

# 埃他卡林通过 c-JNK 信号通路抑制缺氧诱导的人肺血管内皮细胞凋亡

俞砚喆<sup>1</sup>, 解卫平<sup>2\*</sup>, 左祥荣<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 南京大学医学院附属鼓楼医院呼吸科, 江苏 南京 210008; <sup>2</sup> 南京医科大学第一附属医院呼吸科, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 研究  $K_{ATP}$  通道开放剂埃他卡林在缺氧诱导的肺血管内皮细胞凋亡调节中的作用及机制。方法: 细胞分组培养并经过药物及缺氧处理后, 分别采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法对细胞活性进行测定, 同时采用 Hoechst 33342 染色法检测细胞凋亡, 采用 Western blot 对 JNK、磷酸化 JNK、caspase-3 等蛋白的表达进行检测。结果: 缺氧可降低细胞活性, 诱导肺动脉内皮细胞凋亡, 而埃他卡林可抑制凋亡, 这种细胞保护作用可被  $K_{ATP}$  拮抗剂 5-HD 阻断; 埃他卡林可抑制缺氧引起的 c-JNK 通路的磷酸化激活, 并抑制下游凋亡蛋白 caspase-3 的表达, 与 c-JNK 抑制剂 SP600125 作用一致, 而 5-HD 处理组的趋势则相反。结论: 埃他卡林可通过开放  $K_{ATP}$  通道抑制缺氧诱导的肺动脉内皮细胞凋亡, 这种保护机制涉及了对 c-JNK 通路及下游凋亡蛋白的调节。

**[关键词]** 低氧性肺高压; 人肺动脉内皮细胞; 埃他卡林; 氨基末端激酶

**[中图分类号]** Q813

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)08-928-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160806

## Protective effect of Iptakalim on hypoxia-induced apoptosis in HPAECs through c-JNK

Yu Yanzhe<sup>1</sup>, Xie Weiping<sup>2\*</sup>, Zuo Xiangrong<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Medical School of Nanjing University, Nanjing 210008; <sup>2</sup>Department of Respiratory Medicine, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** The present study was designed to investigate the protective effect of Iptakalim against hypoxia-induced apoptosis in human pulmonary arterial endothelial cells (HPAEC) and the potential mechanisms involved. **Methods:** After medicine and hypoxia treatment, the MTT assay was performed to measure cell viability. Hoechst 33342 was then used to detect apoptosis. Finally, the expression of phospho-JNK, JNK and caspase-3 was assayed by Western blot. **Results:** Our study showed that hypoxia significantly decreased the cell viability by inducing cellular apoptosis, while Iptakalim reversed the hypoxia-induced apoptosis, which can be blocked by 5-HD. Iptakalim and SP600125 consistently inhibited the phosphorylation of c-JNK and the expression of caspase-3 induced by hypoxia, and this effect was completely blocked by the 5-HD. **Conclusion:** Iptakalim protects the HPAEC from hypoxia-induced apoptosis by opening the  $K_{ATP}$  channels. The possible cellular mechanisms for this protective effect may involve the inhibition of phospho-JNK and the downstream cell death pathways.

**[Key words]** hypoxic pulmonary hypertension; human pulmonary arterial endothelial cells; Iptakalim; c-JNK

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(08): 928-932]

低氧性肺高压(hypoxic pulmonary hypertension, HPH)是由于缺氧刺激引起肺血管结构及功能发生改变, 从而出现肺循环血流动力学异常的一种疾病<sup>[1]</sup>, 是多种心肺疾病发展过程中的共同病理生理环节。其发生机制目前尚未完全阐明, 目前研究认为缺氧诱导的肺血管内皮细胞凋亡是低氧性肺高

压发生的始动因素。c-Jun 氨基末端激酶(c-JNK)是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路家族的重要成员, 在包括缺氧在内的各种应激中, c-JNK 的激活与细胞的凋亡调节密切相关。埃他卡林是我国自主研发的新型  $K_{ATP}$  通道开放剂, 可同时作用于细胞膜及线粒体的  $K_{ATP}$  通道, 研究表明  $K_{ATP}$  通道与细胞凋亡的调节紧密相关<sup>[2-4]</sup>, 同时  $K_{ATP}$  通道与 c-JNK 通路关系密切<sup>[5-6]</sup>。

