论著

文章编号:1000-5404(2008)09-0820-03

氧化应激对肺泡Ⅱ型上皮细胞MAPKs的激活及N-乙酰半胱氨酸的干预作用

符跃强,卢仲毅,方 芳,匡凤梧,王兴勇,许 峰 (重庆医科大学附属儿童医院PICU,重庆 400014)

摘 要:**目的** 探讨氧化应激对肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type Ⅱ epithelial cells, ATⅡ)丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPKs)活化的影响及N-乙酰半胱氨酸(N-Acetylcysteine,NAC)对MAPKs活化及细胞存活凋亡的干预。**方法** 原代培养大鼠ATⅡ,分为4组:正常对照组、NAC组、H_2O_2组和H_2O_2+NAC组。电镜观察H_2O_2刺激后细胞形态改变;四甲基偶氮唑盐反应比色法(MTT法)检测各组细胞存活率;流式细胞术检测凋亡率和细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平;蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测p-ERK、p-p38和p-JNK的表达。**结果** 与正常对照组比较,H_2O_2刺激后ATⅡ呈典型凋亡改变,细胞存活率下降($P<0.05$),凋亡率和细胞内ROS水平上升($P<0.05$),p-ERK、p-p38和p-JNK的表达也明显增加($P<0.05$),而NAC干预后可提高细胞存活率,降低凋亡率和细胞内ROS水平,并抑制p-ERK、p-p38和p-JNK的表达。**结论** 氧化应激能激活MAPKs并诱导ATⅡ凋亡,NAC通过清除细胞内ROS和抑制MAPKs的磷酸化而对ATⅡ起保护作用。

关键词:肺泡Ⅱ型上皮细胞;丝裂原活化蛋白激酶;活性氧;N-乙酰半胱氨酸

中图法分类号:R322.35;R563.02;R977.4 **文献标识码**:A

Protective effects of N-acetylcysteine on oxidative stress-induced alveolar type Ⅱ epithelial cell injury *in vitro*

FU Yue-qiang, LU Zhong-yi, FANG Fang, KUANG Feng-wu, WANG Xing-yong, XU Feng (Department of Emergency, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of oxidative stress on the activation of mitogen activated protein kinases (MAPKs) in alveolar type Ⅱ epithelial cells (ATⅡ) and the protective role of N-acetylcysteine (NAC) in this induced damage. **Methods** Primary rat ATⅡ cells were randomly divided into 4 groups, control, NAC (5 mmol/L), H_2O_2 (500 μmol/L), H_2O_2 plus NAC pretreatment groups. The morphological change of ATⅡ cells was observed under transmitting electron microscopy (TEM) after H_2O_2 stimulation. Cell viability was assessed with 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). Apoptotic ratio and intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured by flow cytometry. The phosphorylation of ERK, p38 and JNK were analyzed by Western blotting. **Results** The typical apoptosis was observed in the cells after H_2O_2 stimulation. Decreased cell viability, increased intracellular ROS and apoptotic ratio were observed after the stimulation of H_2O_2 ($P<0.05$). Pretreatment with NAC improved cell viability, decreased intracellular ROS levels and apoptosis ($P<0.05$). NAC attenuated the phosphorylation of ERK, p38 and JNK induced by H_2O_2 ($P<0.05$). **Conclusion** H_2O_2 activates MAPKs and induces apoptosis in ATⅡ cells. NAC attenuates cells apoptosis through eliminating intracellular ROS and inhibiting the activation of MAPKs.

