

【DOI】 10.3969/j.issn.1671-6450.2024.04.018

论著·基础

沉默 TUFM 通过 AMPK/mTOR 信号通路调控线粒体自噬对肺源性心脏病模型大鼠肺动脉高压的影响

崔本科, 王岩, 卢云凤, 杜鹃, 翟羽涵



基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(2020-MS-049)

作者单位: 110016 沈阳 辽宁省人民医院呼吸与危重症科(崔本科、王岩、杜鹃、翟羽涵); 110067 沈阳 辽宁省金秋医院 心内科(卢云凤)

通信作者: 王岩, E-mail: wangyanmu@163.com

【摘要】 目的 探讨线粒体翻译延伸因子 Tu (TUFM) 通过线粒体自噬促进肺动脉高压 (PAH) 血管重塑的作用机制。方法 2022 年 1 月—2023 年 6 月于辽宁省人民医院中心实验室进行实验。将 36 只健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为空白对照 (Ctrl) 组、模型 (PAH) 组、TUFM 过表达 (OE) 组、OE 阴性对照 (OE-NC) 组、短发夹 RNA (Sh) 敲除 TUFM (Sh) 组和 Sh-NC 阴性对照 (Sh-NC) 组, 每组 6 只。除 Ctrl 组外, 其余大鼠均一次性腹腔注射 1% 野百合碱 (60 mg/kg) 诱导心源性肺水肿 PAH 大鼠模型; 大鼠肺动脉平滑肌细胞 (PASMC) 在低氧 (3% O₂) 条件下培养 24 h 模拟体内肺动脉高压微环境, 分为常氧 (Norm) 组、低氧 (Hyp) 组、小干扰 RNA (SiRNA)-1 组、SiRNA-2 组、Si-NC 组、OE-NC 组和 OE 组。右心导管插管和脉冲多普勒超声检测大鼠肺血流动力学; 苏木素-伊红染色检测肺小动脉病理结构; 免疫荧光共染检测 TUFM 组织定位; 细胞计数法检测细胞增殖; 透射电镜观察线粒体结构和自噬小体; 蛋白免疫印迹检测 TUFM、自噬、凋亡和磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路相关蛋白表达。结果 与 Ctrl 组比较, PAH 组大鼠 TUFM 蛋白表达升高, 且主要与 PASMC 标志物 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 在肺小动脉内膜存在共定位, 而与内皮细胞标志物 CD31 无共定位, 肺动脉收缩压 (PASP) 升高, 肺动脉血流加速时间 (PAAT) 缩短, 远端肺小动脉管壁呈向心性增厚, 管腔狭窄几乎堵塞, TUFM、苯氯素 1 重组蛋白 (BECN1)、人微管相关蛋白轻链 3 (LC3) II/I 和 B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl2) 蛋白表达升高, P62、Bcl2 相关 X 蛋白 (Bax) 和凋亡酶激活因子 (Apaf) 蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与 PAH 组比较, OE 组 PASP 升高, PAAT 缩短, 肺小动脉管壁厚度升高, 肺动脉 TUFM、BECN1、LC3II/I 和 Bcl2 表达升高, P62、Bax 和 Apaf 表达降低 ($P < 0.05$); 与 PAH 组比较, Sh 组 PASP 降低, PAAT 延长, 肺小动脉管壁厚度和管腔狭窄度有所改善, TUFM、BECN1、LC3II/I 和 Bcl2 表达降低, P62、Bax 和 Apaf 表达升高 ($P < 0.05$)。与 Norm 组比较, Hyp 组 PASMC 细胞 TUFM 蛋白表达升高; 与 Si-NC 组细胞相比, SiRNA-1 和 SiRNA-2 组 P62、Bax 蛋白表达升高, BECN1、LC3II/I、Bcl2、TUFM 表达降低, 线粒体结构完整, PASMC 细胞增殖活性降低, 细胞 p-AMPK 表达降低, p-mTOR 表达升高 ($P < 0.05$); 与 OE-NC 组比较, OE 组细胞 P62 和 Bax 蛋白表达降低, BECN1、LC3II/I、Bcl2 和 TUFM 表达升高, 部分线粒体损伤崩解, 嵴断裂消失, PASMC 细胞增殖活性明显升高, 细胞 p-AMPK 表达升高, p-mTOR 表达降低 ($P < 0.05$)。结论 沉默 TUFM 可通过激活 AMPK/mTOR 信号通路促进线粒体自噬加速 PAH 肺动脉平滑肌细胞凋亡。

【关键词】 肺动脉高压; 线粒体翻译延伸因子 Tu; 平滑肌细胞; 线粒体自噬; AMPK/mTOR 通路; 大鼠**【中图分类号】** R541.5; R363.2⁺1**【文献标识码】** A

Silent TUFM regulates mitochondrial autophagy through the AMPK/mTOR signaling pathway and its effect on pulmonary arterial hypertension in a pulmonary heart disease model rat Cui Benke*, Wang Yan, Lu Yunfeng, Du Juan, Zhai Yuhan.* Department of Respiratory and Critical Care, Liaoning Provincial People's Hospital, Liaoning Province, Shenyang 110016, China

Funding program: Liaoning Provincial Natural Science Foundation Project (2020-MS-049)

Corresponding author: Wang Yan, E-mail: wangyanmu@163.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism by which mitochondrial translation elongation factor Tu (TUFM) promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension (PAH) through mitochondrial autophagy. **Methods** The experiment was conducted in the Central Laboratory of Liaoning Provincial People's Hospital from January 2022 to June 2023. Thirty-six healthy male Sprague Dawley rats were randomly divided into a blank control (Ctrl) group, a model (PAH) group, a TUFM overexpression (OE) group, an OE negative control (OE-NC) group, a short hairpin RNA (Sh) knockout TUFM

