

缺氧性肺动脉高压大鼠肺组织丝裂原活化蛋白激酶、磷酸肌醇 3-激酶和缺氧诱导因子 2 α 表达的变化

孔春初,戴爱国

(湖南省老年医院 湖南省老年医学研究所呼吸疾病研究室,湖南 长沙 410001)

摘要: **目的** 探讨大鼠低氧性肺动脉高压(HPH)形成过程中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、磷酸肌醇 3-激酶(PI3K)和缺氧诱导因子 2 α (HIF-2 α)表达的变化。 **方法** 40 只成年雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组和低氧 3 天、7 天、14 天、21 天组(H3、H7、H14、H21 组),每组 8 只,低氧组复制 HPH 大鼠模型。测各组大鼠平均肺动脉压(mPAP)、右心室肥大指数(RVHI)、管壁面积与血管总面积比值(WA%)、管腔面积与血管总面积比值(LA%);免疫组织化学或 Western blot 检测磷酸化 ERK(p-ERK)、磷酸化 JNK(p-JNK)、磷酸化 P38(p-P38)、磷酸化 Akt(p-Akt);原位杂交和免疫组织化学检测 HIF-2 α 的表达。 **结果** 与对照组比较,H7 组大鼠 mPAP 开始上升($P < 0.05$),H14 组达高水平并维持于此水平。缺氧 14 天后出现肺血管重塑,RVHI 改变。与对照组比较,p-ERK 和 p-Akt 在 H3 组表达上升($P < 0.05$),且在 H3 组、H7 组、H14 组和 H21 组肺小动脉内膜、中膜表达均为阳性。而 p-P38、p-JNK 蛋白在对照组与低氧组表达均不明显。HIF-2 α mRNA 在对照组表达弱阳性,在 H14 组表达升高。HIF-2 α 蛋白在对照组表达不明显,H7 组表达达高峰,H14 组和 H21 组维持在高水平。相关分析表明 p-ERK 和 p-Akt 均与 HIF-2 α 蛋白(内膜)和 mPAP、RVHI 呈正相关($P < 0.01$)。 **结论** p-ERK、p-Akt 与 HIF-2 α 均在大鼠 HPH 的发病机制中发挥作用。p-ERK 和 p-Akt 可能通过在蛋白表达水平上调 HIF-2 α ,进而上调下游目标基因,从而参与 HPH 发生发展。

关键词: 丝裂原活化蛋白激酶; 磷酸肌醇 3-激酶; 缺氧诱导因子 2 α ; 高血压,肺性; 大鼠

中图分类号:R563 文献标识码:A

Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Regulated Hypoxia-Inducible Factor 2 α Roles on Pulmonary Arteries of Rats With Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension

KONG Chunchu, DAI Aiguo

(Department of Respiratory Medicine, Hunan Institute of Gerontology, Hunan Province Geriatric Hospital, Changsha, Hunan 410001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the interaction between hypoxia inducible factor 2 α (HIF-2 α), Mitogen-activated protein kinase(MAPK) or Phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K) during the development of rat hypoxic pulmonary hypertension. **Methods** Male SD rats ($n = 40$) were randomly divided into 5 groups and exposed to hypoxia for 0, 3, 7, 14 or 21 d, respectively. Mean pulmonary pressure (mPAP), right ventric hypertrophy index (RVHI) and vessel morphometry were measured. In situ hybridization were used to determine the expression of mRNA. Immunohistochemistry and western blots were adopted to determine the expression of protein. **Results** mPAP increased significantly after 7d of hypoxia, reaching its peak after 14d of hypoxia, then remained. Pulmonary artery remodeling developed significantly after 14d of hypoxia. p-JNK and p-P38 protein in control group and hypoxia groupe were poorly positive. p-ERK and P-AKT protein in pul-

monary arterial intima and tunica of all hypoxia rats were significantly higher than in control group ($P < 0.05$). In pulmonary arterial intima and tunica, HIF-2 α mRNA was barely positive in C group protein, then increased in H14 group ($P < 0.05$), and HIF-2 α protein was barely positive in C group protein, then increased in H3 group, reaching its peak in H7 group. Linear correlation analysis showed p-Akt and p-ERK were positively correlated with HIF-2 α protein (tunica intima) and vessel morphometry, RVHI and mPAP ($P < 0.01$). **Conclusions** Under chronic hypoxia, p-ERK and p-AKT may up-regulate the expression of HIF-2 α by increasing protein expression, then resulting in the occurrence and development of hypoxic pulmonary hypertension in rat.

