

· 基础研究 ·

缺氧下调FTO并促进小鼠肺动脉平滑肌细胞迁移

史薪炜,钱 骏,袁 超,史阳阳,孙 凯*

南京医科大学第一附属医院急诊医学科,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探究脂肪质量与肥胖相关蛋白(fat mass and obesity associated protein, FTO)对缺氧小鼠肺动脉平滑肌细胞(mouse pulmonary artery smooth muscle cell, MPASMC)迁移能力的影响。方法:体外培养 MPASMC,用三气培养箱构建缺氧 MPASMC 模型;免疫印迹实验用于检测 FTO 蛋白表达;FTO 过表达以及敲低质粒转染 MPASMC 以过表达或抑制 FTO 表达;细胞划痕实验检测细胞迁移能力。结果:缺氧培养后的 MPASMC 中 FTO 蛋白表达明显下调,划痕实验提示细胞迁移加快,并在过表达 FTO 后明显减慢;常氧状态下敲低 FTO 表达出现了类似缺氧培养的“促迁移”表型。结论:在体外条件下 MPASMC 缺氧培养后 FTO 蛋白水平下调,细胞迁移能力增强,并且 FTO 可能是促进 MPASMC 迁移的关键调控基因。

[关键词] 肺高压;脂肪质量与肥胖相关蛋白;细胞迁移**[中图分类号]** R544.16**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)06-802-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20230608

Hypoxia down-regulates FTO and promotes migration of mouse pulmonary artery smooth muscle cells

SHI Xinwei, QIAN Jun, YUAN Chao, SHI Yangyang, SUN Kai*

Department of Emergency Medicine, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** The current study aims to investigate the effect of fat mass and obesity associated protein (FTO) on the migration of hypoxia-inoluced pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC). **Methods:** MPASMC was cultured *in vitro*. The hypoxia model of MPASMC was established in a three-gas incubator (37°C, 1% O₂, 5% CO₂). The expression of FTO protein was detected by Western blot. FTO overexpression and knockdown plasmids were transfected into MPASMC to over-express or inhibit FTO expression, respectively. Cell wound healing assay was used to detect cell migration ability. **Results:** The expression of FTO protein in MPASMC after hypoxia culture was significantly down-regulated. Wound healing assay indicated that MPASMC migration was accelerated after hypoxia culture and was significantly slowed down after FTO overexpression in MPASMC. Knockdown FTO expression in MPASMC in normoxia showed a “pro-migration” phenotype similar to hypoxic culture. **Conclusion:** Under hypoxic conditions, the expression of FTO protein is down-regulated in MPASMC and the cells migration ability is enhanced. FTO may be a key regulator of MPASMC migration.

[Key words] pulmonary hypertension; fat mass and obesity associated protein; cell migration

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(06): 802-806]

肺高压(pulmonary hypertension, PH)是一类由多种病因和发病机制引起肺血管结构和功能障碍,进而导致肺循环阻力和肺动脉压力升高的临床综合征。缺氧是PH最常见的原因之一,能促进肺血管持续收缩,增加肺循环阻力^[1]。肺血管重构(pul-

[基金项目] 国家自然科学基金(81871544);江苏省自然科学基金(BK20181493)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sunkai@njmu.edu.cn

monary vascular remodeling, PVR)是PH发展过程中的关键环节,包括肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC)的异常增殖和迁移^[2],其中PASMC向内膜的迁移往往预示着肺动脉的不可逆增厚和肌化,PVR过程难以逆转^[3]。脂肪质量和肥胖相关蛋白(fat mass and obesity associated protein, FTO)与机体能量摄入以及代谢调节相关^[4],也是最早被发现的m6A(N6-methyladenosine)去甲

基化修饰酶^[5]。FTO能够通过氧化作用移除m6A修饰,广泛参与mRNA的翻译、剪切、核输出及降解等影响mRNA命运的过程^[6-7]。研究表明,FTO参与了PH的发生^[8-9],FTO在PH中的具体作用目前仍未知。本研究拟在缺氧环境下培养小鼠肺动脉平滑肌细胞(mouse pulmonary artery smooth muscle cell, MPASMC),构建体外模型以探究FTO是否对缺氧MPASMC的迁移发挥作用。

