

论著 · 实验研究

mitoKATP 通道开放剂对高氧诱导人 A549 细胞凋亡的保护作用

邹新艳¹ 董文斌¹ 邹丹¹ 李清平¹ 雷小平¹ 翟雪松¹ 陈枫²

(泸州医学院附属医院 1. 新生儿科; 2. 医学实验研究中心, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的** 探讨 mitoKATP 通道开放剂二氮嗪对高氧诱导人 A549 细胞凋亡的保护作用和机制。**方法** 体外培养人肺泡Ⅱ型上皮细胞(A549),随机分为对照组、高氧组(换液后通入 900 mL/L 氧气和 50 mL/L 二氧化碳高纯混合气,10 min 后密闭培养)和二氮嗪组(用终浓度为 100 μmol/L 的二氮嗪培养液预处理 24 h 再进行高氧诱导)。3 组分别于处理后 12、24、48 h 收集细胞进行检测。倒置相差显微镜下观察 A549 细胞形态,流式细胞仪检测 48 h 的细胞凋亡,免疫组化法检测细胞内 Omi/HtrA2 的表达。**结果** 与对照组相比,高氧组细胞受损明显,形态改变,细胞凋亡率增加($P < 0.05$),胞浆 Omi/HtrA2 表达增多($P < 0.05$)。与高氧组相比,二氮嗪组细胞损伤状况明显得到改善,细胞生长状况明显好转,形态明显变好;胞浆 Omi/HtrA2 表达减少($P < 0.05$),细胞凋亡率减少($P < 0.05$)。**结论** mitoKATP 通道开放剂二氮嗪具有降低 Omi/HtrA2 表达和 A549 细胞凋亡,从而减轻高氧诱导的肺损伤的作用。
[中国当代儿科杂志,2011,13(6):514-517]

[关键词] 高氧;二氮嗪;线粒体 ATP 敏感钾通道;凋亡;Omi/HtrA2;A549 细胞
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)06-0514-04

Protective effects of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel on A549 cell apoptosis induced by hyperoxia

ZOU Xin-Yan, DONG Wen-Bin, ZOU Dan, LI Qing-Ping, LEI Xiao-Ping, ZHAI Xue-Song, CHEN Feng. Department of Neonatology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China (Dong W-B, Email: Dong-Wenbin2000@163.com)

Abstract: Objective To explore the protective effects of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel opener diazoxide on hyperoxia-induced apoptosis of type II alveolar epithelial cells (A549 cells) and possible mechanisms. **Methods** A549 cells were cultured *in vitro* and divided randomly into control, hyperoxia and diazoxide group. The hyperoxia group was exposed to a mixture of O₂ (900 mL/L) and CO₂ (50 mL/L) for 10 minutes, then cultured in a closed environment. The diazoxide group was pretreated with diazoxide of 100 μmol/L for 24 hrs before hyperxia induction. The cells were collected 12, 24 and 48 hrs after culture. The morphologic changes of A549 cells were observed under an inverted microscope. A549 cell apoptosis was detected by flow cytometry. The expression of Omi/HtrA2 in the endochylema of A549 cells was determined by immunohistochemistry. **Results** A549 cells were damaged and the changes in morphology of the cells were serious in the hyperoxia group. The apoptosis rate of A549 cells and the expression of Omi/HtrA2 in the endochylema increased in the hyperoxia group compared with the control group ($P < 0.05$). The growth and the morphology of A549 cells were greatly improved and the cell injuries were obviously alleviated in the diazoxide group. The expression of Omi/HtrA2 in the endochylema and the apoptosis rate of A549 cells were significantly reduced in the diazoxide group compared with the hyperoxia group ($P < 0.05$). **Conclusions** Diazoxide as an opener of mitoKATP channel can reduce the expression of Omi/HtrA2 and the apoptosis rate of A549 cells, thus relieves the injury of A549 cells induced by hyperoxia.
[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (6):514-517]

Key words: Hyperoxia; Diazoxide; Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; Apotosis; Omi/HtrA2; A549 cell

长时间高浓度氧气吸入致急性肺损伤,是重症监护新生儿最常见的并发症,1岁以内死亡率可达30%~40%,存活者常常伴有明显的肺发育障碍和肺功能衰竭^[1]。研究显示,细胞凋亡是高氧性肺损

