

TWIST1 通过激活自噬促进肺动脉高压大鼠模型肺血管重塑作用及机制的实验研究

贺红艳^{1a}, 晁满香², 翟翠^{1b}, 张晴^{1a}, 李海燕^{1a}

(1. 西安医学院 a. 医学技术学院; b. 基础与转化医学研究所 / 陕西省脑疾病防治重点实验室, 西安 710021;
2. 空军军医大学空军第九八六医院神经内科, 西安 710000)

摘要: 目的 探讨 Twist 相关蛋白 1 (Twist-related protein 1, TWIST1) 对野百合碱 (Monocrotaline, MCT) 诱导的肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 大鼠肺血管重塑的影响及机制。方法 将 50 只健康雄性 SD 大鼠, 随机分为 5 组, 即对照组、模型组、二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶剂处理的模型组、TWIST1 抑制剂 Harmine 组、自噬抑制剂羟氯喹组。检测右心室收缩压 (RVSP), 右心室肥厚指数 (RVHI) 和内膜厚度百分比 (MT%) 以评估大鼠 PAH 的发展。采用免疫印迹法检测 TWIST1, 自噬相关蛋白 LC3B 以及 RND3 的蛋白质水平。结果 与对照组比较, MCT 诱导的 PAH 大鼠中 TWIST1 和 LC3B 表达增加, 分别为对照组的 2.32 ± 0.22 倍和 0.87 ± 0.19 倍, 差异具有统计学意义 ($t=15.812, 11.227$, 均 $P<0.001$); 同时 RND3 表达下调, 为对照组的 0.32 ± 0.07 倍, 差异具有统计学意义 ($t=-13.003$, $P<0.001$)。给与 TWIST1 抑制剂 Harmine 或自噬抑制剂羟氯喹可显著抑制 MCT 诱导的自噬激活和 RND3 表达下调, 同时降低了 MCT 诱导的 PAH 大鼠的 RVSP, RVHI 和 MT%, 差异具有统计学意义 ($t=-24.277 \sim 16.636$, 均 $P<0.001$)。结论 TWIST1 通过诱导自噬激活促进肺血管重塑, 促进 PAH 的发生发展。

关键词: 肺动脉高压; 血管重塑; Twist 相关蛋白 1

中图分类号: R-332 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 04-045-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.04.009

Experimental Study on the Effect and Mechanism of TWIST1 Promoting Pulmonary Vascular Remodeling in a Rat Model of Pulmonary Arterial Hypertension by Activation of Autophagy

HE Hongyan^{1a}, CHAO Manxiang², ZHAI Cui^{1b}, ZHANG Qing^{1a}, LI Haiyan^{1a}

(1a. Department of Medical Technology; 1b. Shaanxi Key Laboratory of Brain Disorders/Institute of Basic and Translational Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, China; 2. Department of Neurology, Air Force 986th Hospital, Air Force Military Medical University, Xi'an 710000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of Twist-related protein 1 (TWIST1) on pulmonary vascular remodeling induced by monocrotaline (MCT) in pulmonary arterial hypertension (PAH) rats. **Methods** A total of 50 healthy male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups including control group, MCT-treated group, MCT and dimethyl sulfoxide (DMSO)-treated group, MCT and harmine-treated group MCT and hydroxychloroquine (HCQ)-treated group. The right ventricle systolic pressure (RVSP) was measured, right ventricular hypertrophy index (RVHI) and percentage of medial wall thickness (MT%) to assess the development of PAH. The protein levels of TWIST1, autophagy markers LC3B and RND3 were determined using western blot. **Results** Compared with control group, expressions of TWIST1 and LC3B were increased by 2.32 ± 0.22 folds and 0.87 ± 0.19 folds in MCT-induced PAH group, with significant differences ($t=15.812, 11.227$, all $P<0.001$), while the protein level of RND3 in MCT-induced PAH rats was decreased by 0.32 ± 0.07 folds compared with control group, with significant difference ($t=-13.003$, $P<0.001$). Administration of TWIST1 inhibitor Harmine or autophagy inhibitor hydroxychloroquine significantly suppressed MCT-induced increase in LC3B and down-regulation of RND3 expression, and reduced RVSP, RVHI and MT% expressions in MCT-induced PAH rats, with significant differences ($t=-24.277 \sim 16.636$, all $P<0.001$). **Conclusion** TWIST1 promotes pulmonary vascular remodeling by inducing autophagy

