

分类号 R563.9  
UDC 616

密级 公开  
编号 10299T121347



JIANGSU UNIVERSITY

# 学术型硕士学位论文

Thesis for Academic Master Degree



硕士类别: 同等学力

论文题目: siRNA 沉默 CHOP 基因表达对  
高氧暴露肺泡II型上皮细胞凋亡的影响

学科专业: 内科学

作者姓名: 汪科换

指导教师: 卢红艳 主任医师

答辩日期: 2019年5月28日

分类号 R563.9  
UDC 616

密级 公开  
编号 10299T121347

# 学术型硕士学位论文

## siRNA 沉默 CHOP 基因表达对 高氧暴露肺泡II型上皮细胞凋亡的影响 Effect of siRNA silencing CHOP gene expression on apoptosis of type II alveolar epithelial cells exposed to hyperoxia

作者姓名: 汪科换

指导教师: 卢红艳 主任医师

申请学位: 硕士

学科专业: 内科学

论文提交日期: 2019年03月29日

论文答辩日期: 2019年05月28日

学位授予单位: 江苏大学

学位授予日期:

答辩委员会主席: 陈筱青

评阅人:

## 独创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已注明引用的内容以外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品成果，也不包含为获得江苏大学或其他教育机构的学位或证书而使用过的材料。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本声明的法律结果由本人承担。

学位论文作者签名：汪科换

2019年5月28日

## 学位论文版权使用授权书

江苏大学、中国科学技术信息研究所、国家图书馆、中国学术期刊（光盘版）电子杂志社有权保留本人所送交学位论文的复印件和电子文档，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文。本人电子文档的内容和纸质论文的内容相一致，允许论文被查阅和借阅，同时授权中国科学技术信息研究所将本论文编入《中国学位论文全文数据库》并向社会提供查询，授权中国学术期刊（光盘版）电子杂志社将本论文编入《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》并向社会提供查询。论文的公布（包括刊登）授权江苏大学研究生院办理。

本学位论文属于不保密 。

学位论文作者签名：汪科换

2019年5月28日

指导教师签名：卢永艳

2019年5月28日

# 目 录

中文摘要.....	I
英文摘要.....	III
英文缩略词.....	VI
第一章 前言.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 主要研究内容、目标及意义和技术路线.....	3
1.2.1 主要研究内容.....	3
1.2.2 主要研究目标.....	3
1.2.3 主要研究意义.....	3
1.2.4 技术路线.....	4
第二章 siRNA 沉默 CHOP 基因对高氧暴露 AECIIs 凋亡的影响.....	5
2.1 实验材料.....	5
2.1.1 实验用细胞株.....	5
2.1.2 主要试剂.....	5
2.1.3 主要试剂的配制.....	6
2.1.4 主要设备和器材.....	7
2.2 实验方法.....	8
2.2.1 AECIIs 培养.....	8
2.2.2 pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 及 pcDNA3.1(+)-空质粒瞬时转染.....	9
2.2.3 pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 瞬时转染效果检测.....	9
2.2.4 高氧细胞损伤建立及分组.....	12
2.2.5 倒置相差显微镜观察 AECIIs 形态.....	13
2.2.6 RT-PCR 检测各组细胞 CHOP、Bcl-2 及 Bax mRNA 表达.....	13
2.2.7 Western blot 检测各组细胞 CHOP、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达.....	13
2.2.8 AnnexinV/PI 双染流式细胞术检测各组细胞凋亡.....	14
2.3 统计学分析.....	14
2.4 实验结果.....	14

2.4.1 pcDNA3.1(+)-空质粒及 pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 转染结果·····	14
2.4.2 倒置相差显微镜观察 AECIIs 形态·····	16
2.4.3 CHOP-siRNA 对 CHOP 基因 mRNA 及蛋白表达的影响·····	17
2.4.4 CHOP-siRNA 对 Bcl-2 基因 mRNA 及蛋白表达的影响·····	18
2.4.5 CHOP-siRNA 对 Bax 基因 mRNA 及蛋白表达的影响·····	20
2.4.6 流式细胞术检测 CHOP 沉默对细胞早期凋亡的影响·····	22
2.5 讨论·····	24
第三章 结论·····	27
参考文献·····	28
综述·····	32
致谢·····	45
攻读学位期间发表文章·····	46

## 摘要

### 目的

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是严重威胁早产儿尤其极早早产儿的一种常见肺部疾病。前期研究发现, 在高氧诱导的 BPD 中, 肺泡 II 型上皮细胞 (type II alveolar epithelial cells, AECIIs) 凋亡增加, 且通过内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 介导的 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白 (CHOP) 凋亡途径活化。但 CHOP 表达改变对高氧暴露后 AECIIs 凋亡是否产生影响, 目前尚不清楚。本研究主要通过检测被 CHOP-siRNA 转染的 AECIIs 细胞株在高氧暴露后 CHOP、Bcl-2 和 Bax 的表达水平以及 AECIIs 凋亡情况, 探讨阻断内源性 CHOP 表达对高氧暴露 AECIIs 凋亡的影响。

### 方法

体外设计合成靶向 CHOP 基因的 siRNA 碱基序列, 采用 Lipofectamine2000 脂质体介导法对 AECIIs 细胞进行 pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 及 pcDNA3.1(+)-空质粒瞬时转染, RT-PCR 和 Western blot 检测 siRNA 干扰后 CHOP 基因沉默效果。转染后 24 h 给予高氧暴露, 将细胞分为空气组、空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组、空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组、高氧组、高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组、高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组。倒置相差显微镜观察细胞形态, 于空气或高氧暴露 48 h 收集各组细胞, Annexin V/PI 双染法及流式仪检测早期细胞凋亡, RT-PCR 及 Western blot 检测 CHOP、Bcl-2 及 Bax 表达水平。

### 结果

(1) 空气组 AECIIs 伸出较多伪足, 紧贴于瓶底, 呈岛状生长方式, 空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组及空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组细胞形态与空气组相比无明显差异; 高氧组 AECIIs 伸展肥大明显, 细胞贴壁不紧, 伪足减少, 核仁减少或消失, 培养液中悬浮细胞数增加, 少数细胞出现空泡改变, 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组与高氧组相比无明显差异; 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组细胞形态较空气组稍有伸展肥大, 但较高氧组细胞伸展程度变小, 悬浮细胞数减少, 且细胞无空泡改变。

(2) 与空气组相比, 高氧组 AECIIs 凋亡明显增加, CHOP 基因 mRNA 及

蛋白表达增加, Bcl-2 基因 mRNA 及蛋白减少, Bax 基因 mRNA 及蛋白表达增加。

(3) AECIIs 转染 CHOP-siRNA 后, 与高氧组相比, 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 AECIIs 凋亡减少, CHOP 基因 mRNA 及蛋白表达减少, Bcl-2 基因 mRNA 及蛋白表达增加, Bax 基因 mRNA 及蛋白表达减少。

## 结论

(1) 高氧可导致 AECIIs 凋亡增加, CHOP 表达增加, 抗凋亡基因 Bcl-2 减少, 促凋亡基因 Bax 增加, 提示高表达的 CHOP 可通过下调抗凋亡基因 Bcl-2 表达及促进促凋亡基因 Bax 的表达, 最终导致细胞凋亡增加。

(2) AECIIs 转染 CHOP-siRNA 阻断 CHOP 表达后, 可减轻高氧诱导的 AECIIs 凋亡。

## 关键词

CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP), 高氧, 肺泡II型上皮细胞, siRNA, BPD, 凋亡



## ABSTRACT

### 【Objective】

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is a common lung disease that seriously threatens the health of premature infants, especially very early preterm infants. Long-term inhalation of high concentrations of oxygen in premature infants can cause BPD. Previous studies have found that type II alveolar epithelial cells (AECIIs) increases the rate of apoptosis in hyperoxia-induced BPD, and the apoptotic pathway was activated by endoplasmic reticulum stress (ERS) which mediated by the CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP). However, it is unclear whether the change in CHOP expression affects the apoptosis of AECIIs exposed to hyperoxia. This study is mainly to detect the expression levels of CHOP, Bcl-2 and Bax and the rate of apoptosis in AECIIs lines which exposed to high oxygen after transfected with CHOP-siRNA.

### 【Methods】

The siRNA based sequence targeting CHOP gene was designed and synthesized *In vitro*, and the pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA and pcDNA3.1(+)-empty plasmid were transiently transfected into AECII cells by Lipofectamine2000 liposome-mediated method. RT-PCR and Western blot were used to detect the effect of CHOP gene silencing after siRNA interference. The cells were exposed to hyperoxia after transfection for 24 h, and the cells were divided into air group, air + pcDNA3.1(+)-empty plasmid group, air + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group, hyperoxia group, hyperoxia+ pcDNA3.1(+)-empty plasmid group, hyperoxia + pcDNA3.1(+)-CHOP -siRNA group. Under inverted phase contrast microscope the morphology of the cells was observed. The cells of each group were harvested after 48 h of air or high oxygen exposure. Apoptosis was detected early by Annexin V/PI double staining flow cytometry. The expression levels of CHOP, Bcl-2 and Bax were detected by real-time quantitative PCR and Western blot.

### 【Results】

(1) AECIIs in the air group protruded more pseudopods and adhered to the

bottom of the bottle, showing an island-like growth pattern. The cell morphology in The air+pcDNA3.1(+)-empty plasmid group and air+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group had no significant difference compared to that in the air group; AECIIs in the hyperoxia group stretched hypertrophy, cell adhesion was not tight, pseudopod decreased, nucleoli decreased or disappeared, the number of suspended cells in culture medium increased, and a few cells showed vacuolar changes. There was no significant difference between the hyperoxia + pcDNA3.1(+)-empty plasmid group and the hyperoxia group. The morphology of the cells in the hyperoxia + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group was slightly larger than that in the air group, but the degree of cell expansion in the hyperoxia group was smaller, the number of suspended cells was decreased, and the cells were free of vacuoles.

(2) Compared to the air group, the rate of AECIIs apoptosis was significantly increased in the hyperoxia group; the expression levels of CHOP mRNA and protein were increased in the hyperoxia group; the expression levels of Bcl-2 mRNA and protein were decreased in the hyperoxia group; and the expression levels of Bax mRNA and protein were increased in the hyperoxia group.

(3) After the AECIIs transfected with CHOP-siRNA, Compared with the hyperoxia group, the rate of AECIIs apoptosis was decreased in the hyperoxia+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group, the expression levels of CHOP mRNA and protein were decreased, the expression levels of Bcl-2 mRNA and protein were increased, the expression levels of Bax mRNA and protein were decreased.

### **【Conclusions】**

(1) Hyperoxia could lead to increase the rate of AECIIs apoptosis, increase the expression levels of CHOP, decreased the expression levels of anti-apoptotic Bcl-2, and increase the expression levels of proapoptotic gene Bax, suggesting that the high expression levels of CHOP could down-regulate the expression levels of anti-apoptotic gene Bcl-2 and promote the expression levels of proapoptotic gene Bax, and lead to increase the rate of AECIIs apoptosis eventually.

(2) CHOP-siRNA transfected to AECIIs could block the expression levels of

CHOP and induce the rate of AECIIs apoptosis after high oxygen exposure.

**KEYWORDS**

CCAAT enhancer binding protein-homologous protein (CHOP), hyperoxia, type II alveolar epithelial cells(AECIIs), siRNA,BPD,apoptosis

## 英文缩略词

缩写	英文名称	中文名称
BPD	bronchopulmonary dysplasia	支气管肺发育不良
AECIs	type I alveolar epithelial cells	肺泡 I 型上皮细胞
AECIIs	type II alveolar epithelial cells	肺泡 II 型上皮细胞
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2	B 细胞淋巴瘤/白血病-2
Bax	Bcl-2-associated X protein	Bcl-2 相关 X 蛋白
CHOP	CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein	CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白
ERS	endoplasmic reticulum stress	内质网应激
GRP78	glucose regulated protein 78	葡萄糖调节蛋白 78
UPR	unfolded protein response	未折叠蛋白反应
PCR	polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
RT-PCR	Real-Time Quantitative PCR	实时荧光定量 PCR
DNA	deoxyribonucleic acid	脱氧核糖核酸
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
TBS	Tris-buffered saline	Tris 盐缓冲液
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
DTT	DL-Dithiothreitol	二硫苏糖醇
DAB	3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride	二氨基联苯胺
TEMED	tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
BSA	bovine serum albumin	牛血清白蛋白
SDS	sodium-dodecyl sulphate	十二烷基硫酸钠
Tris	Tri hydroxy aminomethane	三羟基氨甲烷
AP	ammonium persulphate	过硫酸铵
PVDF	polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯
RNA	ribonucleic acid	核糖核酸
siRNA	small/short interfering RNA/silencing RNA	小或短干扰 RNA 或沉默 RNA

缩写	英文名称	中文名称
mRNA	messenger ribonucleic acid	信使 RNA
mPTP	mitochondrial permeability transition pore	线粒体渗透性过渡孔隙
CytC	Cytochrome C	细胞色素 C
GSH	nuclear glutathione	细胞核谷胱苷肽
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
ddH <sub>2</sub> O	distillation-distillation H <sub>2</sub> O	双蒸水

# 第一章 前言

## 1.1 研究背景

呼吸窘迫综合征 (respiratory distress syndrome, RDS), 是新生儿常见的危重症, 可导致低氧性呼吸衰竭。随着肺表面活性物质替代疗法、呼吸机辅助通气等新技术应用, 即使重度 RDS, 其存活率亦显著提高。而长时间吸入高浓度氧, 幸存者易发生肺部氧化应激, 引起急慢性肺损伤<sup>[1]</sup>。目前, 高氧肺损伤已成为新生儿重症监护室 NICU 极为棘手的问题之一, 而高氧肺损伤较常见并发症便是支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD)<sup>[2]</sup>, 其病死率较高。然而高氧肺损伤的发病机制尚未完全明了, 临床上尚缺乏有效的治疗手段。因此进一步研究其分子发病机制, 可以为临床上更好的应用辅助氧治疗及防治高氧肺损伤提供靶点依据, 对提高新生儿存活率及改善远期生存质量具有非常重要的意义。

吸入高浓度氧导致的肺损伤其病理生理过程极其复杂, 可分为早期肺组织弥散性损伤 (弥散性肺炎) 和晚期的肺组织损伤后的修复 (肺间质重构) 两个过程<sup>[3]</sup>。肺损伤机制涉及氧化/抗氧化失去平衡、炎症介质损伤、内皮血管受损、不成熟的肺组织发生修复异常、细胞分化受阻及细胞凋亡增加等多种因素, 这些因素相互作用共同导致高氧肺损伤形成<sup>[4]</sup>。在早产儿, 其病理改变表现为肺泡化发育受阻, 肺泡变大及结构简单化, 肺泡数目明显减少, 甚至肺发育停滞<sup>[5]</sup>。动物及临床实验均证实, 高氧暴露后, 肺毛细血管通透性变高, 渗出液增多, 肺泡表面活性物质分泌减少, 肺泡上皮细胞损伤<sup>[6]</sup>。另早产儿由于抗氧化酶系统发育尚未成熟, 吸入高浓度氧后机体产生大量氧自由基, 氧化/抗氧化平衡破坏更易导致肺损伤发生。

肺泡上皮细胞主要由 I 和 II 型构成。肺泡 II 型上皮细胞 (type II alveolar epithelial cells, AECIIs) 可通过有丝分裂增殖补充 AECIIs 的数量, AECIIs 也可以转化为肺泡 I 型上皮细胞 (type I alveolar epithelial cells, AECIs), 被认为是肺泡上皮的干细胞, 在肺的正常发育及损伤后修复过程中发挥着重要作用。有研究发现, 新生的大鼠暴露在高浓度氧中, 肺泡的发育明显受阻, 肺泡体积变大, 肺泡结构出现简单化, 肺泡的数目明显减少, 而这此时肺泡数目的减少考虑与 AECIIs 增殖减少及凋亡增加有关<sup>[7]</sup>。长期吸入高浓度氧可抑制 AECIIs 增殖及向成熟生长分化, 破坏 DNA 合成, 诱导细胞凋亡和坏死, 肺囊泡分裂及肺泡化受

