·基础研究·

Rasal2 在肺动脉平滑肌细胞增殖及迁移中的作用机制

王芳[1],何思毅[2],陈杰[2*]
(西部战区总医院:[1] 烧伤科,[2] 心脏外科,成都 610083)

【摘 要】 **目的** 探讨 Ras 蛋白激活类似物 2(Rasal2)调控肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)增殖与迁移的作用机制。**方法** 提取慢性-低氧小鼠肺动脉组织以及使用低氧条件刺激 PASMCs,检测 Rasal2 表达变化。体外沉默 Rasal2 后检测各组哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合体 1(mTORC1)下游效应分子 S6、4EBP1 的蛋白磷酸化变化,Ki-67 免疫荧光染色与 Transwell 分析检测各组细胞增殖与迁移能力变化。使用胰岛素恢复 mTORC1 活性,检测各组增殖与迁移能力变化。**结果** 与常氧小鼠(Normoxic)相比,慢性低氧组小鼠(CH-PH)肺动脉 Rasal2 mRNA[(2.57±0.15)和(1.02±0.09),$P<0.001$]和蛋白[(2.18±0.36)和(0.97±0.14),$P<0.001$]表达显著升高。与常氧组(Normoxic)细胞相比,低氧组(Hypoxic)细胞处理 12、24 h 后 Rasal2 mRNA[(2.41±0.20)、(2.86±0.24)和(1.03±0.12);均 $P<0.001$]和蛋白[(2.50±0.32)、(2.79±0.38)和(1.13±0.12);均 $P<0.01$]表达显著升高。与 siCon 转染组相比,siRasal2 转染组细胞 Rasal2 表达显著降低[(1.09±0.09)和(0.33±0.04);$P<0.001$]。与 Normoxic+siCon 组相比,Hypoxic+siCon 组 Ki-67 阳性细胞比例[(62.75±7.54)%和(13.90±2.35)%;$P<0.001$]、迁移细胞比例[(305.25±58.28)%和(88.90±13.67)%;$P<0.05$]、p-S6$^{Ser235/236}$/S6[(3.27±0.24)和(1.06±0.14);$P<0.001$]、p-4EBP1$^{Thr37/46}$/4EBP1[(2.95±0.15)和(1.07±0.06);$P<0.001$]表达均显著升高;而与 Hypoxic+siCon 组相比,Hypoxic+siRasal2 组 Ki-67 阳性细胞比例[(19.25±5.34)%和(62.75±7.54)%;$P<0.001$]、迁移细胞比例[(115.25±19.00)%和(305.25±58.28)%;$P<0.05$]、p-S6$^{Ser235/236}$/S6[(1.90±0.06)和(3.27±0.24);$P<0.001$]、p-4EBP1$^{Thr37/46}$/4EBP1[(1.70±0.13)和(2.95±0.15);$P<0.001$]表达均显著降低。此外,与 Hypoxic+siRasal2 组相比,Hypoxic+siRasal2+Insulin 组 p-S6$^{Ser235/236}$/S6[(0.94±0.16)和(0.36±0.11);$P<0.01$]、p-4EBP1$^{Thr37/46}$/4EBP1[(0.99±0.09)和(0.61±0.03);$P<0.01$]表达、Ki-67 阳性细胞比例[(61.25±3.10)%和(27.00±3.46)%;$P<0.001$]、迁移细胞比例[(315.00±21.49)%和(141.00±15.30)%;$P<0.001$]显著回升。**结论** Rasal2 可通过 mTORC1 途径促进 PASMCs 增殖及迁移。

【关键词】 Rasal2; 肺动脉平滑肌细胞; 增殖; 迁移
【中图分类号】 R543 【文献标志码】 A 【DOI】 10.11915/j.issn.1671-5403.2022.09.148

Role and mechanism of Rasal2 in proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells

WANG Fang[1], HE Si-Yi[2], CHEN Jie[2*]
([1]Department of Burns and Plastic Surgery, [2]Department of Cardiac and Vascular Surgery, General Hospital of Western Theater Command, Chengdu 610083, China)

【Abstract】 **Objective** To explore the role and mechanism of Ras protein activator like 2 (Rasal2) in the proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). **Methods** The expression of Rasal2 in pulmonary arteries of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension (CH-PH) mice and in hypoxia-challenged PASMCs was analyzed by Western blotting. After Rasal2 in PASMCs was silenced by transfection of siRNA, the phosphorylation levels of downstream effector molecules of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1), S6 and 4E-binding protein 1 (4EBP1) were determined by Western blotting, and the proliferation and migration of PASMCs were measured with Ki-67 immunofluorescence staining and Transwell assay, respectively. The proliferation and migration of PASMCs were further determined after restoration of mTORC1 activity by insulin. **Results** Compared with the Normoxic group, the mRNA [(2.57±0.15) *vs* (1.02±0.09); $P<0.001$] and protein [(2.18±0.36) *vs* (0.97±0.14); $P<0.001$] levels of Rasal2 were significantly increased in the pulmonary artery of the CH-PH group. In the PASMCs of the Hypoxic group, the mRNA [(2.41±0.20), (2.86±0.24) *vs* (1.03±0.12); both $P<0.001$] and protein [(2.50±0.32), (2.79±0.38) *vs* (1.13±0.12); both $P<0.01$] levels of Rasal2 were obviously higher after 12 h and 24 h of exposure when compared with the Normoxic group. Compared with the siCon group, the protein level of Rasal2 in PASMCs of the siRasal2 group was significantly deceased [(1.09±0.09) *vs*

