

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2023.17.007

文章编号: 1005-8982 (2023) 17-0037-08

实验研究·论著

MIF/HIF-1 α 互为影响调控微血管周细胞分化 对兔系统性硬化症肺动脉高压的作用研究*

李建斌¹, 赵俊¹, 贺超², 吴锐¹

(1. 南昌大学第一附属医院 风湿免疫科, 江西 南昌 330006; 2. 萍乡市人民医院,
江西 萍乡 337099)

摘要: **目的** 探讨巨噬细胞移动抑制因子/缺氧诱导因子1 α (MIF/HIF-1 α) 互为影响调控微血管周细胞向肌成纤维细胞分化在兔系统性硬化症肺动脉高压中的病理作用。**方法** 40只雄性家兔按随机数字表法分为4组: 对照组、模型组、MIF抑制剂组及HIF-1 α 抑制剂组, 每组10只。MIF抑制剂组和HIF-1 α 抑制剂组分别使用异丙肌苷和2-甲氧基雌二醇腹腔注射。记录家兔右心室肥大指数(RVHI)及平均肺动脉压(mPAP)。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组家兔血清中HIF-1 α 、MIF含量; 通过苏木精-伊红(HE)染色观察家兔皮肤和肺组织切片病理改变, 免疫组织化学染色观察各组肺组织中MIF、HIF-1 α 的表达; Western blotting检测周细胞MIF、HIF-1 α 、 α -SMA、Col1A1的表达。**结果** 与对照组比较, 模型组、MIF抑制剂组及HIF-1 α 抑制剂组mPAP和RVHI均升高($P < 0.05$); 与模型组比较, MIF抑制剂组和HIF-1 α 抑制剂组mPAP和RVHI均降低($P < 0.05$)。与对照组比较, 模型组、MIF抑制剂组及HIF-1 α 抑制剂组MIF、HIF-1 α 含量均上升($P < 0.05$); 与模型组比较, MIF抑制剂组和HIF-1 α 抑制剂组MIF、HIF-1 α 含量均下降($P < 0.05$)。HIF-1 α 与MIF呈正相关($r = 0.853$, $P = 0.026$)。HE染色结果显示, 模型组表皮层增厚, 毛囊过度角化, 真皮纤维组织增生, 血管壁增厚, 皮肤附属器减少; HIF-1 α 抑制剂和MIF抑制剂组皮肤表皮、真皮层及血管壁较对照组增厚, 皮肤附属器减少; 模型组肺组织可见肺小动脉管壁增生, 管腔狭窄, HIF-1 α 抑制剂和MIF抑制剂可见肺小动脉管壁增生, 部分管腔狭窄。免疫组织化学染色结果显示, 与对照组比较, MIF抑制剂组及HIF-1 α 抑制剂组MIF和HIF-1 α 表达均升高($P < 0.05$); 与模型组比较, MIF抑制剂组及HIF-1 α 抑制剂组的MIF和HIF-1 α 表达均降低($P < 0.05$)。模型组兔肺组织中肺动脉壁内皮细胞的细胞浆及细胞核中MIF和HIF-1 α 均呈高表达。Western blotting结果显示, 与对照组相比, 模型组和HIF-1 α 抑制剂组的周细胞 α -SMA和Col1A1表达均升高($P < 0.05$); 与模型组相比, HIF-1 α 抑制剂组的周细胞 α -SMA和Col1A1表达均降低($P < 0.05$)。**结论** MIF与HIF-1 α 可能互为影响并通过促进微血管周细胞向成纤维细胞分化参与系统性硬化肺动脉高压的病理过程。

关键词: 系统性硬化症; 肺动脉高压; 周细胞; 缺氧诱导因子1 α ; 巨噬细胞移动抑制因子

中图分类号: R593.2; R544.1

文献标识码: A

MIF/HIF-1 α reciprocally affects the regulation of microvascular pericyte differentiation in pulmonary hypertension in rabbit systemic sclerosis*

Li Jian-bin¹, Zhao Jun¹, He Chao², Wu Rui¹

(1. Department of Rheumatology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang,
Jiangxi 330006, China; 2. Pingxiang People's Hospital, Pingxiang, Jiangxi 337099, China)

收稿日期: 2023-02-27

* 基金项目: 江西省卫健委星火计划项目(No: 20198010); 江西省科技厅青年基金(No: 20192BAB215066); 江西省卫健委中医药课题(No: 2018B004)

