DOI:10.16016/j.2097-0927.202112247

A549 细胞氧糖剥夺/恢复模型中焦亡与凋亡的共享信号通路

安雨轩,肖宗懿,王小燕,宋 娟,陈 菲,王寿勇 400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院麻醉科,国家儿童健康与疾病临床医学研究中心,儿童发育疾病研究教育部重点实验室,儿科学重庆市重点实验室

[**摘要**] **目的** 研究氧糖剥夺/恢复(oxygen-glucose deprivation/recovery, OGD/R)对 A549 肺泡上皮细胞凋亡与焦亡的作用,并探讨二者之间的相互影响。**方法** 培养人肺泡 A549 细胞株,建立氧糖剥夺/恢复细胞损伤模型,分为对照组(control),氧糖剥夺/恢复组(OGD/R),氧糖剥夺/恢复复合焦亡抑制剂组(OGD/R+VX-765),氧糖剥夺/恢复复合凋亡抑制剂组(OGD/R+FMK),采用流式细胞术检测细胞凋亡率,采用 ELISA 法测定培养细胞上清中焦亡标志物 IL-1β、IL-18 水平,采用 RT-qPCR 和 Western blot 法测定细胞凋亡和焦亡关键分子的 mRNA 与蛋白质表达水平。**结果** 与对照组比较,OGD/R 组 A549 细胞凋亡率升高[(3.67±0.64)与(12.57±1.97),$P<0.05$]。与 OGD/R 组比较,OGD/R+VX-765 组凋亡率降低[(5.97±1.28),$P<0.05$];与对照组比较,OGD/R 组培养上清中焦亡标志物 IL-1β、IL-18 水平升高[(7.80±0.80)ng/L、(7.99±0.11) ng/L 与(17.35±0.44) ng/L、(18.06±1.73) ng/L,$P<0.05$];与 OGD/R 组比较,OGD/R+FMK 组 IL-1β、IL-18 水平降低[(4.72±0.59)ng/L、(10.24±1.42)ng/L,$P<0.05$];OGD/R 可刺激 A549 细胞凋亡与焦亡关键分子的 mRNA 和蛋白表达;与 OGD/R 组比较,OGD/R+VX-765 组 BID 的 mRNA 和蛋白相对表达量降低[(1.74±0.14)、(1.29±0.09) *vs* (1.12±0.18)、(1.01±0.10),$P<0.05$],OGD/R+FMK 组 GSDME 的 mRNA 和蛋白相对表达量降低[(1.35±0.10)、(1.20±0.06) *vs* (0.94±0.05)、(0.52±0.03),$P<0.05$]。**结论** OGD/R 可同时引发 A549 细胞发生焦亡与凋亡,且细胞焦亡与凋亡存在共享信号通路;两种抑制剂均可同时抑制 OGD/R 引起的 A549 细胞焦亡与凋亡。

[**关键词**] 氧糖剥夺;细胞焦亡;细胞凋亡;A549 肺泡上皮细胞

[**中图法分类号**] R322.35; R329.25; R329.26 [**文献标志码**] A

Shared signaling pathway in pyroptosis and apoptosis in A549 cells induced by oxygen and glucose deprivation/recovery

AN Yuxuan, XIAO Zongyi, WANG Xiaoyan, SONG Juan, CHEN Fei, WANG Shouyong Department of Anesthesiology, National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effects of oxygen and glucose deprivation/recovery (OGD/R) on apoptosis and pyroptosis of A549 cells, and to explore the possibility of the mutual regulation in apoptosis and pyroptosis. **Methods** A549 cells were resuscitated and cultured, randomly divided into control group, OGD/R group, OGD/R+pyroptosis inhibitor group (OGD/R+VX-765) and OGD/R+apoptosis inhibitor group (OGD/R+FMK). The apoptotic rate was detected by flow cytometry, the levels of pyroptosis markers IL-1β

[**基金项目**] 重庆市自然科学基金项目(cstc2020jcyj-msxmX0357)

[**通信作者**] 王寿勇,E-mail: saulwang@126.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

and IL-18 in the supernatant were measured by ELISA, and the expression of key molecules in pyroptosis and apoptosis at mRNA and protein levels were detected by RT-qPCR and Western blotting, respectively. **Results** The apoptotic rate was significantly increased in the OGD/R group than the control group (12.57±1.97 *vs* 3.67±0.64, $P<0.05$), and the rate of the OGD/R+VX-765 group was decreased than that of the OGD/R group (5.97±1.28, $P<0.05$). OGD/R resulted in obvious increased levels of IL-1β and IL-18 in the supernatant (17.35±0.44 *vs* 7.80±0.80 ng/L, 18.06±1.73 *vs* 7.99±0.11 ng/L, $P<0.05$), but FMK treatment notably reversed the increases of 2 inflammatory factors (4.72±0.59, 10.24±1.42 ng/L, $P<0.05$). OGD/R enhanced the mRNA and protein expression levels of key molecules of apoptosis and proptosis in A549 cells. While, VX-765 decreased the mRNA and protein levels of BID (1.12±0.18 *vs* 1.74±0.14, 1.01±0.10 *vs* 1.29±0.09, $P<0.05$), and FMK reduced those of GSDME (0.94±0.05 *vs* 1.35±0.10, 0.52±0.03 *vs* 1.20±0.06, $P<0.05$) when compared with the cells from the OGD/R group. **Conclusion** OGD/R can induce pyroptosis and apoptosis in A549 cells simultaneously, and there exists shared signaling pathway in pyroptosis and apoptosis. Pyroptosis and apoptosis inhibitors can simultaneously inhibit the 2 types of OGD/R-induced cell death.

