

## ·论著·

## 血红素加氧酶-1 对过氧化氢损伤的 II 型肺泡上皮细胞凋亡的影响

刘海霞 陈淼 杨秀娟 戴慧 陈涛 陈华军

**【摘要】** 目的 探讨血红素加氧酶-1(HO-1)对过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)刺激后原代培养大鼠 II 型肺泡上皮细胞(AEC II)凋亡率、活化天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)及细胞色素 C(Cyt-C)表达的影响。方法 原代培养雄性 SD 大鼠 AEC II 细胞,被随机分为 4 组:对照组(A 组)加入生理盐水;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组(B 组)加入 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理;HO-1 预处理组(C 组)给予 0.2 μmol/L HO-1 预处理 2 h 后加入 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;HO-1 抑制组(D 组)给予 10 μmol/L 锌原卟啉 IX(Znpp IX)预处理 2 h 后加入 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,各组细胞处理后继续培养。于药物干预后 2、6、12 h 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率,用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测活化 caspase-3、Cyt-C 蛋白表达。结果 各组细胞凋亡率均随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用时间延长而逐渐升高;B 组干预后各时间点 AEC II 凋亡率均较 A 组显著增加;C 组 AEC II 凋亡率则较 B 组明显降低[2 h:(11.46 ± 1.47)% 比 (20.83 ± 1.55)%, 6 h:(12.30 ± 1.37)% 比 (27.14 ± 1.53)%, 12 h:(12.62 ± 1.39)% 比 (35.66 ± 0.74)%, 均 P < 0.05];D 组 2、6、12 h AEC II 凋亡率 [(24.33 ± 1.36)%、(31.67 ± 1.24)%、(36.93 ± 2.40)%]与 B 组比较则差异无统计学意义。各组活化 caspase-3、Cyt-C 蛋白表达量均随 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用时间延长而逐渐增加;B 组各时间点活化 caspase-3、Cyt-C 蛋白表达量均较 A 组明显增加;C 组活化 caspase-3 蛋白表达量(灰度值)较 B 组明显减少(2 h:0.250 ± 0.039 比 0.650 ± 0.072, 6 h:0.470 ± 0.080 比 0.960 ± 0.118, 12 h:0.680 ± 0.099 比 1.830 ± 0.220, 均 P < 0.05);Cyt-C 蛋白表达量(灰度值)也较 B 组明显减少(2 h:0.250 ± 0.074 比 0.390 ± 0.069, 6 h:0.340 ± 0.043 比 0.670 ± 0.120, 12 h:0.470 ± 0.072 比 1.360 ± 0.112, 均 P < 0.05);D 组活化 caspase-3 蛋白表达量(0.720 ± 0.052、1.060 ± 0.109、1.880 ± 0.159)、Cyt-C 蛋白表达量(0.500 ± 0.110、0.860 ± 0.050、1.480 ± 0.140)与 B 组比较差异无统计学意义。结论 HO-1 预处理可降低不同时间(2~12 h)H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤的 AEC II 凋亡率,并减少活化 caspase-3 及 Cyt-C 的表达,表明 HO-1 对损伤的 AEC II 保护过程可能有线粒体凋亡通路的参与。

**【关键词】** 血红素加氧酶-1; 凋亡; 肺泡上皮细胞, II 型; 过氧化氢; 大鼠

### The effects of heme oxygenase-1 on apoptosis induced by hydrogen peroxide in type II alveolar epithelium cell

Liu Haixia, Chen Miao, Yang Xiujuan, Ji Hui, Chen Tao, Chen Huajun. Department of Critical Care Medicine, Zunyi Medical College Affiliated Hospital, Zunyi 563000, Guizhou, China

