

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2016.09.016

论著·实验研究

需肌醇酶1介导的内质网应激通路参与高氧所致早产大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡

鞠慧敏 卢红艳 张燕雨 王秋霞 张强

(江苏大学附属医院儿科, 江苏 镇江 212001)

[摘要] **目的** 探讨需肌醇酶1(IRE1)介导的内质网应激通路与高氧暴露肺泡Ⅱ型上皮细胞(AECⅡ)凋亡的关系。**方法** 原代培养早产大鼠AECⅡ, 随机分为空气组和高氧组, 建立高氧细胞损伤模型。在24、48及72 h收集细胞, 倒置相差显微镜观察细胞形态变化; Annexin V/PI双染流式细胞术检测细胞凋亡; RT-PCR及Western blot分别检测葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、IRE1、X盒结合蛋白1(XBP1)及C/EBP同源蛋白(CHOP)mRNA及蛋白表达; 免疫荧光检测CHOP表达。**结果** 随着给氧时间延长, 高氧组AECⅡ伸展呈不规则形, 出现空泡样改变; 高氧组AECⅡ凋亡率与同时时间点空气组比较明显增加($P<0.05$); 随着氧暴露时间延长, 高氧组GRP78、IRE1、XBP1及CHOP mRNA及蛋白表达升高, 且较同时时间点空气组明显上升($P<0.05$); 高氧组CHOP荧光强度高于同时时间点空气组。高氧组CHOP蛋白表达与AECⅡ凋亡率、IRE1及XBP1蛋白表达呈显著正相关($r=0.97, 0.85, 0.88$, 均 $P<0.05$)。**结论** 高氧所致AECⅡ凋亡可能是通过激活IRE1-XBP1-CHOP通路来实现。
[中国当代儿科杂志, 2016, 18(9): 867-873]

[关键词] 内质网应激; 凋亡; 需肌醇酶1; C/EBP同源蛋白; 肺泡Ⅱ型上皮细胞; 大鼠

Association between endoplasmic reticulum stress pathway mediated by inositol-requiring kinase 1 and AECII apoptosis in preterm rats induced by hyperoxia

JU Hui-Min, LU Hong-Yan, ZHANG Yan-Yu, WANG Qiu-Xia, ZHANG Qiang. Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China (Lu H-Y, Email: lhy5154@163.com)

Abstract: Objective To study the association between endoplasmic reticulum stress (ERS) pathway mediated by inositol-requiring kinase 1 (IRE1) and the apoptosis of type II alveolar epithelial cells (AECIIs) exposed to hyperoxia. **Methods** The primarily cultured AECIIs from preterm rats were divided into an air group and a hyperoxia group. The model of hyperoxia-induced cell injury was established. The cells were harvested at 24, 48, and 72 hours after hyperoxia exposure. An inverted phase-contrast microscope was used to observe morphological changes of the cells. Annexin V/PI double staining flow cytometry was performed to measure cell apoptosis. RT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression of glucose-regulated protein 78 (GRP78), IRE1, X-box binding protein-1 (XBP-1), and C/EBP homologous protein (CHOP). An immunofluorescence assay was performed to measure the expression of CHOP. **Results** Over the time of hyperoxia exposure, the hyperoxia group showed irregular spreading and vacuolization of AECIIs. Compared with the air group, the hyperoxia group showed a significantly increased apoptosis rate of AECIIs and significantly increased mRNA and protein expression of GRP78, IRE1, XBP1, and CHOP compared at all time points ($P<0.05$). The hyperoxia group had significantly greater fluorescence intensity of CHOP than the air group at all time points. In the hyperoxia group, the protein expression of CHOP was positively correlated with the apoptosis rate of AECIIs and the protein expression of IRE1 and XBP1 ($r=0.97, 0.85, \text{ and } 0.88$ respectively; $P<0.05$). **Conclusions** Hyperoxia induces apoptosis of AECIIs possibly through activating the IRE1-XBP1-CHOP pathway.