[收稿日期]2010-11-10;[修回日期]2010-12-24
[作者简介]邹新艳,女,硕士研究生,医师。
[通信作者]董文斌,教授。

伤的一种重要形式^[2]。线粒体 ATP 敏感钾通道 (mitochondrial ATP-sensitive potassium channel, mitoKATP) 可通过减少线粒体内钙超载, 阻止线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放, 稳定线粒体膜等机制减轻缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡^[3]。而 Omi/HtrA2 是位于线粒体膜间隙的丝氨酸蛋白酶, 在损伤因素的作用下, 细胞线粒体膜通透性增加, MPTP 孔开放, Omi/HtrA2 释放到线粒体外, 通过细胞凋亡的线粒体途径参与细胞凋亡^[4]。二氮嗪 (diazoxide) 作为 mitoKATP 通道的特异性开放剂, 可以明显减轻缺血缺氧导致的损伤和细胞凋亡^[5-7], 但其是否对高氧性肺损伤具有保护作用, 国内外文献未见报道。因此本研究在建立高氧诱导人肺泡 II 型上皮 (A549) 细胞损伤 (凋亡) 细胞模型^[8] 的基础上, 观察二氮嗪对 Omi/HtrA2 的影响及对高氧性肺损伤的保护作用和机制, 为临床治疗高氧肺损伤提供实验性理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

A549 细胞 (泸州医学院附属医院中心实验室保存), 二氮嗪 (美国 Alexis 公司) (550-260-M500), 溶于 DMSO 备用, DMEM/H 培养基 (Hyclone), 胎牛血清 (天津市灏洋生物制品科技有限责任公司), 胰蛋白酶 (碧云天生物技术有限公司), 二甲基亚砜 (DMSO) (碧云天生物技术有限公司), Omi/HtrA2 兔抗人单克隆抗体 (ABcam), SABC 免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司)。其他细胞培养试剂均为市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 人肺泡上皮细胞系 A549 传代培养与分组
体外传代培养 A549 细胞系^[9], 待其在 37℃、5% CO₂ 培养箱中生长至 70% ~ 80% 融合后, 随机分为 3 组: 对照组、高氧组和二氮嗪组, 对照组加入 100 mL/L 胎牛血清培养液, 高氧组通入 3 L/min 的 900 mL/L 氧气和 50 mL/L 二氧化碳高纯混合气, 10 min 后密闭培养; 二氮嗪组加入等量含二氮嗪 (终浓度为 100 μmol/L) 的 100 mL/L 胎牛血清培养液预处理 24 h^[10], 再用高氧诱导。3 组分别于处理后 12、24、48 h 收集细胞进行检测。在培养结束时用 ML-I ICB 数字智能测氧仪检测培养瓶中氧浓度, 低于 90% 的标本弃去。

1.2.2 实验指标的检测 细胞损伤指标观察: 倒置相差显微镜下观察细胞形态并照相。

48 h 收集的细胞, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 按 Annexin V-FITC 和 PI 双染试剂盒说明书操作, 每组设 3 复瓶。结果以凋亡细胞的百分率表示, 实验结果重复 3 次。

采用 SABC (过氧化物酶免疫组化法) 检测各时间点 Omi/HtrA2 的表达。当培养瓶中的 A549 细胞达到 70% ~ 80% 融合时, 接种于 6 孔板中, 进行细胞爬片, 分组处理, 然后在处理后相同时点, 收集细胞爬片, 对细胞爬片固定、破膜, 封闭内源性过氧化物酶, 特异性单克隆一抗孵育过夜, 用针对一抗的生物素化的二抗孵育, 滴加 SABC 试剂, DAB 显色, 自来水冲洗返蓝, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂胶封片。以 PBS 替代一抗作阴性对照。每组设 8 个样本, 每张爬片任选 5 个高倍镜图片, 采用 Image-Pro 6.0 图象分析软件对图象进行分析。测定其光密度值 (IOD), 取平均值作为该爬片的光密度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行处理, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 二氮嗪对高氧诱导 A549 细胞形态的影响

倒置相差显微镜下观察, 对照组 A549 细胞形态良好, 高氧组细胞受损明显, 二氮嗪组细胞损伤状况明显得到改善。见图 1。

2.2 二氮嗪对高氧诱导 A549 细胞凋亡的影响

采用 Annexin V-FITC 和 PI 双染, 流式细胞术检测高氧对 A549 细胞凋亡的影响。细胞膜有损伤的细胞的 DNA 可被 PI 着染产生红色荧光, 而细胞膜保持完好的细胞则不会有红色荧光产生。因此, 在细胞凋亡的早期 PI 不会着染而没有红色荧光信号。正常活细胞与此相似。在双变量流式细胞仪的散点图上, 左下象限显示活细胞, 为 (FITC⁻/PI⁻); 右上象限是非活细胞, 即坏死细胞, 为 (FITC⁺/PI⁺); 而右下象限为凋亡细胞, 显现 (FITC⁺/PI⁻)。高氧暴露后 48 h, 高氧组凋亡细胞百分比明显增加 [(6.54 ± 0.48)%]; 二氮嗪组凋亡细胞百分比有所减少 [(2.36 ± 0.51)%], 但是没有恢复到对照组的水平 [(0.40 ± 0.10)%], 3 组间比较差异有统计学意义 ($F = 176.643, P < 0.01$)。见图 2。

