

氧化应激诱导肺泡 II 型上皮细胞凋亡时 NF- κ B 和 Bak 的表达变化

符跃强, 刘成军, 陈应富, 李 静, 胡 兰, 卢仲毅, 许 峰

(重庆医科大学附属儿童医院重症医学科、儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室、重庆市发育重大疾病诊治与预防国际科技合作基地, 重庆 400014)

【摘要】目的:探讨氧化应激状态下肺泡 II 型(alveolar type II, AT II)上皮细胞的凋亡情况及核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 和 Bak 表达变化。**方法:**原代培养大鼠 AT II 细胞, 用过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2) 500 μ mol/L 处理不同时间, 建立氧化损伤性细胞模型。相差显微镜下观察细胞形态变化。流式细胞仪检测 H_2O_2 刺激后细胞凋亡率的变化。蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 AT II 细胞受 H_2O_2 刺激后 NF- κ B p65 和 Bak 的表达变化。免疫荧光染色后, 激光共聚焦显微镜下观察 NF- κ B p65 的变化和细胞内分布情况。**结果:**受 H_2O_2 刺激 3 h 后, AT II 细胞体积减小, 胞内颗粒数目减少, 细胞核固缩。与正常对照组比较, 受 H_2O_2 刺激 1 h 和 3 h 后, AT II 细胞的凋亡率明显上升($P=0.000$, $P=0.000$)。Western blot 检测发现 H_2O_2 刺激 3 h 后, 细胞核内 NF- κ B p65 的表达明显增加($P=0.000$), AT II 细胞 Bak 蛋白的表达增加($P=0.000$)。激光共聚焦显微镜观察发现正常细胞 NF- κ B p65 表达微弱, H_2O_2 刺激 3 h 后, NF- κ B p65 表达明显增强, 主要集中分布于细胞核。**结论:**氧化应激能诱导 AT II 细胞凋亡, 在此过程中 NF- κ B p65 在细胞核内的表达增加, Bak 的表达也增加, 两者参与了 AT II 细胞的凋亡。

【关键词】肺泡 II 型上皮细胞; 凋亡; Bak; 核因子 κ B**【中图分类号】**R322.35; R725.6**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-03-20

Expression of NF- κ B and Bak in oxidative stress-induced apoptosis of alveolar type II epithelial cells

Fu Yueqiang, Liu Chengjun, Chen Yingfu, Li Jing, Hu Lan, Lu Zhongyi, Xu Feng

(Department of Critical Care Medicine, the Children's Hospital, Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorder; Key Laboratory of Pediatrics in Chongqing; Chongqing International Science and Technology Cooperation for Child Development and Disorder)

【Abstract】Objective: To investigate the changes of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 and Bak expression during the apoptosis of type II (AT II) epithelial cells induced by oxidative stress, and the apoptotic outcomes of AT II cells as well. **Methods:** Primary AT II cells were separated, purified and cultured from adult Sprague-Dawley rats treated with 500 μ mol/L hydrogen peroxide (H_2O_2) for different periods of time, with the purpose of establishing an apoptotic cell model by oxidative injuries. The change of cell morphology was explored by phase contrast microscope. Apoptotic ratio was measured by flow cytometry. The changes in expression of NF- κ B p65 and Bak were investigated by Western blot. The location of NF- κ B p65 was detected by immunofluorescence and observed under laser confocal microscopy. **Results:** After exposure to H_2O_2 for 3 h, AT II cells turned smaller, with karyopycnosis and reduction of cytoplasmic granules. The cell apoptotic ratios after exposure to H_2O_2 for 1 h and 3 h were both increased obviously ($P=0.000$, $P=0.000$), compared with those of normal control group. Western blot detected that the nucleic expression of NF- κ B p65 and the expression of Bak after exposure to H_2O_2 for 3 h were increased remarkably compared with those of normal control group ($P=0.000$, $P=0.000$). The nucleic translocation of NF- κ B p65 after H_2O_2 treatment was also increased in the merged images under laser confocal microscopy. **Conclusion:** High level of oxidative stress induces AT II cells apoptosis and up-regulates the nuclei expression of NF- κ B p65 and the expression of Bak.