Key words: mitogen-activated protein kinase; phosphatidylinositol 3-kinase; hypoxia-inducible factor 2 α ; anoxia; hypertension, pulmonary; rat

低氧诱导因子 2 (hypoxia-inducible factor-2, HIF-2) 是由 α 、 β 亚基组成的异二聚体, 其中 α 亚基是功能亚基, 调控多种涉及低氧应激下细胞适应与存活的靶基因, 从而在低氧应答反应中起核心作用, 本室近年研究表明, 低氧时 HIF-2 α 在肺小动脉壁中表达增加, 并通过转录激活的形式上调其靶基因, 从而在低氧性肺动脉高压 (hypoxic pulmonary hypertension, HPH) 发病中起重要作用^[1-3]。体外研究表明, 缺氧能激活 MAPK 的各亚类和 PI3K / AKT 信号传导通路^[4], 激活的 MAPK 和 PI3K 能使 HIF-2 α 蛋白表达增加, 或使 HIF-2 α 转录活性增加进而调控目的基因, 从而介导 HPH 的病理生理过程^[5-6]。本研究观察大鼠模型 HPH 形成过程中 HIF-2 α 与磷酸化 ERK (p-ERK)、磷酸化 JNK (p-JNK)、磷酸化 P38 (p-P38)、磷酸化 Akt (p-Akt) 的表达变化及其相关关系, 从而探讨其在发病机制中的作用, 以进一步研究其在 HPH 发病中的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型复制及平均肺动脉压和右室肥厚指数的测定

40 只清洁级雄性 Wistar 健康大鼠 (南华大学实验动物中心提供), 体重 200 ± 20 g, 按随机数目表法分为 5 组: 常氧对照组、低氧 3 天组 (H3 组)、低氧 7 天组 (H7 组)、低氧 14 天组 (H14 组) 和低氧 21 天组 (H21 组), 每组 8 只。按本室传统方法^[2]复制缺氧性肺动脉高压大鼠模型, 测定平均肺动脉压 (mPAP) (对照组于 H7 组大鼠检测后检测) 和右室肥厚指数 (RVHI), 并进行肺小血管形态学分析。

1.2 Western blot 检测

取大鼠右下叶肺组织 0.1 g, 按试剂说明检测 p-ERK、p-JNK、p-P38、p-Akt 的表达, 具体步骤见文献^[2]。

1.3 原位杂交

寡核苷酸探针、地高辛标记的多相寡核苷酸探针由武汉博士德生物工程有限公司提供。探针序列为: (1) HIF-2 α : ① 5'-CGA ACA CAT AAA CTC CTG TCT TCA GTG TGC-3'; ② 5'-ATC CGA GAG AAC CTG ACA CTC AAA ACTG GC-3'; ③ 5'-GGG CAA GTG AGA GTC TAC AAC AAC TGC CCC-3'。参照说明书及 Fu 等^[1]步骤, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色棕黄色为阳性结果。每只大鼠随机选 2 张结构完整的切片, 每张切片以单盲法随机选 3 支直径 100 μ m 左右的肺小动脉, HIF-2 α 表达相对含量以图像分析软件 (PIPS-2020 型, 重庆天海医疗设备有限公司) 检测肺细小动脉管壁平均吸光度 (A) 值表示。

1.4 免疫组织化学

一抗: p-ERK 和 p-Akt 以及 HIF-2 α 兔抗大鼠多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司), 1:150 稀释。二抗链霉亲和素-生物素-过氧化物酶 (SABC) 测检测试剂盒 (公司同上)。操作步骤参照 Fu 等^[1]报道的方法, DAB 显色棕黄色为阳性结果。肺小动脉血管选择以及管壁蛋白表达的结果检测同上。

1.5 统计学处理

计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 15.0 软件。多个样本比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 检验; 相关性分析采用直线相关回归法。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 低氧对 mPAP、右心室肥厚及缺氧性肺血管重塑的影响

