

# JNK 信号转导通路在 Ang II 诱导的血管内皮细胞衰老中的作用机制

单海燕, 韦晓洁, 于凯, 赵心, 于晓松

(中国医科大学附属第一医院全科医学科, 沈阳 110001)

**摘要:**目的: 探讨血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 对人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 衰老的影响, 以及 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun-NH2-terminal kinase, JNK)、核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 表达的变化。方法: 制备 RPMI1640 培养液 (含  $10^{-6}$  mol/L Ang II) 培养 HUVECs, 通过  $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -gal) 染色、流式细胞仪检测细胞衰老; Western-blotting 测定 JNK, 磷酸化 JNK (p-JNK), NF- $\kappa$ B 的蛋白水平。结果: Ang II 诱导组  $\beta$ -gal 阳性细胞数与对照组相比增长了 (81.09±6.72)%; 流式细胞仪检测细胞周期停滞于 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期; 与对照组相比, Ang II 诱导 16, 32, 48 h, p-JNK 蛋白表达水平显著增高 ( $P<0.05$ ), p-JNK 水平于 32 h 达到最高峰 ( $P<0.01$ ); p-JNK 表达呈持续增加时, NF- $\kappa$ B 呈显著上升趋势。结论: Ang II 诱导内皮细胞的衰老可能与 JNK/NF- $\kappa$ B 信号转导通路有关。

**关键词:** 心血管病学; 血管紧张素 II; 内皮细胞; 血管衰老; c-Jun 氨基末端激酶; 核转录因子- $\kappa$ B

中图分类号: R339.3 文献标识码: A 文章编号: 1674-2850(2015)05-0443-06

## Effect of JNK signaling transduction pathway in vascular endothelial cell senescence induced by Ang II

SHAN Haiyan, WEI Xiaojie, YU Kai, ZHAO Xin, YU Xiaosong

(Department of General Practice, The First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

**Abstract:** Objective: To explore the effect of angiotensin II (Ang II) on senescence of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and the expression change of c-Jun-NH2-terminal kinase (JNK) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Methods: HUVECs were cultured in RPMI1640 medium including Ang II ( $10^{-6}$  mol/L).  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) staining and flow cytometry were used to identify cell aging status. By means of Western-blotting, the expression of JNK, p-JNK and NF- $\kappa$ B was observed. Results: The number of positive cells which were identified by  $\beta$ -gal staining was significantly higher in Ang II-induced cells (81.09±6.72)% than those in the control cells. Flow cytometry showed that the cell cycle was at G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> stage. Compared with control group, p-JNK, NF- $\kappa$ B protein expression increased markedly ( $P<0.05$ ) induced by Ang II for 16, 32, 48 h, and the expression level of p-JNK reached the peak at 32 h ( $P<0.01$ ). Furthermore, when the expression of p-JNK increased, the NF- $\kappa$ B expression also increased significantly. Conclusion: There is a probability that activated JNK/NF- $\kappa$ B signaling transduction pathway is involved in the process of endothelial cell senescence induced by Ang II.

**Key words:** cardiovascular diseases; angiotensin II; endothelial cell; vascular aging; c-Jun-NH2-terminal kinase; nuclear factor- $\kappa$ B

基金项目: 国家自然科学基金(81200245); 高等学校博士学科点专项科研基金(20122104120003); 辽宁省科学技术研究项目(201202263, 2012225091)

作者简介: 单海燕(1972—), 女, 副教授, 主要研究方向: 血管衰老及心血管疾病预防康复

通信联系人: 于晓松, 教授, 主要研究方向: 健康管理. E-mail: xsyu@mail.cmu.edu.cn

## 0 引言

21世纪,全球进入不可逆转的老龄化社会。中国老龄化的进程更快,老龄化及其带来的老龄人口健康问题正日益成为当前医学领域面临的主要问题之一。正确认识衰老发生发展的进程从而揭示其分子机制,成为当前医学工作者关注的热点之一。老年人群具有心脑血管病发病率高的特点,存在明显血管衰老的特征<sup>[1]</sup>。血管衰老是心血管疾病的独立危险因素,血管内皮细胞衰老是心血管疾病发生的始动环节,是内皮功能失调的病理生理机制之一<sup>[1~2]</sup>,故从分子水平深入研究和探讨血管内皮细胞衰老机理显得尤其重要。实验利用 Ang II 诱导 HUVECs 衰老,研究 Ang II 作用下 HUVECs 的 JNK, p-JNK 以及 NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平的改变,探寻 JNK/NF- $\kappa$ B 信号转导通路在血管内皮细胞衰老中的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

