

论著·实验研究

沉默 Pin1 表达抑制高氧诱导人肺泡上皮细胞凋亡

赵帅 董文斌 张婵 李清平 康兰 雷小平 翟雪松

(泸州医学院附属医院新生儿科, 四川 泸州 646000)

[摘要] **目的** 研究沉默 Pin1 表达对高氧诱导人肺泡上皮细胞 (A549 细胞) 凋亡的影响。**方法** 在体外常规培养 A549 细胞, 随机分为对照组、高氧组、空载体组和 Pin1-shRNA 组, 以 3 L/min 速度向各处理组细胞中通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 的高纯混合气 10 min。培养 24 h 后, 倒置相差显微镜下观察细胞形态; 流式细胞术检测细胞凋亡率; SP 细胞免疫化学法检测细胞凋亡相关蛋白 XIAP 和 Caspase-9 表达; 荧光显微镜检测细胞线粒体活性氧簇 (ROS) 及线粒体膜电位。**结果** 高氧组和空载体组细胞均生长状态差, Pin1-shRNA 组活细胞数量较高氧组和空载体组多, 但比对照组少。与对照组相比, 高氧组和空载体组细胞凋亡率增加、Caspase-9 表达增加、XIAP 表达降低、ROS 含量增加、线粒体膜电位下降 (均 $P<0.05$)。而 Pin1-shRNA 组与高氧组和空载体组相比, 细胞凋亡率下降、Caspase-9 表达降低、XIAP 表达增加、ROS 含量降低、线粒体膜电位升高 (均 $P<0.05$), 但与对照组相比差异亦有统计学意义 (均 $P<0.05$)。**结论** 抑制人肺泡上皮细胞 Pin1 表达可减轻高氧诱导的细胞凋亡。
[中国当代儿科杂志, 2015, 17(5): 496-501]

[关键词] Pin1; 高氧; 氧化应激; 凋亡; 人肺泡上皮细胞

Silencing of Pin1 suppresses hyperoxia-induced apoptosis of A549 cells

ZHAO Shuai, DONG Wen-Bin, ZHANG Chan, LI Qing-Ping, KANG Lan, LEI Xiao-Ping, ZHAI Xue-Song. Department of Neonatology, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China (Dong W-B, Email: dongwenbin2000@163.com)

Abstract: Objective To explore the effect of silence of Pin1 expression on hyperoxia-induced apoptosis in alveolar epithelial cells A549. **Methods** A549 cells were divided into four groups: control, hyperoxia, negative lentivirus and Pin1-shRNA hyperoxia. The hyperoxia group was exposed to a mixture of 95%O₂ and 5%CO₂ for 10 minutes. Then cells were cultured in a closed environment. After 24 hours, the changes of morphology were observed under an inverted microscope. Cell apoptosis was detected by flow cytometry (FCM). The expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) and Caspase-9 were detected by immunohistochemistry. The production of reactive oxygen species (ROS) and cellular mitochondria membrane potential ($\Delta\Psi_m$) were determined by fluorescence microscopy. **Results** Under the inverted microscope, the A549 cells grew slowly and the changes in morphology of the cells were most obvious in the hyperoxia and negative lentivirus groups. The changes in morphology of A549 cells were obviously improved in the Pin1-shRNA hyperoxia group. The FCM results showed that the apoptosis rate of A549 cells increased, Caspase-9 expression increased, XIAP expression decreased, mitochondrial ROS production increased and mitochondrial membrane potential decreased in the hyperoxia and negative lentivirus groups compared with the control group ($P<0.05$). Compared with the hyperoxia and negative lentivirus groups, the apoptosis rate of A549 cells decreased, Caspase-9 expression decreased, XIAP expression increased, mitochondrial ROS production decreased and mitochondrial membrane potential increased in the Pin1-shRNA hyperoxia group ($P<0.05$), although the levels of the indexes did not reach to those of the control group. **Conclusions** Silencing of Pin1 could suppress hyperoxia-induced apoptosis of A549 cells.
[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(5): 496-501]

Key words: Pin1; Hyperoxia; Oxidative stress; Apoptosis; Alveolar epithelial cell