[通信作者] 吴锐, E-mail: tcmclinic@163.com

Abstract: Objective To investigate the pathological role of MIF/HIF-1 α reciprocal effects in regulating the differentiation of pericytes to myofibroblasts in SSc-PAH. **Methods** Forty male rabbits were divided into four groups ($n=10$) by random number method: control group, model group, MIF inhibitor group and HIF-1 α inhibitor group. the MIF inhibitor group and HIF-1 α group were injected intraperitoneally using ISO and 2-ME2. The right ventricular hypertrophy index (RVHI) and mean pulmonary artery pressure (mPAP) were recorded in rabbits. ELISA was performed to detect the levels of HIF-1 α and MIF in the serum of rabbits in each group; the pathological changes of rabbit skin and lung tissue sections were observed by HE staining, and the expression of MIF and HIF-1 α in lung tissues of each group was observed by IHC staining; the expression of MIF and HIF-1 α in pericytes was detected by Western blot. The expression changes of MIF, HIF-1 α , α -SMA and Col1A1 were detected by Western blot in pericytes. **Results** Compared with the control group, the RVHI and mPAP of rabbits in the MIF inhibitor group and the HIF-1 α inhibitor group were increased; compared with the model group, the RVHI and mPAP of rabbits in the MIF inhibitor group and the HIF-1 α inhibitor group were decreased; compared with the control group, the serum levels of HIF-1 α and MIF were increased in rabbits; compared with the model group, the expression of MIF and HIF-1 α decreased in the MIF inhibitor group and HIF-1 α inhibitor group; there was a positive correlation between HIF-1 α and MIF ($r=0.853$, $P=0.026$); compared with the control group, the thickening of skin and blood vessel wall in rabbits in the MIF/HIF-1 α inhibitor group was less than that in the model group, which had thickened skin dermis, fewer subcutaneous appendages, and significantly increased lung tissue lumen narrowing, irregular small pulmonary artery walls and interstitial lung mass; compared with the control group, the expression of both MIF and HIF-1 α was increased in the inhibitor group, and compared with the model group, the expression of MIF and HIF-1 α expression was decreased in the inhibitor group compared with the model group; HIF-1 α was highly expressed in the lung tissue of rabbits in the model group. The expression of pericyte α -SMA and Col1A was elevated in the MIF/HIF-1 α inhibitor group compared with the control group ($P<0.05$); the expression of pericyte α -SMA and Col1A was decreased in the MIF/HIF-1 α inhibitor group compared with the model group ($P<0.05$). **Conclusions** MIF and HIF-1 α may interact and participate in the pathological process of systemic sclerosis pulmonary hypertension by promoting the differentiation of microvascular pericytes to fibroblasts.

Keywords: scleroderma, systemic; hypertension, pulmonary; pericytes; hypoxia inducible factor 1 α ; macrophage migration-inhibitory factors

系统性硬化症(systemic sclerosis, SSc)是一种原因不明的弥漫性自身免疫性疾病^[1],其主要特点为广泛的小血管病变,以及致细胞外胶原沉积增加的成纤维细胞功能障碍^[2]。肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是SSc常见的死亡原因之一^[3],与其他结缔组织病相比,SSc-PAH发病率更高。流行病学调查显示,SSc-PAH发病率为8%~12%^[4]。PAH一直是SSc治疗的难点,其预后差,致死率极高,5年生存率仅20%,即使使用昂贵的新型靶向药物也只能提高5年存活率至60%^[5-6]。SSc-PAH属于第一类的肺动脉高压,主要病理改变为肺血管增殖重塑,但具体病理机制尚不明确。周细胞是沿着毛细血管壁存在的细胞,与内皮细胞共同维持血管形态及功能的稳定^[7]。研究发现,周细胞在SSc血管重塑、肺动脉高压过程中发挥重要的病理作用^[8]。

巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)是重要的促炎因子。有研究表

明,SSc患者微血管内皮细胞和成纤维细胞产生的MIF较健康人明显增多^[9],提示MIF可能与SSc的炎症血管病变有关^[10]。缺氧诱导因子1 α (hypoxia inducible factor 1, HIF-1 α)是目前已知唯一一种对缺氧生理相关水平有独特表达的哺乳动物转录因子^[11]。研究显示,缺氧环境下HIF-1 α 可持续表达,并参与SSc患者肺血管收缩和肺血管重塑的病理改变^[12]。并且有研究提示,MIF是HIF-1 α 的直接靶基因,HIF-1 α 可以上调或者抑制MIF的表达^[13-14],MIF可以反向调节地塞米松介导的对HIF-1 α 的抑制^[15]。更有文献进一步证明MIF和HIF-1 α 在功能上存在相互依存的关系,HIF-1 α 的高表达在一定程度上需要依赖于MIF^[16]。基于此,笔者推测MIF与HIF-1 α 可互为影响从而参与SSc-PAH病理过程。本研究采用博来霉素联合野百合碱复制SSc-PAH兔模型,拟探讨SSc-PAH兔模型肺微血管周细胞MIF与HIF-1 α 之间的相互作用及其调控微血管周细胞分化在SSc-PAH中的病理作用。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