【Key words】alveolar type II epithelial cells; apoptosis; Bak; nuclear factor- κ B

作者介绍: 符跃强, Email: fuyueqiang@sina.com,

研究方向: 高氧肺损伤。

通信作者: 许 峰, Email: xufeng9899@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30370618)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000349.html>

高氧机械通气疗法是临床上治疗急性呼吸衰竭的常规措施。但是长期吸入高氧,却可带来氧化应激性肺损伤^[1-2]。目前高氧肺损伤的发病机制尚不完全明确,但较多研究认为肺泡上皮细胞凋亡是导致疾病发生发展的重要原因。肺泡Ⅱ型(alveolar type Ⅱ, ATⅡ)上皮细胞作为肺泡上皮的“干细胞”,能转化为肺泡Ⅰ型上皮细胞,修复受损的肺泡上皮^[3]。但是高氧暴露时 ATⅡ细胞本身也遭受活性氧(reactive oxygen species, ROS)的攻击而发生死亡,导致了肺损伤的发生和发展。

核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是细胞内重要的核转录调控因子, Bak 是细胞凋亡途径中重要的促凋亡因子,它们的活动和表达对细胞的功能和命运有重要影响,但目前尚不清楚氧化应激下 ATⅡ细胞凋亡过程中 NF- κ B 和 Bak 的表达情况。本研究以体外培养的原代大鼠 ATⅡ细胞为研究对象,用 H_2O_2 处理模拟机体活性氧攻击损伤 ATⅡ细胞的体内情况,建立氧化损伤性细胞模型,观察氧化应激下 NF- κ B p65 及 Bak 的表达变化和细胞内分布情况,初步探讨 NF- κ B 及 Bak 对 ATⅡ细胞凋亡中的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料

清洁级雄性 SD 大鼠,体质量 180~200 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。胰蛋白酶(美国 BBI 公司),脱氧核糖核酶 I (DNase I)(北京鼎国生物技术有限责任公司),DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司),大鼠 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(美国 BD Biosciences Pharmingen 公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),NF- κ B p65 多克隆抗体(美国 Santa 公司),BCA 蛋白定量检测试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司),化学发光试剂盒(美国 Pierce 化学品公司),Mitotracker Red(美国 invitrogen 公司),荧光显微镜(德国 Leica 公司),激光共聚焦显微镜(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 原代大鼠 ATⅡ细胞的原代培养 按已报道的方法^[4]进行 ATⅡ细胞的分离、纯化、原代培养及鉴定,制备细胞以供使用。

1.2.2 氧化损伤性细胞模型制备 H_2O_2 刺激 1 h 组加入含终浓度为 500 μ mol/L H_2O_2 的无血清培养基刺激细胞 1 h, H_2O_2 刺激 3 h 组加入含终浓度为 500 μ mol/L H_2O_2 的无血清培养基刺激细胞 3 h,而正常对照组仅予无血清培养基。

1.2.3 细胞形态学观察 在倒置显微镜下观察细胞形态、大

小和内在结构变化,并拍照记录。

1.2.4 Annexin V/PI 双标记法检测细胞凋亡 消化并收集各组贴壁细胞, PBS 洗 2 次,重悬于结合液(10 mmol/L HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L $CaCl_2$)中,吹打成单细胞悬液。取细胞悬液与 Annexin V-FITC 及 PI 于室温下黑暗处孵育 15 min,流式细胞仪(FACScalibur, BD 公司)检测, CellQuest 分析软件进行分析。

1.2.5 NF- κ B p65 免疫荧光检测 H_2O_2 处理所需时间后, PBS 轻轻漂洗细胞 3 次,以 1 μ mol/L Mitotracker Red 孵育细胞 15 min 标记细胞线粒体。以 PBS 漂洗细胞爬片 3 次,以纯甲醇 -20 $^{\circ}C$ 下固定细胞爬片 15 min。以 PBS 水化细胞,再在室温下以 1%BSA 液封闭 10 min,与 NF- κ Bp65 抗体(1:100)在 4 $^{\circ}C$ 下孵育过夜,以 PBS 充分漂洗后, FITC 标记山羊抗兔 IgG 在室温暗箱中孵育 1 h。再以 PBS 充分漂洗,晾干,甘油封片。激光共聚焦显微镜下观察并采集图像,放大倍数 200 倍,每张爬片随机选取 3 个视野。

1.2.6 细胞核蛋白提取 收集细胞。 PBS 轻轻漂洗 1 次,吸尽液体后,每孔加入核蛋白提取试剂 A(100 mmol/L HEPES pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF, 1%NP-40),在冰上作用 10 min,期间在振荡器作用 10 s $\times$ 3 次, 4 $^{\circ}C$,离心 12 000 r/min $\times$ 30 s,提取细胞核。细胞核中加入核蛋白提取试剂 C(20 mmol/L HEPES pH 7.9, 0.42 mol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L PMSF, 20%甘油),在冰上作用 20 min,期间在振荡器作用 10 s $\times$ 3 次,离心 10 000 r/min $\times$ 3 min,抽取上清液, -70 $^{\circ}C$ 保存。

