GW501516对低氧致肺动脉内皮细胞损伤的影响及机制Δ

陈昌贵*，易春峰，余志华，王　栋，李立为，贺立群#（武汉市第一医院心血管内科，武汉　430022）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2024）02-0179-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2024.02.10

摘　要　目的　探讨过氧化物酶体增殖物激活受体δ（PPARδ）激动剂GW501516对低氧诱导的肺动脉内皮细胞（PAECs）损伤的影响及机制。**方法**　通过检测PAECs的相对存活率，观察GW501516的细胞毒性作用；采用Western blot法检测PPARδ蛋白的表达水平。建立低氧条件下PAECs损伤的细胞模型，以抗氧化剂*N*-乙酰半胱氨酸（NAC）为阳性对照，通过检测细胞凋亡率、细胞活力、乳酸脱氢酶（LDH）活性、活性氧（ROS）水平，考察GW501516对细胞损伤及ROS产生的影响。以核因子E2相关因子2（Nrf2）激活剂富马酸二甲酯（DMF）为阳性对照，在低氧条件下通过GW501516和（或）Nrf2抑制剂ML385孵育PAECs，以细胞损伤（细胞凋亡、细胞活力、LDH活性）及超氧化物歧化酶（SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）、过氧化氢酶（CAT）、丙二醛（MDA）、ROS水平及Nrf2、血红素加氧酶1（HO-1）、裂解型胱天蛋白酶3（C-caspase-3）蛋白的表达水平，探讨GW501516对低氧致PAECs损伤的作用机制。**结果**　低氧刺激能够抑制PAECs内PPARδ蛋白的表达（$P<0.05$），而GW501516可在低氧条件下促进PPARδ蛋白的表达且无明显的细胞毒性作用。GW501516可抑制PAECs凋亡，提高细胞活力，降低LDH活性及ROS水平。GW501516可通过激活Nrf2通路，上调PAECs内HO-1蛋白表达水平及SOD、GPx、CAT水平，降低MDA、ROS水平（$P<0.05$），而Nrf2抑制剂ML385能够逆转GW501516的上述作用（$P<0.05$）。GW501516下调C-caspase-3蛋白表达，抑制低氧诱导的PAECs损伤的作用与Nrf2激活剂DMF相似（$P<0.05$），而Nrf2抑制剂ML385能够逆转GW501516抑制PAECs损伤的作用（$P<0.05$）。**结论**　GW501516可通过抑制氧化应激来减轻低氧诱导的PAECs损伤，其机制与激活Nrf2有关。

关键词　GW501516；低氧；肺动脉内皮细胞；氧化应激；损伤；核因子E2相关因子2

Effects of GW501516 on the injury of pulmonary artery endothelial cells induced by hypoxia and its mechanism

CHEN Changgui, YI Chunfeng, YU Zhihua, WANG Dong, LI Liwei, HE Liqun (Dept. of Cardiology, Wuhan No.1 Hospital, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of the peroxisome proliferator-activated receptors δ (PPARδ) agonist GW501516 on the injury of pulmonary artery endothelial cells (PAECs) induced by hypoxia and its mechanism. **METHODS** The cytotoxic effects of GW501516 were observed by detecting the relative survival rate of PAECs; the protein expression of PPARδ was determined by Western blot assay. The cellular model of PAECs injury was established under hypoxic conditions; using antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) as positive control, the effects of GW501516 on cell injury and reactive oxygen species (ROS) production were investigated by detecting cell apoptotic rate, cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) activity and ROS levels. Using nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activator dimethyl fumarate (DMF) as positive control, PAECs were incubated with GW501516 and/or Nrf2 inhibitor ML385 under hypoxic conditions; the mechanism of GW501516 on PAECs injury induced by hypoxia was investigated by detecting cell injury (cell apoptosis, cell viability, LDH activity), the levels of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), malondialdehyde (MDA) and ROS, the expressions of Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1) and cleaved-caspase-3 (C-caspase-3) protein. **RESULTS** The results demonstrated that hypoxia inhibited the protein expression of PPARδ ($P<0.05$), while GW501516 promoted the protein expression of PPARδ in hypoxia-exposed PAECs without obvious cytotoxic effects. GW501516 inhibited the apoptosis of PAECs, improved cell viability, and reduced LDH activity and ROS levels. GW501516 could up-regulate the protein expression of HO-1 in PAECs and the levels of SOD, GPx and CAT, while down-regulated the levels of MDA and ROS by activating the Nrf2 pathway ($P<0.05$); but Nrf2 inhibitor ML385 could reverse the above effects of GW501516 ($P<0.05$). GW501516 exerted similar effects to Nrf2 activator DMF in down-regulating the expression of C-caspase-3 and inhibiting the injury of PAECs under conditions of hypoxia ($P<0.05$). Moreover, Nrf2 inhibitor ML385 reversed the inhibition effects of GW501516 on PAECs injury ($P<0.05$).