Corresponding author: Chen Miao, Email: chenmiao64@163.com

**【Abstract】** **Objective** To explore the effects of heme oxygenase-1 (HO-1) on the apoptosis, expression of caspase-3 and cytochrome-C (Cyt-C) on hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) oxidative damage in primary cultured rat's type II alveolar epithelium cell (AEC II). **Methods** AEC II from male Sprague-Dawley (SD) rats were separated and cultured. The cells were randomly divided into four groups: control group (A group, the cells were cultured with normal saline), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> group (B group, cultured with 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), HO-1 pretreatment group (C group, pretreatment with 0.2 μmol/L HO-1 for 2 hours followed by 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), HO-1 inhibition group [D group, pretreatment with 10 μmol/L zinc protoporphyrin IX (Znpp IX) for 2 hours followed by 0.5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>]. The cells in each group were cultured after different treatment. The cell apoptosis rate was determined by flow cytometry at 2, 6, 12 hours after the intervention. The protein expression of caspase-3 and Cyt-C were determined by Western Blot. **Results** The cell apoptosis rate in each group was gradually increased with prolonged time of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. The apoptosis rate at different time points after treatment in B group was significantly higher than that in A group, while the rate in C group was significantly lower than that in B group [2 hours: (11.46 ± 1.47)% vs. (20.83 ± 1.55)%, 6 hours: (12.30 ± 1.37)% vs. (27.14 ± 1.53)%, 12 hours: (12.62 ± 1.39)% vs. (35.66 ± 0.74)%, all P < 0.05]. There were no significant differences in apoptotic rate at 2, 6, 12 hours between D group [(24.33 ± 1.36)%, (31.67 ± 1.24)%, (36.93 ± 2.40)%] and B group. The protein expression of caspase-3 and Cyt-C was gradually increased with prolonged time of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. The protein expression of caspase-3 and Cyt-C at different time points in B group was significantly higher than that in A group. The protein expression of caspase-3 (gray scale) in C group was significantly lower than that

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2014.02.011

基金项目:贵州省科技计划项目(2008-3052);贵州省教育厅自然科学基金项目(2007-042)

作者单位:563000 贵州,遵义医学院附属医院重症医学科(刘海霞现在中国康复研究中心麻醉科工作)

通信作者:陈淼, Email: chenmiao64@163.com

in B group (2 hours:  $0.250 \pm 0.039$  vs.  $0.650 \pm 0.072$ , 6 hours:  $0.470 \pm 0.080$  vs.  $0.960 \pm 0.118$ , 12 hours:  $0.680 \pm 0.099$  vs.  $1.830 \pm 0.220$ , all  $P < 0.05$ ), and the Cyt-C protein expression (gray scale) was also significantly lowered in C group (2 hours:  $0.250 \pm 0.074$  vs.  $0.390 \pm 0.069$ , 6 hours:  $0.340 \pm 0.043$  vs.  $0.670 \pm 0.120$ , 12 hours:  $0.470 \pm 0.072$  vs.  $1.360 \pm 0.112$ , all  $P < 0.05$ ). There were no significant differences in protein expression of caspase-3 and Cyt-C between D group (caspase-3:  $0.720 \pm 0.052$ ,  $1.060 \pm 0.109$ ,  $1.880 \pm 0.159$ ; Cyt-C:  $0.500 \pm 0.110$ ,  $0.860 \pm 0.050$ ,  $1.480 \pm 0.140$ ) and B group. **Conclusions** HO-1 preconditioning reduced the apoptotic rate of the AEC II oxidative damaged by  $H_2O_2$  at different time points (2-12 hours) and decreased the expression of caspase-3 and Cyt-C. The mitochondrial apoptosis pathway participated in the protection mechanism of HO-1 in oxidative damage AEC II.