表 1 显示, H7 组 mPAP 较对照组显著增高 ($P < 0.05$), H14 组达高水平稳定期; RVHI 则从低氧 14 天起较对照组升高 ($P < 0.05$), 说明此时大鼠已

形成右心室肥厚。光镜下可见对照组大鼠肺小动脉管壁薄, H3 组肺小动脉尚无明显肺血管重生 (HPSR), H7 组可见小动脉中层平滑肌增生, 管壁变厚, 管腔变窄, 低氧 14 天和 21 天平滑肌增生更显著, 管腔进一步狭窄。图像分析结果显示 H7 组管壁指数(LA)显著低于对照组 ($P < 0.05$), 而管腔指数(WA)明显高于对照组 ($P < 0.05$)。H14 组和 H21 组 LA 进一步降低, WA 增高更显著。

表 1 不同缺氧时间对大鼠 mPAP、WA、LA 和 RVIH 的影响 ($n = 8$)

Table 1 Effects of different hypoxia time period on mPAP, RVHI, WA, and WT in rats ($n = 8$)

组别	mPAP(mmHg)	WA(%)	LA(%)	RVHI(%)
对照组	15.9 ± 1.9	34.7 ± 2.5	63.3 ± 3.5	23.0 ± 1.6
H3 组	17.1 ± 1.4	38.5 ± 3.3	61.5 ± 3.8	22.7 ± 1.5
H7 组	20.8 ± 1.6 ^{ab}	44.8 ± 3.1 ^{ab}	55.2 ± 3.1 ^{ab}	25.4 ± 1.8
H14 组	26.5 ± 1.7 ^{abc}	54.4 ± 3.2 ^{abc}	45.6 ± 2.9 ^{abc}	27.2 ± 1.6 ^{abc}
H21 组	28.2 ± 1.8 ^{abc}	61.5 ± 2.4 ^{abcd}	38.5 ± 2.5 ^{abcd}	28.1 ± 1.9 ^{abcd}
F 值	98.3	68.4	67.8	15.4

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 H3 组比较, $P < 0.05$; c: 与 H7 比较, $P < 0.05$; d: 与 H14 组比较, $P < 0.05$

2.2 各组 p-ERK、p-JNK、p-P38 和 p-Akt 蛋白表达的比较

Western blot 发现, 低氧 3 天时肺组织 p-ERK 和 p-Akt 蛋白质表达增高, 低氧 14 天时达高峰, 低氧 21 天仍保持较高水平; 而 p-P38、p-JNK 在对照组和各低氧组未见明显表达(见图 1)。

2.3 低氧对肺 HIF-2α mRNA 的影响

对照组在肺小动脉内膜 HIF-2α mRNA 有表达, HIF-2α mRNA H3 组增高, H14 组达高峰, H21 组保持高水平, 主要表现于中膜平滑肌细胞, 内膜细胞(内皮细胞) 可见一定阳性表达(见图 2)。

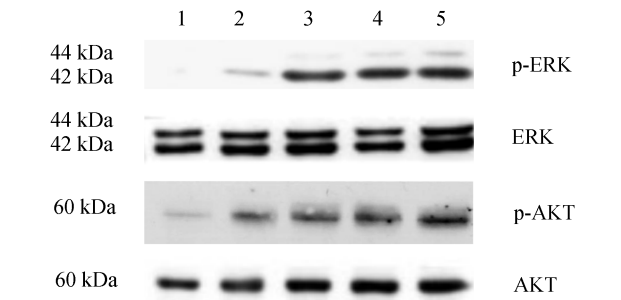


图 1 Western blot 检测各组大鼠肺组织 p-ERK 和 p-Akt 蛋白的表达 1: 对照组; 2: 低氧 3 天组; 3: 低氧 7 天组; 4: 低氧 14 天组; 5: 低氧 21 天组

Figure 1 Western blot analysis of p-ERK and p-Akt protein expression in rat lung tissue