阻,严重影响气血交换<sup>[8]</sup>。体外培养 AECIIs,在高氧暴露后呈现 DNA 损伤和细胞凋亡增加,另外 AECIIs 数量减少、形态结构异常和功能受损在高氧肺损伤动物模型中也同样被观察到<sup>[9]</sup>。利用高氧暴露建立 BPD 动物模型及原代培养 AECIIs 损伤模型中可见<sup>[10]</sup>,AECIIs 向成熟生长分化及增殖受抑,AECIIs 凋亡增加,提示高氧诱导的 BPD 发生发展与 AECIIs 功能受损密切相关。

前期研究发现<sup>[11]</sup>,AECs 凋亡增加与高氧导致的内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)有关。ERS 是介导细胞适应性生存及凋亡的双刃剑。为应对 ERS,细胞启动未折叠蛋白反应(unfolded protein response,UPR),以恢复细胞内环境稳态;而持久强烈的应激会致内环境紊乱,进而活化下游的凋亡信号分子 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein,CHOP)、JNK 及 Caspase-12 诱导细胞凋亡,这一点在 Bridges 等<sup>[12]</sup>的研究中验证,在被 RSV 感染后表达突变体 SP-C<sup>Δexon4</sup> 的 HEK293 细胞株中,IRE1/XBP1 活化,细胞凋亡发生。在对慢性阻塞性肺疾病研究中发现<sup>[13]</sup>,肺泡上皮细胞 ERS 启动,CHOP 及 Caspase-12 增加,提示 ERS 相关凋亡途径参与了慢性阻塞性肺疾病的发展过程。

越来越多的研究证明,ERS 介导的细胞凋亡与疾病的发生密切相关<sup>[14]</sup>。CHOP 是内质网应激标志因子,ERS 激活 CHOP 是诱发细胞凋亡较重要的信号途径。当 CHOP 过量表达时可引起内质网蛋白的错误折叠,导致细胞凋亡发生<sup>[15-16]</sup>,目前认为其机制是大量表达的 CHOP 可以降低 Bcl-2 的表达、降低细胞内谷胱甘肽的量和增加活性氧代谢产物,从而引起 DNA 损伤及阻滞细胞分裂周期,最终诱导细胞凋亡<sup>[17]</sup>。在脂多糖诱导的急性肺损伤中<sup>[18]</sup>,ERS 介导的 CHOP 凋亡途径活化,当 CHOP 基因敲除后,肺损伤减轻,提示阻断 CHOP 基因表达可能对脂多糖诱导的急性肺损伤起到一定保护作用。前期研究发现<sup>[19]</sup>,将早产新生大鼠暴露于 85% 高氧中,85%高浓度氧能促进 ERS 激活的标志蛋白 GRP78 及 CHOP 因子表达上调,并与 ACEs 凋亡指数呈正相关,提示高氧可启动内质网应激,通过 CHOP 通路介导 ACEs 凋亡,并参与支气管肺发育不良(BPD)发病过程。然而应用基因沉默技术特异性阻断 CHOP 表达能否减少高氧诱导的肺泡上皮细胞凋亡,从而对高氧肺损伤性疾病如 BPD 起到保护作用,目前尚不明确。

## 1.2 主要研究内容、目标及意义和技术路线

**1.2.1 主要研究内容：**利用原代培养 AECIIs 高氧暴露细胞损伤模型，研究阻断内源性 CHOP 表达，对高氧暴露 AECIIs 凋亡的影响。

(1) 设计合成靶向 CHOP 基因的 siRNA 碱基序列，再瞬时转染 AECIIs；

(2) 实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测转染效果。

(3) 转染后 24h 给予高氧暴露，将细胞分为高氧组、高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组、高氧+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组、空气组、空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组、空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组。于空气或高氧暴露 48h 后收集细胞，用倒置相差显微镜观察 AECIIs 细胞形态，Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡，实时定量 PCR 及 Western blot 方法检测 Bcl-2 及 Bax 表达情况。

**1.2.2 主要研究目标：**

(1) 阐明高氧可导致 CHOP 通路介导的 AECIIs 细胞凋亡增加。

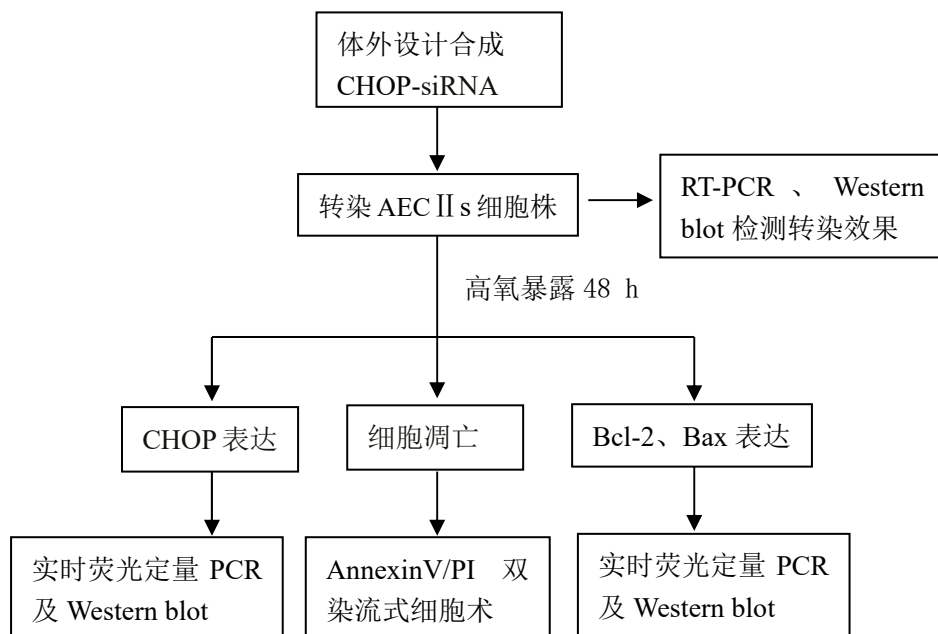
(2) 阐明利用基因沉默技术特异性阻断 CHOP 表达后可以减少高氧诱导的肺泡上皮细胞凋亡。

**1.2.3 主要研究意义：**

通过探讨基因沉默技术特异性阻断ERS启动标志性蛋白CHOP的表达对高氧肺损伤的影响，来进一步认识高氧肺损伤的发病机制，从而为防治高氧肺损伤提供新的潜在治疗靶点。



### 1.2.4 技术路线



## 第二章 siRNA 沉默 CHOP 基因表达对高氧暴露 AECIIs 凋亡的影响

肺细胞凋亡是高氧肺损伤性疾病如支气管肺发育不良(BPD)发病机制之一,而内质网应激反应(ERS)可诱导肺细胞凋亡参与 BPD 的发生发展<sup>[20]</sup>。目前研究显示,ERS 大多通过 CHOP、JNK 及 caspase-12 这三条信号通路参与细胞凋亡调控<sup>[17,21]</sup>。CHOP 属于 C/EBP 家族,为促凋亡因子,生理情况下其表达量极少;应激状态下,其上游活性转录因子 ATF4 及转录元件蛋白激酶 R 样内质网激酶 PERK 解离成为寡聚体,它们通过自身磷酸化后呈活化状态,诱导激活 CHOP 大量转录表达,最终可诱发细胞程序性凋亡<sup>[22-24]</sup>。我们前期研究发现<sup>[19]</sup>,高氧导致 ERS 激活标志分子 CHOP、GRP78 的表达随时间延长而上升,且两者变化规律一致,都与细胞凋亡指数呈正相关,提示高氧可导致肺泡上皮细胞发生 ERS,并可激活 CHOP 通路介导 ACEs 凋亡,诱导 BPD 发生。应用基因沉默技术阻断 CHOP 特异性表达能否减轻高氧导致的肺泡上皮损伤,目前尚不清楚。

本研究体外设计合成靶向 CHOP 基因的 siRNA 碱基序列,采用 Lipofectamine2000 脂质体介导法对 AECIIs 进行 pcDNA3.1(+)-CHOP 质粒瞬时转染,转染后 24 h 给予高氧暴露,通过观察 AECIIs 形态、检测 CHOP、Bcl-2 及 Bax 表达水平和检测 AECIIs 凋亡情况,来研究阻断内源性 CHOP 表达是否可以减少高氧暴露后 AECIIs 的凋亡。

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 实验用细胞株

人来源的 AECIIs 细胞株购自于赛百慷生物技术股份有限公司。

#### 2.1.2 主要试剂

主要使用试剂	公司
胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)	Multicell 公司
OPTI-MEM 培养基	Gibco 公司
RPMI 1640 培养基	Hyclone 公司
胰蛋白酶、转染试剂	Invitrogen 公司
SYBR® Premix Ex Taq™ 试剂盒	TaKaRa 公司

主要使用试剂	公司
Lipofectamine2000	Invitrogen 公司
Opti-MEM Reduced Serum Medium	Invitrogen 公司
逆转录试剂盒	TaKaRa 公司
Trizol	Invitrogen 公司
pcDNA3.1(+)- CHOP-siRNA 质粒	上海生工生物工程有限公司
pcDNA3.1(+)-空质粒	苏州吉玛生物科技有限公司
质粒提取及 PCR 引物试剂盒	上海生工生物工程有限公司
DEPC	Sigma 公司
CHOP、Bcl-2 及 Bax 抗体	Santa Cruz 公司
$\beta$ -actin 抗体	Sigma 公司
标记辣根过氧化物酶 (HRP) 的兔抗山羊 IgG	南京福麦斯生物科技有限公司
HRP 标记的小鼠抗兔 IgG	南京福麦斯生物科技有限公司
FITC AnnexinV/PI 流式试剂盒	南京福麦斯生物科技有限公司
QuickFreezing-M 哺乳动物细胞冻存液	北京博奥龙免疫有限公司
SDS-PAGE 配胶试剂盒	大连 Takara 生物科技有限公司
青/链/两性霉素、RIPA 裂解液	博凌科为生物科技有限公司
蛋白酶抑制剂、Marker 及 10×Binding Buffer	大连 Takara 生物科技有限公司
蛋白质定量试剂盒 (二辛可宁酸 BCA)	北京康为世纪公司
异丙醇、氯仿、乙醇	天津广成化学试剂有限公司

### 2.1.3 主要试剂的配制

(1) PBS 缓冲液: 将称量好的 KCl: 0.2 g, NaCl: 8 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ : 3.49 g, 置入盛有 900 ml ddH<sub>2</sub>O 的大烧杯中, 在磁力搅拌器上充分搅拌混匀, 用容量瓶定容至 1000 ml, 随后分装入小瓶, 蒸汽高压后放进 4℃ 冰箱备用。

(2) 细菌液体培养基: NaCl: 1 g, 酵母提取液: 0.5 g, 胰蛋白胨: 1 g, 把它们倒入装盛有 100 ml ddH<sub>2</sub>O 的烧杯中, 置于磁力搅拌器上均匀搅拌, 然后高压配好的细菌培养基, 紫外照射消毒后放入冰箱 4℃ 内保存备用。

(3) 10%过硫酸铵 (APS) 贮存液: 把 0.5gAPS 和 5 ml ddH<sub>2</sub>O 加入离心管

中，待溶解后分装到套有锡箔纸的的离心管中，接着再放入冰箱-20℃内避光保存备用。

(4) 去掉 EDTA 的胰酶： 2.5 g 胰酶粉和 100ml 高压灭菌的 1 × PBS 溶液混匀后，放 4℃冰箱中备用。

(5) 1×Binding Buffer: 取 1 ml 10×Binding Buffer 和 9 ml ddH<sub>2</sub>O 混匀后，放冰箱 4℃备用。

(6) 5×电泳缓冲液：将 SDS: 5 g, 甘氨酸: 94 g, Tris 碱: 15.15 g, 适量 ddH<sub>2</sub>O 放烧杯中，用磁力搅拌器搅拌至充分溶解，用容量瓶定容至 1000ml，分装好放冰箱 4℃备用。

(7) 10×TBS 缓冲液：将氯化钾: 2 g, Tris 碱: 30 g, 氯化钠: 80 g, 适量双 ddH<sub>2</sub>O 放烧杯中，用磁力搅拌器搅拌至充分溶解后，再加浓 HCL 调节 pH 值至 7.4，然后加入 ddH<sub>2</sub>O 定容至 1000ml，分装好放冰箱 4℃内备用。

(8) 5%的脱脂奶粉：称取 0.25 g 的脱脂奶粉，加入到 5 ml 的 1×TBST 洗脱液中，充分混匀即可。

(9) 一抗稀释液：将 0.01 g NaN<sub>3</sub>, 1 g BSA, 50 ml 1×TBST 洗脱液混匀，放冰箱 4℃内备用。

#### 2.1.4 主要设备和器材

设备和器材	公司
低温高速离心机	德国 Eppendorf 公司 (型号 21R)
倒置相差显微镜	日本 Olympus 公司 (Olympus IX50 型)
细胞培养箱	德国 Thermo 公司
可调式移液器 (各种规格)	德国 Eppendorf 公司
低速离心机	中国白洋医疗器械公司 (型号 BY400C)
电子分析天平	中国赛多利斯有限公司 (型号 BSA224S)
恒温摇床、-20℃及-80℃冰箱	美国 Thermo 公司
荧光定量 PCR 仪	瑞士 Roche 公司
超净工作台	苏州长桥净化设备厂
超纯水分离器	青岛富勒姆公司 (型号 FCR2002-UF)
CYS-1 数字测氧仪	上海嘉定学联仪表厂

设备和器材	公司
制冰机	常熟市雪科电器有限公司
多功能酶标仪	美国 Biotek 公司
电动脱色摇床	金坛市医疗仪器厂
高压灭菌锅	东中泰医疗器械有限公司
漩涡振荡器	常州金坛医疗仪器厂
超净台	苏州净化设备厂
电热鼓风干燥箱	重庆试验设备厂
磁力加热搅拌器	江苏中大仪器厂
水平凝胶电泳槽	美国 pac-300 Bio-Rad 公司
电热隔水式恒温培养箱	上海舍岩仪器有限公司
凝胶成像和分析系统	美国 Gene 公司
BD CANTO 10C 流式仪	美国 BD 公司
蛋白电泳装置	美国 BD 公司
紫外分光光度计	德国 Beckman 公司
八连管、摇菌管、流式玻璃管等	美国 Thermo 公司
细胞培养板、培养皿、培养瓶	美国 Corning 公司

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 AECIIs 培养

(1) AECIIs 复苏: 从液氮罐中取出 AECIIs 冻存管, 放 37℃ 水浴锅摇晃, 待细胞完全融化后 (约 2min), 用 75% 酒精喷洒冻存管外壁进行消毒, 然后把冻存管放在消毒好的超净台内。使用移液枪吸取 AECIIs 悬液至含有血清培养基 10ml 的离心管, 按 1000g/min 离心 5 min, 倒掉上清液, 加入 2ml 培养基再次对细胞进行重悬, 移液枪转移细胞悬液至含有完全培养基的培养皿中, 轻摇使细胞分布均匀。放到 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱进行培养, 待细胞贴壁后更换新鲜含有 10% 血清的细胞培养基。

(2) AECIIs 传代: 用显微镜观察 AECIIs 的生长状态, 当贴壁率达到 85% 左右选择生长好的开始传代。用灭菌 PBS 洗涤 3 次以弃掉培养基, 加入适量胰蛋白酶溶液覆盖培养瓶的底部, 等细胞变圆有少许漂浮后加入适量含有血清的完全培