RPMI1640 培养基、胰蛋白酶、HEPES、L-谷氨酰胺 (Gibco 公司, 美国); HUVECs (ATCC 公司, 美国); Ang II, 兔抗人 JNK, p-JNK 单克隆抗体非免疫血清, 兔抗人 NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  单克隆抗体非免疫血清 (Santa Cruz 公司, 美国);  $\beta$ -gal 染色试剂盒 (Sigma 公司, 美国); 流式细胞仪 FACSscan (BD 公司, 美国); Biophotometer 分光光度仪 (Eppendorf 公司, 德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 HUVECs 培养与实验分组

将 HUVECs 贴壁生长于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,置于 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 培养箱中培养, 2~3 d 换液以维持良好生长状态。用 0.25%胰蛋白酶进行消化、传代。待细胞长至亚融合时无血清培养 12 h, 使细胞达到同步化。加入 Ang II (终浓度为 10<sup>-6</sup> mol/L), 持续刺激 48 h, 第 12, 24 小时各补充 Ang II 1 次, 即为 Ang II 诱导的 HUVECs 衰老模型。对照组为不含 Ang II 的上述培养液培养 48 h; Ang II 组为 Ang II 诱导的 HUVECs 衰老模型组。

#### 1.2.2 衰老细胞鉴定

$\beta$ -gal 为一种可鉴定衰老细胞的生物学标志物, 按照  $\beta$ -gal 染色试剂盒说明书进行操作及相关试剂配置: 用 PBS (pH=7.2) 清洗各组细胞, 加入适量细胞固定工作液, 用 PBS 清洗细胞 3 次, 加入适量细胞固定工作液, 在 37°C 孵育 16 h, 普通光学显微镜下观察, 待出现细胞蓝染时, 去除染色液, 加入 PBS 后观察计数。每组标本随机选取视野, 观察 1 000 个细胞, 细胞质蓝染为衰老细胞, 计算衰老细胞占观察细胞总数的百分比。

#### 1.2.3 细胞周期变化

每组细胞以 0.25%胰蛋白酶消化, 收集细胞, 用预冷的 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 调整细胞数至 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 个/mL, 逐滴加入预冷的 70%乙醇固定, 1 000 r/min 离心, PBS 缓冲液洗 2 次后悬浮于 0.5 mL PBS 中, 缓慢加入 5.0 mL 冷乙醇, 4°C 固定过夜。次日, 1 000 r/min 离心, PBS 缓冲液洗涤, 加入 0.5 mL 终浓度 50 mg/L 的碘化丙啶 (propidium iodide, PI), 4°C 避光反应 30 min。流式细胞仪分析检测; 数据用 BD 公司提供的 Moldifit2.0 分析。

#### 1.2.4 Western-blotting 检测 JNK 与 p-JNK 蛋白水平

收集细胞, 应用 BCA 试剂盒按说明书操作进行蛋白定量, 每个样品上样量为 20  $\mu$ L, 蛋白经过

SDS-PAGE 凝胶电泳分离后至聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF), 5%脱脂奶粉的 TBST 室温下缓慢摇动封闭 60 min, 加入一抗 (兔抗人 JNK, p-JNK, 体积比 1:100) 在 4℃ 摇床孵育过夜, TBST 洗涤后, 与二抗 (体积比 1:1 000) 室温摇床孵育 0.5 h, 常规洗膜化学发光试剂显色, AlphaImager 图像处理系统扫描测定感光区带平均积分吸光度。

### 1.2.5 Western-Blotting 检测 NF- $\kappa$ B 蛋白水平

收集细胞, 考马斯亮兰法测定蛋白样品浓度, 每个样品上样量为 20  $\mu$ L, 常规蛋白电泳分离胶浓度为 12% (pH=8.8), 浓缩胶浓度 4% (pH=6.8), 抽提纯化的蛋白行 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉的 TBST 4℃ 封闭过夜, 加入一抗 (兔抗人 NF- $\kappa$ B 抗体, 体积比 1:100) 室温摇床孵育 3 h, TBST 洗涤后, 与二抗室温摇床孵育 0.5 h, 常规洗膜化学发光试剂显色。AlphaImager 图像处理系统进行定量分析。

### 1.2.6 统计学处理

计量结果均以  $\bar{X} \pm S$  表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 数据资料比较采用单因素 ANOVA (方差分析),  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 细胞的形态学改变

