

· 论著 ·

PI3K/Akt/FoxO1 信号通路对人源肺动脉平滑肌细胞及肺动脉高压大鼠细胞凋亡的影响

高璐阳¹ 金旗^{1,2} 张毅^{1,3} 李欣¹ 黄志华¹ 章思铖¹ 段安琪¹ 赵智慧¹ 赵青¹ 罗勤¹

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 国家心血管病中心 阜外医院 呼吸与肺血管病诊治中心, 北京 100037; 2. 复旦大学附属中山医院 上海市心血管病研究所内科, 上海 200032; 3. 电子科技大学附属四川省人民医院重症监护科, 四川 成都 610072)

【摘要】目的 探究磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/叉头框蛋白 O1(FoxO1) 信号通路对人源肺动脉平滑肌细胞(hPASMC)及肺动脉高压大鼠细胞凋亡的影响。**方法** 细胞实验部分,将 hPASMC 分为 4 组:(1)空白对照组;(2)血小板源性生长因子-BB(PDGF-BB)组;(3)PDGF-BB + LY294002 组;(4)PDGF-BB + 紫杉醇(paclitaxel)组。采用 TUNEL 检测细胞凋亡,采用蛋白质印迹法检测 Bcl-2、裂解的胱天蛋白酶-3(cleaved caspase-3)和 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路相关蛋白表达水平。动物实验部分,将 12 只 SD 大鼠随机分为 4 组:(1)空白对照组;(2)野百合碱(MCT)组;(3)MCT + LY294002 组;(4)MCT + paclitaxel 组。采用 Western blot 检测 Bcl-2、cleaved caspase-3 和 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路相关蛋白表达水平。**结果** 细胞实验部分:相比于 PDGF-BB 组,PDGF-BB + LY294002 组与 PDGF-BB + paclitaxel 组的 Bcl-2 表达水平下降($P < 0.01$),cleaved caspase-3 表达水平上升($P < 0.01$);相比于空白对照组,PDGF-BB + LY294002 组与 PDGF-BB + paclitaxel 组的凋亡率增加($P < 0.01$)。动物实验部分:相比于 MCT 组,MCT + LY294002 组与 MCT + paclitaxel 组 Bcl-2、磷酸化 Akt 与磷酸化 FoxO1 表达水平下降($P < 0.01$),cleaved caspase-3 与 FoxO1 表达水平上升($P < 0.01$)。各组之间 PI3K 表达水平无显著差异。**结论** PI3K/Akt/FoxO1 信号通路抑制 hPASMC 与肺动脉高压大鼠肺组织的细胞凋亡。

【关键词】 肺动脉高压;PI3K/Akt/FoxO1 信号通路;肺动脉平滑肌细胞;细胞凋亡

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.01.020

Effect of PI3K/Akt/FoxO1 Signaling Pathway on Apoptosis in Human Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell and Pulmonary Hypertension Rat

GAO Luyang¹, JIN Qi^{1,2}, ZHANG Yi^{1,3}, LI Xin¹, HUANG Zhihua¹, ZHANG Sicheng¹, DUAN Anqi¹, ZHAO Zhihui¹, ZHAO Qing¹, LUO Qin¹

(1. Center for Respiratory and Pulmonary Vascular Diseases, Fuwai Hospital, National Center for Cardiovascular Diseases, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100037, China; 2. Department of Cardiology, Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Department of ICU, Sichuan Provincial People's Hospital, University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610072, Sichuan, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effects of phosphoinositide 3-kinase(PI3K)/protein kinase B(Akt)/forkhead box protein O1(FoxO1) signaling pathway on apoptosis in human pulmonary artery smooth muscle cell(hPASMC) and pulmonary hypertension rat. **Methods** In cell experiment section, hPASMC was divided into 4 groups: (1) blank control group; (2) platelet-derived growth factor-BB(PDGF-BB) group; (3) PDGF-BB + LY294002 group; (4) PDGF-BB + paclitaxel group. Cell apoptosis was detected using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay, the expression levels of Bcl-2, cleaved caspase-3 and PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway-related proteins were determined using Western blot. In animal experiment section, 12 SD rats were randomly divided into 4 groups: (1) blank control group; (2) monocrotaline(MCT) group; (3) MCT + LY294002 group; (4) MCT + paclitaxel group. The expression levels of Bcl-2, cleaved caspase-3 and PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway-related proteins were evaluated using Western blot. **Results** In the cellular experiments, compared to the PDGF-BB group, the PDGF-BB + LY294002 group and PDGF-BB + paclitaxel group

