DOI:10.16016/j.2097-0927.202407096

缺氧特异性诱导肺血管内皮细胞黏附分子3表达以促进单核细胞黏附

孟祥琼[1,2],陈 婷[2,3],谢宏晨[1,2],杨诚忠[2,4],范 旭[2,5],谭小玲[1,2] 陆军军医大学(第三军医大学)高原军事医学系:[1]寒区医学教研室,[2]极端环境医学教育部重点实验室,[3]高原生理学与病理学教研室,重庆;[4]重庆市妇幼保健院(重庆医科大学附属妇女儿童医院)生殖医学中心,重庆;[5]湖北民族大学医学部,湖北恩施

[摘要] **目的** 探究细胞黏附分子3(cell adhesion molecular 3, CADM3)在肺血管内皮细胞上的表达特异性,分析其介导单核细胞特异性黏附的作用,探讨缺氧诱导肺血管外周单核细胞浸润的新机制。**方法** 以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)、大鼠肺血管内皮细胞(rat pulmonary vascular endothelial cell, rPEC)和大鼠主动脉内皮细胞(rat aortic endothelial cell, rAEC)为细胞模型,分为常氧(21%O_2)对照组和缺氧(1%O_2或5%O_2)处理组。通过分析缺氧8 h HUVEC的转录组数据,筛选差异表达的CADM3。通过细胞黏附实验、siRNA干扰、免疫细胞化学技术、Western blot技术和流式细胞术,分析CADM3在缺氧HUVEC与单核细胞特异性高黏附中的作用;通过铁螯合剂-去铁胺(deferoxamine,DFX)和shRNA干扰调节HIF-1α表达,分析HIF-1转录活性对CADM3表达的影响。**结果** 缺氧HUVEC中CADM3表达增加,在缺氧6~8 h达到最高,随后下降;靶向CADM3的siRNA转染后,与阴性对照组比较,CADM3的表达降低,缺氧HUVEC和U937细胞的黏附率显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与常氧(21%O_2)溶剂对照组比较,DFX(100 μmol/L)处理的HUVEC中HIF-1α及其靶蛋白STC2蛋白水平增加;靶向HIF-1α的shRNA转染后,与阴性对照组比较,HIF-1α及其靶蛋白STC2蛋白水平下降,但CADM3蛋白表达均无变化。缺氧rPEC中CADM3的蛋白水平及其在细胞膜上的分布均增加,与rPEC细胞比较,rAEC细胞中未检测到CADM3的蛋白表达;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(5 μg/mL)处理后,常氧或缺氧培养的rPEC细胞中HIF-1α和CADM3表达均无明显变化。缺氧rPEC与外周血白细胞中$CD11b^+$细胞的黏附比率最高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。抗CADM3抗体孵育后,与Blank组比较,缺氧rPEC与U937细胞的黏附显著下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 缺氧以特异地非HIF-1依赖的方式诱导肺血管内皮细胞中CADM3的表达,促进缺氧诱导的肺血管内皮细胞与单核细胞的特异性黏附。

[关键词] 缺氧;细胞黏附;肺血管内皮细胞;单核细胞;细胞黏附分子3
[中图法分类号] R322.12;R331.142;R364.4 [文献标志码] A

Hypoxia specifically induces CADM3 expression in pulmonary endothelial cells and promotes monocyte adhesion

MENG Xiangqiong[1,2], CHEN Ting[2,3], XIE Hongchen[1,2], YANG Chengzhong[2,4], FAN Xu[2,5], TAN Xiaoling[1,2]
[1]Department of Cold Region Medicine, [2]Key Laboratory of Extreme Environmental Medicine of Ministry of Education, [3]Department of Plateau Physiology and Pathology, Faculty of High Altitude Military Medicine, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing; [4]Center for Reproductive Medicine, Chongqing Health Center for Women and Children (Women and Children Hospital of Chongqing Medical University), Chongqing; [5]Medical School, Hubei Minzu University, Enshi, Hubei, China

[**Abstract**] Objective To investigate the expression profile of cell adhesion molecular 3 (CADM3)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(32071122)
[通信作者] 谭小玲, E-mail:2507973466@qq.com

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
引用格式:孟祥琼,陈婷,谢宏晨,等. 缺氧特异性诱导肺血管内皮细胞黏附分子3表达以促进单核细胞黏附[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(01):51-59. DOI:10.16016/j.2097-0927.202407096.
Citation: MENG X Q, CHEN T, XIE H C, *et al*. Hypoxia specifically induces CADM3 expression in pulmonary endothelial cells and promotes monocyte adhesion[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(01): 51-59. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202407096.

on pulmonary endothelial cells, analyze its role in mediating specific adhesion to monocyte, and explore a new mechanism of hypoxia inducing peripheral monocyte infiltration in pulmonary vessels. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), rat pulmonary vascular endothelial cells (rPEC), and rat aortic endothelial cells (rAEC) were subjected, and divided into normoxic ($21\%O_2$) control group and hypoxic ($1\%O_2$ or $5\%O_2$) treatment group. Analyzing the transcriptome data of HUVEC exposure to hypoxia for 8 h screened a differentially expressed molecule, CADM3. Cell adhesion experiments, siRNA interference, immunohistochemical assay, Western blotting, and flow cytometry were used to study the role of CADM3 in hypoxia specific high adhesion of HUVEC monocytes. Iron chelator deferoxamine (DFX) and shRNA interference were employed to enhance the expression of HIF-1α, and the effect of HIF-1 transcriptional activity on CADM3 expression was analyzed. **Results** Hypoxic treatment resulted in enhanced expression of CADM3 in HUVEC, and the expression level reached the peak at 6-8 h after hypoxia, and then decreased. Transfection with siRNA targeting CADM3 decreased the expression of CADM3, and significantly reduced the adhesion rate of hypoxic HUVEC-U937 cells when compared with the negative control group ($P<0.05$). Compared with the solvent control group, the protein levels of HIF-1α and its target protein STC2 in HUVEC treated with DFX (100 μmol/L) were increased. Transfection with shRNA targeting HIF-1α led the protein levels of HIF-1α and its target protein STC2 decreased, but had no effect on the protein expression of CADM3 in comparison to the negative control group. The protein level and distribution of CADM3 on the cell membrane were increased in hypoxic rPEC. No expression of CADM3 protein was found in the rAEC when compared with rPEC. After treatment with 5 μg/mL LPS, there were no significant changes in HIF-1α, STC2 and CADM3 in rPEC cultured under normoxia or hypoxia. The adhesion rate between hypoxia rPEC with $CD11b^+$ cells was the highest, with statistical significance ($P<0.01$). After incubation with anti-CADM3 antibody, the adhesion of hypoxic rPEC-U937 was significantly decreased compared with the solvent control group ($P<0.05$). **Conclusion** Hypoxia specifically induces the expression of CADM3 in pulmonary vascular endothelial cells in a HIF-1-independent manner, and promotes the specific adhesion of pulmonary vascular endothelial cells and monocytes induced by hypoxia.