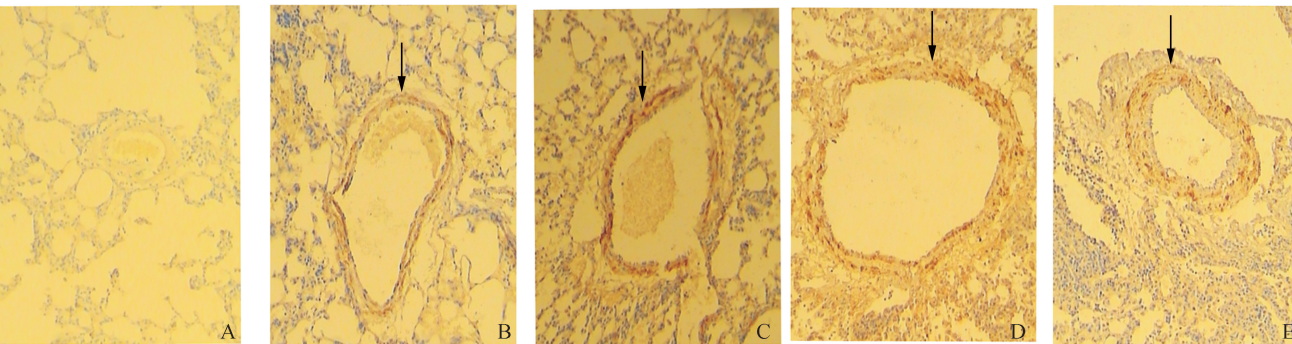


图 2 肺小血管壁 HIF-2α mRNA 表达(DAB × 200) A: 对照组; B: 低氧 3 天组; C: 低氧 7 天组; D: 低氧 14 天组; E: 低氧 21 天组

Figure 2 In situ hybridization analysis of HIF-2α mRNA expression in rat pulmonary arteries after exposure to hypoxia for 0 (A) (control), 3d (B) , 7d (C) , 14d (D) and 21d (E) (DAB × 200)

2.4 不同缺氧时间点肺动脉壁 p-ERK 和 p-Akt 蛋白与 HIF-2 α 蛋白表达的变化

对照组 p-ERK 和 p-Akt 与 HIF-2 α 蛋白均未见明显表达(图 3A、4A、5A)。随着低氧进展,其表达变化主要见于肺小动脉(表 2)。定位于肺小动脉内膜和中膜,H3 组 p-Akt 表达增加,H7 组明显增高(图 3C),H14 和 H21 组达高水平(图 3D、3E)。肺小动脉内膜和中膜,H3 组 P-ERK(图 4B)表达增加,H7 组明显增高(图 4C),至 H14 组、H2 组达高水平(图 4D、4E);对照组(图 5A)和 H3 组 HIF-2 α (图 5B)均呈弱阳性表达,H7 组 HIF-2 α 蛋白表达增强,呈强阳性表达(图 5C~E),随后维持于高水平,且主要见于肺小血管中膜(平滑肌细胞)和内膜(内皮细胞),外膜(成纤维细胞)也可见阳性表达。

2.5 肺小动脉壁 HIF-2 α 基因表达与 mPAP、肺血管重塑的关系

在 4 个不同时间缺氧组大鼠中,HIF-2 α 蛋白与

mPAP、WA、LA、RVHI 相关($r = 0.890, 0.897, -0.897, 0.937$)。在肺小血管内膜:p-ERK、p-Akt 与 HIF-2 α 蛋白呈正相($r = 0.903, 0.893, P = 0.001$)。

3 讨 论

HIF-2 对机体在低氧状态下介导生理和病理过程起非常关键的作用,现已明确肺动脉内皮细胞可能有 5% 的基因受 HIF-2 调控。研究发现转染 HIF-2 α 可上调目标基因 HRE 的转录。本团队前期研究发现低氧时 HIF-1 α 可调控其靶基因血管内皮生长因子、血红素氧合酶等表达,参与低氧大鼠和 COPD 患者 HPSR 的形成^[2],在低氧大鼠和 COPD 患者 HPSR 的形成中 HIF-2 α 翻译后修饰如泛素化、SUMO 化可调节 HIF-2 α 的稳定性,从而改变 HIF-2 α 的转录激活活性。

