DOI:10.16016/j.2097-0927.202111203

# DNase 2α 在缺氧诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用及机制研究

耿建慧[1,2],陈 建[1,2],张二龙[1,2],阳一栋[2,3],陈德伟[2,4],吴 刚[1,2],王 羽[1,2],赵文琦[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],高原生理学教研室[3],病理生理学教研室[4]

[摘要] **目的** 探讨 DNase 2α 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** 培养原代 RPASMCs,采用 3%$O_2$ 缺氧处理细胞构建缺氧诱导细胞增殖模型。采用小干扰 RNA(small interfering RNA sequence,siRNA)敲低 *Dnase*2a 的表达,采用质粒过表达上调细胞中 *Dnase*2a 和 *Hif*1*a* 的表达。采用外源性加入线粒体 DNA(mitochondrial DNA,mtDNA)诱导细胞增殖,使用脯氨酸羟化酶抑制剂 ROXA 作为 HIF-1α 激动剂上调细胞中 HIF-1α 的表达。采用 MTS 法检测各组细胞增殖能力,实时荧光定量 PCR 法检测 *Dnase*2a 的 mRNA 表达,Western blot 法检测 DNase 2α、增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)和细胞周期蛋白(cell cycle protein D1,Cyclin D1)的表达。**结果** 缺氧可诱导 RPASMCs 增殖,并上调 DNase 2α 的表达($P<0.05$)。siRNA 可显著降低 RPASMCs 中 *Dnase*2a 的表达($P<0.05$),并显著增强缺氧诱导的 RPASMCs 增殖($P<0.05$),同时显著上调 PCNA 和 Cyclin D1 的蛋白表达($P<0.05$)。过表达 *Dnase*2a 可显著上调 RPASMCs 中 DNase 2α 的表达($P<0.05$),并显著抑制缺氧诱导 RPASMCs 增殖($P<0.05$)。外源性加入 mtDNA 可诱导 RPASMCs 增殖,而过表达 *Dnase*2a 可显著抑制 mtDNA 诱导的 RPASMCs 增殖($P<0.05$)。过表达 *Hif*1*a* 或使用脯氨酸羟化酶抑制剂 ROXA 可显著上调 HIF-1α 表达,并显著上调 DNase 2α 的蛋白表达($P<0.05$)。**结论** DNase 2α 可抑制缺氧或线粒体 DNA 诱导的大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖,缺氧诱导的 DNase 2α 表达上调与 HIF-1α 有关。

[关键词] DNase 2α;线粒体 DNA;大鼠肺动脉平滑肌细胞;缺氧;增殖
[中图法分类号] R322.121;R345;R364.4 [文献标志码] A

# Role and mechanism of DNase 2α in hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells

GENG Jianhui[1,2], CHEN Jian[1,2], ZHANG Erlong[1,2], YANG Yidong[2,3], CHEN Dewei[2,4], WU Gang[1,2], WANG Yu[1,2], ZHAO Wenqi[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 High Altitude Physiology, [4]Department of Pathophysiology, Faculty of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To explore the role and mechanism of DNase 2α on hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells (RPASMCs). **Methods** Primary RPASMCs were cultured with 3%$O_2$ to establish a hypoxia-induced cell proliferation model. Small interference RNA (siRNA) was used to decrease the expression of *Dnase*2a, and corresponding plasmids were employed to up-regulate the expression of *Dnase*2a and *Hif*1*a*. Cell proliferation was induced by exogenous mitochondrial DNA (mtDNA). Proline hydroxylase inhibitor ROXA was adopted to enhance the expression of HIF-1α. The proliferation of

[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/)

cells in each group was detected by MTS assay, the mRNA level of *Dnase*2a was detected by qPCR, and the protein levels of DNase 2α, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and cell cycle protein D1 (Cyclin D1) were detected by Western blotting. **Results** Hypoxia induced the proliferation of RPASMCs and up-regulated the expression of DNase 2α. siRNA significantly decreased the expression of *Dnase*2a ($P<0.05$) and promoted the hypoxia-induced proliferation of RPASMCs ($P<0.05$), and the protein expression of PCNA and Cyclin D1 was up-regulated ($P<0.05$). Overexpression of *Dnase*2a up-regulated the expression of *Dnase*2a ($P<0.05$) and inhibited the proliferation of RPASMCs induced by hypoxia ($P<0.05$). Exogenous mtDNA also promoted the proliferation of RPASMCs, while, overexpression of DNase 2α inhibited the above proliferation ($P<0.05$). Overexpression of *Hif*1*a* or proline hydroxylase inhibitor ROXA could significantly up-regulate the protein expression of HIF-1α and DNase 2α ($P<0.05$). **Conclusion** DNase 2α inhibits the proliferation of RPASMCs induced by hypoxia or mtDNA, whose expression induced by hypoxia is associated with HIF-1α.

[**Key words**] DNase 2α; mitochondrial DNA; rat pulmonary artery smooth muscle 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)是一种高度恶性的心血管疾病,其特征是肺远端动脉进行性阻塞导致血管阻力增加[1]。PH 的发病机制复杂,涉及肺动脉内皮细胞功能障碍、平滑肌细胞增殖、代谢改变、表型转变和慢性炎症[2-3]。大量研究表明,缺氧可通过刺激血管中膜的平滑肌细胞增殖来诱导肺血管重构[4],因此探究缺氧诱导肺动脉平滑肌细胞增殖的分子基础及其调控机制,对肺动脉高压的防治有重要意义。

肺动脉高压患者肺血管的线粒体形态结构和代谢动力学功能出现异常,尤其是线粒体含量丰富的平滑肌细胞表现更为明显[5-7]。损伤后的线粒体释放包括线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)和甲酰肽在内的多种内容物到细胞质或细胞外,mtDNA 被认为是损伤相关模式分子(damage-associated molecular patterns, DAMPs)的重要来源,细胞质核酸异常增多或核酸酶降解能力不足时可激活相关通路,介导炎症应答,增殖/凋亡和表型转换等[8]。针对线粒体应激释放的 mtDNA,机体会启动核酸修复清除系统,DNase 2α 是由 *Dnase*2a 基因编码的酸性核酸内切酶,负责降解由内体输送的细菌 DNA 和由自噬小泡输送的 mtDNA[9]。DNase 2α 的缺失与系统性红斑狼疮样症状患者的肺动脉高压、肺部炎症性疾病和慢性关节炎等多种疾病的发生发展有关[10-13]。