[**Key words**] hypoxia; cell adhesion; pulmonary vascular endothelial cells; monocytes; cell adhesion molecular 3

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (32071122). Corresponding author: TAN Xiaoling, E-mail: 2507973466@qq.com

肺血管重构(pulmonary vascular remodeling, PVR)是指肺动脉在受到损伤或缺氧等刺激之后,血管壁组织结构及其功能发生病理改变的过程,对心血管健康有较严重危害,一旦发生,可因肺血管阻力进行性增高引起肺动脉高压,导致右心衰竭,甚至死亡[1]。临床上,因肺部疾病或高原低氧引起的缺氧性肺血管重构最为常见[2]。然而,缺氧引起肺血管重构的机制较为复杂,且目前仍缺乏有效的干预措施。

缺氧可直接激活肺组织炎症反应。由于肺组织与外界相通,且缺氧可直接激活肺泡巨噬细胞[3],因此,肺组织被认为是缺氧激活局部、乃至全身炎症的首发部位,突出表现为缺氧早期肺血管外周单核细胞浸润增加,而体循环血管外周(如主动脉、骨骼肌血管等其他血管外周)未观察到类似的炎症细胞浸润现象;如果耗竭外周血单核细胞后进行缺氧暴露,肺血管外周的单核细胞浸润明显减少,肺血管重构明显改善[4-5]。因此,靶向肺血管特异的单核细胞浸润,是干预PVR的有效途径,但具体机制尚不明确。在外周血白细胞浸润的过程中,白细胞黏附并穿过血管内皮是关键环节,而内皮细胞的缺氧活化是决定性因素[6]。基于缺氧特异性地诱导肺循环血管外周单核细胞浸润,推测与体循环血管内皮细胞比较,缺氧可能使肺血管内皮细胞具有更强的与单核细胞黏附的特性。本课题组前期研究证实,缺氧促进肺血管内皮细胞与单核细胞的特异性黏附,而对体循环来源的主动脉内皮细胞与单核细胞的黏附没有影响[7]。因此,深入研究肺血管内皮细胞的黏附特性,是探讨缺氧肺血管特异的单核细胞黏附机制的关键,但目前尚缺乏相关

研究。

本研究旨在筛选肺血管内皮细胞上特异表达的细胞黏附分子3(cell adhesion molecular 3, CADM3),研究其在单核细胞特异性黏附中的作用,探讨缺氧诱导肺血管外周单核细胞浸润的新机制,可为干预缺氧肺血管重构,防治缺氧肺动脉高压提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验细胞 人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)和大鼠肺血管内皮细胞(rat pulmonary vascular endothelial cell, rPEC)分别由陆军军医大学高原军事医学系陈德伟教授和高文祥教授惠赠;人外周血单核细胞系U937由陆军军医大学刘红梅硕士惠赠;大鼠主动脉内皮细胞(rat aortic endothelial cell, rAEC)由重庆医科大学戚迪博士惠赠。

1.1.2 实验试剂 DMEM高糖培养基、胰蛋白酶购自美国Hyclone公司;总RNA提取试剂盒购自美国Invitrogen公司;cDNA第一链合成试剂盒、TB Green Premix Ex *Taq* Ⅱ购自日本TaKaRa公司;自配尿素细胞裂解液[8 mol/L尿素,1 mol/L Tris(pH=6.8),20%SDS,10%甘油,1 mol/L DTT,1%Triton X-100,100 mmol/L PMSF];BCA蛋白浓度测定试剂盒、5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、抗体稀释液、DiI细胞膜绿色荧光探针、DAPI染色液、PBS缓冲液购自中国碧云天公司;1%多聚甲醛、4%多聚甲醛、5%BSA、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、Kisser封片剂购自中国Biosharp公司;Affinity™ ECL kit femtogram购自澳大利亚Affinity公司;HIF-1α激活剂-去铁胺(deferoxamine, DFX)购自德国Sigma公司;靶向CADM3的siRNA购自美国Thermo Fisher公司;靶向HIF-1α的shRNA购自中国GenePharma公司;抗HIF-1α抗体购自美国CST公司;抗STC2抗体、抗CADM3抗体购自美国Invitrogen公司;抗α-tubulin抗体、抗β-actin抗体购自英国Abcam公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG购自中国碧云天公司。

1.2 细胞模型及处理

HUVEC、rPEC、rAEC和U937细胞在DMEM高糖培养基中培养。常氧($21\%O_2$)对照组置于(37 ℃,$21\%O_2$,$5\%CO_2$、$74\%N_2$)普通培养箱中培养,缺氧($1\%O_2$)组(37 ℃,$1\%O_2$、$5\%CO_2$、$94\%N_2$)和缺氧($5\%O_2$)组(37 ℃,$5\%O_2$、$5\%CO_2$、$90\%N_2$)置于缺氧工作站内培养。

1.2.1 HUVEC细胞的处理条件及命名 HUVEC细胞分为9组:常氧对照组($21\%O_2$组)、缺氧($1\%O_2$)组($1\%O_2$组)、缺氧($5\%O_2$)组($5\%O_2$组)、常氧($21\%O_2$)+溶剂对照组、常氧($21\%O_2$)+DFX药物处理组、缺氧($1\%O_2$)+siRNA阴性对照组($1\%O_2$+siRNA-NC组)、缺氧($1\%O_2$)+siRNA转染组($1\%O_2$+siRNA-CADM3组)、缺氧($1\%O_2$)+shRNA阴性对照组($1\%O_2$+shRNA-NC组)、缺氧($1\%O_2$)+shRNA转染组($1\%O_2$+shRNA-HIF-1α组)。DFX溶于去离子水中,工作浓度为100 μmol/L。溶剂对照组加入等体积的溶剂。