因此本实验研究通过测定埃他卡林对肺血管

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81273571)

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

内皮细胞凋亡的影响以及 c-JNK 信号通路的磷酸化水平及下游凋亡蛋白表达,以证明埃他卡林可通过开放  $K_{ATP}$  通道,抑制 c-JNK 信号通路的磷酸化激活,进而抑制肺血管内皮细胞的凋亡。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

细胞培养基及人肺动脉内皮细胞分别购自美国 Hyclone 实验室及美国 ScienCell Research 实验室。c-JNK 抑制剂 SP600125、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、 $K_{ATP}$  不可逆抑制剂 5-HD、Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich 公司,美国),埃他卡林(Iptakalim,军事医学科学院药理和毒理研究所),c-JNK 及磷酸化 c-JNK 抗体、caspase-3 蛋白抗体及  $\beta$ -actin(Cell Signaling Technology 公司,美国),缺氧密封袋 (AnaeroPack-Anaero,Mitsubishi Gas Chemical 公司,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及分组处理

人肺动脉内皮细胞种植于 100 mm 的塑料培养皿内,培养液包括 10%胎牛血清(FBS)、1%血管内皮生长因子 (VEGF) 以及 100 U/mL 的青霉素及链霉素,置于 5%CO<sub>2</sub> 及 37℃的培养箱中生长至 70%~80%融合时开始进行分组,细胞分为 5 组,对照组处于正常环境,缺氧组无药物处理,埃他卡林处理组采用埃他卡林进行预处理,5-HD 组则在埃他卡林预处理前的 0.5 h 采用 5-HD 进行处理,SP600125 组采用 SP600125 进行预处理,后 4 组细胞在药物处理后采用缺氧密封袋进行缺氧处理。

#### 1.2.2 细胞活性测定

肺动脉内皮细胞活性通过 MTT 法进行测定,细胞首先以  $3 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板,经过药物及缺氧处理后,每孔加入 20  $\mu$ L 的 MTT 试剂(以 5 mg/mL 的浓度溶于 PBS 试剂中),经过 37℃培养箱内孵育 4 h 后除去 MTT 试剂,并加入 DMSO 溶液 (100  $\mu$ L),最后采用酶标仪对细胞活性进行测定。

#### 1.2.3 Hoechst 33342 细胞荧光染色

细胞首先在 24 孔板上培养,生长到 80%融合,之后经过药物及缺氧处理后采用 PBS 溶液进行清洗,20 min 后采用 Hoechst 33342 (10 mg/mL) 进行荧光染色,之后通过荧光显微镜进行观察,计数凋亡细胞的数量及比例来评价肺动脉内皮细胞的凋亡情况。

#### 1.2.4 蛋白印迹分析(Western blot)

磷酸化 c-JNK、c-JNK、caspase-3 的蛋白表达主要通过蛋白印迹法进行测定,当细胞在培养皿上生长至 80%融合时,加入含 90%RIPA 及 10%PMSF 的细胞裂解液,收集细胞裂解产物并以 14 000 r/min 离心 15 min,离心后的上清液与 SDS 缓冲液混合加热 10 min 后制成蛋白样本,之后按照标准的 Western blot 方法进行操作,最后采用 ECL 化学发光测量仪对蛋白表达进行测定。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS15.0 统计软件对数据进行统计学处理,所有数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,统计分析采用 one-way ANOVA 分析,并使用 LSD 法进行组间比较。 $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 埃他卡林对缺氧诱导的肺动脉内皮细胞活性的影响