(Sh) group, and a Sh-NC negative control (Sh-NC) group, with 6 rats in each group. Except for the Ctrl group, all other rats were given a one-time intraperitoneal injection of 1% monocrotaline (60 mg/kg) to induce cardiogenic pulmonary edema (PAH) in a rat model. Rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) were cultured under low oxygen (3% O₂) conditions for 24 hours to simulate the in vivo pulmonary arterial hypertension microenvironment. They were divided into normoxic (Norm) group, hypoxic (Hyp) group, small interfering RNA (SiRNA-1) group, SiRNA-2 group, Si-NC group, OE-NC group, and OE group. Right heart catheterization and pulsed Doppler ultrasound were used to detect pulmonary hemodynamics in rats. Hematoxylin-eosin staining was used to detect the pathological structure of pulmonary arterioles. Immunofluorescence co staining was used to detect tissue localization of TUFM. Cell counting method is used to detect cell proliferation. Observation of mitochondrial structure and autophagosomes using transmission electron microscopy. Protein immunoblotting was used to detect the expression of TUFM, autophagy, apoptosis, and adenosine phosphate activated protein kinase (AMPK)/mammalian rapamycin target protein (mTOR) pathway related proteins. **Results** Compared with the Ctrl group, the expression of TUFM protein in the PAH group rats increased and was mainly associated with PASMC markers α smooth muscle actin (α -SMA) is co localized in the intima of pulmonary arterioles, but not with endothelial cell marker CD31. The pulmonary artery systolic pressure (PASP) increases, the pulmonary artery acceleration time (PAAT) shortens, the distal pulmonary arteriole wall shows concentric thickening, and the lumen is almost blocked. The expression of TUFM, benzyl chloride 1 recombinant protein (BECN1), human microtubule associated protein light chain 3 (LC3) II/I, and B lymphocyte tumor 2 (Bcl2) proteins increases, while the expression of P62, Bcl2 related X protein (Bax), and apoptosis activating factor (Apaf) proteins decreases ($P < 0.05$). Compared with the PAH group, the OE group showed an increase in PASP, a decrease in PAAT, an increase in pulmonary artery wall thickness, an increase in pulmonary artery TUFM, BECN1, LC3II/I, and Bcl2 expression, and a decrease in P62, Bax, and Apaf expression ($P < 0.05$). Compared with the PAH group, the Sh group showed a decrease in PASP, an increase in PAAT, an improvement in pulmonary artery wall thickness and luminal stenosis, a decrease in TUFM, BECN1, LC3II/I, and Bcl2 expression, and an increase in P62, Bax, and Apaf expression ($P < 0.05$). Compared with the Norm group, the Hyp group showed an increase in TUFM protein expression in PASMC cells. Compared with the Si-NC group cells, the SiRNA-1 and SiRNA-2 groups showed increased expression of P62 and Bax proteins, decreased expression of BECN1, LC3II/I, Bcl2, and TUFM, intact mitochondrial structure, decreased proliferation activity of PASMC cells, decreased expression of p-AMPK, and increased expression of p-mTOR ($P < 0.05$). Compared with the OE-NC group, the expression of P62 and Bax proteins was reduced in the OE group, while the expression of BECN1, LC3II/I, Bcl2, and TUFM was increased. Some mitochondria were damaged and collapsed, and cristae rupture disappeared. The proliferation activity of PASMC cells was significantly increased, and the expression of p-AMPK was increased and p-mTOR was decreased in cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing TUFM can promote mitochondrial autophagy and accelerate apoptosis of PAH pulmonary artery smooth muscle cells by activating the AMPK/mTOR signaling pathway.

【Key words】 Pulmonary arterial hypertension; Mitochondrial translation elongation factor Tu; Smooth muscle cells; Mitochondrial autophagy; AMPK/mTOR pathway; Rats

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是一种恶性心血管疾病,以肺血管床阻塞性重构和进行性阻力增加为特征,最终导致右心功能障碍^[1]。目前针对 PAH 发病机制的研究主要集中在肺血管平滑肌细胞,但由于其调控通路中信号分子的复杂性,其机制仍不清楚。最近的研究证实,线粒体通过感知缺氧、氧化应激和凋亡在 PAH 发病中发挥重要作用^[2]。提示线粒体代谢可能是 PAH 的关键调节因素。线粒体自噬作为线粒体质量控制的必要手段,可选择性地清除受损线粒体碎片,防止线粒体和细胞功能障碍^[3]。报道称线粒体自噬的激活导致肺动脉平滑肌细胞过度增殖,增加肺血管阻力^[4],但其调控 PAH 的确切分子机制尚未可知。线粒体翻译延伸因子 Tu (mitochondrial translation elongation factor Tu, TUFM) 部

分位于线粒体外膜上,与蛋白质翻译延伸合成、氧化磷酸化和蛋白质控有关^[5]。其表达异常可通过引起线粒体呼吸链失衡和/或促进电子泄露,导致活性氧产生,影响细胞稳态^[6]。最近的 PAH 模型大鼠线粒体蛋白质组分析鉴定了 TUFM 的差异表达^[7],但关于 TUFM 在 PAH 进展中的生物学作用知之甚少。因此,本研究旨在揭示 TUFM 对 PAH 发生发展的影响,并探讨其可能的调控机制,报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料与动物

1.1.1 实验动物:36 只健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (200 ~ 220 g, 4 ~ 5 周龄),由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2021-0004。所有大鼠均饲养于辽宁省人民医院动物实验中心,标准

饲养条件,自由饮食,适应 1 周后进行实验。

1.1.2 试剂耗材:大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMC)购自北京中科质检生物技术有限公司;野百合碱(MCT,货号 C2401,美国 Sigma-Aldrich);蛋白定量检测试剂盒(货号:14G30C40,武汉博士德公司);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(货号:G1120,北京索莱宝公司);TUFM、CD31、Bcl2 相关 X 蛋白(Bax)抗体(货号:ab173300、ab222783、ab182734,美国 Abcam 公司); α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(货号:BM0002,美国 BOSTER 公司);人微管相关蛋白轻链 3(LC3)、苯氯素 1 重组蛋白(BECN1)、P62、凋亡酶激活因子(Apaf)、 β 肌动蛋白(β -actin)抗体(货号:3868、3495、39749、8723、4970,美国 CST 公司);B 淋巴细胞瘤 2(Bcl2)抗体(货号:ET1702-53,美国 HUABIO 公司);磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMPK)、磷酸化(p)-AMPK、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-mTOR 抗体(货号:bs-5551R、bs-2771R、bs3494R、bs3495R);细胞计数(CCK-8)检测试剂盒(货号:HY-K0301,美国 MCE 公司)。

1.1.3 主要实验仪器:脉冲多普勒仪(Vevo 2100,Visualsonics 公司);透射电子显微镜(HT 7700,日本 HITACHI 公司);Cytation3 多功能酶标仪(美国 BioTek 公司);Chemi Doc XRS 化学发光凝胶成像分析系统(美国 Bio-Rad 公司);160HR 高速冷冻离心机(美国赛默飞公司);倒置式生物显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.2 实验方法 2022 年 1 月—2023 年 6 月于辽宁省人民医院中心实验室进行实验。