**【Key words】** Heme oxygenase-1; Apoptosis; Alveolar epithelial cell, type II; Hydrogen peroxide; Rat

急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)是指创伤、感染、休克等疾病导致的急性进行性缺氧性呼吸衰竭,病理特点有弥漫性肺泡损害、肺泡上皮细胞损伤、中性粒细胞浸润、肺表面活性物质(PS)缺乏等。ALI/ARDS是临床常见危重症,病死率高达26%~35%<sup>[1]</sup>,其发病机制有炎性细胞、肺组织细胞、细胞因子、趋化因子及凋亡激活剂/抑制剂的共同参与<sup>[2]</sup>。过氧化氢( $H_2O_2$ )诱导的肺损伤病理过程与临床患者高氧机械通气造成ARDS有相似之处, $H_2O_2$ 诱导的ALI大鼠是研究此疾病的良好动物模型<sup>[3]</sup>。II型肺泡上皮细胞(AEC II)是肺泡上皮细胞(AEC)的干细胞,近年研究发现,AEC II凋亡及凋亡相关基因表达异常在ALI/ARDS的发病过程中起重要作用<sup>[4]</sup>,因此,凋亡被认为是ARDS基本的发病机制<sup>[5]</sup>。随着研究的深入,发现线粒体凋亡通路可能是引发AEC II凋亡的重要途径,在AEC II凋亡中起关键作用<sup>[6-7]</sup>,抑制AEC II凋亡可有效减轻ALI严重程度<sup>[8-9]</sup>。本课题组前期的研究发现,血红素加氧酶-1(HO-1)在0.2  $\mu\text{mol/L}$ 浓度下对体外培养的AEC II有较好的抗氧化损伤作用,可减少细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。本研究拟用 $H_2O_2$ 模拟机体氧自由基(ROS)攻击损伤AEC II建立ALI/ARDS模型,对照观察应用低浓度的HO-1与HO-1抑制剂锌原卟啉IX(ZnPP IX)对氧化损伤的AEC II凋亡的影响及机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物:**SPF级健康雄性SD大鼠,体质量约180~220 g,由第三军医大学实验动物中心提供,动物合格证号:SCXK(渝)2007-0005。

**1.2 实验方法及分组:**按照文献[12]方法配置溶液I、溶液II和D-Hanks溶液等。给大鼠腹腔注射戊巴比妥钠和低分子肝素钠麻醉、抗凝后,开胸进行支气管肺泡灌洗,取肺组织剪成小块进行组织匀浆,离心,取细胞悬液,分离、纯化AEC II<sup>[13-14]</sup>,加入含胎牛血清完全培养基重悬细胞,光镜下观察细胞生长及形态。无菌培养瓶原代培养24 h后,电镜鉴定,寻找特征结构——微绒毛和嗜碱性板层小体鉴

定为AEC II。选择生长良好的细胞分为4组<sup>[15]</sup>:对照组加入等量生理盐水; $H_2O_2$ 组加入0.5 mmol/L  $H_2O_2$ 处理;HO-1组加入0.2  $\mu\text{mol/L}$  HO-1预处理2 h后给予0.5 mmol/L  $H_2O_2$ ;HO-1抑制剂组加入10  $\mu\text{mol/L}$  Znpp IX预处理2 h后给予0.5 mmol/L  $H_2O_2$ 。各组继续培养2、6、12 h后进行指标测定。

## 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 流式细胞仪检测AEC II凋亡率:**取各组细胞悬液离心弃上清,磷酸盐缓冲液(PBS)重悬;吸取细胞悬液,再离心弃上清,加入膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)结合液重悬;取细胞悬液与Annexin V-FITC室温避光孵育,碘化丙啶(PI)冰水混合物避光混合,用流式细胞仪(Becton Dickinson, 美国)检测AEC II凋亡率,操作按试剂盒说明书步骤进行,Cell quest分析软件进行分析。实验重复6次。

**1.3.2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测活化天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)、细胞色素-C(Cyt-C)表达:**取各组细胞悬液,冰上操作,PBS洗2次,加入苯甲基磺酰氟(PMSF)及RIPA裂解液裂解,离心取上清,进行BCA蛋白定量。根据不同蛋白分子质量配制不同浓度十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶,取50  $\mu\text{g}$ 蛋白上样电泳分离、电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,5%脱脂奶粉的PBS封闭,孵育一抗,加含吐温20的磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤后避光孵育二抗,荧光扫描读取蛋白量,结果以待测蛋白与内参的灰度值比值表示。

**1.4 统计学处理:**所有数据采用SPSS 17.0软件进行统计学分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,重复测量数据采用多因素方差分析,同时进行相关回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 细胞鉴定:**经提取、纯化、培养24 h后,倒置显微镜下观察,AEC II细胞呈梭形大量贴壁,形成岛状,胞质内可见细小颗粒,生长良好。透射电镜下可见细胞体积较大,形状接近圆形,表面有粗细不一、长短不等的微绒毛,核居中、明显,且胞质含有不同