1 材料和方法

1.1 材料

MPASMC购自中国科学院上海细胞库;DMEM培养基、胎牛血清(Gibco公司,美国);RIPA裂解液(北京Solarbio公司);抗 β -actin、抗FTO抗体、HRP标记山羊抗兔二抗(Abcam公司,美国);脂质体Lipofectamine™ 3000、增强型ECL试剂盒(Invitrogen公司,美国);FTO过表达质粒(上海吉玛公司);小鼠FTO siRNA(siFTO, sc-75003)及阴性对照 siNC(sc-36869)(Santa公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 MPASMC缺氧培养

MPASMC在含有10%胎牛血清、1%双抗的DMEM培养基中培养,培养条件为37℃、5%CO₂,达到70%~80%融合后转入三气培养箱进行缺氧培养,调整培养条件为37℃、1%O₂、5%CO₂,在缺氧培养后12 h取出细胞备用。

1.2.2 细胞转染

过表达转染实验:FTO过表达质粒由吉玛公司构建,用PCR得到目的基因FTO序列片段,然后将其克隆到载体pcDNA3.1(+)中,再进行重组质粒测序,验证成功后抽提。转染按Lipofectamine™ 3000试剂说明书进行操作,在室温下转染5 μ g质粒DNA到MPASMC中。以空载体pcDNA3.1(+)作为对照。转染48 h后收集细胞,Western blot验证转染效率。

敲低转染实验:将冻干的siRNA在330 μ L无RNA酶的水中重悬备用,待6孔板中细胞长到70%~80%密度时,按Lipofectamine™ 3000试剂说明书,在室温下分别将5 μ g的siFTO及其阴性对照siNC转染至MPASMC细胞,转染48 h后收集细胞,Western blot验证转染效率。

1.2.3 Western blot检测 β -actin、FTO蛋白表达

用细胞刮刀刮下细胞,低温离心机以4℃、1 000 r/min条件离心5 min收集细胞;用RIPA裂解液提取细胞总蛋白,BCA法进行蛋白浓度定量;各

组取10 μ g总蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、5%脱脂奶粉溶液封闭1 h,根据蛋白分子量剪出合适的膜条带,分别与相应的一抗在4℃孵育过夜。TBST洗膜10 min $\times$ 2次后加入HRP标记的兔二抗(1:1 000)室温孵育1 h,再次洗膜后加入ECL发光剂于暗室中显影、曝光,采用Gel-Pro软件对蛋白灰度值进行定量分析。

1.2.4 划痕实验检测细胞迁移

用含2%胎牛血清的培养基替换原培养基以排除细胞本身增殖对实验结果的影响,使用200 μ L移液管的尖端在单层融合的MPASMC上划出数条划痕。在划痕后0、12 h用荧光显微镜拍摄图像,观察划痕宽度的变化情况。在每条边上共选取3个点,间隔均匀,并测量划痕两边的距离。细胞迁移率的计算公式如下:[划痕宽度(0 h)-划痕宽度(12 h)]/划痕宽度(0 h) $\times$ 100%。实验重复3次,并计算平均值。

1.3 统计学方法

所有数据均采用GraphPad Prism 8软件进行分析,正态分布的数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 缺氧处理后FTO表达变化

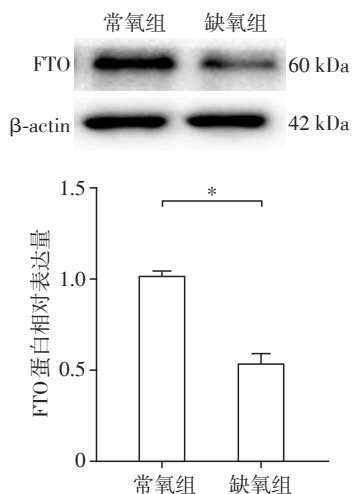
Western blot检测常氧和缺氧处理的MPASMC中的FTO蛋白表达水平,结果显示,与常氧组相比,缺氧组中FTO蛋白相对表达水平明显下降(1.01 ± 0.06 vs. 0.54 ± 0.04 , $P < 0.05$,图1)。