[**Key words**] oxygen-glucose deprivation; pyroptosis; apoptosis; hypotriploid alveolar basal epithelial A549 cells

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2020jcyj-msxmX0357). Corresponding author: WANG Shouyong, E-mail: saulwang@126.com

体外循环相关性肺损伤是心脏直视手术常见而严重的并发症,继发于肺缺血再灌注基础上的肺泡上皮细胞损伤是其最典型的病理生理改变之一[1-3]。氧糖剥夺/恢复(oxygen-glucose deprivation/recovery, OGD/R)模型常用来在细胞水平上研究缺血再灌注损伤效应。在离体细胞培养实验中,OGD/R 可引起细胞发生焦亡和凋亡两种结局类似但过程完全独立的死亡过程[4-5]。细胞焦亡由 Caspase 1、4、5 介导,表现为细胞膜通透性升高和细胞胀裂,伴随炎性细胞因子 IL-1β、IL-18 显著升高和炎性细胞浸润[6-8],是一种“燃烧式”的细胞死亡,它常是细胞或机体为应对伤害性刺激或清除入侵病原,保障机体渡过生存危机而采取的自救性反应,但不适当的或过度的细胞焦亡却可能导致炎症反应放大和组织损伤。而细胞凋亡则主要由 Caspase 3 介导,表现为细胞向内塌陷、皱缩,常见于细胞新陈代谢或生长发育中组织重塑等条件下,也可见于伤害性刺激较轻的条件下,不伴随炎性细胞因子变化和炎性细胞浸润[9-10],相对于细胞焦亡来看,是一种“安静的”细胞死亡方式,对机体整体的影响较小。A549 细胞来源于人肺癌上皮细胞,具有永生化和无限增殖的能力,常用作研究肺泡上皮细胞功能及有关病理生理机制的模式细胞。我们前期研究证实,OGD/R 可引发 A549 细胞发生焦亡[11],但同一 OGD/R 条件下,是否同时触发 A549 细胞凋亡,以及焦亡与凋亡的平衡是否可被调节,以促使 A549 细胞以炎症反应较轻的凋亡方式死亡,尚不清楚。本研究拟对此进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

人 A549 肺泡上皮细胞细胞株,由本单位中心实验室保存。高糖 DMEM 培养基购自 Gibco 公司;无糖 DMEM 培养基购自迈晨科技有限公司;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;Annexin V-FITC/PI 流式凋亡检测试剂盒、人源细胞因子 IL-1β、IL-18 ELISA 试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司;PCR 逆转录试剂盒、购自 MedChemExpress 有限公司;引物购自上海生工;VX-765、Z-DEVD-FMK 购自美国 APExBIO 公司;全蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测量试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司;兔多克隆抗体购自成都正能生物技术有限责任公司。

1.2 细胞培养及分组

冷冻保存的 A549 细胞用 37 ℃水浴解冻,采用完全培养基(含 10%胎牛血清的高糖 DMEM)培养传代,每 2 天更换 1 次培养液,至生长密度达 70%~80%时分为以下几组:对照组(control),氧糖剥夺/恢复组(OGD/R),氧糖剥夺/恢复复合焦亡抑制剂组(OGD/R+VX-765),氧糖剥夺/恢复复合凋亡抑制剂组(OGD/R+Z-DEVD-FMK,以下简称 OGD/R+FMK)。OGD/R 条件根据以前的研究确定[11],具体方法为:

OGD/R 组细胞更换无糖无血清培养基,在 37 ℃和 1% O_2 条件下处理 6h,然后更换完全培养基在 37 ℃、21% O_2 条件下继续培养 6h,该过程模拟临床条件下的缺血-再灌注过程。VX-765 终浓度为 50 μg/mL,Z-DEVD-FMK 终浓度为 60 μg/mL,均于 OGD/R 前加入相应分组细胞中。对照组仅在平行时间点给予更换完全培养基的操作,不实施 OGD/R 处理。OGD/R 后分别检测各组细胞凋亡及焦亡相关指标,根据检测结果分析,本研究追加检测了各组细胞非经典凋亡及焦亡通路中关键分子 BID 和 GSDME 的 mRNA 和蛋白表达。