成熟阶段、大小不一、数量不等的嗜铁性板层小体，层叠呈剥开的“洋葱皮”状(见图1)。

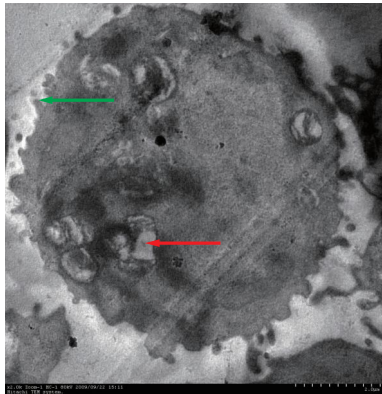


图1 透射电镜下鉴定II型肺泡上皮细胞(AEC II) 红色箭头示嗜铁性板层小体,绿色箭头示微绒毛 醋酸铀-枸橼酸铅双染 ×2000

2.2 细胞凋亡率(表1;图2):药物干预前各组细胞存活率均大于95%,细胞生长良好;药物干预各组随H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激氧化时间延长,诱导AEC II细胞凋亡率逐渐增加。与A组比较,B组各时间点AEC II细胞凋亡率均明显增加(均P<0.05);与B组比较,C组

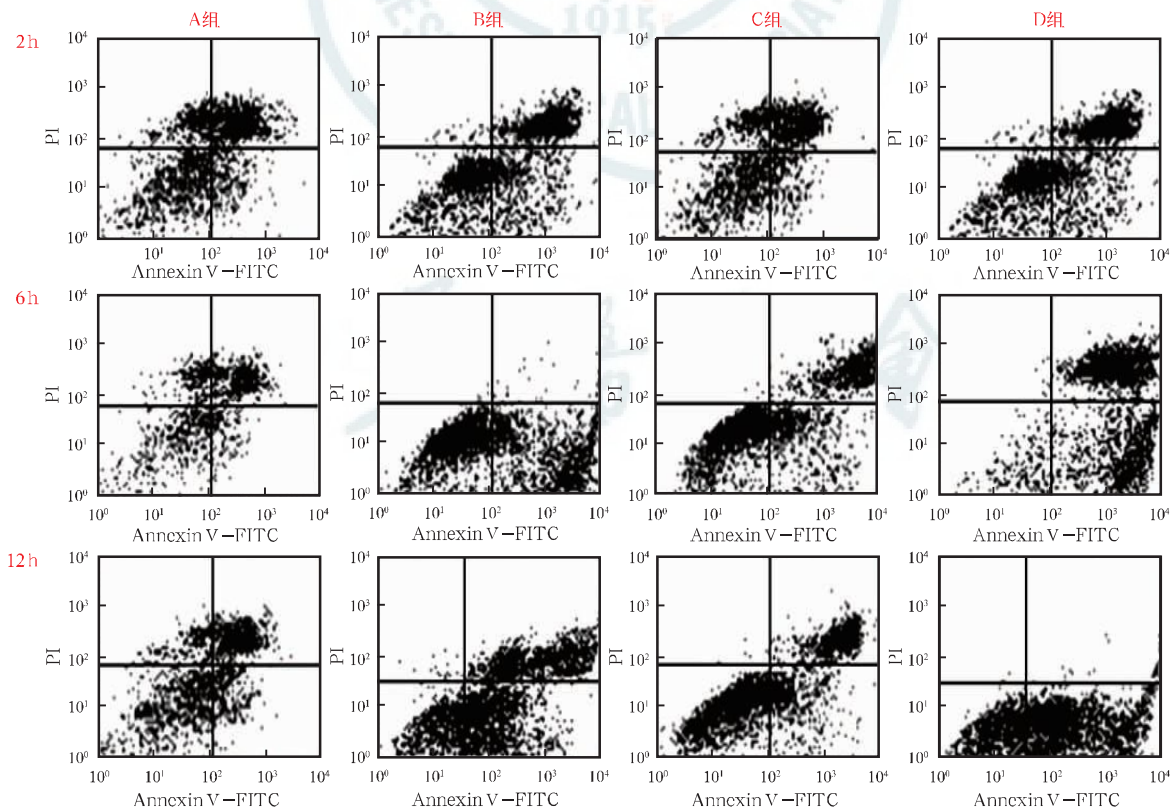
各时间点AEC II细胞凋亡率均明显降低(均P<0.05);与C组比较,D组各时间点AEC II细胞凋亡率均明显增加(均P<0.05)。