基金项目:北京市自然科学基金(2020-BZJ01)

通信作者:罗勤, E-mail:luoqin2009@163.com

showed the decreased expression levels of Bcl-2 ($P < 0.01$), and the increased expression levels of cleaved caspase-3 ($P < 0.01$). Compared to the blank control group, the PDGF-BB + LY294002 group and PDGF-BB + paclitaxel group showed the increased apoptosis rates ($P < 0.01$). In the animal experiments, compared to the MCT group, the MCT + LY294002 group and MCT + paclitaxel group showed the decreased expression levels of Bcl-2, phosphorylated Akt and phosphorylated FoxO1 ($P < 0.01$), and the increased expression levels of cleaved caspase-3 and FoxO1 ($P < 0.01$), with no significant difference in PI3K expression levels between the groups. **Conclusion** The PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway inhibits cell apoptosis in hPASMC and lung tissue of pulmonary hypertension rat.

【**Keywords**】 Pulmonary hypertension; PI3K/Akt/FoxO1 signaling pathway; Pulmonary artery smooth muscle cell; Cell apoptosis

肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH) 是一种常见的血流动力学异常状态、严重的心血管疾病,可累及全身多个系统。其特征为肺动脉压异常升高、肺血管阻力不断增加,导致肺血管重构,并损害右心泵血能力,最终可能导致右心衰竭和死亡^[1]。由于现有的靶向药物主要作用于舒张血管通路,因此,有必要探索发病机制,以发现直接针对肺动脉重构的治疗目标^[2]。有研究^[3]证实,阻止肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary artery smooth muscle cell, PASMC) 凋亡在肺动脉重构中起重要作用。有研究^[4]显示,磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路在细胞生长、增殖、凋亡、侵袭和迁移等多个病理生理过程中起重要作用,并与血管重构密切相关。在该信号通路中,叉头框蛋白 O1 (forkhead box protein O1, FoxO1) 是 Akt 的下游目标蛋白。研究^[5]表明, FoxO1 在肺血管中的表达水平降低可能引发肺血管重构。因此,笔者提出了“PI3K/Akt 信号通路可能通过下调转录因子 FoxO1 抑制 PASMC 凋亡”的科学假设。笔者计划从细胞和动物水平进行研究,以探究 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路在 PH 发病机制中的作用,并希望找到新的治疗靶点。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

人源肺动脉平滑肌细胞 (human pulmonary artery smooth muscle cell, hPASMC) 购自美国模式培养物集存库,货号 PCS-100-023。使用的试剂包括胰酶-乙二胺四乙酸、磷酸盐缓冲液、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体和抗小鼠抗体、二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天公司),胎牛血清 (GIBCO 公司,美国),平滑肌细胞培养基 (Sciencell 公司,美国),野百合碱 (monocrotaline, MCT) (Sigma 公司,美国), Bcl-2 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体、Akt 抗体、磷酸化 Akt 抗体、PI3K 抗体 (Proteintech 公司,美国),裂解的胱天蛋白酶 3 (cleaved caspase-3) 抗体 (CST 公司,美国),磷酸化 FoxO1 抗体、FoxO1 抗体 (Abcam 公司,英国),细胞计数试剂盒 (DoJinDo, 日本),Transwell 嵌套 (带聚碳酸酯膜,尺寸为 6.5 mm,孔径为 8.0 μm) (Costar 3422),结晶紫染液 (武汉谷歌生物),一步法 TUNEL

细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物)。

1.2 实验动物

选取无特定病原体级成年雄性 SD 大鼠 (8 ~ 10 周龄),购于北京华阜康生物科技有限公司。伦理批件号为 Fw-2021-0026。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

hPASMC 在平滑肌细胞培养基中培养,在恒温培养箱中以 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 和饱和湿度条件下松盖培养。每隔 1 ~ 2 d 更换培养液,当细胞生长到 80% 铺满时再进行消化和传代。