2.2 缺氧引起MPASMC迁移能力上调,过表达FTO预处理能显著减缓该过程

划痕实验显示,缺氧处理后MPASMC迁移速度显著加快[(74.63 ± 2.70)% vs. (54.17 ± 3.92)%, $P < 0.05$,图2],用FTO过表达质粒转染细胞,Western blot检测转染后FTO蛋白表达较转染空载体组明显上调(1.60 ± 0.03 vs. 0.99 ± 0.01 , $P < 0.05$,图3A),提示转染成功。而在过表达FTO后再进行缺氧培养,相比转染空载体组,MPASMC迁移速率显著减慢[(75.10 ± 1.19)% vs. (51.87 ± 2.57)%, $P < 0.05$,图4]。

2.3 常氧状态下敲低FTO促进MPASMC迁移

为进一步证明FTO对于MPASMC迁移能力的影响,在常氧培养条件下敲低FTO表达,再次检测MPASMC迁移能力。Western blot结果显示,敲低组(siFTO组)FTO蛋白表达较阴性对照组(siNC组)显著下调,提示敲低成功(0.29 ± 0.04 vs. 1.10 ± 0.02 , $P <$



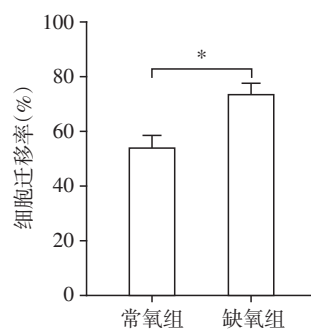
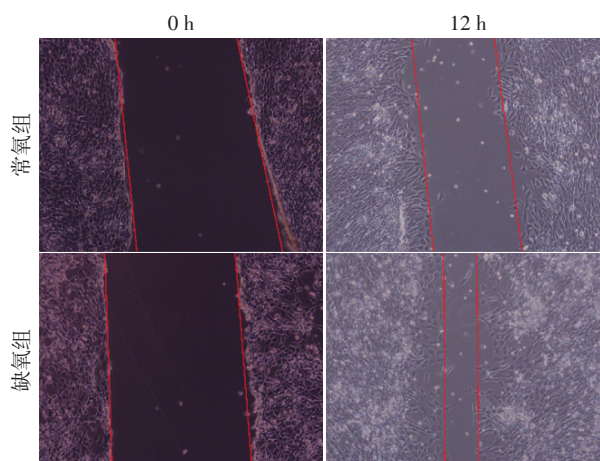
两组比较, $P < 0.05$ ($n=3$)。

图1 MPASMC常氧及缺氧培养条件下FTO蛋白表达水平
Figure 1 FTO protein expression levels in MPASMC cultured under normoxic and hypoxic conditions

0.05,图3B)。划痕实验显示,siFTO组相比siNC组,迁移速率显著加快 $[(85.00 \pm 1.98)\% \text{ vs. } (53.20 \pm 1.96)\%, P < 0.05$,图5]。

3 讨论

PH中PVR包括一系列血管结构和功能的复杂变化,对其机制的研究是研发PH靶向药物的重要依据^[10]。生理状态下,肺动脉内膜为肺循环血流提供了巨大而通畅的接触表面,能够维持肺循环较低的灌注压力,有利于气体交换^[11]。肺动脉中膜主要由肺动脉平滑肌细胞构成,是诱发PVR的基础。研究表明,在缺氧、炎症等外界因素刺激下,肺动脉平滑肌细胞异常增殖,引起肺血管增厚以及管腔狭窄,并向内膜迁移,使得肺血管结构和功能异常,肺血管灌注压不可逆上升,最终导致PH发生^[12]。本研究发现,MPASMC迁移能力增强是缺氧性PH模



两组比较, $P < 0.05$ ($n=3$)。

图2 划痕实验检测MPASMC在常氧和缺氧条件下的迁移能力(×200)