1.3 流式细胞术检测 A549 细胞凋亡水平

采用 Annexin V-FITC/PI 双染法以流式细胞仪进行检测,主要步骤如下:以完全培养基重悬细胞,调整浓度为每毫升 5×10^5 个细胞,接种于 6 孔板,每孔 4 mL,培养过夜。待细胞贴壁后,按照前述分组处理细胞,然后弃去培养基,用 PBS 清洗后,再用 0.25%胰蛋白酶消化直至细胞完全脱落,收集细胞,以 1 000×*g* 离心 5 min,弃去上清液,收集细胞,用 PBS 轻轻重悬细胞并计数。取 5~10 万个重悬的细胞,于 4 ℃下以 1 000×*g* 离心 5 min,弃去上清液,重复 3 次后,将细胞重悬于 binding buffer 200 μL 中,依次加入 Annexin V-FITC 和 PI 试剂各 10 μL,轻轻混匀,于 4 ℃下避光孵育 30 min;再加入 binding buffer 300 μL,用流式细胞仪检测细胞总凋亡率。

1.4 ELISA 法测定 A549 细胞上清液中 IL-1β、IL-18 的水平

各组细胞培养结束后,收集上清液,4 ℃、1 000×*g* 离心 20 min,吸取上清液,放入-80 ℃冰箱备用,待全部样本收集齐全后采用 ELISA 法测定上清液中 IL-1β 和 IL-18 的浓度,操作步骤按照试剂盒说明书进行,酶标仪中读取 450 nm 波长处的光密度值 *D*(450),制作标准曲线,并按照标准曲线计算样本中的 IL-1β、IL-18 浓度。

1.5 RT-qPCR 检测 A549 细胞焦亡与凋亡相关分子 mRNA 的表达

细胞培养结束后,采用 TRIzol 法提取总 RNA:每培养孔加入 TRIzol 裂解液 1 mL,充分吹打混匀细胞,转移至 EP 管,置冰上继续裂解 10 min。加入氯仿 200 μL,涡旋 30 s 充分混匀,4 ℃、14 400 r/min,离心 10 min 后留取上层水相。加入等体积异丙醇,涡旋 30 s 充分混匀,4 ℃、14 400 r/min,离心 10 min,收集白色 RNA 沉淀。按照逆转录试剂盒说明书步骤合成 cDNA,条件为 25 ℃ 2 min,42 ℃ 45min,85 ℃ 2 min。采用实时荧光定量 PCR 法测定 mRNA 表达水平,反应条件为:95 ℃ 15 min;95 ℃ 10 s、60 ℃ 32 s,共 40 个循环,各引物序列见表 1,采用周期阈值法($2^{-\triangle\triangle Ct}$)分析目的基因表达,以 β-actin 为内参照。

表 1 基因扩增引物序列与片段长度

Name	Primer sequence	Product/bp
Caspase 1	上游: 5′-GAAGAAACACTCTGAGCAAGTC-3′ 下游:5′-GATGATGATCACCTTCGGTTTG-3′	112
*NLRP*3	上游:5′-AGGGATGAGAGTGTTGTGTGAAACG-3′ 下游: 5′-GCTTCTGGTTGCTGCTGAGGAC-3′	131
ASC	上游: 5′-CTCAAGAAGTTCAAGCTGAAGC-3′ 下游:5′-TAGGTCTCCAGGTAGAAGCTG-3′	134
GSDMD	上游: 5′-GAGCTTCCACTTCTACGATGCCATG-3′ 下游:5′-CCTGCGATCTTTGCCTGTCCTG-3′	84
Caspase 3	上游: 5′-CCAAAGATCATACATGGAAGCG-3′ 下游:5′-CTGAATGTTTCCCTGAGGTTTG-3′	185
BCL2	上游:5′-GACTTCGCCGAGATGTCCAG-3′ 下游:5′-GAACTCAAAGAAGGCCACAATC-3′	129
BAX	上游: 5′-CGAACTGGACAGTAACATGGAG-3′ 下游:5′-CAGTTTGCTGGCAAAGTAGAAA-3′	157
BID	上游:5′-CTGTGAACCAGGAGTGAGTC-3′ 下游:5′-GTAGGTTTGTGATGCACTCATC-3′	101
GSDME	上游:5′-TTTGCATTCATAGACATGCCAG-3′ 下游:5′-GTTCATCATCAAATAGGACCGC-3′	181
GAPDH	上游:5′-CAGGAGGCATTGCTGATGAT-3′ 下游:5′-GAAGGCTGGGGCTCATTT-3′	138