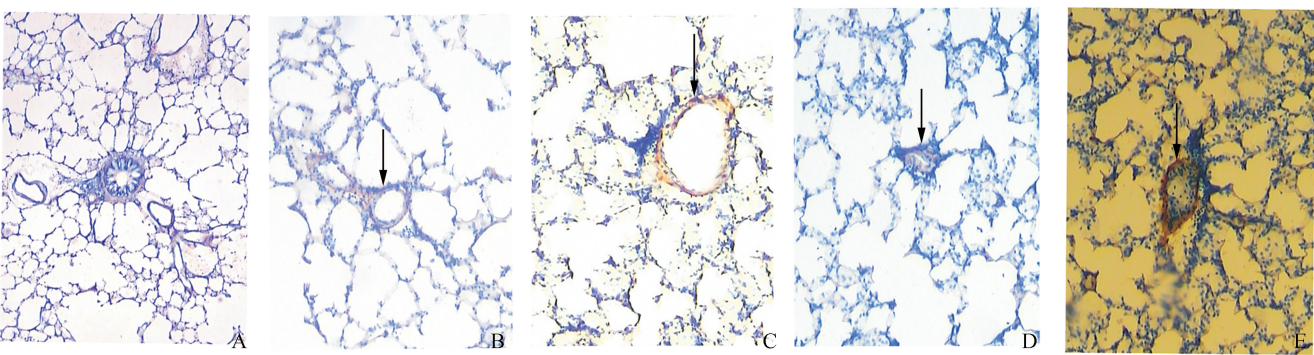


图 3 肺小血管壁 P-AKT 蛋白表达(DAB $\times$ 200) A:对照组;B:低氧 3 天组;C:低氧 7 天组;D:低氧 14 天组;E:低氧 21 天组
Figure 3 Immunohistochemistry analysis of P-AKT protein expression in rat pulmonary arteries after exposure to hypoxia for 0 (A) (control) ,3d (B) ,7d (C) ,14d (D) and 21d (E) (DAB $\times$ 200)

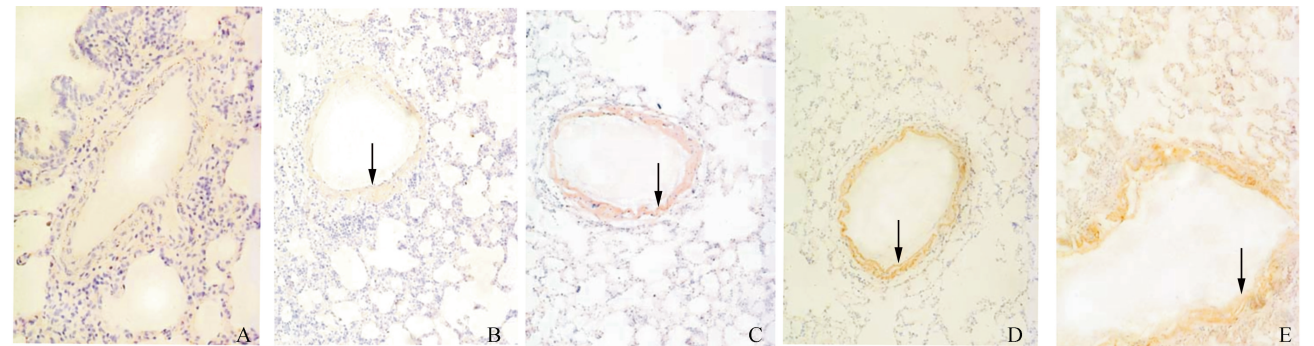


图 4 肺小血管壁 P-ERK 蛋白表达(DAB $\times$ 200) A:对照组;B:低氧 3 天组;C:低氧 7 天组;D:低氧 14 天组;E:低氧 21 天组
Figure 4 Immunohistochemistry analysis of P-ERK protein expression in rat pulmonary arteries after exposure to hypoxia for 0 (A) (control) ,3d (B) ,7d (C) ,14d (D) and 21d (E) (DAB $\times$ 200)