Figure 2 Wound healing assay was used to detect the migration ability of MPASMC under normoxic and hypoxic conditions(×200)

型的显著表型特征。Wang等^[13]研究得出了相似结果,并且表明PASMC的迁移能力改变受到表观遗传调控,有着复杂的分子机制。因此,结合进一步的动物实验深入探究肺动脉平滑肌细胞迁移的过程,以寻找PH潜在的治疗靶点,具有重要意义。

FTO是最早被确定的m6A去甲基化酶,它的发现使研究者认识到m6A修饰是一个动态可逆的过

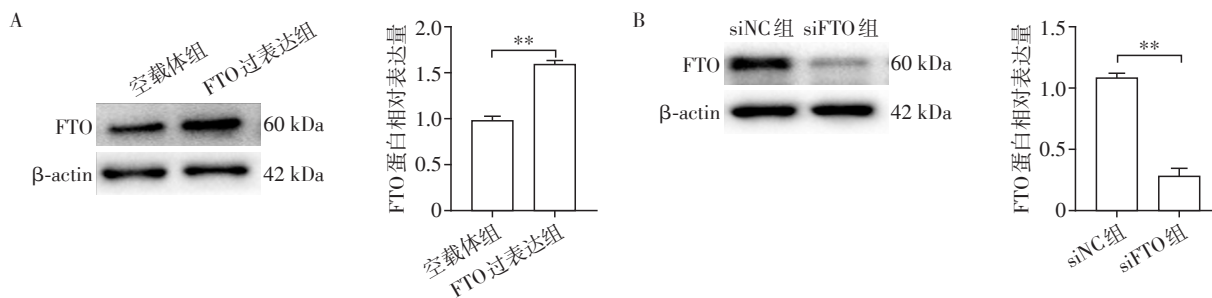


图3 FTO过表达及敲低转染效率验证
Figure 3 Validation of transfection efficiency after FTO overexpression or knockdown

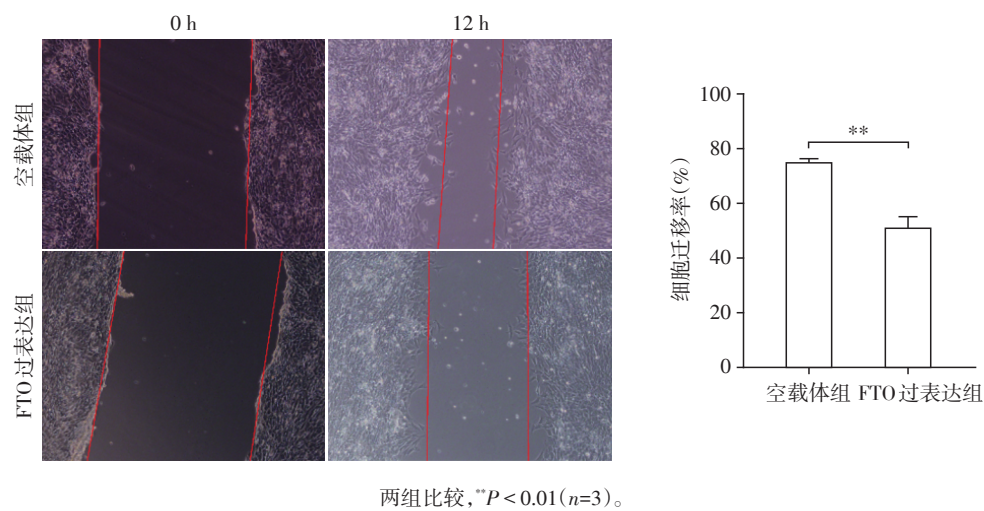


图4 缺氧条件下过表达FTO的MPASMC迁移能力的变化(×200)

Figure 4 Changes in migration ability of MPASMC with FTO overexpression under hypoxic conditions (×200)

