

·论著·

JNK 调控阻塞性睡眠呼吸暂停合并高血压模式研究

张可¹,陈静²,周燕¹

(1.桂林医学院附属医院呼吸与危重症医学科/呼吸疾病实验室,广西 桂林 541000;

2.泰安市中心医院呼吸内科,山东 泰安 271000)

摘要:目的 观察 JNK 信号通路对阻塞性睡眠呼吸暂停(OSA)合并高血压的调控模式。方法 选取生长发育正常大鼠 36 只,随机分为常氧对照组、常氧干预组、间歇性低氧组、间歇性低氧干预组,每组 9 只。JNK 阻滞剂对两干预组大鼠进行灌胃,后将间歇性低氧组大鼠进放置在低压氧舱内,制作 OSA 大鼠模型;使用血压计测量各组大鼠 12 周的平均动脉血压,并在 12 周末处死大鼠,予大鼠腹主动脉行 HE 染色查看病理学结果,采用 RT-PCR 法和 Western blot 法检测腹主动脉 JNK-1 的 mRNA 和蛋白的表达水平。结果 ①与常氧对照组比较,间歇性低氧组大鼠血压升高($P<0.05$);与间歇性低氧组比较,间歇性低氧干预组大鼠血压下降($P<0.05$);②与间歇性低氧组比较,间歇性低氧干预组中腹主动脉中膜血管平滑肌细胞(VSMCs)数量下降($P<0.05$),血管壁厚度无增加,未见纤维蛋白堆积,无明显内皮细胞表型转化表现,与常氧干预组大鼠比较,间歇性低氧干预组大鼠腹主动脉中膜 VSMC 层数未增加或减少($P>0.05$);③与常氧对照组比较,JNK-1mRNA 在间歇性低氧组中表达升高($P<0.05$);与间歇性低氧组比较,干预组 JNK-1mRNA 表达量降低($P<0.05$);④与常氧对照组比较,间歇性低氧组 JNK-1 蛋白表达水平增加($P<0.05$);与间歇性低氧组比较,干预组蛋白表达水平降低($P<0.05$)。结论 间歇性低氧可引起高血压,并介导大鼠腹主动脉出现血管重构,可能与 JNK 信号通路的激活有关。

关键词:间歇性低氧;JNK 信号通路;高血压;血管重构;阻塞性睡眠呼吸暂停

中图分类号:R766;R544.1

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2021.22.007

文章编号:1006-1959(2021)22-0026-05

Study on the Mode of JNK Regulating Obstructive Sleep Apnea with Hypertension

ZHANG Ke¹,CHEN Jing²,ZHOU Yan¹

(1.Department of Respiratory and Critical Care Medicine/Laboratory of Respiratory Diseases,

Affiliated Hospital of Guilin Medical College,Guilin 541000,Guangxi,China;

2.Department of Respiratory Medicine,Taian Central Hospital,Taian 271000,Shandong,China)

Abstract:Objective To study the model of JNK pathway on obstructive sleep apnea with hypertension. Methods Thirty-six rats with normal growth and development were randomly divided into normoxia control group, normoxia intervention group, intermittent hypoxia group and intermittent hypoxia intervention group, with 9 rats in each group. JNK inhibitor was administered intragastrically to rats in the two intervention groups, and then rats in the intermittent hypoxia group were placed in the low pressure oxygen chamber to make OSA rat model. The mean arterial blood pressure of rats in each group at 12 weeks was measured by a sphygmomanometer, and the rats were sacrificed at the end of 12 weeks. The abdominal aorta of rats was stained with HE to examine the pathological results. The mRNA and protein expression levels of JNK-1 in the abdominal aorta were detected by RT-PCR and Western blot. Results ①Compared with normoxia control group, the blood pressure of rats in intermittent hypoxia group increased ($P<0.05$); compared with the intermittent hypoxia group, the blood pressure of rats in the intermittent hypoxia intervention group decreased ($P<0.05$). ②Compared with the intermittent hypoxia group, the number of vascular smooth muscle cells (VSMCs) in the middle abdominal aorta in the intermittent hypoxia intervention group decreased ($P<0.05$), there was no increase in vessel wall thickness, no fibrin accumulation, and no obvious phenotypic transformation of endothelial cells; compared with rats in the normoxic intervention group, the number of VSMC layers in the abdominal aorta of rats in the intermittent hypoxia intervention group did not increase or decrease ($P>0.05$). ③Compared with normoxic control group, the expression of JNK-1mRNA in intermittent hypoxia group increased ($P<0.05$); compared with the intermittent hypoxia group, the expression of JNK-1mRNA in the intervention group decreased ($P<0.05$). ④Compared with normoxia group, the expression of JNK-1 protein in intermittent hypoxia group was increased ($P<0.05$); compared with intermittent hypoxia group, protein expression in intervention group decreased ($P<0.05$). Conclusion Intermittent hypoxia can cause hypertension and mediate vascular remodeling in rat abdominal aorta, which may be related to the activation of JNK signaling pathway.