1.3.2 细胞分组与处理

将 hPASMC 分为 4 组:空白对照组、血小板源性生长因子-BB (platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB) 组、PDGF-BB + LY294002 组和 PDGF-BB + 紫杉醇 (paclitaxel) 组。空白对照组不接受任何额外处理; PDGF-BB 组接受 20 ng/mL 的 PDGF-BB 处理; PDGF-BB + LY294002 组接受 20 ng/mL 的 PDGF-BB 处理,并用浓度梯度为 10、20、30 $\mu\text{g}/\text{mol}$ 的 LY294002 (PI3K 抑制剂) 处理 24 h; PDGF-BB + paclitaxel 组接受 20 ng/mL 的 PDGF-BB 处理,并用 10 $\mu\text{g}/\text{mol}$ 的 paclitaxel (FoxO1 激动剂) 处理 24 h。

1.3.3 动物分组与处理

将 12 只 SD 大鼠随机分为 4 组:空白对照组、MCT 组、MCT + LY294002 组和 MCT + paclitaxel 组。空白对照组仅在大鼠颈背部皮下注射生理盐水,其余 3 组大鼠均在颈背部皮下注射 60 mg/kg 的 MCT, MCT + LY294002 组额外接受 25 mg 的 LY294002 处理, MCT + paclitaxel 组在注射 MCT 后的第 1、7、14 和 21 天额外接受 6 mg/kg 的 paclitaxel 处理。

1.3.4 TUNEL 染色检测细胞凋亡

将空气干燥的 hPASMC 样本使用 4% 多聚甲醛室温固定 20 ~ 30 min,并用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次。按照 TUNEL 细胞凋亡试剂盒的说明书进行实验,最后使用倒置显微镜拍照观察,计算 TUNEL 阳性细胞在总细胞中的比例。

1.3.5 蛋白质印迹法检测细胞 Bcl-2 和 cleaved caspase-3 表达水平

消化离心收集各组细胞沉淀并裂解,以 4 ℃ 和 12 000 r/min 离心 5 min 收集细胞;使用二喹啉甲酸法对蛋白进行浓度定量。每孔上样 100 μ g 细胞总蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜,使用 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h,根据蛋白分子量剪下适当的膜带,分别与相应的一抗在 4 ℃ 孵育过夜。带有吐温 20 的三乙醇胺缓冲盐水溶液洗膜 15 min,重复 3~4 次后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1 000),37 ℃ 孵育 2 h,再次洗膜后加入电化学发光试剂,在聚偏氟乙烯膜上滴加工作液,待荧光带明显后,放入天能全自动化学发光分析仪中曝光并拍照。

1.3.6 蛋白质印迹法检测大鼠肺组织 Bcl-2、cleaved caspase-3、PI3K、磷酸化 Akt、FoxO1 及磷酸化 FoxO1 表达水平

从 -80 ℃ 冰箱中取出大鼠肺组织,剪取部分组织转移到 1.5 mL EP 管中剪碎。每管加入 250 μ L 裂解液,在冰上裂解 45 min。其余步骤同 1.3.5。

1.4 统计学分析

所有数据均使用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行分析和绘图。正态分布的数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较使用独立样本 *t* 检验,多组样本间