2.3 二氮嗪对高氧诱导 A549 细胞 Omi/HtrA2 表达的影响

Omi/HtrA2 表达染色为棕黄色,位于胞浆。本

研究发现,高氧组 Omi/HtrA2 表达明显高于对照组 ($P<0.01$),二氮嗪组较高氧组明显减轻,但并未恢复到对照组水平($P<0.01$),见图 3,表 1。

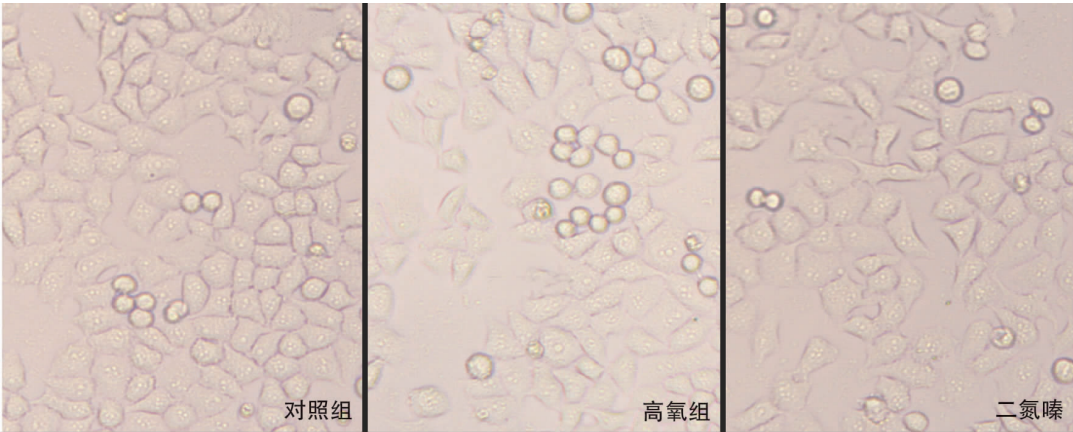


图 1 二氮嗪对高氧诱导 48 h A549 细胞形态学改变的影响(倒置相差显微镜,×100)

对照组 A549 细胞贴壁良好,为扁圆的多角形,细胞排列紧密,连接成片,数量多,悬浮细胞较少。高氧组细胞由典型的扁圆多角形细胞变为圆形或椭圆形,细胞间空隙加大,连接松散,活细胞数量明显降低,悬浮细胞明显增多。二氮嗪组细胞生长状况明显好转,细胞间隙稍大,形态明显变好,活细胞数量较高氧组增多,悬浮细胞数减少,但是未恢复到对照组水平。

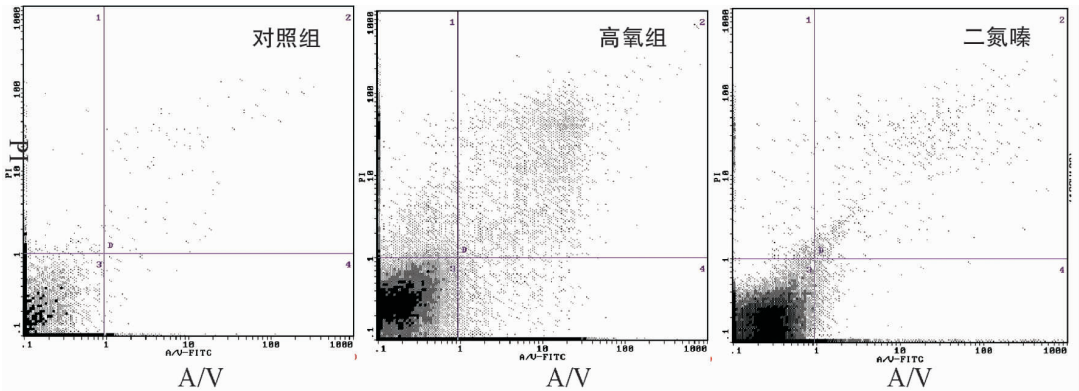


图 2 二氮嗪对高氧诱导 48 h A549 细胞凋亡的影响(流式细胞仪,双参数图)