Key words: alveolar epithelial type Ⅱ cells; mitogen activated protein kinases; reactive oxygen species; N-Acetylcysteine

氧气疗法是临床上治疗呼吸衰竭最常用的手段之一,但长时间持续高浓度用氧可引起氧化应激性肺损伤等不良反应[1,2]。N-乙酰半胱氨酸(N-Acetylcysteine,NAC)是一种有效的抗氧化剂,在多种肺损伤动物模型和临床研究中已证实其对肺损伤及肺纤维化具有明确的防治作用[3,4]。新近研究报道,NAC吸入能减轻高氧暴露下肺组织的损伤[5],但其作用机制尚不清楚。本研究以体外分离培养的大鼠原代肺泡Ⅱ型上皮细胞(alveolar type Ⅱ epithelial cells, ATⅡ)为对

基金项目:国家自然科学基金(30370618);教育部留学回国人员择优项目(2006331);重庆市科委自然科学基金(200621)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30370618) and the Supporting Project of Preferred Overseas Returnees of Ministry of Education of China (2006331) and the Natural Science Foundation of Chongqing (200621)

作者简介:符跃强,男,浙江省嘉兴市人,博士研究生,医师,主要从事高氧肺损伤方面的研究。电话:(023)63632756-3602,E-mail:fuyueqiang@sina.com.cn

通信作者:许 峰,电话:(023)63632664,E-mail:xufeng9899@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-11-08;修回日期:2008-01-28

象，采用 H_2O_2 刺激，复制细胞氧化应激损伤模型，观察氧化应激下 ATⅡ存活凋亡和丝裂原活化蛋白激酶（mitogen activated protein kinases，MAPKs）活化的情况，并探讨 NAC 对细胞凋亡和 MAPKs 活化的影响。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

胰蛋白酶（美国 BBI 公司），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），特级胎牛血清（天津 TBD 公司），NAC（美国 Sigma 公司），Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒（美国 BD Biosciences Pharmingen 公司），DCFH- DA（碧云天生物技术研究所），MTT（美国 Amresco 公司），ERK、p38 和 JNK 磷酸化抗体（美国 CST 公司）。

1.2　实验方法

1.2.1　肺泡Ⅱ型上皮细胞的原代培养　　成年清洁级雄性 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。参照文献[6]的方法，麻醉大鼠，打开胸腔行肺动脉插管，以生理盐水冲净肺血。整体取出肺和气管，气管插管，灌洗肺泡腔 10 次。将 0.08% 胰蛋白酶溶液从气管注入肺泡，作用 20 min 后，去除肺外组织。将肺置于 250 μg/ml DNase Ⅰ和终止血清混合液中，剪至 1 mm^3 小块，筛网过滤，离心，收集细胞。DMEM/F12 培养基重悬，吸附纯化 2 h，离心，用含 20% 血清的培养基重悬，接种至培养板，培养 36 h 备用。

1.2.2　氧化损伤性细胞模型及分组　　吸去培养板中的培养基，正常对照组加入培养基 3 ml，NAC 组加入含终浓度 5 mmol/L NAC 的培养基 3 ml，H_2O_2 组加入含终浓度 500 μmol/L H_2O_2 的培养基 3 ml，H_2O_2 + NAC 组在 H_2O_2 组刺激前 0.5 h 加入含终浓度 5 mmol/L NAC 的培养基 3 ml 预先处理细胞。各组处理 3 h 后进行检测。

1.2.3　电镜鉴定和观察凋亡变化　　经胰酶消化、离心，收集 H_2O_2 组细胞和正常对照组细胞，4% 戊二醛固定 2 h 后换成 0.01 mol/L PBS，送重庆医科大学电镜室处理，以检测细胞内板层小体鉴定 ATⅡ，并观察细胞受 H_2O_2 刺激后的形态变化。

1.2.4　DCFH- DA 法检测细胞内活性氧水平　　各组细胞处理完毕后以培养基冲洗细胞 3 次，6 孔培养板每孔加入 1 ml 培养基稀释的 DCFH-DA（终浓度为 10 μmol/L），在培养箱中孵育 25 min，消化、离心，培养基洗涤细胞 3 次，流式细胞仪以激发波长 488 nm，发射波长 525 nm 检测细胞平均荧光强度，以反映 ROS 水平。