培养基进行消化。使用移液枪吹打贴壁细胞，尽可能使细胞消化悬浮。用移液枪转移 AECIIs 悬液到灭菌离心管内，再 1000g/min 离心 5 min。然后弃掉上清液，加入培养基 2 ml 重悬，细胞计数器进行细胞计数。取适量细胞悬液接种于另一培养瓶中，待细胞生长良好后备用。由于 AECIIs 在体外培养容易转换为 AECIs，因此本研究一般选用 2-3 代内的细胞用于实验，并采用慢病毒转染 AECIIs 24h 随后高氧暴露 48h 即迅速处理细胞以减少 AECIIs 向 AECIs 转换。

## 2.2.2 pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 及 pcDNA3.1(+)-空质粒瞬时转染

### 2.2.2.1 CHOP -siRNA 序列合成及筛选

在 NCBI 数据库中查找出 human CHOP 基因序列并设计其干扰序列，由上海吉玛制药技术有限公司合成其序列。序列如下：CHOP -siRNA 序列：5'-AAG AAC CAG CAG AGG UCA CAA TT-3'和 5'-UUG UGA CCU CUG CUG GUU CUUTT-3'；阴性对照：5'-AAA UCA UAG CGU AUG GUG CUGTT-3'和 5'-CAG CAC CAU ACG CUA UGA UUUTT-3'，同时筛选出敲低效率最佳的 CHOP -siRNA 序列。

### 2.2.2.2 pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 及 pcDNA3.1(+)-空质粒转染 AECIIs 细胞株

(1) 在转染前 24h 将 AECIIs 细胞株接种于 6 孔培养板中，DMEM-DF12 培养基体积为 2ml (含 10% FBS，不含抗生素)，转染时细胞融合度为 60%-70%。

(2) 分别稀释 4 $\mu$ g 纯化的 CHOP -siRNA、阴性对照序列于 250 $\mu$ l Opti-MEM Reduced Serum Medium 中，轻轻混匀。

(3) 先将 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 轻轻混匀，然后取其 12 $\mu$ l 稀释于 250 $\mu$ l 不含血清的 Opti-MEM Reduced Serum Medium 中并混匀。室温孵育 5 分钟。

(4) 孵育 5 分钟后，分别混合稀释的 CHOP-siRNA、阴性对照序列和 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000。轻轻混匀并于室温下孵育 20 分钟。

(5) 分别把 CHOP-siRNA、阴性对照序列与 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 的混合液加入培养细胞中，再轻轻前后推摇混匀培养板内液体，再将培养板放入备好的细胞培养箱中。

(6) 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵育转染细胞 8h 后，换用新鲜完全培养基继续培养 24h。

## 2.2.3 pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 瞬时转染效果检测

### 2.2.3.1 RT-PCR 检测 CHOP 基因 mRNA 表达

(1) 细胞总 RNA 提取: 吸出细胞培养液后, 用 PBS 缓冲液洗细胞 2 次, 加入 Trizol 1 ml, 室温下裂解细胞 5 分钟, 然后用移液枪将裂解液和氯仿 0.2 ml 放入 EP 管中混匀, 静置 10 分钟, 再 4℃ 下 12000rpm 离心 20 分钟。吸上层水相入干净 EP 管, 加入相同体积异丙醇, 上下颠倒 10 次, -20℃ 下静置 2 小时, 4℃ 条件下 12000rpm 离心 15 分钟。轻轻地用移液枪吸除上清液, 加入预冷的 75% 乙醇, 4℃ 条件下 12000rpm 离心 10 分钟。弃去上清, 倒扣 EP 管, 室温干燥 10 分钟。适量 DEPC 处理水溶解将总 RNA, 最后分光光度计测量 RNA 终浓度。

(2) 合成第一链 cDNA: 按照试剂盒说明书完成以下操作步骤: 在无核酶的冰浴离心管中加入反应混合物如下: 超纯 dNTP2 $\mu$ l、oligo(dT)2 $\mu$ l、总 RNA2 $\mu$ g、再加 RNase-free 双蒸水至 14.5 微升; 70℃ 下加热 5 分钟再用冰冷却 2 分钟。离心后收集反应液加至以下各组: 加 1 $\mu$ l (200U) TIANScript M-MLV, 4 $\mu$ l 5 $\times$ First-strand Buffer (含有 DTT), 0.5 $\mu$ l RNasin 移液枪轻轻吹打混匀。25℃ 条件下温浴离心管 10 分钟; 然后 42℃ 条件下温浴 50 分钟; 最后 95℃ 加热 5 分钟终止反应, 冰上放置冷却后-20℃ 冰箱备用保存。

(3) 荧光定量 PCR 检测 CHOP 基因 mRNA 表达

①CHOP: 正义链 5'-CACTCTTGACCCTGCTTC-3'

反义链 5'-AGTCGCCTCTACTTCCCT-3'

GAPDH: 正义链 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'

反义链 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

②25 $\mu$ l 反应体系:

cDNA	2 $\mu$ l
SuperMix	12.5 $\mu$ l
A 引物	0.5 $\mu$ l
S 引物	0.5 $\mu$ l
assive Reference Dye	0.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	9 $\mu$ l

③设置程序如下:

95℃	3min	
95℃	20s	} 40 个循环
56℃	20s	
72℃	20s	
95℃	15s	
60℃	15s	
60℃-95℃	20min	
95℃	15s	

④Realplex 软件导出数据后处理分析

### 2.2.3.2 Western blot 检测转染后 CHOP 蛋白表达

(1) 配制细胞裂解液: 向基础裂解液中添加 PMSF 蛋白酶抑制剂, 终浓度为 0.2mmol/L。

(2) 蛋白样品的制备: 首先移液枪吸弃六孔板中的细胞培养基。4℃预冷的 PBS 每孔中加入 2 ml, 轻轻晃动 2 分钟洗涤细胞, 然后吸弃 PBS 洗涤液。重复以上操作 2-3 次。接着加入每孔细胞裂解液 100μl 裂解细胞, 转移裂解液至干净灭菌的 EP 管, 冰上裂解 30 分钟, 期间反复抽吸吹打裂解液 10 次。等裂解完后在 4℃条件下 12000rpm 离心 20 分钟。然后移入上清液至灭菌的 1.5ml EP 管中, 即是所需蛋白样品。每个蛋白样品中吸取蛋白提取液 3ul, 转移到新的 EP 管保存备用定量。剩下蛋白样品中加入四分之一体积的缓冲液, 沸水煮至 5 分钟左右, 放 -80℃冰箱保存备用。

(3) 蛋白浓度测定: 根据试剂盒说明书中详细步骤进行实验操作。详细流程如下: 将 0.5μg/μl 的蛋白标准品依次按照 0、1、2、4、8、12、16μl 移入 96 孔板, 接着用细胞裂解液将各孔补足到 20μl 体积。吸取 1μl 的每个样本到 96 孔板样品孔中, 补加 19μl 的细胞裂解液。然后每孔加入 BCA 工作液(BCA 试剂 A: BCA 试剂 B=50:1) 200μl, 37℃条件下放置 30min。用酶标仪 562nm 波长处测定各孔吸光度, 按照标准曲线来测算蛋白浓度。

(4) SDS-PAGE 电泳: 配胶: CHOP (1.5mm 12%分离胶, 5%浓缩胶); 上样: 将制备好的蛋白样品取去, 沸水煮 5min 后, 转速 12000rpm 离心 2min。平



衡各样本之间后, 上样每泳道 45 $\mu$ l 体积。电泳: 60V 跑浓缩胶, 100V 跑分离胶, 当溴酚蓝跑至玻璃板的底端, 结束电泳, 电源关闭。

(5) 转膜: 将裁剪好适当大小的 PVDF 膜浸泡甲醇 2min, 接着把膜海绵垫、滤纸、PVDF 膜放置于转膜夹, 电转液中平衡 30min。打开转膜夹, 铺上一块湿润的海绵垫在代表负极的黑色面, 上面添加两层湿润的滤纸, 在其上方添加电泳完毕的分离胶, 上面再覆盖合适尺寸的 PVDF 膜; 然后再覆盖两层湿润的滤纸, 然后铺上润湿的海绵垫, 最后把转膜夹放入转膜槽中的相应位置。100V 转膜 90 分钟, 转膜的全过程在冰上进行。染料丽春红染色: 转膜完成后, 将膜立刻放入丽春红染液中进行染色, 大约 3 分钟染色后取出膜, 用 ddH<sub>2</sub>O 洗膜至膜上的红色条带足够清晰后停止, 剪下指示蛋白所在范围的膜。再用 ddH<sub>2</sub>O 冲洗, 尽最大可能冲洗残留的丽春红染液。

(6) 转膜后, 将 PVDF 膜迅速放入含 TBST 溶液及 5%奶粉的封闭液中。封闭在 37 $^{\circ}$ C, 60rpm 摇床中 1 h。再用 TBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 将封闭的 PVDF 膜放入一抗 CHOP (1:500),  $\beta$ -actin (1:10000) 中在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育 12 h, 接着拿出 PVDF 膜, 用 TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次, 每次 15 min, 洗掉一抗后, 加入 TBST 稀释过的二抗, 封闭在 37 $^{\circ}$ C, 60rpm 摇床中 1 h, 等二抗孵育结束再用 TBST 清洗 3 次, 每次 5 min, 显示蛋白条带用 ECL 显色液。

(7) ECL 显色及数据分析: 显示蛋白条带用 ECL 显色液完成, 将配置好的显色液均匀滴加到 PVDF 膜上, 用凝胶分析成像系统进行扫描, 以  $\beta$ -actin 为对照, 用 LANE-ID Analyzer 软件分析图像相对定量。

## 2.2.4 高氧细胞损伤建立及分组

### 2.2.4.1 高氧细胞损伤模型建立

取生长好的 AECIIs 接种到培养瓶, 等细胞基本贴壁后 (一般培育 15 小时左右), 吸弃培养液。加入 DMEM/F12 完全培养基 (含有 10% 血清), 5 ml/瓶, 保证各瓶细胞数量相当。随机分为高氧组、空气组。通入 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 混合气体在高氧组的培养瓶中, 保证通气的流速为 3 L/min, 持续 10 分钟后立即密封培养瓶。而空气组不添加任何刺激。均置两组细胞于 37 $^{\circ}$ C 条件下的 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。分别培养 24 小时、48 小时、72 小时, 每隔 24 h 更换一次培养基和通入高氧混合气体, CYS-1 测氧仪监测高氧组氧含量, 小于 90% O<sub>2</sub> 的培养瓶弃

去，收获各组细胞备检。

#### 2.2.4.2 AECII<sub>s</sub> 细胞的分组

取生长良好的 AECII<sub>s</sub> 接种至培养瓶中，等细胞基本贴壁后（一般培育 15 小时左右），吸弃培养瓶中的培养液，接着用灭菌的 PBS 缓冲液冲洗至少 3 次，然后加入含有 10% 血清的 RPMI1640 培养基，保持体积为 5 ml/瓶。随机分为：空气组、空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组、空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组、高氧组、高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组、高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组。打开通气装置，向高氧组培养瓶通入 5%CO<sub>2</sub> 和 95%O<sub>2</sub> 混合气体，保证通气的流速为 3 L/min，持续 10 分钟后立即密封培养瓶。而空气组不添加任何刺激。各组细胞均放入 37℃ 条件下的 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中。接着培养 24 小时、48 小时、72 小时，注意每 24 小时更换一次培养基，并在高氧组中再次通入 5%CO<sub>2</sub> 和 95%O<sub>2</sub> 混合气体。CYS-1 测氧仪监测高氧组氧含量，低于 90% O<sub>2</sub> 的培养瓶弃去，收获各组细胞备测。

#### 2.2.5 倒置相差显微镜观察 AECII<sub>s</sub> 形态

#### 2.2.6 RT-PCR 检测各组细胞 CHOP、Bcl-2 及 Bax mRNA 表达

2.2.6.1 总 RNA 的提取：同前 2.2.3.1（1）。

2.2.6.2 第一链 cDNA 的合成：同前 2.2.3.1（2）。

#### 2.2.6.3 RT-PCR 检测 CHOP、Bcl-2、Bax 基因 mRNA 表达

引物序列如下：

(1) CHOP: 正义链 5'-CACTCTTGACCCTGCTTC-3'

反义链 5'-AGTCGCCTCTACTTCCCT-3'

(2) Bcl-2: 正义链 5'-TCCAATCCTGTGCTGCTA-3'

Bcl-2: 反义链 5'-ACTCTGTGAATCCCGTTT-3'

(3) Bax: 正义链 5'-TTTTGCTTCAGGGTTTCATC-3'

Bax: 反义链 5'-GACACTCGCTCAGCTTCTTG-3'

(4) GAPDH: 正义链 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'

GAPDH 反义链 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

其他具体操作步骤同前 2.2.3.1。

#### 2.2.7 Western blot 检测各组细胞 CHOP、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达

具体操作步骤同前 2.2.3.2。

## 2.2.8 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测各组细胞凋亡

按照流式试剂盒说明书操作如下：

(1) PBS 洗细胞 3 次，去除 PBS，再加入胰酶（不含 EDTA）消化细胞，等细胞变圆，再加入血清培养基中和，移液枪吹打后，吸取细胞悬液入离心管，每样本细胞数为  $1 \times 10^6$ ，在 1200rpm 下离心 5min，去掉培养液。

(2) PBS 洗 2 次细胞，再 1200rpm 下离心 5min。

(3) 用 500 $\mu$ l 终浓度为 1 $\mu$ g/ml Annexin V-FITC 和 PI 标记液重悬细胞，避光室温孵育持续 15min。

(4) 孵育结束，将  $1 \times$ BindingBuffer400  $\mu$ l 加进混悬液中，摇匀。1h 内进行检测。

(5) 流式细胞仪分析：流式细胞仪激发光波长用 488nm，FITC 荧光检测波长用 515nm，PI 检测波长用大于 560nm。数据处理及分析。

## 2.3 统计学分析

采用 Graphpad prism 8.02 统计软件对所得数据进行统计分析，所有计量资料采用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，单因素方差分析比较多组间均数，SNK-*q* 检验进行组间两两比较，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2.4 实验结果

### 2.4.1 pcDNA3.1(+)-空质粒及 pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 转染结果

采用 Lipofectamine2000 脂质体转染法，对 AECIIs 细胞进行 CHOP-siRNA 及空质粒瞬时转染，运用 RT-PCR 及 Western blot 法检测各组 CHOP 的表达情况。结果如图 2.1 和图 2.2 所示，与对照组相比，转染 pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 的 AECIIs 细胞中 CHOP 基因 mRNA 及蛋白表达水平显著降低，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。说明 CHOP-siRNA 下调了 CHOP 的表达。

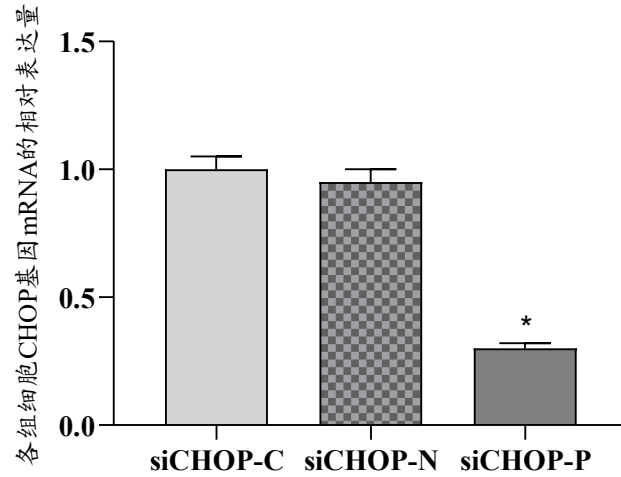


图 2.1 RT-PCR 检测各组细胞 CHOP 基因 mRNA 的相对表达量  
 siCHOP-C:空白对照, siCHOP-N:阴性对照, siCHOP-P: CHOP-siRNA  
 注: 与对照组相比\* $P < 0.05$ 。