高氧组右下象限凋亡细胞数明显增加,二氮嗪组凋亡细胞百分数有所减少,但是没有恢复到对照组的水平。

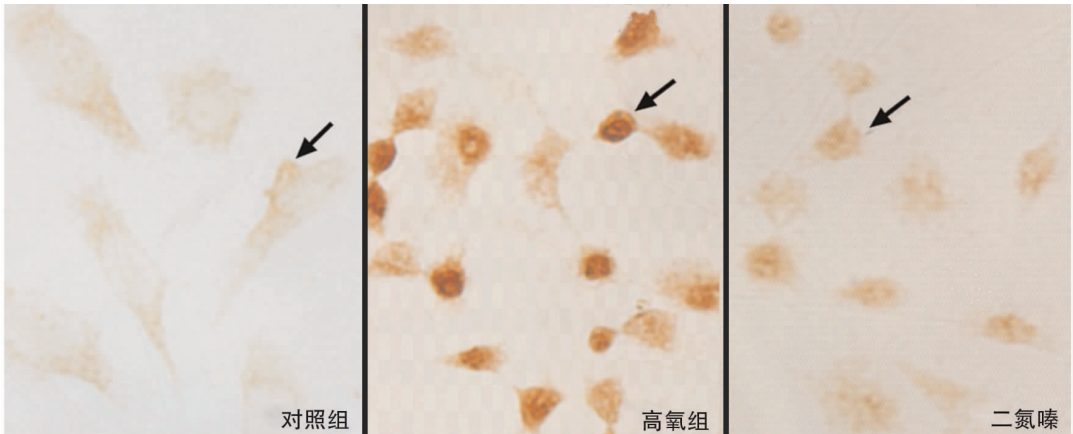


图 3 二氮嗪对高氧诱导 48 h A549 细胞 Omi/HtrA2 表达的影响(倒置相差显微镜,×400)

对照组 Omi/HtrA2 表达微弱,高氧组 Omi/HtrA2 表达明显,二氮嗪组较高氧组明显减轻,但未恢复到对照组水平。箭头所指为 Omi/HtrA2 表达阳性细胞,呈棕黄色。

表 1 各组 Omi/HtrA2 表达光密度值检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	12 h	24 h	48 h	F 值	P 值
对照组	8	15.25 ± 1.88	15.75 ± 1.68	15.26 ± 2.80	0.14	0.87
高氧组	8	23.32 ± 1.50 ^a	35.51 ± 1.82 ^{a,c}	44.94 ± 4.47 ^{a,c,d}	110.21	< 0.01
二氮嗪组	8	20.04 ± 2.54 ^{a,b}	25.56 ± 1.42 ^{a,b,c}	28.22 ± 1.07 ^{a,b,c,d}	43.40	< 0.01
F 值		32.34	287.18	183.14		
P 值		< 0.01	< 0.01	< 0.01		

a: 与同时时间点对照组比较, $P < 0.01$; b: 与同时时间点高氧组比较, $P < 0.01$; c: 与同组 12 h 比较, $P < 0.01$; d: 与同组 24 h 比较, $P < 0.01$

3 讨论

本研究用二氮嗪干预高氧诱导的 A549 细胞,发现二氮嗪可通过减少 Omi/HtrA2 在胞内的表达,减少高氧诱导的 A549 细胞的凋亡,从而减轻高氧引起的 A549 细胞损伤。

凋亡是高氧暴露后肺损伤的一种形式,高氧暴露会导致肺组织细胞凋亡率增加^[11]。线粒体途径是细胞凋亡的一条途径,指线粒体受到损伤刺激后,MPTP 孔开放,释放凋亡蛋白,Omi/HtrA2、细胞色素 C、凋亡诱导因子等,引起 caspase-9 活化,最终引起 caspase-3 活化,导致 DNA 断裂发生凋亡。

mitoKATP 通道广泛存在于心、脑、肺、肾等脏器细胞内,是一种存在于线粒体内膜的内向整流钾离子通道,其主要内源性门控分子是 ATP,通过结合 mitoKATP 通道,对通道的开放和关闭起调节作用^[12],生理情况下处于关闭状态,只有在缺血缺氧等病理状态下才被激活开放。mitoKATP 通道能被二氮嗪激活开放^[13]。二氮嗪通过激活开放 mitoATP 通道,使线粒体去极化,阻止 MPTP 孔开放,从而减少 Omi/HtrA2、细胞色素 C 的释放,抑制凋亡蛋白酶,对抗缺氧诱导的细胞死亡,通过增加 Bcl-2 的水平和抑制 Bax 与线粒体的结合来对抗细胞凋亡^[14]。因此,mitoKATP 开放剂预处理后 A549 细胞损伤减少,可能通过抑制 A549 细胞的凋亡而发挥作用。