Δ**基金项目** 湖北省自然科学基金项目（No.2019CFB405）

＊**第一作者** 主治医师，博士。研究方向：肺血管重构。电话：027-85332969。E-mail：chenchanggui2008@aliyun.com

＃**通信作者** 主任医师，硕士生导师，博士。研究方向：血管重构相关疾病的基础与临床。电话：027-85332101。E-mail：liqunhe0902@163.com

CONCLUSIONS GW501516 can relieve the hypoxia-induced injury of PAECs via the inhibition of oxidative stress, the mechanism of which may be associated with activating Nrf2.

KEYWORDS GW501516; hypoxia; pulmonary artery endothelial cells; oxidative stress; injury; nuclear factor erythroid 2-related factor 2

低氧性肺动脉高压（hypoxic pulmonary hypertension，HPH）是低氧所致的肺动脉高压，属于肺动脉高压的第三大类。持续的低氧可引起肺血管重构，进而导致HPH，长期过高的肺动脉压力会诱发患者出现难以控制的右心衰竭而死亡。肺动脉内皮细胞（pulmonary artery endothelial cells，PAECs）在低氧肺血管重构中起至关重要的作用，一旦PAECs发生损伤，肺血管重构过程即同步启动，表现为血管收缩与舒张功能紊乱、肺动脉平滑肌细胞异常迁移与增殖、细胞外基质合成增加，最终导致肺动脉高压[1]。此外低氧还可诱导PAECs产生氧化应激，进而损伤PAECs，导致低氧肺血管重构和HPH[1]。因此，具有逆转低氧致PAECs损伤作用的药物，可能会改善低氧肺血管重构。

过氧化物酶体增殖物激活受体（peroxisome proliferator-activated receptors，PPARs）是一种核受体，在配体激活时充当转录因子促进细胞转录，包含PPARα、PPARγ和PPARδ 3种亚型。既往研究发现，PPARδ具有抑制炎症反应、抗氧化应激、改善内皮细胞功能、抗动脉粥样硬化等作用[2]。GW501516是一种人工合成的PPARδ激动剂，已被用于治疗肥胖症、脂质紊乱和心血管疾病。动物实验发现，每天以3 mg/kg GW501516喂食低密度脂蛋白受体基因敲除小鼠，可减轻小鼠高脂饮食诱导的血管重构[3]；体外细胞实验发现，GW501516能够改善内皮细胞功能[4]。活性氧（reactive oxygen species，ROS）是参与氧化应激的主要分子之一，在血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞肥大模型中，GW501516可抑制血管平滑肌细胞内产生ROS[5]。由此推测GW501516可能通过抑制氧化应激，保护PAECs，从而在低氧肺血管重构中发挥保护作用。因此，本研究从GW501516调控氧化应激的角度探讨了其对低氧致PAECs损伤的影响及机制，以期为GW501516用于临床治疗HPH提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究使用的主要仪器包括Dmil Led型倒置荧光显微镜（德国Leica公司）、3131型和311型细胞培养箱（美国Thermo Fisher Scientific公司）、Synergy HT型多功能酶标仪（美国Bio-Tek公司）、NovoCyte型流式细胞仪（美国ACEA Biosciences公司）、ChemiDoc XRS型化学发光成像系统（美国Bio-Rad公司）。

1.2 主要药品与试剂

GW501516（批号SML1491）、二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）（批号D2625）、抗氧化剂*N*-乙酰半胱氨酸（*N*-acetylcysteine，NAC）（批号A0150000）均购自美国Sigma-Aldrich公司，纯度均≥98%；核因子E2相关因子2（nuclear factor erythroid 2-related factor 2，Nrf2）激活剂富马酸二甲酯（dimethyl fumarate，DMF）（批号S2586）、Nrf2抑制剂ML385（批号S8790）均购自美国Selleck生物科技有限公司，纯度均≥99%；CCK-8试剂盒购自日本同仁化学研究所；Annexin Ⅴ-FITC/PI凋亡检测试剂盒（批号556547）购自美国BD公司；乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）（批号C0017）、ROS（批号S0033S）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）（批号S0101S）、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase，GPx）（批号S0058）、过氧化氢酶（catalase，CAT）（批号S0051）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）（批号S0131S）检测试剂盒、BCA试剂盒（批号P0012S）、细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒（批号P0028）均购自上海碧云天生物技术有限公司；兔源PPARδ（批号74076）、Nrf2（批号12721）、血红素加氧酶1（heme oxygenase-1，HO-1）（批号43966）、裂解型胱天蛋白酶3（cleaved-caspase-3，C-caspase-3）（批号9661）、核纤层蛋白B1（Lamin B1）（批号13435）、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）（批号5174）等一抗均购自美国Cell Signaling Technology公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗人IgG二抗（批号ab6858）购自英国Abcam公司。

1.3 实验细胞

人PAECs购自中国典型培养物保藏中心，批号为GPC0037。

2 方法

2.1 GW501516对PAECs的细胞毒性检测

2.1.1 实验分组与给药

将细胞分为对照组和GW501516组，对照组给予0.1%DMSO孵育12、24、48 h，GW501516组给予100 nmol/L GW501516[6]孵育12、24、48 h。