1.2.1 PAH 实验动物模型构建及分组:将 36 只大鼠随机分成 6 组:空白对照(Ctrl)组,模型(PAH)组,TUFM 过表达(OE)组,OE 阴性对照(OE-NC)组,短发夹 RNA(Sh)敲除 TUFM(Sh)组和 Sh 阴性对照(Sh-NC)组,每组 6 只。Ctrl 组仅给予等量生理盐水,其余 5 组根据文献[8],将溶解于 0.5 mmol/L 盐酸(pH = 7.4)溶液的 1% MCT(60 mg/kg)一次性腹腔注射诱导肺源性心脏病大鼠模型。基于美国国家生物技术信息中心相关序列(NM_001106295.1),选择具有平滑肌 22 α (SM22a)基因的血清型腺相关病毒(AAV9)作为平滑肌特异性启动子。对于 OE 和 Sh 组,在给予 MCT 的同时将 1 ml 含有 10^{12} GC/ml 滴度的敲低或过表达的 AAV9 分别注射到大鼠尾静脉中,OE-NC 组和 Sh-NC 组使用等体积的相应空溶剂作为阴性对照,4 周后进行后续实验。序列如下:Sh-TUFM:上游,5'-CCCUGGUCAUGCAGAUUAUTT-3'和下游,5'-AUAU-CUGCAUGACCAGGGTT-3'和 Sh-NC:上游,5'-UUCUC-CGAACGUGUCACGUTT-3',下游,5'-ACGUGACACGU-

UCGGAGAATT-3'。

1.2.2 细胞模型制备及分组处理: PASMC 聚集至 80%~90%时,更换为无血清改良 Eagle 培养基,置于 37℃培养箱内饥饿处理 24 h,更换常规培养基,随机分为常氧(Norm)组、低氧(Hyp)组、小干扰 RNA(SiRNA)-1 组、SiRNA-2 组、Si-NC 组、OE-NC 组和 OE 组。Norm 组和 Hyp 组分别置于常氧(21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂, 37℃)和低氧(3% O₂, 5% CO₂, 92% N₂, 37℃)培养箱中培养 24 h; Si-NC 组、SiRNA-1 组、SiRNA-2 组、OE-NC 组和 OE 组细胞分别转染携带 Si-NC、Si-TUFM-1 组、Si-TUFM-2、OE-NC 和 OE-TUFM 质粒,孵育 6 h 后,放入低氧培养箱中培养 24 h。序列如下, Si-TUFM-1: 上游,5'-CACCGAGUUUGGCCUAUAAATT-3'和下游,5'-UUUAUAGCCAAACUCGGUGTT-3'; Si-TUFM-2: 上游,5'-GGGCUAAGUUCAAGAAGUATT-3'和下游,5'-UACUUCUUGAACUUAGCCCTT-3'; Si-NC: 上游,5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',下游,5'-ACGUGA-CACGUUCGGAGAATT-3'。

1.2.3 血流动力学测定和组织收集:各组大鼠使用 2.5% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉并固定在工作台上。脉冲多普勒检测肺动脉多普勒信号,并测量肺动脉加速时间(PAAT)。每次测量重复 3 次,计算平均值。使用颈静脉右心导管插管直接检测血流动力学数据:经颈行正中切口,钝性分离右颈外静脉,将 3F 聚乙烯导管插入主肺动脉,参照文献[9]方法测量肺动脉压力。用生理盐水冲洗右肺和右心组织以清除血液,液氮冷冻,-80℃保存。左肺用 4% 多聚甲醛固定,石蜡切片行组织学检查。

1.2.4 大鼠肺小动脉形态学检测:根据 HE 染色试剂盒说明书,石蜡切片行 HE 染色,光学显微镜下观察肺内小动脉病理情况。在低倍视野下随机选取外径(ED)50~200 μ m 的血管,分析血管内径肥大情况。测量 ED 和中膜厚度(MT),并按照文献[10]根据 MT 百分比(MT% = 2 × MT/ED × 100%)计算动脉重塑。

1.2.5 免疫荧光共染色检测 TUFM 定位:石蜡切片用过氧化氢处理后,5% 牛血清白蛋白封闭,然后分别与 TUFM、 α -SMA 或 CD 31 单克隆抗体在 4℃下孵育过夜。洗涤未结合的一抗后,滴加异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠 IgG、Cy3 标记的羊抗兔 IgG 二抗在 37℃下孵育 30 min。用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为阴性对照。二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精复染并封片,荧光显微镜下观察拍照记录。

1.2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TUFM、自噬、凋亡和 AMPK/mTOR 相关蛋白表达:将收集的肺

组织和 PASMC 细胞加入含有苯甲磺酰氟和磷酸酶抑制剂的蛋白裂解缓冲液,冰上裂解 30 min。二喹啉甲酸法测定蛋白浓度,等量的蛋白通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜后将聚偏二氟乙烯膜用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h,分别加入 TUFM、LC3、BECN1、P62、Bax、Bcl2、AMPK、p-AMPK、mTOR、p-mTOR(抗体稀释倍数 1:1 000)和 β -actin(1:10 000),4℃ 孵育过夜。次日,将膜与含有辣根过氧化物酶的二抗在室温下孵育 1 h。洗涤后,使用增强化学发光法对条带显影,以 β -actin 作为内参,Image J 软件进行灰度值测定分析。

1.2.7 CCK-8 法检测细胞增殖活力:根据说明书使用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。用上述不同条件处理细胞,然后胰蛋白酶消化并均匀接种到 96 孔板中。每孔加入 100 μ l CCK-8 混合液,37℃ 下孵育 2 h。分别在 12、24 和 36 h 利用酶标仪测量 450 nm 处吸光度。

1.2.8 透射电镜检测细胞线粒体结构:将 PASMC 细胞按照上述方式处理 24 h 后,戊二醛固定,用 PBS 洗涤 3 次。然后用 1% 锇酸处理,再次用 PBS 冲洗,并用丙醇脱水。将细胞包埋在环氧树脂和 2% 醋酸铀-饱和乙醇溶液中。通过透射电子显微镜观察不同处理组的线粒体结构和自噬小体。

1.3 统计学分析 利用 SPSS 26.0 软件进行统计学

分析,使用 GraphPad Prism 9.0 软件绘图。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两两比较采用独立样本 *t* 检验,3 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