收稿日期: 2022-01-12; **接受日期**: 2022-05-24
基金项目: 西部战区总医院院管课题(2021-XZYG-B31)
通信作者: 陈杰, E-mail: chenjie181213@sina.com

(0.33±0.04), $P<0.001$]. Compared with the Normoxic+siCon group, the percentage of Ki-67-positive cells [(62.75±7.54)% *vs* (13.90±2.35)%; $P<0.001$], percentage of migrated cells [(305.25±58.28)% *vs* (88.90±13.67)%; $P<0.05$], and expression of p-S6$^{Ser235/236}$/S6 [(3.27±0.24) *vs* (1.06±0.14); $P<0.001$] and p-4EBP1$^{Thr37/46}$/4EBP1 [(2.95±0.15) *vs* (1.07±0.06); $P<0.001$] were both increased in the Hypoxic+siCon group. Compared with the Hypoxic+siCon group, the percentage of Ki-67-positive cells [(19.25±5.34)% *vs* (62.75±7.54)%; $P<0.001$], percentage of migrated cells [(115.25±19.00)% *vs* (305.25±58.28)%; $P<0.05$], and expression of p-S6$^{Ser235/236}$/S6 [(1.90±0.06) *vs* (3.27±0.24); $P<0.001$] and p-4EBP1$^{Thr37/46}$/4EBP1 [(1.70±0.13) *vs* (2.95±0.15); $P<0.001$] in the Hypoxic+siRasal2 group were both reduced. Additionally, the percentage of Ki-67-positive cells [(61.25±3.10)% *vs* (27.00±3.46)%; $P<0.001$], percentage of migrated cells [(315.00±21.49)% *vs* (141.00±15.30)%; $P<0.001$], and expression of p-S6$^{Ser235/236}$/S6 [(0.94±0.16) *vs* (0.36±0.11); $P<0.01$] and p-4EBP1$^{Thr37/46}$/4EBP1 [(0.99±0.09) *vs* (0.61±0.03); $P<0.01$] were both elevated in the Hypoxic+siRasal2+Insulin group than the Hypoxic+siRasal2 group. **Conclusion** Rasal2 promotes the proliferation and migration of PASMCs *via* mTORC1 pathway.

【Key words】 Ras protein activator like 2; pulmonary artery smooth muscle cells; proliferation; migration

This work was supported by the Project of General Hospital of Western Theater Command (2021-*XZYG-B*31).

Corresponding author: *CHEN Jie*, *E-mail*: *chenjie181213@sina.com*

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)是一种病因多变、病理机制复杂、死亡率较高的综合征,发生机制包括异常的肺动脉收缩、肺血管重塑,从而引起肺动脉阻力增高、最终导致右心衰竭及终末死亡[1,2],而低氧是引起 PAH 的关键因素[3]。肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs)在生理状况下保持着增殖和凋亡的动态平衡。然而在慢性低氧刺激下,PASMCs 增殖和迁移能力过度增强,造成血管狭窄甚至闭锁,最终导致 PAH[4]。目前基于传统机制的药物仍不能完全有效地降低 PAH 的致死率、致残率,因此,探索新的调控 PASMCs 增殖、迁移的分子机制势在必行。

Ras 家族蛋白在调控平滑肌细胞增殖和迁移中发挥重要作用[3,5]。Ras 蛋白激活类似物 2(Ras protein activator like 2, Rasal2)属于 Ras GTP 酶活化蛋白家族[6],最初被认为是一种抑制肿瘤的蛋白[7]。然而,近期研究发现 Rasal2 还可以促进多种肿瘤的生长[6,8]。此外,Rasal2 还可以抑制肾癌组织的血管新生过程[9],提示其在血管生理病理中发挥潜在作用。然而,Rasal2 在肺动脉高压中的作用目前尚不清楚。本研究利用缺氧条件干预细胞模型,探讨 Rasal2 是否能调控 PASMCs 增殖与迁移并探讨其可能的机制。本研究拓宽了肺动脉高压发病机制的研究思路,为肺动脉高压的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要材料

C57BL/6J 小鼠购自成都达硕实验动物有限公司,共 30 只,8~10 周龄,体质量 22 g 左右。小鼠饲养在 12 h 光暗交替、温度 24 ℃ 的无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级动物房中。小鼠肺动脉高压模型造模方法:低氧组的小鼠皮下注射 SU5416,浓度 20 mg/kg,每周注射 1 次;与此同时,小鼠饲养在恒温培养箱的低氧(10%氧气)环境中,饲养 21 d。而常氧组的小鼠每周 1 次注射等量的溶剂。