1.2.2 rPEC细胞的处理条件及命名 rPEC细胞分为9组:常氧对照组($21\%O_2$组)、缺氧组($1\%O_2$组)、常氧($21\%O_2$)+溶剂对照组、常氧($21\%O_2$)+LPS药物处理组、缺氧($1\%O_2$)+溶剂对照组、缺氧($1\%O_2$)+LPS药物处理组、缺氧($1\%O_2$)+抗CADM3对照组(Blank组)、缺氧($1\%O_2$)+抗CADM3(1∶400)组(anti 400组)、缺氧($1\%O_2$)+抗CADM3(1∶200)组(anti 200组)。LPS溶于PBS中,工作浓度为5 μg/mL。

1.2.3 rAEC细胞的处理条件及命名 rAEC细胞分为6组:常氧对照组($21\%O_2$组)、缺氧组($1\%O_2$组)、常氧($21\%O_2$)+溶剂对照组、常氧($21\%O_2$)+LPS药物处理组、缺氧($1\%O_2$)+溶剂对照组、缺氧($1\%O_2$)+LPS药物处理组。LPS溶于PBS中,工作浓度为5 μg/mL。溶剂对照组加入等体积的溶剂。

1.3 转录组数据分析

由在线分析软件DAVID(http://david.abcc.ncifcrf.gov)进行基因表达谱聚类分析,按差异倍数(fold change,FC)≥1.5且$P\leq0.05$的标准,筛选HUVEC中与炎症相关的黏附基因。

1.4 RT-qPCR实验

*CADM3*和*β-actin*的特异性引物由擎科生物有限公司合成,引物序列见表1。利用总RNA提取试剂盒提取细胞总RNA,按照cDNA第一链合成试剂盒说明书合成cDNA第一条链,使用TB Green Premix Ex *Taq* Ⅱ进行荧光定量实验。选用*β-actin*作为参照基因,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法对各基因的mRNA表达半定量分析。

表1 RT-qPCR引物序列

引物	序列(5′→3′)
CADM3	正向:AGTGCCGTGAAAGACCATGAA
	反向:AGTGAAGATGGAGCATGTGTACT
β-actin	正向:CACCCGCGAGTACAACCTTC
	反向:CCCATACCCACCATCACACC

1.5 Western blot检测

收集细胞后,加入适量尿素细胞裂解液提取细胞总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度,依据浓度以及相关线性关系计算蛋白上样量。SDS-PAGE电泳分离蛋白,湿转法400 mA恒流转膜后,用5%BSA封闭蛋白结合位点,分别加入相应抗体液,4 ℃过夜孵育。TBST(1×)漂洗30 min后,加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗液(1∶1 000),室温孵育1 h,1×TBST漂洗30 min,ECL显影并采集图像。以β-actin或α-tubulin为内参,分析目的蛋白表达水平。

1.6 细胞转染实验

根据实验需求,按照Lipofectamine™ RNAiMAX细胞转染试剂使用说明,将shRNA和siRNA分别与Lipofectamine™ 2000轻轻混匀并在室温下孵育20 min,形成复合物,添加至各组细胞中,通过来回摇动平板轻轻混匀,根据实验条件分组并继续培养6 h。采用Western blot技术鉴定转染后的干扰效果。

1.7 免疫荧光技术检测

对相应细胞进行不同实验处理后,吸弃细胞培养上清,PBS漂洗后,4%多聚甲醛固定15 min。PBS漂洗后,Triton X-100(0.5%)室温处理20 min,PBS漂洗。经5%BSA工作液室温封闭1 h后,加入抗CADM3抗体液(1∶50)并4 ℃孵育过夜。次日,PBS清洗去除未结合抗体,加入辣根过氧化物酶标记的二抗液(1∶100)室温孵育1 h。DAPI染核10 min后,Kisser封片剂封片,采用激光共聚焦显微镜观察并采集图像。

1.8 外周血白细胞分离

采集大鼠股动脉血4 mL,加入外周血白细胞分离液,在4 ℃下以500×*g*离心10 min后,抽取中间白色环状层,PBS清洗3次,加入红细胞裂解液,裂解红细胞后,离心收集外周血白细胞沉淀,PBS清洗备用。

1.9 细胞黏附实验

参照课题组前期的实验步骤[10]实施。加入4 μL无水乙醇稀释的DiI(1 mg/mL)至U937细胞悬液中,室温孵育5 min后,PBS漂洗3次后重悬,完成细胞的荧光标记。将等量的DiI标记的U937细胞,分别加入21%O_2组、1%O_2组、1%O_2+siRNA-NC组、1%O_2+siRNA-CADM3组的HUVEC细胞中,孵育30 min后,PBS清洗3次,充分去除未黏附的U937细胞,加入4%多聚甲醛常温固定15 min,吸弃固定液,PBS清洗3次后,倒置荧光显微镜观察,每组采集图像5帧。对每个视野下内皮细胞的数目、与内皮细胞黏附的U937细胞的数目进行计数,根据公式计算U937细胞黏附率(细胞黏附率=与内皮细胞黏附的U937细胞数/总内皮细胞数×100%)。外周血白细胞加入缺氧rPEC细胞培养板中,37 ℃恒温培养箱孵育30 min,吸弃上清,PBS漂洗去除未黏附细胞。加入胰酶消化,离心收集细胞沉淀,采用流式细胞技术检测细胞类型和比率。

1.10 流式细胞术

将抗CADM3抗体液加入缺氧rPEC细胞中,缺氧(1%O_2)孵育1 h,PBS清洗后,加入等量的DiI标记的U937细胞悬液,继续孵育30 min。PBS清洗3次,充分去除未黏附的U937细胞,经胰酶消化制备成单细胞悬液,PBS清洗、重悬后,流式细胞仪(美国BD公司)检测DiI标记的细胞比例。在缺氧rPEC与外周血白细胞黏附实验后收集的细胞沉淀中,加入PBS制成悬液,分为4等份,分别加入1 μg/mL荧光偶联的抗CD11b抗体液、抗CD3抗体液、抗OX62抗体液或抗CD19抗体液,室温孵育30 min后,500×*g*离心5 min收集细胞,PBS清洗后,重悬于预冷的PBS中,流式细胞仪检测$CD11b^+$、$CD3^+$、$OX62^+$、$CD19^+$细胞的比率。