1.2.7 细胞总蛋白提取 将预冷的 RIPA 细胞裂解液按每孔 60 μ l 加至经过漂洗的细胞中,冰上放置 10 min。转移至 EP 管,冰浴 20 min,期间在振荡器上作用 15 s,共 3 次。于 4 $^{\circ}C$ 以 12 000 r/min 将裂解物离心 20 min,抽取上清液, -70 $^{\circ}C$ 保存。

1.2.8 Western blot 检测 Bak 及 NF- κ B p65 的表达 BCA 法定量蛋白,取 45 μ g 蛋白质上样, 12%SDS-PAGE 电泳,电转移至 PVDF 膜, TBS 洗涤 3 次, 5%脱脂奶粉封闭 1 h 后, TBST 洗涤 3 次,分别与 NF- κ B p65(1:1 000)或 Bax(1:1 000), 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜,与辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(1:2 000) 37 $^{\circ}C$ 孵育 1 h, ECL 法检测, Quantity One 4.5.0 软件分析各蛋白条带的校对积分光密度。将某对照组蛋白/内参的值设定为 1,目的蛋白/相应内参的值以此为参照得到相对值,进行统计学分析。

1.3 统计学方法

SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多样本均数比较用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD- t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 光镜下观察 H_2O_2 刺激后细胞形态变化

正常对照组细胞生长良好,细胞质内颗粒较多,细胞间

连接紧密;而受 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激 3 h 后,部分细胞体积减小,胞内颗粒数目减少,细胞核固缩(图 1)。

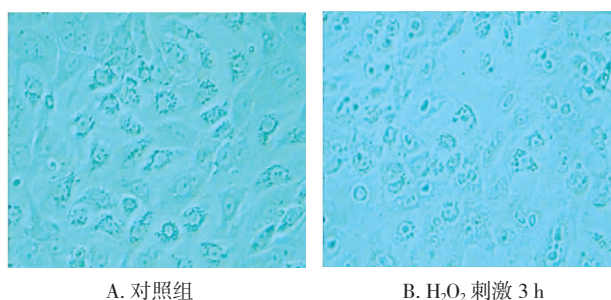


图 1 AT II 细胞的形态变化 (250 $\times$)

Fig.1 Morphological change of AT II cells (250 $\times$)

2.2 H_2O_2 刺激诱导 AT II 细胞凋亡

H_2O_2 刺激 1 h、3 h 后 AT II 细胞发生凋亡。与正常对照组比较,受 H_2O_2 刺激 1 h 和 3 h 后,AT II 细胞的凋亡率明显上升($P=0.000$, $P=0.000$)。见表 1。

表 1 500 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激不同时间后,AT II 细胞凋亡率、NF- κB p65 和 Bak 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab.1 Apoptotic ratios, the expression of NF- κB p65 and Bak after various times of H_2O_2 treatment ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

H_2O_2 刺激不同时间	细胞凋亡率 (%)	Bak 相对光密度	NF- κB p65 相对光密度
对照组 (0 h)	3.19 ± 1.09	1.06 ± 0.17	1.04 ± 0.14
1 h	9.06 ± 1.75^a	1.22 ± 0.19	1.56 ± 0.23^a
3 h	15.05 ± 2.73^a	1.65 ± 0.29^a	3.46 ± 0.27^a
F 值	54.002	10.998	200.041
P 值	0.000	0.001	0.000

注:a,与正常对照组比较, $P < 0.05$

2.3 H_2O_2 刺激诱导 NF- κB p65 的核内表达增加

Mitotracker Red 能特异性标记细胞线粒体,在激光共聚焦显微镜下发出红色荧光;经免疫荧光,以 FITC 标记山羊抗兔 IgG 来显示 NF- κB p65 的表达,在激光共聚焦显微镜下发出绿色荧光,同一视野图片叠加以后,可观察 NF- κB p65 在细胞内的分布情况。正常细胞 NF- κB p65 的表达十分微弱,而 H_2O_2 刺激 AT II 细胞 3 h 后,视野中几乎所有的细胞 NF- κB p65 表达明显增加,而且 NF- κB p65 主要表达部位在细胞核内,细胞质内 NF- κB p65 的表达无明显变化(图 2)。