Key words:Intermittent hypoxia;JNK signaling pathway;Hypertension;Vascular remodeling;Obstructive sleep apnea

阻塞性睡眠呼吸暂停 (obstructive sleep apnea, OSA) 是一种发病率日益增高的睡眠呼吸疾病,其病理生理学特点为间歇性低氧,与高血压密切相关^[1]。血管重构与高血压密切相关,而血管内皮细胞表型

转化是血管重构的重要环节^[2],阻断其发生发展是治疗高血压的重要途径,越来越受到临床的关注^[3]。研究表明^[4],氧化应激会激活 JNK 信号通路,是体内高血压进展的重要病理生理途径,介导着血管重构的发生。本研究通过观察间歇性低氧能否调控 JNK 信号通路引起高血压,并探讨其可能作用机制,旨在为治疗 OSA 合并高血压提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验动物购自广西医科大学-广西实验动物中心,雄性 8 周龄 SD 大鼠共 36 只,体重

基金项目:1.广西自然科学基金项目(编号:2013GXNSFAA019208);

2.广西医药卫生基金项目(编号:Z2014336)

作者简介:张可(1996.6-),男,广东清远人,硕士,住院医师,主要从事睡眠呼吸疾病的基础与临床研究

通讯作者:周燕(1973.11-),女,湖南衡阳县人,硕士,主任医师,教授,硕士生导师,主要从事睡眠呼吸疾病的基础与临床研究

160~200 g,随机均分为四组:常氧对照组、常氧干预组、间歇性低氧组、间歇性低氧干预组,各9只。

1.2 实验仪器与试剂 低压氧舱;动脉血压测量仪;光学显微镜;基因扩增仪:TC020A-230V;稳压电泳仪:DYY-6D型;蛋白转膜系统:TE22型;数码凝胶成像分析系统:JS-780型;数字图像分析系统:IPP-5.0形态学分析软件;Trizol RNA提取及逆转录试剂盒;JNK阻滞剂:SP600125^[5];JNK-1山羊抗小鼠多克隆抗体;BCA蛋白浓度测定试剂盒。

1.3 方法

1.3.1 模型制备 将造模组大鼠放置于低氧舱内,每日固定时间循环充入氮气和氧气8 h,具体方法为首先充入氮气30 s,在30 s内将氧浓度下降至4%~6%,保持该氧浓度1 min使大鼠处于缺氧状态,然后充入氧气10 s,使氧浓度恢复至21%,保持20 s,持续2 min。常氧对照组及常氧对照干预组大鼠将充入气体更改为空气,进行相同处理,该处理持续12周;常氧干预组及间歇性低氧干预组大鼠每天以30 mg/kg的SP600125进行灌胃,对剩余两组大鼠行生理盐水灌胃。

1.3.2 血压测定 在实验过程中,每周固定时间进行对鼠尾平均动脉血压(MAP)进行测定,测量3次血压后取3次血压的平均值。

1.3.3 病理学检测 不同组别大鼠处死后分离腹主动脉,固定标本后进行染色,观察腹主动脉病理学改变,并测量各组腹主动脉中膜厚度(MT)、管腔直径(LD)、两者比值以及中膜胶原纤维面积百分比。