1.6 Western blot 检测 A549 细胞焦亡与凋亡相关蛋白的表达

各组培养细胞处理结束后,采用 PBS 清洗,胰酶消化,离心收集细胞沉淀,加入细胞裂解液和蛋白酶抑制剂,提取总蛋白,BCA 法定量蛋白浓度。总蛋白样品煮沸变性,取 20 μg 上样行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,分离总蛋白样品。电泳条件为 60 V、30 min,120 V、60 min,电泳结束后 250 mA 条件下转膜 2 h。PVDF 膜用 5%脱脂奶粉液封闭 90 min,TBST 洗膜 4 次,每次 5 min。加入特异性一抗,4 ℃下摇床过夜孵育,再经 TBST 清洗 3 次,每次 5 min。最后加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 2 h,TBST 清洗 3 次,每次 10 min。以 GAPDH 为内参,ECL 曝光显影,采用 Bio-Rad quantity One 软件分析。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 25.0 统计软件进行分析,GraphPad Prism 8.0 软件绘图。本实验中均为计量资料,以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间均数比较采用独立样本 *t* 检验,多组间均数比较先采用单因素方差分析,然后采用 Bonferroni

法进行两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 A549 细胞总凋亡率的变化

对照组与 OGD/R 组细胞总凋亡率分别为(3.67±0.64)*vs*(12.57±1.97),OGD/R 组细胞总凋亡率升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。经焦亡和凋亡抑制剂处理后,OGD/R+VX-765 组、OGD/R+FMK 组总凋亡率分别为(5.97±1.28)和(5.17±0.78),均较 OGD/R 组下降,差异有统计学意义,见图 1。

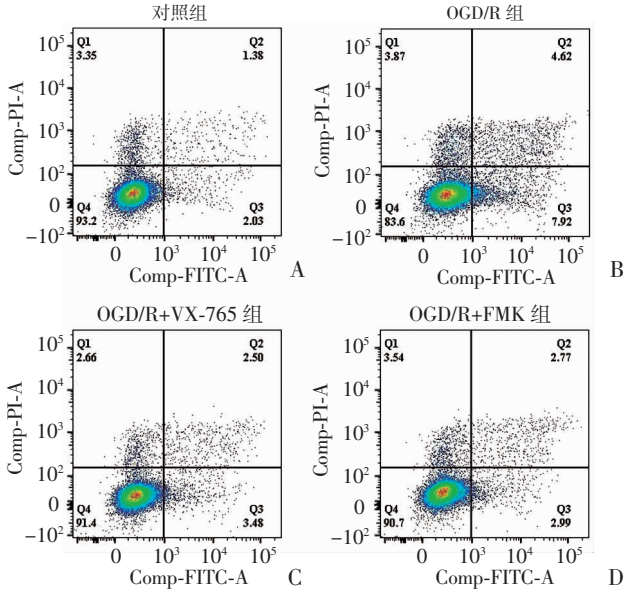
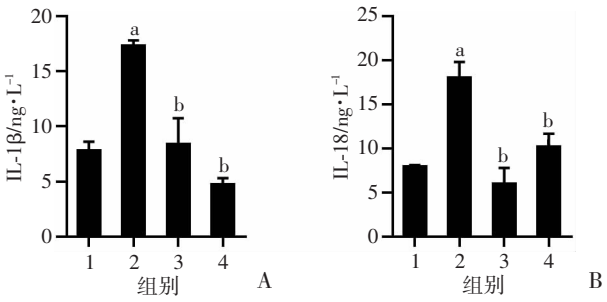


图 1 流式细胞术检测结果

2.2 A549 细胞培养上清中,焦亡标志物 IL-1β 和 IL-18 的变化

ELISA 检测结果显示,OGD/R 组上清液中 IL-1β 和 IL-18的浓度与对照组比较,OGD/R组升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用焦亡抑制剂 VX-765 后,与 OGD/R 组比较出现降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 后,与 OGD/R 组比较也出现降低,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 2)。

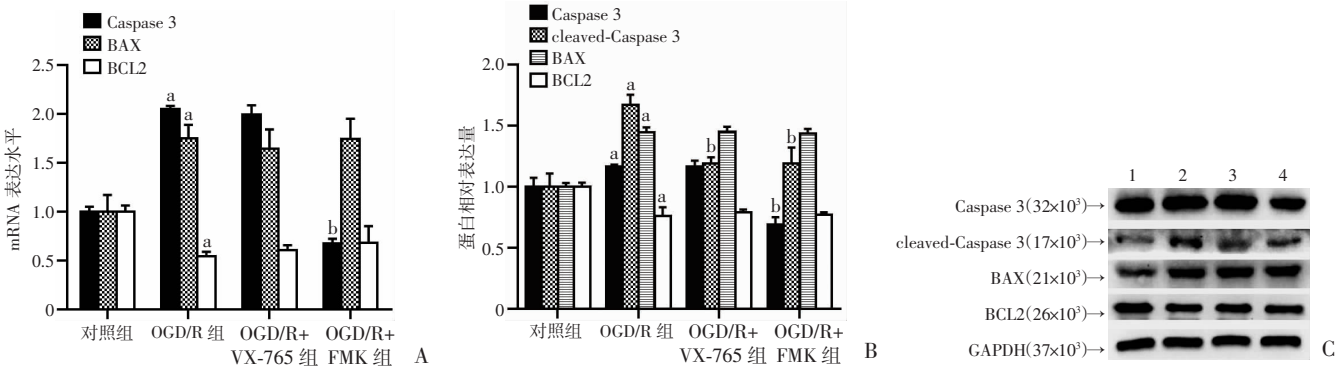


A:IL-1β;B:IL-18 1:对照组;2:OGD/R 组;3:OGD/R+VX-765 组;4:OGD/R+FMK 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 OGD/R 组比较