2.4 H_2O_2 刺激诱导 Bak 和核内 NF- κB p65 的表达变化

Western blot 检测发现与对照组比较,受 H_2O_2 刺激 1 h 后 Bak 的表达无明显变化($P=0.258$),刺激 3 h 后, Bak 表达增加($P=0.001$)(表 1,图 3)。另外,正常对照组细胞核内 NF- κB p65 较为微弱, H_2O_2 刺激 1 h 后,核内 NF- κB p65 的表达增加($P=0.001$), H_2O_2 刺激 3 h 后,核内 NF- κB p65 的表达明显增加($P=0.000$)(表 1,图 3)。

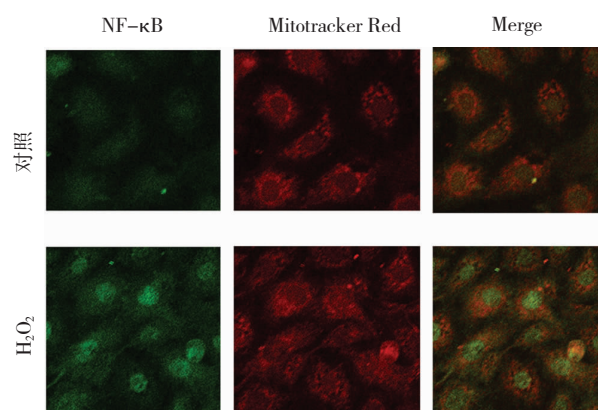


图 2 激光共聚焦显微镜下观察 H_2O_2 刺激可明显增加 NF- κB p65 的表达 (200 $\times$)

Fig.2 Increased expression of NF- κB p65 after H_2O_2 stimulating under laser confocal microscopy (200 $\times$)

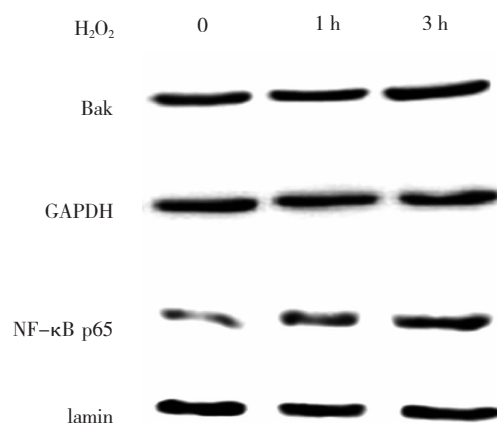


图 3 Western blot 检测 H_2O_2 刺激后 Bak 和 NF- κB p65 的表达变化

Fig.3 Expression of Bak and NF- κB p65 after H_2O_2 stimulating detected by Western blot

3 讨论

目前高氧肺损伤防治的根本难题是内源性肺泡上皮不能恢复,肺修复过程中不是由正常肺泡上皮细胞替代,而是由成纤维细胞替代形成肺纤维化,最终导致肺呼吸功能的丧失。AT II 细胞是肺泡上皮细胞的干细胞,能转化为肺泡 I 型上皮细胞,修复受损肺泡上皮。高氧暴露下产生的 ROS 是导致肺组织损伤和细胞死亡的主要原因^[5-6]。故研究氧化应激下 AT II 细胞的凋亡机制与特定信号的活化,有助于对高氧肺损伤的防治。

核因子 NF- κB 与细胞损伤、炎症因子的分泌、应激反应和细胞凋亡有密切联系^[7]。NF- κB 主要是

由 p50 和 p65 两个亚单位构成的异源二聚体,正常时 p65 与抑制蛋白 I- κ B 非共价结合,处于 p50-p65-I- κ B 的多聚体状态而锚定于胞质。外界刺激可通过激活 I- κ B 激酶,导致 I- κ B 的降解,使 p50 和 p65 快速转移至胞核,发挥转录调控作用。多种病理刺激引起肺组织及肺泡上皮细胞的损伤过程中有 NF- κ B 的活化。穿心莲内酯通过抑制 NF- κ B 的激活而对脂多糖诱导的肺损伤起到保护作用^[8]。Gentry 等^[9]发现人原代 AT II 细胞给予土拉热杆菌刺激后,细胞将释放 IL-8;如预先给予 NF- κ B 特异性抑制剂处理后再给刺激,细胞释放 IL-8 的量将减少。本研究发现正常 AT II 细胞核内 NF- κ B p65 的表达微弱,而 H₂O₂ 刺激 3 h 后其核内表达增强,提示氧化应激下 NF- κ B 可转入细胞核内,发挥其核转录因子的调节作用,促进 AT II 细胞的凋亡。