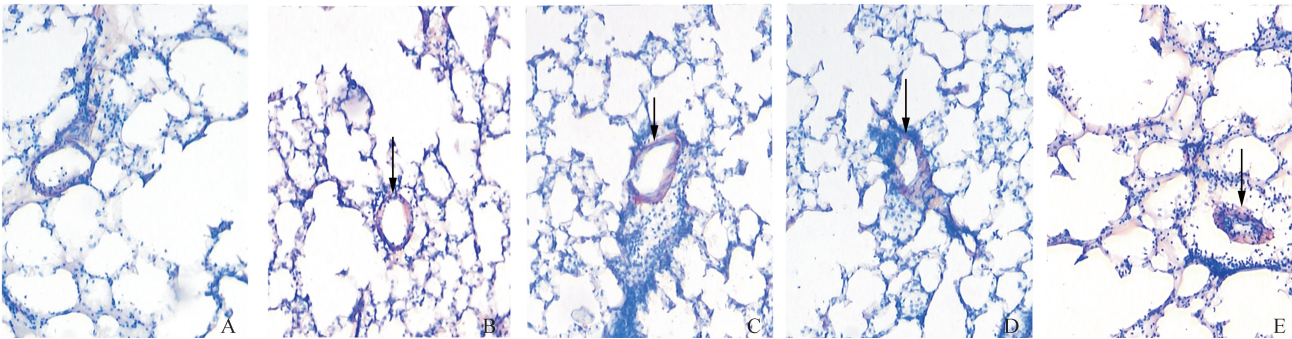


图 5 肺小血管壁 HIF-2α 蛋白表达 (DAB × 200) A: 对照组; B: 低氧 3 天组; C: 低氧 7 天组; D: 低氧 14 天组; E: 低氧 21 天组

Figure 5 Immunohistochemistry analysis of HIF-2α protein expression in rat pulmonary arteries after exposure to hypoxia for 0 (A) (control) ,3d (B) ,7d (C) ,14d (D) and 21d (E) (DAB × 200)

表 2 不同缺氧时间对大鼠肺小动脉 p-ERK、p-Akt、HIF-2α 表达 (A 值) 的影响 (n = 8)

Table 2 Effects of different hypoxia time periods on expression of p-ERK,p-Akt,HIF-2α (absorbance value) in pulmonary arterioles of rats (n = 8)

组别	p-ERK 蛋白	p-Akt 蛋白	HIF-2α 蛋白	HIF-2αmRNA
对照组	0.030 ± 0.006	0.021 ± 0.012	0.041 ± 0.012	0.062 ± 0.010
H3 组	0.066 ± 0.013 ^a	0.036 ± 0.011 ^a	0.052 ± 0.013	0.055 ± 0.015
H7 组	0.175 ± 0.011 ^{ab}	0.178 ± 0.010 ^{ab}	0.185 ± 0.012 ^{ab}	0.164 ± 0.012 ^{ab}
H14 组	0.195 ± 0.013 ^{abc}	0.215 ± 0.013 ^{abc}	0.168 ± 0.015 ^{ab}	0.173 ± 0.011 ^{ab}
H21 组	0.199 ± 0.010 ^{abc}	0.219 ± 0.012 ^{abc}	0.180 ± 0.017 ^{ab}	0.198 ± 0.012 ^{ab}
F 值	319.429	109.635	152.990	551.795

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与 H3 组比较, $P < 0.05$; c: 与 H7 比较, $P < 0.05$; d: 与 H14 组比较, $P < 0.05$

慢性低氧可诱导肺血管重塑,其特征性病理变化是细胞外基质增多,肺血管平滑肌细胞增生肥大,使管腔狭窄,管壁增厚,肺血管阻力增加,进而引起低氧性肺动脉高压。本研究结果显示在 3 周的常压间断低氧过程中,复制 HPH 大鼠模型 H7 组出现肺动脉高压、肺血管重塑,肺小动脉出现管壁增厚,管腔狭窄,图像分析显示 WA 增加,LA 降低,H14 组肺小动脉重塑更加明显并出现右室肥厚。

丝裂原活化蛋白激酶和磷酸肌醇 3 - 激酶是近年发现的信号传递因子,在低氧应激中,不同的细胞在不同低氧条件下,MAPK 亚类的活性有所差别。本实验发现肺组织 p-Akt 和 p-ER 在 H3 组表达增加,H7 组明显升高,后随低氧进展表达均增高,而肺组织中 p-P38 和 p-JNK 在对照组和各实验组均未见表达。