[收稿日期] 2014-08-21; **[接受日期]** 2014-10-18

[基金项目] 中华儿科杂志第二届双鹤珂立苏科研基金; 四川省教育厅科研基金 (08ZA150); 四川省卫生厅科研基金 (90191); 四川省科技厅-泸州市科技局-泸州医学院 2014 年联合科研项目资金 (2014NZ0014); 泸州市政府-泸州医学院联合专项资金 (2013LZLY-J08)。

[作者简介] 赵帅, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 董文斌, 男, 教授。

由于机械通气和肺表面活性物质的普遍应用及早产儿管理技术的改进,危重新生儿存活率显著提高。然而,由于呼吸障碍需要长时间吸入高体积分数氧(高氧),可能引起肺部出现氧化应激反应,继而发展至肺纤维化及支气管肺发育不良,对患儿生活质量造成影响^[1]。

目前研究显示,细胞内产生过量活性氧(reactive oxygen species, ROS)是引起高氧肺损伤的主要途径,而ROS常通过以下两种途径产生:一种是还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)途径,另一种是线粒体途径^[2-3]。本课题组前期研究表明,高氧可激活PKC β ,从而使胞质内p66Shc发生磷酸化,随后被Pin1识别发生异构化(Pin1主要作用是介导p66Shc在线粒体转位),进而在蛋白磷酸酶2A(protein phosphatase 2A, PP2A)去磷酸化的作用下进入线粒体,活化后的p66Shc转移到线粒体呼吸链酶复合体Ⅲ氧化细胞色素C产生ROS/H₂O₂^[4-5]。因此推测,Pin1可在高氧条件下导致ROS形成,继而在肺损伤中起到重要作用。本课题组前期实验已成功构建Pin1-shRNA慢病毒载体,并建立Pin1稳定低表达的A549细胞系^[6]。本研究进一步探讨沉默Pin1表达是否抑制高氧诱导人肺泡上皮细胞的凋亡,为高氧肺损伤治疗提供一种新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 细胞培养与分组

体外常规培养的人肺泡上皮细胞株(A549),随机分为对照组、高氧组、空载体组和Pin1-shRNA组,对照组置于5% CO₂培养箱中常规培养,高氧组、空载体组和Pin1-shRNA组分别给予高体积分数氧诱导细胞,即通入3 L/min的95%氧气和5%二氧化碳高纯混合气10 min,并在培养箱中密闭培养24 h后检测下述指标。

1.2 细胞形态学观察

各组细胞分别密闭培养24 h后,在IX71型倒置相差显微镜下观察细胞的形态变化。

1.3 流式细胞术检测细胞凋亡率

按照凯基生物Annexin V-FITC和PI双染试剂盒说明书进行细胞凋亡率检测。将上述分组细胞密闭培养24 h后,PBS洗涤3次,用不含

EDTA的胰酶消化制备单细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,取 1×10^6 个细胞加入500 μ L的Binding Buffer重悬细胞,再分别加入5 μ L Annexin V-FITC和5 μ L PI,混匀后室温下避光孵育反应15 min。在激发光波长488 nm,发射波长530 nm的流式细胞仪进行检测。在双变量流式细胞仪的散点图上,右上象限为晚期凋亡细胞(FITC⁺/PI⁺);右下象限为早期凋亡细胞(FITC⁺/PI⁻);左上象限为机械损伤细胞(FITC⁻/PI⁺);左下象限为正常细胞(FITC⁻/PI⁻)。实验结果是以右上象限和右下象限的细胞数之和与总细胞数之比计算凋亡率。实验重复3次,每组共8个样本。

1.4 免疫组化法检测细胞凋亡相关蛋白的表达

采用SP免疫组织化学法检测细胞凋亡相关蛋白X连锁凋亡抑制蛋白(XIAP)和胱冬肽酶(Caspase)-9蛋白的表达情况。实验中XIAP和Caspase-9蛋白抗体的稀释度均为1:150。实验步骤按照说明书进行操作,胞浆染成棕黄色为阳性表达。实验重复3次,每组随机选取8张细胞爬片,每张爬片任选8个高倍镜视野,在倒置相差显微镜下观察细胞,采用Image-Pro 6.0图象分析软件对图象进行分析,XIAP和Caspase-9表达水平以其平均光密度值(AOD)表示。