SU5416(美国 Sigma 公司),DMEM 细胞培养基(美国 HyClone 公司),10%胎牛血清(美国 Invitrogen 公司),雷帕霉素(中国皓元生物),siRasal2 试剂(中国锐博生物公司), Lip2000(美国 Invitrogen 公司), 二脒基苯基吲哚(4′,6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)胞核荧光染料(美国 Roche 公司),增殖细胞相关抗原(Ki-67)抗体(中国博奥森生物公司), Rasal2、p-S6$^{Ser235/236}$、S6、p-4EBP1$^{Thr37/46}$、4EBP1 抗体(美国 CST 公司),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(Gapdh)抗体(美国 CST 公司),siRasal2 试剂(中国锐博生物公司),Transwell 试剂盒(德国默克公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组及干预 从野生型小鼠的肺动脉中获得 PASMCs,并分为 6 组:常氧对照组(常氧+siCon)、常氧转染组(常氧+siRasal2)、低氧对照组(低氧+siCon)、低氧转染组(低氧+siRasal2)、常氧干预组(常氧+siRasal2+胰岛素)、低氧干预组(低氧+siRasal2+胰岛素)。每组约 1×10^6~2×10^6 个细胞,待细胞长到 40%左右时,予以 siCon 和 siRasal2 转染并培养 24 h,其中,常氧组细胞在 21%氧气环境中培养,低氧组细胞在 3%氧气环境中培养。为进一步研究 Rasal2 通过 mTOR 蛋白复合体 1(mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)调控细胞增殖和迁移,同时加入胰岛素(5 mg/L)继续孵育 24 h。

1.2.2 细胞 siRasal2 的转染 使用小干扰 RNA(small interfering RNA, siRNA)沉默 PASMCs 中 Rasal2 的表达水平。在细胞生长至 40%时,使用 Lip2000 与 siRNA 在细胞中共培养 48 h。siRasal2 序列是 5′-CTGCATCAGATGCCATCTA-3′。

1.2.3 实时定量 PCR 使用 Trizol 法提取总 RNA，使用 Bestar qPCR 逆转录试剂盒逆转录 cDNA，使用 ABI Prism 7700 完成实时定量 PCR 反应。引物：*Rasal2*（F：5′-TGTTCTGTCCTTGAGCCAGT-3′；R：5′-TCCACCTCAGACATCACCAA-3′）；*Gapdh*（F：5′-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3′；R：5′-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3′）[10]。

1.2.4 CCK-8 试验 细胞与 10 μl CCK-8 染色剂在 37 ℃共培养 2 h，使用分光光度计测量 $A_{450\,nm}$，取其相对值表示细胞活力。

1.2.5 Ki-67 免疫荧光染色 在 6 孔板中放入小玻片，倒入细胞悬液，按上述分组干预完成后倒掉培养液固定细胞，磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline，PBS）清洗 3 次，用 0.3%～0.5% TritonX-100 处理穿透 15 min，PBS 清洗 3 遍，血清室温封闭 30 min。Ki-67 抗体以 1∶1 000 在 4℃湿盒孵育过夜，PBS 清洗 3 遍，二抗室温暗室孵育 1 h，PBS 清洗 3 遍，DAPI 复染核，使用荧光显微镜拍片，Ki-67 染色呈绿色，DAPI 染色呈蓝色，计算 Ki-67 阳性细胞率。

1.2.6 Transwell 实验 将上述分组的各组 PASMCs 接种在 8 μm 孔的 transwell 上层小室中，小室置于含无血清培养基的 24 孔板中，分别置于常氧和低氧环境中继续孵育 8 h。将未迁移的小室内膜一面细胞擦除，而留有迁移细胞的外膜使用多聚甲醛固定，并用 PBS 冲洗 3 次，之后将膜剪下置于玻璃片并使用 1%结晶紫染液染色，迁移的细胞数目比例通过光镜进行图像采集和计算。

1.2.7 免疫印迹实验 提取各组小鼠肺动脉组织和 PASMCs 蛋白，通过 8%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，将蛋白电转到聚偏二氟乙烯膜上。5%胎牛血清封闭 1 h，使用相应一抗 4 ℃过夜孵育。充分洗膜后，常温下二抗孵育 1 h。继续洗膜，通过化学发光液显色，并用凝胶图像分析系统对条带进行定量分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行分析。计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，2 组间比较用独立样本 t 检验，多组间比较用方差分析。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Rasal2 蛋白在慢性低氧小鼠肺动脉组织和缺氧处理的 PASMCs 中的表达水平变化

为探索 Rasal2 在肺动脉高压中的作用，我们利用慢性低氧小鼠构建肺动脉高压模型，发现与常氧组小鼠相比，慢性低氧组小鼠肺动脉组织中 Rasal2mRNA［(2.57±0.15)和(1.02±0.09)，$P<0.001$；图 1A］和蛋白［(2.18±0.36)和(0.97±0.14)，$P<0.001$；图 1B］水平明显增高。缺氧所致的 PASMCs 异常增殖和迁移在 PAH 中发挥重要作用，我们也检测了 Rasal2 在缺氧处理 PASMCs 中的表达变化，发现与常氧组相比，低氧处理 12 h 与 24 h 的 mRNA［(2.41±0.20)，(2.86±0.24)和(1.03±0.12)，$P<0.001$；图 1C］和蛋白表达明显升高［(2.50±0.32)，(2.79±0.38)和(1.13±0.1)，$P<0.01$；图 1D］。