1.11 统计学分析

采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,各组均数进行配对样本*t*检验或单因素方差分析,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧HUVEC中差异表达的黏附因子

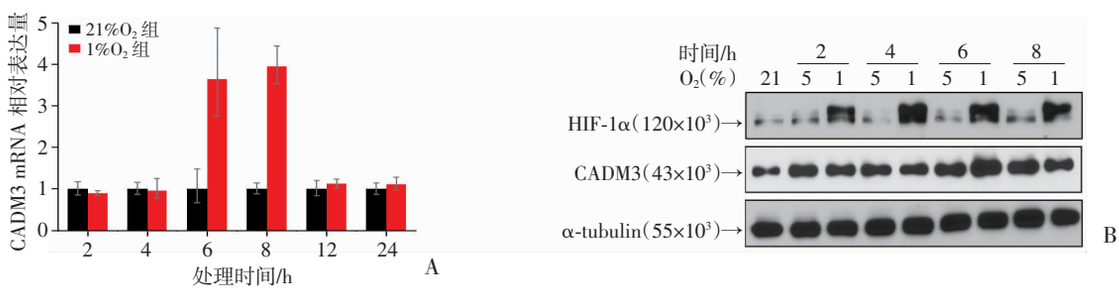
缺氧(1%O_2,8 h)HUVEC的转录组数据分析显示,9种细胞黏附分子的差异表达具有统计学意义(表2)。已有报道,除*CADM3*外,*ANGPTL4*、*CXCL1*、*CDH2*、*INHBA*、*FBLN5*、*PVR*、*ALCAM*和*ICAM1*均在缺氧血管内皮细胞中表达增加。*CADM3*的mRNA水平在缺氧6~8 h的HUVEC中显著增加(图1A)。与21%O_2组比较,缺氧2~8 h时,CADM3蛋白在HUVEC中的表达持续增加,在缺氧(1%O_2)6 h时达到最高(图1B)。

2.2 CADM3参与缺氧HUVEC-U937的黏附

与21%O_2组比较,缺氧(1%O_2)促进HUVEC与U937细胞的黏附(图2A),U937细胞黏附率显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$,图2B);与1%O_2组和1%O_2+siRNA-NC组比较,1%O_2+siRNA-CADM3组HUVEC中CADM3蛋白表达水平降低(图2C)。与1%O_2+siRNA-NC组比较,1%O_2+siRNA-CADM3组HUVEC中黏附的U937细胞显著减少(图2D),U937细胞黏附率显著降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$,图2E)。

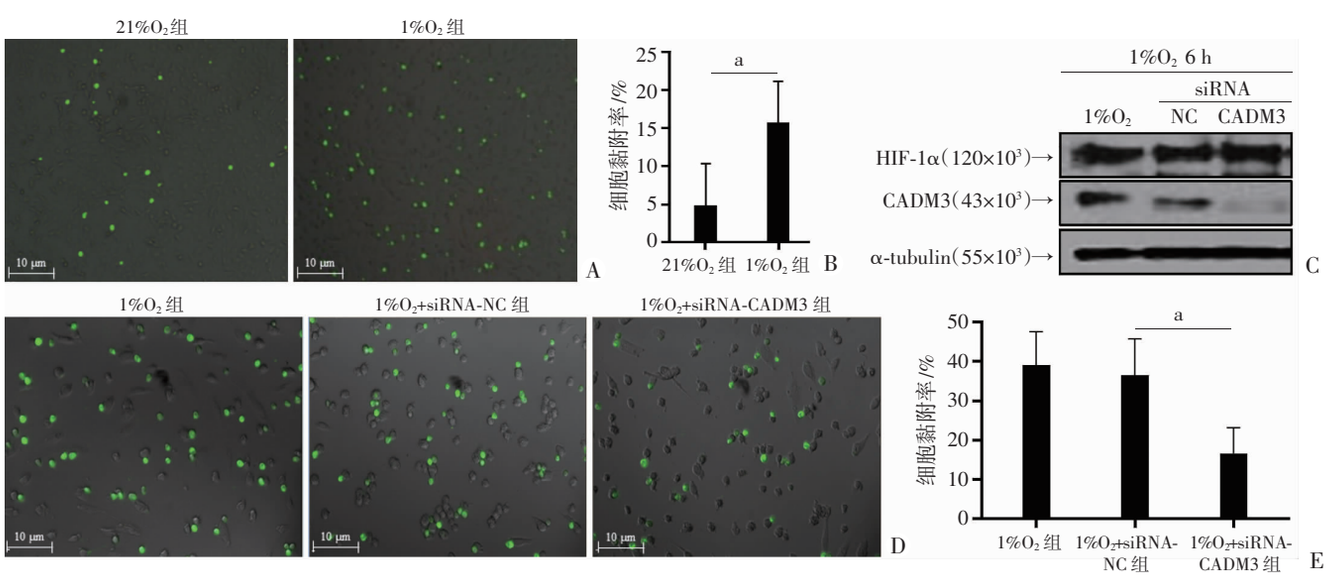
表2　缺氧HUVEC中差异表达的黏附因子

编号	基因	FC($1\%O_2$ *vs* $5\%O_2$)	*P*	$5\%O_2$强度值	$1\%O_2$强度值
NM_139314	*ANGPTL4*	7.56	<0.01	10 973.68	84 081.21
NM_001511	*CXCL1*	2.41	0.04	661.61	1 650.26
NM_001792	*CDH2*	2.20	0.02	3 035.87	7 252.11
NM_002192	*INHBA*	3.70	<0.01	4 407.41	17 593.51
NM_006329	*FBLN5*	2.46	0.02	1 319.60	3 455.44
NM_021189	*CADM3*	2.43	0.05	482.76	1 187.19
NM_006505	*PVR*	2.51	0.01	1 590.32	4 254.08
NM_001627	*ALCAM*	2.39	0.02	1 146.41	2 909.10
NM_000201	*ICAM1*	1.60	0.03	197.64	291.09