1.5 荧光显微镜检测线粒体ROS的含量

采用MitoSox Red(Molecular Probes®)作为高选择性的线粒体内ROS荧光染料,能够自由透过活细胞膜进入细胞内并选择性靶向线粒体,与线粒体内的超氧阴离子ROS氧化产生红色荧光。实验根据说明书步骤进行操作,细胞核采用DAPI染色呈蓝色荧光。荧光显微镜下观察并照相(MitoSOX: 510/580 nm, DAPI: 340/488 nm),实验重复3次,每组随机选取8张细胞爬片,每张爬片任选8个高倍镜视野进行观察,使用Image-Pro 6.0图像分析软件分析图像,测定AOD以表示ROS含量。

1.6 荧光显微镜检测线粒体膜电位的变化

按照线粒体膜电位检测试剂盒说明书进行操作。正常细胞中线粒体膜电位较高,JC-1以聚合物形式存在于线粒体的基质中,在发射波长590 nm下产生红色荧光。但当细胞受损时,线粒体膜电位下降,JC-1则不能聚集在线粒体的基质中,以单体形式存在,在发射波长530 nm下产生

绿色荧光,通过JC-1从红色荧光到绿色荧光的转变检测细胞膜电位的下降。JC-1红色荧光与绿色荧光的荧光度比值(红/绿)反映细胞线粒体膜电位的高低。实验重复3次,每组随机选取8张细胞爬片,每张爬片任选8个高倍镜视野进行观察,使用Image-Pro 6.0图像分析软件分析图像,测定AOD,以红/绿荧光强度比值表示线粒体膜电位高低。

1.7 统计学分析

采用SPSS 19.0统计分析软件对数据进行处理,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK- q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察

通过倒置相差显微镜对细胞形态进行观察,对照组细胞生长状态良好,活细胞数量多,少见细胞漂浮,细胞呈梭形,细胞间隙较小,连接紧密。高氧组及空载体组细胞均呈现出生长状态差,活细胞数量明显减少,培养基中可见大量圆形细胞漂浮,剩下的活细胞排列松散,间隙明显增宽。Pin1-shRNA组细胞生长状态欠佳,贴壁欠佳,但活细胞数量较高氧组有所增加,悬浮细胞数较高氧组减少,但是未达到对照组水平。

2.2 各组细胞凋亡率变化

流式细胞术检测结果表明与对照组相比,高氧组和空载体组细胞凋亡率显著增加($P<0.05$),但两组间凋亡率的差异无统计学意义($P>0.05$)。Pin1-shRNA组凋亡率较高氧组和空载体组显著降

低($P<0.05$),但仍高于对照组($P<0.001$)。见图1、表1。

2.3 各组细胞中 XIAP 和 Caspase-9 蛋白表达

XIAP 和 Caspase-9 蛋白阳性表达呈棕黄色。与对照组比较,高氧组和空载体组 A549 细胞 XIAP 表达量明显减少, Caspase-9 表达量明显增加($P<0.05$)。XIAP 和 Caspase-9 表达水平在高氧组和空载体组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。Pin1-shRNA 组细胞 XIAP 表达水平明显高于高氧组和空载体组,但仍低于对照组($P<0.05$); Caspase-9 表达水平低于高氧组和空载体组,但仍高于对照组($P<0.05$)。见图2、表2。

2.4 荧光显微镜检测线粒体 ROS 的含量

胞质中 ROS 阳性表达呈红色荧光。对照组 ROS 含量最低(1.08 ± 0.05),高氧组(1.47 ± 0.06)和空载体组(1.48 ± 0.06) ROS 含量显著高于对照组(分别 $t=-12.396$ 、 -13.402 , $P<0.05$),但两组间比较差异无统计学意义($t=-0.251$, $P>0.05$)。Pin1-shRNA 组 ROS 含量(1.26 ± 0.04)较高氧组和空载体组降低(分别 $t=-7.639$ 、 -6.710 , $P<0.05$),但仍高于对照组($t=-7.288$, $P<0.05$)。见图3。