Figure 2.1 Relative expression of CHOP mRNA with RT-PCR in each group  
 siCHOP-C: control group, siCHOP-N: pcDNA3.1(+)-empty group, siCHOP-P: pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group.  
 \* $P < 0.05$  compared with the control group or the pcDNA3.1(+)-empty group

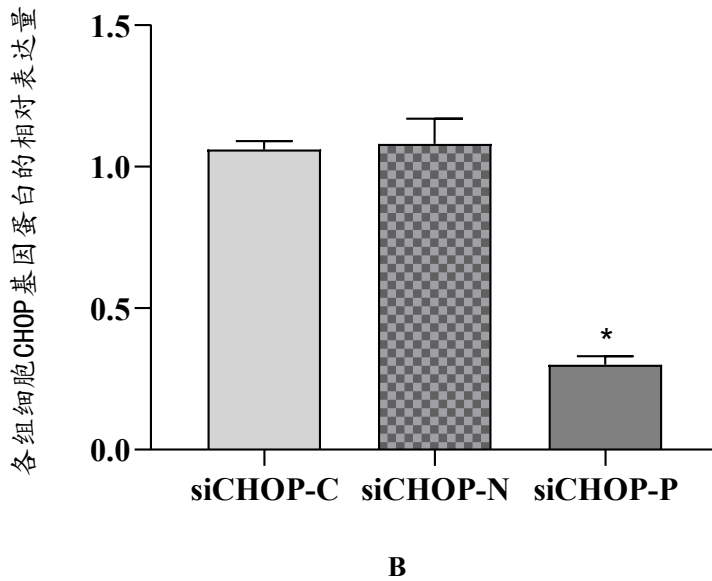
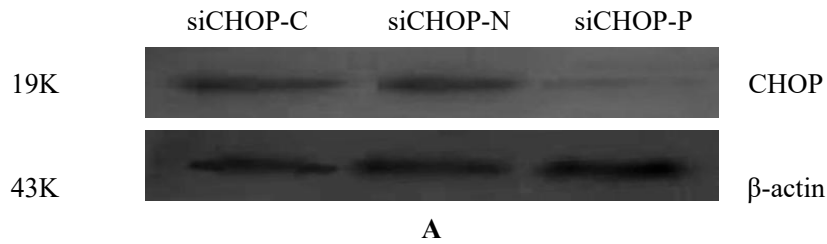


图 2.2 Western blot 法检测各组细胞 CHOP 基因蛋白的相对表达量  
 A: Western blot 法检测各组细胞 CHOP 基因蛋白; B: A 的统计分析图  
 siCHOP-C:空白对照, siCHOP-N:阴性对照, siCHOP-P: CHOP-siRNA

注：与对照组相比\* $P < 0.05$ 。

Figure 2.2 Relative expression of CHOP protein with Western blot in each group

A: Expression of CHOP protein with Western blot in each group; B: statistical analysis diagram of A.

siCHOP-C: control group, siCHOP-N: pcDNA3.1(+)-empty group, siCHOP-P: pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group.

\* $P < 0.05$  compared with the control group or the pcDNA3.1(+)-empty group.

#### 2.4.2 倒置相差显微镜观察 AECIIs 形态

应用倒置相差显微镜观察 CHOP 沉默对细胞形态的影响，结果如图 2.3，发现空气组 AECIIs 伸出较多伪足，紧贴于瓶底，呈岛状生长方式；空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组及空气+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组细胞形态与空气组相比无显著差异；与空气组相比，高氧组 AECIIs 伸展肥大明显，细胞贴壁不紧，伪足减少，核仁减少或消失，培养液中悬浮细胞数增加，少数细胞出现空泡改变；高氧+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组细胞形态较空气组稍有伸展肥大，但较高氧组细胞伸展程度变小，悬浮细胞数减少，且细胞无空泡改变。提示 CHOP 沉默可能减轻高氧对细胞形态异常的影响。

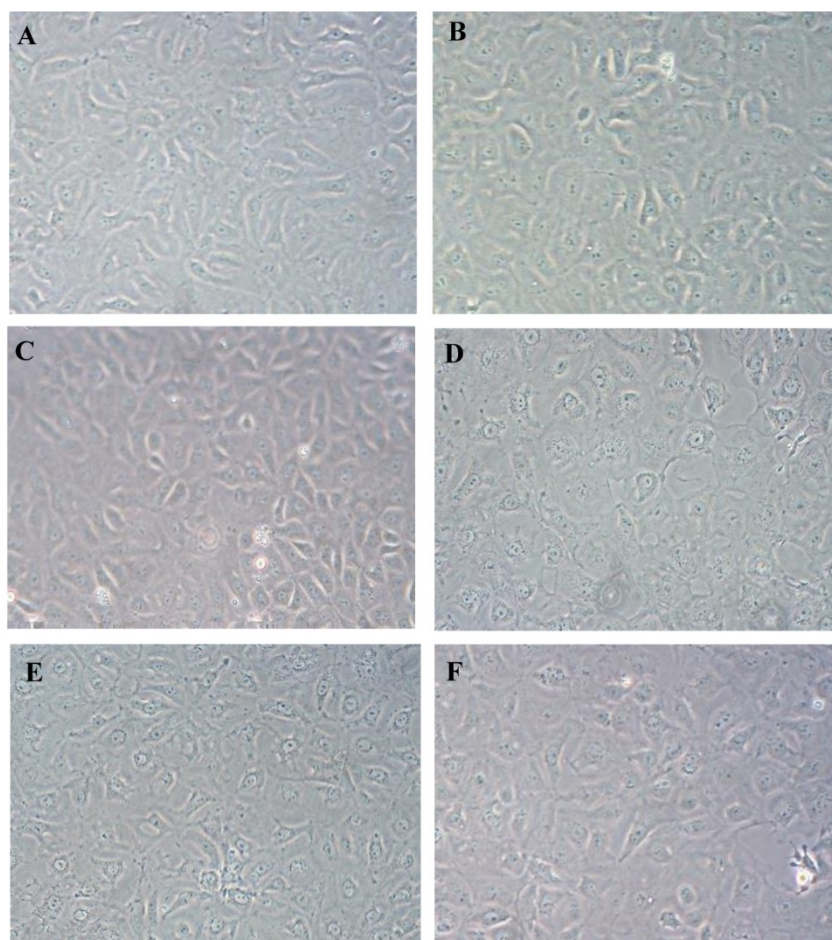


图 2.3 倒置相差显微镜观察 AECIIs 生长状况

A.空气组 B.空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组 C.空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 D.

高氧组 E.高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 F.高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组。

Figure 2.3 Observation of AECII's growth conditions by inverted phase contrast microscope

A.air group B.air+pcDNA3.1(+)-empty plasmid group C.air + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group  
D. hyperoxia group E. hyperoxia + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group  
F. hyperoxia+ pcDNA3.1(+)-empty plasmid group.

### 2.4.3 CHOP-siRNA 对 CHOP 基因 mRNA 及蛋白表达的影响

为分析 CHOP-siRNA 对 CHOP 基因表达的影响,在高氧暴露及 CHOP-siRNA 转染后,我们采用 RT-PCR 及 Western blot 法检测各组 AECII's 中 CHOP 基因 mRNA 及蛋白的表达情况,结果如图 2.4、图 2.5 所示,与空气组相比,空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组及空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 CHOP 基因 mRNA 及蛋白表达均无显著差异,  $P$  均 $>0.05$ ;与空气组相比,高氧组 CHOP 基因 mRNA 及蛋白表达明显增加,差异有统计学意义,  $P<0.05$ ;与高氧组相比,高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组 CHOP 基因 mRNA 及蛋白表达无显著差异,  $P>0.05$ ;与高氧组相比,高氧+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 CHOP 基因 mRNA 及蛋白表达水平显著降低,差异有统计学意义,  $P<0.05$ 。上述结果提示 CHOP-siRNA 可沉默高氧诱导的 CHOP 基因 mRNA 及蛋白的表达。

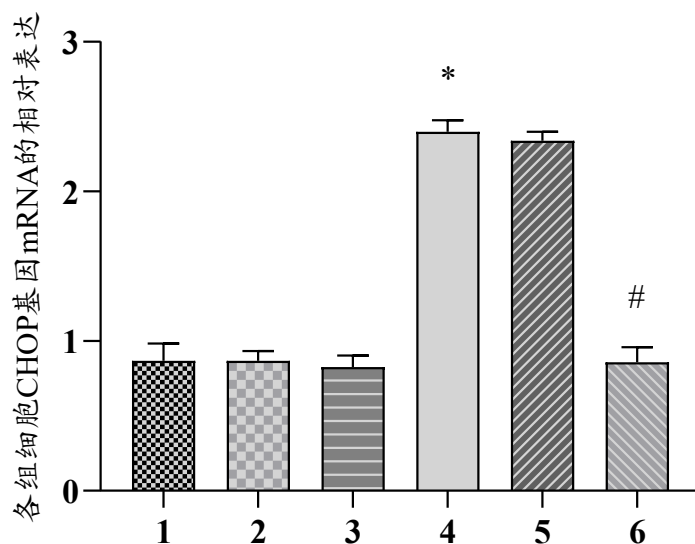


图 2.4 RT-PCR 检测各组细胞 CHOP 基因 mRNA 的相对表达

1 空气组; 2 空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 3 空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组;  
4 高氧组; 5 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 6 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组。

注: 与空气组相比\* $P<0.05$ ; 与高氧组相比# $P<0.05$ 。

Figure 2.4 Relative expression of CHOP mRNA with RT-PCR in each group

1.air group 2.air+pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 3.air + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA

group 4. hyperoxia group 5. hyperoxia+ pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 6. hyperoxia + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group.

\* $P < 0.05$  compared with the air group; # $P < 0.05$  compared with the hyperoxia group.

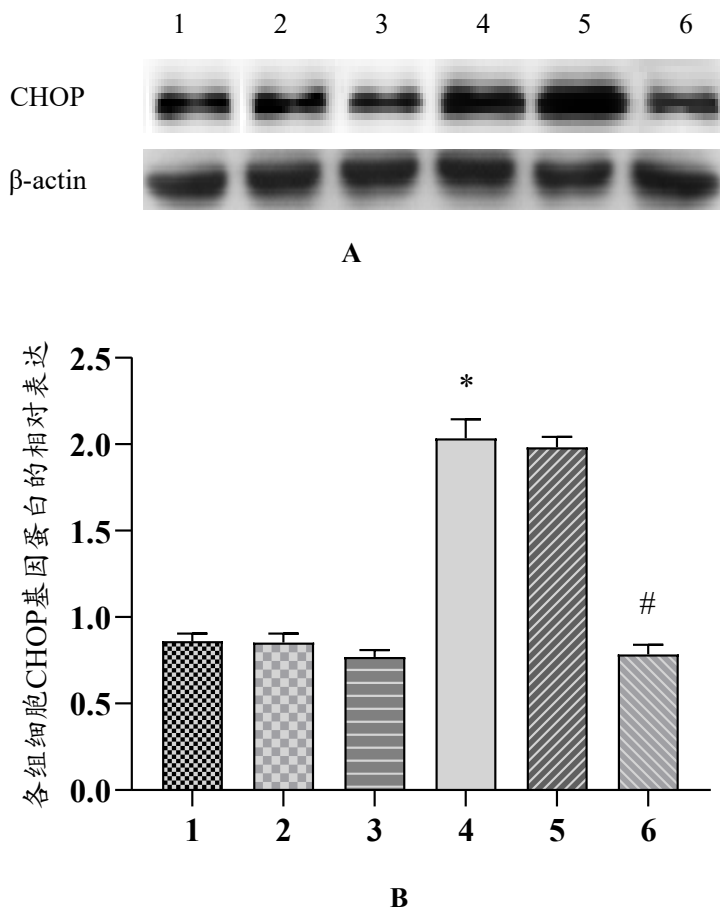


图 2.5 Western blot 法检测各组细胞 CHOP 基因蛋白的相对表达

A: Western blot 法检测各组细胞 CHOP 基因蛋白; B: A 的统计分析图

1 空气组; 2 空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 3 空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组;  
4 高氧组; 5 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 6 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组。

注: 与空气组相比\* $P < 0.05$ ; 与高氧组相比# $P < 0.05$ 。

Figure 2.5: Relative expression of CHOP protein with Western blot in each group

A: Expression of CHOP protein with Western blot in each group; B: statistical analysis diagram of A

1.air group 2.air+pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 3.air+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group 4. hyperoxia group 5. hyperoxia+ pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 6. hyperoxia + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group.

\* $P < 0.05$  compared with the air group; # $P < 0.05$  compared with the hyperoxia group.

#### 2.4.4 CHOP-siRNA 对 Bcl-2 基因 mRNA 及蛋白表达的影响

为分析 CHOP-siRNA 对高氧条件下细胞凋亡相关基因 Bcl-2 的表达影响, 在



高氧暴露及 CHOP-siRNA 转染后, 我们采用 RT-PCR 及 Western blot 法检测各组 AECIIs 中 Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达情况, 结果如图 2.6、图 2.7 所示, 与空气组相比, 空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组及空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 Bcl-2 基因 mRNA 及蛋白表达均无显著差异,  $P$  均 $>0.05$ ; 与空气组相比, 高氧组 Bcl-2 mRNA 及蛋白表达明显减少, 差异有统计学意义,  $P<0.05$ ; 与高氧组相比, 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组 Bcl-2 基因 mRNA 及蛋白表达无显著差异,  $P>0.05$ ; 与高氧组相比, 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 Bcl-2 基因 mRNA 及蛋白表达明显增加, 差异有统计学意义,  $P<0.05$ 。这一结果提示 CHOP 沉默可能增加高氧诱导的细胞凋亡相关基因 Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达。

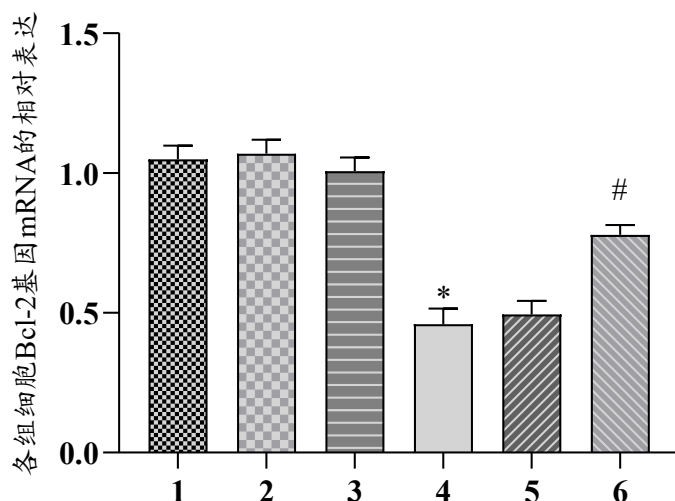


图 2.6 RT-PCR 检测各组细胞 Bcl-2 基因 mRNA 的相对表达

1 空气组; 2 空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 3 空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组;  
4 高氧组; 5 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 6 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组。

注: 与空气组相比\* $P<0.05$ ; 与高氧组相比# $P<0.05$ 。

Figure 2.6 Relative expression of Bcl-2 mRNA with RT-PCR in each group

1.air group 2.air+pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 3.air + pcDNA3.1(+)-CHOP -siRNA group

4. hyperoxia group 5. hyperoxia+ pcDNA3.1(+)-empty plasmid group

6. hyperoxia + pcDNA3.1(+)-CHOP -siRNA group.

\* $P<0.05$  compared with the air group; # $P<0.05$  compared with the hyperoxia group.