用相差显微镜动态观察细胞形态变化, 如图 1 所示: 对照组 HUVECs 生长良好, 呈长梭形或不规则形; Ang II 诱导组 HUVECs 排列不规则, 体积较大、形态扁平, 胞浆区域增大, 细胞浆/细胞核的比例增加, 胞浆中可见较多颗粒或空泡。

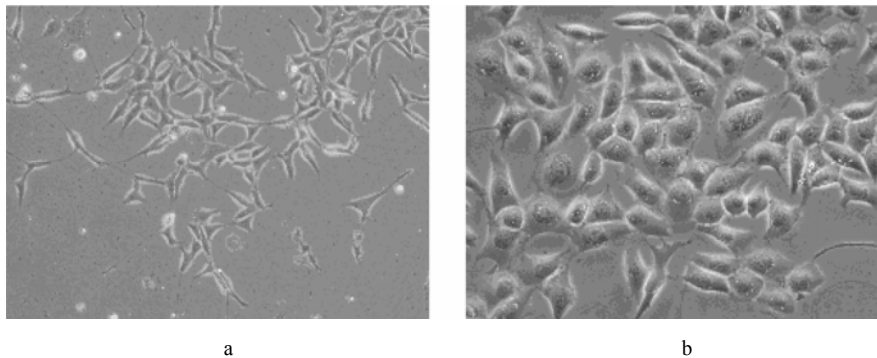


图 1 Ang II 诱导 HUVECs 形态学改变 ( $\times 400$ )

Fig 1 Morphological changes induced by Ang II ( $\times 400$ )

a—对照组; b—Ang II 诱导组

a-Control group; b-Ang II induced group

### 2.2 衰老相关的 $\beta$ -gal 染色

$\beta$ -gal 是一种鉴别细胞衰老的生物学标志, 在 pH=6.0 条件下, 随细胞老化, 胞内产生的蓝色沉淀物也越多。 $\beta$ -gal 染色结果显示: 对照组细胞几乎不表达  $\beta$ -gal; 随 Ang II 诱导 HUVECs 时间的延长,  $\beta$ -gal 阳性细胞数明显增加, Ang II 诱导组  $\beta$ -gal 阳性细胞数明显增加, 80%以上细胞染色阳性, 有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 表明 Ang II 诱导可导致 HUVECs 的衰老, 具体数据如表 1 所示。

表1 各组 HUVECs 的衰老指标比较 ( $\bar{X} \pm S, n = 6$ )

Tab. 1 Comparison of senescence markers of HUVECs in each group ( $\bar{X} \pm S, n = 6$ )

组别	G <sub>0</sub> -G <sub>1</sub> 期/%	G <sub>2</sub> -M期/%	S期/%	β-gal 染色率/%
对照组	54.10±5.84	16.41±1.70	31.02±3.10	0.19±0.03
Ang II 诱导 16 h	69.22±5.18*	10.92±2.32**	22.10±3.08**	58.40±4.51*
Ang II 诱导 32 h	81.35±6.54**	8.70±1.52**	11.62±0.45**	72.15±5.26**
Ang II 诱导 48 h	90.78±6.72*	2.14±0.36**	6.56±3.08*	81.09±6.72**

注: 与对照组相比, \*表示  $P < 0.05$ , \*\*表示  $P < 0.01$

### 2.3 细胞周期分析

细胞增殖能力下降是衰老的另一个生物学标志, 而细胞周期变化可反映细胞的增殖能力。流式细胞仪分析显示对照组 HUVECs 的各期比例正常; 随着 Ang II 诱导 HUVECs 时间的延长, HUVECs 停滞于 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期比例增加, G<sub>2</sub>-M 期比例下降; Ang II 诱导组大部分 HUVECs 停滞于 G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期, S 期及 G<sub>2</sub>-M 期趋于消失 (如表 1、图 2 所示)。

### 2.4 Ang II 作用时间对 JNK, p-JNK 蛋白质表达的影响

Western-blotting 显示, Ang II 作用 HUVECs 随着时间的延长, 其磷酸化水平逐渐增加, 16 h 时, p-JNK 表达为对照组的 1.65 倍 ( $P < 0.05$ ), 32 h 时, p-JNK 蛋白质水平达到高峰, 为对照组的 4.20 倍 ( $P < 0.01$ ); 之后逐渐下降, 48 h 为对照组的 3.10 倍 ( $P < 0.01$ ), 而 JNK 蛋白水平与对照组相比无明显变化, 如图 3 所示。