1.3.4 Western blot法检测 JNK-1蛋白在大鼠腹主动脉组织中的表达 称取各组大鼠腹主动脉10 mg左右,经研磨-裂解-震荡-离心后吸取上清液测定蛋白浓度,最后通过Western blot检测腹主动脉中

JNK-1蛋白水平。

1.3.5 RT-PCR法检测 JNK-1mRNA在大鼠腹主动脉组织中的表达 取各组大鼠腹主动脉组织称重,选取等重量组织在低温条件下研磨至粉末状,按说明依次进行RNA提取-测定RNA纯度及完整性-RNA逆转录-RT-PCR进行JNK-1mRNA目的基因片段扩增-RT-PCR产物电泳。目的片段的相对表达量=JNK-1mRNA的灰度值/ β -actin的灰度值。

1.4 统计学处理 用SPSS 21.0软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用t检验。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血压变化情况 与同周龄常氧对照组大鼠比较,自造模2周后,间歇性低氧组大鼠血压升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与同周龄间歇低氧组大鼠比较,间歇性低氧干预组大鼠血压下降,差异有统计学意义($P<0.05$);间歇性低氧干预组大鼠血压与同周龄常氧对照组大鼠比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见表1。

2.2 各组大鼠腹主动脉病理结果比较 各组大鼠腹主动脉内膜MT/LD、MT/LD及中膜胶原纤维面积百分比变化情况见表2。与间歇性低氧组比较,间歇性低氧干预组大鼠腹主动脉无明显内膜破坏,动脉中膜血管平滑肌细胞(VSMCs)数量下降($P<0.05$),腹主动脉未见中层弹性膜明显增加,层次排列较整齐,壁层厚度较统一,层次较分明,未见平滑肌纤维破裂;与同培养时间常氧干预组大鼠比较,间歇性低氧干预组大鼠腹主动脉中膜血管平滑肌细胞(VSMCs)层数无明显增加或减少($P>0.05$),见图1。

表1 各组大鼠血压变化情况($\bar{x} \pm s$, mmHg)