基金项目: 国家自然科学基金 (81700546), 陕西省科技厅自然科学基金基础研究计划项目 (2023-JC-QN-0863), 2023~2024 年度西安医学院校级科研项目 (2023QN02), 西安医学院第五批校级重点学科 (医学技术 12202306)。

作者简介: 贺红艳 (1976-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 临床检验, E-mail: hehongyan@xiyi.edu.cn。

晁满香 (1976-) 女, 学士, 主治医师, Email: chaomanxiang@126.com, 并列第一作者。

通讯作者: 李海燕 (1979-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 血液学检验, E-mail: lhy20240110@126.com。

activation, thus promoting the occurrence and development of PAH.

Keywords: pulmonary arterial hypertension; vascular remodeling; Twist-related protein 1

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是一种严重的致死性肺血管疾病, 可导致右心室收缩压增加以及右心室肥大^[1-3]。PAH 预后差、病死率高, 虽然传统的 PAH 靶向治疗药物可有效改善患者的生活质量, 但五年死亡率仍超过 50%^[4]。PAH 的发病机制复杂, 肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC) 异常增殖/凋亡抵抗导致的肺血管重塑是 PAH 的主要病理基础^[3]。细胞自噬是细胞对受损细胞器、大蛋白聚集体和入侵病原体的降解过程。现已证实, PAH 患者和动物模型中自噬活性增强, 抑制自噬激活可明显减轻肺动脉重塑, 抑制 PAH^[5]。Twist 相关蛋白 1 (Twist-related protein 1, TWIST1) 是进化上高度保守的碱基-螺旋-环-螺旋转录因子家族一员。TWIST1 可调控胚胎发育, 还参与多种生理和病理过程的调控。TWIST1 为一种致癌基因, 促进多种恶性肿瘤上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和血管生成^[6]。此外, TWIST1 还可调控多种心血管疾病。研究证实, TWIST1 与 PAH 的发生发展密切相关^[7]。在 PAH 中, 自噬调控 TWIST1 的作用及具体机制目前尚不清楚。本研究拟在野百合碱 (monocrotaline, MCT) 构建 PAH 大鼠模型的基础上, 探索 TWIST1 对 PAH 的影响及具体的分子机制。

1. 材料与方法

1.1 研究对象 本研究所用动物皆为雄性健康 SD (Sprague-Dawley) 大鼠, 体重为 180~250g, 所有 SD 大鼠购于西安交通大学医学部实验动物中心, 并饲养于 SPF 级动物房中。所有 SD 大鼠分笼分组饲养于恒温 (20±2℃)、恒湿 (40%~60%)、12h 光照/黑暗循环及可自主进食食物和水的环境中。本研究所用动物的全部实验操作均遵循《西安医学院动物实验中心实验动物养护与使用指南》。

1.2 仪器与试剂 本实验所用主要试剂包括: 野百合碱, 二甲基亚砜 (Sigma-Aldrich); 硫酸羟氯喹片 (HCQ, 上海中西制药有限公司); Harmine (MCE); β -actin (Santa Cruz Biotechnology); TWIST1 (ABclonal); LC3B (Cell Signaling Technology); RND3 (Proteintech) 山羊抗兔 IgG 二抗 (Sigma-Aldrich); RIPA 裂解液, SDS-PAGE 制胶试剂盒 (西安赫特生物科技有限公司)。主要的仪器设备包括: 恒冷箱式冰冻切片机及石蜡切片机 (Leica), 图像采集分析仪 (日本尼康公司), 压力换能器及多导生理记录仪 (Power lab), 电泳及转印装置 (北京六一仪器厂), 化学发光成像系