2.1.2 PAECs相对存活率的检测

采用CCK-8试剂盒检测细胞相对存活率，评估GW501516的细胞毒性。细胞以5×10^3个/孔均匀接种于96孔板，每组设6个复孔。按“2.1.1”项下方法分组及

给药后，按照试剂盒说明书加入CCK-8溶液，同时设置空白组（培养基100 μL+CCK-8溶液10 μL），继续孵育3 h后于450 nm波长处测定吸光度（OD）值。细胞的相对存活率＝（实验组OD－空白组OD）/（对照组OD－空白组OD）×100%。

2.2 低氧条件下PAECs中PPARδ蛋白表达水平的检测

2.2.1 实验分组与给药

将细胞分为对照组（常氧+0.1%DMSO）、低氧组（低氧+0.1%DMSO）、GW501516干预组（低氧+100 nmol/L GW501516），低氧刺激时间为24 h。低氧刺激前1 h用GW501516孵育PAECs，当PAECs融合度达到80%～90%时，1∶2传代培养。各组细胞在低氧刺激前用不含胎牛血清的DMEM培养基培养12 h使细胞同步化。模拟低氧条件为含1%O_2、5%CO_2和94%N_2的空气，模拟常氧为含5%CO_2的空气（下同）。

2.2.2 PAECs中PPARδ蛋白表达水平的检测

采用Western blot法检测PPARδ蛋白的表达水平。细胞以1.5×10^5个/孔均匀接种于6孔板，每组设3个复孔。按“2.2.1”项下方法分组及给药后，使用细胞裂解液裂解细胞提取细胞总蛋白，通过BCA试剂盒检测细胞总蛋白浓度。采用沸水浴灭活蛋白，上样前将各组细胞蛋白稀释成相同浓度，每个样本取15 μg总蛋白加样，并用10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质，再转移至聚偏氟乙烯膜中，用5%脱脂奶粉室温封闭2 h，TBST缓冲液洗膜，接着加入PPARδ、GAPDH一抗（稀释比分别为1∶1 000、1∶5 000），4 ℃孵育过夜；洗膜后加入二抗（稀释比为1∶10 000），然后于室温下孵育1 h，TBST缓冲液洗膜后，滴加ECL混合溶液，暗室中曝光，测定蛋白条带灰度值。以PPARδ和GAPDH条带灰度值的比值表示PPARδ蛋白的表达水平。

2.3 低氧条件下PAECs的凋亡率、细胞活力、LDH活性和ROS水平的检测

2.3.1 实验分组与给药

将细胞分为对照组（常氧+0.1%DMSO）、低氧组（低氧+0.1%DMSO）、NAC干预组（阳性对照，低氧+10 mmol/L NAC[7]）、GW501516干预组（低氧+100 nmol/L GW501516）。各药物干预组在低氧刺激前1 h给予不同药物孵育PAECs，低氧刺激时间为24 h。

2.3.2 细胞凋亡率的检测

采用Annexin Ⅴ-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒联合流式细胞仪检测细胞凋亡情况。细胞以1.5×10^5个/孔均匀接种于6孔板，每组设3个复孔。按“2.3.1”项下方法分组及给药后，以胰酶消化收集细胞，取约1×10^6个细胞，用磷酸盐缓冲液（PBS）洗涤后，依次加入PBS 200 μL、Annexin Ⅴ-FITC 10 μL和PI 10 μL重悬细胞，4 ℃避光孵育30 min后加入PBS 200 μL，通过流式细胞仪检测细胞凋亡率，使用NovoExpress软件分析数据。

2.3.3 细胞活力的检测

采用CCK-8试剂盒检测细胞活力。细胞以5×10^3个/孔均匀接种于96孔板，每组设6个复孔。按“2.3.1”项下方法分组及给药后，按“2.1.2”项下方法操作，检测细胞存活率。

2.3.4 LDH活性的检测

使用LDH检测试剂盒检测细胞中LDH活性。细胞以5×10^3个/孔均匀接种于96孔板，每组设6个复孔。按“2.3.1”项下方法分组及给药后，每孔加入LDH释放液10 μL，孵育1 h后以400×g离心5 min，取上清液，按试剂盒说明书加入LDH检测液后，于450 nm波长处测定OD，检测LDH活性。

2.3.5 ROS水平的检测

采用二乙酰二氯氢化荧光素（DCFH-DA）探针联合荧光酶标仪测定细胞内ROS水平。细胞以3×10^4个/孔均匀接种于24孔板，每组设6个复孔。按“2.3.1”项下方法分组及给药后，吸出培养基，加入10 μmol/L无血清培养基稀释的DCFH-DA，37 ℃孵育20 min后将培养基吸出，PBS洗涤3次后，置于荧光酶标仪（激发波长为488 nm，发射波长为525 nm）下检测细胞内ROS水平。

2.4 GW501516对低氧致PAECs损伤的作用机制研究

2.4.1 实验分组与给药

将细胞分为对照组（常氧+0.1%DMSO）、低氧组（低氧+0.1%DMSO）、DMF干预组（阳性对照，低氧+75 μmol/L DMF[8]）、GW501516干预组（低氧+100 nmol/L GW501516）、GW501516+ML385干预组（低氧+100 nmol/L GW501516+5 μmol/L ML385[9]）。各药物干预组在低氧刺激前1 h给予不同药物孵育PAECs，低氧刺激时间为24 h。