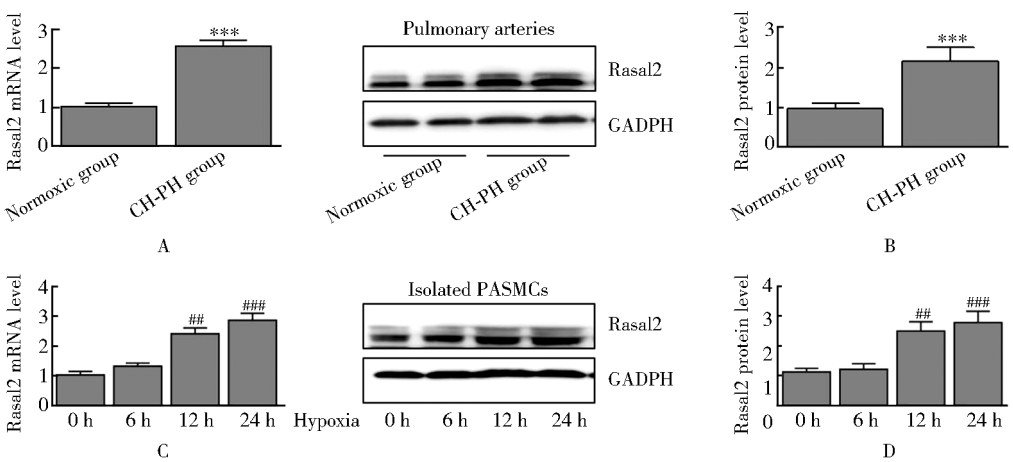


图 1 各组 Rasal2 mRNA 与蛋白表达情况比较

Figure 1 mRNA and protein expression of Rasal2 in different groups

Compared with Normoxic group, $^{***}P<0.001$; compared with 0 h group, $^{\#\#}P<0.01$, $^{\#\#\#}P<0.001$. CH-PH: chronic hypoxia-pulmonary hypertension; PASMCs: pulmonary arterial smooth muscle cells.

2.2 Rasal2 沉默对低氧所致 PASMCs 增殖的影响

我们利用 Rasal2 siRNA(siRasal2)沉默 Rasal2 的表达。转染 siRasal2 后,Rasal2 表达明显下降[(1.09±0.09)和(0.33±0.04),$P<0.001$,图 2]。与常氧组相比,低氧组 Ki-67 阳性细胞百分比明显升高[(62.75±7.54)%和(13.90±2.35)%,$P<0.001$];在低氧处理的 PASMCs 中,转染 siRasal2 后 Ki-67 阳性细胞百分比显著下降[(19.25±5.34)%和(62.75±7.54)%,$P<0.001$;图 3]。

2.3 沉默 Rasal2 对低氧所致 PASMCs 迁移的影响

我们利用 transwell 实验评估 PASMCs 迁移能力。与常氧组相比,低氧组迁移细胞百分比明显升高[(305.25±58.28)%和(88.90±13.67)%,$P<0.05$];在低氧处理的 PASMCs 中,转染 siRasal2 后迁移细胞百分比显著下降[(115.25±19.00)%和(305.25±58.28)%,$P<0.05$;图 4]。

2.4 沉默 Rasal2 对 PASMCs 中 mTORC1 下游效应蛋白表达的影响

mTORC1 可被 Ras 蛋白激活,从而通过下游效应分子 S6 和 4EBP1 诱导 SMC 增殖、迁移[11,12]。我们发现与常氧组相比,低氧组 PASMCs 中 S6、4EBP1 磷酸化水平明显增强[(3.27±0.24)和(1.06±0.14),(2.95±0.15)和(1.07±0.06),均 $P<0.001$];在低氧处理的 PASMCs 中,转染 siRasal2 后 S6、4EBP1 磷酸化水平显著减弱[(1.90±0.06)和(3.27±0.24),(1.70±0.13)和(2.95±0.15),均 $P<0.001$;图 5]。

2.5 恢复 mTORC1 活性对 PASMCs 增殖的影响

我们利用胰岛素处理细胞恢复 mTORC1 活性从而探索其在 Rasal2 调控 PASMCs 功能中的作用。沉默了 Rasal2 表达的基础上,使用胰岛素恢复 mTORC1 活性后 S6[(0.94±0.16)和(0.36±0.11),$P<0.01$;图 6]、4EBP1[(0.99±0.09)和(0.61±0.03),$P<0.01$;图 6]磷酸化水平显著回升、细胞活力明显升高[(1.24±0.06)和(1.61±0.10),$P<0.001$;图 7A]、Ki-67 阳性细胞百分比增多[(61.25±3.10)%和(27.00±3.46)%,$P<0.001$;图 7B]。

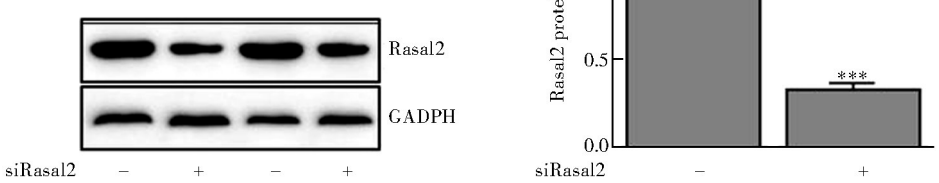


图 2 各组 Rasal2 表达情况比较

Figure 2 Rasal2 protein expression in different groups

Compared with siCon group, *** $P<0.001$. siRasal2: Rasal2 siRNA; siCon: control siRNA.