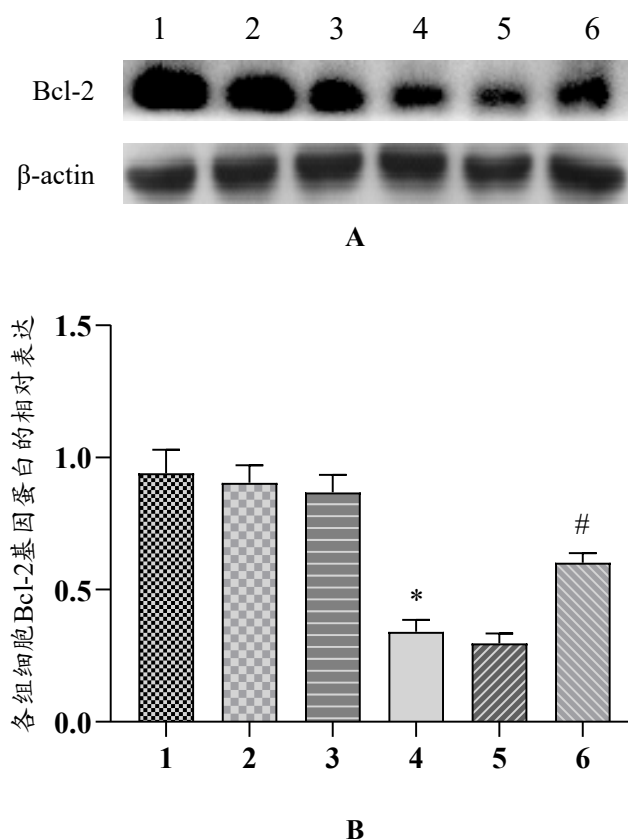


图 2.7 Western blot 法检测各组细胞 Bcl-2 基因蛋白的相对表达

A: Western blot 法检测各组细胞 Bcl-2 基因蛋白; B: A 的统计分析图

1 空气组; 2 空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 3 空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组;  
4 高氧组; 5 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 6 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组。

注: 与空气组相比\* $P < 0.05$ ; 与高氧组相比# $P < 0.05$ 。

Figure 2.7 Relative expression of Bcl-2 protein with Western blot in each group

A: Expression of Bcl-2 protein with Western blot in each group; B: statistical analysis diagram of A

1. air group 2. air+pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 3. air + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group  
4. hyperoxia group 5. hyperoxia+ pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 6. hyperoxia +  
pcDNA3.1(+)-CHOP -siRNA group

\* $P < 0.05$  compared with the air group; # $P < 0.05$  compared with the hyperoxia group.

#### 2.4.5 CHOP-siRNA 对 Bax 基因 mRNA 及蛋白表达的影响

为分析 CHOP-siRNA 对高氧条件下细胞凋亡相关基因 Bax 表达的影响, 在高氧暴露及 CHOP-siRNA 转染后, 我们采用 RT-PCR 及 Western blot 法检测各组 AECIIs 中 Bax 基因 mRNA 及蛋白的表达情况, 结果如图 2.8、图 2.9 所示, 与空气组相比, 空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组及空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 Bax 基因 mRNA 及蛋白表达均无显著差异,  $P$  均 $>0.05$ ; 与空气组相比, 高氧组 Bax 基因 mRNA 及蛋白表达增加, 差异有统计学意义,  $P < 0.05$ ; 与高氧组相比,

高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组 Bax 基因 mRNA 及蛋白表达无显著差异,  $P>0.05$ ; 与高氧组相比, 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 Bax 基因 mRNA 及蛋白表达减少, 差异有统计学意义,  $P<0.05$ 。上述结果提示 CHOP 沉默可能减少高氧诱导的细胞凋亡相关基因 Bax 基因 mRNA 及蛋白的表达。

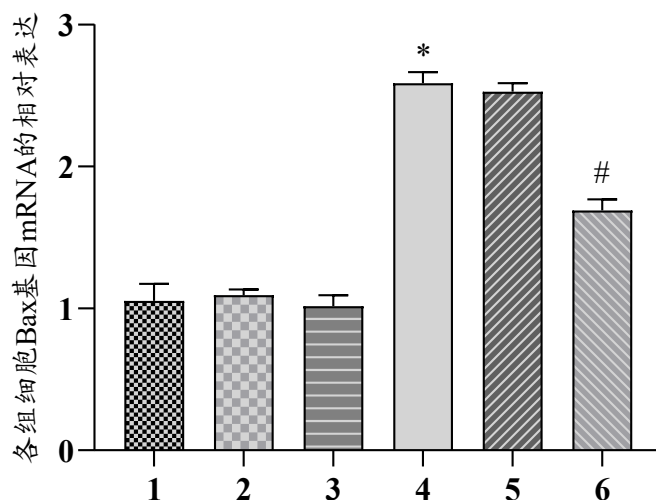


图 2.8 RT-PCR 检测各组细胞 Bax 基因 mRNA 的相对表达

1 空气组; 2 空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 3 空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组; 4 高氧组; 5 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 6 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组。

注: 与空气组相比\* $P<0.05$ ; 与高氧组相比# $P<0.05$ 。

Figure 2.8 Relative expression of Bax mRNA with RT-PCR in each group

1.air group 2.air+pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 3.air + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group 4. hyperoxia group 5. hyperoxia+ pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 6. hyperoxia + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group.

\* $P<0.05$  compared with the air group; # $P<0.05$  compared with the hyperoxia group.

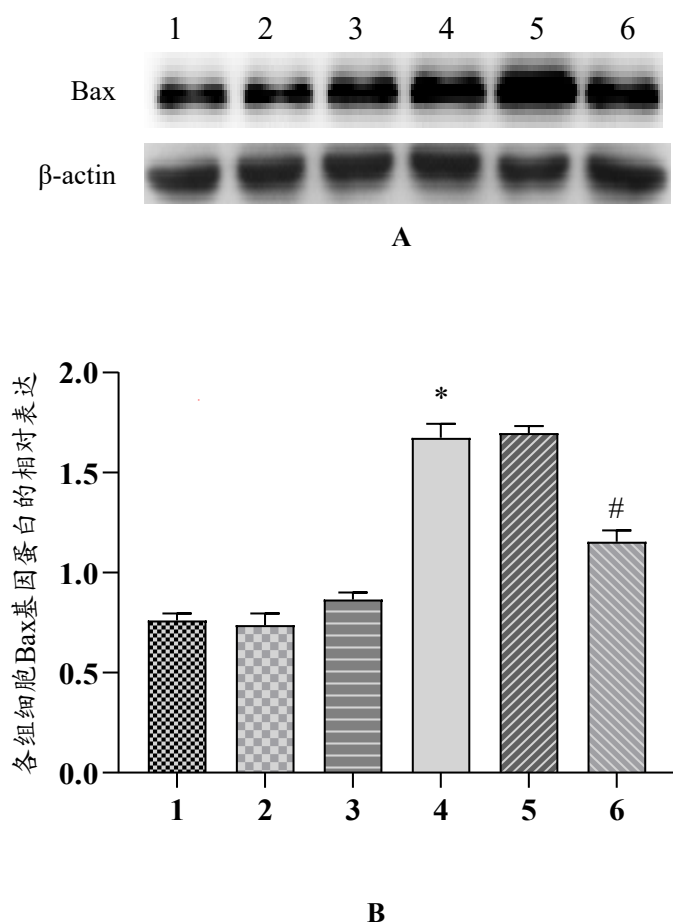


图 2.9: Western blot 法检测各组细胞 Bax 基因蛋白的相对表达

A: Western blot 法检测各组细胞 Bax 基因蛋白; B: A 的统计分析图

1 空气组; 2 空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 3 空气+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组;  
4 高氧组; 5 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组; 6 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组。

注: 与空气组相比\* $P < 0.05$ ; 与高氧组相比# $P < 0.05$ 。

Figure 2.9: Relative expression of Bax protein with Western blot in each group

A: Expression of Bax protein with Western blot in each group; B: statistical analysis diagram of A

1. air group 2. air+pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 3. air+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group 4. hyperoxia group 5. hyperoxia+ pcDNA3.1(+)-empty plasmid group 6. hyperoxia + pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA group.

\* $P < 0.05$  compared with the air group; # $P < 0.05$  compared with the hyperoxia group.

#### 2.4.6 流式细胞术检测 CHOP 沉默对细胞早期凋亡的影响

为分析 CHOP 沉默对细胞早期凋亡的影响, 在高氧暴露及 CHOP-siRNA 转染后, 我们采用 Annexin V/PI 双染法, 经流式细胞仪分析各组 AECIIs 中细胞早期凋亡情况, 结果如图 2.10 及表 2.1 所示, 与空气组相比, 空气+ pcDNA3.1(+)-空质粒组及空气+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 AECIIs 凋亡均无显著差异,  $P$

均>0.05；与空气组相比，高氧组及高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 AECIIs 凋亡明显增加，差异均有统计学意义，*P* 均<0.05；与高氧组相比，高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组 AECIIs 凋亡无显著差异，*P* 均>0.05；与高氧组相比，高氧+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组 AECIIs 凋亡明显减少，差异有统计学意义，*P*<0.05。上述结果说明 CHOP 沉默虽然不能完全阻断但是能够明显减少高氧诱导的细胞早期凋亡。

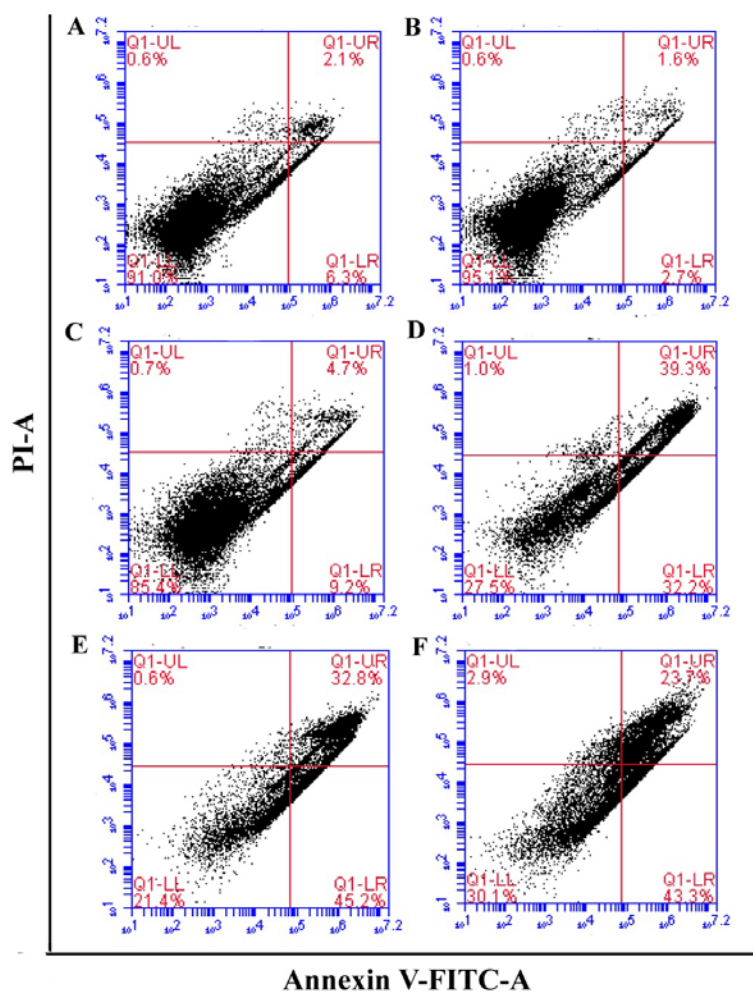


图 2.10: Annexin V/PI 双染法检测各组 AECIIs 的凋亡情况

A 空气组、B 空气组+ pcDNA3.1(+)-空质粒组、C 空气组+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组、D 高氧组、E 高氧+ pcDNA3.1(+)-空质粒组、F 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组

Figure 2.10: Detection of AECIIs apoptosis with Annexin V/PI double staining in each group

A. air group B.air+pcDNA3.1(+)-empty plasmid group C.air + pcDNA3.1(+)-CHOP -siRNA group D. hyperoxia group E. hyperoxia+ pcDNA3.1(+)-empty plasmid group F. hyperoxia + pcDNA3.1(+)-CHOP -siRNA group.

表 2.1 Annexin V/PI 双染法检测各组 AEC II s 的凋亡情况

Table 2.1 Detection of AECIIs apoptosis with Annexin V/PI double staining in each group

组别	凋亡率
空气组	4.51±0.34
空气+pcDNA3.1(+)-空质粒组	4.79±0.43
空气+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组	4.92±0.31
高氧组	39.42±1.96*
高氧+pcDNA3.1(+)-空质粒组	32.55±2.72
高氧+pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组	20.15±1.09 <sup>#</sup> *

注：与空气组相比\* $P<0.05$ ；与高氧组相比<sup>#</sup> $P<0.05$ 。\* $P<0.05$  compared with the air group; <sup>#</sup> $P<0.05$  compared with the hyperoxia group.

## 2.5 讨论

肺上皮细胞 (ACEs) 是各种肺部疾病的基本位点。ACEs 凋亡是各种肺部疾病的重大事件。研究认为, 细胞凋亡途径主要有三种: (1) 线粒体通路, 即由传染源、药物、活性氧等应激源激活的线粒体凋亡途径<sup>[25]</sup>; (2) 死亡受体通路, 即与死亡受体结合激活 caspase 级联诱发细胞凋亡; (3) 内质网应激反应通路。而内质网应激反应通路是细胞凋亡比较新颖及重要的通路, 是近期研究的热点。

目前认为, 内质网应激反应通路主要通过 CHOP、JNK、caspase-12 三条信号通路参与调控细胞的凋亡<sup>[17,26]</sup>, 而 CHOP 通路是内质网应激反应引起的细胞凋亡较重要的信号途径。正常下, 胞质中 CHOP 表达量很低, 但在 ERS 时却大量表达, 并转移到细胞核内, CHOP 能反映 ERS 介导的细胞凋亡水平, 是 ERS 的标志蛋白<sup>[27]</sup>。而高表达的 CHOP 可促进细胞凋亡<sup>[28]</sup>。有研究提示, 高氧肺损伤中可见 CHOP 的表达, 且与肺细胞凋亡指数呈正相关<sup>[29]</sup>。本实验通过设计合成靶向 CHOP 基因的 siRNA 碱基序列, 再瞬时转染 AEC II s 细胞, 通过实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测 CHOP-siRNA 转染效果, 倒置相差显微镜观察 AECIIs 细胞形态, Annexin V/PI 双染流式细胞术检测 AECIIs 细胞凋亡, RT-PCR 及 Western blot 方法检测 CHOP 基因、Bcl-2 及 Bax 表达水平, 研究阻断内源性 CHOP 表达对高氧暴露 AECIIs 凋亡的影响。结果发现, 与空气组相比, 高氧组 AECIIs 伸展肥大明显, 细胞贴壁不紧, 伪足减少, 核仁减少或消失, 悬浮细胞数增加, 少数细胞出现空泡改变, 从细胞形态学上提示高氧暴露可能对 AECIIs 细胞有损伤作用; 而阻断内源性 CHOP 表达后, 高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组细胞形态与高氧组比较, 细胞伸展程度变小, 悬浮细胞数减少, 且细胞无空泡

改变,从形态学上提示阻断内源性 CHOP 表达可能对高氧暴露的 AECIIs 具有保护作用。Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡发现,与空气组相比,高氧组 AECIIs 凋亡明显增加,提示高氧可以导致 AECIIs 凋亡增加;AECIIs 转染 CHOP-siRNA 后,高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组与高氧组相比 AECIIs 凋亡明显减少;而高氧+ pcDNA3.1(+)-CHOP-siRNA 组与空气组比较细胞凋亡还是有明显增加,提示阻断 CHOP 后能减少高氧诱导的内质网应激导致的细胞凋亡,但是却不能完全阻止细胞凋亡,进一步提示可能还有其他的凋亡因子及途径参与了细胞凋亡。而 CHOP 调节 ER 介导的凋亡反应最敏感,能反映 ER 介导的细胞凋亡的水平<sup>[30]</sup>。有研究发现<sup>[31]</sup>,沉默 CHOP 基因可以减轻衣霉素诱导的内质网应激诱发的 Hepa 1-6 细胞凋亡,进一步提示沉默 CHOP 能减少细胞凋亡,发挥保护作用。