2.4.2 PAECs中HO-1蛋白和细胞核内Nrf2蛋白表达水平的检测

采用Western blot法检测HO-1蛋白和Nrf2蛋白的表达水平。细胞以1.5×10^5个/孔均匀接种于6孔板，每组设3个复孔。按“2.4.1”项下方法分组及给药后，使用细胞裂解液裂解细胞提取细胞总蛋白，使用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒提取细胞核蛋白。按“2.2.2”项下方法检测HO-1蛋白和Nrf2蛋白的表达水平，HO-1、Nrf2、Lamin B1和GAPDH的稀释比例分别为1∶1 000、1∶1 000、1∶2 000、1∶5 000，以HO-1蛋白与GAPDH蛋白的灰度值比值表示HO-1蛋白的表达水平，以Nrf2蛋白

与Lamin B1蛋白的灰度值比值表示Nrf2蛋白的表达水平。

2.4.3　PAECs中SOD、GPx、CAT、MDA、ROS水平的检测

采用ELISA法检测PAECs中SOD、GPx、CAT、MDA水平；采用DCFH-DA探针联合荧光酶标仪测定细胞中ROS水平。细胞以1.5×10^5个/孔均匀接种于6孔板，每组设6个复孔。按“2.4.1”项下方法分组及给药后，按试剂盒说明书检测PAECs中SOD、GPx、CAT、MDA水平；细胞中ROS水平的检测方法同“2.3.5”。

2.4.4　PAECs的凋亡率、细胞活力、LDH活性和C-caspase-3蛋白表达水平的检测

按“2.4.1”项下方法分组及给药后，按“2.3.2”项下方法检测细胞凋亡率；按“2.1.2”项下方法检测细胞活力；按“2.3.4”项下方法检测LDH活性；按“2.2.2”项下方法检测C-caspase-3蛋白表达水平，其中C-caspase-3一抗稀释比例为1∶1 000，以C-caspase-3与GAPDH条带灰度值的比值表示C-caspase-3蛋白的表达水平。

2.5　统计学方法

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。计量数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD检验。检验水准$\alpha=0.05$。

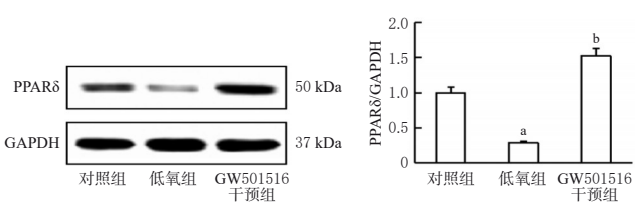
3　结果

3.1　GW501516对PAECs的细胞毒性

GW501516组PAECs孵育12、24、48 h后的细胞相对存活率[(98.37±2.14)%、(102.10±4.61)%、(103.24±3.66)%]与对照组PAECs孵育12、24、48 h后的细胞相对存活率[(100.00±2.68)%、(100.00±3.75)%、(100.00±4.23)%]比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。

3.2　低氧条件下GW501516对PAECs中PPARδ蛋白表达水平的影响

与对照组比较，低氧组PAECs中PPARδ蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$）；与低氧组比较，GW501516干预组PAECs中PPARδ蛋白表达水平显著升高（$P<0.05$）。结果见图1。



A. PPARδ蛋白表达电泳图　　B. PPARδ蛋白表达柱状图（$n=3$）

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与低氧组比较，$P<0.05$。

图1　低氧条件下GW501516对PAECs中PPARδ蛋白表达的影响

3.3　低氧条件下GW501516对PAECs的凋亡率、细胞活力、LDH活性和ROS水平的影响

与对照组比较，低氧组PAECs的凋亡率、LDH活性、ROS水平均显著升高（$P<0.05$），细胞活力显著降低（$P<0.05$）；与低氧组比较，NAC干预组和GW501516干预组细胞凋亡率、LDH活性、ROS水平均显著降低（$P<0.05$），细胞活力均显著升高（$P<0.05$）。结果见图2、表1。

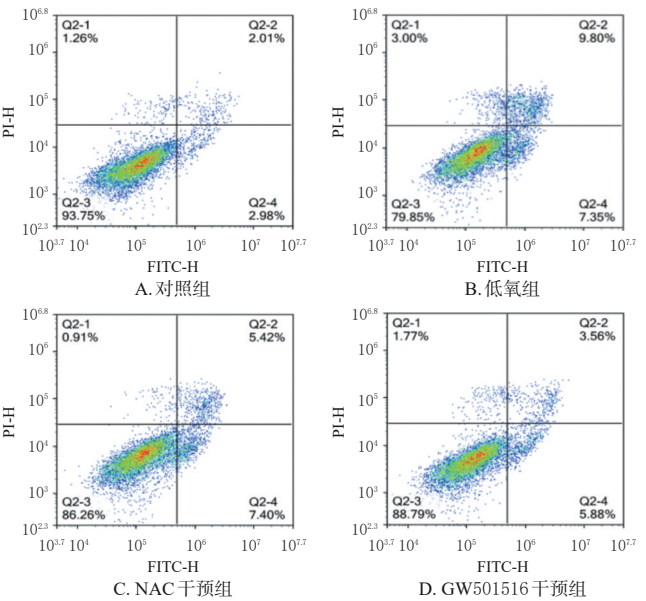


图2　各组细胞的凋亡流式图

表1　低氧条件下PAECs的凋亡率、细胞活力、LDH活性和ROS水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$）