A:HUVEC中CADM3的mRNA相对表达量;B:HUVEC中CADM3的蛋白水平

图1　缺氧对HUVEC中CADM3表达的影响(n=5,$\bar{x}\pm s$)



a:P<0.05

A:缺氧影响HUVEC与U937细胞的黏附情况;B:缺氧诱导HUVEC与U937细胞的黏附情况;C:靶向CADM3的siRNA转染后HUVEC中CADM3的蛋白表达水平;D:靶向CADM3-siRNA转染后HUVEC与U937细胞的黏附情况;E:靶向CADM3的siRNA转染后HUVEC与U937细胞的黏附率情况

图2　CADM3调节缺氧HUVEC和U937细胞的黏附

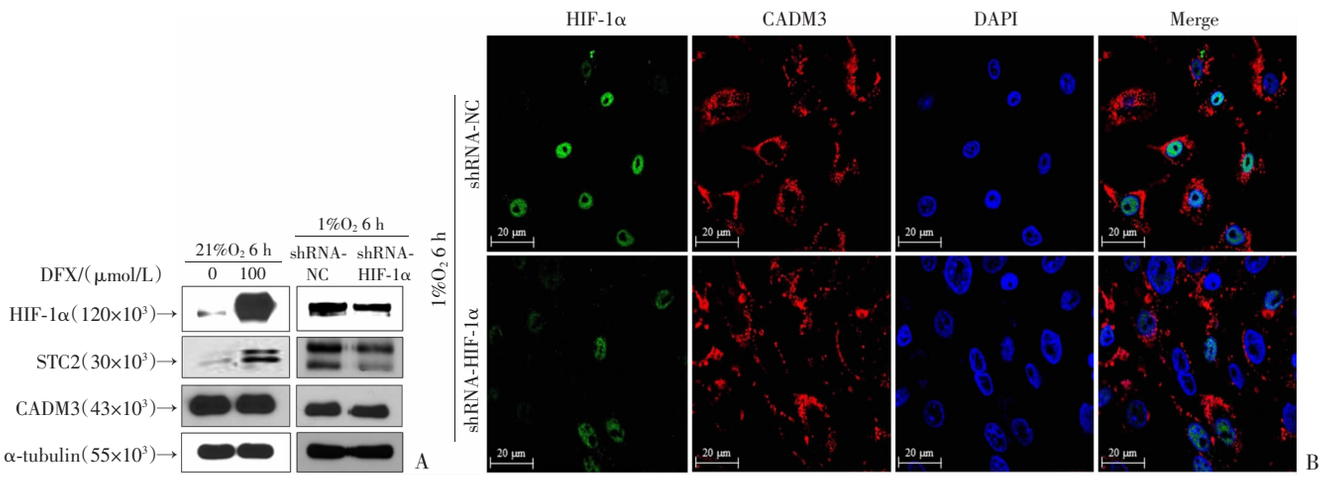
2.3　缺氧以非HIF-1α依赖的方式诱导CADM3表达

与常氧($21\%O_2$)+溶剂对照组比较,常氧($21\%O_2$)+DFX处理组中HIF-1α和STC2蛋白表达明显升高,而CADM3蛋白表达水平差异没有统计学意义(图3A)。与$1\%O_2$+shRNA-NC组相比,$1\%O_2$+shRNA-HIF-1α转染组HUVEC中HIF-1α和STC2蛋白表达明显降低,而CADM3蛋白表达水平没有变化。免疫荧光染色结果表明,shRNA-HIF-1α转染明显抑制了HUVEC中HIF-1α