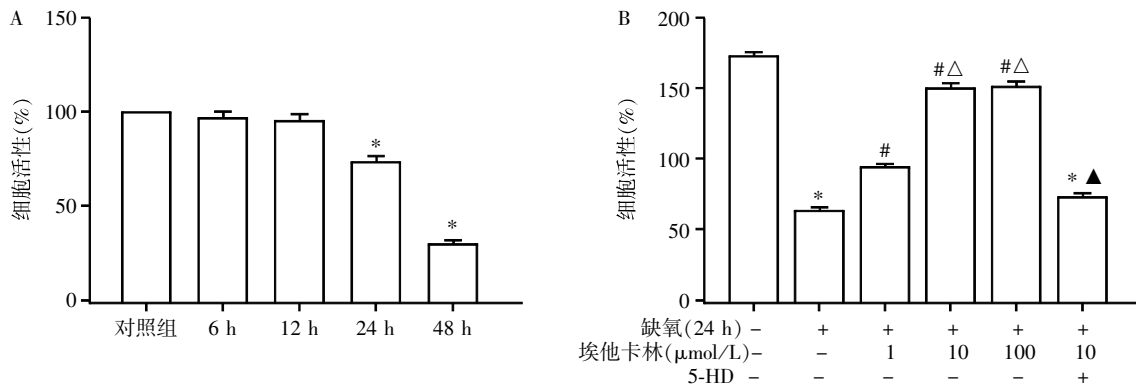
MTT 测定结果显示,随着缺氧时间延长,肺动脉内皮细胞活性逐渐下降,经过 24 h 以上缺氧的细胞活性与对照组具有统计学差异( $P < 0.05$ ,图 1A)。进一步对不同浓度埃他卡林处理组细胞活性测定则显示(图 1B),处理浓度为 1、10、100  $\mu$ mol/L 组的细胞活性与缺氧组相比具有统计学差异,而 10  $\mu$ mol/L 及 100  $\mu$ mol/L 组的细胞活性大于 1  $\mu$ mol/L 组,具有统计学差异,因此确定 10  $\mu$ mol/L 处理 24 h 是埃他卡林的最佳试验浓度和时间,而 5-HD 则可阻断埃他卡林对细胞活性的作用。

### 2.2 埃他卡林对缺氧诱导的肺动脉内皮细胞凋亡的影响

本研究采用 Hoechst 33342 染色法对不同组细胞的凋亡情况进行测定,结果显示,与对照组相比,经过缺氧处理的肺动脉内皮细胞凋亡比例明显增加( $P < 0.05$ ),而埃他卡林能明显减少缺氧诱导的细胞凋亡,与缺氧组相比,存在统计学差异( $P < 0.05$ ),而 5-HD 则能阻断埃他卡林的上述作用,因此细胞凋亡比例与缺氧组无统计学差异(图 2)。从而证实,埃他卡林可通过开放  $K_{ATP}$  通道,抑制缺氧诱导的肺血管内皮细胞凋亡。

### 2.3 埃他卡林与 c-JNK 磷酸化激活的关系

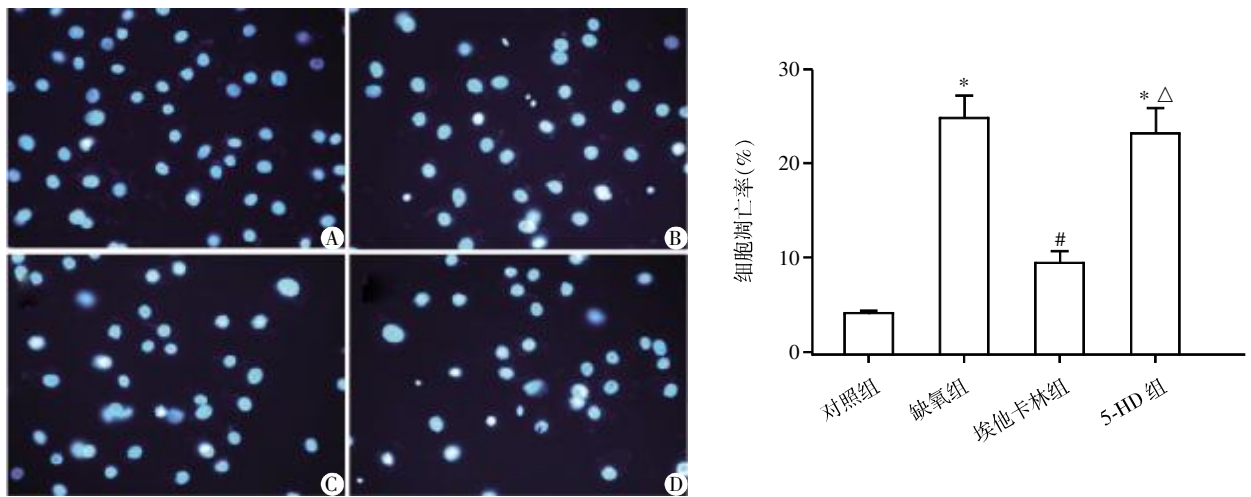
为了确定埃他卡林对 c-JNK 磷酸化激活的影响,本研究进一步测定了不同分组间磷酸化 c-JNK 与 c-JNK 的比值(图 3A),结果显示缺氧可以诱导 c-JNK 的磷酸化激活,而埃他卡林处理组细胞的 c-JNK 磷酸化水平明显低于缺氧组( $P < 0.05$ ),c-JNK



