

网络出版时间: 2018-5-23 14:13 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180522.1500.012.html>

## PLA 激活 JNK 信号通路促进 NCI-H292 细胞凋亡

吴莎莎, 范晓云, 梁雅雪, 徐玉菲, 王亚妮, 管明龙

**摘要** 目的 探讨多聚左旋精氨酸(PLA)诱导 NCI-H292 细胞凋亡的信号通路及分子机制。方法 将加入 PLA 的浓度梯度分 5 组: 0、10、20、40、60 mg/L, 作用 NCI-H292 细胞 24 h 后 Western blot 法检测每组 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)的磷酸化水平; 设对照组、PLA 组(40 mg/L)、SP 组(加入特异性 JNK 通路抑制剂 SP600125)、PLA + SP 组, 加药 24 h 后流式细胞仪检测每组 NCI-H292 细胞凋亡率, Western blot 法检测各组 NCI-H292 细胞内凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax、Caspase-3、P-JNK/JNK 和  $\beta$ -actin 蛋白的表达水平。结果 对照组、PLA 组、SP 组、PLA + SP 组 NCI-H292 细胞凋亡率分别为 (5.13 ± 1.07)%、(22.62 ± 1.66)%、(5.69 ± 0.14)%、(8.99 ± 3.73)%; Western blot 法检测 PLA 诱导 NCI-H292 细胞内 BCL-2/Bax 比值降低 ( $P < 0.01$ ), Caspase 3 表达升高 ( $P < 0.001$ ), PLA 诱导 NCI-H292 细胞 JNK 磷酸化水平增加 ( $P < 0.001$ ), SP600125 抑制 PLA 诱导 JNK 磷酸化 ( $P < 0.001$ )。结论 PLA 可能介导 JNK 信号通路引起 NCI-H292 细胞凋亡水平增加。

**关键词** 哮喘; c-Jun 氨基末端激酶; 细胞凋亡

中图分类号 R 256.12

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0885-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.012

哮喘是以气道高反应性和气道重构为特征的一种常见的呼吸系统疾病,哮喘的本质是慢性气道炎症。气道上皮细胞(airway epithelial cell, AEC)是气道、肺内稳态和炎症的主要调节细胞,能够通过抑制内源性的 PRR 信号等机制抑制炎症过程<sup>[1]</sup>,气道上皮损伤及损伤后的异常凋亡在哮喘发病中起到了重要作用,损伤的气道上皮细胞破坏了气道的屏障功能,并且能够合成释放多种炎症因子,调控哮喘气道炎症及气道重塑的病理过程<sup>[2]</sup>。聚阳离子蛋白多

聚左旋精氨酸(poly-L-arginine, PLA)能够在不产生严重的上皮细胞毒性的情况下激活细胞内的激酶或磷酸酶,改变大分子透膜电位,体外研究中 PLA 常被来诱导气道上皮细胞模拟哮喘炎症反应<sup>[3]</sup>。实验组前期研究<sup>[4]</sup>显示体外 PLA 可引起气道上皮细胞凋亡,但其具体信号通路及分子调控机制尚不清楚,该研究旨在探讨 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)信号通路在此过程中的作用。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 细胞株** NCI-H292 细胞属人肺的黏液上皮样癌细胞,由中国科学院上海生命科学研究院细胞库提供。

**1.1.2 主要试剂** 胎牛血清(美国 Gibco 公司); Western blot 检测试剂、RPMI 1640 培养液(美国 Thermo 公司);多聚左旋精氨酸、SP600125-JNK 通路特异性抑制剂(美国 Sigma 公司);细胞凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, BCL-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, BAX)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cysteine-specific proteinase, Caspase-3)蛋白一抗(美国 CST 公司);抗  $\beta$ -actin 抗体、辣根酶标记山羊抗兔/小鼠 IgG(H + L)(北京中杉金桥公司);胰蛋白酶、Western blot 一抗稀释液、RIPA 裂解液(江苏碧云天公司);流式 Annexin V-66FITC/PI 双染凋亡检测试剂盒(上海贝博生物公司)。