图 2 A549 细胞上清液 IL-1β、IL-18 表达量变化

2.3 A549 细胞凋亡关键分子 Caspase 3、BAX 和 BCL2 的 mRNA 和蛋白表达的变化

RT-qPCR 结果显示,OGD/R 组细胞凋亡相关分子 Caspase 3、BAX 和 BCL2 的 mRNA 相对表达量与对照组相比 Caspase 3 和 BAX 表达升高,BCL2 表达降低,BCL2/BAX 比值降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 后,Caspase 3、BAX 和 BCL2 的 mRNA 相对表达量与 OGD/R 组比较,Caspase 3 表达量降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用焦亡抑制剂 VX-765 后,Caspase 3、BAX 和 BCL2 的 mRNA 相对表达量与 OGD/R 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$,图 3)。



A:RT-qPCR 检测结果;B:Western blot 检测结果;C:半定量分析 1:对照组;2:OGD/R 组;3:OGD/R+VX-765 组;4:OGD/R+FMK 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 OGD/R 组比较

图 3 A549 细胞凋亡关键分子的 mRNA 和蛋白表达情况

Western blot 检测结果显示,OGD/R 组凋亡关键分子 Caspase 3、cleaved-Caspase 3、BAX 和 BCL2 的蛋白相对表达量与对照组相比 Caspase 3、cleaved-Caspase 3、BAX 表达升高,BCL2 表达降低,BCL/BAX 比值降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用了凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 后上述关键分子的蛋白相对表达量,与 OGD/R 组相比 Caspase 3、Cleaved-Caspase 3 表达下调,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用了焦亡抑制剂 VX-765 后,Caspase 3、BAX 和 BCL2 的蛋白相对表达量与 OGD/R 组相比差异无统计学意义($P>0.05$),cleaved-caspase 3 较 OGD/R 组相对表达量有所降低,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 3)。

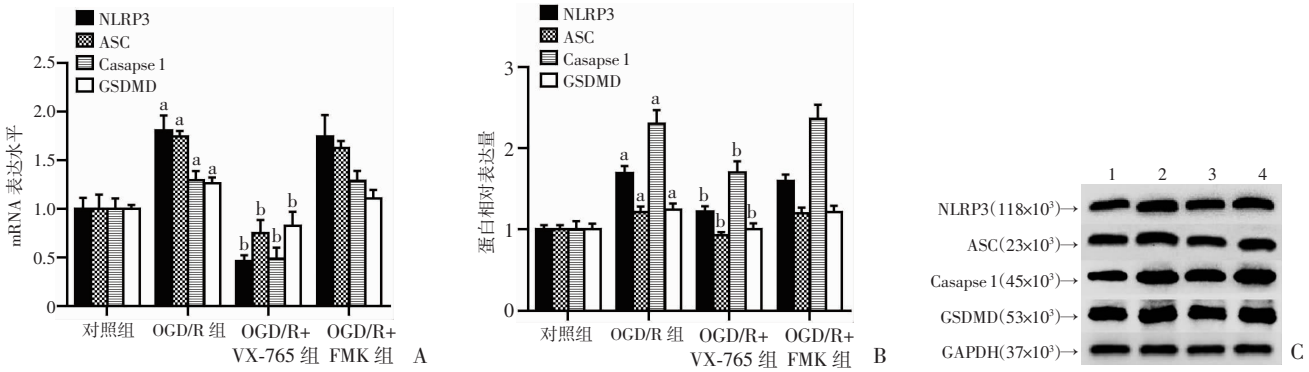
2.4　A549 细胞焦亡关键分子 NLRP3、ASC、Caspase 1 和 GSDMD 的 mRNA 和蛋白表达的变化

RT-qPCR 检测结果显示,OGD/R 组细胞焦亡相关分子 NLRP3、ASC、Caspase 1、GSDMD 的 mRNA 相对表达量与对照组相比升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用了焦亡抑制剂 VX-765 后上述分子的 mRNA 相对表达量与 OGD/R 组相比出现下调,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用了凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 后上述分子的 mRNA 相对表达量与 OGD/R 组相比差异无统计学意义($P>0.05$,图 4)。

Western blot 检测结果显示,OGD/R 组焦亡关键分子 NLRP3、ASC、Caspase 1、GSDMD 的蛋白相对表达量与对照组相比升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用了焦亡抑制剂 VX-765 后上述关键分子的蛋白相对表达量与 OGD/R 组相比出现下调,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用了凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 后上述关键分子相对表达量与 OGD/R 组相比无统计学意义($P>0.05$,图 4)。