多种基因参与了细胞凋亡的调控,这些基因在种属之间非常保守<sup>[32]</sup>。Bcl-2 蛋白家族是目前被研究最多的一个细胞凋亡基因家族<sup>[33]</sup>,Bcl-2 蛋白家族有众多成员,可分为抗凋亡蛋白代表 Bcl-xL 和 Bcl-2 等和促凋亡蛋白代表 Bax 和 Bak 等。在不同的细胞类型中,Bcl-2 定位于线粒体、核膜或内质网上,可遏制线粒体释放细胞色素 C 来抗凋亡;当定位于内质网膜上时能影响内质网的稳态,它的过量表达可以抑制 ERS 诱发的细胞凋亡,另外,过量的 Bcl-2 导致核内 GSH 聚集,进而破坏氧化还原平衡,最终 Caspase 的活性降低而抗凋亡。Bax 为促凋亡基因,Bax 的减少可保护由 ERS 诱发的细胞凋亡。

目前 CHOP 介导细胞凋亡的机制考虑与诱导氧化应激,抑制 Bcl-2 表达有关<sup>[34]</sup>。本研究发现,AECIIs 高氧暴露后 Bcl-2 基因 mRNA 及蛋白减少,Bax 基因 mRNA 及蛋白表达增加,阻断 CHOP 基因表达后,Bcl-2 基因 mRNA 及蛋白增加,Bax 基因 mRNA 及蛋白表达减少,提示 AECIIs 高氧暴露后,阻断 CHOP 有细胞保护作用。

有研究发现<sup>[35]</sup>,ER 应激也可以通过 UPR 来活化 CHOP 蛋白,从而增加 Bak/Bax 表达,降低 Bcl-2 表达;此外,大量表达的 CHOP 可促使 Bak/Bax 构象改变并进入线粒体,进而破坏 ER 完整性,促使 Ca<sup>2+</sup>外流<sup>[36]</sup>,而当 Ca<sup>2+</sup>浓度过高时,氧化剂、促凋亡蛋白 Bax 等物质刺激线粒体外膜渗透性过渡孔隙 (mitochondrial permeability transition pore, mPTP)受体,导致 mPTP 孔长时间开



放,大量的溶质和水进入线粒体基质,打破渗透压平衡性而引起基质肿胀最终外膜破裂,从线粒体释放凋亡诱导因子、细胞色素 C(Cytochrome C, CytC)等, CytC 最终可以激活 Caspase-9 酶原导致 Caspase-9 活化,活化的 Caspase-9 又可激活下游的 Caspase-7、Caspase-3 等,最终启动 Caspase 的级联反应<sup>[37]</sup>,另外 Bcl-2 蛋白降低会促使线粒体对促凋亡因子更敏感<sup>[38,39]</sup>,导致线粒体释放胱抑素 C 到胞质中。另高浓度的  $Ca^{2+}$ 通过激活钙蛋白酶原最终导致 caspase-12 激活, caspase-12 活化后会激活 Caspase-9 酶原,从而启动 Caspase 级联<sup>[40,41]</sup>,这提示 CHOP 介导的细胞凋亡信号最终进入线粒体内进行整合及放大并诱发细胞凋亡<sup>[42]</sup>。

总之,在内质网应激介导细胞凋亡中CHOP发挥着重要的作用,作为ERS途径的中间信号分子,CHOP可广泛调控其下游蛋白的表达与作用,进一步研究CHOP及其相关因子的相互作用及致病机制,以及相应的研发更多的基因沉默技术和相关抑制剂,阻断细胞凋亡相关因子及通路对高氧细胞损伤如BPD的预防具有重大意义,可作为其潜在的治疗靶点之一。本研究发现敲低CHOP后只能减轻高氧诱导的肺泡上皮细胞凋亡,但并不能阻止肺泡上皮细胞凋亡,进一步提示CHOP通路可能并不是细胞凋亡唯一的通路。参与调控细胞凋亡的因子还很多,调控凋亡机制也很复杂,都还需要我们进行更深入的研究。本次研究尚具有一定的局限性,首先只采用了一种来源的AECIIs细胞株从体外细胞模型进行初步探讨,如在今后的研究中能采用2种或以上来源的AECIIs细胞株并同时增加体内动物模型支撑进行更深入的研究可能更具有说服力;其次本次研究只做了敲低研究,在今后的研究中可以同时增加过表达实验以提高研究的可信度;再次本次研究测量指标偏少,仅对细胞凋亡的CHOP通路做了一定的探讨,可以在以后的研究中增加一些测量指标,并对相应的测量指标进行多项检测以提高可信度,如对凋亡指标进行检测时可以采用Annexin V/PI双染流式细胞术和Tunel检测相结合的方法,最后本次实验siRNA对照组只做了空白和空质粒对照组,以后可以增加si-NS序列其他质粒对照,从而对细胞凋亡的信号通路及相关机制做更深入的研究。

### 第三章 结论

(1) 高氧可导致 AECIIs 凋亡增加, CHOP 表达增加, 抗凋亡基因 Bcl-2 减少, 促凋亡基因 Bax 增加, 提示高表达的 CHOP 可通过下调抗凋亡基因 Bcl-2 表达及促进促凋亡基因 Bax 的表达, 最终导致细胞凋亡增加。

(2) AECIIs 在转染 CHOP-siRNA 阻断 CHOP 表达及高氧暴露后, 抗凋亡基因 Bcl-2 表达增加, 促凋亡基因 Bax 表达减少, AECIIs 凋亡减少。说明利用基因沉默技术特异性阻断 CHOP 表达后可以减轻高氧诱导的 AECIIs 凋亡, 对高氧肺损伤性疾病如 BPD 起到保护作用。



## 参 考 文 献

- [1] 佚名. 肺泡上皮细胞在高氧急性肺损伤中的作用研究[J]. 西南师范大学学报(自然科学版),2018,43(5).
- [2] 杨雨晨,毛健,李娟. 早产儿支气管肺发育不良的药物治疗研究进展[J]. 中国当代儿科杂志,2018,20(1):67-71.
- [3] 陈国兵,许峰,卢仲毅. 水通道蛋白在高浓度氧肺损伤中的研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志,2004,19(10):888-890.
- [4] 张喆,曹大伟,张新日. 高氧肺损伤机制研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2018,38(6):461.
- [5] 石晶. 糖皮质激素疗法防治支气管肺发育不良研究进展[J]. 中华实用儿科临床杂志,2018,33(2):85.
- [6] 李方治,侯春阳,孙佳英. 急性肺损伤炎症环境中 TNF- $\alpha$  介导肺通透性增加的机制研究[J]. 临床和实验医学杂志,2017,16(19):1914-1918.
- [7] 丁璐,吴本清,黄进洁,等. 促红细胞生成素对新生大鼠高氧肺损伤细胞凋亡的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2010,12(7):576-579.
- [8] 付红敏,许峰,黄波,等. 高氧暴露对早产鼠 AECII 生长增殖的影响及 CGRP 的干预作用[J]. 医学争鸣,2009(5):389-392.
- [9] 何新飙. 高浓度氧诱发急性肺损伤发病机制的探讨[J]. 天津医药,2008,36(12):965-966.
- [10] 徐凤丹,王优,吴文燊,等. 高氧暴露对新生小鼠肺部炎性反应及纤维化的影响[J]. 中国医药导报,2017,14(26):21-24.
- [11] Korfei M,Ruppert C,Mahavadi P,et al. Epithelial Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Sporadic Idiopathic Pulmonary Fibrosis[J]. Am J Respir Crit Care Med,2008,178(8):838-846.
- [12] Xi GY,Wang ZT,Dong TL,et al. Effects of dexmedetomidine on cell apoptosis and CHOP in lung injury following one-lung ventilation in rats[J]. Journal of Clinical Anesthesiology,2015,31(2):184-188.
- [13] Bridges JP,Wert SE,Nogee LM,et al. Expression of a Human Surfactant Protein C Mutation Associated with Interstitial Lung Disease Disrupts Lung Development

- in Transgenic Mice[J]. *Journal of Biological Chemistry*,2003, 278(52):52739-52746.
- [14] Khan S,Zafar A,Naseem I. Copper-redox cycling by coumarin-di (2-picolyl) amine hybrid molecule leads to ROS-mediated DNA damage and apoptosis: A mechanism for cancer chemoprevention.[J]. *Chemico-biological interactions*, 2018,25(290):64-76.
- [15] Chen CM,Wu CT,Chiang CK,et al. C/EBP Homologous Protein (CHOP) Deficiency Aggravates Hippocampal Cell Apoptosis and Impairs Memory Performance[J]. *Plos One*,2012,7(7):e40801.
- [16] Kadowaki H,Nishitoh H,Ichijo H. Survival and apoptosis signals in ERS: the role of protein kinases[J]. *J Chem Neuroanat*,2004,28(1-2): 93-100.
- [17] Sovolyova N,Healy S,Samali A,et al. Stressed to death-mechanisms of ER stress-induced cell death[J]. *Biol Chem*,2014,395(1): 1-13.
- [18] Wang F,Fu X,Wu X,et al. Bone marrow derived M2 macrophages protected against lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibiting oxidative stress and inflammation by modulating neutrophils and T lymphocytes responses.[J]. *International Immunopharmacology*,2018,61:162.
- [19] 高楚楚,卢红艳,唐炜. 支气管肺发育不良大鼠肺 GRP78 及 CHOP 表达与肺细胞凋亡的关系[J]. *临床儿科杂志*,2013(10):959-963.
- [20] 卢红艳,张婷,王秋霞,等. 内质网应激相关的蛋白激酶 R 样内质网激酶-转录活化因子 4-CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白通路参与支气管肺发育不良大鼠肺细胞凋亡[J]. *中华实用儿科临床杂志*,2015,30(4):305-309.
- [21] Lakshmanan AP,Thandavarayan RA,Palaniyandi SS,et al. Modulation of AT-1R/CHOP-JNK-Caspase12 pathway by olmesartan treatment attenuates ER stress-induced renal apoptosis in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*,2011,44(5):627-634.
- [22] Chen Y,Gui D,Chen J,et al. Down-regulation of PERK-ATF4-CHOP pathway by Astragaloside IV is associated with the inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic rats[J]. *Cellular Physiology &*

- Biochemistry,2014,33(6):1975-1987.
- [23] Yi S,Shi W,Wang H,et al. Endoplasmic Reticulum Stress PERK-ATF4-CHOP Pathway Is Associated with Hypothalamic Neuronal Injury in Different Durations of Stress in Rats[J]. *Frontiers in Neuroscience*,2017,11:152.
- [24] Cox DJ,Strudwick N,Ali AA,et al. Measuring signaling by the UPR[J]. *Methods Enzymol*,2011, 491: 261-292.
- [25] Bates DJ P,Lewis LD. Manipulating the apoptotic pathway:potential therapeutics for cancer patients[J]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2013,76(3):381-395.
- [26] Huang Y,Li X,Wang Y,et al. Endoplasmic reticulum stress-induced hepatic stellate cell apoptosis through calcium-mediated JNK/P38 MAPK and Calpain/Caspase-12 pathways[J]. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 2014,394(1-2):1-12.
- [27] Gu YH,Wang Y,Bai Y,et al. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis via PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP signaling in the methamphetamine-induced chronic pulmonary injury.[J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2017, 49:194.
- [28] Lu HY,Chen XQ,Tang W,et al. GRP78 silencing enhances hyperoxia-induced alveolar epithelial cell apoptosis via CHOP pathway.[J]. *Molecular Medicine Reports*,2017,16(2):1493-1501.
- [29] Pizov R,Weiss YG,Oppenheim-Eden A,et al. High oxygen concentration exacerbates cardiopulmonary bypass-induced lung injury[J]. *Journal of Cardiothoracic & Vascular Anesthesia*,2000,14(5):519-523.
- [30] 李一鸣,臧宇,郭云山,等. CHOP/GADD153 在内质网应激介导细胞凋亡中的研究进展[J]. *现代生物医学进展*,2016,16(11):2178-2182.
- [31] 王艳勋,徐作军. 内质网应激与特发性肺纤维化[J]. *中华医学杂志*,2013, 93(44):3563-3565.
- [32] Rong R,Montalbano JW,Zhang J,et al. Oncogenic Ras-mediated downregulation of Gadd153/CHOP is required for Ras-induced cellular transformation.[J]. *Oncogene*,2005,24(30):4867.

- [33] Rudel T. Caspase inhibitors in prevention of apoptosis[J]. Herz,1999, 24(3):236-241.
- [34] Tabas I,Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. Nat Cell Biol,2011,13( 3):184-190.
- [35] Wang Y,Gong J,Zeng H,et al. Lipopolysaccharide Activates the Unfolded Protein Response (UPR) in Human Periodontal Ligament Fibroblasts[J]. Journal of Periodontology,2015,87(5):1.
- [36] Takahashi Y,Karbowski M,Yamaguchi H,et al. Loss of Bif-1 suppresses Bax/Bak conformational change and mitochondrial apoptosis[J]. Molecular & Cellular Biology,2005,25(21):9369-9382.
- [37] 蒋红,李继昌,王红军. 细胞凋亡的信号通路和检测方法[J].中国饲料,2012,13:20-26.
- [38] 高小玲,罗子国. 双氢青蒿素诱导前列腺癌 PC-3 细胞凋亡及其机制研究[J]. 中草药,2010,41(1):9-13.
- [39] 李捷萌,陈彦青,刘荣国. 线粒体凋亡途径与 Bcl-2 家族蛋白研究进展[J]. 医学综述,2008, 14(4):489-490.
- [40] 王筱冰,张小翠,夏妙红,等. Caspase 的活化机制[J]. 现代生物医学进展,2006, 6(3):53-55.
- [41] 刘洪亮,崔玉山. Caspase-12 在内质网应激中的激活途径及与疾病关系研究进展[J].环境卫生学杂志,2011,1(4):41-45.
- [42] Oyadomari S,Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic stress[J].Cell Death Differ,2004,11:381-389.