的表达,但CADM3的表达没有变化(图3B)。

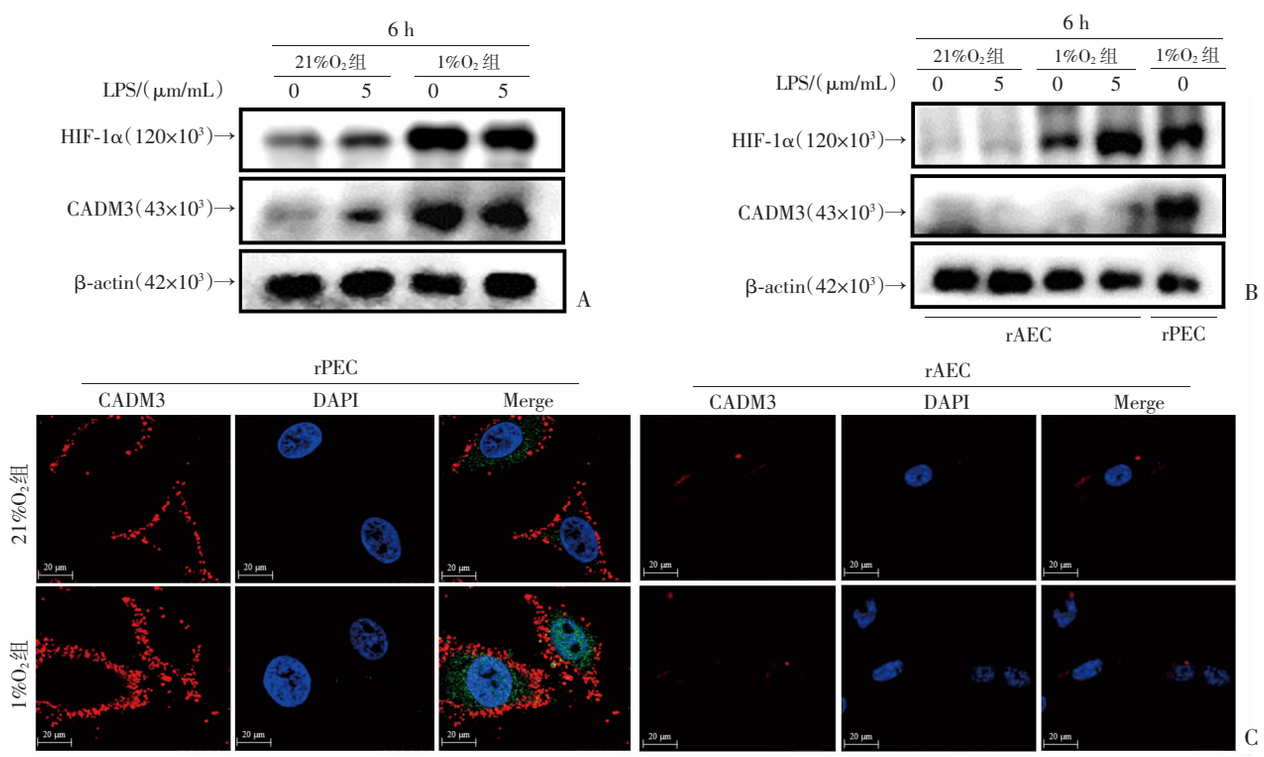
2.4 CADM3在rPEC和rAEC中差异表达

与常氧(21%O_2)+溶剂对照组比较,缺氧(1%O_2)+溶剂对照组的rPEC和rAEC中,HIF-1α蛋白水平均增加。与溶剂对照组比较,LPS处理各组rPEC、rAEC细胞中HIF-1α和CADM3蛋白表达均无变化。与常氧(21%O_2)+溶剂对照组比较,缺氧(1%O_2)+溶剂对照组的rPEC细胞中,CADM3蛋白表达明显增加;与1%O_2组rPEC比较,各组rAEC细胞中未检测到CADM3表达(图4A、B)。CADM3主要分布在rPEC的细胞膜上,与21%O_2组比较,1%O_2组rPEC细胞膜上,CADM3荧光强度明显增加,而在21%O_2组和1%O_2组rAEC细胞膜上,CADM3荧光强度微弱(图4C)。



A: Western blot检测HUVEC中HIF-1α和CADM3的表达水平;B:shRNA-HIF-1α转染HUVEC中HF-1α和CADM3的分布情况

图3 HIF-1α在缺氧诱导CADM3表达中的作用



A:Western blot检测rPEC细胞中CADM3的蛋白表达变化;B:Western blot检测rAEC和rPEC细胞中CADM3的蛋白表达变化;C:免疫荧光技术检测rPEC和rAEC细胞中CADM3在细胞膜上的分布情况

图4 rPEC和rAEC细胞中CADM3表达及其对缺氧的影响

2.5　CADM3调节缺氧肺血管内皮细胞与单核细胞的特异性黏附

流式细胞术检测结果显示,1%O_2组rPEC黏附的外周血白细胞中,$CD11b^+$、$CD3^+$、$OX62^+$和$CD19^+$细胞占比依次降低(图5A);1%O_2组rPEC黏附的外周血白细胞中,$CD11b^+$细胞占比最高,差异具有统计学意义(P<0.01,图5B)。经抗CADM3抗体封闭后,与Blank组比较,anti 400组和anti 200组中,1%O_2组rPEC黏附的U937细胞占比均显著降低,差异均具有统计学意义(P<0.05),而anti 200组和anti 400组的差异无统计学意义(图5C、D)。

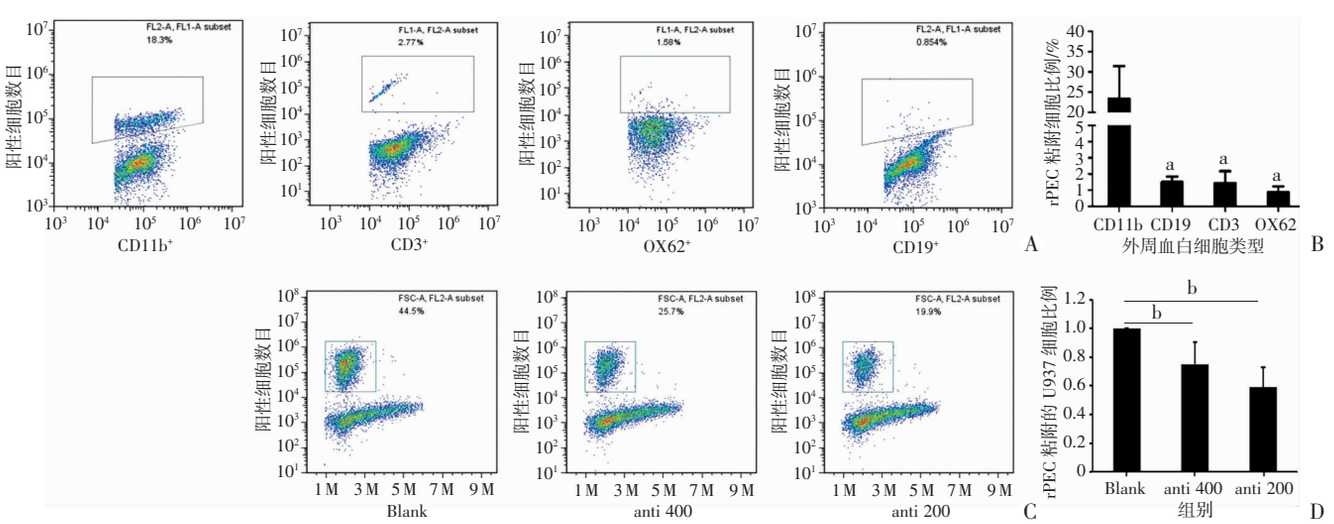
3　讨论

PVR不仅是呼吸系统疾病共同的病理生理特征,也是长期高原暴露导致肺动脉高压、高原心脏病的中心环节,一旦发生将持续发展,治疗难度大,逆转困难[8]。研究表明,缺氧诱导肺组织特异的单核细胞浸润是促进肺血管重构的关键环节,靶向抑制肺组织单核细胞浸润是干预肺血管重构的有效途径[9-10]。本研究通过组学筛选和细胞学验证,发现缺氧特异性诱导肺血管内皮细胞高表达CADM3;干预CADM3表达或功能,能抑制缺氧肺血管内皮细胞与单核细胞黏附。本研究揭示了CADM3在缺氧肺血管内皮细胞与单核细胞特异性黏附增加中的作用,为干预缺氧肺血管重构提供了新的线索。