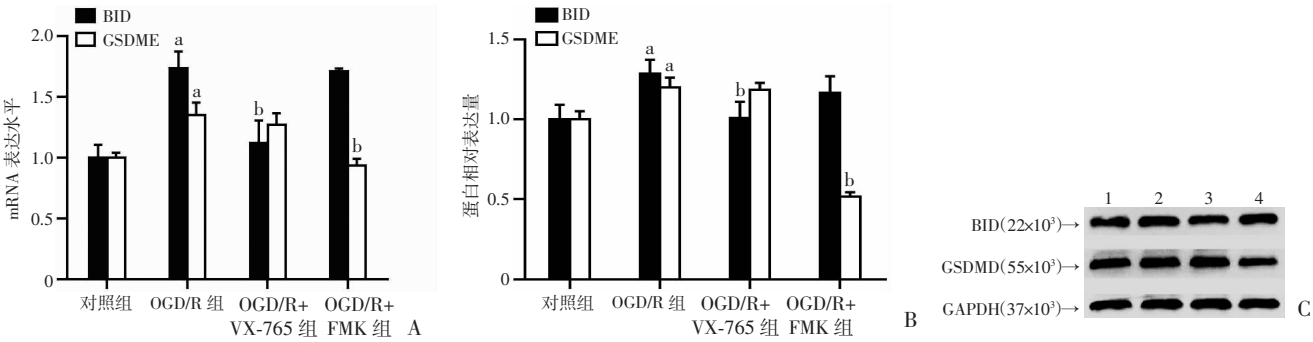
2.5　非经典细胞凋亡及焦亡通路中关键分子 BID 和 GSDME 的 mRNA 和蛋白表达

RT-qPCR 检测结果显示,OGD/R 组 BID、GSDME 的 mRNA 相对表达量与对照组相比升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用了焦亡抑制剂 VX-765 后 BID、GSDME 的 mRNA 相对表达量与 OGD/R 组比较,BID 相对表达量降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用了凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 后 BID、GSDME 的 mRNA 相对表达量与 OGD/R 组比较,GSDME 表达下调,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 5)。



A:RT-qPCR 检测结果;B:Western blot 检测结果;C:半定量分析　1:对照组;2:OGD/R 组;3:OGD/R+VX-765 组;4:OGD/R+FMK 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 OGD/R 组比较

图 4　A549 细胞焦亡关键分子 mRNA 与蛋白相对表达



A:RT-qPCR 检测结果;B:Western blot 检测结果;C:半定量分析　1:对照组;2:OGD/R 组;3:OGD/R+VX-765 组;4:OGD/R+FMK 组;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 OGD/R 组比较

图 5　A549 细胞 BID 与 GSDME 的 mRNA 和蛋白相对表达

Western blot 检测结果显示,OGD/R 组 BID、GSDME 的蛋白相对表达量与对照组相比升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用了焦亡抑制剂 VX-765 后 BID、GSDME 的蛋白相对表达量与 OGD/R 组比较,BID 相对表达量降低,差异具有统计学意义($P<0.05$);使用了凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 后 BID、GSDME 的蛋白相对表达量与 OGD/R 组比较,GSDME 下调,差异具有统计学意义($P<0.05$,图 5)。

3 讨论

本研究再次证实当前 OGD/R 条件可引发 A549 肺泡上皮细胞发生焦亡,且当前 OGD/R 条件还可同时触发 A549 细胞凋亡;凋亡和焦亡抑制剂对两种细胞死亡方式存在交叉抑制效应,且并非通过 Caspase 3 和 Caspase 1 途径;补充实验结果显示 OGD/R 激活了 Caspase 1/BID 和 Caspase 3/GSDME 途径,提示 OGD/R 引发的细胞焦亡与凋亡存在共享信号通路。

凋亡与焦亡是严重伤害性刺激下细胞两种截然不同的程序性细胞死亡方式。前者表现为染色质固缩、片段化以及细胞整体内陷,不伴有炎性细胞浸润和炎症因子释放[9-10],后者则表现为细胞“胀裂”,胞膜通透性升高,胞内物质漏出及炎性因子的释放,伴随强烈炎症反应[6-8]。本研究发现,OGD/R 同时引发 A549 细胞发生凋亡与焦亡,则二者之间是否存在调控可能性,是否可以通过抑制其中一种,而导致死亡已不可避免的细胞更多地向另一种方式转变,尤其是抑制焦亡而促使细胞结局向凋亡转变,从而减轻炎症反应,是一个值得关注的问题。