我们推测,未被 DNase 2α 降解完全的 mtDNA 可以诱导平滑肌细胞的增殖。本研究拟通过 PCR、Western blot、小干扰 RNA 和质粒转染等实验技术探讨 mtDNA-DNase 2α 的平衡关系在缺氧诱导平滑肌细胞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(rat pulmonary artery smooth muscle cells, RPASMCs)购自武汉齐氏生物公司;DMEM/F12 培养基(货号:GF3115)购自重庆鼎国生物技术有限责任公司;胎牛血清购自 HyClone 公司;β-巯基乙醇购自重庆川东化工集团有限公司;反转录试剂盒和 Real-Time PCR 试剂盒、RNA 提取试剂盒(货号:R683402)购自美国 OMEGA 公司;青-链霉素、0.25%胰蛋白酶、BCA 蛋白定量试剂盒、细胞组织裂解液、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(货号:P1045)、Western blot 实验一抗稀释液(货号:P0023)、脱脂奶粉、HRP 标记山羊抗兔二抗、HRP 标记山羊抗小鼠二抗购自碧云天公司;抗 PCNA 抗体(货号:2586s)、抗 α-Tubulin 抗体(货号:2125S)购自美国 CST 公司;Lipofectamine RNAiMAX(货号:13778150)、Opti-MEM 减血清培养基(货号:31985062)、Lipofectamine 3000 转染试剂均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;质粒小提试剂盒(货号:DP103)购自 Tiangen 公司;小干扰 RNA 购自上海吉玛生物有限公司,*Dnase*2a 干扰序列:si-*Dnase*2a-1 靶序列为 GGGAUUGGCAAGCAACUAATT,si-*Dnase*2a-2 的靶序列为 GCUGGAAGGUAUCUUUGCUTT;CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay 试剂盒(货号:G3580)购自重庆荣达普麦生物技术有限公司;PBS、TBS、PMSF 购自武汉博士德公司;ROXA(货号:HY-13426)购自 MCE 公司;*Dnase*2a 过表达质粒由上海吉玛生物有限公司设计合成;低氧工作站购自英国 Baker Ruskinn 公司。

1.2 细胞培养及分组

1.2.1 细胞缺氧处理 RPASMCs 采用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基常规培养,置于常氧(体积分数 21%$O_2$、5%$CO_2$、74%$N_2$ 的混合气体)培养箱中培养。每 2~3 天换液传代,分组处理前,0.2%低血清培养基饥饿处理 24 h,同步化细胞周期,更换 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基继续培养,分别将 4 组细胞置于常氧培养箱和 3%$O_2$ 低氧工作站培养 24、48 h,标记为常氧 24 h 组、缺氧 24 h 组、常氧 48 h 组、缺氧 48 h 组。实验均独立重复 3 次。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 检测 收集各组细胞,检测 *Dnase*2a 的 mRNA 表达水平,用 RNA 提取试剂盒提取各组细胞总 RNA,按反转录试剂盒说明书反转录后得到 cDNA,避光配制反应体系,PCR 反应条件为:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s,循环 40 次,引物由 Invitrogen 公司合成,大鼠 *Dnase*2a 上游引物 5′-CCTGTGGATTGGTTCGTGG-3′,下游引物 5′-ATGTGCCCTACACCGTCTTG-3′;β-actin 上游引物 5′-CTAAGGCCAACCGTGAAAAGAT-3′,下游引物 5′-ACCAGAGGCATACAGGGACAAC-3′。实验均独立重复 3 次。

1.2.3 Western blot 法检测细胞中 DNase 2α、PCNA、Cyclin D1 蛋白的表达 收集各组的细胞,PBS 清洗后,加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液,置于冰上裂解 15 min,用细胞刮收集细胞于离心管中,冰上超声 10 s,4 ℃ 12 000×*g* 离心 10 min,转移上清于新的离心管中,BCA 法测定蛋白浓度并调整蛋白浓度一致,加入 5×loading buffer 100 ℃ 变性 10 min。采用 5%浓缩胶、10%的分离胶进行 SDS-PAGE 分离,恒压转膜(100 V,70 min),5%脱脂牛奶常温封闭 2 h,然后置于一抗稀释液稀释的 DNase 2α(1∶500)、α-Tubulin(1∶1 500)、PCNA 抗体(1∶2 000)和 Cyclin D1(1∶1 000)抗体中 4 ℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,置于 5%脱脂奶粉稀释 HRP 标记的山羊抗兔二抗(1∶2 000)、HRP 标记的山羊抗鼠二抗(1∶2 000)孵育 2 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,化学发光法曝光显影,使用 Quantity one 软件对条带进行光密度分析。实验均独立重复 3 次。

1.2.4 小干扰 RNA 转染细胞 按照 Lipofectamine RNAiMAX 转染试剂说明书进行转染,将 siRNA 配成终浓度为 20 μmol/L 的工作液,以 6 孔板为例,取 150 μL Opti-MEM 培养液,加入 5 μL siRNA 工作液混匀静止 5 min,取 150 μL Opti-MEM 加入 10 μL 的 Lipofectamine RNAiMAX 混匀静止 5 min,将二者混匀后室温静置 20 min,静置时将 6 孔板中的旧培养基弃去,更换为 2 mL 不含抗生素培养基,将上述 Lipofectamine RNAiMAX-siRNA 复合液加入 6 孔板中,轻轻晃动混匀,于常氧培养箱内继续培养 6 h 后,置于 3%$O_2$ 低氧工作站缺氧,48 h 后进行检测。干扰 *Dnase*2a 表达分为 3 组:si-*Dnase*2a-NC 组、si-*Dnase*2a-1 组、si-*Dnase*2a-2 组。实验均独立重复 3 次。

