-2 in canine breast cancer cells[J]. Res Vet Sci, 2016, 105: 10-14. DOI:10.1016/j.rvsc.2016.01.008.

[24] BAUER E M, SHAPIRO R, ZHENG H, *et al*. High mobility group box 1 contributes to the pathogenesis of experimental pulmonary hypertension via activation of Toll-like receptor 4[J]. Mol Med,2013, 18:1509-1518. DOI: 10.2119/molmed.2012.00283.

[25] WANG J, TIAN X T, PENG Z, *et al*. HMGB1/TLR4 promotes hypoxic pulmonary hypertension via suppressing BMPR2 signaling[J]. Vascul Pharmacol,2019, 117: 35-44. DOI: 10.1016/j.vph.2018.12.006.

[26] FARKAS D, THOMPSON A A R, BHAGWANI A R, *et al*. Toll-like receptor 3 is a therapeutic target for pulmonary hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med,2019, 199(2): 199-210. DOI: 10.1164/rccm.201707-1370OC.

[27] XIAO G, ZHUANG W, WANG T, *et al*. Transcriptomic analysis identifies Toll-like and Nod-like pathways and necroptosis in pulmonary arterial hypertension[J]. J Cell Mol Med,2020, 24(19): 11409-11421. DOI: 10.1111/jcmm.15745.

[28] LOOMIS Z, EIGENBERGER P, REDINIUS K, *et al*. Hemoglobin induced cell trauma indirectly influences endothelial TLR9 activity resulting in pulmonary vascular smooth muscle cell activation[J]. PLoS ONE, 2017, 12(2):e0171219. DOI: 10.1371/journal.pone.0171219.

[29] ISHIKAWA T, ABE K, TAKANA-ISHIKAWA M, *et al*. Chronic inhibition of Toll-Like receptor 9 ameliorates pulmonary hypertension in rats[J]. J Am Heart Assoc, 2021, 10(7): e019247. DOI: 10.1161/JAHA.120.019247.

[30] WILSON J L, YU J, TAYLOR L, *et al*. Hyperplastic growth of pulmonary artery smooth muscle cells from subjects with pulmonary arterial hypertension is activated through JNK and p38 MAPK[J]. PLoS ONE, 2015, 10(4): e0123662. DOI: 10.1371/journal.pone.0123662.

[31] PANZHINSKIY E, ZAWADA W M, STENMARK K R, *et al*. Hypoxia induces unique proliferative response in adventitial fibroblasts by activating PDGFβ receptor-JNK_1 signalling[J]. Cardiovasc Res, 2012, 95(3): 356-365. DOI:10.1093/cvr/cvs194.

[32] DAS M, ZAWADA W M, WEST J, *et al*. JNK2 regulates vascular remodeling in pulmonary hypertension[J]. Pulm Circ,2018, 8(3): 2045894018778156. DOI: 10.1177/2045894018778156.

(收稿:2021-07-23;修回:2021-09-25)
(编辑 栾 嘉)