#### 1.2 方 法

**1.2.1 细胞培养** NCI-H292 细胞生长于 10% 胎牛血清 + 100 mg/L 青霉素 + 100 mg/L 链霉素 + 12 mmol/L L-谷氨酰胺的 RPMI1640 培养液中,放置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内传代培养,每 2 ~ 3 d 换液 1 次。

**1.2.2 Western blot 法检测** PLA 处理 24 h 后的 NCI-H292 细胞内 JNK 及 P-JNK 的表达 将加入 PLA 的浓度梯度分 5 组: 0、10、20、40、60 mg/L,作用 NCI-H292 细胞 24 h 后提取各组细胞总蛋白, SDS-PAGE 电泳分离蛋白并将目标蛋白转移至

2018-03-27 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1708085MH178);2016 年高校学科(专业)拔尖人才学术资助重点项目(编号:gxhjZD2016036)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院老年呼吸与危重症学科,合肥 230022

作者简介:吴莎莎,女,硕士研究生;

范晓云,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: smallcloud2@126.com

PVDF 膜上,室温下在 50 g/L 的脱脂牛奶中封闭 2 h,洗膜后孵化一抗过夜、再次洗膜后孵化二抗,最后将膜置于暗室中 ECL 显影。以  $\beta$ -actin 为内参,Image J 分析条带灰度值,分析各组 JNK 磷酸化有无差异。

**1.2.3 流式细胞仪双染色法检测 JNK 信号通路特异性阻断剂 SP600125 干预后 PLA 作用 24 h 的 NCI-H292 细胞凋亡率** 设空白对照组、PLA 组、SP600125 组、PLA + SP600125 组,提前 30 min 用 SP600125 预处理 NCI-H292 细胞,然后按照分组要求加入 PLA,培养 24 h 后用胰酶消化转移至 15 ml 离心管离心 5 min(1 500 r/min),弃上清液,PBS 洗涤 2 次后离心 5 min(1 500 r/min);用 400  $\mu$ l  $1 \times$  Annexin V 结合液悬浮细胞,室温下避光孵育 15 min;再加入 10  $\mu$ l PI 染色液 4  $^{\circ}$ C 下孵育 5 min,PBS 洗涤重悬细胞,用流式细胞仪(BDFACSVERS,美国)检测,FlowJo 软件分析结果。

**1.2.4 Western blot 检测抑制 JNK 信号通路后凋亡蛋白及信号通路蛋白的表达** 采用 Western blot 法分别检测空白对照组、PLA 组、PLA + SP600125 组、SP600125 组中 NCI-H292 细胞内 Bax、Bcl-2、Caspase-3 的表达和信号通路蛋白 JNK、P-JNK 的表达,具体操作方法同上。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组数据之间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA);两两间比较当方差齐时采用 LSD-t 检验,方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 PLA 作用于 NCI-H292 细胞内的 JNK 磷酸化水平变化** Western blot 法检测不同浓度 PLA(0、10、20、40、60 mg/L)作用于 NCI-H292 细胞后各组的 JNK、P-JNK、 $\beta$ -actin 蛋白含量,与空白对照组比较,10 mg/L 组 JNK 磷酸化水平差异无统计学意义( $P = 0.179$ ) 20、40、60 mg/L 组的 JNK 磷酸化水平均增加,且呈现浓度依赖性,差异有统计学意义( $F = 4.239$   $P$  均  $< 0.05$ )。见图 1。

**2.2 SP600125 抑制 PLA 对 NCI-H292 细胞凋亡的诱导作用** 流式 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 NCI-H292 细胞凋亡率结果显示,空白对照组、PLA 组、SP600125 组、PLA + SP600125 组 NCI-H292 细胞凋亡率分别为 (5.13  $\pm$  1.12)%、(22.62  $\pm$  1.66)%、(5.69  $\pm$  0.18)%、(8.99  $\pm$  1.74)%;采用