表1 HO-1预处理对原代培养大鼠AEC II细胞凋亡率的影响(̄x±s)

组别	样本数	AEC II 凋亡率(%)		
		2 h	6 h	12 h
A组	6	5.16 ± 0.57	5.95 ± 0.71	7.56 ± 0.80
B组	6	20.83 ± 1.55 <sup>a</sup>	27.14 ± 1.53 <sup>a</sup>	35.66 ± 0.74 <sup>a</sup>
C组	6	11.46 ± 1.47 <sup>b</sup>	12.30 ± 1.37 <sup>b</sup>	12.62 ± 1.39 <sup>b</sup>
D组	6	24.33 ± 1.36 <sup>c</sup>	31.67 ± 1.24 <sup>c</sup>	36.93 ± 2.40 <sup>c</sup>

注:HO-1为血红素加氧酶-1,AEC II为II型肺泡上皮细胞,A组为对照组,B组为过氧化氢损伤组,C组为HO-1预处理组,D组为HO-1抑制剂组;与A组比较,<sup>a</sup>P<0.05;与B组比较,<sup>b</sup>P<0.05;与C组比较,<sup>c</sup>P<0.05

2.3 AEC II细胞中活化caspase-3、Cyt-C蛋白表达(表2;图3):各组细胞药物干预后caspase-3、Cyt-C表达量随H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>刺激时间延长均呈增加趋势,且呈明显正相关。组间比较显示,与A组比较,B、D两组caspase-3、Cyt-C表达量明显增加(均P<0.05);与B组比较,C组caspase-3、Cyt-C表达量明显减少



注:AEC II为II型肺泡上皮细胞,Annexin V-FITC为膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素,PI为碘化丙啶,A组为对照组,B组为过氧化氢损伤组,C组为血红素加氧酶-1(HO-1)预处理组,D组为HO-1抑制剂组

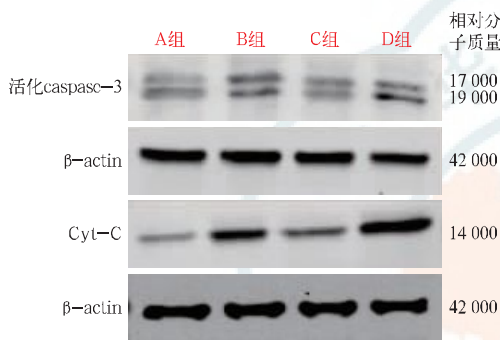
图2 流式细胞仪检测各组原代培养大鼠AEC II药物干预2、6、12 h细胞凋亡情况

表 2 HO-1 预处理对原代培养大鼠 AEC II 细胞活化 caspase-3、Cyt-C 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	活化 caspase-3(灰度值)			Cyt-C(灰度值)		
		2 h	6 h	12 h	2 h	6 h	12 h
A 组	6	0.300 ± 0.057	0.360 ± 0.052	0.640 ± 0.073	0.240 ± 0.058	0.360 ± 0.048	0.450 ± 0.078
B 组	6	0.650 ± 0.072 <sup>a</sup>	0.960 ± 0.118 <sup>a</sup>	1.830 ± 0.220 <sup>a</sup>	0.390 ± 0.069 <sup>a</sup>	0.670 ± 0.120 <sup>a</sup>	1.360 ± 0.112 <sup>a</sup>
C 组	6	0.250 ± 0.039 <sup>b</sup>	0.470 ± 0.080 <sup>b</sup>	0.680 ± 0.099 <sup>b</sup>	0.250 ± 0.074 <sup>b</sup>	0.340 ± 0.043 <sup>b</sup>	0.470 ± 0.072 <sup>b</sup>
D 组	6	0.720 ± 0.052 <sup>c</sup>	1.060 ± 0.109 <sup>c</sup>	1.880 ± 0.159 <sup>c</sup>	0.500 ± 0.110 <sup>c</sup>	0.860 ± 0.050 <sup>c</sup>	1.480 ± 0.140 <sup>c</sup>