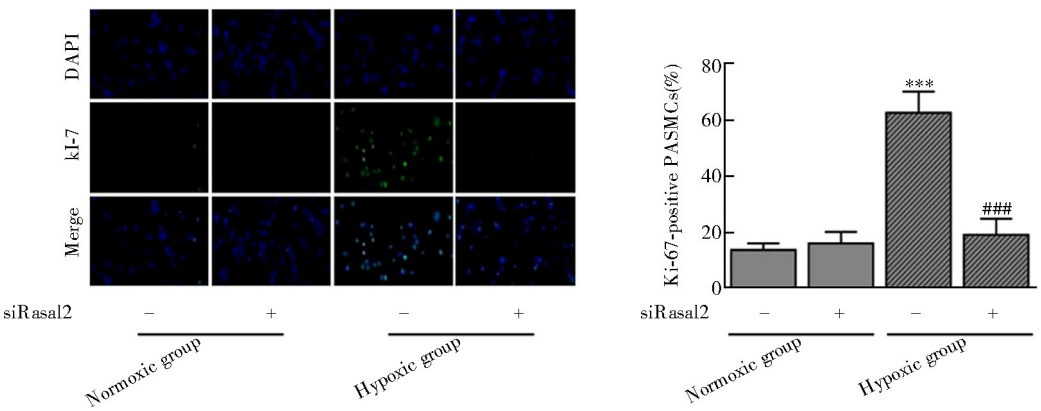


图 3 各组 PASMCs Ki-67 免疫荧光染色比较

Figure 3 Immunofluorescence staining of Ki-67 in different groups (×400)

Compared with Normoxic+siCon group, *** $P<0.001$; compared with Hypoxic+siCon group, ### $P<0.001$. PASMCs: pulmonary arterial smooth muscle cells; siRasal2: Rasal2 siRNA; siCon: control siRNA; DAPI: 4′,6-diamidino-2-phenylindole.

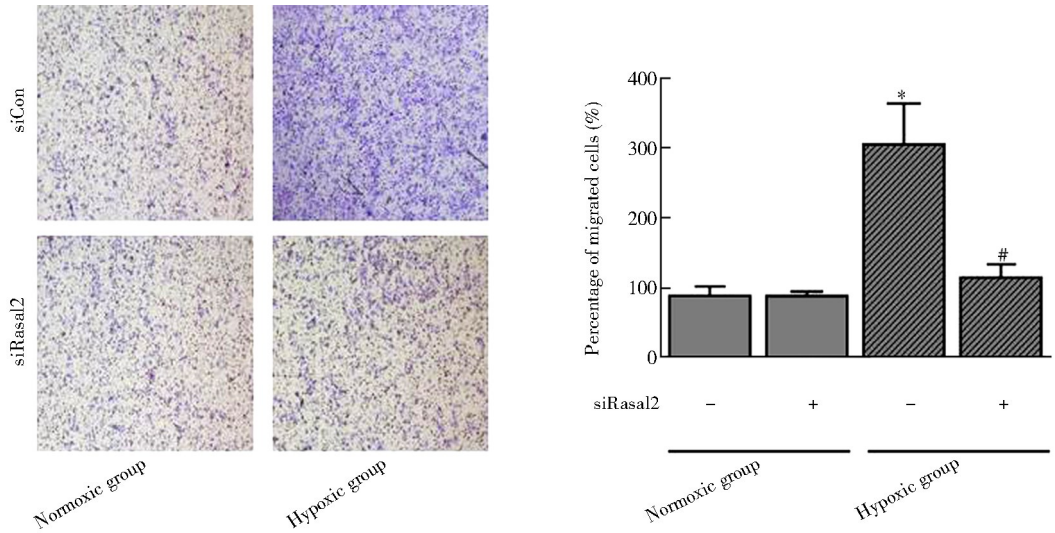


图 4 各组 PASMCs Transwell 分析

Figure 4 Transwell assay of PASMCs in different groups (×100)

Compared with Normoxic+siCon group, $^{*}P<0.05$; compared with Hypoxic+siCon group, $^{\#}P<0.05$. PASMCs: pulmonary arterial smooth muscle cells; siRasal2: Rasal2 siRNA; siCon: control siRNA.