本研究发现,给予焦亡抑制剂 VX-765 处理后,焦亡关键分子 NLRP3、ASC、Caspase 1 和 GSDMD 的 mRNA 与蛋白表达均出现降低,培养上清中焦亡标志蛋白 IL-1β 和 IL-18 的浓度也出现降低,表明 OGD/R 引起的细胞焦亡受到抑制。与此同时,流式细胞检测发现细胞凋亡率也出现下降,提示焦亡抑制剂 VX-765 使细胞凋亡也受到了抑制,但凋亡关键分子 Caspase 3、BAX 和 BCL2 的 mRNA 和蛋白表达并未受到影响,这提示 OGD/R 引起的细胞凋亡可能涉及 Caspase 3 之外的非经典途径。有研究证实,焦亡关键分子 Caspase 1 活化后可通过切割 BID 蛋白参与细胞凋亡的发生,在 BID 基因敲除细胞中,激活 Caspase 1 可使细胞凋亡受到显著抑制[12-14]。因此,本研究检测了 BID 的 mRNA 和蛋白表达变化,结果显示 OGD/R 后,A549 细胞 BID 的 mRNA 和蛋白表达升高,且焦亡抑制剂 VX-765(抑制 Caspase 1)对此有抑制作用,这提示 Caspase 1/BID 机制参与了 OGD/R 引发的细胞凋亡。

本研究还发现,在给予凋亡抑制剂 Z-DEVD-FMK 处理后,促凋亡关键分子 Caspase 3、BAX 被抑制,抑凋亡关键分子 BCL2 的 mRNA 和蛋白表达上调,细胞凋亡率下降。与此同时,细胞焦亡也受到一定程度的抑制,但细胞焦亡关键分子 Caspase 1、ASC、NLRP3、GSDMD 的 mRNA 与蛋白表达并未受到显著影响,这提示 OGD/R 引起的细胞焦亡中可能涉及另外的机制。细胞焦亡机制包括 Caspase 1 依赖的经典途径与 Caspase4、5 依赖的非经典途径[6],这些焦亡关键分子活化后,水解细胞膜 GSDMD 蛋白导致膜孔形成和渗漏,并同时促使 IL-1β、IL-18 前体成熟并释放,标志细胞焦亡的发生[15-16]。但近期有研究证实细胞焦亡还存在通过 Caspase 3 水解胞膜 GSDME 蛋白而导致膜孔形成的新机制[17]。为此我们检测了 A549 细胞在 OGD/R 条件下 GSDME 的表达情况,结果显示,OGD/R 后 A549 细胞 GSDME 的 mRNA 和蛋白表达出现升高,且可被 Casepase 3 抑制剂所抑制,这提示 OGD/R 引起的细胞焦亡中,包含 Casepase 3/GSDME 机制的参与。

本研究的目的在于通过 OGD/R 细胞模型来模拟体外循环中肺泡上皮细胞的缺血再灌注,以进一步理解体外循环相关性肺损伤的发生机制,并探讨抑焦亡促凋亡以减轻炎症反应获得肺保护效应的可能性。肺泡上皮细胞是呼吸膜的关键组成部分,也是肺缺血再灌注损伤的关键靶点[18],并可继发引起肺泡表面活性物质代谢障碍、基底膜毁损和炎性细胞浸润,若能以炎症反应较轻的凋亡形式死亡,无疑有助于减轻缺血再灌注所致的肺损伤。本研究发现,OGD/R 条件下 A549 细胞的 Caspase 1 表达增加既可通过 ASC、NLRP3、GSDMD 途径引起细胞焦亡,也可通过 BID 途径引起细胞凋亡,还发现 Caspase 3 表达增加既可引起细胞凋亡,也可通过 GSDME 途径引起细胞焦亡,提示 OGD/R 引起的细胞焦亡与凋亡存在共享信号通路。因此,凋亡与焦亡抑制剂对两种细胞死亡方式存在交叉抑制现象,但本研究既未证实通过抑制细胞焦亡而促使细胞向凋亡方向发展,也未证实抑制细胞凋亡而促使焦亡发生。这提示上述抑焦亡促凋亡以减轻炎症反应获得肺保护效应的可行性存疑,但是并未排除焦亡和凋亡抑制剂在防治体外循环相关性肺损伤中的可能性,尤其可以对二者联合应用进行进一步探索。

本研究尚存在一些不足,首先是当前 OGD/R 条件与临床体外循环下肺泡上皮细胞实际缺血再灌注条件并不完全吻合[19],其次是细胞焦亡与凋亡仅通过检测分子标记来代表,进一步的实验中应该采取电镜并结合基因调控等更准确的实验手段。此外,A549 细胞虽广泛用作肺泡上皮模式细胞,但其生物学性状和功

能与肺泡上皮细胞可能仍存在差异,进一步研究中应考虑采用原代培养的肺泡上皮细胞。但是,本研究结果为更好理解体外循环相关性肺损伤等缺血再灌注类肺损伤的发生机制提供了一些新的线索,值得进一步关注。

综上,氧糖剥夺/恢复可同时导致 A549 细胞发生焦亡与凋亡,且细胞焦亡与凋亡存在共享信号通路;焦亡与凋亡抑制剂均可同时抑制 OGD/R 引起的 A549 细胞焦亡与凋亡。

参考文献:

[1] DENG Y X, HOU L, XU Q Y, *et al*. Cardiopulmonary bypass induces acute lung injury via the high-mobility group box 1/toll-like receptor 4 pathway[J]. Dis Markers, 2020, 2020: 8854700. DOI:10.1155/2020/8854700.