1.2.5 过表达质粒转染细胞 由上海吉玛生物公司设计针对 *Dnase*2a、*Hif*1*a* 的过表达质粒,另设非靶向质粒作为对照,根据制造商的说明使用 Lipofectamine 3000 转染试剂进行质粒转染。以 6 孔板为例,待细胞接种贴壁后,将 125 μL Opti-MEM 培养基分别与 6 μL Lipofectamine 3000,2 μg 质粒 DNA,4 μL p3000 混匀后,于室温下静置 20 min,转染时培养基不含抗生素,48 h 后进行检测。过表达 *Dnase*2a 分为 2 组:缺氧 48 h+pcDNA 组、缺氧 48 h+过表达 *Dnase*2a 组;过表达 *Hif*1*a* 分为 2 组:pcDNA 组、过表达 *Hif*1*a* 组。实验均独立重复 3 次。

1.2.6 MTS 法测定细胞增殖 胰酶消化细胞后,吹打成单细胞悬液状态,细胞以 $3\times10^3$ 个/孔接种在 96 孔板,分组处理后,避光条件下每孔加入 20 μL MTS 和 100 μL PBS,继续培养 2~4 h,酶标仪测定波长 490 nm 处各孔光密度值[*D*(490)]。实验均独立重复 3 次。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析,使用 GraphPad Prism 6.0 作图,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间差异比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

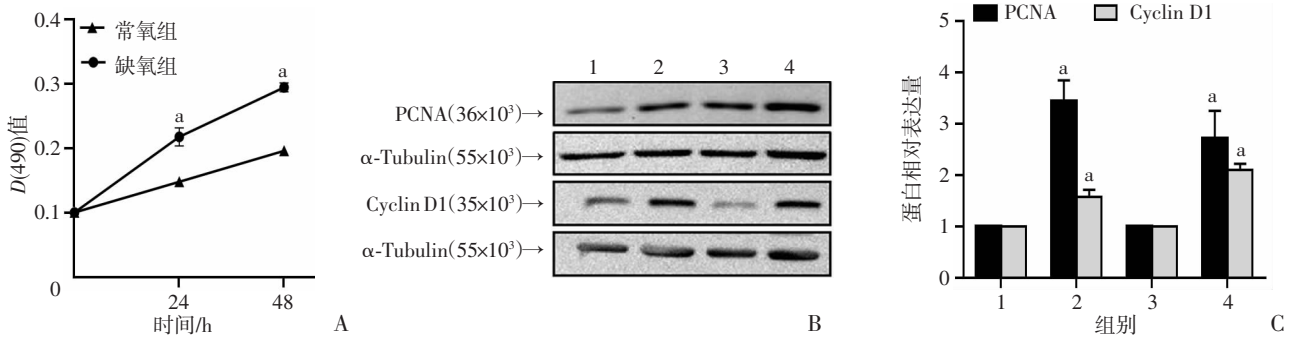
## 2 结果

2.1 缺氧 24、48 h 可诱导原代大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖

3%$O_2$ 缺氧处理 RPASMCs 24、48 h,MTS 实验结果显示,缺氧 24、48 h 组细胞增殖能力高于常氧各对应时间点组($P<0.05$,图 1A)。与常氧各对应时间点组相比,缺氧 24、48 h 组 RPASMCs 内 PCNA 蛋白和 Cyclin D1 蛋白的表达量均显著增加($P<0.05$,图 1B、C),表明缺氧 24、48 h 可诱导 RPASMCs 增殖。

2.2 缺氧 24、48 h 显著上调 RPASMCs 的 DNase 2α 蛋白表达

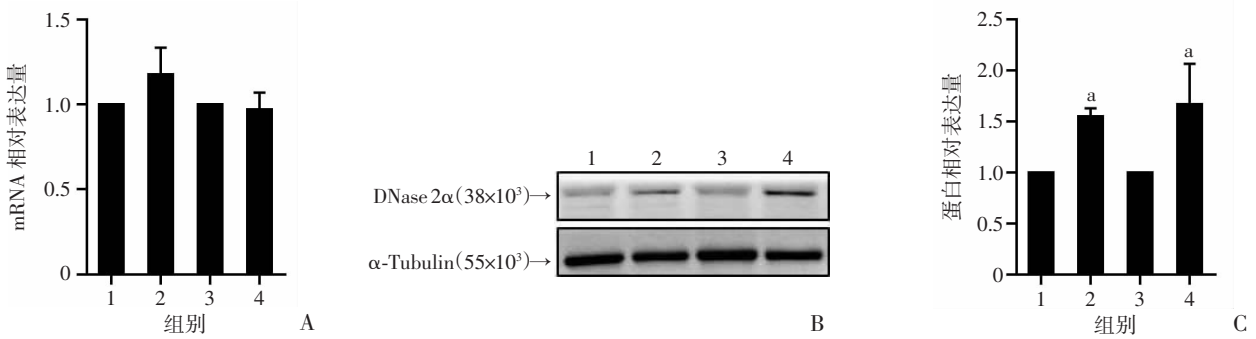
为了探究 DNase 2α 在缺氧诱导平滑肌细胞增殖中的变化,3%$O_2$ 缺氧处理细胞 24、48 h,采用实时荧光定量 PCR 法检测 *Dnase*2a mRNA 水平变化,Western blot 法检测 DNase 2α 蛋白表达变化。与常氧各对应时间点组相比,缺氧 24、48 h 组 *Dnase*2a mRNA 的表达量变化无统计学差异(图 2A),DNase 2α 蛋白表达量显著增加($P<0.05$,图 2B、C)。




a:$P<0.05$,与常氧组各对应时间点比较

A:MTS 法检测各组细胞增殖能力;B:Western blot 法检测各组细胞 PCNA、Cyclin D1 蛋白表达;C:PCNA、Cyclin D1 蛋白定量结果;1:常氧 24 h 组;2:缺氧 24 h 组;3:常氧 48 h 组;4:缺氧 48 h 组