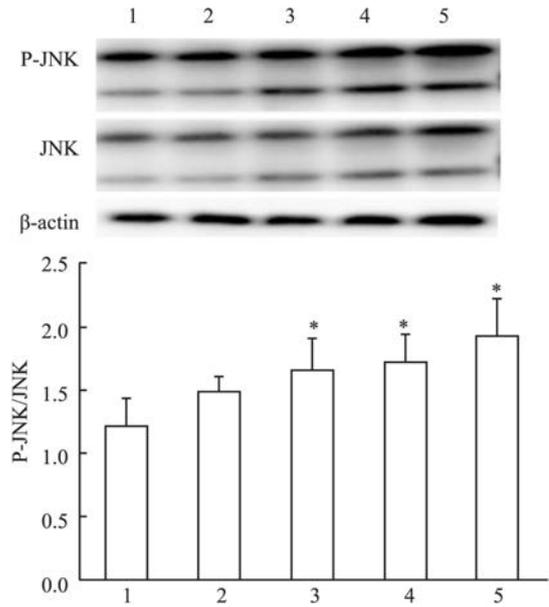


图 1 Western blot 法检测 PLA 作用 24 h 后 NCI-H292 细胞内 P-JNK/JNK 的表达

1: 0 mg/L PLA; 2: 10 mg/L PLA; 3: 20 mg/L PLA; 4: 40 mg/L PLA; 5: 60 mg/L PLA; 与对照组比较: \*  $P < 0.05$

单因素方差分析统计结果,显示各组间差异有统计学意义( $F = 113.961$ ,  $P < 0.001$ ),与对照组相比,PLA 组 NCI-H292 细胞凋亡率增高( $P < 0.001$ );与 PLA 组比较,PLA + SP 组细胞凋亡率降低( $P < 0.001$ )。说明 PLA 作用后 NCI-H292 细胞凋亡率增加,而 SP600125 能抑制 PLA 对 NCI-H292 细胞凋亡的诱导作用。见图 2。

**2.3 SP600125 对 PLA 诱导的 NCI-H292 细胞内 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达及 JNK 磷酸化的影响**

Western blot 检测对照组、PLA 组、PLA + SP 组、SP 组的 BCL-2/Bax 和 Caspase-3、P-JNK/JNK 水平,与空白对照组比较,PLA 组 Bcl-2/Bax 比值降低( $F = 21.077$ ,  $P < 0.01$ ); Caspase-3 表达明显升高( $F = 31.768$ ,  $P < 0.001$ ); P-JNK/JNK 比值升高( $F = 31.778$ ,  $P < 0.001$ )。与 PLA 组比较,PLA + SP 组 Bcl-2/Bax 比值升高( $P < 0.001$ ); Caspase-3 表达下降( $P < 0.001$ ); P-JNK/JNK 比值降低( $P < 0.001$ )。见图 3。

**3 讨论**

在支气管哮喘发病过程中气道上皮细胞易受到各种致炎因素攻击而发生凋亡<sup>[5]</sup>,Bucchieri et al<sup>[6]</sup>发现吸烟可通过 Caspase 依赖途径引起哮喘气道上皮凋亡增多;Lin et al<sup>[7]</sup>研究证实来源于屋尘螨的