[2] KARACALILAR M, ONAN I S, ONAN B, *et al*. Effects of pulmonary perfusion during cardiopulmonary bypass on lung functions after cardiac operation[J]. J Card Surg, 2020, 35(10): 2469-2476. DOI:10.1111/jocs.14934.

[3] YUAN S M. Postperfusion lung syndrome: physiopathology and therapeutic options[J]. Rev Bras Cir Cardiovasc, 2014, 29(3): 414-425. DOI:10.5935/1678-9741.20140071.

[4] HU Z Z, YUAN Y, ZHANG X L, *et al*. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced microglial pyroptosis by promoting FOXO3a-dependent mitophagy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6219715. DOI: 10.1155/2021/6219715.

[5] XIE P, REN Z K, LV J, *et al*. Berberine ameliorates oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced apoptosis by inhibiting endoplasmic Reticulum stress and autophagy in PC12 cells[J]. Curr Med Sci, 2020, 40(6): 1047-1056. DOI:10.1007/s11596-020-2286-x.

[6] SHI J J, GAO W Q, SHAO F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(4): 245-254. DOI: 10.1016/j.tibs.2016.10.004.

[7] WANG Q, WU J F, ZENG Y C, *et al*. Pyroptosis: a pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease[J]. Clin Chim Acta, 2020, 510: 62-72. DOI:10.1016/j.cca.2020.06.044.

[8] MCKENZIE B A, DIXIT V M, POWER C. Fiery cell death: pyroptosis in the central nervous system[J]. Trends Neurosci, 2020, 43(1): 55-73. DOI: 10.1016/j.tins.2019.11.005.

[9] XU X B, LAI Y Y, HUA Z C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials[J]. Biosci Rep, 2019, 39(1): BSR20180992. DOI: 10.1042/BSR20180992.

[10] KACZANOWSKI S. Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging[J]. Phys Biol, 2016, 13(3): 031001. DOI: 10.1088/1478-3975/13/3/031001.

[11] 王小燕, 肖宗懿, 易寒, 等. 氧糖剥夺/恢复对 A549 肺泡上皮细胞焦亡的影响[J]. 中国细胞生物学学报, 2020, 42(11): 1969-1974.
WANG X Y, XIAO Z Y, YI H, *et al*. Effects of oxygen-glucose deprivation/recovery on pyroptosis of A549 alveolar epithelial cells[J]. Chin J Cell Biol, 2020, 42(11): 1969-1974.

[12] MAN S M, KARKI R, KANNEGANTI T D. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases[J]. Immunol Rev, 2017, 277(1): 61-75. DOI:10.1111/imr.12534.

[13] MAHIB M R, HOSOJIMA S, KUSHIYAMA H, *et al*. Caspase-7 mediates caspase-1-induced apoptosis independently of bid[J]. Microbiol Immunol, 2020, 64(2): 143-152. DOI:10.1111/1348-0421.12756.

[14] RIGO A, FERRARINI I, LORENZETTO E, *et al*. BID and the α-bisabolol-triggered cell death program: converging on mitochondria and lysosomes[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(12): 889. DOI:10.1038/s41419-019-2126-8.

[15] ORNING P, LIEN E, FITZGERALD K A. Gasdermins and their role in immunity and inflammation[J]. J Exp Med, 2019, 216(11): 2453-2465. DOI: 10.1084/jem.20190545.

[16] RUAN J W, WANG S J, WANG J B. Mechanism and regulation of pyroptosis-mediated in cancer cell death[J]. Chem Biol Interact, 2020, 323: 109052. DOI:10.1016/j.cbi.2020.109052.

[17] WANG Y P, GAO W Q, SHI X Y, *et al*. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin[J]. Nature, 2017, 547(7661): 99-103. DOI: 10.1038/nature22393.

[18] ALI A, CYPEL M. Commentary: To Die or not to Die-rescuing lung cells from ischemia-reperfusion injury[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2022, 163(2): e123-e124. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2021.01.091.

[19] LAGIER D, FISCHER F, FORNIER W, *et al*. Effect of open-lung *vs* conventional perioperative ventilation strategies on postoperative pulmonary complications after on-pump cardiac surgery: the PROVECS randomized clinical trial[J]. Intens Care Med, 2019, 45(10): 1401-1412. DOI: 10.1007/s00134-019-05741-8.

(**收稿**:2021-12-28;**修回**:2022-01-26)

(编辑 王 红)