组别	细胞凋亡率（$n=3$）/%	细胞活力（$n=6$）/%	LDH活性（$n=6$）	ROS水平（$n=6$）
对照组	6.03±1.34	100.00±5.67	1.00±0.12	1.00±0.15
低氧组	20.42±4.47[a]	70.91±5.23[a]	6.26±0.51[a]	8.85±0.96[a]
NAC干预组	13.55±2.06[b]	85.13±4.25[b]	3.32±0.23[b]	2.14±0.38[b]
GW501516干预组	11.37±1.85[b]	88.86±5.92[b]	2.14±0.27[b]	3.81±0.27[b]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与低氧组比较，$P<0.05$。

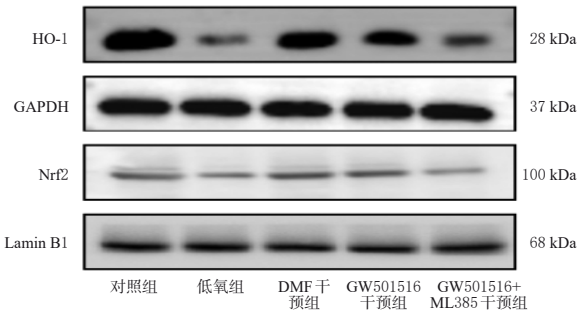
3.4　GW501516对低氧致PAECs损伤的作用机制

3.4.1　PAECs中HO-1蛋白和细胞核内Nrf2蛋白表达水平的检测结果

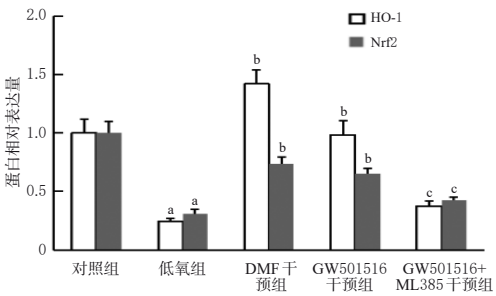
与对照组比较，低氧组PAECs中HO-1蛋白和细胞核内Nrf2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与低氧组比较，DMF干预组和GW501516干预组PAECs中HO-1蛋白和细胞核内Nrf2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$）；与GW501516干预组比较，GW501516+ML385干预组PAECs中HO-1蛋白和细胞核内Nrf2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见图3。

3.4.2　PAECs中SOD、GPx、CAT、MDA、ROS水平的检测结果

与对照组比较，低氧组PAECs中SOD、GPx、CAT水平均显著降低（$P<0.05$），MDA、ROS水平均显著升高



A. HO-1蛋白与细胞核内Nrf2蛋白表达的电泳图



B. HO-1蛋白与细胞核内Nrf2蛋白表达的柱状图(n=3)

a：与对照组比较，P<0.05；b：与低氧组比较，P<0.05；c：与GW501516干预组比较，P<0.05。

图3　GW501516对低氧条件下PAECs中HO-1蛋白和细胞核内Nrf2蛋白表达水平的影响

(P<0.05)；与低氧组比较，DMF干预组和GW501516干预组PAECs中SOD、GPx、CAT水平均显著升高(P<0.05)，MDA、ROS水平均显著降低(P<0.05)；与GW501516干预组比较，GW501516+ML385干预组PAECs中SOD、GPx、CAT水平均显著降低，MDA、ROS水平均显著升高(P<0.05)。结果见表2。

表2　PAECs中SOD、GPx、CAT、MDA、ROS水平的检测结果($\bar{x}\pm s$，n=6)

组别	SOD	GPx	CAT	MDA	ROS
对照组	1.00±0.08	1.00±0.15	1.00±0.09	1.00±0.08	1.00±0.12
低氧组	0.48±0.05[a]	0.15±0.01[a]	0.30±0.04[a]	7.56±0.81[a]	7.62±0.56[a]
DMF干预组	0.95±0.06[b]	0.76±0.05[b]	0.75±0.05[b]	2.38±0.38[b]	2.53±0.15[b]
GW501516干预组	0.87±0.07[b]	0.58±0.07[b]	0.94±0.10[b]	3.66±0.26[b]	2.79±0.11[b]
GW501516+ML385干预组	0.34±0.03[c]	0.12±0.02[c]	0.25±0.03[c]	6.15±0.52[c]	5.81±0.47[c]

a：与对照组比较，P<0.05；b：与低氧组比较，P<0.05；c：与GW501516干预组比较，P<0.05。

3.4.3　PAECs的凋亡率、细胞活力、LDH活性和C-caspase-3蛋白表达水平的检测结果

与对照组比较，低氧组PAECs的凋亡率、C-caspase-3蛋白表达水平、LDH活性均显著升高，细胞活力显著降低(P<0.05)；与低氧组比较，DMF干预组和GW501516干预组PAECs的凋亡率、C-caspase-3蛋白表达水平、LDH活性均显著降低，细胞活力均显著升高(P<0.05)；与GW501516干预组比较，GW501516+ML385干预组PAECs的凋亡率、C-caspase-3蛋白表达水平、LDH活性均显著升高，细胞活力显著降低(P<0.05)。结果见图4、表3、图5。