电子天平购自上海舜宇恒平科学仪器有限公司,显微摄像系统和正置生物显微镜购自日本尼康株式会社,倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司。98%野百合碱(上海阿拉丁生化科技有限公司),博来霉素(北京索莱宝科技有限公司), α -SMA、HIF-1 α 和 MIF 抗体(美国 Abcam 公司),Col1A1 抗体(北京生物科技有限公司),GAPDH 抗体(上海赛默飞科技有限公司),2-甲氧基雌二醇(2-ME2)(上海阿拉丁生化科技有限公司),异丙肌苷(Isoprinosine, ISO)(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 实验动物与分组

40 只 SPF 级健康雄性家兔,15 周龄左右,体重 1.2 ~ 1.8 kg, 购自江西中医药大学动物实验中心。实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0015;实验动物使用许可证号:SYXK(赣)2017-004。饲养环境适应本实验要求,通风性好,光照交替,温度(22 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 55%,每天更换水和食物,每天清洗笼具。将兔按随机数字表法分为模型组、对照组、MIF 抑制剂组及 HIF-1 α 抑制剂组,每组 10 只。模型组:按 40 mg/kg 体重经腹腔注射 98%野百合碱 1 次,之后每只经皮下注射 0.1 mL 的博来霉素(取浓度为 125 mg/1.25 mL 的博来霉素溶液溶于相应 0.9% NaCl 溶液中配成浓度为 1 mg/mL 博来霉素溶液),连续注射 21 次,每次间隔 24 h。MIF 抑制剂组:在模型组基础上第 2 天经腹腔注射 0.66 mg/kg 的 ISO,连续注射 20 次,每次间隔 24 h。HIF-1 α 抑制剂组:在模型组基础上第 2 天经腹腔注射 1 mg/mL 的 2-甲氧基雌二醇(2-methoxyestradiol, 2-ME2),连续注射 20 次,每次间隔 24 h。对照组:在正常兔相同部位注射等剂量的磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)。

1.3 实验方法

1.3.1 兔右心导管测压 模型复制 21 d 后,用 30 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉兔。待兔麻醉后将 PE50 微导管连接压力传感器,再连接心电图监护仪,用肝素钠盐水冲管(12 500 u 肝素配 500 mL 0.9% NaCl)。把兔放在手术桌上,取仰卧位备皮、消毒,依次切开表皮、真皮层及结缔组织层,切开气管,肉眼可视血管,将微导管慢慢插入,直至能可视肺动脉

压力波,记录数据,退回导管。

1.3.2 解剖与取材 取兔称重,用 30 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后固定于解剖台,分离皮下组织,充分暴露胸腔,将灌注针(7#)插入左心室并送至升主动脉内,同时剪开右心耳,用蠕动泵依次灌注生理盐水和 4% 多聚甲醛,前 1/3 的量采用快速灌注(70 r/min),后 2/3 的量缓慢灌注(50 r/min)。灌注结束后取出心脏、双侧肺脏及肺动脉干,生理盐水清洗干净,把肺组织和肺动脉干分别用浓度为 4% 的甲醛固定,皮肤病变周围剪干净毛发,酒精消毒,剪下皮肤组织和皮肤血管周围结缔组织,用生理盐水冲洗干净皮肤组织,放入同样的甲醛中固定,剩下的所有标本于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存。

1.3.3 右心室肥厚指数(right ventricular hypertrophy index, RVHI)测定 兔麻醉处死后解剖,取下心脏,剪下左右心房,清理干净周围的血管及其他组织,沿室间隔(interventricular septum, IVS)边缘剪下右心室(right ventricle, RV)游离壁,分离出左心室(left ventricle, LV)、RV 与 IVS,用生理盐水清洗去除残留的血块及杂质,再用滤纸吸干水分,在恒温烘干机中烘干,分别称重。 $\text{RVHI} = \text{RV}/(\text{LV} + \text{IVS})$ 。

1.3.4 模型复制成功评价指标 模型复制成功 21 d 后,检测模型兔平均肺动脉压(mean pulmonary artery pressure, mPAP)和 RVHI。家兔皮肤皮层增厚、毛囊过度角化、真皮纤维组织增生、皮肤附属器减少则表明模型复制成功^[17-18]。

1.3.5 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 HIF-1 α 、MIF 含量 4 组家兔分别取静脉血 5 mL,置入 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存,兔血清 HIF-1 α 、MIF 检测严格按照 ELISA 试剂盒和酶标仪说明书步骤进行操作。根据标准品吸光度值用 SPSS 22.0 软件绘制标准曲线,通过标本吸光度值计算出浓度。

1.3.6 皮肤和肺组织苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色 多聚甲醛固定好皮肤和肺组织,经梯度酒精脱水、二甲苯透明,石蜡包埋并切片(4 ~ 5 μm)。HE 染色后封片。