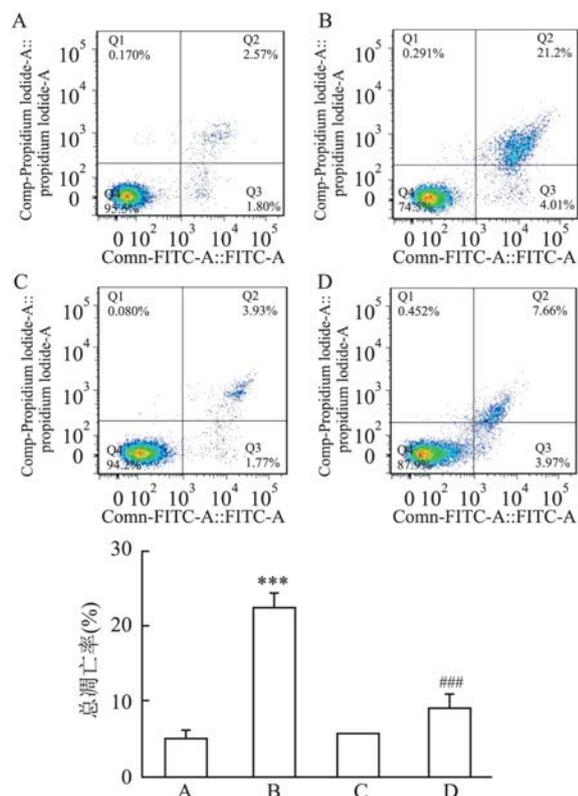


图2 流式细胞仪检测 SP600125 抑制 PLA 诱导 NCI-H292 细胞凋亡  
A: 对照组; B: PLA 组; C: SP 组; D: PLA + SP 组; 与对照组比较:  
\*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 PLA 组比较: ###  $P < 0.001$

吸入性变应原 Der p2 诱导支气管上皮 BEAS-2B 细胞株凋亡,本课题组前期研究<sup>[8]</sup>显示 PLA 可诱导 NCI-H292 细胞凋亡,说明外界刺激可引起哮喘患者气道上皮细胞凋亡,气道上皮细胞异常凋亡可能是导致哮喘发病及气道重构的重要机制。JNK 通路是 MAPK 家族代表性成员之一,可被应激刺激、细胞因子、氧化损伤等激活,是细胞凋亡的重要调节靶点, Lai et al<sup>[9]</sup>发现海洛因可通过激活 JNK 通路使原代培养的小脑颗粒细胞凋亡增多,使用 JNK 抑制剂 SP600125, Caspase 抑制剂 z-VAD, 或联合使用 SP600125 和 z-VAD 后该凋亡作用受到明显抑制。许多研究<sup>[10]</sup>证实 JNK 通路参与调控神经细胞、心肌细胞、肝细胞及癌细胞的凋亡,但 JNK 在气道上皮细胞凋亡中作用的研究并不多见。本实验中,利用 Western blot 法检测不同浓度 PLA(0、10、20、40、60 mg/L) 作用及使用 JNK 抑制剂 SP600125 后 NCI-H292 细胞中 JNK 的磷酸化水平,结果显示 PLA 诱导 NCI-H292 细胞 JNK 磷酸化水平增加 ( $P < 0.001$ ),且呈浓度依赖性,SP600125 抑制 PLA 诱导 JNK 磷酸化 ( $P < 0.001$ ),揭示 PLA 可能介导 JNK 信号通路引起气道上皮 NCI-H292 细胞凋亡水平增加。