注:HO-1 为血红素加氧酶-1,AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞,caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3,Cyt-C 为细胞色素 C,A 组为对照组,B 组为过氧化氢损伤组,C 组为 HO-1 预处理组,D 组为 HO-1 抑制剂组;与 A 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 B 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 C 组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

(均  $P < 0.05$ ); 与 C 组比较,D 组 caspase-3、Cyt-C 表达量均明显增加(均  $P < 0.05$ )。



注:HO-1 为血红素加氧酶-1,AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞,caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3,Cyt-C 为细胞色素 C, $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白,A 组为对照组,B 组为过氧化氢损伤组,C 组为 HO-1 预处理组,D 组为 HO-1 抑制剂组

图 3 蛋白质免疫印迹试验检测 HO-1 预处理对原代培养大鼠 AEC II 细胞活化 caspase-3、Cyt-C 蛋白表达的影响

### 3 讨论

AEC 分为 I 型和 II 型(AEC I 和 AEC II)。AEC I 是肺泡上皮的主要细胞,覆盖 95%的肺泡表面,由 AEC II 分化而来;AEC II 是 AEC 的干细胞,具有多种重要功能,如合成、贮存和分泌 PS,可以转化为 AEC I 参与肺泡更新和损伤修复,调节肺泡液体量和成分,参与免疫调节等<sup>[16-17]</sup>。ALI/ARDS 时大量 AEC I 受损,而 AEC I 主要由 AEC II 增殖和分化<sup>[18]</sup>来修复,因此,AEC II 过度凋亡可引起 AEC 修复障碍,从而导致弥漫性肺泡上皮细胞和肺泡-毛细血管屏障受损。此外,AEC II 是 AEC 中 ROS 袭击的靶细胞<sup>[19-20]</sup>,其损伤后可引起 PS 生成减少,导致肺水肿、透明膜形成以及肺不张等一系列病理变化。因此,肺保护关键在于降低 AEC II 凋亡率。

HO-1 是人体最易诱导的抗凋亡、抗氧化酶之一,是血红素降解的第一个限速酶,它使血红素中间位置碳链断裂,反应产生与血红素等摩尔的胆绿素、 $Fe^{2+}$  和一氧化碳(CO)<sup>[21]</sup>。本课题组前期研究发现,低浓度 HO-1(0.01~10  $\mu\text{mol/L}$ )可保护氧化所致肺损

伤,且不同浓度 HO-1 对氧化损伤后 AEC II 生长有不同保护效应<sup>[11]</sup>;还有研究发现,HO-1 可降低  $H_2O_2$  氧化损伤所导致的 AEC II 凋亡率,并且稳定线粒体跨膜电位,其抗 AEC II 凋亡作用可能通过调控 Bcl-2、p53 蛋白表达来实现<sup>[22]</sup>。

本实验通过分离、提纯 SD 大鼠 AEC II,经透射电镜鉴定后原代培养 24 h,通过流式细胞仪检测细胞活性,发现活性良好,且凋亡率低;说明实验所选检测试剂未对细胞凋亡率造成影响。分组后继续培养,实验结果显示,正常的原代培养 AEC II 随时间推移均存在凋亡现象。而  $H_2O_2$  氧化损伤后,AEC II 凋亡率随损伤时间延长明显增加。HO-1 预处理后,AEC II 凋亡率较  $H_2O_2$  损伤组明显受抑制。HO-1 抑制剂组 AEC II 凋亡率明显高于 HO-1 预处理组。表明 HO-1 预处理可能具有抗氧化损伤作用,可减轻 AEC II 的凋亡。