1.3.7 免疫组织化学检测 MIF 和 HIF-1 α 表达 将 HE 染色的切片脱蜡、冷却后用 PBS(pH=9.0)洗 3 min $\times$ 3 次,血清封闭,倒掉血清后分别加入一抗 HIF-1 α 抗体(1:1 000 Abcam,兔单克隆抗体)和 MIF

抗体(1:1 000 Abcam,兔单克隆抗体)37 ℃孵育 2 h,倒掉一抗后用 PBS 洗 3 次,每次 5 min,加二抗[兔抗鼠 IgG(H+L)1:10 000 Proteintech],37 ℃孵育 20 min,再用 PBS 洗 3 min×3 次,加入 DAB 显色液,依次复染、脱水、透明及封片:用苏木精复染,梯度乙醇脱水及二甲苯透明然后封片。每张切片选取直径<300 μm 的肺小动脉进行测量,通过显微镜及电脑采集染色面积的百分比评价 MIF 和 HIF-1α 的表达水平^[19]。

1.3.8 周细胞提取 胶原酶混合物消化组织。经 100 μm 不锈钢滤网过滤进一步选择微血管。滤液在 10% 的 Percoll 分离液中以 1 000 r/min 离心。将微血管团块在 4 mL 上清液中重悬,与链霉素蛋白酶组织一起消化 15 min,然后使用 Percoll 不连续梯度(60%、10%、0%)去除单个细胞和组织碎片。1 000 r/min 离心 30 min 后,用 PBS 对这些碎片进行重悬。离心后用无血清的 DMEM 洗 3 次,再加入 50 mL 无血清 DMEM 重悬,4 ℃静置 30 min 后丢弃上清液,重复 2 次。冲洗后,用含 10% FBS 的 20 mL DMEM 对微血管碎片进行重悬,将重悬的微血管片段移入到 35 mm 的细胞培养皿中,放置在 37 ℃、5% 二氧化碳、湿度 95% 的细胞培养箱中培养。72 h 观察细胞的生长情况,更换培养液,后每隔 3 d 换液 1 次,原代培养 8~10 d 后细胞基本爬满瓶底 80%~90%。加入 PBS 洗涤 2 次,加入胰蛋白酶和 EDTA 充分消化,镜下观察,细胞壁出现皱缩,细胞变圆,加入等体积的 DMEM 培养液终止其消化。离心 5 min,弃上清液,加入 2 mL 含 15% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)培养基重悬,接种后放进细胞培养箱中,周细胞的培养使用含 5% FBS 的 PM 培养基,置于 37 ℃、5% 二氧化碳培养箱中培养,7 d 传代 1 次,传代比例为 1:4,传代次数不超过 10 代。使用时,将细胞刮下,加入培养基重悬,计数后加入培养板各孔中。取第 5 代原代细胞用于细胞鉴定。

1.3.9 Western blotting 检测周细胞 α-SMA 和 Col1A1 蛋白表达 将培养皿中处理好的周细胞加入 RIPA 裂解缓冲液(1%SDS 和 0.5% 去氧胆酸钠)1 mL,静置 30 min,于 4 ℃,12 000 r/min,离心 10 min。取上清液并采用 BCA 法测定总蛋白含量。上清液与蛋白质上样缓冲液混匀煮沸冷却,取总量为 30 μg 的蛋白质点样至浓缩胶上样孔中,经电泳、转膜等步骤,获得含有蛋白质条带的 PVDF 膜,经 5% 脱脂奶粉

封闭 2 h、加入一抗稀释液稀释,α-SMA 按(1:1 000 Abcam,兔单克隆抗体),Col1A1(1:1 000 Santa Cruz,兔单克隆抗体),GAPDH(1:1 000 美国赛默飞公司,兔单克隆抗体),4 ℃孵育过夜、TBST 洗 3×10 min、二抗予封闭液稀释(山羊抗兔 IgG HRP 1:10 000 Proteintech),室温孵育 1h、再次 TBST 洗 3×10 min,采用 ECL 发光液显影,并对 Western blotting 结果进行分析:使用 Image J 软件得出曝光后各蛋白条带的 Integrated density 值,计算各目的蛋白与其内参蛋白的积分光密度(integrated optical density, IOD)比值。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验,相关分析用 Pearson 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 野百合碱联合博来霉素对兔肺动脉压力的影响