2.5 荧光显微镜检测线粒体膜电位的变化

对照组中线粒体膜电位最高(0.97 ± 0.06),而高氧组(0.56 ± 0.03)和空载体组(0.53 ± 0.07)与之相比均下降(分别 $t=10.661$ 、 9.612 , $P<0.05$),但两组间比较差异无统计学意义($t=0.897$, $P>0.05$)。Pin1-shRNA 组(0.71 ± 0.03)膜电位高于高氧组和空载体组(分别 $t=6.622$ 、 2.634 , $P<0.05$),但仍高于对照组($t=7.302$, $P<0.05$)。见图4。

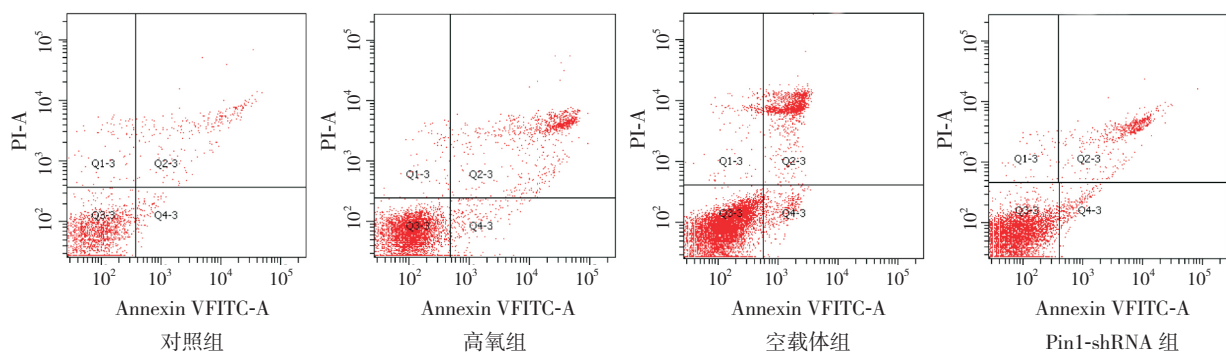


图1 高氧诱导 A549 细胞凋亡的影响(流式细胞术双参数图) 右上象限与右下象限细胞数之和占总细胞数比值为细胞凋亡率。

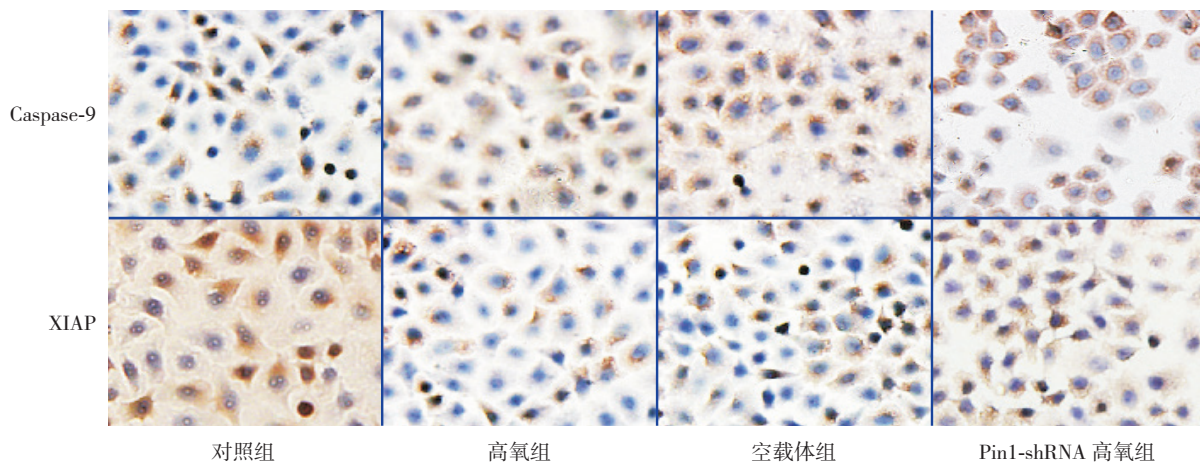


图 2 SP 细胞免疫化学方法检测各组细胞中 XIAP 和 Caspase-9 蛋白的表达 ($\times 200$) XIAP 和 Caspase-9 蛋白阳性表达均呈棕黄色。与对照组相比,高氧组和空载体组 XIAP 阳性表达减少, Caspase-9 阳性表达增加; Pin1-shRNA 组 XIAP 和 Caspase-9 蛋白阳性表达介于对照组和高氧组间。