**图 1 不同缺氧时长对 RPASMCs 增殖能力的影响** ($n=3,\bar{x}\pm s$)




A:实时荧光定量 PCR 法检测缺氧对 *Dnase*2a 的 mRNA 表达影响;B:Western blot 法检测各组细胞 DNase 2α 蛋白表达;C:DNase 2α 蛋白定量分析;1:常氧 24 h 组;2:缺氧 24 h 组;3:常氧 48 h 组;4:缺氧 48 h 组;a:$P<0.05$,与常氧组各对应时间点比较

**图 2 不同缺氧时长对 RPASMCs 的 *Dnase*2a 表达的影响** ($n=3,\bar{x}\pm s$)

### 2.3 敲低 *Dnase*2a 显著增强缺氧诱导的 RPASMCs 增殖

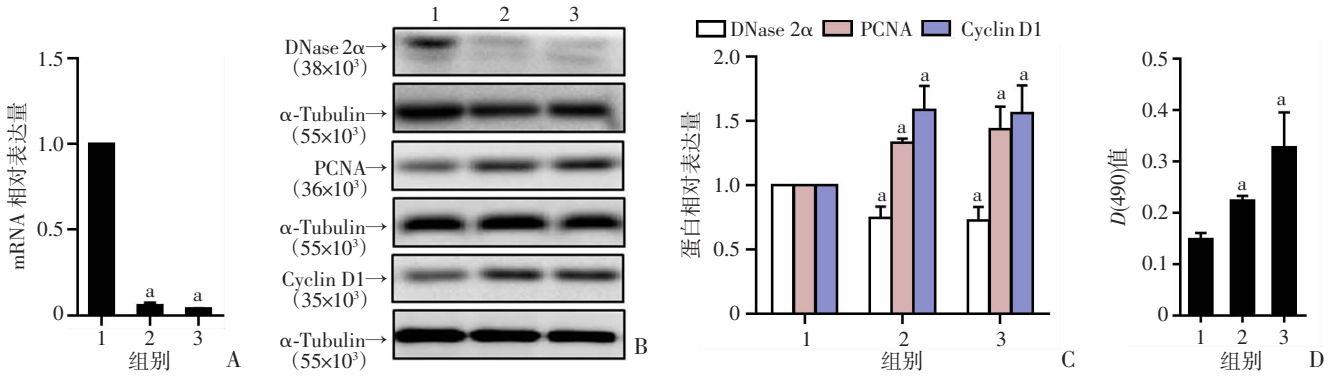
为探究 DNase 2α 在缺氧诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖中的作用,使用 *Dnase*2a 特异性 siRNA 在 3% 缺氧条件下下调 RPASMCs 中 *Dnase*2a 的表达。结果显示,与 si-*Dnase*2a-NC 组相比,si-*Dnase*2a-1 组和 si-*Dnase*2a-2 组细胞 *Dnase*2a mRNA 显著减少($P<0.05$,图 3A),DNase 2α 蛋白表达量显著减少($P<0.05$),PCNA 和 Cyclin D1 蛋白表达上调($P<0.05$,图 3B、C);MTS 结果显示,与 si-*Dnase*2a-NC 组相比,si-*Dnase*2a-1 组和 si-*Dnase*2a-2 组细胞增殖能力上调($P<0.05$,图 3D)。上述结果表明,缺氧下敲低 *Dnase*2a,可显著增强缺氧诱导的 RPASMCs 增殖。

### 2.4 过表达 *Dnase*2a 显著抑制缺氧诱导的 RPASMCs 增殖

为进一步明确 DNase 2α 在缺氧诱导的 RPASMCs 增殖中的作用,使用质粒过表达 *Dnase*2a,在 3%$O_2$ 缺氧条件下上调 *Dnase*2a 的表达。结果显示,与缺氧 48 h+pcDNA 组相比,缺氧 48 h+过表达 *Dnase*2a 组 *Dnase*2a mRNA 表达量显著增加($P<0.05$,图 4A),DNase 2α 蛋白的表达量显著增加($P<0.05$),PCNA 蛋白和 Cyclin D1 蛋白表达下调($P<0.05$,图 4B、C);MTS 结果显示:与缺氧 48 h+pcDNA 组相比,缺氧 48 h+过表达 *Dnase*2a 组 RPASMCs 增殖受到显著抑制($P<0.05$,图 4D)。结果表明,缺氧条件下使用质粒过表达 *Dnase*2a 后,可抑制缺氧诱导的 RPASMCs 增殖。

### 2.5 外源性线粒体 DNA 可诱导 RPASMCs 的增殖

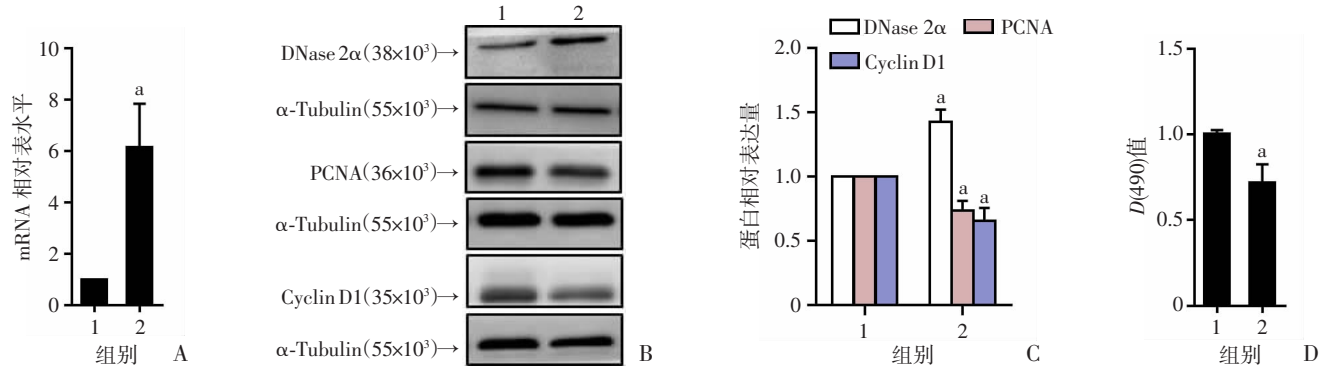
为模拟缺氧诱导 RPASMCs 增殖中 mtDNA-DNase 2α 失衡状态,使用浓度为 30 ng/μL 外源性线粒体 DNA 处理 RPASMCs 48 h,检测其对 DNase 2α 蛋白表达量和细胞增殖能力的影响。Western blot 和 MTS 结果分别显示,与对照组相比,线粒体 DNA 组的 DNase 2α 蛋白表达量未发生明显变化(图 5A、B),细胞增殖能力增强($P<0.05$,图 5C),PCNA 蛋白和 Cyclin D1 蛋白表达量上调($P<0.05$,图 5A、B)。结果提示:外源性线粒体 DNA 可诱导 RPASMCs 的增殖。