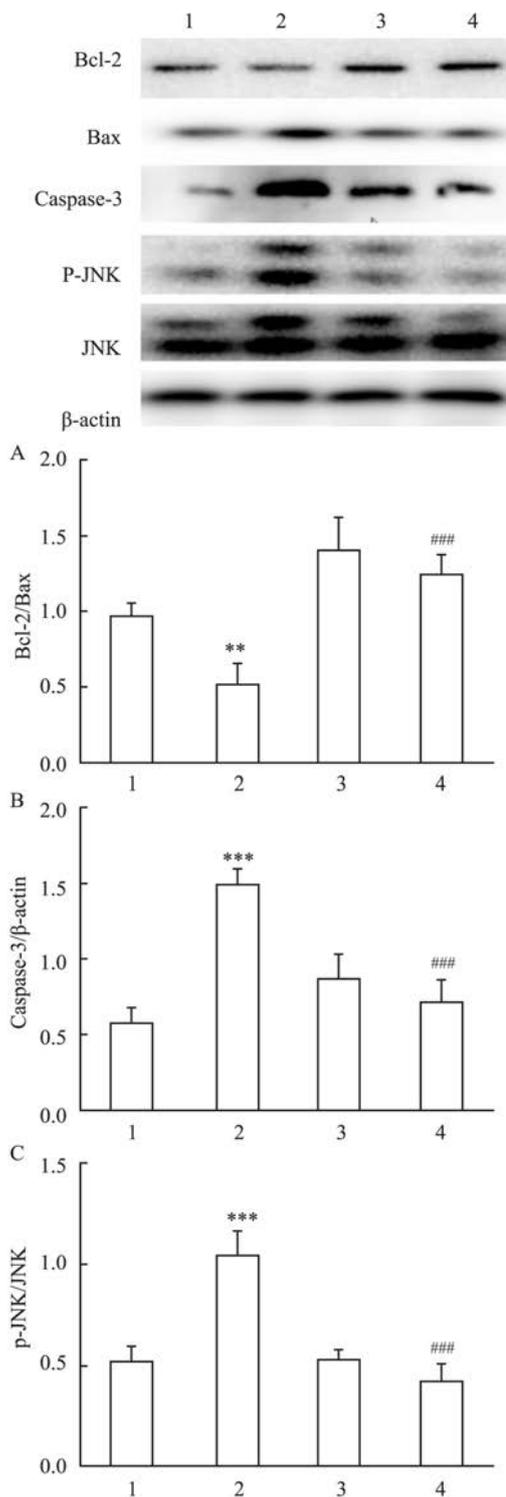


图3 Western blot 法检测 SP600125 抑制 PLA 诱导 NCI-H292 细胞内 Bcl-2、Bax、Caspase-3 及 P-JNK/JNK 的表达  
A: 统计分析 Bcl-2 与 Bax 条带灰度值比值; B: 统计分析 Caspase-3 与  $\beta$ -actin 条带灰度值比值; C: 统计分析 P-JNK 与 JNK 条带灰度值比值; 1: 对照组; 2: PLA 组; 3: PLA + SP 组; 4: SP 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与 PLA 组比较: ###  $P < 0.001$

Bcl-2 是 Bcl-2 家族中抗凋亡的关键性蛋白,可通过抑制线粒体膜通透性减少由紫外线、自由基和

生长因子缺乏等多种应激作用引起的细胞凋亡,研究<sup>[11]</sup>显示过敏性刺激后,支气管肺泡灌洗液 Bcl-2 蛋白表达增多,而 Bcl-2 抑制剂 ABT-737 和 ABT-199 可减少激素不敏感型哮喘的气道炎症反应,提示 Bcl-2 是哮喘气道炎症及气道上皮凋亡的调控因子。与之作用相反, Bcl-2 家族另一成员 Bax 则诱导细胞死亡<sup>[12]</sup>, Bax 可通过 BH3 结构域与 Bcl-2 蛋白结合形成异二聚体,从而抑制 Bcl-2 蛋白的抗凋亡作用。Caspase-3 蛋白酶的激活是细胞凋亡过程中的核心步骤,在线粒体依赖的细胞凋亡途径激活后, Caspase-3 通过细胞色素 C 介导引起 DNA 的降解或分裂,还可经 Fas/FasL 介导的死亡受体细胞凋亡信号途径降解 Bcl-2 蛋白,从而诱导细胞凋亡。Rouabhia et al<sup>[13]</sup> 研究表明电子烟烟雾通过 Caspase-3 途径诱导人牙龈上皮细胞凋亡。所以 Bcl-2/Bax 及 Caspase-3 均是反映细胞凋亡状态的重要指标,本实验中加入 JNK 抑制剂 SP600125, PLA + SP 组与 PLA 组相比 Bcl-2/Bax 升高, Caspase-3 降低,说明 PLA 可能通过调控 NCI-H292 细胞内 Bcl-2/Bax 及 Caspase-3 水平诱导 NCI-H292 细胞凋亡。