的均值差异比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

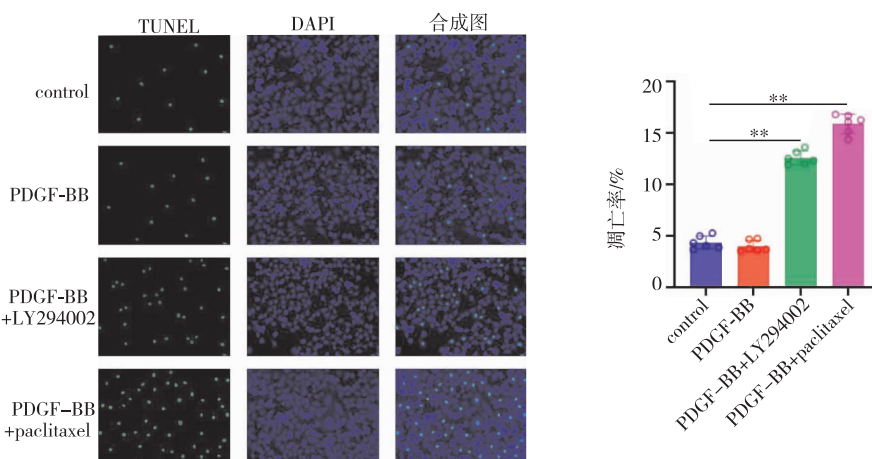
2 结果

2.1 PI3K/Akt 信号通路对 hPASC 凋亡的影响

如图 1 所示,采用 TUNEL 法检测各组 hPASC 的凋亡情况,以探究 PI3K/Akt 信号通路对 hPASC 凋亡的影响。结果显示,相比于空白对照组,PDGF-BB + LY294002 组及 PDGF-BB + paclitaxel 组凋亡率均显著增加($P < 0.01$)。

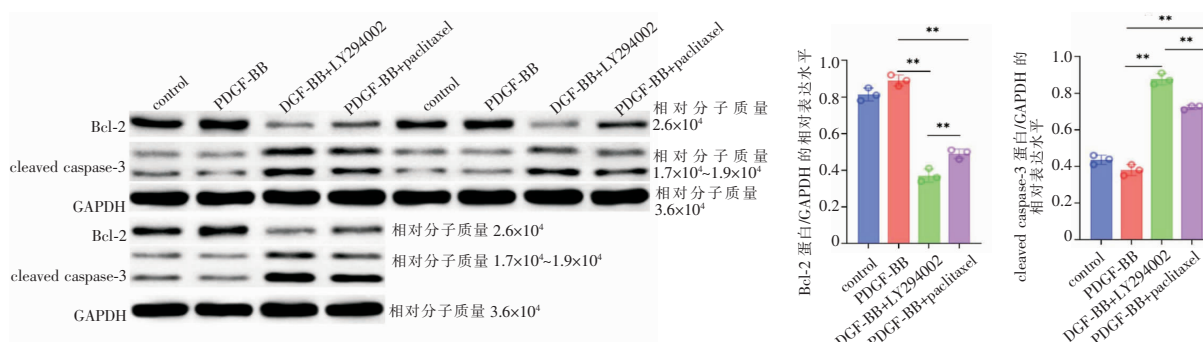
2.2 各组 hPASC 的 Bcl-2 和 cleaved caspase-3 蛋白表达情况

采用蛋白质印迹法检测 Bcl-2 和 cleaved caspase-3 蛋白的表达水平。结果如图 2 所示,PDGF-BB + LY294002 组和 PDGF-BB + paclitaxel 组 hPASC 的 Bcl-2 蛋白表达水平均显著低于 PDGF-BB 组($P < 0.01$),且 PDGF-BB + paclitaxel 组 Bcl-2 蛋白表达水平高于 PDGF-BB + LY294002 组($P < 0.01$)。相反,相比于 PDGF-BB 组,PDGF-BB + LY294002 组和 PDGF-BB + paclitaxel 组 hPASC 的 cleaved caspase-3 表达水平更高($P < 0.01$),且 PDGF-BB + paclitaxel 组 cleaved caspase-3 表达水平低于 PDGF-BB + LY294002 组($P < 0.01$)。