1:si-*Dnase*2a-NC 组;2:si-*Dnase*2a-1 组;3:si-*Dnase*2a-2 组; a:$P<0.05$,与 si-*Dnase*2a-NC 组比较

A:实时荧光定量 PCR 法检测 siRNA 干扰 *Dnase*2a 的效率;B:Western blot 法检测干扰 *Dnase*2a 对 PCNA、Cyclin D1 蛋白表达的影响;C:DNase 2α、PCNA、Cyclin D1 蛋白定量结果;D:MTS 法检测干扰 *Dnase*2a 对细胞增殖的影响

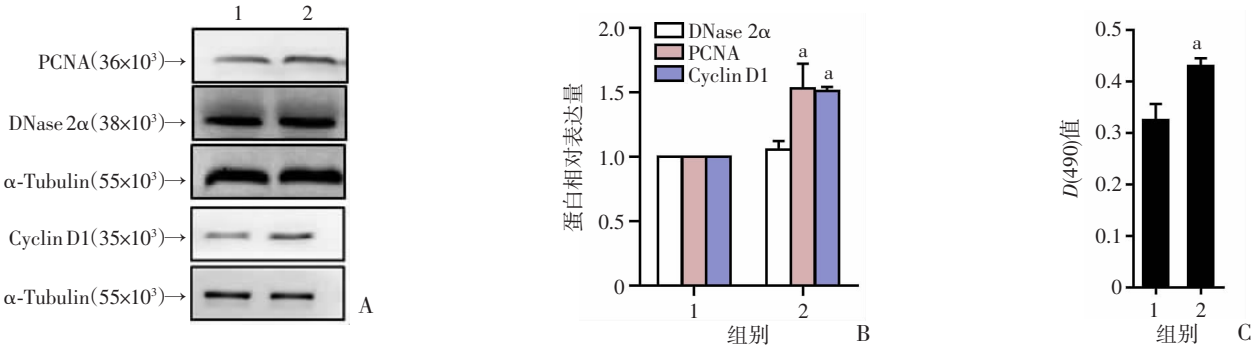
**图 3　干扰 *Dnase*2a 基因对 RPASMCs 增殖能力的影响**　($n=3,\bar{x}\pm s$)




1:缺氧 48 h+pcDNA 组;2:缺氧 48 h+过表达 *Dnase*2a 组;a:$P<0.05$,与缺氧 48 h+pcDNA 组比较

A:实时荧光定量 PCR 法检测质粒过表达 *Dnase*2a 的效率;B:Western blot 法检测质粒过表达 *Dnase*2a 对 PCNA、Cyclin D1 表达的影响;C:DNase 2α、PCNA、Cyclin D1 蛋白定量结果;D:MTS 法检测过表达 *Dnase*2a 对细胞增殖的影响

**图 4　过表达 *Dnase*2a 对 RPASMCs 增殖能力的影响**　($n=3,\bar{x}\pm s$)




1:对照组;2:线粒体 DNA 组;a:$P<0.05$,与对照组比较

A:Western blot 法检测线粒体 DNA 对 DNase 2α、PCNA、Cyclin D1 蛋白表达的影响;B:DNase 2α、PCNA、Cyclin D1 蛋白定量结果;C:MTS 法检测线粒体 DNA 对细胞增殖的影响

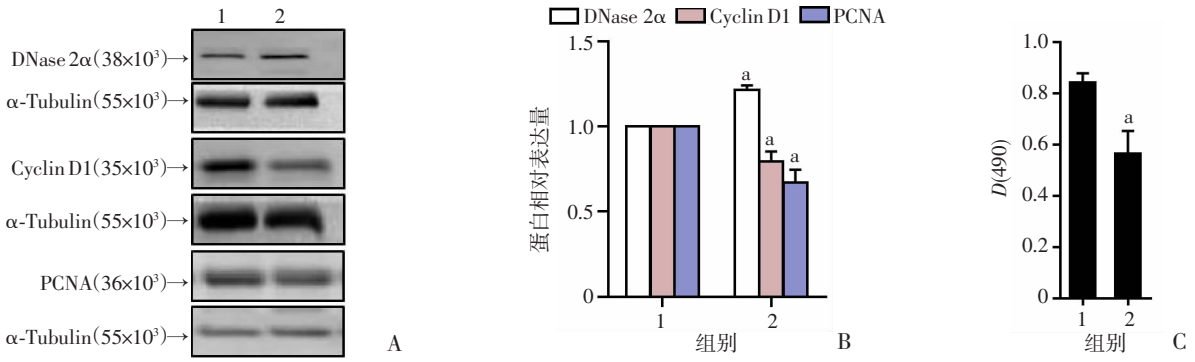
**图 5　线粒体 DNA 对 DNase 2α 蛋白表达量和 RPASMCs 增殖的影响**　($n=3,\bar{x}\pm s$)