[Chin J Contemp Pediatr, 2016, 18(9): 867-873]

Key words: Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis; Inositol-requiring kinase 1; C/EBP homologous protein; Type II alveolar epithelial cell; Rats

[收稿日期] 2016-04-10; [接受日期] 2016-07-08

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370746); 镇江市社会发展项目(SH2015071)。

[作者简介] 鞠慧敏, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 卢红艳, 女, 主任医师。

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是威胁早产儿, 特别是小早产儿生存及生活质量的常见呼吸系统疾病。高浓度氧治疗是早产儿 BPD 主要原因之一^[1], 但具体发病机制尚不十分清楚。肺泡 II 型上皮细胞 (type II alveolar epithelial cell, AEC II) 是肺内主要干细胞, 研究发现^[2], AEC II 高氧损伤及凋亡在 BPD 形成中起重要作用。AEC II 内质网丰富, 具有发生内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 的结构基础。内质网应激相关凋亡是近年研究热点, 与多种肺部疾病有关^[3-4]。我们前期利用早产大鼠 BPD 模型研究已发现^[5], 高氧暴露后早产大鼠肺组织 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 表达明显增高, CHOP 途径参与 BPD 中肺细胞凋亡。需肌醇酶 1 (inositol-requiring kinase 1, IRE1) 是 ERS 感受信号之一, ERS 状态下 IRE1 剪切 X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein-1, XBP1) 前体 mRNA 生成编码 XBP1s 的 mRNA, XBP1s 可诱导下游 ERS 特异 CHOP 凋亡蛋白表达。已有研究指出^[6], IRE1-XBP1-CHOP 途径与非小细胞肺癌细胞凋亡密切相关。而 IRE1-XBP1-CHOP 途径与 AEC II 凋亡的关系目前研究甚少。本实验拟建立原代培养早产大鼠 AEC II 细胞高氧损伤模型, 进一步从细胞层面探讨 IRE1-XBP1-CHOP 通路是否与 AEC II 凋亡相关。

1 材料与方法

1.1 材料

IV 胶原酶 (Sigma 公司, 美国); D/F12 培养基 (Hyclone 公司, 美国); 胰蛋白酶 (Invitrogen 公司, 美国); 胎牛血清 (Serpro 公司, 德国); 双抗 (Invitrogen 公司, 美国); SDS-PAGE 配胶试剂盒 (长沙艾佳生物技术有限公司); TRIzol (Invitrogen 公司, 美国); Prime-Script RT reagent Kit 试剂盒、SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒 (TaKaRa 公司, 日本); 兔抗大鼠 β -actin、葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、IRE1、XBP1s 及 CHOP 单克隆抗体 (CST 公司, 美国); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (CST 公司, 美国); 山羊抗兔 IgG、FITC (北京康为世纪生物技术有限公司); FITC AnnexinV/PI 流式试剂盒 (BD 公司, 美国); ECL (Millipore 公司, 美国); 引物由上海生工生物工

程公司设计及合成 (表 1); CYS-1 数字式测氧仪 (上海嘉定学联仪表厂)。

表 1 引物序列

基因	产物大小 (bp)	引物序列 5' → 3'
β -actin	136	F: GCAGAAGGAGATTACTGCCCT R: GCTGATCCACATCTGCTGGAA
GRP78	143	F: GAACGTCTGATTGGCGATGC R: ACCACCTTGAACGGCAAGAA
IRE1	121	F: GGACACTGAATCTGGGGACG R: GGTCTCCACAGCGACATTGA
XBP1	117	F: CTGAGTCCGCAGCAGGTG R: TGTCCAGAATGCCCAACAGG
CHOP	142	F: TGTTCAGCCACTCCCCATTA R: CTCTGCAGGTCTCATACCAG

注: [GRP78] 葡萄糖调节蛋白 78; [IRE1] 需肌醇酶 1; [XBP1] X 盒结合蛋白 1; [CHOP]C/EBP 同源蛋白。

1.2 AEC II 高氧损伤模型建立及分组

雌性清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体重 200~220 g, 雄性清洁级 SD 大鼠, 体重 220~250 g, 由江苏大学实验动物中心提供。SD 雌雄鼠按 3:1 合笼交配, 次日晨取雌鼠阴道分泌物涂片, 镜检见精子, 当日记为妊娠第 1 天。孕 19~20 d SD 大鼠, 无菌条件下剖腹取出胎鼠, 并取胎鼠肺组织进行 AEC II 原代培养, 按前期已报道方法进行^[7]。AEC II 接种 15 h 贴壁后, 更换培养液并随机分为空气组和高氧组。高氧组按 3 L/min 通入 95% O₂+5% CO₂ 10 min, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 空气组直接置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。每隔 24 h 更换培养液, 高氧组重复以上操作。分别于给氧后 24、48 及 72 h 收获各组细胞, CYS-1 数字式测氧仪检测培养瓶中 O₂ 浓度, 低于 900 mL/L O₂ 浓度标本舍弃。