表 1 各组细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	凋亡率 (%)
对照组	8	10 ± 4
高氧组	8	25 ± 8^a
空载体组	8	23 ± 6^a
Pin1-shRNA 组	8	$14 \pm 3^{a,b}$
<i>F</i> 值		48.465
<i>P</i> 值		<0.05

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与高氧组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 各组 XIAP 和 Caspase-9 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	XIAP	Caspase-9
对照组	8	0.42 ± 0.04	0.14 ± 0.09
高氧组	8	0.15 ± 0.07^a	0.47 ± 0.03^a
空载体组	8	0.16 ± 0.04^a	0.48 ± 0.04^a
Pin1-shRNA 组	8	$0.26 \pm 0.03^{a,b}$	$0.29 \pm 0.02^{a,b}$
<i>F</i> 值		37.391	21.372
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

注: a 示与对照组比较, $P < 0.05$; b 示与高氧组比较, $P < 0.05$ 。

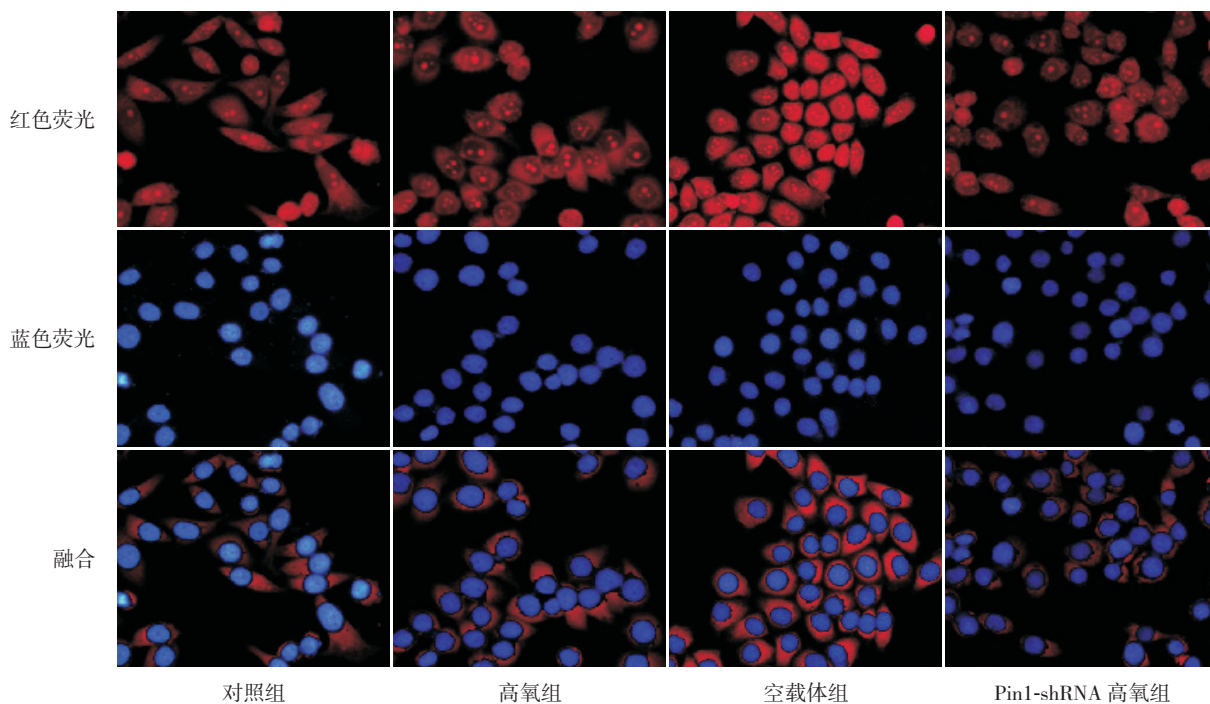


图 3 各组细胞线粒体 ROS 生成的改变 (荧光显微镜, $\times 400$) 线粒体 ROS 呈红色荧光, 蓝色荧光显示为细胞核。高氧组、空载体组红色荧光明显增多, 代表线粒体 ROS 显著高于对照组, 而 Pin1-shRNA 组线粒体 ROS 较高氧组显著降低, 但仍高于对照组。

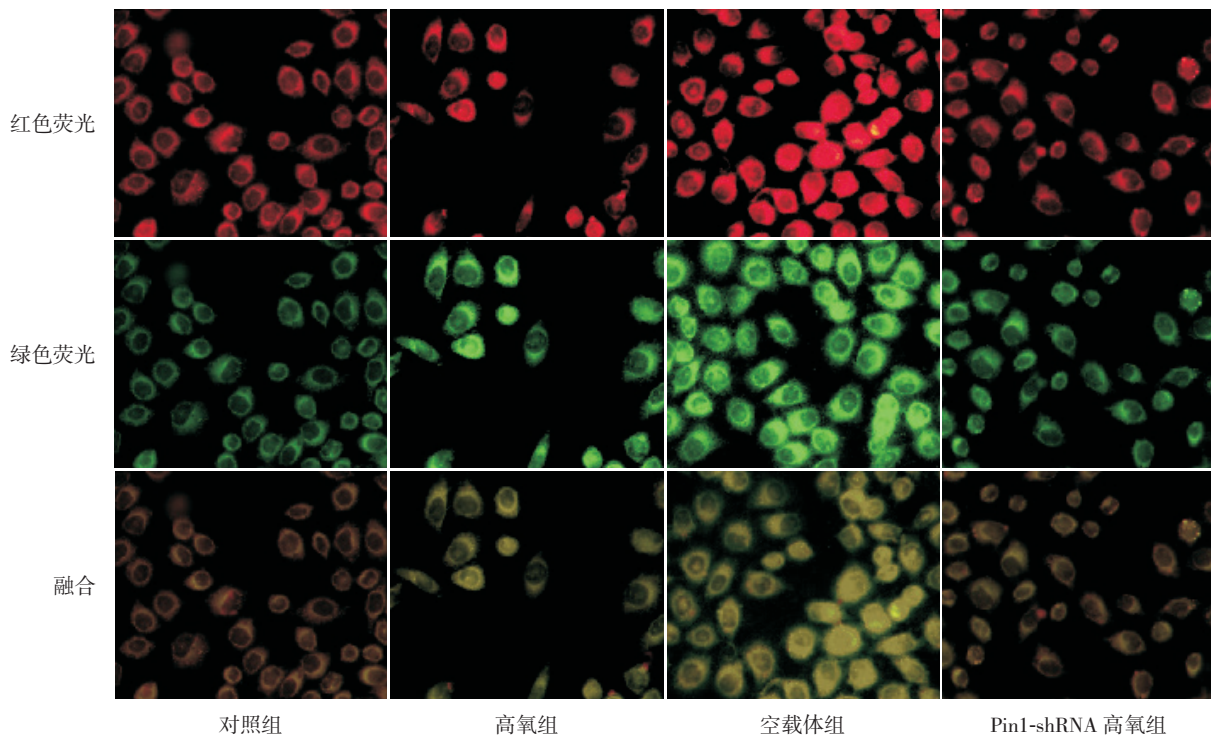


图 4 各组细胞线粒体膜电位的改变 (荧光显微镜, $\times 400$) 正常线粒体膜电位较高, JC-1 呈现红色荧光, 线粒体膜电位下降时, JC-1 呈现绿色荧光。判断线粒体膜电位高低以红、绿荧光的比值来表示。高氧组、空载体组线粒体膜电位较对照组降低, Pin1-shRNA 组线粒体膜电位较高氧组有所升高, 但仍低于对照组。