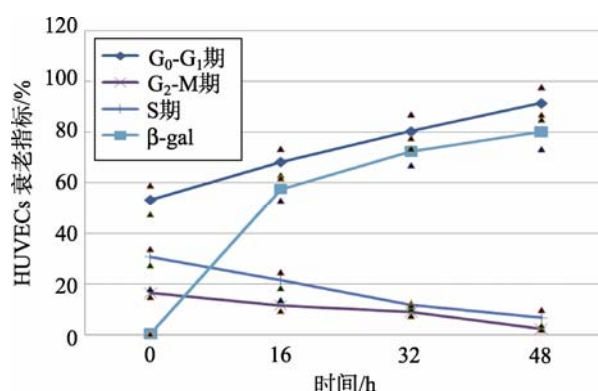


图2 Ang II 诱导 HUVECs 细胞周期时间效应关系分析  
Fig. 2 Analysis of time-effect relation in cell cycle of HUVECs induced by Ang II

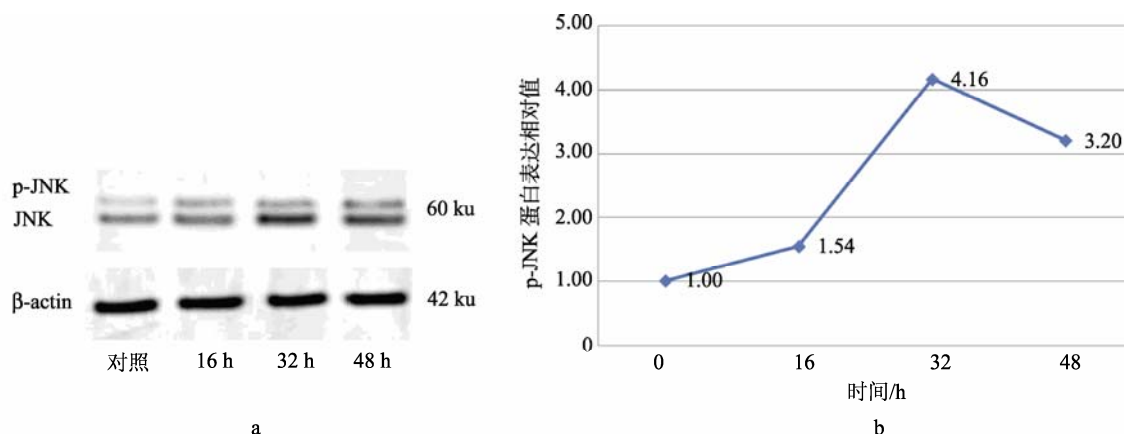


图3 Ang II 诱导时间对 HUVECs JNK 蛋白表达的影响

Fig.3 Time effect of Ang II on JNK expression in HUVECs

a—Western-blotting 分析; b—定量分析

a-Western-blotting analysis; b-Quantitative analysis

### 2.5 Ang II 作用时间对 NF-κB 蛋白表达的影响

Western-blotting 显示, Ang II 作用 HUVECs 随着时间的延长, NF-κB 水平逐渐增加, 16 h 时为对照

组的 1.46 倍 ( $P<0.05$ ), 32h 时, NF- $\kappa$ B 蛋白质水平达到高峰, 为对照组的 3.64 倍 ( $P<0.01$ ); 之后逐渐下降, 48 h 为对照组的 2.60 倍 ( $P<0.01$ ), 如图 4 所示。