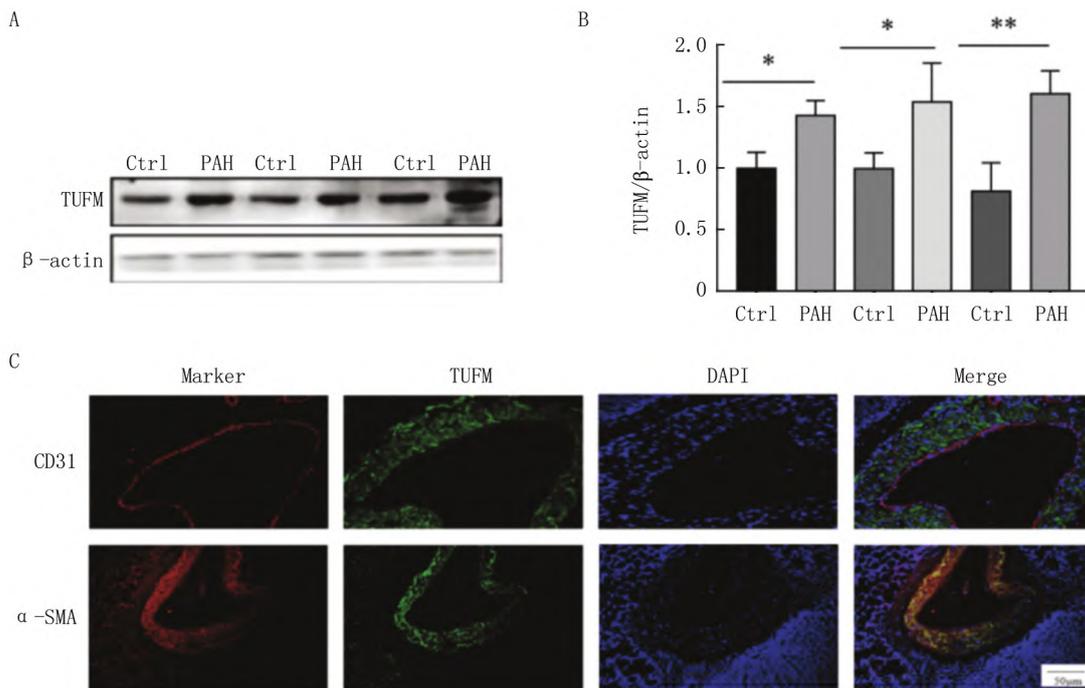
2 结果

2.1 PAH 模型大鼠肺动脉 TUFM 表达水平及定位

Western blot 结果显示,与 Ctrl 组比较,PAH 组大鼠肺动脉 TUFM 蛋白表达显著升高($P < 0.05$,图 1A、B)。荧光共染结果显示,绿色荧光标记的 TUFM 与红色荧光标记的 PASMC 标志物 α -SMA 在肺小动脉内膜重合为黄色荧光,存在共定位;而 TUFM 与内皮细胞标志物 CD31 未见明显重合和共定位(图 1C)。

2.2 TUFM 对 PAH 大鼠血流动力学的影响 与 Ctrl 组比较,PAH 组肺动脉收缩压(PASP)升高,PAAT 缩短($P < 0.05$);与 PAH 组比较,OE 组 PASP 显著升高,PAAT 明显缩短($P < 0.01$);与 PAH 组比较,Sh 组 PASP 降低,PAAT 延长($P < 0.05$),见图 2。

2.3 TUFM 对 PAH 大鼠肺动脉重构的影响 HE 染色结果显示,与 Ctrl 组比较,PAH 组大鼠远端肺小动脉管壁呈向心性增厚,管腔狭窄几乎堵塞,MT 百分比显著升高($P < 0.05$);与 PAH 组比较,Sh 组肺小动脉管壁厚度和管腔狭窄度有所改善;OE 组肺小动脉管壁厚度明显高于 PAH 组($P < 0.05$),见图 3。



注: A. Western blot 检测 PAH 大鼠肺动脉 TUFM 蛋白表达; B. 灰度值统计图; C. 免疫荧光检测 TUFM 定位(×200)。Marker. 目的蛋白; TUFM. 线粒体翻译延伸因子 TU; DAPI. 4',6'-二脒基-2-苯基吡啶; Merge. 合并。与 Ctrl 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

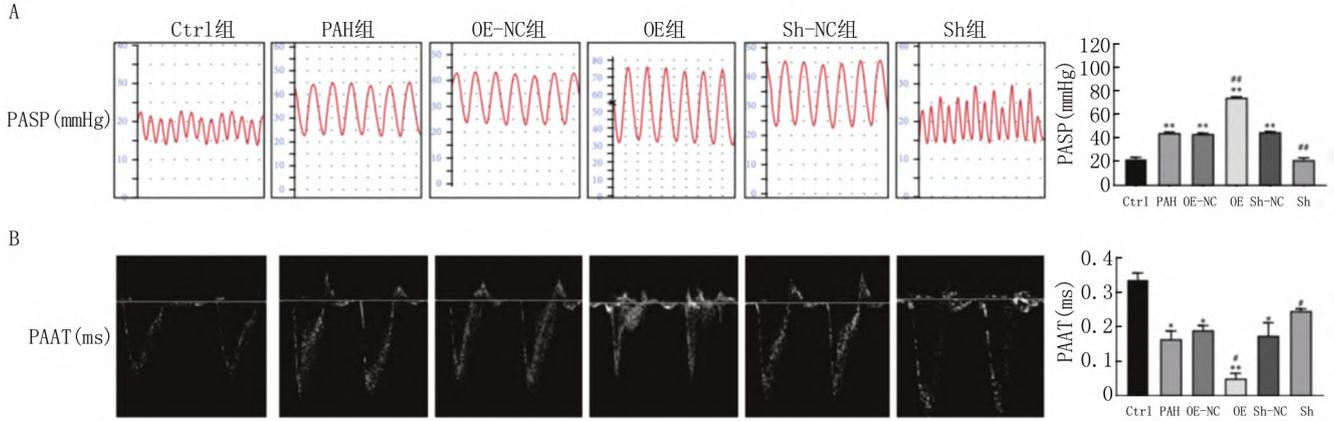
图 1 PAH 模型大鼠肺动脉 TUFM 表达水平及定位

Fig. 1 Expression level and localization of TUFM in pulmonary arteries of PAH model rats

2.4 TUFM 对 PAH 大鼠线粒体自噬和细胞凋亡相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示 ,与 Ctrl 组比较 ,PAH 组大鼠肺动脉 TUFM、BECN1、LC3II/I 和 Bcl2 蛋白表达升高 ,P62、Bax 和 Apaf 蛋白表达降低 ($P < 0.05$) ;与 PAH 组比较 ,OE 组肺动脉 TUFM、BECN1、

LC3II/I 和 Bcl2 表达显著升高 ,P62、Bax 和 Apaf 表达明显降低 ($P < 0.05$) ,Sh 组 TUFM、BECN1、LC3II/I 和 Bcl2 表达降低 ,P62、Bax 和 Apaf 表达升高 ($P < 0.01$) ,见图 4。

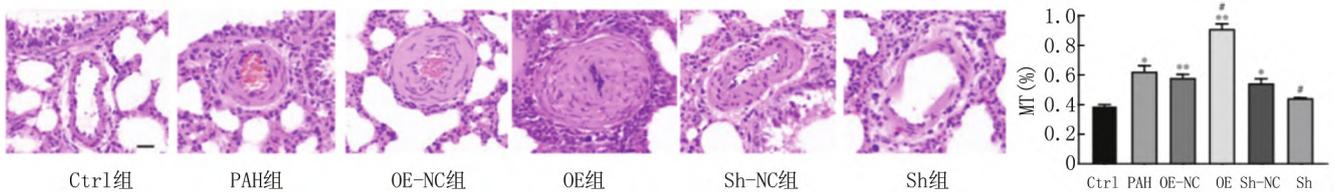
2.5 缺氧对 PASMC 细胞 TUFM 蛋白表达的影响 与



注: A. 颈静脉右心导管插管检测 PASP; B. 脉冲多普勒超声检测 PAAT。与 Ctrl 组比较 , $P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与 PAH 组比较 , $#P < 0.05$, $##P < 0.01$ 。