A:不同缺氧时间处理后的细胞活性;B:不同浓度组埃他卡林以及5-HD处理组细胞缺氧后的活性。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与缺氧组比较,\* $P < 0.05$ ;与缺氧+埃他卡林 1 μmol/L组比组,△ $P < 0.05$ ;与缺氧+埃他卡林不同浓度组比较,▲ $P < 0.05$ ( $n=6$ )。

图 1 MTT 法测定的细胞活性

Figure 1 Measurement of cell viability by MTT assay



A:对照组;B:缺氧组;C:埃他卡林组;D:5-HD组。与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与缺氧组比较,\* $P < 0.05$ ;与埃他卡林组比较,△ $P < 0.05$ ( $n=10$ )。

图 2 Hoechst 染色对人肺动脉内皮细胞凋亡的测定

Figure 2 Apoptosis in HPAEC was detected by Hoechst staining

抑制剂 SP600125 处理组也表现出类似的趋势,而 5-HD 则能拮抗埃他卡林对 c-JNK 磷酸化激活的抑制作用。

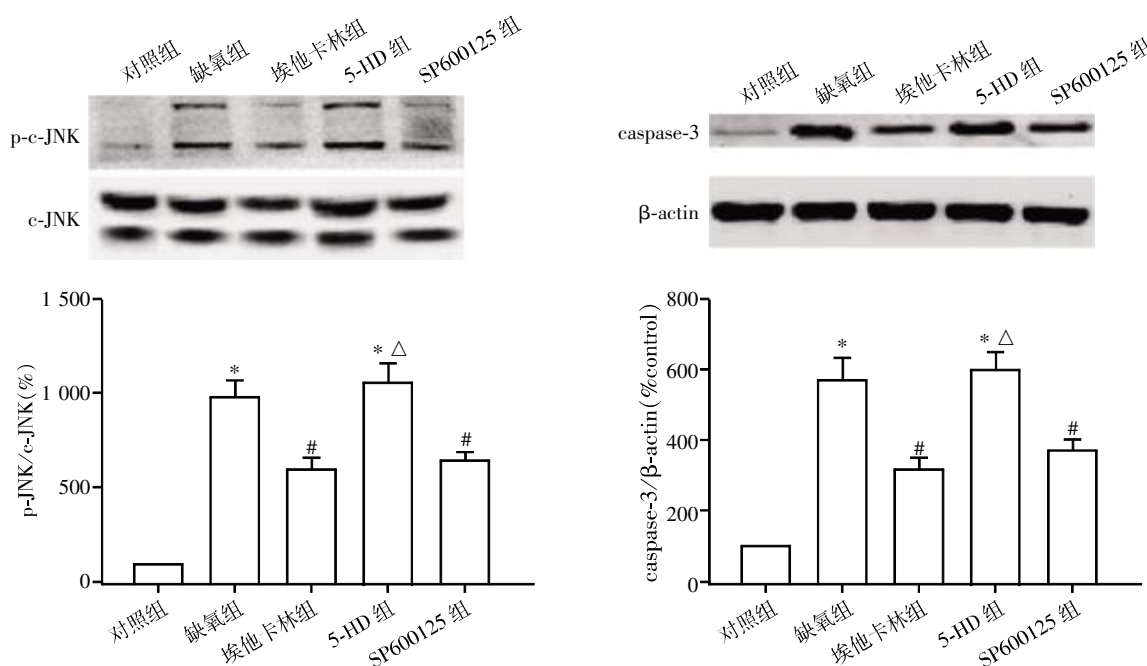
### 2.4 下游凋亡蛋白表达的研究

为进一步确定埃他卡林通过抑制 c-JNK 磷酸化激活,从而抑制细胞凋亡,进一步测定了下游重要凋亡蛋白 caspase-3 的表达,结果显示与对照组相比,缺氧组 caspase-3 表达显著升高( $P < 0.05$ ),埃他卡林及 SP600125 组 caspase-3 表达则显著低于缺氧组( $P < 0.05$ ),而 5-HD 组则呈现出与单独缺氧组类似的表达(图 3)。