3.1　CADM3在缺氧肺内皮细胞中高表达

肺血管内皮细胞对缺氧十分敏感,是调控炎细胞浸润的第一道屏障[11]。缺氧诱导血管内皮细胞分泌炎症因子,刺激细胞黏附分子表达,这是介导内皮细胞与炎细胞黏附的普遍机制[12-13]。然而,不同组织的血管内皮细胞具有明显的结构和功能差异[14-15],但在细胞黏附特性的差异上,目前少有研究。本课题组前期研究证实,大鼠肺血管内皮细胞和主动脉内皮细胞对单核细胞U937的黏附性不同,说明肺血管内皮细胞具有独特的单核细胞黏附特性[7]。本研究中,进一步观察了缺氧肺血管内皮细胞与外周血白细胞的黏附特点,数据显示,单核细胞($CD11b^+$)的黏附显著增加,且缺氧肺血管内皮细胞与单核细胞的黏附率最高。这些数据进一步说明,肺血管内皮细胞可能表达独特的黏附分子,介导缺氧肺血管内皮与单核细胞黏附。深入研究肺血管内皮的独特黏附特征,可为干预缺氧肺组织特异的单核细胞浸润提供新的线索。

在分析缺氧HUVEC的转录组数据中,我们发现,除*ANGPTL4*、*CXCL1*、*CDH2*和*ICAM1*等已知的、内皮细胞普遍表达的细胞黏附相关分子表达增加外[16-18],*CADM3*的表达显著增加。CADM3是细胞膜上的跨膜糖蛋白,属于免疫球蛋白超家族,在神经系统和癌症中的研究较多,它通过钙离子非依赖的方式介导细胞间黏附[19-20]。尽管CADM3在肺血管内皮细胞中表达及其功能未见报道,但有研究表明,CADM3的胞外部分可与Nectin家族和Nectin like家族蛋白形成复合体,调节细胞功能,并与配体IGSF4/Necl-2,PVRL1(Nectin-1)和PVRL3(Nectin-3)结合,介导细胞黏附[21],其中,PVRL1/Nec-1是造血系前体细胞的标志物,在骨髓来源的单核细胞中高表达[22],这表明CADM3具有介导血管内皮细胞与单核细胞黏附的分子基础。通过进



A、B:流式细胞术检测与缺氧rPEC黏附的外周血白细胞类型及定量分析　a:P<0.01,与CD11b细胞比较;C、D:流式细胞术检测与缺氧rPEC黏附的U937细胞及定量分析　b:P<0.05

图5　CADM3促进缺氧rPEC与单核细胞的黏附(n=3,$\bar{x}\pm s$)

一步对比研究发现,与主动脉内皮细胞相比,缺氧特异诱导肺血管内皮细胞膜上CADM3表达增加;并且,在LPS激活的缺氧或常氧培养的rPEC、rAEC中,CADM3的表达并无明显改变。由此推测:肺血管内皮细胞中CADM3的表达可能在介导缺氧肺血管内皮细胞与单核细胞特异性黏附中发挥重要作用。

3.2 缺氧特异性诱导CADM3介导单核细胞黏附

本研究结果显示,抑制CADM3表达后,缺氧HUVEC与U937细胞的黏附显著下降;通过抗CADM3抗体对肺血管内皮细胞CADM3的结合活性进行封闭,缺氧肺血管内皮细胞与U937细胞的黏附显著降低,且随着抗体浓度的增加呈下降的趋势。这些结果表明,缺氧促进的CADM3表达与肺血管内皮细胞与单核细胞特异黏附有关。以往的研究中,通过耗竭外周血单核细胞,可以有效抑制PVR的发生或发展[23]。但是,单核细胞作为机体防御系统的重要组成部分,在细胞防御、识别和杀伤肿瘤细胞、吞噬异物方面发挥重要作用。因此,以CADM3为靶点,干预缺氧肺血管外周单核细胞浸润可能是更可行的手段。首先,CADM3在肺血管内皮细胞中特异表达;其次,缺氧诱导肺血管内皮细胞中CADM3表达增加,且主要分布在细胞膜上;并且,在外周血单核细胞中存在与CADM3结合的配体,干预单核细胞特异结合是可以实现的。基于此,本研究未来将从肺血管内皮细胞特异的黏附特性入手,以CADM3为靶点,抑制缺氧肺血管特异的单核细胞浸润,探讨干预缺氧肺血管重构的可行性。

3.3 缺氧以非HIF-1α依赖的方式调节CADM3的表达

HIF-1是参与调节机体氧平衡的关键转录因子,能够通过激活下游靶基因调节细胞的缺氧反应,在缺氧炎症反应中也发挥重要作用[24]。本研究发现,在常氧条件下,增加HUVEC细胞HIF-1α的蛋白水平,代表HIF-1转录活性的STC2表达增加,而CADM3的表达不受影响。另一方面,在缺氧条件下,降低HIF-1α蛋白水平,STC2表达降低,但缺氧诱导的CADM3的表达水平也没有变化。这些数据表明,CADM3的表达不受HIF-1的调控。此外,缺氧培养的rPEC细胞中,HIF-1α蛋白表达水平升高,但CADM3蛋白表达水平并没有随之进一步增加。由此推测:肺血管内皮细胞中存在缺氧直接诱导的、非HIF-1调控的独特炎症机制,通过促进CADM3的表达,介导肺血管内皮细胞和单核细胞的特异性黏附,这为特异抑制缺氧肺组织炎细胞浸润提供了新思路。

综上所述,本研究在细胞学水平上明确了CADM3的作用,后续将利用靶向肺血管内皮敲除CADM3的动物模型,观察肺组织单核细胞浸润、缺氧肺血管结构改变,明确干预CADM3介导的单核细胞黏附途径抑制缺氧肺血管重构的可行性和有效性。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] CHEN D W, GAO W X, WANG S X, *et al*. Critical effects of epigenetic regulation in pulmonary arterial hypertension[J]. Cell Mol Life Sci, 2017, 74(20): 3789-3808. DOI: 10.1007/s00018-017-2551-8.

[2] 林宁,李玉友,杨人懿, 等.高原地区卫勤保障难点与对策[J]. 西南军医, 2012, 14(1): 185-187. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7193.2012.01.100.
LIN N, LI Y Y, YANG R Y, *et al*. Difficulties and countermeasures of medical support in plateau area[J]. J Mil Surg Southwest China, 2012, 14(1): 185-187. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7193.2012.01.100.

[3] FRÖHLICH S, BOYLAN J, MCLOUGHLIN P. Hypoxia-induced inflammation in the lung: a potential therapeutic target in acute lung injury?[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48(3):271-9. DOI: 10.1165/rcmb.2012-0137TR.

[4] HU Y J, CHI L, KUEBLER W M, *et al*. Perivascular inflammation in pulmonary arterial hypertension[J]. Cells, 2020, 9(11): 2338. DOI: 10.3390/cells9112338.