图 2 TUFM 对 PAH 大鼠血流动力学的影响

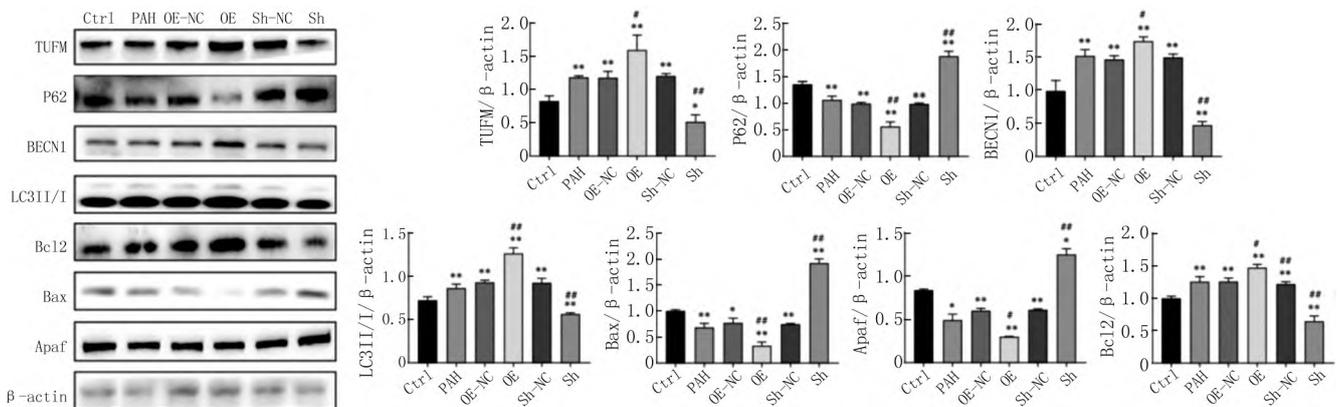
Fig. 2 Effect of TUFM on hemodynamics in PAH rats



注: 与 Ctrl 组比较 , $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与 PAH 组比较 , $#P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠肺小动脉病理结构比较(HE 染色 , $\times 200$)

Fig. 3 Comparison of pathological structures of pulmonary arterioles in different groups of rats (HE staining , $\times 200$)



注: 与 Ctrl 组比较 , $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与 PAH 组比较 , $#P < 0.05$, $##P < 0.01$ 。

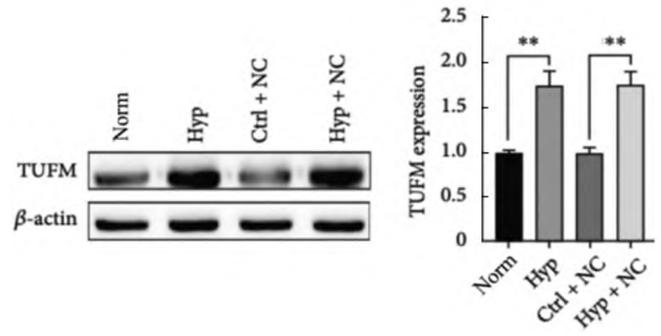
图 4 Western blot 检测各组大鼠线粒体自噬和细胞凋亡相关蛋白表达

Fig. 4 Western blot detection of mitochondrial autophagy and apoptosis related protein expression in each group of rats

Norm 组比较, Hyp 组细胞缺氧刺激可上调 TUFM 表达 ($P < 0.01$) ,见图 5。

2.6 缺氧对 PASC 细胞线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达的影响 与 Si-NC 组比较, SiRNA-1 和 SiRNA-2 组细胞 P62 和 Bax 蛋白表达升高, BECN1、LC3II/I、Bcl2 和 TUFM 表达降低 ($P < 0.05$) ; 与 OE-NC 组比较, OE 组细胞 P62 和 Bax 蛋白表达降低, BECN1、LC3II/I、Bcl2 和 TUFM 表达升高 ($P < 0.05$) ,见图 6。

2.7 缺氧对 PASC 细胞线粒体结构的影响 透射电镜发现, Si-NC 组和 OE-NC 组在缺氧条件下线粒体轻微肿胀, 但膜仍完整; 部分损伤的线粒体嵴减少, 损伤线粒体包裹在自噬体中。SiRNA-1 和 SiRNA-2 组细胞线粒体结构完整, 嵴存在, 膜完整, 仅有少量自噬溶酶体。OE 组可见部分线粒体损伤崩解, 嵴断裂消失, 以及一些含有受损线粒体片段的自噬小体, 见图 7。

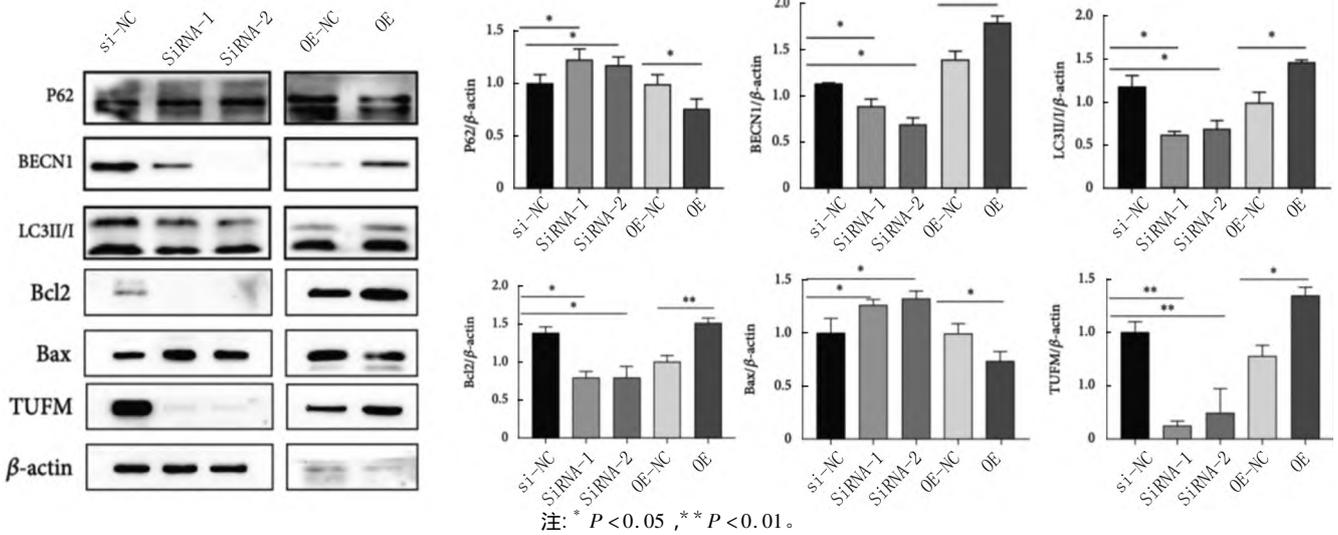


注: ** $P < 0.01$ 。

图 5 Western blot 检测缺氧对 PASC 细胞 TUFM 蛋白表达的影响

Fig. 5 Western blot detection of the effect of hypoxia on TUFM protein expression in PASC cells