### 2.6 过表达 *Dnase*2a 可抑制外源性线粒体 DNA 诱导的 RPASMCs 增殖

为探讨 DNase 2α 在外源性线粒体 DNA 诱导 RPASMCs 增殖中的作用,使用质粒过表达 *Dnase*2a 后,再使用浓度为 30 ng/μL 的外源性线粒体 DNA 处理 RPASMCs 48 h,检测 DNase 2α 蛋白表达量和细胞增殖能力。Western blot 和 MTS 结果分别显示,与线粒体 DNA+pcDNA 组相比,线粒体 DNA+过表达 *Dnase*2a 组 DNase 2α 蛋白表达量显著上调($P<0.05$,图 6A、B),细胞增殖受到抑制($P<0.05$,图 6C),PCNA 蛋白和 Cyclin D1 蛋白表达量下调($P<0.05$,图 6A、B)。结果提示:过表达 *Dnase*2a 可抑制外源性线粒体 DNA 诱导的 RPASMCs 的增殖,表明 DNase 2α-mtDNA 的平衡在维持 RPASMCs 正常生长状态中发挥着重要作用。

### 2.7 缺氧诱导的 DNase 2α 表达上调依赖 HIF-1α

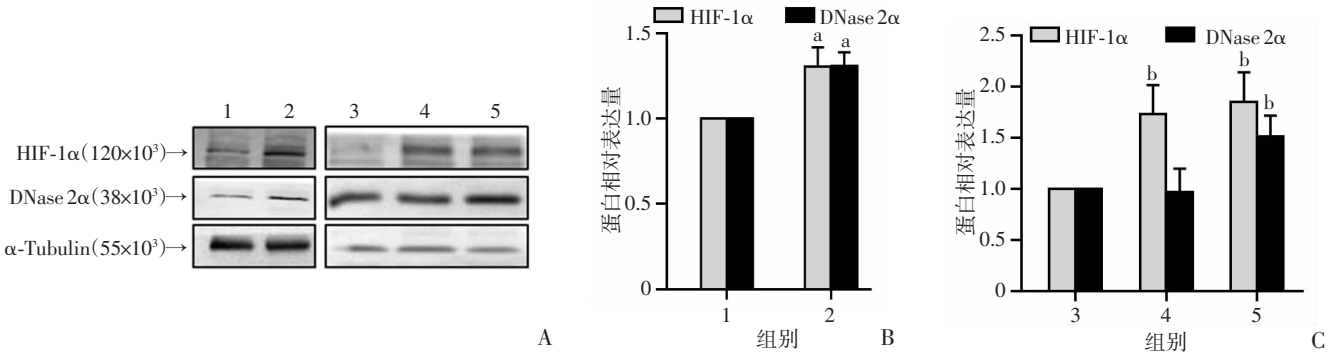
由于在外源性线粒体 DNA 诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖模型中,未能模拟出 DNase 2α 蛋白在缺氧条件表达被上调的现象,为进一步明确 DNase 2α 如何在缺氧条件下被上调,在常氧条件下使用 *Hif*1*a* 过表达质粒和浓度为 10、20 nmol/L 的 ROXA(脯氨酸羟化酶抑制剂)处理 RPASMCs 48 h,检测其对 DNase 2α 蛋白表达量的影响。结果显示,与 pcDNA 组相比,过表达 *Hif*1*a* 组 HIF-1α 的蛋白表达量显著增加($P<0.05$),DNase 2α 蛋白表达量也显著增加($P<0.05$,图 7A、B)。与 DMSO 组相比,浓度为 20 nmol/L 的 ROXA 处理组细胞中 HIF-1α 蛋白表达量显著增加($P<0.05$),DNase 2α 蛋白表达量也显著增加($P<0.05$,图 7A、C)。结果提示:缺氧诱导的 DNase 2α 蛋白表达上调可能依赖于 HIF-1α。




1:线粒体 DNA+pcDNA 组;2:线粒体 DNA+过表达 *Dnase*2a 组; a:$P<0.05$,与线粒体 DNA+pcDNA 组比较

A:Western blot 法检测蛋白表达水平;B:DNase 2α、PCNA、Cyclin D1 蛋白定量结果;C:MTS 法检测细胞增殖

**图 6 过表达 *Dnase*2a 对线粒体 DNA 诱导 RPASMCs 增殖的影响** ($n=3,\bar{x}\pm s$)




1:pcDNA 组;2:过表达 *Hif*1*a* 组;3:DMSO 组;4:ROXA 10 nmol/L 组;5:ROXA 20 nmol/L 组; a:$P<0.05$,与 pcDNA 组比较; b:$P<0.05$,与 DMSO 组比较

A:Western blot 法检测蛋白表达水平;B、C:HIF-1α、DNase 2α 蛋白定量结果

**图 7 上调 HIF-1α 对 DNase 2α 蛋白表达量的影响** ($n=3,\bar{x}\pm s$)

## 3 讨论

肺动脉高压是指肺小动脉阻塞、狭窄,肺血管阻力增加,导致右心室肥厚并最终衰竭的综合征,其中缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞过度增殖是肺血管改建的中心环节。有研究指出,肺动脉高压患者的血管平滑肌细胞常常出现线粒体破裂[14],破裂的线粒体释放包括mtDNA和甲酰肽在内的多种内容物到细胞质或细胞外[15],DNase 2α负责降解mtDNA来维持细胞内核酸含量的稳态平衡,因此我们推测DNase 2α与mtDNA的平衡关系可能在缺氧诱导RPASMCs增殖中发挥独特的作用。

### 3.1 DNase 2α在缺氧诱导RPASMCs增殖中的变化

本研究结果表明,缺氧在诱导RPASMCs增殖的同时也上调了DNase 2α的表达。与此一致,急性心肌梗死患者和缺血性心脏病患者的DNase表达增加,提示缺血缺氧可上调DNase表达[16]。进一步探讨DNase 2α在缺氧情况下是如何被上调的,LIU等[17]发现缺氧是以HIF-1α依赖的方式上调人眼睑上皮细胞中DNase 2α的表达。通常情况下,缺血缺氧可促进转录因子HIF-1α不断累积,与HIF-1β结合形成复合物,进而与缺氧反应基因上的缺氧反应元件结合,来调节细胞能量代谢、增殖和凋亡等相关基因的表达。同时本研究结果也显示,质粒过表达HIF-1α或使用脯氨酸羟化酶抑制剂后,DNase 2α的蛋白表达量也会相应增加,但是mRNA没有发生显著增加,提示HIF-1α对DNase 2α的表达调控不是依赖转录调节,而可能是在转录后或翻译水平实现调控的。