统 (Bio-Rad)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组及处理: 将本研究选取的 50 只雄性健康 SD 大鼠, 随机分为 5 组, 每组 10 只。对照组 (Con): 给与等剂量生理盐水或载体溶剂腹腔注射, 每日 1 次, 连续治疗 4 周; MCT 诱导的 PAH 模型组 (MCT): 一次性腹腔注射 MCT 60mg/kg; 二甲基亚砜 (DMSO) 溶剂处理的 PAH 模型组 (MCT+DMSO): 单次腹腔注射 MCT 60mg/kg 后, 再给与 DMSO 0.1mg/kg 腹腔注射, 每日 1 次, 连续治疗 4 周; TWIST1 抑制剂 Harmine 处理的 PAH 模型组 (MCT+Harmine): 一次性腹腔注射 MCT 60mg/kg 后, 给与 30 mg/kg Harmine 腹腔注射, 每日 1 次, 连续治疗 4 周; 自噬抑制剂 HCQ 处理的 PAH 模型组 (MCT+HCQ): 一次性腹腔注射 MCT 60mg/kg 后, 给与 40mg/kg HCQ 灌胃, 每日 1 次, 连续治疗 4 周。

1.3.2 右心室收缩压的测定: 28 天后对存活的 SD 大鼠吸入异氟烷进行麻醉, 稳定麻醉后分离出右颈外静脉, 随后作一斜形切口, 将填充有 0.5g/dl 肝素钠-盐水溶液的聚乙烯导管沿着切口插入血管, 将导管经颈外静脉缓缓推入右心室, 同时仔细观察多导生理记录仪记录的压力波形变化情况。当连续出现典型的右心室波形时, 开始对右心室收缩压 (right ventricle systolic pressure, RVSP) 进行记录, 检测完成后缓缓的退出导管。

1.3.3 右心室肥厚指数的测定: 右心室收缩压测量完成后, 分离出大鼠的心、肺组织, 将右肺下叶浸入 4g/dl 多聚甲醛中进行固定, 剩余肺组织及心脏置于 -80℃ 冰箱保存, 用于完成后续实验。沿室间沟边缘分离出心脏的右心室 (right ventricle, RV), 用 PBS 缓冲液进行冲洗, 滤纸吸掉残存的水分, 称量右心室 (right ventricular, RV)、左心室和室间隔 (left ventricle and interventricular septum, LV+S), 最后对右心室肥厚指数 (right ventricular hypertrophy index, RVHI) 进行计算, 公式为: $RVHI = RV / (LV + S)$ 。

1.3.4 肺组织苏木精-伊红 (HE) 染色, 计算中膜厚度百分比: 将固定好的大鼠右肺下叶组织进行包埋, 制备为肺组织蜡块, 随后切成 5 μ m 厚度的切片行 HE 染色。最后在光学显微镜下, 使用 Image Pro Plus 6.0 图像采集与分析系统测量直径在 50~250 μ m 肺小动脉的中膜厚度 (medial wall thickness, MT) 及血管外径 (external diameter, ED)。每张玻片测量 20~30 根肺血管, 计算中膜

厚度百分比 (MT%) 以评估血管重塑。MT% 计算如下: $MT\% = (2 \times MT/ED) \times 100\%$ 。

1.3.5 免疫印迹法检测大鼠肺组织中 TWIST1, LC3B 和 RND3 蛋白表达: 取适量于 -80°C 冰箱保存的肺组织, 按照西安赫特生物科技有限公司放射免疫沉淀测定 (RIPA) 使用说明书提取总蛋白, 随后使用 BCA 法蛋白定量试剂盒检测各组样品蛋白浓度。在 $10\sim 15\text{g/dl}$ 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 中进行蛋白分离、转膜。PVDF 膜用 5g/dl 脱脂奶粉封闭 1h 后, 孵育相应的一抗 (4°C , 过夜): β -actin, TWIST1, LC3B 和 RND3。随后与辣根过氧化物酶 (HRD) 偶联的山羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 1h 。最后通过增强型化学发光检测系统 (Amersham Bioscience) 检测印迹, 并使用 Quality One 软件 (Bio-Rad) 测量条带密度。