2.8 TUFM 对缺氧诱导 PASC 细胞增殖活性的影响 CCK-8 法检测结果显示, 与 Si-NC 组比较, SiRNA-1



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 6 Western blot 检测缺氧对 PASC 细胞线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 6 Western blot detection of the effect of hypoxia on mitochondrial autophagy and apoptosis related protein expression in PASC cells

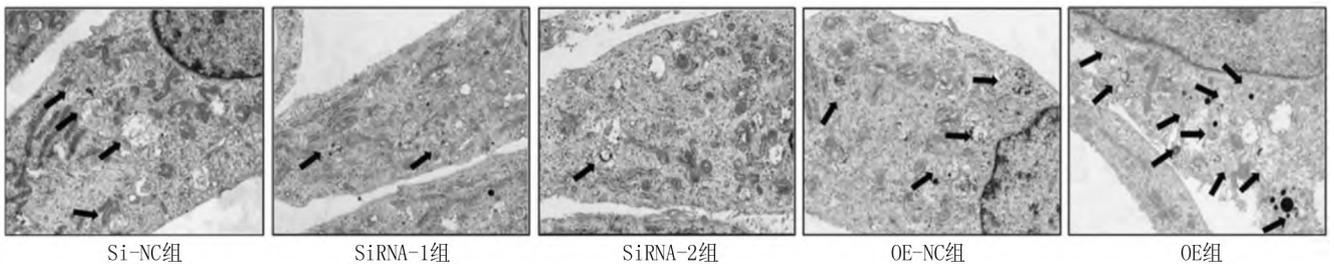
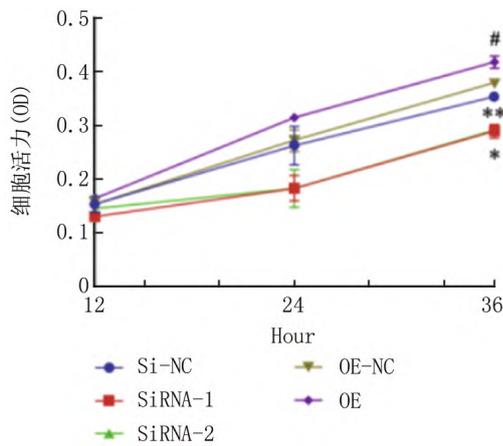


图 7 透射电镜检测缺氧对 PASC 细胞线粒体结构的影响($\times 8\ 000$, 箭头代表自噬小体)

Fig. 7 Transmission electron microscopy detection of the effect of hypoxia on the mitochondrial structure of PASC cells ($\times 8\ 000$, arrows representing autophagosomes)

和 SiRNA-2 组细胞增殖活性显著降低 ($P < 0.05$) ; 与 OE-NC 组比较 ,OE 组细胞增殖活性明显升高 ($P < 0.01$) ,见图 8。

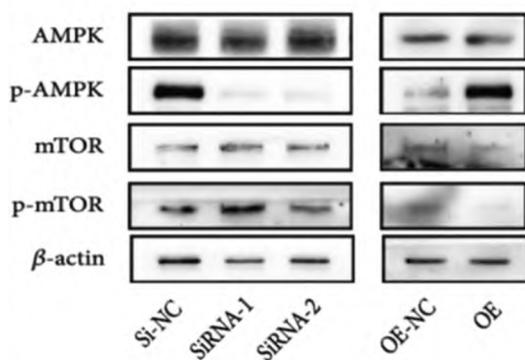


注: 与 Si-NC 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 OE-NC 组比较, # $P < 0.05$ 。

图 8 CCK-8 法检测缺氧对 PASC 细胞增殖活性的影响

Fig. 8 CCK-8 method for detecting the effect of hypoxia on the proliferation activity of PASC cells

2.9 TUFM 对缺氧诱导 PASC 细胞 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达的影响 与 Si-NC 组比较 ,SiRNA-1 和 SiRNA-2 组细胞 p-AMPK 表达降低 ,p-mTOR 表达升高 ($P < 0.05$) ; 与 OE-NC 组比较 ,OE 组细胞 p-AMPK 表达升高 ,p-mTOR 表达降低 ($P < 0.05$) ,见图 9。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

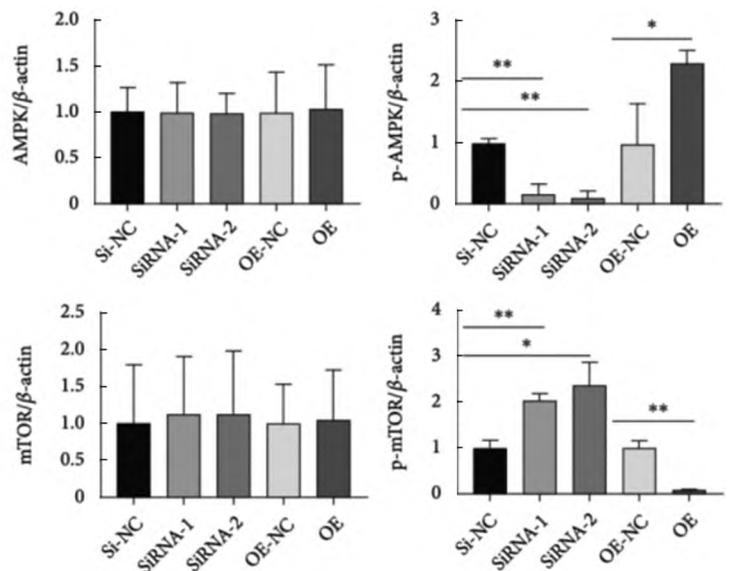
图 9 Western blot 检测 TUFM 对缺氧诱导 PASC 细胞 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达的影响

Fig. 9 Western blot detection of the effect of TUFM on the expression of AMPK/mTOR pathway related proteins in hypoxia induced PASC cells