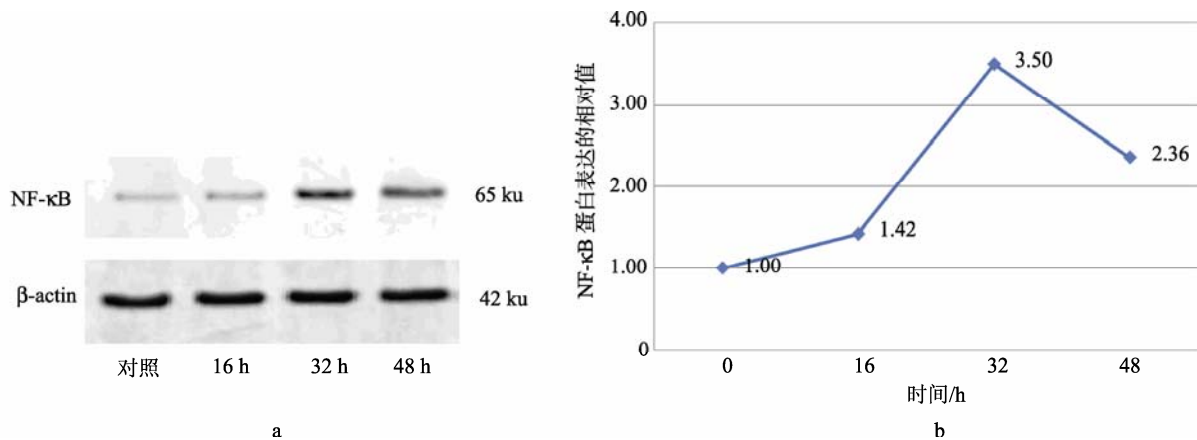


图 4 Ang II 诱导时间对 HUVECs NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响

Fig.4 Time effect of Ang II on NF- $\kappa$ B expression in HUVECs

a—Western-blotting 分析; b—定量分析

a—Western-blotting analysis; b—Quantitative analysis

### 3 讨论与结论

衰老是生命运动的自然过程, 存在于任何生命体的任何时期, 是多细胞生物这个复杂系统中最为复杂的生物过程之一, 不同的情况下衰老速率与程度有所区别。流行病学研究显示, 衰老是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 性心血管疾病重要的危险因素<sup>[1]</sup>, 在 As 过程中起着重要作用, 是 As 形成过程中的起始步骤, 但具体的分子机制仍不清楚。许多研究认为, 衰老的过程是通过信号转导途径实现, 并且不只一种途径<sup>[2-3]</sup>。研究利用既往已建立的血管内皮细胞衰老模型<sup>[4]</sup>, 探讨 JNK/NF- $\kappa$ B 信号转导通路调控血管内皮细胞衰老的机制, 从深层次揭示血管内皮细胞衰老的分子作用机制, 为延缓内皮细胞衰老以及防治动脉粥样硬化开辟新途径。

细胞周期是细胞生命活动中的基本过程, 细胞衰老是细胞周期调控下多基因参与的复杂生理病理过程, 具有一定的可控性。当培养细胞到其寿命末期时, 由于端粒长度不可避免地缩短, 复制性衰老会自然而然发生。细胞衰老最显著的特征是细胞在很长一段时间内仍维持代谢活性, 但因阻滞于 G<sub>1</sub> 期, 失去了对有丝分裂原的反应和合成 DNA 的能力, 不能进入 S 期。在衰老内皮细胞中, 细胞周期蛋白、周期蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 等均发生量与活性的变化<sup>[4-5]</sup>。研究观察 Ang II 可促进血管内皮细胞衰老的改变, 抑制细胞进入增殖周期发生增殖, 与对照组比较, 给予 Ang II 处理后内皮细胞  $\beta$ -gal 染色阳性率增高, G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub> 期细胞的比例明显上升, 而处于 S 期的细胞比例下降, 细胞存活率降低, 表明 Ang II 抑制内皮细胞增殖, 促进内皮细胞衰老。相差显微镜及流式细胞术亦显示衰老细胞较正常对照组细胞明显增多, 这与以往的研究一致<sup>[4]</sup>。

近年来的研究表明, JNK 信号转导通路可能是调控衰老的一条重要信号途径<sup>[6-7]</sup>。众所周知, 有丝分裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 在调节血管内皮细胞衰老过程中起重要作用, JNK 属于 MAPK 家族成员, 是细胞浆中 G 蛋白耦联和受体激活的信号转换器, 其可使转录子和效应蛋白磷酸化, 从而调节细胞的生长、分化、衰老与死亡<sup>[8]</sup>。JNK 通过磷酸化 c-Jun 和 ATF-2 激活转录因子 AP-1, 进一步促进细胞衰老, 而 JNK 激活是其发挥促细胞生存功能的重要前提<sup>[9]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种转