### 3.2 DNase 2α在缺氧诱导RPASMCs增殖中的调控作用

为了进一步探讨DNase 2α在缺氧诱导RPASMCs增殖中的作用,在敲低DNase 2α后,发现细胞增殖能力增强,过表达DNase 2α则会抑制缺氧诱导的细胞增殖,说明DNase 2α在缺氧诱导肺动脉平滑肌细胞增殖中起着保护作用。相关研究显示,恶性胃癌、结肠癌、胰腺癌、肝癌以及恶性淋巴瘤患者的DNase含量较低[18-20],说明DNase的含量或者活性的相对不足可能与肿瘤细胞的异常增殖状态有关,特别是DAOUST等[18]在从60多种不同类型的肿瘤中提取的分离细胞显示出DNase活性不足。这与DNase抑制肿瘤细胞的增殖,DNase 1可增强肺微血管中的肿瘤细胞生长阻滞等研究一致[21],支持了DNase 2α可以影响缺氧诱导的RPASMCs增殖。既往研究表明,重组人DNase可以通过降解DNA减缓炎症反应来治疗气管插管哮喘患者、难治性治疗哮喘、阻塞性肺疾病等慢性肺疾病和狼疮性肾炎[22-23],提示DNase 2α有望成为抑制缺氧诱导肺动脉平滑肌细胞增殖新的防治靶点,作为药物来防治肺动脉高压[24]。

### 3.3 DNase 2α在调控缺氧诱导RPASMCs增殖中的机制

关于DNase 2α在缺氧诱导RPASMCs增殖中的机制研究较少,OKA等[25]在心力衰竭的小鼠模型观察到,心肌肥厚与DNase 2α的表达减少和细胞质内mtDNA的增加有关,DNase 2α的表达上调后可以改善心肌重构。缺氧能使线粒体呼吸传递链功能的失衡,导致ROS的短暂积累,损害mtDNA,这些受损基因的表达导致故障蛋白的合成、活性氧的进一步积累,甚至对mtDNA造成更大的损伤,进而导致故障蛋白的合成和活性氧的进一步过量产生,这种状态被称为“线粒体恶性循环”,这也是缺氧使细胞内损伤mtDNA生成过量的原因[26]。以上研究提示,DNase 2α-mtDNA的平衡关系可能影响了缺氧诱导的RPASMCs增殖。为了进一步探讨我们的猜想,通过加入外源性mtDNA来模拟这一失衡状态,研究结果显示,mtDNA能诱导RPASMCs的增殖,这与mtDNA可引起肝癌细胞增殖的研究一致[27],过表达DNase 2α可抑制mtDNA诱导的平滑肌细胞增殖,可能的相关机制是损伤后的线粒体把mtDNA释放到细胞质或细胞外,mtDNA含有大量与细菌类似的未甲基化CpG序列,激活TLR9等受体[28]介导的信号途径,通过p38-MAPK和NF-κB等途径,诱导活化中性粒细胞和单核巨噬细胞,引起炎症细胞因子释放增加、粘附分子表达上调,引发严重的炎症反应[29]。进入细胞浆中的mtDNA还可以通过细胞质内DNA感受器cGAS-STING-TBK1-IRF3增加干扰素的表达或自噬信号通路,激活免疫炎症反应,引起细胞增殖效应[30-32]。

综上所述,本研究发现mtDNA-DNase 2α之间的平衡关系会影响RPASMCs增殖。缺氧可引起平滑肌细胞中受损的mtDNA增加,同时也可上调DNase 2α的表达,当DNase 2α不足以清除受损的mtDNA时即可引起细胞增殖效应,而过表达DNase 2α来增强对mtDNA的降解,可抑制缺氧或mtDNA诱导的平滑肌细胞的增殖,这一研究结果有望为缺氧性肺动脉高压的防治提供新的治疗靶点。

**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] RYAN J J, ARCHER S L. Emerging concepts in the molecular basis of pulmonary arterial hypertension: part I: metabolic plasticity and mitochondrial dynamics in the pulmonary circulation and right ventricle in pulmonary arterial hypertension [J]. Circulation, 2015, 131(19): 1691-1702. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.006979.

[3] TROMBETTA A, GHIRARDO S, PASTORE S, *et al*. Pulmonary arterial hypertension in interferonophaties: a case report and a review of the literature[J]. Pulm Circ, 2019, 9(3): 2045894019869837. DOI: 10.1177/2045894019869837.

[4] GIBBONS G H, DZAU V J. The emerging concept of vascular remodeling[J]. N Engl J Med, 1994, 330(20): 1431-1438. DOI: 10.1056/NEJM199405193302008.

[5] FUHRMANND C, BRÜNE B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia[J]. Redox Biol, 2017, 12: 208-215. DOI: 10.1016/j.redox.2017.02.012.

[6] RYAN J, DASGUPTA A, HUSTON J, *et al*. Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension[J]. J Mol Med (Berl), 2015, 93(3): 229-242. DOI: 10.1007/s00109-015-1263-5.

[7] ZHUAN B, WANG X, WANG M D, *et al*. Hypoxia induces pulmonary artery smooth muscle dysfunction through mitochondrial fragmentation-mediated endoplasmic reticulum stress [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(23): 23684-23697. DOI: 10.18632/aging.103892.

[8] RILEY J S, TAIT S W. Mitochondrial DNA in inflammation and immunity[J]. EMBO Rep, 2020, 21(4): e49799. DOI: 10.15252/embr.201949799.

[9] EVANS C J, AGUILERA R J. DNase Ⅱ: genes, enzymes and function[J]. Gene, 2003, 322: 1-15. DOI: 10.1016/j.gene.2003.08.022.