[5] STACHER E, GRAHAM B B, HUNT J M, *et al*. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2012, 186(3): 261-272. DOI: 10.1164/rccm.201201-0164OC.

[6] MURDOCH C, MUTHANA M, LEWIS C E. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation[J]. J Immunol, 2005, 175(10): 6257-6263. DOI: 10.4049/jimmunol.175.10.6257.

[7] 陈婷, 谭小玲, 杨诚忠, 等. 缺氧对肺循环和体循环血管内皮细胞与单核细胞黏附特性的影响[J].免疫学杂志, 2017, 33(4): 288-293. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20170052.
CHEN T, TAN X L, YANG C Z, *et al*. Hypoxia specifically promotes the adhesion of pulmonary vascular endothelial cells to monocytes[J]. Immunol J, 2017, 33(4): 288-293. DOI: 10.13431/j.cnki.immunol.j.20170052.

[8] 石海霞, 高芬. 低氧性肺动脉高压发病机制概述[J]. 社区医学杂志, 2011,9(2):53-55.DOI: CNKI:SUN:SQYX.0.2011-02-024.
SHI H X, GAO F. Overview of pathogenesis of hypoxic

pulmonary hypertension[J]. J Community Med, 2011, 9(2): 53-55. DOI: CNKI:SUN:SQYX.0.2011-02-024.

[9] CHEN T, YANG C Z, LI M M, *et al*. Alveolar hypoxia-induced pulmonary inflammation: from local initiation to secondary promotion by activated systemic inflammation[J]. J Vasc Res, 2016, 53(5/6): 317-329. DOI: 10.1159/000452800.

[10] LIU S F, NAMBIAR V N, LI Q H, *et al*. Pulmonary hypertension: Linking inflammation and pulmonary arterial stiffening[J]. Front Immunol, 2022, 13: 959209. DOI: 10.3389/fimmu.2022.959209.

[11] LI G, XU Y L, LING F, *et al*. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against pulmonary arterial hypertension through improving early endothelial function and mediating cytokines levels[J]. Chin Med J, 2012, 125(8): 1381-1388. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2012.08.004.

[12] EVANS C E, COBER N D, DAI Z Y, *et al*. Endothelial cells in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension[J]. Eur Respir J, 2021, 58(3): 2003957. DOI: 10.1183/13993003.03957-2020.

[13] LIU X, ZHANG S Y, WANG X L, *et al*. Endothelial cell-derived SO_2 controls endothelial cell inflammation, smooth muscle cell proliferation, and collagen synthesis to inhibit hypoxic pulmonary vascular remodelling[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 5577634. DOI: 10.1155/2021/5577634.

[14] BURKE D L, FRID M G, KUNRATH C L, *et al*. Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(2): L238-L250. DOI: 10.1152/ajplung.90591.2008.

[15] FLORENTIN J, DUTTA P. Origin and production of inflammatory perivascular macrophages in pulmonary hypertension[J]. Cytokine, 2017, 100: 11-15. DOI: 10.1016/j.cyto.2017.08.015.

[16] 李晶, 曹丽叶, 张爱民, 等. 重症急性胰腺炎肺损伤大鼠肺内血管生成素样蛋白4、细胞间黏附分子-1基因表达及意义[J]. 临床荟萃, 2015, 30(4): 412-415. DOI: 10.3969/j.issn.1004-583X.2015.04.014.

LI J, CAO L Y, ZHANG A M, *et al*. Expression of angiopoietin-like 4 and intercellular adhesion molecule-1 in lung injury tissues of rats with severe acute pancreatitis and significance[J]. Clin Focus, 2015, 30(4): 412-415. DOI: 10.3969/j.issn.1004-583X.2015.04.014.

[17] 李清明, 李伶, 杨刚毅. 血管生成素样蛋白3和4对脂质代谢和胰岛素抵抗的影响[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2006, 26(1): 20-22. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2006.01.008.

LI Q M, LI L, YANG G Y. Effects of Angptl3 and Angptl4 on lipid metabolism and insulin resistance[J]. Int J Endocrinol Metab, 2006, 26(1): 20-22. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2006.01.008.

[18] 付燕燕, 龚龙波, 孟良. CXCL1及其受体CXCR2在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(13): 784-787. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2011.13.009.

FU Y Y, GONG L B, MENG L. Expression and clinical significance of CXCL1 and its receptor CXCR2 in gastric carcinoma[J]. Chin J Clin Oncol, 2011, 38(13): 784-787. DOI: 10.3969/j.issn.1000-8179.2011.13.009.

[19] HUNTER P R, NIKOLAOU N, ODERMATT B, *et al*. Localization of Cadm2a and Cadm3 proteins during development of the zebrafish nervous system[J]. J Comp Neurol, 2011, 519(11): 2252-2270. DOI: 10.1002/cne.22627.

[20] REN H Y, WANG Z, ZHANG L, *et al*. Clinical significance of low expression of CADM3 in breast cancer and preliminary exploration of related mechanisms[J]. BMC Cancer, 2024, 24(1): 367. DOI: 10.1186/s12885-024-12114-y.

[21] FUJITO T, IKEDA W, KAKUNAGA S, *et al*. Correction: Inhibition of cell movement and proliferation by cell-cell contact-induced interaction of Necl-5 with nectin-3[J]. J Cell Biol, 2020, 219(6): jcb.20050109005122020c. DOI: 10.1083/jcb.20050109005122020c.

[22] MAGRI G, MUNTASELL A, ROMO N, *et al*. NKp46 and DNAM-1 NK-cell receptors drive the response to human cytomegalovirus-infected myeloid dendritic cells overcoming viral immune evasion strategies[J]. Blood, 2011, 117(3): 848-856. DOI: 10.1182/blood-2010-08-301374.

[23] FRID M G, BRUNETTI J A, BURKE D L, *et al*. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage[J]. Am J Pathol, 2006, 168(2): 659-669. DOI: 10.2353/ajpath.2006.050599.

[24] LUO Z, TIAN M F, YANG G, *et al*. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics[J]. Signal Transduct Target Ther, 2022, 7(1): 218. DOI: 10.1038/s41392-022-01080-1.

(收稿:2024-07-29;修回:2022-11-22)

(编辑 张艺霖)