### 3 讨论

目前研究发现,埃他卡林在高血压病、肺高压、帕金森病等疾病的治疗领域具有巨大的潜力,但其

确切的作用机制尚未完全阐明,通过相关基础及临床研究,其抗细胞损伤作用越来越引起人们的关注,对神经细胞研究发现埃他卡林可以显著抑制缺血缺氧造成的神经细胞损伤<sup>[2]</sup>,而在氧化应激引起的神经细胞凋亡中,埃他卡林也发挥了类似的保护作用<sup>[3]</sup>。而在肺血管的研究中,埃他卡林也发挥了显著的血管保护作用<sup>[4,7]</sup>,同时埃他卡林与肺血管内皮细胞功能密切相关<sup>[8-10]</sup>。因此为进一步证实埃他卡林在肺血管内皮细胞凋亡调节中发挥的作用,本实验首先通过 MTT 对细胞活性进行测定,同时采用 Hoechst 染色对细胞凋亡进行测定。实验证实,相比于缺氧组,埃他卡林处理组细胞活性增高,凋亡比例显著减少,其抑制剂 5-HD 的应用可逆转上述变化,从而进一步确认,在缺氧诱导的肺动脉内皮细胞凋亡中,埃他卡林可通过开放 KATP 通路,抑制肺



与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与缺氧组比较, # $P < 0.05$ ; 与埃他卡林组比较,  $\Delta P < 0.05$  ( $n=4$ )。

图 3 c-JNK 磷酸化及下游凋亡蛋白的表达

Figure 3 Expression of phosphorylation c-JNK and apoptosis related proteins

血管内皮细胞的凋亡。

为了研究埃他卡林调控凋亡的机制,本试验进一步对相关的细胞信号机制进行了研究。目前,随着对信号通路系统的深入研究,人们发现 MAPK 通路,特别是 c-JNK 通路在各类细胞凋亡中发挥着重要的调节作用,而早先对于神经元细胞及心血管系统缺血再灌注的相关研究已经发现,  $K_{ATP}$  通道与 MAPK 信号通路之间存在密切的联系<sup>[5-6]</sup>。在本实验中,埃他卡林处理组细胞的 c-JNK 磷酸化水平要远低于缺氧组,与 c-JNK 抑制剂 SP600125 处理组呈现出相似的趋势,而  $K_{ATP}$  通道拮抗剂 5-HD 处理组的 c-JNK 磷酸化水平则与缺氧组表现一致,从而进一步证实了这种密切的关系,即在缺氧诱导的肺动脉内皮细胞中,埃他卡林通过开放  $K_{ATP}$  通道,抑制了 c-JNK 信号通路的磷酸化激活。

本研究还进一步测定了下游相关凋亡蛋白表达。目前研究认为, JNK 信号通路对细胞凋亡的调节主要通过线粒体途径及毒受体信号途径发挥作用<sup>[11-12]</sup>,前者通过 Bax 的转位,从而激活 caspase-9,而后者则通过 caspase-8 的募集,最终两种途径均可激活 caspase-3,进而引起细胞凋亡,因此本实验测定了凋亡途径共同通路 caspase-3 的蛋白表达。实验证实,缺氧能够显著增加 caspase-3 的表达,埃他卡林及 c-JNK 抑制剂 SP600125 则能逆转这种改变,而

$K_{ATP}$  拮抗剂 5-HD 处理后, caspase-3 的表达则呈现出与缺氧组一致的变化,从而证实埃他卡林可通过减少 c-JNK 的磷酸化表达,从而对下游的细胞凋亡途径发生影响,最终减少凋亡蛋白 caspase-3 的表达,从而显著抑制了缺氧诱导的肺血管内皮细胞凋亡。