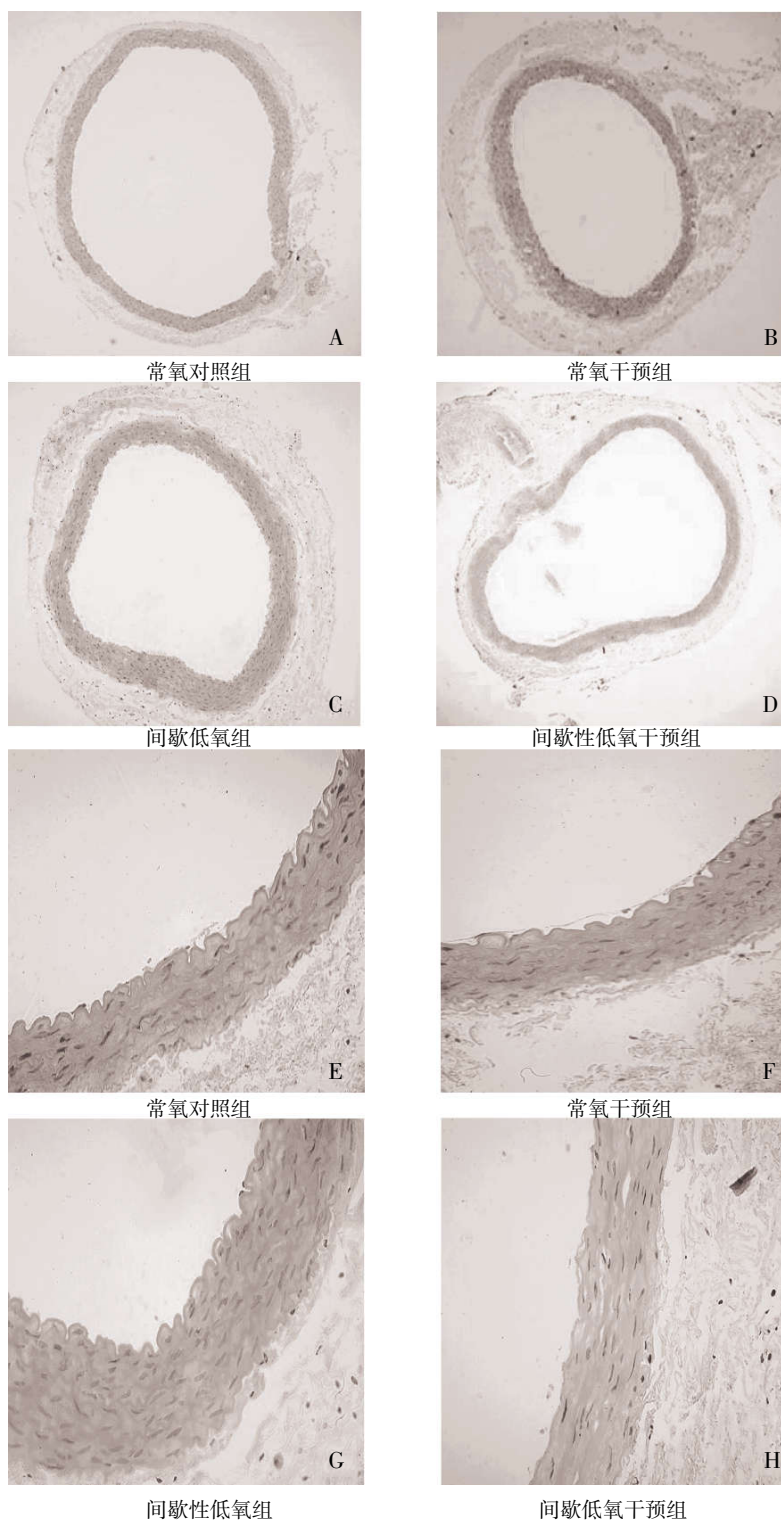
时间	常氧对照组	常氧干预组	间歇性低氧组	间歇性低氧干预组
实验前	101.34 \pm 4.53	98.06 \pm 4.79	103.06 \pm 5.32	99.04 \pm 3.21
低氧2周	102.57 \pm 3.48	103.32 \pm 3.27	115.80 \pm 3.97*	103.56 \pm 4.07 $^{\Delta}$
低氧4周	110.10 \pm 3.23	108.41 \pm 3.55	131.09 \pm 3.89*	109.33 \pm 3.67 $^{\Delta}$
低氧6周	107.69 \pm 4.30	106.03 \pm 4.07	145.65 \pm 4.16*	106.24 \pm 4.15 $^{\Delta}$
低氧8周	111.61 \pm 3.42	112.42 \pm 2.99	158.14 \pm 3.59*	108.58 \pm 5.03 $^{\Delta}$
低氧10周	105.69 \pm 3.45	105.68 \pm 3.46	172.01 \pm 3.20*	102.43 \pm 4.22 $^{\Delta}$
低氧12周	106.83 \pm 4.77	110.42 \pm 4.25	184.25 \pm 4.48*	109.72 \pm 3.78 $^{\Delta}$

注:与常氧对照组比较,* $P<0.05$;与间歇性低氧组比较, $^{\Delta}P<0.05$

表2 各组大鼠腹主动脉内膜各指标变化情况($\bar{x} \pm s$)

组别	MT(μ m)	LD(μ m)	MT/LD(%)	中膜胶原纤维面积百分比
常氧对照组	76.908 \pm 12.53	589.494 \pm 19.95	0.124 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01
常氧干预组	73.895 \pm 10.97	588.563 \pm 20.06	0.122 \pm 0.03	0.04 \pm 0.02
间歇性低氧组	114.184 \pm 11.55*	566.379 \pm 16.62*	0.218 \pm 0.02*	0.28 \pm 0.06*
间歇性低氧干预组	80.782 \pm 13.14 $^{\Delta}$	587.217 \pm 18.23 $^{\Delta}$	0.130 \pm 0.01 $^{\Delta}$	0.05 \pm 0.04 $^{\Delta}$