细胞凋亡信号转导主要有 3 条途径:① Fas/FasL 通路,通过激活 caspase-8 前体和下游 caspase-3 前体,介导细胞凋亡;② 内质网激活,引起  $Ca^{2+}$  释放,打破了  $Ca^{2+}$  稳态,从而导致 caspase-12 前体的激活,介导细胞凋亡;③ 最重要的、也是脊椎动物体内最主要的线粒体通路,是通过释放 Cyt-C 激活 caspase-9 前体,继而激活 caspase-3 前体,介导细胞凋亡。Cyt-C 是由细胞核核基因编码表达、相对分子质量为 14 000 的水溶蛋白,以电稳定性结合于线粒体内膜外侧,处于呼吸链复合体 III ~ IV 之间。凋亡启动后,Cyt-C 通过线粒体外膜释放,在 ATP/dATP 存在下,Cyt-C 与凋亡蛋白因子 1(Apaf-1)以 2 : 1 结合形成寡聚体(apoptosome),通过 Apaf 1 氨基端与 caspase-9 前体功能前区相互作用,触发 caspase 级联反应<sup>[23-24]</sup>,首先使 caspase-9 发生自身活化,继而激活其下游的 caspase-3,导致细胞凋亡。一般认为,Fas/FasL 与线粒体通路的 Cyt-C 均能激活 caspase 系统,Fas/FasL 通过激活 caspase-8 继而激活下游的 caspase-3,但并不是主要激活 caspase-3 的方式。本

实验通过检测细胞凋亡率、活化 caspase-3 及 Cyt-C 表达,并对实验结果进行相关性分析,发现随细胞凋亡率的上升,Cyt-C 表达上升,同时活化 caspase-3 表达量也明显增加。Tafari 等<sup>[25]</sup>研究推测线粒体释放 Cyt-C 途径是激活 caspase-3 的主要途径,与实验结果一致。

已证实 HO-1 对离体培养 24 h 的 AEC II 凋亡具有保护作用,其作用机制较复杂,线粒体凋亡通路在其中起重要作用,而 Cyt-C、caspase-3 是关键。我们推测其作用机制可能与降低 Cyt-C、caspase-3 表达,抑制线粒体凋亡通路有关。本研究结果显示,与对照组进行对比,H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 损伤组 AEC II 中活化 caspase-3 蛋白表达有所升高,与 AEC II 细胞凋亡率上升成正比;而 HO-1 预处理组活化 caspase-3 蛋白表达量与对照组较为接近;而 HO-1 抑制剂组活化 caspase-3 蛋白表达量与损伤组较为接近。Cyt-C 的表达与活化 caspase-3 表达相吻合:与对照组比较,损伤组 AEC II 的 Cyt-C 表达量有所增加,而 HO-1 预处理组 Cyt-C 表达量与对照组接近;HO-1 抑制剂组 Cyt-C 表达量与损伤组接近。实验发现 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致氧化损伤 AEC II 细胞凋亡率及 Cyt-C、活化 caspase-3 的表达量、活性同时升高,说明 Cyt-C 及活化 caspase-3 的表达及活性关系到 AEC II 的凋亡,也证实了 HO-1 具有抗凋亡作用,且其机制可能通过抑制线粒体凋亡通路释放 Cyt-C,继而抑制 caspase 级联反应,降低活化 caspase-3 表达实现。本实验结果与 Kawasaki 等<sup>[26]</sup>实验结果相吻合。

综上所述,HO-1 预处理可减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化损伤后 12 h 内的 AEC II 凋亡,并抑制 caspase-3 活化和 Cyt-C 表达,从而产生抗凋亡作用。从而证实:①AEC II 凋亡在 ALI/ARDS 发病过程中起重要作用,其凋亡与 caspase-3 关系密切;②H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可通过 caspase-3 等促使 AEC II 凋亡;③HO-1 在细胞水平也可发挥抗凋亡效应,其机制可能是通过下调 caspase-3 从而抑制线粒体凋亡通路。

参考文献

[1] Xiang M, Fan J. Pattern recognition receptor-dependent mechanisms of acute lung injury[J]. Mol Med, 2010, 16 (1-2): 69-82.  
 [2] Galani V, Tatsaki E, Bai M, et al. The role of apoptosis in the pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): an up-to-date cell-specific review[J]. Pathol Res Pract, 2010, 206 (3): 145-150.  
 [3] 王燕, 陆权, Feistein S, SHELDON, 等. 脂质抗氧化酶 Peroxiredoxin 6 对急性肺损伤的抗氧化保护作用[J]. 中华儿科杂志, 2008, 46(10): 739-744.  
 [4] Martin TR, Nakamura M, Matute-Bello C. The role of apoptosis in acute lung injury[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4 Suppl): S184-188.  
 [5] Liang X, Wei SQ, Lee SJ, et al. p62 sequestosome 1/light chain 3b