1.2.5　MTT 法检测细胞存活　　细胞以 1×10^6 ml^{-1} 的细胞数接种于 96 孔培养板中，每孔 100 μl。H_2O_2 处理后，吸去孔内液体，每孔加入 5 mg/ml 的 MTT 液 20 μl 和培养基 180 μl，反应 4 h 后，去除培养液，每孔加入二甲亚砜 150 μl，多功能酶标仪检测 492 nm 吸光度值[D(492)]，空白孔调零。

细胞存活率(%) = 处理孔 D(492)/对照孔 D(492) ×100%

1.2.6　Annexin Ⅴ/PI 双标记法检测细胞凋亡　　胰酶消化，离心，收集各组细胞，PBS 洗 2 次，重悬于 400 μl 结合缓冲液（NaCl 140 mmol/L，$CaCl_2$ 2.5 mmol/L，Hepes/NaOH 10 mmol/L，pH 7.4）中，细胞悬液与 Annexin Ⅴ-FITC 及 PI 于黑暗处孵育 15 min，流式细胞仪检测以激发波长 488 nm，Annexin Ⅴ-FITC 通过 FL1 通道，PI 通过 FL2 通道检测，采用 CellQuest 软件进行分析。

1.2.7　Western blot 检测 p-ERK、p-p38 和 p-JNK　　提取细胞总蛋白，BCA 法定量蛋白，各取 30 μg 蛋白上样，12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，电转移至 PVDF 膜，脱脂奶粉封闭，p-ERK、p-p38 和 p-JNK 抗体（1∶1 000）4 ℃孵育过夜，再加入辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶2 000），化学发光法检测，采用 Quantity One 4.5.0 软件分析各蛋白条带的校对积分光密度。将对照组蛋白/内参的值设定为 1，各蛋白/内参的值以此为参照得到相对值，进行统计学分析。

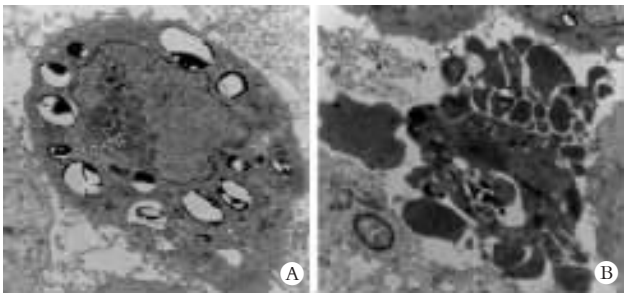
1.3　统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 统计软件，多样本均数比较用单因素方差分析，两组间比较用 t 检验。

2　结果

2.1　H_2O_2 刺激后 ATⅡ的形态变化

ATⅡ在电镜下形态规则，体积较大，细胞质丰富，细胞核周围的细胞质内含“洋葱样”结构的嗜锇小体即板层小体，细胞表面可见微绒毛突起。经 H_2O_2 刺激 3 h 后，ATⅡ表面微绒毛突起消失，细胞崩解变成数个大小不等的凋亡小体，细胞核碎裂（图 1）。



A：正常生长的 ATⅡ（×8 000）；B：ATⅡ受 H_2O_2 刺激后发生凋亡（×6 000）

图 1　电镜观察 H_2O_2 刺激前后 ATⅡ的形态变化

2.2　H_2O_2 和 NAC 对 ATⅡ内 ROS 水平的影响

H_2O_2 组 ATⅡ内 ROS 的水平与正常对照组相比明显上升（$P<0.05$），H_2O_2 + NAC 组细胞内的 ROS 水平与 H_2O_2 组细胞相比明显降低（$P<0.05$，表 1），提示 NAC 干预能明显减轻氧化应激下 ATⅡ内 ROS 的水平。