1.4 统计学分析 使用 SPSS 18.0 软件进行数据统计分析, 计量数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 的形式描述。两组间的均数比较采用 Tukey post hoc 检验分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MCT 诱导的 PAH 模型建立 见表 1, 图 1。与对照组比较, 腹腔注射 MCT 4 周后 PAH 组大鼠的右心室收缩压升高, 差异具有统计学意义 ($t=36.178$, $P < 0.001$), 提示 PAH 模型构建成功。MCT 组大

鼠的 RVHI 显著高于对照组, 差异具有统计学意义 ($t=13.315$, $P < 0.001$)。此外, MCT 组大鼠的肺小动脉管壁厚度增加、管腔狭窄, PASMCs 数量增多, 外膜伴有炎性细胞浸润; 同时肺小动脉中膜厚度百分比 (MT%) 定量形态学分析显示, MCT 组大鼠的 MT% 较对照组显著增高, 差异具有统计学意义 ($t=19.784$, $P < 0.001$)。MCT 组大鼠肺组织 TWIST1 蛋白水平较对照组显著增加, 差异具有统计学意义 ($t=15.812$, $P < 0.001$)。

2.2 抑制 TWIST1 对 MCT 诱导的 PAH 模型大鼠肺血管重塑及 TWIST1 蛋白水平影响 见表 1。给与 TWIST1 抑制剂 Harmine 处理后, 与 MCT+DMSO 组大鼠相比较, MCT+Harmine 组的 RVSP 降低, RVHI 下降, 差异具有统计学意义 ($t=-27.614$, -11.830 , 均 $P < 0.001$)。给与 Harmine 处理后明显改善 PAH 模型大鼠肺小动脉管壁厚度的增加、管腔的狭窄, 抑制了 PASMCs 数量的增多以及外膜炎性细胞的浸润, 见图 1。定量分析表明, 与 MCT+DMSO 组相比, MCT+harmine 组大鼠的肺小动脉 MT% 下降, 同时与 MCT+DMSO 组大鼠相比较, MCT+Harmine 组的 TWIST1 表达降低, 差异具有统计学意义 ($t=-15.737$, -14.927 , 均 $P < 0.001$), 说明 Harmine 可显著抑制大鼠肺组织 TWIST1 蛋白水平的增加。

表 1 各组大鼠 RVSP, RVHI, MT% 和 TWIST1 的变化水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=9\sim 12$)

项目	Con	MCT	MCT+DMSO	MCT+harmine
RVSP (mmHg)	21.22 ± 1.25	48.68 ± 2.33	50.52 ± 3.02	28.52 ± 1.67
RVHI	0.32 ± 0.02	0.58 ± 0.07	0.67 ± 1.13	0.41 ± 0.04
MT%	21.75 ± 2.64	35.98 ± 4.12	39.57 ± 4.22	27.29 ± 4.20
TWIST1	1.00 ± 0.15	2.32 ± 0.22	1.96 ± 0.20	0.97 ± 0.13

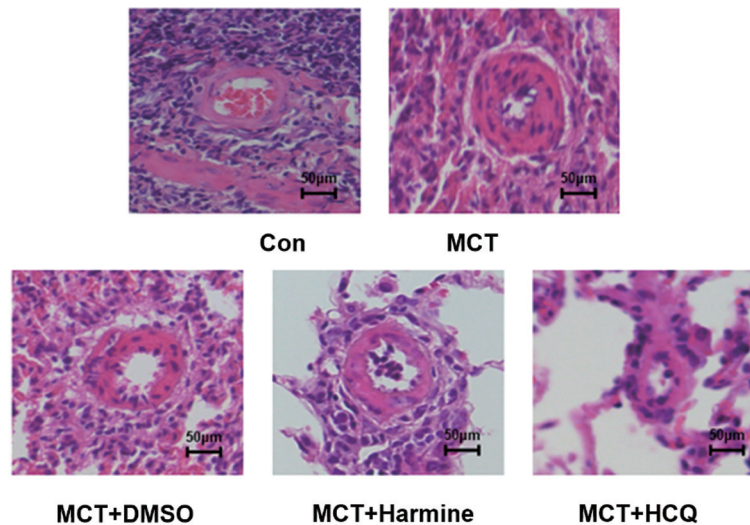


图 1 各组大鼠肺小动脉 HE 染色结果 ($\times 400$)