### 参考文献

- [1] Weitnauer M, Mijoeck V, Dalpke A H. Control of local immunity by airway epithelial cells [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9(2): 287-98.
- [2] Whitsett J A, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity [J]. *Nat Immunol*, 2015, 16: 27e35.
- [3] 陆兆双, 范晓云, 陈冰, 等. 多聚左旋精氨酸通过 p38/MAPK 信号通路诱导 NCI-H292 细胞分泌 IL-6、IL-8 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(12): 1693-6.
- [4] 张玲玲, 范晓云, 吴莎莎, 等. 多聚左旋精氨酸诱导 NCI-H292 细胞凋亡及其可能机制的分析 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(10): 1135-9.
- [5] Gon Y, Hashimoto S. Role of airway epithelial barrier dysfunction in pathogenesis of asthma [J]. *Allergol Int*, 2018, 67(1): 12-7.
- [6] Bucchieri F, Marino Gammazza A, Pitruzzella A, et al. Cigarette smoke causes caspase independent apoptosis of bronchial epithelial cells from asthmatic donors [J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0120510.
- [7] Lin C H, Hong Y C, Kao S H. Aeroallergen Der p 2 induces apoptosis of bronchial epithelial BEAS-2B cells via activation of both intrinsic and extrinsic pathway [J]. *Cell Biosci*, 2015, 5: 71.
- [8] Fan X Y, Chen B, Lu Z S, et al. Poly-L-arginine acts synergistically with LPS to promote the release of IL-6 and IL-8 via p38/ERK signaling pathways in NCI-H292 cells [J]. *Inflammation*, 2016, 39(1): 47-53.
- [9] Lai B, Pu H, Cao Q, et al. Activation of caspase-3 and c-Jun NH2-terminal kinase signaling pathways involving heroin-induced neuronal apoptosis [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 502(3): 209-13.
- [10] 熊方圆, 唐松涛, 苏欢, 等. 褪黑素对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡及 MAPK 通路的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(5): 634-8.
- [11] Tian B P, Xia L X, Bao Z Q, et al. Bcl-2 inhibitors reduce steroid-insensitive airway inflammation [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(2): 418-30.
- [12] Tsai C J, Liu S, Hung C L, et al. BAX-induced apoptosis can be initiated through a conformational selection mechanism [J]. *Structure*, 2015, 23(1): 139-48.
- [13] Rouabhia M, Park H J, Semlali A, et al. E-cigarette vapor induces an apoptotic response in human gingival epithelial cells through the Caspase-3 pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(6): 1539-47.

## PLA activates JNK signal pathway to promote apoptosis of NCI-H292 cells

Wu Shasha, Fan Xiaoyun, Liang Yaxue, et al

(Dept of Elderly Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

**Abstract Objective** To investigate the signaling pathway and molecular mechanism of PLA-induced NCI-H292 apoptosis. **Methods** The concentration gradients with PLA were divided into five groups: 0, 10, 20, 40 and 60 mg/L. After NCI-H292 cell treatment for 24 hours, Western blot was employed to detect the phosphorylation level of JNK in each group. The set groups included the control group, PLA group (40 mg/L), SP (JNK inhibitor) group, and PLA + SP group. After 24 hours' treatment, flow cytometer was used to detect NCI-H292 apoptotic rate in each group, while Western blot was adopted to detect their Bcl-2/Bax, Caspase-3, P-JNK/JNK and  $\beta$ -actin protein expression levels in NCI-H292 cells. **Results** The NCI-H292 apoptotic rates in the black control group, PLA group, SP group, and PLA + SP group were (5.13  $\pm$  1.07)%, (22.62  $\pm$  1.66)%, (5.69  $\pm$  0.14)%, (8.99  $\pm$  3.73)%, respectively. According to the detection results by Western blot, the BCL-2/Bax ratio in PLA-induced