## 综 述

### 肺泡上皮细胞凋亡介导肺损伤的研究进展

细胞凋亡(apoptosis), 指由内外环境变化或死亡信号触发导致的由基因调控的细胞有序的、自主的死亡过程, 又称为细胞程序性死亡, 这一过程在细胞存活和死亡的平衡中发挥着不可替代的作用, 对维持机体内环境的稳定起着重要的作用。一旦细胞凋亡调控机制紊乱, 就会引发机体一系列疾病。如今对细胞凋亡复杂的分子机制已有深入研究, 但其确切机制仍不完全清楚。目前认为调控哺乳动物细胞凋亡的机制, 通常有以下几种途径<sup>[1]</sup>: (1) 线粒体或内源性途径; (2) 死亡受体或外源性途径; (3) 颗粒酶介导的细胞凋亡途径; (4) 内质网介导的细胞凋亡途径等。细胞凋亡在各器官损伤如肺损伤时发挥着重要作用。

肺损伤(lung injury)是各种损伤因素介导的肺泡上皮细胞与毛细血管内皮细胞损伤, 诱发弥漫性肺泡与肺间质水肿, 导致低氧性呼吸障碍表现。肺损伤发生机制复杂, 尤其是脂质过氧化与产生细胞凋亡密切相关<sup>[2]</sup>, 被认为是急性肺损伤(acute lung injury, ALI)发生的重要机制之一, 主要通过机体大量产生的ROS, 打破机体氧化/抗氧化系统, 诱发细胞凋亡导致肺组织结构的功能异常。一般而言, 肺在受到如高氧或者外力刺激损伤下会导致ROS大量堆积, 触发细胞凋亡信号途径, 如造成线粒体膜通透性转换孔(mPTP)开放, 导致促凋亡因子和细胞色素C(CytC)从线粒体释放诱发细胞凋亡<sup>[3]</sup>。有研究表明高浓度氧暴露下ROS的产生能导致线粒体膜Bax激活、释放CytC并诱导大鼠肺泡上皮细胞凋亡<sup>[4]</sup>。此外, ROS能激活丝裂原活化蛋白激酶家族信号通路如JNK1/2和p38激酶, 从而诱导细胞凋亡发生<sup>[5]</sup>。肺泡上皮细胞(AECs)的凋亡与各种原因引起的肺损伤的生存率和预后关系密切。本文就肺泡上皮细胞凋亡在肺损伤中的研究进展做一简要综述。

#### 1. 肺泡上皮细胞凋亡的途径

##### 1.1 线粒体或内源性途径

线粒体是为细胞的各种生命活动提供能量的细胞器, 在细胞衰老、增值分化、信号转导及凋亡等的发生中均发挥着重要的作用。目前认为, 线粒体调控细胞凋亡的机制是: (1) 各种应激因素导致抗凋亡线粒体蛋白(如Bcl-2和Bcl-x)表达减少, 促凋亡线粒体蛋白(如Bak、Bax、Bim)表达增加<sup>[6]</sup>, 从而诱发细胞凋亡。

(2) 在各种凋亡信号诱导下, 线粒体的膜电位丢失致通透性增加, 导致各种促凋亡因子如细胞色素c(Cytc)、caspase-3前体(procaspase-3)、SMAC(second mitochondria-derived activator of caspase)、凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)、核酸内切酶G(EndoG)<sup>[7,8]</sup>等从线粒体释放到细胞质中, 它们或激活caspase, 或独立地破坏核染色质, 最终启动凋亡反应诱发细胞凋亡。

### 1.2 死亡受体或外源性途径

死亡受体或外源性途径涉及激活细胞膜中存在的死亡受体, 如Fas、肿瘤坏死因子受体1(TNFR1)和TRAIL等。死亡配体与其受体的结合激活死亡结构域的衔接蛋白, 并随后激活原蛋白酶-8或-10, 激活半胱天冬酶诱导细胞凋亡。目前认为外源性途径可被3种机制所抑制: 1) FLIP(Fas-activated death domain (FADD)-like interleukin-1 converting enzyme (FLICE)-like inhibitor of apoptosis protein), 其与procaspase-8结合, 从而不被激活; 2) 诱饵受体对死亡配体结合膜死亡受体的拮抗作用; 3) 热休克蛋白的结合<sup>[9]</sup>。

### 1.3 颗粒酶(granzymes, Gr)途径

Gr是存在于自然杀伤细胞(natural killer cell, NKC)和细胞毒性淋巴细胞(cytotoxic lymphocytes, CTL)中的颗粒相关丝氨酸蛋白酶<sup>[10]</sup>, 有研究发现<sup>[11]</sup>, CTL在遇到被感染或恶性转化的宿主细胞后, 会分泌穿孔蛋白, 一种能够在被感染细胞的细胞膜上形成孔的蛋白质, 再通过GrB侵入宿主细胞并诱导肺泡上皮细胞凋亡。细胞毒性T淋巴细胞就是能有效依赖GrB, 从而使细胞发生凋亡<sup>[12]</sup>。GrB诱导细胞凋亡主要是通过激活胞浆中天门冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspases), 启动级联反应, 水解细胞骨架与多种核蛋白, 最终诱发细胞凋亡<sup>[13]</sup>。体外试验证明, caspases家族蛋白几乎都能被颗粒酶B激活, 其中caspase-7和caspase-10为颗粒酶B最适底物。Caspase-10的活化是颗粒酶B介导凋亡的重要触发器, 顺序激活caspase-7、caspase-3等从而诱发细胞凋亡。颗粒酶B也可直接迁移至细胞核, 切割PARP、NuMA和DNA-PKcs等一系列核蛋白, 诱发启动细胞核发生凋亡。除此之外, 颗粒酶B还可不依赖caspases的激活启动胞浆凋亡, 主要通过破坏线粒体膜电位或激活某些胞浆底物及引起细胞色素C释放等, 从而启动细胞凋亡<sup>[14]</sup>。

## 1.4 内质网凋亡途径

内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 是真核细胞中重要的细胞器, 参与蛋白质合成、加工等以及脂质代谢、糖类代谢、钙的储存等。内质网应激是维护细胞内环境稳态的机制之一, 但内质网过强过久应激会诱发细胞凋亡。其介导细胞凋亡的机制可能有<sup>[15]</sup>: (1) IRE1-JNK 途径, (2) caspase-12 活化途径, (3) CHOP 途径。

### 1.4.1 IRE1-JNK 途径

JNK 属于丝裂原活化蛋白激酶家族成员之一, 可被多种应激原所激活, 因此该通路又常被称为应激活化蛋白激酶的激活通路, ER 应激激活 IRE-1s 后, 可招募 TNF 受体相关因子 2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2, TRAF2), TRAF2 又激活凋亡信号调节激酶 1 (apoptosis signal kinase 1, ASK1), 形成 IRE-1/TRAF2/ASK1 三聚体进一步激活 JNK 途径信号, 诱导细胞凋亡。

### 1.4.2 caspase-12 活化途径

caspase-12 属于半胱氨酸蛋白酶 (caspase) 家族成员之一, 生理情况下, 以无活性的前体形式存在于内质网的胞浆面, 应激情况下, caspase-12 被特异性地激活, 随后通过 caspase 的级联效应促使细胞凋亡<sup>[16]</sup>。目前的观点有三种: 一种是由内质网  $\text{Ca}^{2+}$  失衡直接激活 caspase-12, 活化的 caspase-12 进一步激活 caspase-9, 由 caspase-9 再激活 caspase-3 进入细胞凋亡通路; 另一种是  $\text{Ca}^{2+}$  失衡激活钙蛋白酶, 活化的钙蛋白酶可直接切割 caspase-12 前体, 成为活性的 caspase-12 片段, 进而启动 caspase 的级联反应诱导细胞凋亡; 第三种是 caspase-7 在应激时可由胞质内转移至内质网表面, 切割 caspase-12 前体, 产生的活性 caspase-12 进而引发 caspase 级联反应诱导细胞凋亡。

### 1.4.3 CHOP 途径

CHOP, 是 CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白 (CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein, C/EBP 同源蛋白), 属于转录因子 C/EBP 家族成员之一, 为促凋亡因子, 广泛存在于哺乳动物机体中, 其编码的蛋白与细胞分化、增殖、凋亡等功能活动密切相关。生理状况下, 其表达量极少; 应激状态下, 上游转录元件如 eIF2 $\alpha$ 、ATF6、PERK 等活化, 均能诱导 CHOP 转录激活, 表达量显著增加。研究显示, 高表达的 CHOP 可干扰内质网对蛋白的折叠功能, 减少抗

凋亡基因 Bcl-2 的表达、增加活性氧产物与减少细胞中谷胱甘肽含量，且可阻滞细胞周期及引起 DNA 损伤，从而引发细胞凋亡<sup>[17,18]</sup>。实验提示 CHOP 高表达时细胞对 ERS 引起的凋亡更敏感<sup>[19]</sup>，而沉默 CHOP 基因可增强细胞抵抗 ERS 介导的凋亡效应，因此，CHOP 能反映 ERS 介导的细胞凋亡水平，是 ERS 过度激活的标志蛋白<sup>[20]</sup>。

## 2 肺泡上皮细胞凋亡在肺损伤相关疾病中的作用。

### 2.1 肺泡上皮细胞凋亡在肺气肿发生与发展中的作用。

肺气肿特征性病变是肺泡完整性丧失和肺泡间隙扩大。感染和吸烟是诱发肺气肿的常见因素，然而，其发生与发展涉及多种机制。其中，肺泡上皮细胞凋亡是肺泡细胞丢失的重要原因，目前多项研究证明在肺气肿中肺泡上皮细胞凋亡异常升高。

肺气肿中肺泡上皮细胞凋亡异常曾多次被报告，与肺泡表面积降低<sup>[21]</sup>以及肺泡上皮细胞凋亡增加相关<sup>[22]</sup>。有研究发现NE主要抑制剂A1AT缺陷促进肺气肿发展的易感性<sup>[23]</sup>。肺蛋白酶的高活性通过降解弹性纤维影响肺泡的完整性，而弹性纤维负责维持肺泡结构和肺的伸展。然而，弹性酶诱导的肺气肿似乎不仅仅归因于弹性纤维的降解。事实上，弹性蛋白酶的活性仅在弹性蛋白酶灌注后45-50分钟内可检测到，而肺气肿病变和较高的肺泡上皮细胞凋亡持续数周<sup>[24]</sup>，可能是由于炎症状态的持续存在。为了验证这一假设，小鼠敲除IL-1 $\beta$ 和TNF受体基因，并将其置于弹性蛋白酶灌注中，显示肺气肿病变和肺泡上皮细胞凋亡较少<sup>[25]</sup>，表明弹性蛋白酶通过IL-1 $\beta$ 和TNF依赖机制可促进肺气肿进展和肺泡上皮细胞凋亡。

在过去的研究中，血管内皮生长因子（VEGF）信号在肺气肿病理生理学中的作用逐渐引起了人们的兴趣<sup>[26-27]</sup>。研究表明，肺气肿患者的肺中VEGF和VEGFR2水平降低，并且与肺泡上皮细胞凋亡增加密切相关<sup>[28]</sup>。此外，用VEGF受体阻滞剂SU5416能诱导大鼠肺气肿形成，表明降低VEGF信号可能促进肺细胞凋亡和肺气肿<sup>[29]</sup>，此情况可被caspase抑制剂所阻止<sup>[30]</sup>。在肺气肿的情况下，氧化分子主要有两个来源，第一种是香烟烟雾（主动吸烟），其中含有具有巨大氧化能力的自由基，如超氧化物（O<sub>2</sub>•-）、羟基自由基（•OH）和过氧化氢（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）<sup>[31]</sup>。第二种来源，且可能是最持久的，来自肺气肿固有的慢性炎症，即使在未



吸烟甚至戒烟的情况下也会持续<sup>[32]</sup>。肺气肿患者的抗氧化防御能力严重不足，导致严重的氧化损伤，并且肺气肿肺呈现更多受损蛋白和更多过氧化脂质<sup>[33-34]</sup>。这些氧化损伤都可能导致肺气肿肺泡上皮细胞凋亡增加。在肺气肿吸烟者的肺泡上皮细胞中，trail受体1、2和3已被证明上调<sup>[35]</sup>。此外，它们的表达与肺气肿肺实质中肿瘤抑制因子p53的水平密切相关<sup>[35]</sup>。让人感兴趣的是，A549体外暴露于氧化应激（H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）和TNF中，结果trail-r1、2和3的表达升高，且p53表达也同样升高，此表明肺气肿肺中观察到的trail系统的调节可能归因于氧化应激和/或炎性细胞因子。由于激活的炎性细胞释放了trail，肺气肿肺中的氧化应激和炎症可能使肺泡上皮细胞对其凋亡作用更加敏感。

有大量证据表明肺气肿可能有自身免疫成分，在约70%的肺气肿患者血清中发现了肺上皮细胞具有亲和力的自身激活抗体<sup>[36]</sup>。此外，在肺气肿患者血浆中，体外外周血单核细胞对肺泡上皮细胞的细胞毒性更强。提示自身激活抗体可能启动免疫细胞介导的AECs凋亡。此外，一个自身免疫性肺气肿模型显示，对肺内皮细胞的免疫反应可导致肺泡内皮细胞和上皮细胞凋亡并引起肺气肿<sup>[37]</sup>。

## 2.2 肺泡上皮细胞凋亡在急性肺损伤中的作用。

急性肺损伤（acute lung injury, ALI）是多种原因引起的急性进行性呼吸衰竭，主要表现为炎症反应失控引起弥漫性肺泡上皮以及肺微血管内皮的严重损伤。目前认为<sup>[38]</sup>，其发生的主要机制是炎症反应的失控、肺泡 II 型上皮细胞（type II alveolar epithelial cells, AECIIs）过量凋亡、AECs 和血管内皮细胞的生理屏障功能破坏进而导致肺泡通透性增加、凝血途径异常激活以及趋化因子、细胞因子、凋亡因子的激活等，其中 AECIIs 的凋亡在 ALI 的发生发展中发挥着至关重要的作用。

有研究表明<sup>[39]</sup>，AECIIs 的自噬异常激活进而上调肺泡上皮细胞凋亡是急性肺损伤重要机制之一。进一步研究发现，microRNAs 参与其中。采用脂多糖（lps）在体内诱导小鼠急性肺损伤和体外诱导 AECIIs 损伤模型，发现脂多糖诱导自噬激活，增加肺组织和 AECIIs 中 miR-34a 的表达<sup>[40]</sup>。体外实验结果表明，在肺泡 II 型上皮细胞中，上调 miR-34a 会抑制自噬，然而抑制 miR-34a 则促进自噬<sup>[40]</sup>。此外，miR-34a 通过直接结合自噬相关基因 FoxO3 的 3'端非翻译区，下调其表达。而下调 FoxO3 表达抑制了 AECIIs 的自噬活性，进而抑制上皮细胞的凋亡<sup>[40]</sup>。

## 2.3 肺泡上皮细胞凋亡在高氧性肺损伤中的作用。

长期氧化应激被认为是高氧性肺损伤发病机制之一,可导致肺泡上皮细胞损伤及凋亡异常,最终导致支气管肺发育不良。高氧刺激可降低P-Foxo3a、P-Akt、Bcl-2和Cyclind1的表达<sup>[41]</sup>,同时增加Bax、Bim和Foxo3a的表达,从而引起肺泡II型上皮细胞的增殖受限以及诱导肺泡上皮细胞凋亡。此高氧的作用可被氢预处理所逆转。此外,PI3K/AKT抑制剂LY294002可剔除氢的保护作用。因此,研究表明氢可通过下调促凋亡因子和促进抗凋亡因子的表达,保护AECIIs免受高氧导致的细胞凋亡,且与通过激活PI3K/Akt/Foxo3a的信号通路密切相关<sup>[41]</sup>。肺泡上皮细胞凋亡、“过度”肺老化、线粒体功能障碍以及线粒体DNA(mtDNA)完整性破坏是导致高氧肺损伤的关键因素。有研究发现抗衰老因子 $\alpha$ -Klotho,可以保护AECs免受高氧导致的细胞凋亡<sup>[42]</sup>,其机制是 $\alpha$ -Klotho通过依赖于上游成纤维细胞生长因子受体1(Fibroblast growth factor receptor 1, FGFR1)的激活而引起AKT的激活,维持线粒体DNA(mtDNA)的完整性进而减轻上皮细胞凋亡,保护暴露于氧化应激下的肺泡上皮细胞<sup>[42]</sup>。

#### 2.4 肺泡上皮细胞凋亡在肺纤维化中的作用。

肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AECs),是肺组织的结构细胞,主要由ACEIs和ACEIIs组成,ACEIs主要作用是气体交换,ACEIIs主要作用为分泌活性物质减轻肺泡表面张力,ACEIIs可以转化为ACEIs,参与AECs损伤后的修复<sup>[43,44]</sup>,在肺纤维化(pulmonary fibrosis,PF)的发生发展中起着重要的作用。AECs损伤、老化加速、异常修复及凋亡是促进和引起肺纤维化的重要因素之一<sup>[45,46]</sup>,其中ACEIIs最易受到氧化应激发生凋亡从而促进肺纤维化的形成,目前认为其促进肺纤维化的机制有<sup>[46]</sup>:(1)ACEIIs凋亡后释放TGF- $\beta$ ,诱导ACEIIs通过上皮间质转化(EMT)转化为成纤维细胞;(2)凋亡的ACEIIs可分泌炎症因子,趋化单核细胞、中性粒细胞和淋巴细胞等炎症细胞,更加加重了肺组织损伤,另外发生损伤时辅助T<sub>2</sub>分泌的细胞因子如IL4、IL-13等也有促肺纤维化的作用;(3)ACEIIs对成纤维细胞的增殖调控异常,减轻了其抑制成纤维细胞的作用,从而启动了ACEIIs非正常的修复功能,ACEIIs还能释放促纤维化的因子,促进成纤维细胞的活化和增殖;(4)ACEIIs的凋亡与成纤维细胞和肌成纤维细胞的激活增殖相互作用,进入肺纤维化恶性循环<sup>[47,48]</sup>。