2.3 抑制 TWIST1 对 MCT 诱导的 PAH 模型大鼠肺组织自噬及 RND3 影响 见表 2。与对照组比较, MCT 组 LC3B 蛋白水平显著增加, RND3 蛋白水平显著下降, 差异具有统计学意义 ($t=11.227$,

-13.003 , 均 $P<0.001$)。与 MCT+DMSO 组比较, MCT+Harmine 组大鼠肺组织中 LC3B 蛋白水平明显降低, RND3 蛋白水平明显增加, 差异具有统计学意义 ($t=-10.374$, 13.764 , 均 $P<0.001$)。

表 2 各组大鼠肺组织中 LC3B 和 RND3 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

项目	Con	MCT	MCT+DMSO	MCT+harmine
LC3B	1.00 ± 0.11	1.87 ± 0.19	1.91 ± 1.18	1.18 ± 0.13
RND3	1.00 ± 0.17	0.32 ± 0.07	0.19 ± 0.06	0.86 ± 0.13

2.4 抑制自噬对 MCT 诱导的 PAH 模型大鼠肺血管重塑及 RND3 影响 见表 3。给与自噬抑制剂 HCQ 处理后, 与 MCT 组比较, MCT+HCQ 组大鼠的 RVSP, RVHI, 肺小动脉 MT% 均显著降低, 差异具有统计学意义 ($t=-15.634$, -8.869 , -12.112 , 均 $P<0.001$)。同时给与 HCQ 处理后明显

改善了 PAH 模型大鼠肺小动脉管壁厚度的增加、管腔的狭窄, 抑制了 PASMCs 数量的增多以及外膜炎性细胞的浸润, 见图 1。与 MCT 组比较, MCT+HCQ 组 LC3B, RND3 蛋白水平较 MCT 组明显增加, 差异具有统计学意义 ($t=5.552$, 16.636 , 均 $P<0.001$)。

表 3 各组 RVSP, RVHI, MT%, LC3B 和 RND3 的变化水平 ($\bar{x} \pm s$, $n=9-12$)

项目	Con	MCT	MCT+HCQ
RVSP (mmHg)	21.22 ± 1.25	48.68 ± 2.33	$30.49 \pm 1.78^{\#}$
RVHI	0.32 ± 0.02	0.58 ± 0.07	$0.42 \pm 1.78^{\#}$
MT%	21.75 ± 2.64	35.98 ± 4.12	$27.06 \pm 3.17^{\#}$
LC3B	1.00 ± 0.18	2.32 ± 0.23	2.80 ± 0.24
RND3	1.00 ± 0.10	0.30 ± 0.01	1.12 ± 0.12

3 讨论

本实验探索了自噬在 MCT 诱导的 PAH 模型大鼠肺血管重塑中的作用及分子机制。研究证实, 在 MCT 诱导的 PAH 大鼠中 TWIST1 表达上调, 进而诱导自噬活化, 促进 RND3 降解, 从而促进肺血管重塑以及 PAH 的形成。因此, 自噬可作为 PAH 新的治疗靶点, 为 PAH 的预防和治疗提供新的理论依据。