3 讨论

PAH 是一种进行性致死疾病 ,以肺小动脉重塑导致肺动脉阻力增加为特征 ,最终发展为右心功能障碍或右心衰竭。PAH 发病机制复杂 ,涉及遗传、缺氧、氧化应激、糖代谢失衡等多方面因素 ,其病理主要包括 PASC 过度增殖和/或抑制凋亡以及胶原和弹性蛋白等细胞外基质的积累。但由于其分子机制不完全清楚 ,临床缺乏有效治疗药物 ,预后仍然较差。因此 ,迫切需要探索能有效抑制 PASC 增殖并改善肺动脉重塑的靶向药物和内在机制。

线粒体作为细胞稳态的中心监护者 ,协调多种细胞生物过程 ,如细胞周期进程、线粒体动力学和细胞代谢等 ,与 PAH 的发病机制和病理过程密切相关^[11]。TUFM 是线粒体 DNA 翻译表达的重要因子 ,在线粒体功能调控中起关键作用。既往研究显示 ,TUFM 可控制线粒体 DNA 编码肽的氨基酸延伸 ,并且其水平的变化能够影响多种细胞生物活性^[6, 12-13]。最近的 PAH 肺动脉蛋白质组学研究发现 ,PAH 与正常个体之间存在 TUFM 差异表达^[7]。因此 ,结合 PAH 的发病机制以及 TUFM 与线粒体功能的关系 ,推测 TUFM 可能参与 PAH 的发生发展。本研究在 MCT 诱导 PAH 大鼠模型中发现 ,与空白对照组相比 ,PAH 大鼠和细胞模型中 TUFM 表达明显增加 ,且主要定位于肺小动脉中膜平滑肌细胞 ,而不聚集于内层内皮细胞 ,与 PAH 主要病变细胞相一致^[14] ,这提示低氧诱导的 PAH 发生发展



过程中 TUFM 可能起到一定程度的作用,但其中机制尚不明确。

为了探索 TUFM 是否参与 PAH 的发展及其在病理过程中的作用,本研究引入 TUFM 敲低或过表达质粒的 AAV9 腺相关病毒,构建 MCT 处理的 TUFM 沉默或过表达大鼠模型。4 周后,TUFM 的缺失抑制了 PAH 的发展,改善 PAH 小鼠血流动力学情况和肺小动脉血管重构,而过表达 TUFM 则加重 PAH 病理结构损伤。此外,与自噬呈负相关的自噬底物 P62 在 Sh 组中的表达水平高于 PAH 组,表明在无 TUFM 的情况下肺动脉线粒体自噬减少。自噬产物 LC3II/I 和 BECN1 水平降低也显示了 Sh 组线粒体自噬减少。据报道,PAH 的发生与 PASM C 的自噬激活、过度增殖和凋亡抵抗密切相关^[14],存在自噬/凋亡互反馈调节机制,逆转自噬/凋亡失衡可有效改善血管重构,从而降低肺动脉压。研究发现,BECN1/Bcl-2 在调控自噬/凋亡平衡中发挥关键调控作用^[15]。另外,本研究发现 TUFM 沉默促进 PASM C 细胞增殖的同时,引起抗凋亡基因 Bcl-2 表达下调,而凋亡促进因子 Bax 和 Apaf 表达上调,反之亦然。因此,TUFM 的缺失减轻了体内 PAH 的发展,这可能归因于线粒体自噬和凋亡调节。

为了探讨 TUFM 基因沉默抑制线粒体自噬和增殖/凋亡的分子机制,笔者重点研究了已知的信号分子 AMPK 和 mTOR 来阐明可能的途径。据报道,AMPK 和 mTOR 通过调控自噬激活激酶 1 (ULK1) 调节自噬,Lin 等^[16]报道,双酚 A 可通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路激活促进卵巢颗粒细胞自噬。Gui 等^[17]发现,红景天苷通过 AMPK/mTOR/ULK1 通路上调细胞自噬,减轻低氧诱导的肺动脉平滑肌细胞增殖和凋亡抵抗。本研究结果发现,AMPK 和 mTOR 的总蛋白水平不受 TUFM 水平的影响,但 p-AMPK 和 p-mTOR 的磷酸化激活受 TUFM 表达的调节。这说明 AMPK 和 mTOR 的活性在一定程度上受 TUFM 调控。此外,线粒体自噬标志物 P62、BECN1 和 LC3II/I 均受 TUFM 和 p-AMPK/p-mTOR 的调节。既往研究提示,AMPK 通过磷酸化其 Ser-555 和 Ser-777 位点来刺激 ULK1,而 mTOR 通过磷酸化 ULK1 中的不同 Ser 残基 (Ser-757) 来抑制自噬^[18]。而且 mTOR 抑制剂和/或 AMPK 激活剂预处理内质网应激可扩大自噬的“生存窗口”。这些研究表明,AMPK/mTOR 通路在线粒体自噬中起枢纽作用,并调节线粒体功能和稳态。最近有学者提出,AMPK/mTOR 诱导的线粒体自噬增强通过控制一些蛋白的浓缩和溶解来调节编码关键线粒体蛋白的核 mRNA^[19]。而且,TUFM 是 AMPK 和 mTOR 的

上游分子,这一点通过敲低或过表达的状态得到证实。这些结果提示,TUFM 通过参与线粒体蛋白的合成,影响线粒体功能和稳态,进而调节整个细胞的功能。

本研究也存在一些局限性,首先,尽管缺氧可以部分模拟 PAH 的体内环境,但它并不完全代表 MCT 诱导 PAH 的发病机制,TUFM 研究需要一种模拟 PAH 的良好体外刺激。其次,遗憾的是没有使用 AMPK 或 mTOR 的干扰剂来进一步证实信号通路。鉴于线粒体功能调控在细胞周期过程中的重要性和复杂性,下一步的研究将从线粒体的功能和代谢调控两个方面来探讨 PAH 的发生机制。

综上所述,抑制 TUFM 可通过激活 AMPK/mTOR 信号通路抑制 PAH 肺动脉平滑肌细胞线粒体自噬,改善 PASM C 在缺氧条件下的增殖/凋亡失衡,这说明 PAH 肺动脉平滑肌细胞过度增殖至少部分是由于 TUFM 被激活促进线粒体自噬而导致的,这为改善 PAH 肺动脉重塑提供了新的靶点。

利益冲突:所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明

崔本科:设计研究方案,实施研究过程,论文撰写;王岩:提出研究思路,分析实验数据,论文审核;卢云凤:实施研究过程,资料搜集整理;杜鹃:进行统计学分析;翟羽涵:论文修改