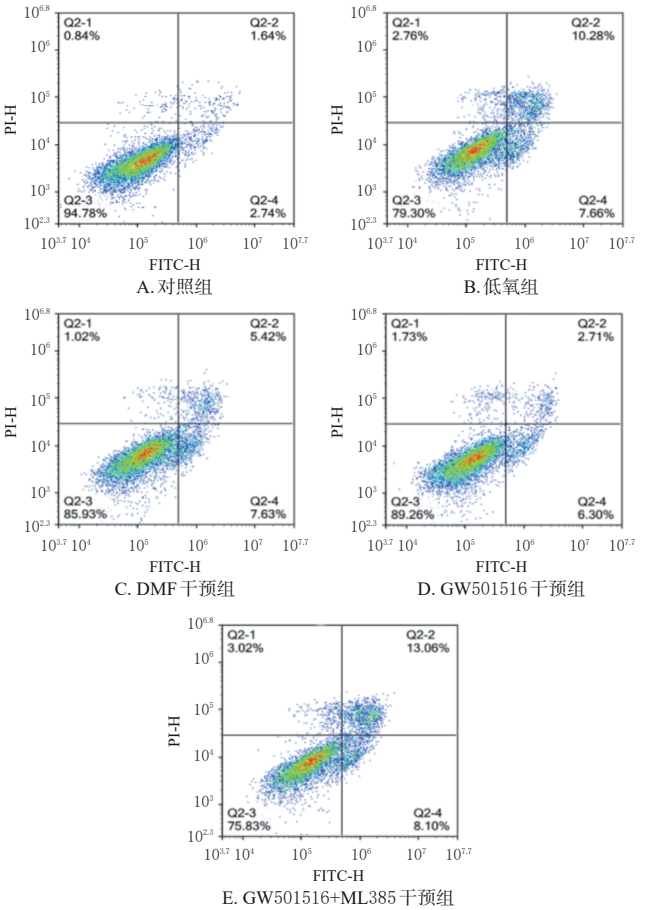


图4　机制研究中各组细胞的凋亡流式图

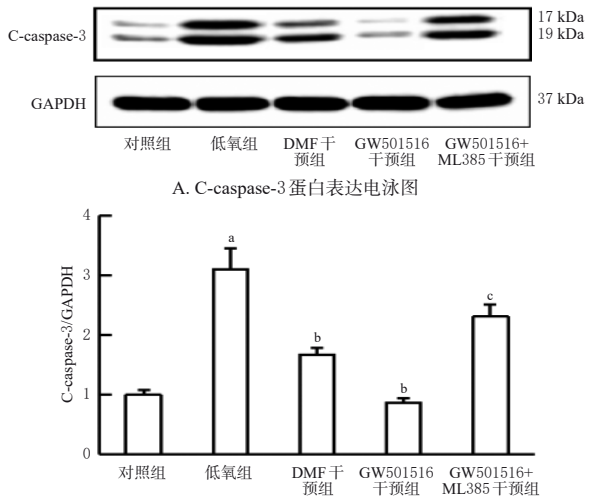
表3　机制研究中PAECs的凋亡率、细胞活力、LDH活性的检测结果($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞凋亡率(n=3)/%	细胞活力(n=6)/%	LDH活性(n=6)
对照组	4.69±0.82	100.00±6.06	1.00±0.09
低氧组	21.55±3.13[a]	73.85±4.58[a]	8.65±0.81[a]
DMF干预组	12.94±2.06[b]	87.11±6.23[b]	4.67±0.35[b]
GW501516干预组	9.24±1.86[b]	84.86±5.82[b]	3.26±0.51[b]
GW501516+ML385干预组	22.92±3.54[c]	73.04±4.24[c]	8.05±0.78[c]

a：与对照组比较，P<0.05；b：与低氧组比较，P<0.05；c：与GW501516干预组比较，P<0.05。

4　讨论

低氧能够诱导PAECs损伤，使其凋亡增加，抑制PAECs损伤和凋亡能够逆转HPH[1]。正常条件下LDH不能穿透细胞膜，但当细胞受损或死亡后，LDH可以释放到细胞外，其释放水平能够反映细胞损伤程度[10]。caspase-3是调控细胞凋亡的关键介质，可被外源性(死亡配体)和内源性(线粒体)凋亡途径激活，是最重要的胱天蛋白酶。caspase-3激活后生成的C-caspase-3是细胞凋亡的主要执行者之一，亦是细胞凋亡的标志蛋白[11]。研究发现，PPARδ合成型激动剂L-165041能够抑制H_2O_2诱导的人脐静脉血管内皮细胞损伤，抑制其凋亡，而PPARδ的沉默逆转了这种作用[2]。此外，PPARδ可通过激活磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B通路来抑制缺