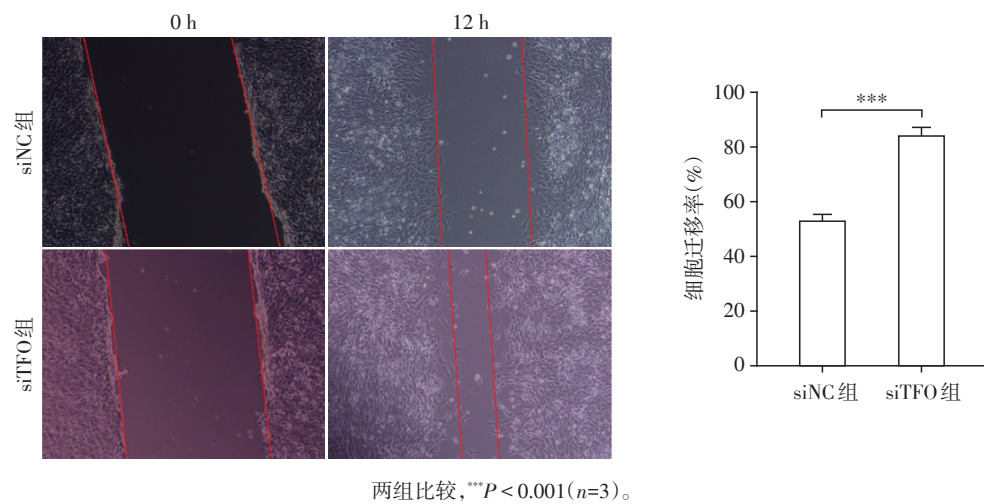


图5 常氧状态下敲低FTO表达后MPASMC迁移能力的变化(×200)

Figure 5 Changes in migration ability of MPASMC after FTO knockdown under normoxia conditions (×200)

程^[5]。m6A 修饰属于表观遗传学的范畴,是真核生物 mRNA 中最常见的内部修饰,广泛参与了组织发育、性别产生、肿瘤发生等重要的生物学过程^[14-16]。FTO 介导的 m6A 去甲基化过程对于肿瘤细胞的迁移调控已经在多项研究中得到证实^[17-19]。Zeng 等^[8]在野百合碱致肺动脉高压大鼠 m6A mRNA 甲基化的综合分析中发现,大鼠 PH 模型中 FTO 表达明显减低。作者的另一项基于缺氧性 PH 模型的 m6A 表观转录组芯片 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE218412>) 结果也显示,缺氧下调了 MPASMC 中 FTO 的表达水平,进一步验证了 FTO 在 PH 模型中的表达改变。本研究探讨了 FTO 对 MPASMC 迁移能力的影响,发现缺氧引起的 FTO 水平下调是导致 MPASMC 迁移能力增强的关键调控因素。值得注意的是, Ma 等^[20]发现,主动脉夹层动

脉瘤患者动脉平滑肌细胞中,FTO 表达上调,并能促进主动脉平滑肌细胞增殖和迁移,分析该研究与本研究的异同,认为这种差异是由主动脉和肺动脉病变原因不同导致的。主动脉夹层动脉瘤的一大危险因素是血脂异常升高,这与 FTO 促进脂肪增长的作用相关,而在本研究构建 PH 模型的过程中,MPASMC 缺氧抑制了 FTO 表达,这可能是其 m6A 修饰水平上调的重要原因。此外, m6A 修饰的变化所产生的下游效应取决于特定的 m6A 阅读蛋白识别靶基因的功能,并且缺氧诱导因子-1 α 通路^[21]、MAPK/ERK 通路^[22-23]等 PH 发病过程中发挥重要作用的信号通路已被证明能够调控细胞病理性迁移,相关通路及基因是否能够作为 FTO 介导的 m6A 下游靶点调控 PASM 迁移将是一个值得后续研究的方向。

综上所述,本研究通过构建 MPASMC 细胞体外 PH 模型,证实了 FTO 对缺氧所引起的 MPASMC 迁移的影响,在本研究的基础上,进一步探究 FTO 所介导的 m6A 去甲基化过程调控 PASMC 迁移的确切分子机制,可为 PH 机制和治疗靶点研究提供新思路。

[参考文献]