参考文献

- [1] 崔宇菲,张磊.肺动脉高压基因遗传突变研究进展[J].疑难病杂志,2020,19(7):739-742. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2020.07.023.
- [2] Zhang W, Liu B, Wang Y, et al. Mitochondrial dysfunction in pulmonary arterial hypertension [J]. Front Physiol, 2022, 13: 1079989. DOI: 10.3389/fphys.2022.1079989.
- [3] Onishi M, Yamano K, Sato M, et al. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy [J]. EMBO J, 2021, 40(3): e104705. DOI: 10.15252/embj.2020104705.
- [4] Lingling L, Yuhua Q, Erfel L, et al. Hypoxia-induced PINK1/Parkin-mediated mitophagy promotes pulmonary vascular remodeling [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 534: 568-575. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.11.040.
- [5] Choi CY, Vo MT, Nicholas J, et al. Autophagy-competent mitochondrial translation elongation factor TUFM inhibits caspase-8-mediated apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(2): 451-464. DOI: 10.1038/s41418-021-00868-y.
- [6] Kim D, Hwang HY, Ji ES, et al. Activation of mitochondrial TUFM ameliorates metabolic dysregulation through coordinating autophagy induction [J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 1. DOI: 10.1038/s42003-020-10566-0.
- [7] Wang J, Uddin MN, Li Q, et al. Identifying potential mitochondrial proteome signatures associated with the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension in the rat model [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8401924. DOI: 10.1155/2022/8401924.
- [8] 杜阿胖,林立建,练桂丽,等.二甲双胍通过激活自噬改善野百合碱诱导的肺动脉高压大鼠的肺动脉重塑和功能[J].中华高血压

- 杂志, 2021, 29(11): 1069-1077. DOI: 10.16439/j.issn.1673-7245.2021.11.010.
- [9] 孙鹤宁, 鲁美丽, 田小雪, 等. Calpain-1 通过诱导内质网应激加速肺动脉高压的内皮细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2023, 39(4): 723-730. DOI: 10.12360/CPB202109047.
- [10] Masson B, Le Ribez H, Sabourin J, et al. Orai1 inhibitors as potential treatments for pulmonary arterial hypertension [J]. Circ Res, 2022, 131(9): e102-e119. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.122.321041.
- [11] 崔志峰, 孙佳伟, 刘美洋, 等. 线粒体功能障碍在肺动脉高压形成中的作用机制 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2022, 30(7): 24-28. DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2022.00.165.
- [12] Xi HQ, Zhang KC, Li JY, et al. Expression and clinicopathologic significance of TUFM and p53 for the normal-adenoma-carcinoma sequence in colorectal epithelia [J]. World J Surg Oncol, 2017, 15(1): 90. DOI: 10.1186/s12957-017-1111-x.
- [13] Weng X, Zheng S, Shui H, et al. TUFM-knockdown inhibits the migration and proliferation of gastrointestinal stromal tumor cells [J]. Oncol Lett, 2020, 20(5): 250. DOI: 10.3892/ol.2020.12113.
- [14] 周琴怡, 龚邵新, 彭琴, 等. 肺动脉平滑肌细胞: 肺动脉高压的关键治疗靶点 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(6): 543-547. DOI: 10.3969/j.issn.1007-3949.2021.06.016.
- [15] 何梦, 陶克龙, 张春意, 等. 淫羊藿苷通过 miR-210 调控自噬-凋亡平衡改善低氧性肺动脉高压血管重塑的研究 [J]. 现代实用医学, 2020, 32(8): 919-922. DOI: 10.3969/j.issn.1671-0800.2020.08.017.
- [16] Lin M, Hua R, Ma J, et al. Bisphenol A promotes autophagy in ovarian granulosa cells by inducing AMPK/mTOR/ULK1 signalling pathway [J]. Environ Int, 2021, 147: 106298. DOI: 10.1016/j.envint.2020.106298.
- [17] 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.
- [18] Holeczer M, Búnhegyi G, Kapuy O. GADD34 keeps the mTOR pathway inactivated in endoplasmic reticulum stress related autophagy [J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0168359. DOI: 10.1371/journal.pone.0168359.
- [19] Fernández-Alvarez AJ, Gabriela Thomas M, Pascual ML, et al. Smaug1 membrane-less organelles respond to AMPK and mTOR and affect mitochondrial function [J]. J Cell Sci, 2022, 135(1): jcs253591. DOI: 10.1242/jcs.253591.

(收稿日期: 2023-10-05)

作者 · 编者 · 读者

撰写医学论文主体部分的要求

- 前言** 概述研究的背景、目的、研究思路、理论依据、研究方法、预期结果和意义等。仅提供与研究主题紧密相关的参考文献,切忌写成文献综述。一般以 200~300 个汉字为宜,占全文字数的 5% 左右。
- 资(材)料与方法** 实验研究论文常写成“材料与方法”,临床研究论文常写成“资料与方法”。
 - 研究对象:** 研究对象为人,需注明时间、地点、分组方法、一般情况、选择标准与排除标准等,并说明经所在单位伦理委员会批准,研究对象知情同意。研究对象为实验动物,需注明动物的名称、种系、雌雄、年龄、饲养条件、健康状况及合格证号等。
 - 药品、试剂及仪器、设备:** 药品及化学试剂使用通用名称,并注明剂量、单位、纯度、批号、生产单位及给药途径。仪器、设备应注明名称、型号、规格、生产单位、精密度或误差范围,无须描述工作原理。
 - 观察指标与方法:** 选用相应观察指标,详述新创的方法及改良方法的改进之处,以备他人重复。采用他人方法,以引用参考文献的方式给出即可。
- 统计学方法** 说明所使用的统计学软件及版本,明确资料的表达及统计学方法的选择。用 $\bar{x} \pm s$ 表达服从或近似服从正态分布的计量资料,可采用 t 检验、方差分析;用 $M(Q_1, Q_3)$ 表达呈偏态分布的计量资料或生存时间资料,可采用秩和检验,若考虑协变量的影响,可采用协方差分析;用频数或率(%)表达计数资料或等级资料,可采用卡方检验或秩和检验。
- 结果** 是指与设计的观察指标相对应的实(试)验所得数据、观察记录,经过综合分析和统计学处理的结果,而不是原始数据,更不是原始记录。按逻辑顺序在正文的文字、表格和图中描述所获得的结果。结果的叙述应实事求是,简洁明了,数据准确,层次清楚,逻辑严谨。以数据反映结果时,应注意不能只描述导数(如百分数),还应同时给出据以计算导数的绝对数。一般应对所得数据进行统计学处理,并给出具体的统计检验值,如: $t = 2.85, P < 0.01$ 。
- 讨论** 是对研究结果的科学解释与评价,是研究所形成的科学理论,不必重述结果部分具体数据或资料。着重讨论研究结果的创新之处及从中得出的结论,包括理论意义、实际应用价值、局限性,及其对进一步研究的启示。应将本研究结果与其他有关的研究相比较,并将本研究结论与目的联系起来讨论,同时列出相关参考文献。