各组兔 mPAP 与 RVHI 比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组、MIF 抑制剂组及 HIF-1α 抑制剂组 mPAP 与 RVHI 均升高($P < 0.05$);与模型组比较,MIF 抑制剂组和 HIF-1α 抑制剂组 mPAP 与 RVHI 降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组兔肺动脉压力的比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	mPAP/mmHg	RVHI/%
对照组	14.274 ± 2.941	0.241 ± 0.004
模型组	37.852 ± 3.063 ^①	0.454 ± 0.039 ^①
MIF 抑制剂组	31.642 ± 1.920 ^{①②}	0.370 ± 0.005 ^{①②}
HIF-1α 抑制剂组	32.480 ± 1.861 ^{①②}	0.362 ± 0.043 ^{①②}
F 值	49.936	27.327
P 值	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P < 0.05$;②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 MIF 与 HIF-1α 抑制剂对兔血清 MIF 与 HIF-1α 含量的影响

ELISA 检测结果显示,各组兔血清 MIF 和 HIF-1α 含量比较,经方差分析,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与对照组比较,模型组、MIF 抑制剂组及 HIF-1α 抑制剂组的 MIF、HIF-1α 的表达均升高($P < 0.05$);与模型组比较,MIF 抑制剂组和 HIF-1α

抑制剂组 MIF、HIF-1α 的表达均降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组兔血清 MIF 和 HIF-1α 含量比较
($n=10$, pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	MIF	HIF-1α
对照组	0.412 ± 0.003	0.693 ± 0.020
模型组	0.691 ± 0.014 ^①	1.241 ± 0.046 ^①
MIF 抑制剂组	0.503 ± 0.026 ^{①②}	0.820 ± 0.142 ^{①②}
HIF-1α 抑制剂组	0.603 ± 0.005 ^{①②}	1.067 ± 0.041 ^{①②}
F 值	197.600	29.834
P 值	0.000	0.000

注：①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 HIF-1α 与 MIF 的相关性分析

MIF 抑制剂组和 HIF-1α 抑制剂组中 HIF-1α 与 MIF 呈正相关($r = 0.853$, $P = 0.026$)。见图 1。

2.4 HE 染色结果

皮肤组织 HE 染色结果显示, 对照组皮肤表皮, 真皮层呈正常状态, 皮肤附属器存在; 模型组表皮层增厚, 毛囊过度角化, 真皮纤维组织增

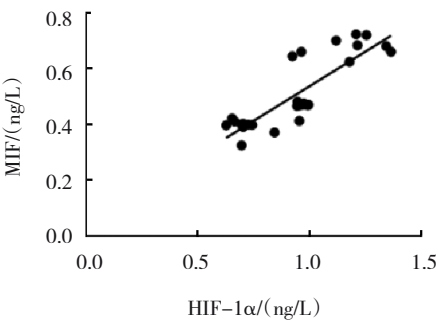


图 1 兔血清中 HIF-1α 与 MIF 的相关性分析

生, 血管壁增厚, 皮肤附属器减少; HIF-1α 抑制剂和 MIF 抑制剂组皮肤表皮、真皮层及血管壁较对照组增厚, 皮肤附属器减少。肺组织 HE 染色结果显示, 对照组肺组织的肺小动脉结构正常, 血管壁及血管周围组织正常, 管壁无狭窄, 未见炎症细胞浸润; 模型组可见肺小动脉管壁显著增生, 管腔明显狭窄, 肺微血管有血管重构, 血管壁和血管周围被大量的炎症细胞浸润, 肺泡壁增厚, 肺间质增生; MIF 抑制剂组和 HIF-1α 抑制剂组肺小动脉增生, 部分管腔狭窄, 血管壁和血管周围有炎症细胞浸润, 肺泡壁增厚。见图 2。