本研究还发现,HIF-2α 蛋白、p-ERK 和 p-Akt 在对照组肺小动脉和肺组织未见明显表达,低氧条件下它们表达呈动态增长变化,且两者在时间上相

一致,相关分析显示在内膜中表达相互呈正相关。体外实验发现 MAPK 通过 HIF-2α 中邻近脯氨酸残基的抑制区域内的 8 个丝氨酸磷酸化使得 HIF-2α 转录抑制结构域去阻遏,从而导致 HIF-2α 转录活性增强,另外磷酸化能阻止门冬酰胺羟基化,使得 CBP/ P300 辅助激活因子与 HIF-2α 结合,从而导致 HIF-2α 转录活性进一步增强。且最新研究表明 PI3K 通路通过其磷酸化使翻译调控蛋白去抑制,从而使 HIF-2α 其新生蛋白增加。同样也能激活 P70s6K,而 P70s6k 活化将导致 HIF-2α mRNA 翻译增加,从而将导致 HIF-2α 蛋白增加^[8-9,12]。因此,在缺氧性肺动脉高压形成过程中,p-ERK 蛋白和 p-Akt 很可能从蛋白水平上调 HIF-2α。

本研究中肺小动脉壁 p-ERK 和 p-Akt 及 HIF-2α 蛋白表达水平均与 mPAP、WA、RVHI 呈正相关,提示 p-ERK 和 p-Akt 可能在 HPH 发病过程中发挥一定的作用。p-ERK 和 p-Akt 参与 HPH 发病的机制可能与慢性低氧诱导肺小动脉壁丝裂原活化蛋

白激酶和磷酸肌醇 3-激酶活化,进而从蛋白水平上调 HIF-2 α ,而 HIF-2 α 能使目的基因转录活化从而在 HPH 发病机制中发挥作用,如 HIF-2 α 在缺氧性肺动脉高压大鼠肺内可能以转录激活的形式上调 VEGF 基因^[11],VEGF 能通过诱导细胞增殖而在 HPH 发病机制中发挥作用^[12]。

参考文献:

- [1] Fu DY, Dai AG, Hu RC. Expression and role of factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arteries of rat with hypoxia-induced hypertension[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2008, 40(10): 883-892.
- [2] 孔春初,戴爱国. 磷酸肌醇 3-激酶调控缺氧诱导因子 1 α 对大鼠缺氧性肺动脉高压的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(11): 2132-2137.
- [3] Li QF, Dai AG. Hypoxia-inducible factor-1 α regulates the role of vascular endothelial growth factor on pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. Chin Med J, 2004, 117(7): 1023-1028.
- [4] Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, et al. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signaling in HA-ras-transformed cells through a hypoxia-inducible factor-1 transcriptional element[J]. Blood, 1997, 90(9): 3322-3331.
- [5] 孔春初,戴爱国. 缺氧诱导因子表达调控与缺氧性肺动脉高压[J]. 国外医学呼吸系统分册, 2004, 24(3): 176-182.
- [6] 陈云荣,戴爱国,胡瑞成. 一氧化氮抑制缺氧诱导因子 α 亚基表达对大鼠缺氧性肺动脉高压的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(1): 14-21.
- [7] Sally K, Martin, Peter Diamond, et al. Hypoxia-inducible factor-2 is a novel regulator of aberrant CXCL12 expression in multiple myeloma plasma cells[J]. Haematologica, 2010, 95(5): 776-784.
- [8] Sascha S, Boyan K, Garvalov D, et al. A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia-inducible factor 2[J]. Brain, 2010, 133(4): 983-995.
- [9] Julie M, Roda, Laura A, Sum N, et al. Hypoxia-inducible factor-2 α regulates GM-CSF-derived soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 production from macrophages and inhibits tumor growth and angiogenesis[J]. Immunol, 2011, 187(4): 1970-1976.
- [10] Kong HS, Lee S, Beebe K, et al. Emetine promotes von hippel-lindau-independent degradation of hypoxia-inducible factor-2 in clear cell renal carcinoma[J]. Pharmacol, 2010, 78(4): 1072-1078.
- [11] Bougatef F, Quemener C, Kellouche S, et al. EMMPRIN promotes angiogenesis through hypoxia-inducible factor-2-mediated regulation of soluble VEGF isoforms and their receptor VEGFR-2[J]. Blood, 2009, 114(27): 5547-5556.
- [12] Farha S, Asosingh K, Xu WL, et al. Hypoxia-inducible factors in human pulmonary arterial hypertension: a link to the intrinsic myeloid abnormalities[J]. Blood, 2011, 117(13): 3485-3493.