[10] RANCHOUX B, MELOCHE J, PAULIN R, *et al*. DNA damage and pulmonary hypertension[J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(6): E990. DOI: 10.3390/ijms17060990.

[11] BRYANT A J, PHAM A, GOGOI H, *et al*. The Third Man: DNA sensing as espionage in pulmonary vascular health and disease [J]. Pulm Circ, 2021, 11(1): 2045894021996574. DOI: 10.1177/2045894021996574.

[12] KAWANE K, TANAKA H, KITAHARA Y, *et al*. Cytokine-dependent but acquired immunity-independent arthritis caused by DNA escaped from degradation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(45): 19432-19437. DOI: 10.1073/pnas.1010603107.

[13] RODERO M P, TESSER A, BARTOK E, *et al*. Type Ⅰ interferon-mediated autoinflammation due to DNase Ⅱ deficiency[J]. Nat Commun, 2017, 8(1): 2176. DOI: 10.1038/s41467-017-01932-3.

[14] MARSBOOM G, TOTH P T, RYAN J J, *et al*. Dynamin-related protein 1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension [J]. Circ Res, 2012, 110(11): 1484-1497. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.263848.

[15] BHANSALI S, SOHI K, DHAWAN V. Hypoxia-induced mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) differentially regulates smooth muscle cell (SMC) proliferation of pulmonary and systemic vasculature[J]. Mitochondrion, 2021, 57: 97-107. DOI: 10.1016/j.mito.2020.11.012.

[16] FUJIBAYASHI K, KAWAI Y, KITAYAMA M, *et al*. Serum deoxyribonuclease I activity can be a useful diagnostic marker for the early diagnosis of unstable angina pectoris or non-ST-segment elevation myocardial infarction[J]. J Cardiol, 2012, 59(3): 258-265. DOI: 10.1016/j.jjcc.2012.01.005.

[17] LIU Y, WANG J Y, CHEN D, *et al*. The role of hypoxia-inducible factor 1α in the regulation of human meibomian gland epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2020, 61(3): 1. DOI: 10.1167/iovs.61.3.1.

[18] DAOUST R, AMANO H. Ribonuclease and deoxyribonuclease activites in experimental and human tumors by the histochemical substrate film method[J]. Cancer Res, 1963, 23: 131-134.

[19] GOLONKA R M, YEOH B S, PETRICK J L, *et al*. Deoxyribonuclease I activity, cell-free DNA, and risk of liver cancer in a prospective cohort[J]. JNCI Cancer Spectr, 2018, 2(4): pky083. DOI: 10.1093/jncics/pky083.

[20] FUNAKOSHI A, KIMURA T, WAKASUGI H, *et al*. Clinical investigation of serum deoxyribonuclease: I. Analysis of serum deoxyribonuclease activity in comparison with normal and after endoscopic retrograde pancreatography[J]. Gastroenterol Jpn, 1979, 14(5): 432-435. DOI: 10.1007/BF02773730.

[21] LAUKOVÁ L, KONEČNÁ B, JANOVIČOVÁ L, *et al*. Deoxyribonucleases and their applications in biomedicine [J]. Biomolecules, 2020, 10(7): 1036. DOI: 10.3390/biom10071036.

[22] DURWARD A, FORTE V, SHEMIE S D. Resolution of mucus plugging and atelectasis after intratracheal rhDNase therapy in a mechanically ventilated child with refractory status asthmaticus[J]. Crit Care Med, 2000, 28(2): 560-562. DOI: 10.1097/00003246-200002000-00045.

[23] SILVERMAN R A, FOLEY F, DALIPI R, *et al*. The use of rhDNAse in severely ill, non-intubated adult asthmatics

refractory to bronchodilators: a pilot study[J]. Respir Med, 2012, 106(8): 1096-1102. DOI: 10.1016/j.rmed.2012.04.002.

[24] YASUDA T, KAWAI Y, UEKI M, *et al*. Clinical applications of DNase I, a genetic marker already used for forensic identification[J]. Leg Med (Tokyo), 2005, 7(4): 274-277. DOI: 10.1016/j.legalmed.2004.10.008.

[25] 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.

[26] KAARNIRANTA K, PAWLOWSKA E, SZCZEPANSKA J, *et al*. Role of mitochondrial DNA damage in ROS-mediated pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD)[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(10): E2374. DOI: 10.3390/ijms20102374.

[27] 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.

[28] 吴启建, 张二龙, 孙滨达, 等. TLR9-JNK 信号通路调控缺氧诱导大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(21): 2350-2357. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202107145.
WU Q J, ZHANG E L, SUN B D, *et al*. TLR9-JNK signaling pathway regulates hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells[J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(21): 2350-2357. DOI: 10.16016/j.1000-5404.202107145.

[29] LAN Y Y, HEATHER J M, EISENHAURE T, *et al*. Extranuclear DNA accumulates in aged cells and contributes to senescence and inflammation[J]. Aging Cell, 2019, 18(2): e12901. DOI: 10.1111/acel.12901.

[30] CHAN M P, ONJI M, FUKUI R, *et al*. DNase Ⅱ-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9[J]. Nat Commun, 2015, 6: 5853. DOI: 10.1038/ncomms6853.

[31] BAUM R, SHARMA S, CARPENTER S, *et al*. Cutting edge: AIM2 and endosomal TLRs differentially regulate arthritis and autoantibody production in DNase Ⅱ-deficient mice[J]. J Immunol, 2015, 194(3): 873-877. DOI: 10.4049/jimmunol.1402573.

[32] 韦汉南, 陈德伟, 张二龙, 等. 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[J]. 陆军军医大学学报, 2022, 44(2): 117-124. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202107134.
WEI H N, CHEN D W, ZHANG E L, *et al*. Hypoxia-induced mitochondrial DNA release promotes proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells *via* activating cGAS-STING pathway[J]. J Army Med Univ, 2022, 44(2): 117-124. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202107134.

(**收稿**:2021-11-28;**修回**:2022-01-17)

(编辑 栾 嘉)