关于 ACEIIs 受到氧化应激发生凋亡的机制, 有研究显示<sup>[49]</sup>, 氧化应激会诱导 mtROS 产生, 进而会降低 ACEs 中的 8-氧代胍 DNA 糖基化酶 mtOGG1、Sirtuin 家族成员 SIRT3 和线粒体鸟头酸酶 ACO-2 的表达, 从而诱导 mtDNA 的损伤, mtDNA 的损伤会导致线粒体功能障碍, 从而诱导肺泡上皮细胞的凋亡, 最终导致肺纤维化。同时研究表明<sup>[50]</sup>, 8-氧代胍 DNA 糖基化酶 mtOGG1 和线粒体鸟头酸酶 ACO-2 在修复肺泡上皮细胞 mtDNA 损伤及维持 mtDNA 完整性方面发挥着重要的作用, 对防止肺纤维化的发生具有重要意义。

在特发性肺纤维化 (IPF) 患者的肺泡灌洗液中, 内皮抑制素表达增多, 在 AECIIs 中这种内皮抑制素以 FasL 与 caspase 依赖方式诱导 AECIIs 凋亡, 并阻止损伤后修复<sup>[51]</sup>。IPF 患者的 AECs 中去乙酰化酶 SIRT3 表达明显减少, 从而加重了 AECs 线粒体 DNA 损伤及凋亡<sup>[49]</sup>。也有观点认为<sup>[52]</sup>, IPF 患者的肺泡上皮细胞中存在内质网应激, 激活 JNK、CHOP 或 caspase-12, 引起肺泡上皮细胞的凋亡, 最终引起肺纤维化。在 IPF 中有检测到表面活性蛋白 C 基因突变, 是疾病导致肺泡 II 型上皮细胞错误折叠的基因产物<sup>[53]</sup>。另也有研究发现<sup>[54]</sup>, 在肺纤维化中, AECs 凋亡明显增加, 肺泡结构塌陷, 一方面 AECs 损伤后释放促纤维化细胞因子如 TGF- $\beta$  刺激成纤维细胞转化为肌成纤维细胞, 另一方面 TGF- $\beta$  也可反馈性通过 Fas-FasL 途径激活 caspase-3, 从而诱导 AECs 凋亡, 进一步促进肺纤维化的发生。凝血蛋白酶可活化受体 (PARs) 进而增进成纤维细胞增生及产生细胞外基质, 使用 PAR-1 激动剂可增加 AECs 凋亡, 而 PAR-1 抑制剂则可减少 AECs 凋亡<sup>[55]</sup>, 而凝血蛋白酶既能增进 AECs 凋亡也能抑制肺内成纤维细胞的凋亡, 这些均说明 AECs 凋亡在肺纤维化发病机制中发挥着重要的作用。

因此, ACEs 凋亡在肺纤维化的发生与发展中具有重要的意义, 修复 ACEs 损伤可能会导致肺纤维化的逆转<sup>[56]</sup>。

### 3 结论

大量积累的证据表明, AECs 凋亡作为肺损伤潜在致病机制的重要性。细胞凋亡对机体是有益还是有害, 不同的细胞类型表现出不同的凋亡行为。如促纤维化环境可诱导上皮细胞凋亡并提高肌成纤维细胞存活率。炎症细胞可以通过自身凋亡和去除凋亡碎片来调节肺损伤反应, 如纤维化反应。用抗凋亡药物靶向特定细胞类型是治疗肺损伤如特发性肺纤维化、支气管肺发育不良等疾病的重要手

段。然而，细胞凋亡是肺损伤发生的多种机制之一，这些机制之间相互作用的复杂性还远未得到解决，有待我们进一步探索。

## 参考文献

- [1] 焦俊霞,高维娟. 细胞凋亡的信号转导机制研究进展[J].中国老年学杂志,2010,30(6):853-856.
- [2] Jamal M,Masood A,Belcastro R,et al. Lipid hydroperoxide formation regulates postnatal rat lung cell apoptosis and alveologenesi[J]. Free Radic Biol Med, 2013, 55(2):83-92.
- [3] Zorov DB,Juhaszova M,Sollott SJ. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release[J]. Physiological Reviews,2014, 94(3):909.
- [4] Buccellato LJ,Tso M,Akinci OI,et al. Reactive Oxygen Species Are Required for Hyperoxia-induced Bax Activation and Cell Death in Alveolar Epithelial Cells[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(8):6753.
- [5] Porzionato A,Sfriso MM,Mazzatenta A,et al. Effects of hyperoxic exposure on signal transduction pathways in the lung[J]. Respir Physiol Neurobiol,2015, 209:106-114.
- [6] Ravagnan L,Roumier T,Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons[J]. J Cell Physiol ,2002,192:131-137.
- [7] Susin SA,Lorenzo HK,Zamzami N,et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor[J]. Nature 1999, 397: 441-446.
- [8]刘丽君,彭建新,洪华珠,等. 线粒体在细胞凋亡中的变化与作用[J].细胞生物学杂志,2005,27(2):117-120.
- [9] Beere HM. Death versus survival: functional interaction between the apoptotic and stress-inducible heat shock protein pathways[J]. J Clin Invest,2005,115: 2633-2639.
- [10] 焦俊霞,高维娟. 细胞凋亡的信号转导机制研究进展[J].中国老年学杂志,2010,30(6):853-856.
- [11] Russell JH,Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity[J]. Annu Rev Immunol ,2002,20: 323-370.
- [12] Goping IS,Barry M,Liston P,et al. Granzyme B-Induced Apoptosis Requires Both Direct Caspase Activation and Relief of Caspase Inhibition[J]. Immunity, 2003,

- 18(3):355-365.
- [13] Shi L, Mai S, Sara I, et al. Granzyme B (GraB) Autonomously Crosses the Cell Membrane and Perforin Initiates Apoptosis and GraB Nuclear Localization[J]. *Journal of Experimental Medicine*, 1997, 185(5):855-866.
- [14] Heibein JA, Barry M, Motyka B, et al. Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and cytochrome c release are caspase independent[J]. *Journal of Immunology*, 1999, 163(9):4683-4693.
- [15] 胥国强, 黄文芳, 卢贤瑜. 内质网与细胞凋亡[J]. *国际检验医学杂志*, 2007, 28(3):241-243, 246.
- [16] Hermel E, Klapstein KD. A possible mechanism for maintenance of the deleterious allele of human CASPASE-12[J]. *Med Hypotheses*, 2011, 5(77):803-6.
- [17] Chen CM, Wu CT, Chiang CK, et al. C/EBP Homologous Protein (CHOP) Deficiency Aggravates Hippocampal Cell Apoptosis and Impairs Memory Performance[J]. *Plos One*, 2012, 7(7):e40801.
- [18] Kadowaki H, Nishitoh H, Ichijo H. Survival and apoptosis signals in ERS: the role of protein kinases[J]. *J Chem Neuroanat*, 2004, 28(1-2): 93-100.
- [19] Lin L, Zhou JY. ERS and alcoholic liver disease[J]. *In China Academic Journal*, 2009, 9(36): 532-5.
- [20] Gu YH, Wang Y, Bai Y, et al. Endoplasmic reticulum stress and apoptosis via PERK-eIF2 $\alpha$ -CHOP signaling in the methamphetamine-induced chronic pulmonary injury.[J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2017, 49:194.
- [21] Imai K, Mercer BA, Schulman LL, et al. Correlation of lung surface area to apoptosis and proliferation in human emphysema[J]. *Eur Respir J*, 2005, 25:250-258.
- [22] Yokohori N, Aoshiba K, Nagai A. Increased levels of cell death and proliferation in alveolar wall cells in patients with pulmonary emphysema[J]. *Chest*, 2004, 125:626-632.
- [23] Eriksson S. Pulmonary emphysema and alpha1-antitrypsin deficiency[J]. *Acta Med Scand*, 1964, 175:197-205.

- [24] Stone PJ,Lucey EC,Calore JD,et al. Defenses of the hamster lung against human neutrophil and porcine pancreatic elastase[J]. *Respiration*,1988,54:1-15.
- [25] Lucey EC,Keane J,Kuang PP,et al. Severity of elastase-induced emphysema is decreased in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta receptor-deficient mice[J]. *Lab Invest*,2002,82:79-85.
- [26] Kanazawa H. Role of vascular endothelial growth factor in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Med Sci Monit*. 2007,13:RA189-195.
- [27] Voelkel NF,Vandivier RW,Tuder RM. Vascular endothelial growth factor in the lung[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006,290: L209-L221.
- [28] Kasahara Y,Tuder RM,Cool CD,et al. Endothelial cell death and decreased expression of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor 2 in emphysema[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001,163:737-744.
- [29] 王悦虹. 血管内皮细胞生长因子及其受体在肺气肿中的表达研究[D].复旦大学,2004:1-48.
- [30] Kasahara Y,Tuder RM,Taraseviciene-Stewart L,et al. Inhibition of VEGF receptors causes lung cell apoptosis and emphysema[J]. *J Clin Invest*, 2000,106:1311-1319.
- [31] Pryor WA.Cigarette smoke radicals and the role of free radicals in chemical carcinogenicity[J]. *Environ Health Perspect*, 1997,105 (Suppl 4):875-882.
- [32] Willemsse BW,Postma DS,Timens W,et al. The impact of smoking cessation on respiratory symptoms, lung function, airway hyperresponsiveness and inflammation[J]. *Eur Respir J*, 2004,23:464-476.
- [33] Rahman I,van Schadewijk AA,Crowther AJ,et al. 4-Hydroxy-2-nonenal, a specific lipid peroxidation product, is elevated in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002,166:490-495.
- [34] Malhotra D,Thimmulappa R,Navasacien A,et al. Decline in NRF2-regulated antioxidants in chronic obstructive pulmonary disease lungs due to loss of its positive regulator, DJ-1.[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2008, 178(6):592.

- [35] Morissette MC, Vachon-Beaudoin G, Parent J, et al. Increased p53 level, Bax/Bcl-x(L) ratio, and TRAIL receptor expression in human emphysema[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 178:240-247.
- [36] Feghali-Bostwick CA, Gadgil AS, Otterbein LE, et al. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008, 177:156-163.
- [37] Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, et al. An animal model of autoimmune emphysema[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171:734-742.
- [38] 陈家宽. 肿瘤转移相关蛋白1(MTA1)在急性肺损伤中的作用机制研究[D]. 第四军医大学, 2017:1-72.
- [39] 李少莹. 自噬在LPS诱导的肺泡上皮细胞死亡中的作用及机制研究[D]. 第三军医大学, 2015:1-97.
- [40] Song L, Zhou F, Cheng L, et al. MicroRNA-34a Suppresses Autophagy in Alveolar Type II Epithelial Cells in Acute Lung Injury by Inhibiting FoxO3 Expression[J]. *Inflammation*, 2017, 40(3): 927-936.
- [41] Wu D, Liang M, Dang H, et al. Hydrogen protects against hyperoxia-induced apoptosis in type II alveolar epithelial cells via activation of PI3K/Akt/Foxo3a signaling pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 495(2):1620-1627.
- [42] Seok-Jo Kim, Paul Cheresh, Mesut Eren, et al. Klotho, an antiaging molecule, attenuates oxidant-induced alveolar epithelial cell mtDNA damage and apoptosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 313: L16-L26.
- [43] 刘建, 刘燕梅, 王玉光. 肺泡上皮细胞凋亡与特发性肺纤维化的研究进展[J]. *医学综述*, 2015, 21(16):2893-2895.
- [44] Serrano-Moilar A. Alveolar epithelial cell injury as an etiopathogenic factor in pulmonary fibrosis[J]. *Arch Bronconeumol*, 2012, 48(Suppl 2):2-6.
- [45] 朱剑萍, 姚宏伟, 陈季强. 肺泡上皮细胞在肺纤维化中的作用及机制研究进展[J]. *国际呼吸杂志*, 2006, 26(7):506-509.
- [46] 王聪, 董春玲. 氧化应激与肺纤维化肺泡上皮凋亡的研究进展[J]. *新医*



- 学,2018,49(1):15-18.
- [47] 夏婷婷,张丽婷,陈芳,等. 特发性肺纤维化的细胞学研究进展[J].医学研究生学报,2016,29(3):314-318.
- [48] 孔勤,陈民利. 特发性肺纤维化发病机制的研究进展[J].中国比较医学杂志,2012,22(8):74-80.
- [49] Jablonski RP, Kim SJ, Cheres P, et al. SIRT3 deficiency promotes lung fibrosis by augmenting alveolar epithelial cell mitochondrial DNA damage and apoptosis[J].FASEB J,2017,31(6):2520-2532.
- [50] Seok-Jo Kim, Paul Cheresh, Renea P, et al. The Role of Mitochondrial DNA in Mediating Alveolar Epithelial Cell Apoptosis and Pulmonary Fibrosis[J]. Int. J. Mol. Sci, 2015,16:21486-21519.
- [51] Richter AG, McKeown S, Rathinam S, et al. Soluble endostatin is a novel inhibitor of epithelial repair in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Thorax, 2009,64(2):156-161.
- [52] Ankita Burman Harikrishna Tanjore, Timothy S. Blackwell. Endoplasmic reticulum stress in pulmonary fibrosis[J]. Matrix Biology, 2018, 68-69:355-365.
- [53] 王艳勋,徐作军. 内质网应激与特发性肺纤维化[J].中华医学杂志,2013, 93(44):3563-3565.
- [54] Song X, Wang B, Lin S, et al. Astaxanthin inhibits apoptosis in alveolar epithelial cells type II in vivo and in vitro through the ROS-dependent mitochondrial signalling pathway[J]. J cell Mol Med, 2014, 18(11):2198-2212.
- [55] Suzuki T, Moraes TJ, Vachon E, et al. Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(3):231-247.
- [56] 吴秋云,徐甜甜,刘易,等. 肺泡上皮细胞在肺纤维化中的作用[J].中华劳动卫生职业病杂志,2017,35(7):540-542.

## 致谢

光阴似箭，日月如梭，不知不觉中迎来研究生毕业季，在此谨向我的老师及亲友们致以最真诚的感谢。

首先，要感谢我的恩师卢红艳老师，从论文的选题、撰写到定稿，卢老师都给予了我极大的帮助，有了您的帮助，我的硕士学习和科研课题才得以顺利完成。您不仅传授我专业知识，更教会了我独立思考、治学严谨的科研作风，让我受益终生，您对我的影响之大，言语表达不尽。能够成为您的学生我感到无比荣幸和骄傲，在此，再次向我的恩师致以最崇高的敬意和最衷心的感谢，感谢一路上有您指引和陪伴！导师的恩情，学生铭记于心。

衷心感谢在研究生学习期间帮助过我的朋友、同事和同学们，感谢你们的无私协助，陪伴我度过了那段艰难的日子。

特别感谢我的家人尤其是我的先生王波，谢谢他们一直以来对我的支持，宽容和鼓励，没有他们背后的付出，就没有我今天的收获。

最后，我要感谢在百忙之中抽出时间参与我论文评审及答辩的所有老师，感谢您们的细心指导，谢谢！我将在今后的工作、学习中更加努力！

## 攻读硕士期间发表的论文

Wang KH, Mi LL, Zhang T, et al. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is involved in the lungs of hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia rats[J]. Int J Clin Exp Med, 2018, 11(12):13259-13266.