注:与常氧对照组比较,* $P<0.05$;与间歇性低氧组比较, $^{\Delta}P<0.05$



注:HE 染色:(A~D)×40, (E~H)×400

图 1 各组大鼠腹主动脉病理结果比较

2.3 各组大鼠腹主动脉 JNK-1mRNA RT-PCR 表达比较 四组均于 138 bp 处出现 JNK-1mRNA 表达条带,其中间歇性低氧组表达量高于常氧对照组,差异有统计学意义($P<0.05$);在两间歇性低氧组中,间歇性低氧干预组 JNK-1mRNA 表达量低于间歇性低氧组,差异有统计学意义($P<0.05$);与常氧干预组比较,间歇性低氧干预组 JNK-1mRNA 表达量增加,但差异无统计学意义($P>0.05$),见图 2。

2.4 各组大鼠腹主动脉 JNK-1 蛋白 Westernblot 结果比较 与常氧对照组比较,间歇性低氧组 JNK-1 蛋白表达水平增高,差异有统计学意义($P<0.05$);与常氧对照组比较,间歇性低氧干预组 JNK-1 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与常氧干预组比较,间歇低氧干预组 JNK-1 蛋白表达水平增加,但差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。

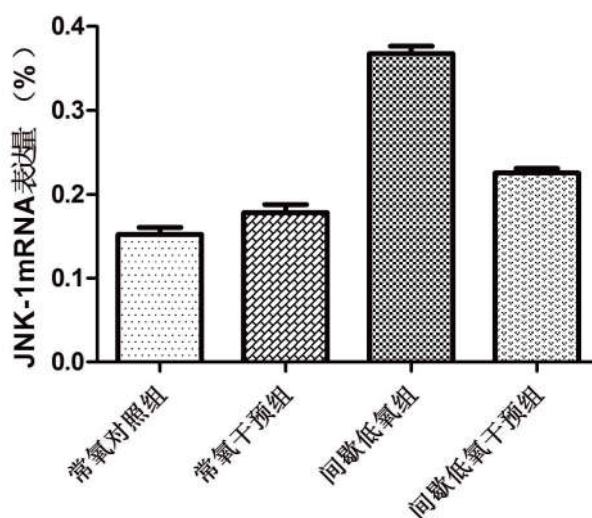


图 2 各组大鼠腹主动脉 JNK-1mRNA RT-PCR 表达比较



注:A:常氧对照组;B:常氧干预组;C:间歇性低氧组;D:间歇性低氧干预组

图 3 各组大鼠腹主动脉 JNK-1 蛋白 WesternBlot 结果比较

3 讨论

OSA 是一种发病率日益增长的呼吸睡眠疾病,目前我国 OSA 患者已达 6600 万^[6]。OSA 患者在睡眠时反复出现上气道完全或部分堵塞,进而出现间歇性低氧表现,是高血压的独立危险因素^[7]。研究表明^[8],OSA 主要通过激活交感神经系统、激活 RASS 系统、增加氧化应激、损伤内皮及全身炎症反应等方式导致高血压的发生。另有研究表明^[9,10],高血压的主要病理特点为血管内皮功能障碍,血管收缩增加和血管重构,而 VSMCs 表型转化与血管重构密切相关,其主要通过免疫及炎症反应进行调节。由此推测,OSA 可能通过某种信号通路对 VSMCs 进行调控,进而影响血管重构及高血压的发生。

c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 信号转导通路是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号转导通路中的重要家族成员^[11]。JNK 蛋白激酶由由三种蛋白激酶基因编码^[12],其中 JNK1-3 通过磷酸化激活后,不同 JNK 异构体通过特定模式与特定的蛋白底物激活、结合及进行磷酸化^[13]。JNK 分别由 JNK 激酶 1、2 激活,并从细胞质向细胞核转移,进而与细胞核内的 ATF2 和 c-Jun 尾端的 63、73 位丝氨酸结合,引导相关基因与蛋白的表达,广泛参与体内的炎症及免疫反应^[14]。