complex confers cytoprotection on lung epithelial cells after hyperoxia[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48(4): 489-496.  
 [6] Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death [J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 835-840.  
 [7] Kinnally KW, Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 857-868.  
 [8] Husari AW, Khayat A, Awdeh H, et al. Activated protein C attenuates acute lung injury and apoptosis in a hyperoxic animal model[J]. Shock, 2010, 33(5): 467-472.  
 [9] Zhang M, Lin L, Lee SJ, et al. Deletion of caveolin-1 protects hyperoxia-induced apoptosis via survivin-mediated pathways[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(5): 1945-953.  
 [10] 钱明江, 陈森, 王洪敏, 等. 阿司匹林预处理对原代培养大鼠 II 型肺泡上皮细胞抗氧化损伤的影响研究 [J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(4): 247-250.  
 [11] 王洪敏, 钱明江, 陈森, 等. 血红素加氧酶-1 预处理对大鼠肺泡 II 型上皮细胞氧化损伤的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2010, 30(11): 1372-1374.  
 [12] 符跃强, 蒋静, 陈娟, 等. 大鼠肺泡 II 型上皮细胞的培养、鉴定及体外特性初步研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(5): 1988-1990.  
 [13] 戢慧, 陈森, 钱明江, 等. II 型肺泡上皮细胞凋亡相关微小 RNA 的筛选[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25(9): 546-549.  
 [14] 谭泽龙, 陈森, 曹海军, 等. 血红素加氧酶-1 对急性肺损伤大鼠肺泡 II 型上皮细胞的保护作用 [J]. 临床麻醉学杂志, 2012, 28(4): 406-408.  
 [15] 胡杰, 陆元兰, 曾慧, 等. N-乙酰半胱氨酸对急性肺损伤大鼠肺组织转化生长因子-β1 表达影响的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(1): 51-53.  
 [16] Fernandes AB, Zin WA, Rocco PR. Corticosteroids in acute respiratory distress syndrome [J]. Braz J Med Biol Res, 2005, 38(2): 147-159.  
 [17] Raghavendran K, Pryhuber GS, Chess PR, et al. Pharmacotherapy of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. Curr Med Chem, 2008, 15(19): 1911-1924.  
 [18] Nishina K, Mikawa K, Morikawa O, et al. The effects of intravenous anesthetics and lidocaine on proliferation of cultured type II pneumocytes and lung fibroblasts[J]. Anesth Analg, 2002, 94(2): 385-388.  
 [19] Lee HS, Kim CK. Effect of recombinant IL-10 on cultured fetal rat alveolar type II cells exposed to 65%-hyperoxia [J]. Respir Res, 2011, 12: 68.  
 [20] Lee HS, Kim CK. Cathepsin B is activated as an executive protease in fetal rat alveolar type II cells exposed to hyperoxia [J]. Exp Mol Med, 2011, 43(4): 223-229.  
 [21] 朱子夫. HO-1 抗氧化损伤的研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(15): 2266-2270.  
 [22] 吴艳, 陈森, 吴双, 等. 血红素加氧酶-1 对原代培养大鼠肺泡 II 型上皮细胞凋亡及线粒体跨膜电位的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23(11): 658-660.  
 [23] Zou H, Li Y, Liu X, et al. An APAF-1, cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11549-11556.  
 [24] Hu Y, Benedict MA, Ding L, et al. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis[J]. EMBO J, 1999, 18(13): 3586-3595.  
 [25] Tafari M, Schneider TG, Pastorino JG, et al. Cytochrome c-dependent activation of caspase-3 by tumor necrosis factor requires induction of the mitochondrial permeability transition[J]. Am J Pathol, 2000, 156(6): 2111-2121.  
 [26] Kawasaki M, Kuwano K, Hagimoto N, et al. Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor[J]. Am J Pathol, 2000, 157(2): 597-603.

(收稿日期: 2013-12-30)

(本文编辑: 李银平)