3 讨论

随着医疗技术的不断发展, 早产儿救治的成活率逐年增加。但在救治过程中, 大部分患儿均吸入不同浓度的氧气, 由此造成了急、慢性肺损伤, 后者已经成为了早产儿, 尤其是极低出生体重儿的主要死亡原因^[7-8]。

越来越多的研究者关注高氧诱导肺泡上皮细胞的损伤机制, 重点仍是氧化应激通路。氧化应激可产生肿瘤坏死因素 α (tumor necrosis factor, TNF- α), 后者与细胞膜表面受体特异性结合, 通过死亡受体途径介导细胞凋亡^[9]。此外, 有研究表明持续高氧暴露可产生大量 ROS, 导致 Ca^{2+} 蓄积并超载, 通过线粒体途径介导细胞凋亡, 引起线粒体通透性转换孔开放, 从而氧化磷酸化解偶联与电子传递链下降、线粒体膜电位丧失、细胞色素 C 和凋亡诱导因子释放等^[10]。本课题组前期研究证实, Omi/HtrA2 是一种线粒体丝氨酸蛋白酶, 作为凋亡蛋白之一^[11], 正常情况下存在于线粒体膜膜间隙中, 高氧可以诱导线粒体膜通透性改变, 从线粒体膜间隙释放到细胞质中^[12], 可独立地破坏核内染色质, 经过自身酶切转变成活性形式,

与 XIAP 相互作用, 进而激活凋亡蛋白家族的主要成员 Caspase 并作用于其他 Ca^{2+} 依赖性蛋白, 通过这些变化导致整个细胞的结构破坏、功能紊乱, 最终细胞凋亡^[13]。

Pin1 是人类肽基脯氨酰异构酶, 能特异地识别和结合蛋白质磷酸化的丝 / 苏 - 脯氨酸基序, 催化磷酸化的丝 / 苏 - 脯氨酸肽键发生顺反异构, 从而改变磷酸化蛋白质的功能^[14-15]。目前尚无报道关于 Pin1 参与线粒体氧化应激通路的相关报道。线粒体作为细胞内唯一供能细胞器, 既是细胞产生氧化应激反应的重要部位, 又是发生细胞凋亡的中心环节^[16]。本实验研究 Pin1 所参与的氧化磷酸化途径是通过线粒体膜通透性的改变, 进入胞质中活化后的 p66Shc 转移到线粒体呼吸链酶复合体 III 氧化细胞色素 C 产生 ROS/ H_2O_2 。当细胞色素 C 等进入胞质中, 与 d-ATP 结合, 激活 Apaf-1, Apaf-1 寡聚化使凋亡起始蛋白酶原前体 Caspase-9 激活, 从而启动了凋亡途径。XIAP 的 BIR3 结构域可与在 Asp315 位点酶切活化的 Caspase-9 上 315 位天冬氨酸能与 XIAP-BIR3 结合, 产生抑制信号而阻滞 Caspase-9 对下游蛋白激活^[17-20]。如果能够早期抑制细胞中 Pin1 的表达, 就可从根源上减

少氧化应激后 Pin1 介导的 p66shc 在线粒体上转位, 进而阻止线粒体呼吸链复合体Ⅲ氧化细胞色素 C 产生的 ROS/H₂O₂, 最终减少高氧对细胞的损伤。

本研究检测了抑制 Pin1 表达后的 A549 细胞系相关指标。在流式细胞仪检测凋亡中, 抑制 Pin1 表达的 A549 细胞系给予高氧刺激后能够降低凋亡率; 其在免疫组化检测结果中得到, XIAP 的表达较高氧组有所增加, Caspase-9 的表达有所下降; 在检测线粒体 ROS 的产生中, 抑制 Pin1 表达的 A549 细胞系中表达活性氧簇的红色荧光较高氧组明显减少; 而在检测线粒体膜电位的变化中, 其线粒体膜电位较高氧组高, 但未达到对照组水平。由此可见, Pin1 通过 p66shc 调节细胞氧化应激反应信号通路, 抑制其表达有望成为新的氧化应激治疗方法, 提高早产儿的生存质量。

[参 考 文 献]