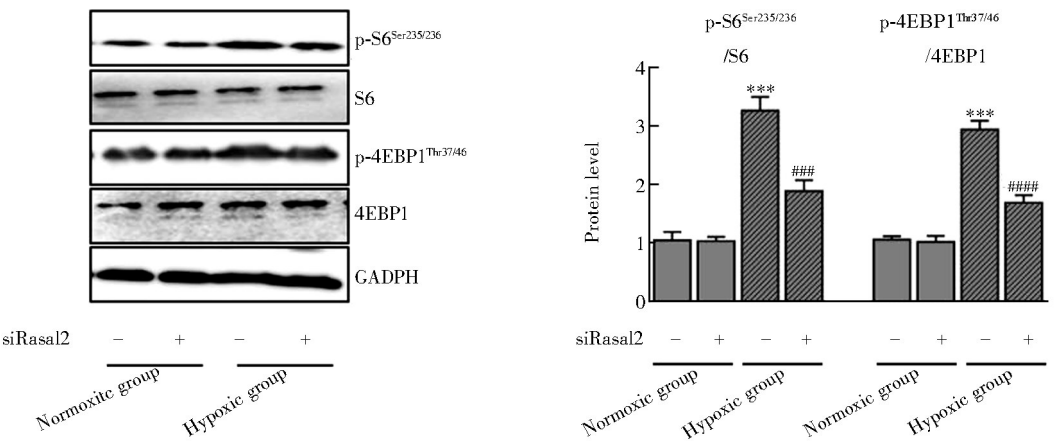


图 5 各组 mTORC1 下游通路蛋白表达情况

Figure 5 Expression of mTORC1-associated proteins in different groups

Compared with Normoxic+siCon group, $^{***}P<0.001$; compared with Hypoxic+siCon group, $^{\#\#\#}P<0.001$. mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1; siRasal2: Rasal2 siRNA; siCon: control siRNA.

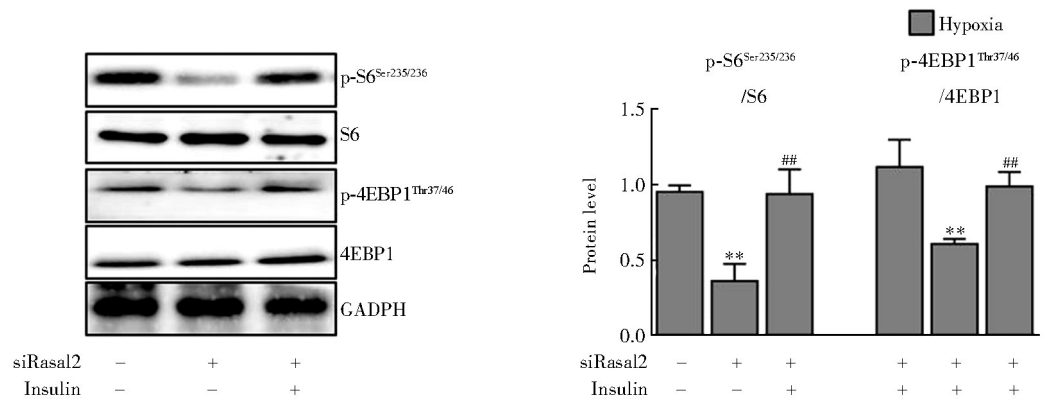


图 6 各组 mTORC1 下游通路蛋白表达情况

Figure 6 Expression of mTORC1-associated proteins in different groups

Compared with Vehicle+siCon group, $^{**}P<0.01$; compared with Vehicle+siRasal2 group, $^{\#\#}P<0.01$. mTORC1: mammalian target of rapamycin complex 1; siRasal2: Rasal2 siRNA; siCon: control siRNA.

2.6 恢复 mTORC1 活性对 PASMCs 迁移的影响

为了探索 mTORC1 在 Rasal2 调控 PASMCs 迁移中的作用，我们利用胰岛素处理细胞恢复 mTORC1 活性。在沉默了 Rasal2 表达的基础上，使用胰岛素恢复 mTORC1 活性后迁移细胞百分比明显升高[(315.00±21.49)%和(141.00±15.30)%，$P<0.001$]；而在胰岛素恢复 mTORC1 活性的基础上，siRasal2 对低氧所致 PASMCs 迁移的抑制作用消失了[(315.00±21.49)%和(111.25±16.09)%，$P<0.001$；图 8]。

3 讨 论

本研究旨在探索 Rasal2 在低氧所致 PASMCs 增殖和迁移中的作用机制研究，主要发现总结如下：(1)Rasal2 蛋白表达水平在慢性低氧小鼠的肺动脉组织和低氧处理的 PASMCs 中均明显增高；(2)沉默 Rasal2 表达抑制低氧所致 PASMCs 过度增殖和迁移；(3)沉默 Rasal2 表达抑制低氧所致 PASMCs 中 mTORC1 过度活化，主要体现在下游效应分子 S6 和 4EBP1 的去磷酸化；(4)胰岛素恢复 mTORC1 活性后，Rasal2 沉默对低氧所致 PASMCs 增殖和迁移的抑制作用消失。这些发现表明 Rasal2 可能成为防治 PAH 的新的关键靶分子。