目前研究 JNK 信号及 OSA 相互关系的实验不多,已有资料显示在大脑海马区的损伤中二者关系

密切。相关研究表明^[15],大鼠在间歇性缺氧环境下海马区的 JNK 磷酸化水平上升,诱导细胞的凋亡,进而对机体的学习记忆功能产生影响。丙二醛(malondialdehyde, MDA) 及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是氧化应激的主要标志物^[16]。间歇性低氧使机体 MDA 表达水平上升及 SOD 表达水平下降,同时导致 JNK 表达水平上升,证实间歇性低氧会引导氧化应激反应的出现,进而上调 JNK 基因及相关蛋白表达,对大鼠神经系统造成损害并破坏记忆功能^[17]。另外,随着间歇性低氧持续时间增加,大鼠体内炎症反应亦随之增强,体内组织的相关 JNK 基因及蛋白表达水平随之上升,由此推断 JNK 信号通路参与了 OSA 患者炎症反应,并与炎症反应的发展密切相关。

当前有关 JNK 信号通路作用于血管重构的研究较少。已有研究表明,血管重构与 VSMCs 的表型转化密切相关, VSMCs 作为动脉中膜的主要细胞成分,可以根据生理形态及功能的不同,分为收缩型和合成型^[18]。当受到免疫炎症反应刺激后, VSMCs 发生转化,其表达形式发生转变,由收缩型转化为合成型,进而介导 VSMCs 增殖和转移,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成增加,最终导致血管重构,这也是高血压的重要病理特征之一^[19,20]。因此, JNK 信号通路作为的炎症反应信号通路,其可能参与了腹主动脉中 VSMCs 的表型转化,进而介导血管重构的产生。

本研究结果显示,与常氧对照组大鼠比较,间歇性低氧组大鼠 MAP 升高,而间歇性低氧干预组大鼠 MAP 较间歇性低氧组大鼠下降,且与常氧干预组 MAP 水平比较无差异,说明 JNK 信号通路调控 OSA 高血压的变化。本研究发现,间歇性低氧组大鼠腹主动脉出现血管壁炎性细胞浸润、弹性纤维损害、平滑肌细胞丢失及内膜厚度增加等血管重构现象,而间歇性低氧干预组中腹主动脉血管重构现象不明显,说明 JNK 信号通路参与 OSA 合并高血压大鼠的腹主动脉血管重构过程。另外,Western blot 及 RT-PCR 结果显示,间歇性低氧组大鼠腹主动脉组织中 JNK mRNA 及 JNK 相关蛋白的表达水平较常氧对照组增高,但与间歇性低氧干预组大鼠对比, JNK mRNA 及 JNK 相关蛋白的表达水平下降,这进一步提示 JNK 信号通路参与了 OSA 合并高血压大鼠的血管重构现象,结合间歇性低氧组大鼠的血管重构现象,进一步说明了 JNK 信号通路通过调节 JNK mRNA 及 JNK 相关蛋白的表达水平,影响腹主动脉血管重构,进而调控 OSA 合并高血压大鼠的血管重构情况。因此,抑制 JNK 信号通路可以抑制腹主动脉血管重构,进而抑制高血压的发生发展。

综上所述,间歇性低氧会激活 JNK 信号通路,上调 JNK 信号通路的 mRNA 及蛋白表达水平,引起高血压,并介导大鼠腹主动脉出现的血管重构。阻断 JNK 信号通路能抑制 OSA 所致的血压升高及血管重构现象,这可能成为治疗阻塞性睡眠呼吸暂停合并高血压的新思路。

参考文献:

- [1]Wang S,Niu X,Zhang P,et al.Analysis of OSAS incidence and influential factors in middle-aged and elderly patients with hypertension[J].Minerva Med,2019,110(2):115-120.
- [2]Lu QB,Wang HP,Tang ZH,et al.Nesfatin-1 functions as a switch for phenotype transformation and proliferation of VSMCs in hypertensive vascular remodeling [J].Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis,2018,1864(6 Pt A):2154-2168.
- [3]Brown IAM,Diederich L,Good ME,et al.Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension [J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2018,38 (9): 1969-1985.
- [4]Hu C,Zuo K,Li K,et al.p38/JNK Is Required for the Proliferation and Phenotype Changes of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by L3MBTL4 in Essential Hypertension [J].Int J Hypertens,2020(2020):3123968
- [5]Wu Q,Wu W,Jacevic V,Franca TCC,et al.Selective inhibitors for JNK signalling: a potential targeted therapy in cancer[J].Enzyme Inhib Med Chem,2020,35(1):574-583.
- [6]Benjafield AV,Ayas NT,Eastwood PR,et al.Estimation of the global prevalence and burden of obstructive sleep apnoea: a literature - based analysis[J].Lancet Respir Med,2019(7):687-698.
- [7]Han B,Chen WZ,Li YC,et al.Sleep and hypertension[J].Sleep Breath,2020,24(1):351-356.
- [8]Carnethon MR,Johnson DA.Sleep and Resistant Hypertension[J].Curr Hypertens Rep,2019,21(5):34.
- [9]Brown IAM,Diederich L,Good ME,et al.Vascular Smooth Muscle Remodeling in Conductive and Resistance Arteries in Hypertension [J].Arterioscler Thromb Vasc Biol,2018,38 (9): 1969-1985.
- [10]Anzai T.Inflammatory Mechanisms of Cardiovascular Remodeling[J].Circ J,2018,82(3):629-635.
- [11]Geng J,Yang C,Wang B,et al.Trimethylamine N -oxide promotes atherosclerosis via CD36 -dependent MAPK/JNK pathway[J].Biomed Pharmacother,2018(97):941-947.
- [12]Hammouda MB,Ford AE,Liu Y,et al.The JNK Signaling Pathway in Inflammatory Skin Disorders and Cancer [J].Cells, 2020,9(4):857.
- [13]Schellino R,Boido M,Vercelli A.JNK Signaling Pathway Involvement in Spinal Cord Neuron Development and Death[J].Cells,2019,8(12):1576.
- [14]Kirsch K,Zeke A,Toke O,et al.Co-regulation of the transcription controlling ATF2 phosphoswitch by JNK and p38 [J].Nat Commun,2020,11(1):5769.
- [15]Zhao YN,Wang HY,Li JM,et al.Hippocampal mitogen-activated protein kinase activation is associated with intermittent hypoxia in a rat model of obstructive sleep apnea syndrome [J].Mol Med Rep,2016,13(1):137-145.
- [16]Halima BH,Sonia G,Sarra K,et al.Apple Cider Vinegar Attenuates Oxidative Stress and Reduces the Risk of Obesity in High-Fat-Fed Male Wistar Rats[J].J Med Food,2018,21(1):70-80.
- [17]Ikram M,Saeed K,Khan A,et al.Natural Dietary Supplementation of Curcumin Protects Mice Brains against Ethanol-Induced Oxidative Stress -Mediated Neurodegeneration and Memory Impairment via Nrf2/TLR4/RAGE Signaling [J].Nutrients,2019,11(5):1082.
- [18]Josefs T,Boon RA.The Long Non -coding Road to Atherosclerosis[J].Curr Atheroscler Rep,2020,22(10):55.
- [19]Touyz RM,Alves -Lopes R,Rios FJ,et al.Vascular smooth muscle contraction in hypertension [J].Cardiovasc Res,2018,114 (4):529-539.
- [20]Basatemur GL,Jørgensen HF,Clarke MCH,et al.Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis [J].Nat Rev Cardiol, 2019,16(12):727-744.

收稿日期:2021-06-08;修回日期:2021-06-23

编辑/成森