- [1] Gien J, Kinsella JP. Pthogenesis and treatment of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2011, 23(3): 305-313.
- [2] Przybylska D, Mosieniak G. The role of NADPH oxidase NOX4 in regulation of proliferation, senescence and differentiation of the cells[J]. *Postepy Biochem*, 2014, 60(1): 69-76.
- [3] Kardeh S, Ashkani-Esfahani S, Alizadeh AM. Paradoxical action of reactive oxygen species in creation and therapy of cancer[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 15(735): 150-168.
- [4] Pinton P, Rimessi A, Marchi S, et al. Protein kinase C and prolylisomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life span determinant p66Shc[J]. *Science*, 2007, 315 (5812): 6592-6663.
- [5] 车忠丽, 董文斌, 李清平, 等. PKC β /p66shc 氧化应激通路介导高氧诱导人肺泡上皮细胞凋亡的作用[J]. *临床儿科杂志*, 2013, 31(11): 1066-1069.
- [6] 赵帅, 董文斌, 张婵, 等. 慢病毒介导的 shRNA 对 A549 细胞 Pin1 表达的感染作用[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2013, 30(3): 245-249.
- [7] Fridman E, Linder N. Magnesium and bronchopulmonary dysplasia[J]. *Harefuah*, 2013, 152(3): 158-161.
- [8] Agrawal A, Zhuo H, Brady S, et al. Pathogenetic and predictive value of biomarkers in patients with ALI and lower severity of illness: results from two clinical trials[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 303: L634-L639.
- [9] Tchikov V, Bertsch U, Fritsch J, et al. Subcellular compartmentalization of TNF receptor-1 and CD95 signaling pathways[J]. *Eur J Cell Biol*, 2011, 90(6-7): 467-475.
- [10] Delavallee L, Cabon L, Galan Malo P, et al. AIF mediated caspase in dependent necroptosis: A new chance for targeted therapeutics [J]. *IUBMB Life*, 2011, 63(4): 221-232.
- [11] Xu Z, Chen X, Peng C, et al. The expression and clinical significance of Omi/Htra2 in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatogastroenterology*, 2013, 60(121): 6-13.
- [12] Lu MY, Dong WB, Kang L, et al. Protective effect of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel on lung injury induced by hyperoxia in premature rats[J]. *Am J Appl Clin Pediatr*, 2012(27): 1402-1406.
- [13] Winkler J, Rand ML, Schmugge M, et al. Omi/HtrA2 and XIAP are components of platelet apoptosis signaling[J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109(3): 532-539.
- [14] Lee TH, Pastorino L, Lu KP. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase Pin1 in ageing, cancer and Alzheimer disease[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2011, 13: e21.
- [15] Hanes SD. The Ess1 prolyl isomerase: Traffic cop of the RNA polymerase II transcription cycle[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 939(14): 21-22.
- [16] Garcia-Corzo L, Luna-Sanchez M, Doerrier C, et al. Ubiquinol-10 ameliorates mitochondrial encephalopathy associated with CoQ deficiency[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 443(14): 47-57.
- [17] Zhang Z, Falk MJ. Integrated transcriptome analysis across mitochondrial disease etiologies and tissues improves understanding of common cellular adaptations to respiratory chain dysfunction[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2014, 2725(14): 55-57.
- [18] Verner Z, Cermakova P, Skodová I, et al. Comparative analysis of respiratory chain and oxidative phosphorylation in *Leishmania tarentolae*, *Crithidia fasciculata*, *Phytomonas serpens* and procyclic stage of *Trypanosoma brucei*[J]. *Mol Biochem Parasitol*, 2014, 6851(14): 19-25.
- [19] Kiss G, Konrad C, Pour-Ghaz I, et al. Mitochondrial diaphorases as NAD⁺ donors to segments of the citric acid cycle that support substrate-level phosphorylation yielding ATP during respiratory inhibition[J]. *FASEB J*, 2014, 5674(45): 452-455.
- [20] Oberoi-Khanuja TK, Murali A, Rajalingam K. IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration[J]. *Cell Death Dis*, 2013, 5(4): e784.

(本文编辑: 周勇)