- [1] MCLOUGHLIN P. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: building a solid base [J]. *Exp Physiol*, 2018, 103 (9): 1181-1182
- [2] HUETSCH J C, SURESH K, SHIMODA L A. Regulation of smooth muscle cell proliferation by NADPH oxidases in pulmonary hypertension [J]. *Antioxidants (Basel)*. 2019, 8(3):56
- [3] TAJISIC T, MORRELL N W. Smooth muscle cell hypertrophy, proliferation, migration and apoptosis in pulmonary hypertension[J]. *Compr Physiol*, 2011, 1(1):295-317
- [4] AZZAM S K, ALSAFAR H, SAJINI A A. FTO m6A demethylase in obesity and cancer: implications and underlying molecular mechanisms [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (7):3800
- [5] JIA G, FU Y, ZHAO X, et al. N6-methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO[J]. *Nat Chem Biol*, 2011, 7(12):885-887
- [6] MÜLLER S, GLAB M, SINGH A K, et al. IGF₂BP₁ promotes SRF-dependent transcription in cancer in a m6A- and miRNA-dependent manner [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(1):375-390
- [7] LI Q, NI Y, ZHANG L R, et al. HIF-1 α -induced expression of m6A reader YTHDF₁ drives hypoxia-induced autophagy and malignancy of hepatocellular carcinoma by promoting ATG2A and ATG14 translation [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021(3):988-1000
- [8] ZENG Y, HUANG T, ZUO W, et al. Integrated analysis of m6A mRNA methylation in rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(14):18238-18256
- [9] XU S, XU X, ZHANG Z, et al. The role of RNA m6A methylation in the regulation of postnatal hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1):121
- [10] XIAO Y, CHEN P P, ZHOU R L, et al. Pathological mechanisms and potential therapeutic targets of pulmonary arterial hypertension: a review [J]. *Aging Dis*, 2020, 11 (6): 1623-1639
- [11] STENMARK K R, FAGAN K A, FRID M G. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms [J]. *Circ Res*, 2006, 99(7):675-691
- [12] TUDER R M. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367 (3): 643-649
- [13] WANG Y, HUANG X X, LENG D, et al. Effect of EZH2 on pulmonary artery smooth muscle cell migration in pulmonary hypertension [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(2):129
- [14] XU K, YANG Y, FENG G H, et al. Mettl3-mediated m6A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation [J]. *Cell Res*, 2017, 27(9):1100-1114
- [15] CHEN Y, ZHAO Y, CHEN J, et al. ALKBH5 suppresses malignancy of hepatocellular carcinoma via m6A-guided epigenetic inhibition of LYPD1 [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19 (1):123
- [16] DENG X, SU R, FENG X, et al. Role of N6-methyladenosine modification in cancer [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2018, 48:1-7
- [17] LIU J, REN D, DU Z, et al. m6A demethylase FTO facilitates tumor progression in lung squamous cell carcinoma by regulating MZF1 expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 502(4):456-464
- [18] SUN J, MA X, YING Y, et al. SMAD3 and FTO are involved in miR-5581-3p-mediated inhibition of cell migration and proliferation in bladder cancer [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1):199
- [19] XU Y Y, YE S, ZHANG N, et al. The FTO/miR-181b-3p/ARL5B signaling pathway regulates cell migration and invasion in breast cancer [J]. *Cancer Commun (Lond)*, 2020(10):484-500
- [20] MA D, LIU X, ZHANG J J, et al. Vascular smooth muscle FTO promotes aortic dissecting aneurysms via m6A modification of Klf5 [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7: 592550
- [21] HAN X J, ZHANG W F, WANG Q, et al. HIF-1 α promotes the proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells via activation of Cx43 [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(22):10663-10673
- [22] GUO M, ZHANG M, CAO X, et al. Notch4 mediates vascular remodeling via ERK/JNK/P38 MAPK signaling pathways in hypoxic pulmonary hypertension [J]. *Respir Res*, 2022, 23(1):6
- [23] SAMSON S C, KHAN A M, MENDOZA M C. ERK signaling for cell migration and invasion [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 9:998475

[收稿日期] 2023-02-13
(本文编辑:陈汐敏)