A. C-caspase-3蛋白表达电泳图

B. C-caspase-3蛋白表达柱状图(n=3)

a：与对照组比较，P<0.05；b：与低氧组比较，P<0.05；c：与GW501516干预组比较，P<0.05。

图5　GW501516对低氧条件下PAECs中C-caspase-3蛋白表达水平的影响

氧诱导的内皮祖细胞凋亡[12]。本研究发现，在低氧刺激下，PAECs中PPARδ蛋白表达水平降低，细胞凋亡率升高，C-caspase-3表达水平升高，细胞活力降低，LDH活性升高；而GW501516可上调PPARδ蛋白的表达，抑制低氧诱导的PAECs损伤，且实验浓度的GW501516对PAECs无明显细胞毒性。因此，本课题组推测低氧通过抑制PPARδ蛋白表达来损伤内皮细胞，GW501516则通过激活PPARδ来发挥保护内皮细胞的作用。

低氧能够诱导氧化应激，导致PAECs的损伤和凋亡，抑制氧化应激可抑制PAECs损伤及HPH的形成[1,13-14]。有研究表明，PPARδ能够抑制高糖诱导的血管内皮功能障碍及ROS的产生[15]。在动脉粥样硬化的动物模型中发现，PPARδ可减少ROS的产生，从而发挥保护内皮细胞的作用[16]。另有研究表明，GW501516能够通过抑制ROS产生而抑制血管紧张素Ⅱ诱导的血管平滑肌细胞肥大[5]。本研究发现，GW501516及NAC均可抑制低氧诱导的PAECs损伤及ROS产生。因此，本课题组推测GW501516可通过抑制氧化应激来抑制低氧诱导的PAECs损伤。

Nrf2是一种参与氧化应激的关键转录因子，其在细胞核内可与抗氧化反应元件结合，来促进下游抗氧化酶或蛋白的表达，从而发挥抗氧化应激作用。CAT、GPx、HO-1和SOD是Nrf2通路下游的主要抗氧化酶。其中，HO-1可降解血红素，产生一氧化碳、亚铁和胆绿素，而HO-1以及血红素分解代谢产物均具有抗氧化作用，并能够缓解肺血管重构[17]；SOD可将超氧化自由基分解为H_2O_2，促进氧自由基的清除，上调SOD活性，减轻肺血管重构[18]；GPx可催化谷胱甘肽与H_2O_2或其他过氧化物的反应，生成氧化型谷胱甘肽和H_2O，从而消除ROS[11]；CAT能催化H_2O_2生成H_2O与O_2。氧化应激能导致细胞脂质过氧化，MDA是脂质过氧化的产物，其水平与氧化应激呈负相关。Nrf2激活剂能够通过上调肺动脉组织内SOD、HO-1活性，降低MDA及ROS水平，抑制低氧诱导的氧化应激，从而缓解大鼠低氧肺血管重构[19]。在高糖诱导人脐静脉血管内皮细胞氧化应激的细胞模型中发现，PPARδ激动剂GW0742和L165041可激活Nrf2，并以浓度依赖的方式上调人脐静脉血管内皮细胞内HO-1蛋白和mRNA的表达，抑制ROS产生，从而发挥保护人脐静脉血管内皮细胞的作用[20]。在内皮细胞中，GW0742通过诱导SOD、CAT等抗氧化酶的表达，减少肿瘤坏死因子α诱导的内皮细胞产生ROS[2]。内皮细胞特异性*PPARδ*基因敲除小鼠主动脉内CAT和GPx的表达降低，氧化应激增强[21]。本研究发现，Nrf2激活剂DMF和GW501516均可升高Nrf2蛋白、HO-1蛋白的表达水平及SOD、GPx、CAT水平，降低MDA、ROS水平，减轻低氧诱导的PAECs损伤，且Nrf2抑制剂ML385能够逆转GW501516的上述作用。这说明GW501516可通过抑制氧化应激，减轻低氧诱导的PAECs损伤，其机制可能与激活Nrf2有关。

综上所述，GW501516可通过激活Nrf2，抑制氧化应激来减轻低氧诱导的PAECs损伤。本研究仅从细胞水平探讨了GW501516对低氧诱导PAECs损伤及氧化应激的影响，本课题组将在后续动物实验中观察GW501516对低氧诱导的肺动脉高压大鼠内皮细胞功能、氧化应激及肺血管重构的影响。

参考文献

[1] EVANS C E, COBER N D, DAI Z Y, et al. Endothelial cells in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension[J]. Eur Respir J, 2021, 58(3): 2003957.

[2] XIAO L, WANG N P. PPAR-δ: a key nuclear receptor in vascular function and remodeling[J]. J Mol Cell Cardiol, 2022, 169: 1-9.

[3] BOJIC L A, BURKE A C, CHHOKER S S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor δ agonist GW1516 attenuates diet-induced aortic inflammation, insulin resistance, and atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor knockout mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(1): 52-60.