录激活因子,在正常状态下,NF- $\kappa$ B在胞质中与其抑制因子I- $\kappa$ B结合在一起,失去转录活性。JNK能通过磷酸化激活IKK(I- $\kappa$ B的激酶),导致I- $\kappa$ B磷酸化与降解,并与NF- $\kappa$ B分离,被释放后的NF- $\kappa$ B转位到细胞核内并诱导目的基因表达<sup>[9-10]</sup>。Ang II等可诱导NF- $\kappa$ B激活,NF- $\kappa$ B激活参与多种生物学过程,在细胞生长、分化、凋亡、衰老等过程中发挥了极其重要的作用<sup>[10-11]</sup>。研究发现,随着Ang II作用时间的延长,Ang II能显著增加HUVECs p-JNK表达,提示Ang II可以激活HUVECs JNK通路,但JNK信号途径通过哪些蛋白发挥衰老作用知之甚少。研究发现,NF- $\kappa$ B与p-JNK平行增多,并且NF- $\kappa$ B蛋白与p-JNK表达呈正相关,考虑JNK与NF- $\kappa$ B之间可能存在相互调节关系,推测Ang II诱导HUVECs早、中期(16, 32 h),显著激活JNK信号转导通路,致使p-JNK表达逐步递增至高峰(32 h);随着时间进一步增加,p-JNK水平逐渐降低,表明持续的Ang II对已发生表型改变HUVECs中JNK信号通路的激活作用开始减弱,当Ang II作用48 h时,JNK表达已降至最低水平,提示JNK信号途径参与全过程。此外,研究显示p-JNK表达呈持续增加时,NF- $\kappa$ B呈显著上升趋势,NF- $\kappa$ B蛋白质的表达呈动态变化,表明JNK信号途径可能通过调控NF- $\kappa$ B途径参与HUVECs衰老,这为As可能提供新的干预靶点。

尽管实验发现JNK可作为NF- $\kappa$ B上游信号,参与调节NF- $\kappa$ B作用,但是p-JNK是如何调节NF- $\kappa$ B还不清楚,其具体作用环节有待更深入的研究。至于Ang II是否能通过干扰Ang II代谢来降低机体内Ang II浓度或给予JNK抑制剂来防治As,尚需进一步研究探讨。

#### [参考文献] (References)

- [1] HERRERA M D, MINGORANCE C, RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ R, et al. Endothelial dysfunction and aging: an update[J]. *Ageing Res. Rev.*, 2010, 9(2): 142-152.
- [2] LASCHOB G T, RULI D, HOFER E, et al. Identification of evolutionarily conserved genetic regulators of cellular aging[J]. *Aging Cell*, 2010, 9(6): 1084-1097.
- [3] GUNEY I, WU S, SEDIVY J M. Reduced c-Myc signaling triggers telomere-independent senescence by regulating Bmi-1 and p16(INK4a)[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, 103(10): 3645-3650.
- [4] SHAN H Y, BAI X J, CHEN X M. Apoptosis is involved in the senescence of endothelial cells induced by angiotensin[J]. *Cell Biology International*, 2008, 32(2): 264-270.
- [5] 单海燕, 刘姝, 胡翠竹, 等. 血管紧张素 II 对血管内皮细胞凋亡及 p38 丝裂素活化蛋白激酶表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (1): 13-17.  
SHAN H Y, LIU S, HU C Z, et al. Effects of Angiotensin II on apoptosis and expression of p38 mitogen activated protein kinase in vascular endothelial cells[J]. *Chinese Journal of Arteriosclerosis*, 2011, 19(1): 13-17. (in Chinese)
- [6] FAVARO E, MICELI I, BUSSOLATI B, et al. Hyperglycemia induces apoptosis of human pancreatic islet endothelial cells: effects of pravastatin on the Akt survival pathway[J]. *Am. J. Pathol.*, 2008, 173(2): 442-450.
- [7] JEONG A, LEE H J, JEONG S J, et al. Compound K inhibits basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis via regulation of p38 mitogen activated protein kinase and AKT in human umbilical vein endothelial cells[J]. *Biol. Pharm. Bull.*, 2010, 33(6): 945-950.
- [8] TZIVION G, HAY N. PI3K-AKT-FoxO axis in cancer and aging[J]. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, 1813(11): 1925.
- [9] FALLAH M P, CHELVARAJAN R L, GARVY B A, et al. Role of phosphoinositide 3-kinase-Akt signaling pathway in the age-related cytokine dysregulation in splenic macrophages stimulated via TLR-2 or TLR-4 receptors[J]. *Mech. Ageing Dev.*, 2011, 132(6-7): 274-286.
- [10] HASEGAWA Y, SAITO T, OGIHARA T, et al. Blockade of the nuclear factor- $\kappa$ B pathway in the endothelium prevents insulin resistance and prolongs life spans[J]. *Circulation*, 2012, 125(9): 1122-1133.
- [11] HUANG X M, CHEN Y M, ZHANG H, et al. Salubrinal attenuates  $\beta$ -amyloid-induced neuronal death and microglial activation by inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Neurobiol. Aging*, 2012, 33(5): 1007.e9-1007.e17.