表 1　NAC 干预对 ATⅡ凋亡率和细胞内 ROS 水平的影响（$n=6$，$\bar{x} \pm s$）

组别	存活率(%)	凋亡率(%)	ROS 平均荧光强度
正常对照组	100.05 ± 2.42	3.19 ± 1.09	23.79 ± 2.68
NAC 组	101.06 ± 2.08	2.89 ± 1.05	23.04 ± 2.25
H_2O_2 组	68.33 ± 4.47[a]	15.05 ± 2.73[a]	42.42 ± 3.81[a]
H_2O_2 + NAC 组	84.40 ± 8.56[ab]	7.82 ± 1.97[ab]	28.89 ± 2.28[b]

a：$P<0.05$，与正常对照组比较；b：$P<0.05$，与 H_2O_2 组比较

2.3　H_2O_2 和 NAC 对 ATⅡ存活率和凋亡率的影响

与正常对照组比较，H_2O_2 组 ATⅡ存活率明显下降（$P<0.05$），而凋亡率明显升高（$P<0.05$）。H_2O_2 + NAC 组与 H_2O_2 组比较细胞存活率明显上升（$P<0.05$），细胞凋亡率明显下降（$P<0.05$，表 1），提示 NAC 干预对氧化应激下 ATⅡ有良好的保护作用。

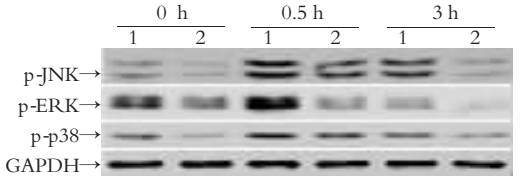
表2 NAC干预对氧化应激下ATⅡ MAPKs表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	p-JNK			p-ERK			p-p38		
	0 h	0.5 h	3 h	0 h	0.5 h	3 h	0 h	0.5 h	3 h
H_2O_2组	0.98±0.17	4.39±0.52[a]	1.82±0.17	1.03±0.16	1.59±0.14[a]	0.33±0.06	1.02±0.10	1.72±0.29[a]	0.96±0.06
H_2O_2+NAC组	0.52±0.07[b]	2.20±0.32[b]	0.73±0.12[b]	0.58±0.07[b]	0.45±0.09[b]	0.14±0.04[b]	0.45±0.05[b]	1.16±0.16[b]	0.55±0.07[b]

a：$P<0.05$，与0 h比较；b：$P<0.05$，与同时间点H_2O_2组比较

2.4 H_2O_2和NAC对ERK、p38和JNK磷酸化的影响

与0 h相比，ERK、p38和JNK三者磷酸化水平在H_2O_2刺激0.5 h后显著升高($P<0.05$)，说明氧化应激能激活MAPKs。而NAC预处理0.5 h后再经H_2O_2刺激，p-ERK、p-p38和p-JNK在0、0.5、3 h的表达水平较单用H_2O_2刺激时降低($P<0.05$，图2，表2)，提示NAC干预能抑制MAPKs的磷酸化表达。



1：H_2O_2组；2：H_2O_2+NAC组

图2 H_2O_2和NAC对JNK、ERK和p38磷酸化的Western blot检测结果

3 讨论

目前认为高氧暴露下产生的活性氧(reactive oxygen species，ROS)是导致肺组织损伤和细胞死亡的主要原因[7]。ATⅡ能主动修复受损的肺泡上皮[8]，维持肺泡的正常结构，但在氧化应激下ATⅡ本身也受到ROS的攻击发生凋亡，从而导致肺损伤并阻碍损伤后的正常修复。本研究表明，H_2O_2刺激3 h后部分ATⅡ出现凋亡改变，MTT法和流式细胞仪检测结果显示H_2O_2组细胞存活率较正常对照组明显下降，而凋亡率则显著上升，证实氧化应激能损伤ATⅡ并诱导其凋亡。