[4] TIAN D Y, MENG J Q, LI L, et al. Hydrogen sulfide ameliorates senescence in vascular endothelial cells through ameliorating inflammation and activating PPARδ/SGLT2/STAT3 signaling pathway[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2023, 55(9): 1358-1369.

[5] KANG E S, HWANG J S, LEE W J, et al. Ligand-

activated PPARδ inhibits angiotensin Ⅱ-stimulated hypertrophy of vascular smooth muscle cells by targeting ROS [J]. PLoS One,2019,14(1):e0210482.

[6] 陈昌贵,易春峰,王栋,等. PPARδ的激活通过抑制糖酵解减轻PDGF-BB诱导的肺动脉平滑肌细胞表型转化[J]. 中国病理生理杂志,2023,39(6):988-995.
CHEN C G,YI C F,WANG D,et al. Activation of PPARδ suppresses phenotypic switching of PDGF-BB-induced pulmonary artery smooth muscle cells via inhibition of glycolysis[J]. Chin J Pathophysiol,2023,39(6):988-995.

[7] YAMADA T,EGASHIRA N,BANDO A,et al. Activation of p38 MAPK by oxidative stress underlying epirubicin-induced vascular endothelial cell injury[J]. Free Radic Biol Med,2012,52(8):1285-1293.

[8] PASCALE C L,MARTINEZ A N,CARR C,et al. Treatment with dimethyl fumarate reduces the formation and rupture of intracranial aneurysms:role of Nrf2 activation [J]. J Cereb Blood Flow Metab,2020,40(5):1077-1089.

[9] JIN D H,LIN L H,XIE Y X,et al. NRF2-suppressed vascular calcification by regulating the antioxidant pathway in chronic kidney disease[J]. FASEB J,2022,36(1):e22098.

[10] JIANG Y,LIU H Y,YU H,et al. Circular RNA Calm4 regulates hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cells pyroptosis via the circ-Calm4/miR-124-3p/PDCD6 axis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol,2021,41(5):1675-1693.

[11] WANG R,PAN J J,HAN J Z,et al. Melatonin attenuates dasatinib-aggravated hypoxic pulmonary hypertension via inhibiting pulmonary vascular remodeling[J]. Front Cardiovasc Med,2022,9:790921.

[12] HAN J K,LEE H S,YANG H M,et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-delta agonist enhances vasculogenesis by regulating endothelial progenitor cells through genomic and nongenomic activations of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway[J]. Circulation,2008,118(10):1021-1033.

[13] AIMAIER S,YANG T,FANG L,et al. Protective effects of the *Terminalia bellirica* tannin-induced Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats with high-altitude pulmonary hypertension[J]. BMC Complement Med Ther,2023,23(1):150.

[14] 孙鹤宁,鲁美丽,田小雪,等. Calpain-1通过诱导内质网应激加速肺动脉高压的内皮细胞凋亡[J]. 中国药理学通报,2023,39(4):723-730.
SUN H N,LU M L,TIAN X X,et al. Calpain-1 accelerates endothelial cell apoptosis in pulmonary hypertension by inducing endoplasmic reticulum stress[J]. Chin Pharmacol Bull,2023,39(4):723-730.

[15] LIU F,FANG S H,LIU X X,et al. Omentin-1 protects against high glucose-induced endothelial dysfunction via the AMPK/PPARδ signaling pathway[J]. Biochem Pharmacol,2020,174:113830.

[16] TIAN Q Q,LEUNG F P,CHEN F M,et al. Butyrate protects endothelial function through PPARδ/miR-181b signaling[J]. Pharmacol Res,2021,169:105681.

[17] CHEN Y C,YUAN T Y,ZHANG H F,et al. Activation of Nrf2 attenuates pulmonary vascular remodeling via inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition:an insight from a plant polyphenol[J]. Int J Biol Sci,2017,13(8):1067-1081.

[18] ARCHER S L,MARSBOOM G,KIM G H,et al. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension:a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target[J]. Circulation,2010,121(24):2661-2671.

[19] 葛亮,向悦华,谭旋. Nrf2激活剂缓解低氧性肺动脉高压大鼠肺血管重构[J]. 基础医学与临床,2021,41(10):1446-1450.
GE L,XIANG Y H,TAN N. Nrf2 activator relieves pulmonary vascular remodeling in rats with hypoxic pulmonary arterial hypertension[J]. Basic Clin Med,2021,41(10):1446-1450.

[20] JIMENEZ R,TORAL M,GÓMEZ-GUZMÁN M,et al. The role of Nrf2 signaling in PPARβ/δ-mediated vascular protection against hyperglycemia-induced oxidative stress [J]. Oxid Med Cell Longev,2018,2018:5852706.

[21] D'USCIO L V,HE T R,SANTHANAM A V,et al. Mechanisms of vascular dysfunction in mice with endothelium-specific deletion of the *PPAR*-δ gene[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2014,306(7):H1001-H1010.

(收稿日期:2023-06-06 修回日期:2023-11-20)
(编辑:曾海蓉)