注:control,空白对照组;DAPI,4',6-二脒基-2-苯基吡啶; **表示 $P < 0.01$ 。

图 1 TUNEL 法测定 hPASC 的凋亡水平



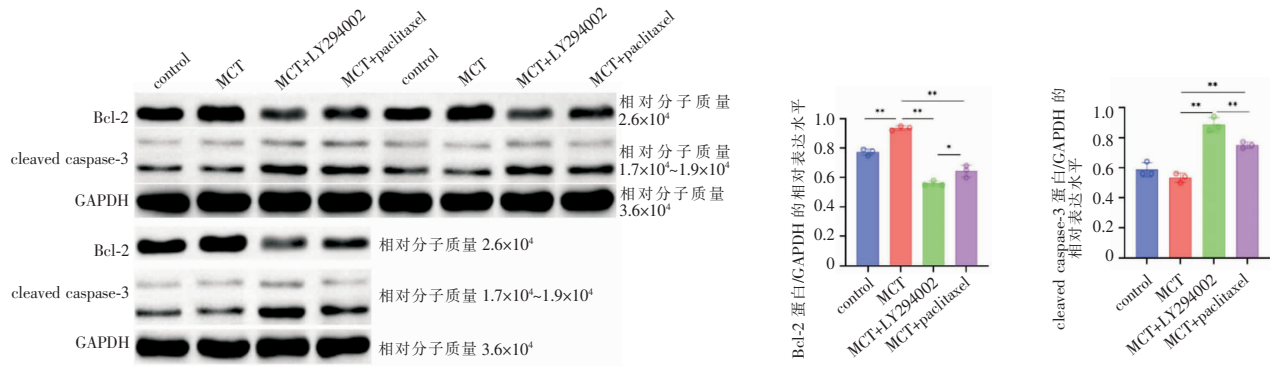
注:control,空白对照组;GAPDH,甘油醛-3-磷酸脱氢酶; **表示 $P < 0.01$ 。

图 2 各组 hPASC 的 Bcl-2 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平

2.3 各组大鼠肺组织 Bcl-2 和 cleaved caspase-3 蛋白表达情况

采用蛋白质印迹法检测大鼠肺组织 Bcl-2 和 cleaved caspase-3 蛋白的表达水平。结果如图 3 所示, MCT + LY294002 组和 MCT + paclitaxel 组大鼠肺组织的 Bcl-2 蛋白表达水平均显著低于 MCT 组 ($P <$

0.01), 且 MCT + paclitaxel 组 Bcl-2 蛋白表达水平高于 MCT + LY294002 组 ($P < 0.05$)。相反, 相比于 MCT 组, MCT + LY294002 组和 MCT + paclitaxel 组的 cleaved caspase-3 蛋白表达水平更高 ($P < 0.01$), 且 MCT + paclitaxel 组 cleaved caspase-3 蛋白表达水平低于 MCT + LY294002 组 ($P < 0.01$)。



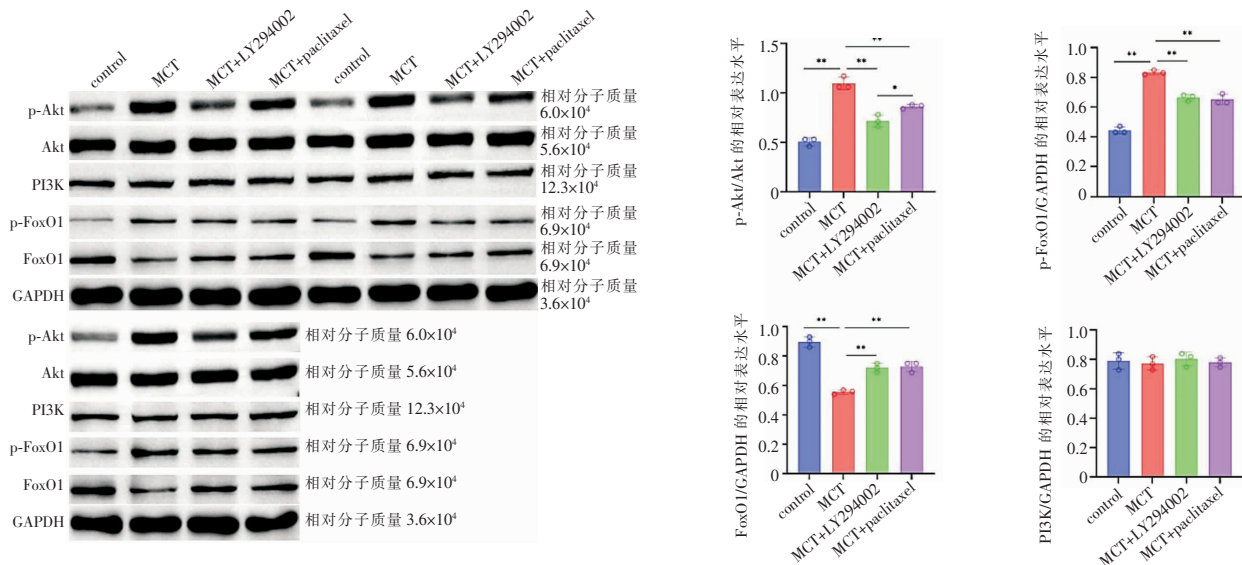
注: control, 空白对照组; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; ** 表示 $P < 0.01$, * 表示 $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠肺组织 Bcl-2 和 cleaved caspase-3 蛋白表达水平