1.3 倒置相差显微镜观察 AEC II 形态变化

在各时间点吸弃各组培养基, 以 PBS 液洗涤细胞 2 遍, 倒置相差显微镜观察细胞形态变化。

1.4 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡

每组分别在 24、48 及 72 h, 各取 8 瓶细胞, 吸弃培养基, 以 PBS 液洗涤细胞 2 遍, 用不含 EDTA 胰酶消化, 每瓶细胞平均分 3 份收集于 EP 管中。严格按照 FITC Annexin V/PI 流式试剂盒说明处理细胞。处理后 1 h 内用 Accuri C6 流式机 (BD

公司, 美国) 检测各样本细胞凋亡率。

1.5 RT-PCR 检测相关因子 mRNA 表达

每组分别在 24、48 及 72 h, 各取 8 瓶细胞, TRIzol 试剂提取 AEC II 总 RNA, 紫外分光光度计 (Thermo 公司, 美国) 测定 RNA 纯度和含量, 严格按照试剂盒说明书反转录合成 cDNA, 将每个样本平均分成 3 份在 PCR 扩增仪 (Roche 公司, 美国) 上进行扩增。PCR 反应体系: 12.5 μ L SYBR Premix Ex Taq™; PCR 上下游引物 (10 μ M) 各 0.5 μ L; 0.5 μ L ROX Reference Dye II ($\times 50$); 2.0 μ L DNA 模板; 9.0 μ L ddH₂O; 合计 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。以 β -actin 为内参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 相对定量法进行分析。

1.6 Western blot 检测相关因子蛋白表达

每组分别在 24、48 及 72 h, 各收集 8 瓶细胞, RIPA 裂解液 (含 PMSF) 提取各组细胞总蛋白。按每泳道取 20 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿式电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h 后, 以兔抗大鼠 β -actin、GRP78、IRE1、XBP1s 及 CHOP IgG (1:1000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天洗膜后, 以辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔单克隆 IgG (1:5000) 孵育 1 h, ECL 化学发光显色。每次跑胶重复上样 3 次, GDS-8000 型凝胶成像分析系统扫描并分析。以目的蛋白与 β -actin 条带积分吸光度的比值表示目的基因的相对表达水平。

1.7 CHOP 免疫荧光检测

各时间点各组样本以 PBS 液洗涤 3 遍, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.5% Triton 通透化 30 min, 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h, 以兔抗大鼠 CHOP IgG (1:200) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。第 2 天以 FITC 标记山羊抗兔 IgG (1:300) 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。DAPI 染核 2 min 后荧光显微镜 (Olympus 公司, 日本) 观察拍照。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 18.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组样本间比较采用 t 检验; 组内各时间点比较采

用单因素方差分析, 两两时间点比较采用 SNK- q 检验; 两样本间相关性采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AEC II 形态变化

空气组 AEC II 在 24、48 及 72 h 略呈梭形, 细胞贴壁呈岛状生长, 细胞饱满。高氧暴露 24 h, AEC II 颜色变暗, 细胞内出现细小点状颗粒, 部分细胞变小变圆; 48 h 后, 细胞伸展呈不规则形, 胞内点状颗粒增多, 部分细胞漂浮于培养基中; 72 h 后, 细胞形态更不规则, 细胞颜色变暗, 部分细胞呈空泡化改变, 漂浮于培养基中的死细胞更多。

2.2 AEC II 凋亡变化

Annexin V/PI 双染流式细胞术检测各时间点各组 AEC II 凋亡情况, 结果表明, 各时间点空气组 AEC II 早期凋亡率均较低, 而高氧组 AEC II 早期凋亡率明显增加, 与同时间点空气组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2 及图 1。