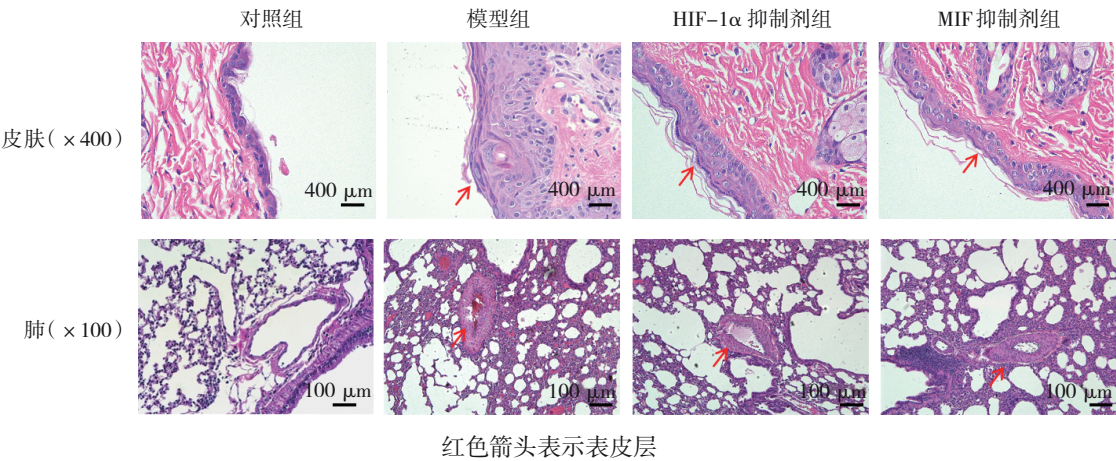


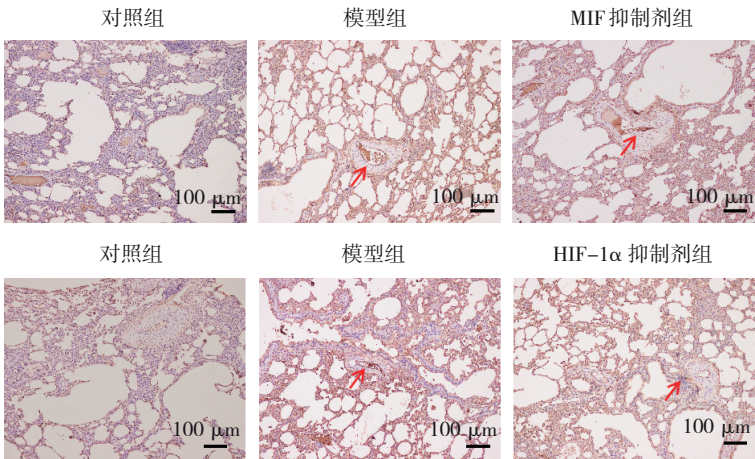
图 2 各组兔皮肤和肺组织病理改变 (HE 染色)

2.5 免疫组织化学染色结果

各组兔肺组织免疫组织化学染色结果显示, MIF 抑制剂组和 HIF-1α 抑制剂组与对照组比较, MIF 和 HIF-1α 表达较高; 与模型组比较, MIF 和 HIF-1α 表达较低, 模型组兔肺组织中肺动脉壁内皮细胞的细胞浆及细胞核中 MIF 和 HIF-1α 呈高表达。见图 3。

2.6 HIF-1α 与 MIF 抑制剂对周细胞中 α-SMA 和 col1A1 的蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, 对照组、模型组、HIF-1α 抑制剂组周细胞中 α-SMA 和 Col1A 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, HIF-1α 抑制剂组周细胞中 α-SMA 和 Col1A 的表达均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, HIF-1α 抑制剂组周细胞中 α-SMA 和 Col1A



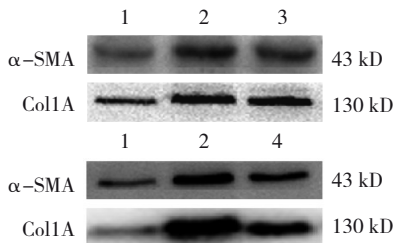
红色箭头表示在兔肺组织中 MIF 和 HIF-1α 的表达
图 3 各组兔肺组织中 MIF 和 HIF-1α 表达情况 (免疫组织化学 × 100)

的表达均降低 ($P < 0.05$)。见表 3 和图 4。
Western blotting 结果显示, 对照组、模型组、MIF 抑制剂组周细胞中 α -SMA 和 Col1A 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, MIF 抑制剂组周细胞中 α -SMA 和 Col1A 的表达均升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, MIF 抑制剂组周细胞中 α -SMA 和 Col1A 的表达均降低 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 4。

表 3 对照组、模型组及 HIF-1α 抑制剂组周细胞中 α -SMA 和 Col1A 蛋白相对表达量比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA	Col1A
对照组	0.220 ± 0.042	0.289 ± 0.004
模型组	0.760 ± 0.137^{①}	0.726 ± 0.126^{①}
HIF-1α 抑制剂组	0.533 ± 0.025^{①②}	0.659 ± 0.091^{①②}
F 值	31.509	20.794
P 值	0.000	0.002

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。



1: 对照组; 2: 模型组; 3: HIF-1α 抑制剂组; 4: MIF 抑制剂组。

图 4 各组 α -SMA 和 Col1A 凝胶电泳图

表 4 对照组、模型组及 MIF 抑制剂组周细胞中 α -SMA 和 Col1A 蛋白相对表达量比较 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	α -SMA	Col1A
对照组	0.337 ± 0.092	0.375 ± 0.027
模型组	1.450 ± 0.193^{①}	1.316 ± 0.261^{①}
MIF 抑制剂组	0.997 ± 0.182^{①②}	0.880 ± 0.174^{①②}
F 值	35.766	19.358
P 值	0.000	0.002