2.4 各组大鼠 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的表达情况

采用蛋白质印迹法检测大鼠肺组织 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白。结果如图 4 所示, MCT + LY294002 组和 MCT + paclitaxel 组大鼠肺组织的 FoxO1 表达水

平均显著高于 MCT 组 ($P < 0.01$), 磷酸化 FoxO1 表达水平均低于 MCT 组 ($P < 0.01$)。MCT + LY294002 组和 MCT + paclitaxel 组大鼠肺组织的磷酸化 Akt 与 Akt 表达水平比值均显著低于 MCT 组 ($P < 0.01$)。此外, 各组之间 PI3K 表达水平无显著差异。



注: control, 空白对照组; GAPDH, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶; p-Akt, 磷酸化 Akt; p-FoxO1, 磷酸化 FoxO1。 ** 表示 $P < 0.01$, * 表示 $P < 0.05$ 。

图4 各组大鼠肺组织 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达水平

3 讨论

研究数据提示 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路可能在 PASM 异常凋亡中发挥作用, 研究结果表明 PDGF-BB + LY294002 组和 PDGF-BB + paclitaxel 组的 hPASM 抗凋亡能力下降。蛋白质印迹法检测结果显示, 在 PI3K

抑制剂作用后, FoxO1 的总量增加, 磷酸化 FoxO1 表达水平降低; 在 FoxO1 激动剂作用后, FoxO1 表达水平升高, 但磷酸化 FoxO1 表达水平无明显变化。动物实验中也观察到类似效应。本研究的创新之处在于从细胞和动物两个层面首次探究了 PI3K/Akt/FoxO1 信号

通路在肺血管重构过程中的作用及其对凋亡表型的影响。

PH 病因复杂多样,病情进展迅速,常导致患者的生活质量下降并增加短期死亡风险^[6]。随着对 PH 发病机制的探究,PASMC 异常生物学行为导致的肺动脉重构被认为是该疾病发生与发展的重要环节。既往研究指出了细胞凋亡异常在肺动脉重构中的重要作用。有研究^[7]显示,在 PH 患者的 PASMC 中,沉默核异质核糖核蛋白 A2B1 基因会导致携带 A2B1 基序的信使 RNA 减少,从而导致细胞增殖和抗凋亡能力下降。同样,Schuoler 等^[8]发现缺氧诱导的 PH 小鼠肺组织中水通道蛋白 1 的上调进一步增加了 hPASMC 的凋亡,这种作用与肿瘤抑制基因 p53 的高表达有关。肺血管重构一旦发生,几乎是不可逆的,是 PH 治疗中的关键和难点^[9]。因此,深入了解肺血管重构机制对于治疗 PH 具有至关重要的意义。

PI3K/Akt 通路广泛存在于细胞中,调节细胞生长、增殖、分化、凋亡和免疫炎症等众多病理生理过程^[10]。先前的研究已证实 PI3K/Akt 信号通路与 PH 密切相关。在 MCT 大鼠模型中发现,通过抑制 PI3K/Akt 信号通路来减轻肺血管重构可能是由于泛素蛋白酶体功能抑制引起的^[11]。黄芩苷可通过增加腺苷 A2A 受体的活性来抑制 PI3K/Akt 信号通路,从而缓解低氧诱导的 PH^[12]。饥饿激素可通过激活 PI3K/Akt 信号通路抵抗低氧诱导的 hPASMC 凋亡,并参与 PH 的发生^[13]。Li 等^[14]通过在 paclitaxel (FoxO1 激动剂) 晶体纳米粒子上加载活性蛋白,并使用一层葡糖醛酸包被,成功制备出一种可靶向 PASMC 的复合制剂——葡萄糖转运蛋白 1。这种复合制剂通过抑制细胞周期进程和促进细胞凋亡来逆转肺动脉重构,并改善大鼠的血流动力学参数。在小鼠模型中发现,Maresin 1 通过 LGR6 (糖蛋白激素受体家族成员之一) 来抑制 Akt 和 FoxO1 磷酸化,从而阻止 PASMC 增殖并促进细胞凋亡^[15]。此外,有研究^[16]证明在自体血栓造模下形成的慢性血栓栓塞性 PH 大鼠模型中,FoxO1 和细胞凋亡对其发病机制起重要作用。由于 PH 患者终末期可能发展为右心衰竭甚至全心衰竭,可推测靶向 PI3K/Akt/FoxO1 通路可能有助于改善 PH 患者的预后。