综合上述结果,本研究证实,在肺血管内皮细胞中,埃他卡林可通过开放  $K_{ATP}$  通道,抑制缺氧诱导的细胞凋亡,上述作用是通过抑制 c-JNK 的磷酸化表达及其下游的凋亡蛋白表达来实现的。既往的细胞及动物研究中已经揭示了  $K_{ATP}$  通道可介导内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达及下游的一氧化氮(NO)释放从而调节内皮功能<sup>[3]</sup>,本研究则进一步阐明了  $K_{ATP}$  通道与肺血管内皮细胞凋亡的关系,但  $K_{ATP}$  通道如何调控 c-JNK 通路以及与 eNOS 通路之间的相互作用则仍有待将来研究的进一步阐明。同时,近年来缺氧诱导的各类细胞凋亡的信号通路表达被广泛研究,包括 P38 MAPK、ERK1/2 在内的其他 MAPK 家族信号通路都在凋亡调节中发挥着作用<sup>[13-15]</sup>,因此未来对于相关信号机制的研究还应涉及更多其他信号通路的研究以及信号通路之间的相互作用,从而为埃他卡林在缺氧性肺高压疾病中的临床应用提供更坚实的理论基础。

#### [参考文献]

[1] Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG, et al. Hypoxia-induced

- pulmonary vascular remodeling:cellular and molecular mechanisms[J]. *Circ Res*,2006,99(7):675-691
- [2] Wang H,Zhang YL,Tang XC,et al. Targeting ischemic stroke with a novel opener of ATP-sensitive potassium channels in the brain[J]. *Mol Pharmacol*,2004,66(5):1160-1168
- [3] Chai Y,Niu L,Sun XL,et al. Iptakalim protects PC12 cell against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative injury via opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channel[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2006,350(2):307-314
- [4] Li J,Long C,Cui W,et al. Iptakalim ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*,2013,18(1):60-69
- [5] Issa K,Kimmoun A,Collin S,et al. Compared effects of inhibition and exogenous administration of hydrogen sulphide in ischaemia-reperfusion injury [J]. *Crit Care*,2013,17(4):R129
- [6] Zhang S,Zhou F,Ding JH,et al. ATP-sensitive potassium channel opener iptakalim protects against MPP-induced astrocytic apoptosis via mitochondria and mitogen-activated protein kinase signal pathways[J]. *J Neurochem*,2007,103(2):569-579
- [7] 吴苏玲,解卫平,孔 辉. 埃他卡林对低氧诱导的肺动脉高压大鼠炎症反应的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*,2013,33(2):149-154
- [8] Zhu R,Bi LQ,Wu SL,et al. Iptakalim attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats by endothelial function protection[J]. *Mol Med Rep*,2015,12(2):2945-2952
- [9] Zong F,Zuo XR,Wang Q,et al. Iptakalim rescues human pulmonary artery endothelial cells from hypoxia-induced nitric oxide system dysfunction[J]. *Exp Ther Med*,2012,3(3):535-539
- [10] Wang Y,Zeng FH,Long CL,et al. The novel ATP-sensitive potassium channel opener iptakalim prevents insulin resistance associated with hypertension via restoring endothelial function[J]. *Acta Pharmacol Sin*,2011,32(12):1466-14674
- [11] Date T,Taniguchi I,Inada K,et al. Nicorandil inhibits serum starvation-induced apoptosis in vascular endothelial cells[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*,2005,46(6):721-726
- [12] Härtel FV,Holl M,Arshad M,et al. Noll T. Transient hypoxia induces ERK-dependent anti-apoptotic cell survival in endothelial cells[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2010,298(6):C1501-1509
- [13] Zhou F,Yao HH,Wu JY,et al. Opening of microglial K(ATP)channels inhibits rotenone-induced neuroinflammation[J]. *J Cell Mol Med*,2008,12(5A):1559-1570
- [14] Park MT,Choi JA,Kim MJ,et al. Suppression of extracellular signal-related kinase and activation of p38 MAPK are two critical events leading to caspase-8- and mitochondria-mediated cell death in phytosphingosine-treated human cancer cells[J]. *J Biol Chem*,2003,278(50):50624-50634
- [15] Lin FL,Hsu JL,Chou CH,et al. Activation of p38 MAPK by damnacanthol mediates apoptosis in SKHep 1 cells through the DR5/TRAIL and TNFR1/TNF- $\alpha$  and p53 pathways[J]. *Eur J Pharmacol*,2011,650(1):120-129

[收稿日期] 2015-12-27