氧化应激可导致ROS在细胞内的累积，当ROS水平超过细胞的抗氧化能力时，ROS可通过激活相关信号而诱导细胞发生凋亡。MAPKs主要由细胞外信号调节激酶(ERK)、p38和c-jun氨基末端激酶(JNK)组成。总体上认为ERK可调节细胞的增殖、分化和存活，而JNK和p38作为应激激活的蛋白激酶，参与多种应激介导的细胞凋亡[9]。但因细胞种类和刺激模型的不同，MAPKs各亚型的作用也不尽相同。

本研究表明，在H_2O_2刺激ATⅡ过程中，ERK、p38和JNK的磷酸化明显增加，同时细胞内ROS的水平明显升高，ATⅡ存活率下降、凋亡率增加，提示MAPKs可能参与了ROS诱导的细胞凋亡。

NAC是一种小分子物质，易通过细胞膜，脱乙酰基后作为谷胱甘肽合成的前体，促进细胞内GSH的合成而维持细胞内氧化还原电势稳定。研究提示NAC可通过调节MAPKs而影响氧化应激状态下细胞的功能和命运：Usatyuk等[10]发现NAC通过抑制p38信号而减轻H_2O_2对肺微血管内皮细胞通透性的破坏。Lee等[11]报道H_2O_2可诱导人神经胶质瘤细胞A172凋亡，NAC通过抑制ERK信号而阻滞A172凋亡。本研究表明，NAC预处理显著降低H_2O_2刺激后细胞内ROS的水平，减轻ERK、p38和JNK的磷酸化，并且明显提高H_2O_2刺激后ATⅡ的存活率，抑制细胞的凋亡，提示NAC可能通过清除ATⅡ内ROS，抑制MAPKs的活化，提高ATⅡ对氧化应激的耐受力。

ATⅡ的功能状态是决定肺损伤病理转归的决定因素。NAC对氧化应激下ATⅡ具有较好的保护作用，在防治高氧肺损伤方面具有一定的应用前景。

参考文献：

[1] Alejandre-Alcazar M A, Kwapiszewska G, Reiss I, *et al*. Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 292(2): L537-L549.

[2] Lian X, Qin Y, Hossain S A, *et al*. Overexpression of Stat3C in pulmonary epithelium protects against hyperoxic lung injury[J]. J Immunol, 2005, 174(11): 7250-7256.

[3] Alkan A, Eroglu F, Eroglu E, *et al*. Protective effects of N-acetylcysteine and erdosteine on hemorrhagic shock-induced acute lung injury[J]. Eur J Emerg Med, 2006, 13(5): 281-285.

[4] Kao S J, Wang D, Lin H I, *et al*. N-acetylcysteine abrogates acute lung injury induced by endotoxin[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33(1-2): 33-40.

[5] Nagata K, Iwasaki Y, Yamada T, *et al*. Overexpression of manganese superoxide dismutase by N-acetylcysteine in hyperoxic lung injury[J]. Respir Med, 2007, 101(4): 800-807.

[6] Dobbs L G. Isolation and culture of alveolar type cells[J]. Am J Physiol, 1990, 258(4 Pt 1): L134-L147.

[7] Barazzone C, White C W. Mechanisms of cell injury and death in hyperoxia: role of cytokines and Bcl-2 family proteins[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2000, 22(5): 517-519.

[8] Mason R J. Biology of alveolar type Ⅱ cells[J]. Respirology, 2006, (11 Suppl): S12-S15.

[9] 罗莉漫，李华强，余 健. 新生鼠高氧肺损伤中p38MAPK的磷酸化[J]. 第三军医大学学报，2006，28(23)：2377-2379.

[10] Usatyuk P V, Vepa S, Watkins T, *et al*. Redox regulation of reactive oxygen species-induced p38 MAP kinase activation and barrier dysfunction in lung microvascular endothelial cells[J]. Antioxid Redox Signal, 2003, 5(6): 723-730.

[11] Lee W C, Choi C H, Cha S H, *et al*. Role of ERK in hydrogen peroxide-induced cell death of human glioma cells[J]. Neurochem Res, 2005, 30(2): 263-267.

(编辑 龙 亮)