Rasal2 是属于 RAS GTP 酶活化蛋白家族的一员，参与调控细胞增殖、糖脂代谢活动等[7]。有文献报道 Rasal2 参与血管生理病理方面的调控，例如血管新生过程[9]。另有研究发现受 Rasal2 调控的包含撕裂元活化蛋白激酶在内的多种蛋白也在 PAH 发生发展中发挥重要作用[13]。我们当前研究也发现 Rasal2 在血管组织中表达丰富。然而，Rasal2 在 PAH 中的作用鲜有研究。在 PAH 的发生发展中，PASMCs 的表型转换作用十分关键，主要表现为过度的异常迁移和增殖。我们当前的研究中，使用低氧的条件刺激 PASMCs，Rasal2 的表达水平显著提升。低氧明显促进了 PASMCs 的增殖和迁移，而通过 siRNA 外源性沉默了 Rasal2 的表达后，低氧对增殖、迁移的促进效应消失了。本实验中 Rasal2 对 PASMCs 增殖、迁移的促进效应也与文献报道中对多种肿瘤细胞增殖、迁移的促进作用相似[6,8]。以上研究结果表明，Rasal2 升高是低氧所致 PASMCs 异常增殖、迁移的分子机制之一。然而，Rasal2 如何调控 PASMCs 的增殖和迁移尚不清楚。

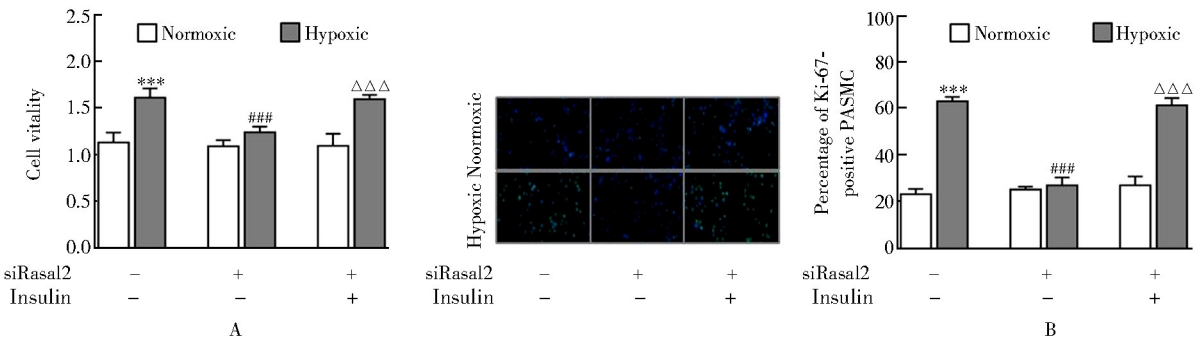


图 7 各组 PASMC CCK-8 活性及 Ki-67 免疫荧光染色

Figure 7 CCK-8 assay and immunofluorescence staining of Ki-67 in different groups (×400)

Compared with Normoxic+siCon group, *** $P<0.001$; compared with Hypoxic+siCon group, ### $P<0.001$; compared with Hypoxic+siRasal2 group, △△△ $P<0.001$. PASMCs: pulmonary arterial smooth muscle cells; siCon: control siRNA.

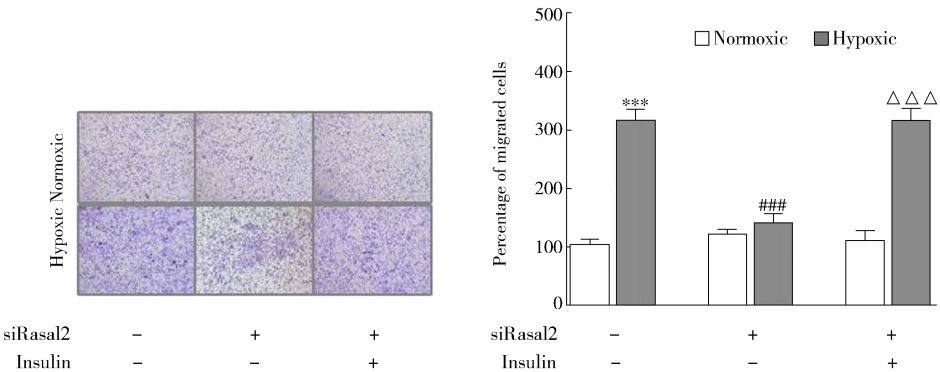


图 8 各组 PASMCs Transwell 分析

Figure 8 Transwell assay of PASMCs in different groups (×100)

Compared with Normoxic+siCon group, *** $P<0.001$; compared with Hypoxic+siCon group, ### $P<0.001$; compared with Hypoxic+siRasal2 group, △△△ $P<0.001$. PASMCs: pulmonary arterial smooth muscle cells; siRasal2: Rasal2 siRNA; siCon: control siRNA.

mTORC1 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,其可以调控包括增殖、生长、存活及迁移等多种生物过程[14,15]。既往研究已经明确 mTORC1 是 PAH 发生发展中的核心调控因子之一[16]。也有研究报道了 mTORC1 可诱导 PASMCs 表型转换,从而参与 PAH 发生发展。例如,慢性缺氧诱导 mTOR 和 S6(mTORC1 下游核心效应分子)磷酸化增强,并促进大鼠 PASMCs 增殖过程[17]。此外,另有研究报道 mTOR 信号参与血管内膜增生过程中的 SMC 迁移调控[18]。然而,mTORC1 信号在 PASMCs 中是否受 Rasal2 调控并不清楚。在本研究中,我们同样发现低氧可以激活 mTORC1 信号,而沉默 Rasal2 表达后则显著抑制了 mTORC1 活性。因此,我们猜测 mTORC1 可能是 Rasal2 调控 PASMCs 增殖、迁移的重要分子机制。进一步研究发现,使用胰岛素恢复 mTORC1 活性后,siRasal2 对 PASMCs 增殖、迁移的抑制作用消失了。该结果提示 Rasal2 调控的 PASMCs 表型转换是 mTORC1 依赖型的。