Omi/HtrA2 是一种线粒体丝氨酸蛋白酶,是促凋亡蛋白的一种。正常情况下成熟 Omi/HtrA2 与蛋白质 Smac/DIABLO 共存于线粒体内、外膜之间的膜间隙中。细胞凋亡的线粒体途径活化时,线粒体受到刺激,MPTP 孔开放释放凋亡蛋白 Omi/HtrA2、Smac/DIABLO、凋亡诱导因子和核酸内切酶 G,引起 caspase-9 活化,最终导致 DNA 断裂发生凋亡。

本研究观察到二氮嗪预处理可使高氧诱导 A549 细胞损伤后表达 Omi/HtrA2 明显减少,细胞损伤减少。可能是二氮嗪激活 MitoKATP 通道,阻断了线粒体 MPTP 孔的开放,减少了 Omi/HtrA2 的释放,即阻断了细胞凋亡的线粒体途径,从而减少凋亡,起到减轻高氧诱导的 A549 细胞损伤的作用。进一步

研究 MitoKATP 敏感钾通道可以为寻找有效的治疗高氧诱导的肺损伤的方法提供理论依据。

[参 考 文 献]

[1] Gordo-Vidal F, Calvo-Herranz E, Abella-Alvarez A, Salinas-Gabiña I. Hyperoxia-induced pulmonary toxicity [J]. Med Intensiva, 2010, 34 (2): 134-138.

[2] 王安茹,罗小平. 细胞凋亡与高氧肺损伤 [J]. 中国新生儿科杂志, 2006, 21 (5): 314-316.

[3] 秦建伟,别平,朱瑾. 线粒体膜通透性转换作用对再灌注损伤后肝细胞凋亡的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28 (10): 1049-1051.

[4] 王晓樑,王瑾,吕小萍,王澎,刘慧荣. 线粒体丝氨酸蛋白酶 Omi/HtrA2 与细胞凋亡 [J]. 生理学进展, 2006, 37 (3): 285-288.

[5] Rottlaender D, Boengler K, Wolny M, Michels G, Endres-Becker J, Motloch LJ, et al. Connexin 43 acts as a cytoprotective mediator of signal transduction by stimulating mitochondrial KATP channels in mouse cardiomyocytes [J]. J Clin Invest, 2010, 120 (5): 1441-1453.

[6] Elrod JW, Harrell M, Flagg TP, Gundewar S, Magnuson MA, Nichols CG, et al. Role of sulfonylurea receptor type 1 subunits of ATP-sensitive potassium channels in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. Circulation, 2008, 117 (11): 1405-1413.

[7] 刘喜娟,董文斌,李清平,雷小平,翟雪松,熊涛,等. 二氮嗪对新生儿窒息后血清诱导人近曲肾小管上皮细胞损伤的保护作用 [J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24 (6): 444-445.

[8] 蔡成,常立文,李文斌,刘伟,陈燕,单瑞艳,等. 高氧对人肺腺癌 A549 细胞中硫氧还蛋白-2 表达的影响 [J]. 华中科技大学学报 (医学版), 2008, 37 (2): 222-224.

[9] Xu D, Guthrie JR, Mabry S, Sack TM, Truog WE. Mitochondrial aldehyde dehydrogenase attenuates hyperoxia-induced cell death through activation of ERK/MAPK and PI3K-Akt pathways in lung epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 291 (5): L966-L975.

[10] 刘喜娟,董文斌,李清平,雷小平,翟雪松,熊涛,等. 二氮嗪对新生儿窒息后血清诱导人近曲肾小管上皮细胞损伤时线粒体凋亡途径的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22 (4): 214-216.

[11] 李冬梅,薛辛东,闫丽娟,张宏伟,郑菲,南春红,等. 高氧致早产鼠 AEC II 凋亡及其信号机制 [J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7 (2): 154-158.

[12] 刘喜娟,董文斌. mitoKATP 与缺血缺氧性损伤 [J]. 国际儿科学杂志, 2009, 36 (2): 210-212.

[13] 钱坤,李琳,刘振国,戚辰. 线粒体 KATP 通道开放剂对多巴胺能神经细胞的保护作用研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 25 (6): 669-672.

[14] Gomez L, Thibault H, Gharib A, Dumont JM, Vuagniaux G, Scalfaro P, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition improves functional recovery and reduces mortality following acute myocardial infarction in mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293 (3): H1654-H1661.

(本文编辑:王庆红)