综上所述,本研究认为 PI3K/Akt 信号通路可能通

过下调转录因子 FoxO1 影响 PASMC 的凋亡,从而参与 PH 的发生与发展。未来可探索 PI3K/Akt 信号通路影响的更多表型与 PH 发病的关系,以深入挖掘 PH 的发病机制,寻找潜在的治疗靶点。

参考文献

- [1] Humbert M, Kovacs G, Hoeper MM, et al. 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension [J]. *Eur Heart J*, 2023, 61 (1): 2200879.
- [2] Ruopp NF, Cockrill BA. Diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension; a review [J]. *JAMA*, 2022, 327 (14): 1379-1391.
- [3] Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, et al. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management [J]. *BMJ*, 2018, 360: j5492.
- [4] Liberale L, Puspitasari YM, Ministrini S, et al. JCAD promotes arterial thrombosis through PI3K/Akt modulation; a translational study [J]. *Eur Heart J*, 2023, 44 (20): 1818-1833.
- [5] Kim M, Allen B, Korhonen EA, et al. Opposing actions of angiopoietin-2 on Tie2 signaling and FOXO1 activation [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126 (9): 3511-3525.
- [6] Hoeper MM, Humbert M, Souza R, et al. A global view of pulmonary hypertension [J]. *Lancet Respir Med*, 2016, 4 (4): 306-322.
- [7] Ruffenach G, Medzikovic L, Aryan L, et al. HNRNP A2B1: RNA-binding protein that orchestrates smooth muscle cell phenotype in pulmonary arterial hypertension [J]. *Circulation*, 2022, 146 (16): 1243-1258.
- [8] Schuoler C, Haider TJ, Leuenberger C, et al. Aquaporin 1 controls the functional phenotype of pulmonary smooth muscle cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Basic Res Cardiol*, 2017, 112 (3): 30.
- [9] Fayyaz AU, Edwards WD, Maleszewski JJ, et al. Global pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension associated with heart failure and preserved or reduced ejection fraction [J]. *Circulation*, 2018, 137 (17): 1796-1810.
- [10] Revathidevi S, Munirajan AK. Akt in cancer: mediator and more [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 80-91.
- [11] Zhu Y, Wu Y, Shi W, et al. Inhibition of ubiquitin proteasome function prevents monocrotaline-induced pulmonary arterial remodeling [J]. *Life Sci*, 2017, 173: 36-42.
- [12] Huang X, Wu P, Huang F, et al. Baicalin attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension via adenosine A_{2A} receptor-induced SDF-1/CXCR4/PI3K/AKT signaling [J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24 (1): 52.
- [13] 杨丹. Ghrelin 对肺动脉内皮细胞损伤的保护作用及其与内皮舒缩分子关系的研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- [14] Li B, Teng C, Yu H, et al. Alleviating experimental pulmonary hypertension via co-delivering FoxO1 stimulus and apoptosis activator to hyperproliferating pulmonary arteries [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13 (6): 2369-2382.
- [15] Li H, Li X, Hao Y, et al. Maresin 1 intervention reverses experimental pulmonary arterial hypertension in mice [J]. *Br J Pharmacol*, 2022, 179 (22): 5132-5147.
- [16] Deng C, Zhong Z, Wu D, et al. Role of FoxO1 and apoptosis in pulmonary vascular remodeling in a rat model of chronic thromboembolic pulmonary hypertension [J]. *Sci Rep*, 2017, 7 (1): 2270.

收稿日期: 2023-12-01