综上,本研究表明,Rasal2 可能通过 mTORC1 途径加重肺血管重构。本研究尚有以下不足:一是 mTORC1 的机制在体外得到证实,但在体内是否能复制尚需进一步研究;二是 Rasal2 调节 mTORC1 活性的上游机制尚未明确。我们的发现也许能够为研发改善肺动脉高压患者的临床预后情况的药物提供借鉴和参考。

【参考文献】

[1] Kahraman BO, Savci S, Ozsoy I, *et al*. Effects of neuromuscular electrical stimulation in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized controlled pilot study[J]. J Cardiol, 2020, 75(6): 702-708. DOI: 10.1016/j.jjcc.2019.12.013.

[2] Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, *et al*. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension[J]. Nat Rev Cardiol, 2011, 8(8): 443-455. DOI: 10.1038/nrcardio.2011.87.

[3] Zhang W, Shu C, Li Q, *et al*. Adiponectin affects vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis through modulation of the mitofusin-2-mediated Ras-Raf-Erk1/2 signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3): 4703-4707. DOI: 10.3892/mmr.2015.3899.

[4] Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, *et al*. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era[J]. Circulation, 2010, 122(2): 156-163. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.911818.

[5] Lawrence MC, Jivan A, Shao C, *et al*. The roles of MAPKs in disease[J]. Cell Res, 2008, 18(4): 436-442. DOI: 10.1038/cr.2008.37.

[6] Pan Y, Tong J, Lung R, *et al*. RASAL2 promotes tumor progression through LATS2/YAP1 axis of hippo signaling pathway in colorectal cancer[J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 102. DOI: 10.1186/s12943-018-0853-6.

[7] Zhou B, Zhu W, Jiang X, *et al*. RASAL2 plays inconsistent roles in different cancers[J]. Front Oncol, 2019, 9: 1235. DOI: 10.3389/fonc.2019.01235. eCollection2019.

[8] Feng M, Bao Y, Li Z, *et al*. RASAL2 activates RAC1 to promote triple-negative breast cancer progression[J]. J Clin Invest, 2014, 124(12): 5291-5304. DOI: 10.1172/JCI76711.

[9] Hui K, Yue Y, Wu S, *et al*. The expression and function of RASAL2 in renal cell carcinoma angiogenesis[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(9): 881. DOI: 10.1038/s41419-018-0898-x.

[10] Ren L, Zhang Z, Feng Y, *et al*. MicroRNA-876-5p represses the cell proliferation and invasion of colorectal cancer through suppressing YAP signalling *via* targeting RASAL2[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2020, 47(5): 867-876. DOI: 10.1111/1440-1681.13264.

[11] Li Y, Yang L, Dong L, *et al*. Crosstalk between the Akt/mTORC1 and NF-kappaB signaling pathways promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension by increasing DPP4 expression in PASMCs[J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(10): 1322-1333. DOI: 10.1038/s41401-019-0272-2.

[12] Kim JH, Kim N. Signaling pathways in osteoclast differentiation[J]. Chonnam Med J, 2016, 52(1): 12-17. DOI: 10.4068/cmj.2016.52.1.12.

[13] Yang H, Lu Y, Yang H, *et al*. Integrated weighted gene co-expression network analysis uncovers STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) and IFI44L (interferon-induced protein 44-like) as key genes in pulmonary arterial hypertension[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 6021-6034. DOI: 10.1080/21655979.2021.1972200.

[14] Jellusova J. The role of metabolic checkpoint regulators in B cell survival and transformation[J]. Immunol Rev, 2020, 295(1): 39-53. DOI: 10.1111/imr.12855.

[15] Fernandes H, Moura J, Carvalho E. mTOR signaling as a regulator of hematopoietic stem cell fate[J]. Stem Cell Rev Rep, 2021, 17(4): 1312-1322. DOI: 10.1007/s12015-021-10131-z.

[16] Aghamohammadzadeh R, Zhang YY, Stephens TE, *et al*. Up-regulation of the mammalian target of rapamycin complex 1 subunit Raptor by aldosterone induces abnormal pulmonary artery smooth muscle cell survival patterns to promote pulmonary arterial hypertension[J]. FASEB J, 2016, 30(7): 2511-2527. DOI: 10.1096/fj.201500042.

[17] Krymskaya VP, Snow J, Cesarone G, *et al*. mTOR is required for pulmonary arterial vascular smooth muscle cell proliferation under chronic hypoxia[J]. FASEB J, 2011, 25(6): 1922-1933. DOI: 10.1096/fj.10-175018.

[18] Jain M, Dhanesha N, Doddapattar P, *et al*. Smooth muscle cell-specific fibronectin-EDA mediates phenotypic switching and neointimal hyperplasia[J]. J Clin Invest, 2020, 130(1): 295-314. DOI: 10.1172/JCI124708.

(编辑:温玲玲)