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

前期研究显示, 博来霉素与野百合碱可成功复制家兔 SSc-PAH 动物模型^[20]。本研究结果显示, 模型组 mPAP 较对照组和 HIF-1α、MIF 抑制剂组均升高; 对动物麻醉处死解剖后, 分别计算出各组的 RVHI, 结果显示, 模型组 RVHI 均高于对照组和 HIF-1α、MIF 抑制剂组。模型复制 21 d 后发现, 兔模型组精神较差, 呼吸频率增快, 活动次数减少, 食欲下降, 注射部位皮肤增厚变硬, 弹性差, 毛发脱落。皮肤 HE 染色结果显示表皮层增厚, 毛囊过度角化, 真皮纤维组织增生, 血管壁增厚, 皮肤附属器减少; 肺组织 HE 染色结果显示血管壁增厚、血管壁和血管周围被大量的炎症细胞浸润, 肺泡壁增厚, 肺间质增生。证明博来霉素联合野百合碱能成功复制 SSc-PAH 兔模型。

内皮细胞在 SSc 中的功能和作用已被广泛研究^[21], 但对周细胞的功能知之甚少。周细胞与内皮

细胞共同构成微血管结构,相比内皮细胞,周细胞对血管的发生及形态稳定有更为重要的生理作用。研究发现血管周细胞与内皮细胞相互作用,相互影响促进血管的成熟与稳定^[22],内皮细胞分泌大量细胞因子促进周细胞增殖活化,并向肌成纤维细胞表型分化,过度表达 α -SMA、COL1A,促进胶原的合成及纤维化;周细胞可分化为肌成纤维细胞,并参与SSc血管重塑及纤维化的病理过程^[23-24]。另有研究发现,野百合碱诱导的肺高压血管重塑过程中,位于腺泡内的肺微动脉管壁的血管周细胞过度增殖并向平滑肌细胞转化;也有证据表明在肺动脉高压患者的肺组织中肺血管周细胞数量是健康对照2倍以上^[25]。以上研究均提示周细胞向肌成纤维细胞转化后参与了SSc-PAH的病理过程,与本研究相符。

本研究显示,与对照组相比,模型组肺周细胞的MIF、HIF-1 α 、 α -SMA表达均上调,而经MIF抑制剂(ISO)、HIF-1 α 抑制剂(2-ME2)处理后的周细胞MIF、HIF-1 α 、 α -SMA表达均低于模型组,相关性分析示HIF-1 α 与MIF呈正相关。经HIF-1 α 抑制剂与MIF抑制剂处理后的兔肺血管病理改变较模型组有改善。以上结果证实MIF、HIF-1 α 在SSc-PAH中发挥一定病理作用,且MIF的抑制会同样导致周细胞HIF-1 α 下调,而HIF-1 α 抑制也会影响周细胞MIF的表达,提示MIF、HIF-1 α 可能互为影响参与SSc-PAH周细胞的病理改变。模型组周细胞 α -SMA表达显著上调提示SSc-PAH周细胞向肌成纤维细胞转化,而MIF、HIF-1 α 的抑制可显著抑制周细胞 α -SMA的表达,提示MIF、HIF-1 α 可通过调控周细胞向成纤维细胞的分化参与SSc-PAH的发生、发展。

综上所述,采用博来霉素联合野百合碱可成功复制SSc-PAH模型,MIF与HIF-1 α 可能互为影响并参与SSc-PAH病理过程,且可能通过调控周细胞向肌成纤维细胞转化参与SSc-PAH的发病,本研究结果提示,在对SSc-PAH的干预上可以考虑从阻断周细胞向成纤维细胞的分化入手,为临床治疗SSc-PAH提供一些思路。

参 考 文 献:

[1] DENTON C P, KHANNA D. Systemic sclerosis[J]. Lancet, 2017, 390(10103): 1685-1699.

[2] van den HOOGEN F, KHANNA D, FRANSEN J, et al. 2013 classification criteria for systemic sclerosis: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative[J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72(11): 1747-1755.

[3] JIANG Y X, TURK M A, POPE J E. Factors associated with pulmonary arterial hypertension (PAH) in systemic sclerosis (SSc) [J]. Autoimmun Rev, 2020, 19(9): 102602.

[4] DOMINGO S, SOLÉ C, MOLINÉ T, et al. MicroRNAs in several cutaneous autoimmune diseases: psoriasis, cutaneous lupus erythematosus and atopic dermatitis[J]. Cells, 2020, 9(12): 2656.

[5] GIUCĂ A, MIHAI C, JURCUȚ C, et al. Screening for pulmonary hypertension in systemic sclerosis-a primer for cardio-rheumatology clinics[J]. Diagnostics (Basel), 2021, 11(6): 1013.

[6] GIUGGIOLI D, RICCIERI V, CIPOLLETTA E, et al. Peripheral microangiopathy changes in pulmonary arterial hypertension related to systemic sclerosis: data from a multicenter observational study[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9: 924899.

[7] SWEENEY M D, AYYADURAI S, ZLOKOVIC B V. Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways[J]. Nat Neurosci, 2016, 19(6): 771-783.