# miR-17-5p 在动脉粥样硬化小鼠中的作用机制研究

谭力力 刘丽敏

**摘要** 目的 探讨 miR-17-5p 在动脉粥样硬化发展中对组织炎症反应及氧化应激水平的影响。方法 高脂喂养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠 12 周构建动脉粥样硬化(AS)模型,尾静脉注射 miR-17-5p 拮抗剂。HE 染色观察主动脉的病理变化;TUNEL 染色观察细胞凋亡,Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达情况;ELISA 检测炎症因子的表达。通过检测丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和髓过氧化物酶(MPO)的活性评估氧化应激水平。结果 抑制 miR-17-5p 减轻了 AS 小鼠主动脉的病变程度,减少了主动脉细胞凋亡,同时下调了 Bax、cleaved-caspase-3、cleaved-PARP 的表达,上调了 Bcl-2 蛋白表达。抑制 miR-17-5p 后,AS 小鼠主动脉 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平下降,IL-10 水平上升,同时 MDA 含量及 MPO 活性受到抑制,SOD 活性上调。结论 抑制 miR-17-5p 可以通过减轻动脉粥样硬化小鼠主动脉的炎症反应和氧化应激水平缓解动脉粥样硬化病变。miR-17-5p 可能是治疗动脉粥样硬化的潜在靶点。

**关键词** 动脉粥样硬化;炎症;氧化应激;miR-17-5p

中图分类号 R 543.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0889-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.013

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病,是缺血性心脑血管疾病的病理基础<sup>[1]</sup>。在世界范围内,心脑血管疾病是死亡率最高的疾病,因此,在 AS 发病早期的诊断和治疗对于防治心脑血管疾病显得尤为重要。近几年来,micro-

RNA 在疾病中的作用受到了广泛的关注。一些 microRNA 分子已经被证实其在血浆中的表达量与疾病发生具有较为明确的相关性<sup>[2]</sup>,甚至直接调控一些主要的通路影响疾病的发生发展,具有作为生物学标志的应用价值<sup>[3-4]</sup>。有研究<sup>[5]</sup>曾表明,miR-17-5p 的表达水平与冠状动脉粥样硬化的严重程度具有相关性,但是 miR-17-5p 对 AS 的具体影响和机制尚不清楚,因此,该研究探讨 miR-17-5p 在动脉粥样硬化中对炎症反应和氧化应激的影响,并初步评估 miR-17-5p 在 AS 的诊断和治疗中的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和材料

**1.1.1 实验动物** C57BL/6 和 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠(雄性,6 周,18~22 g)购自 Vital River 实验中心(中国北京)根据中国医科大学附属第一医院动物保护和使用的标准在无病原体条件下饲养。

**1.1.2 主要试剂** 髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)测定试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)WET 法测定试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(南京建成);小鼠肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )ELISA 试剂盒、小鼠白介素-10(interleukin-10, IL-10)ELISA 试剂盒、小鼠白介素-6(interleukin-6, IL-6)ELISA 试剂盒(Boster);苏木精(Solarbio);醇溶(国药);B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体、活化半胱天冬酶 3(cleaved-caspase-3)抗体、活化多聚 ADP 核糖聚合酶[cleaved poly(ADP-ribose) polymerase, cleaved-PARP]抗体(万类生物)。

2018-02-28 接收

基金项目:辽宁省自然科学基金(编号:201602728);沈阳市科技计划项目(编号:F16-206-9-17、F14-158-9-27)

作者单位:沈阳医学院附属第二医院心血管内科,沈阳 110002

作者简介:谭力力,女,博士,副主任医师;

刘丽敏,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: 648316800@qq.com

NCI-H292 cells was reduced ( $P < 0.01$ ), the expression of Caspase-3 was increased ( $P < 0.001$ ). In PLA-induced NCI-H292 cells, the phosphorylation level of JNK was enhanced ( $P < 0.001$ ), and SP600125 inhibited the JNK phosphorylation induced by PLA ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** PLA may lead to the increase of NCI-H292 apoptosis level by inducing JNK signaling pathway.

**Key words** asthma; c-jun amino terminal kinase; cell apoptosis