Bcl-2 家族可分为促凋亡成员(如 Bax、Bad、Bid、Bak 等)和抗凋亡成员(如 Bcl-2、Bcl-XL 等)两大类。Bak 和 Bax 结构和功能非常相似,都能引起线粒体膜电位的改变,导致细胞色素 c 的释放,促进细胞凋亡。既往研究表明在 H₂O₂ 刺激以时间依赖的方式诱导 AT II 细胞凋亡^[10],在凋亡的过程中促凋亡蛋白 Bax 的表达增加^[11]。另外,有研究报道发现在百草枯诱导肺泡上皮细胞凋亡的过程中,Bak mRNA 表达增加^[12]。本研究发现 H₂O₂ 刺激 3 h 后 Bak 的表达增加,提示 Bak 作为促凋亡因子参与了氧化应激下 AT II 细胞的凋亡。

NF- κ B 作为核转录因子能调控 Bcl-2 家族成员的表达,从而影响细胞的生命活动。以 siRNA 技术沉默 NF- κ B p65 的表达后,可降低 Bax/Bcl-2 的比率,并对 TNF- α 诱导肺泡上皮细胞凋亡起抑制作用^[13]。另外,已有研究发现人神经母细胞瘤细胞经分次照射处理可诱导 NF- κ B 活化,NF- κ B 转入细胞核内与 DNA 结合从而调控 Bak 在内多种基因的表达^[14]。本研究发现 AT II 细胞的凋亡过程中有 NF- κ B 的活化,Bak 表达的增加,NF- κ B 可能参与了 Bak 表达的调控,但两者的确切关系尚有待进一步研究证实。

综上所述,氧化应激能诱导 AT II 细胞凋亡,在此过程中 NF- κ B p65 在细胞核内的表达增加,Bak 的表达也明显增加,从而促进了 AT II 细胞的凋亡。氧化应激下如能有效阻断 Bak 的表达或 NF- κ B 的

活化可能会有效保护 AT II 细胞,维持肺泡的正常功能,从而减轻高氧肺损伤。

参 考 文 献

- [1] Kallet RH, Matthay MA. Hyperoxic acute lung injury[J]. Respir Care, 2013, 58(1): 123-141.
- [2] Alejandre-Alcazar MA, Kwapiszewska G, Reiss I, et al. Hyperoxia modulates TGF- β /BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(2): L537-L549.
- [3] Barkauskas CE, Counce MJ, Rackley CR, et al. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung[J]. J Clin Invest, 2013, 123(7): 3025-3036.
- [4] 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(15): 1988-1990.
- [5] Faller S, Spasov SG, Zimmermann KK, et al. Hydrogen sulfide prevents hyperoxia-induced lung injury by downregulating reactive oxygen species formation and angiopoietin-2 release[J]. Curr Pharm Des, 2013, 19(15): 2715-2721.
- [6] Gore A, Muralidhar M, Espey MG, et al. Hyperoxia sensing: from molecular mechanisms to significance in disease[J]. J Immunotoxicol, 2010, 7(4): 239-254.
- [7] Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways[J]. Nat Immunol, 2011, 12(8): 695-708.
- [8] Zhu T, Wang DX, Zhang W, et al. Andrographolide protects against LPS-induced acute lung injury by inactivation of NF- κ B[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56407.
- [9] Gentry M, Taormina J, Pyles RB, et al. Role of primary human alveolar epithelial cells in host defense against Francisella tularensis infection[J]. Infect Immun, 2007, 75(8): 3969-3978.
- [10] 符跃强, 许 峰, 卢仲毅, 等. 氧化应激对肺泡 II 型上皮细胞的损伤作用及 JNK 信号转导机制[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(11): 1150-1153.
- [11] 符跃强, 卢仲毅, 方 芳, 等. 氧化应激下肺泡 II 型上皮细胞凋亡及 Bax 和 p53 的表达变化[J]. 中国危重病急救医学, 2008, 18(2): 462-465.
- [12] Chen YW, Yang YT, Hung DZ, et al. Paraquat induces lung alveolar epithelial cell apoptosis via Nrf-2-regulated mitochondrial dysfunction and ER stress[J]. Arch Toxicol, 2012, 86(10): 1547-1558.
- [13] Li L, Wu W, Huang W, et al. NF- κ B RNAi decreases the Bax/Bcl-2 ratio and inhibits TNF- α -induced apoptosis in human alveolar epithelial cells[J]. Inflamm Res, 2013, 62(4): 387-397.
- [14] Madhusoodhanan R, Natarajan M, Veeraraghavan J, et al. NF- κ B signaling related molecular alterations in human neuroblastoma cells after fractionated irradiation[J]. J Radiat Res, 2009, 50(4): 311-324.

(责任编辑:冉明会)