[8] SIEGERT E, URUHA A, GOEBEL H H, et al. Systemic sclerosis-associated myositis features minimal inflammation and characteristic capillary pathology[J]. Acta Neuropathol, 2021, 141(6): 917-927.

[9] CORALLO C, PAULESU L, CUTOLO M, et al. Serum levels, tissue expression and cellular secretion of macrophage migration inhibitory factor in limited and diffuse systemic sclerosis[J]. Clin Exp Rheumatol, 2015, 33(4 Suppl 91): S98-105.

[10] HASSOUN P M, MOUTHON L, BARBERÀ J A, et al. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling[J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(1 Suppl): S10-S19.

[11] MALKOV M I, LEE C T, TAYLOR C T. Regulation of the hypoxia-inducible factor (HIF) by pro-inflammatory cytokines[J]. Cells, 2021, 10(9): 2340.

[12] GABER T, DZIURLA R, TRIPMACHER R, et al. Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do![J]. Ann Rheum Dis, 2005, 64(7): 971-980.

[13] MENDOZA-REINOSO V, SCHNEPP P M, BAEK D Y, et al. Bone marrow macrophages induce inflammation by efferocytosis of apoptotic prostate cancer cells via HIF-1 α stabilization[J]. Cells, 2022, 11(23): 3712.

[14] SAFI W, KRAUS A, GRAMPP S, et al. Macrophage migration inhibitory factor is regulated by HIF-1 α and cAMP and promotes renal cyst cell proliferation in a macrophage-independent manner[J]. J Mol Med (Berl), 2020, 98(11): 1547-1559.

[15] GABER T, SCHELLMANN S, EREKUL K B, et al. Macrophage migration inhibitory factor counterregulates dexamethasone-mediated suppression of hypoxia-inducible

- factor-1 alpha function and differentially influences human CD4⁺ T cell proliferation under hypoxia[J]. J Immunol, 2011, 186(2): 764-774.
- [16] WINNER M, KOONG A C, RENDON B E, et al. Amplification of tumor hypoxic responses by macrophage migration inhibitory factor-dependent hypoxia-inducible factor stabilization[J]. Cancer Res, 2007, 67(1): 186-193.
- [17] 孙园, 王庆博, 皮亦华, 等. 早期和晚期有氧运动对野百合碱诱导肺动脉高压大鼠右心衰竭的影响[J/OL]. 中国组织工程研究: 1-9. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1581.R.20230215.1445.004.html>.
- [18] MOURATIS M A, AIDINIS V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin[J]. Curr Opin Pulm Med, 2011, 17(5): 355-361.
- [19] MEYRICK B, GAMBLE W, REID L. Development of crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study[J]. Am J Physiol, 1980, 239(5): H692-H702.
- [20] FANG X, HE C, NI X D, et al. A potential model of systemic sclerosis with pulmonary hypertension induced by monocrotaline plus bleomycin[J]. Clin Exp Hypertens, 2022, 44(6): 507-513.
- [21] MANETTI M, ROMANO E, ROSA I, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction and dermal fibrosis in systemic sclerosis[J]. Ann Rheum Dis, 2017, 76(5): 924-934.
- [22] ARMULIK A, ABRAMSSON A, BETSHOLTZ C. Endothelial/pericyte interactions[J]. Circ Res, 2005, 97(6): 512-523.
- [23] RAJKUMAR V S, HOWELL K, CSISZAR K, et al. Shared expression of phenotypic markers in systemic sclerosis indicates a convergence of pericytes and fibroblasts to a myofibroblast lineage in fibrosis[J]. Arthritis Res Ther, 2005, 7(5): R1113-R1123.
- [24] CIPRIANI P, MARRELLI A, BENEDETTO P D, et al. Scleroderma mesenchymal stem cells display a different phenotype from healthy controls; implications for regenerative medicine[J]. Angiogenesis, 2013, 16(3): 595-607.
- [25] WANG S, ZENG H, XIE X J, et al. Loss of prolyl hydroxylase domain protein 2 in vascular endothelium increases pericyte coverage and promotes pulmonary arterial remodeling[J]. Oncotarget, 2016, 7(37): 58848-58861.
- (张西倩 编辑)
- 本文引用格式:** 李建斌, 赵俊, 贺超, 等. MIF/HIF-1 α 互为影响调控微血管周细胞分化对兔系统性硬化症肺动脉高压的作用研究[J]. 中国现代医学杂志, 2023, 33(17): 37-44.
- Cite this article as:** LI J B, ZHAO J, HE C, et al. MIF/HIF-1 α reciprocally affects the regulation of microvascular pericyte differentiation in pulmonary hypertension in rabbit systemic sclerosis[J]. China Journal of Modern Medicine, 2023, 33(17): 37-44.