自噬是真核细胞的主要降解途径之一, 可将细胞内异常物质吞噬运输到溶酶体内进行降解^[8-10]。当细胞出现营养物质耗尽、低氧、氧化应激等不利条件时, 自噬被异常激活, 进而通过吞噬降解大分子物质、清除受损的细胞器及细胞质蛋白聚集体以维持细胞内环境稳定^[11-12]。自噬的异常调节与包含心血管疾病、恶性肿瘤以及炎症相关性疾病在内的多种人类疾病的发生发展密切相关。研究发现, 在 MCT 诱导的 PAH 大鼠肺组织中自噬活性增强, 肺血管重塑增加。另有研究表明, 在多种类型 PAH 患者的 PASMCs 及其他类型 PAH 动物模型中自噬活性亦显著增强^[13]。在本研究中, 我们发现在 MCT 诱导的大鼠 PAH 模型中自噬标志性蛋白 LC3B 水平及肺血管重塑均明显增加。HCQ 是一种常用的自噬抑制剂, 可促使自噬溶酶体中的酸性水解酶失活, 导致自噬溶酶体不能降解底物, 进而抑制自噬发生过程的终末阶段^[14]。因此, 在 HCQ 处

理的 PAH 模型大鼠中, 自噬活性降低, 自噬标志性蛋白 (LC3B 和 Beclin1) 大量聚积。

TWIST1 是进化上高度保守的碱基-螺旋-环-螺旋转录因子家族一员, 调控血管疾病的发生及多种恶性肿瘤的血管生成^[15-16]。研究表明, TWIST1 与 PAH 的发生发展密切相关^[7, 17]。本研究发现, 在 MCT 诱导的 PAH 模型大鼠中, TWIST1 表达明显上调。研究发现, miR-532 通过负调控 TWIST1 抑制胰腺癌细胞迁移和侵袭并诱导细胞凋亡和自噬^[18]。同时, RND3 作为 Rho 家族的成员, 是一种抗增殖蛋白^[4]。RND3 具有多种生物学功能, 过表达 RND3 可抑制细胞增殖和生长、诱导细胞凋亡和分化^[19-20]。在多种人类恶性肿瘤中, RND3 表达显著下调, 而过表达 RND3 细胞增殖被抑制^[21]。另有研究证实, 自噬活性增强可诱导自噬溶酶体途径降解 RND3, 促进胃部恶性肿瘤细胞的增殖^[22]。

近年来, 对 PAH 发病机理的认识得以迅速发展, PAH 的临床药物治疗也取得了较强的进展^[23-24]。目前, 多种针对血管收缩和肺血管重塑的靶向药物已经广泛应用于 PAH 的临床治疗。在本研究中, 我们发现 TWIST1 可促进 MCT 诱导的 PAH 模型大鼠肺组织中自噬的激活, 进而下调 RND3 表达, 促进肺血管重塑。此外, 本研究仍需在细胞实验基础上对具体的机制进行进一步的验证。本研究提示阻断

Twist1 介导的自噬激活可能成为预防和治疗 PAH 的有效策略。

参考文献:

- [1] CANSU D Ü, KORKMAZ C. Pulmonary hypertension in connective tissue diseases: epidemiology, pathogenesis, and treatment[J]. *Clinical Rheumatology*, 2023, 42(10): 2601-2610.
- [2] BOUCLY A, SAVALÉ L, JAÏS X, et al. Association between initial treatment strategy and long-term survival in pulmonary arterial hypertension[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2021, 204(7): 842-854.
- [3] 杨春光, 刘海红, 王凤东, 等. 特发性肺动脉高压患儿血清 miR-182 和 ICAM-1 表达水平及其与预后相关性分析[J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(5): 23-27, 43.
YANG Chunguang, LIU Haihong, WANG Fengdong, et al. Analysis of serum miR-182 and ICAM-1 expression levels in children with idiopathic pulmonary hypertension and their correlation with prognosis[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(5): 23-27, 43.
- [4] MOCUMBI A, HUMBERT M, SAXENA A, et al. Pulmonary hypertension[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2024, 10(1):1.
- [5] ZHAI Cui, ZHANG Nana, WANG Jian, et al. Activation of autophagy induces Monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension by FOXM1-mediated FAK phosphorylation[J]. *Lung*, 2022, 200(5): 619-631.
- [6] HE Jingang, ZHOU Haiyun, XUE Shige, et al. Transcription factor TWIST1 integrates dendritic remodeling and chronic stress to promote depressive-like behaviors[J]. *Biological Psychiatry*, 2021, 89(6): 615-626.
- [7] MISNER K, KASS D J. A plot TWIST in pulmonary arterial hypertension[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2020, 202(9): 1214-1216.
- [8] LI Wen, HE Pengcheng, HUANG Yuge, et al. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances[J]. *Theranostics*, 2021, 11(1): 222-256.
- [9] YANG Zhifen, KLIONSKY D J. Eaten alive: a history of macroautophagy[J]. *Nature Cell Biology*, 2010, 12(9): 814-822.
- [10] 伍义文, 曹健斌, 黄维佳, 等. m6A 甲基转移酶 METTL3 介导 miR-127 调控非小细胞肺癌细胞系自噬的机制研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(2): 12-16, 32.
WU Yiwen, CAO Jianbin, HUANG Weijia, et al. Mechanism of M6A methyltransferase METTL3 mediates mir-127 to regulate autophagy in non-small cell lung cancer cell lines[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(2): 12-16, 32.
- [11] SHAN Zhengfei, WEI Liqin, YU Shengqiang, et al. Ketamine induces reactive oxygen species and enhances autophagy in SV-HUC-1 human uroepithelial cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234(3): 2778-2787.
- [12] LIN Nengyu, BEYER C, GIESSL A, et al. Autophagy regulates TNF α -mediated joint destruction in experimental arthritis[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2013, 72(5): 761-768.
- [13] AGGARWAL S, MANNAM P, ZHANG Jianhua. Differential regulation of autophagy and mitophagy in pulmonary diseases[J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2016, 311(2): L433-L452.
- [14] SASAKI K, TSUNO N H, SUNAMI E, et al. Chloroquine potentiates the anti-cancer effect of 5-fluorouracil on colon cancer cells[J]. *BMC Cancer*. 2010, 10: 370.
- [15] SEPPORTA V M, PRAZ V, BALMAS BOURLOUD K, et al. TWIST1 expression is associated with high-risk neuroblastoma and promotes primary and metastatic tumor growth[J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1): 42.
- [16] ZHANG Lin, ZHANG Shanshan, WANG Kaifang, et al. Overexpression of TWIST1 in vascular endothelial cells promotes pathological retinal angiogenesis in mice[J]. *Zoological Research*, 2022, 43(1): 64-74.
- [17] MAMMOTO T, MUYLEART M, KONDURI G G, et al. TWIST1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension through transforming growth factor- β - smad signaling[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 2018, 58(2): 194-207.
- [18] WU Hui, LI Anshu, ZHENG Qichang, et al. LncRNA LZTS1-AS1 induces proliferation, metastasis and inhibits autophagy of pancreatic cancer cells through the miR-532/TWIST1 signaling pathway[J]. *Cancer Cell International*, 2023, 23(1): 130.
- [19] JIE Wei, ANDRADE K C, LIN Xi, et al. Pathophysiological functions of Rnd3/RhoE[J]. *Comprehensive Physiology*, 2015, 6(1): 169-186.
- [20] VILLALONGA P, GUASCH R M, RIENTO K, et al. RhoE inhibits cell cycle progression and Ras-induced transformation[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, 24(18): 7829-7840.
- [21] ZHU Yajie, ZHOU Jitao, XIA Hongwei, et al. The Rho GTPase RhoE is a p53-regulated candidate tumor suppressor in cancer cells[J]. *International Journal of Oncology*, 2014, 44(3): 896-904.
- [22] ZHOU Jinfeng, YANG Jianjun, FAN Xing, et al. Chaperone-mediated autophagy regulates proliferation by targeting RND3 in gastric cancer[J]. *Autophagy*, 2016, 12(3): 515-528.
- [23] DUPUIS J. Endothelin: setting the scene in PAH[J]. *European Respiratory Review*, 2007, 16(102): 3-7.
- [24] HANSMANN G. Pulmonary hypertension in infants, children, and young adults[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2017, 69(20): 2551-2569.

收稿日期: 2024-01-08

修回日期: 2024-05-27