2.3 ERS 相关因子 mRNA 表达变化

实时荧光定量 PCR 结果表明, 各时间点空气组 GRP78、IRE1、XBP1 及 CHOP mRNA 表达量均较低; GRP78、IRE1、XBP1 及 CHOP mRNA 表达随高氧暴露时间延长, 表达量呈逐渐增高趋势 ($P < 0.05$), 且与同时间点空气组比较均增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 2 空气组和高氧组 AECII 凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	24 h	48 h	72 h
空气组	8	8.03 \pm 0.56	8.31 \pm 0.51	8.93 \pm 0.26
高氧组	8	10.34 \pm 0.78	36.61 \pm 3.09	47.51 \pm 2.23
t 值		6.84	20.35	48.56
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

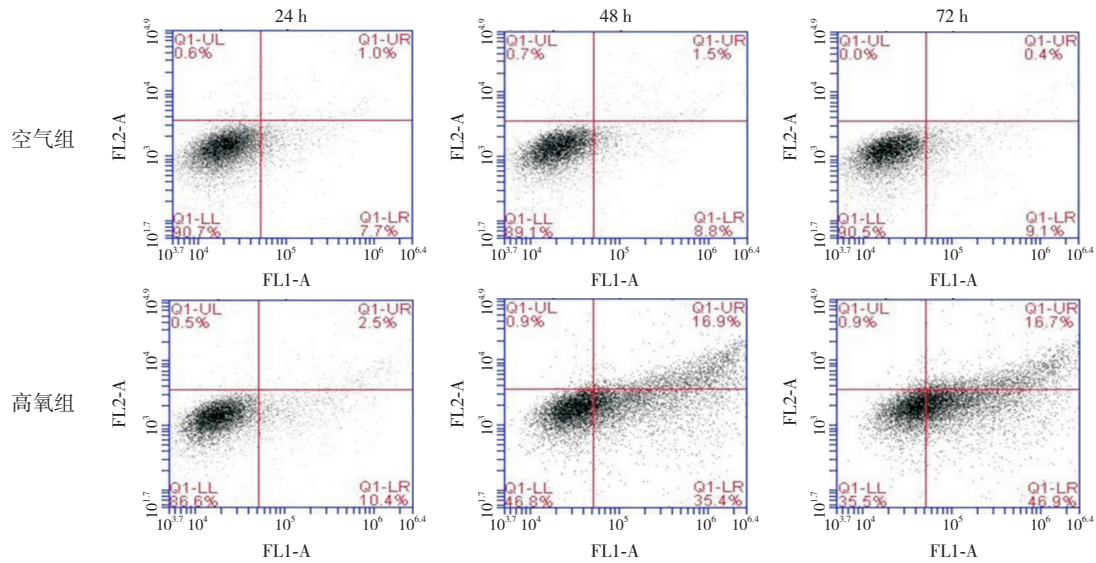


图 1 Annexin V/PI 双染流式细胞术检测 AEC II 凋亡 左上象限代表机械损伤细胞，左下象限代表正常细胞，右下象限代表早期凋亡细胞，右上象限代表晚期凋亡细胞。24、48 及 72 h，空气组早期凋亡率均较低，同时间点高氧组早期凋亡率均明显增加。

表 3 两组各时间点 ERS 相关因子 mRNA 表达比较 ($\times 10^{-3}$, $\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	GRP78					IRE1				
	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
空气组	13.9 ± 0.9	16.1 ± 1.6 ^a	13.4 ± 2.0 ^b	4.43	<0.05	0.15 ± 0.06	0.15 ± 0.46	0.15 ± 0.38	0.01	>0.05
高氧组	17.0 ± 1.2	53.7 ± 1.7 ^a	73.0 ± 8.4 ^{a,b}	264.30	<0.05	0.22 ± 0.06	0.65 ± 0.11 ^a	1.03 ± 0.38 ^{a,b}	130.13	<0.05
t 值	5.75	45.39	19.59			2.34	11.65	20.44		
P 值	<0.01	<0.01	<0.01			<0.05	<0.01	<0.01		

续表 3

组别	XBP1					CHOP				
	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
空气组	0.67 ± 0.09	0.73 ± 0.13	1.31 ± 0.53 ^{a,b}	9.85	<0.05	0.88 ± 0.06	1.49 ± 0.07 ^a	1.52 ± 0.07 ^a	211.01	<0.05
高氧组	1.58 ± 0.39	3.58 ± 1.10 ^a	4.87 ± 1.18 ^{a,b}	24.14	<0.05	1.64 ± 0.11	3.61 ± 0.13 ^a	4.93 ± 0.35 ^{a,b}	130.13	<0.05
t 值	6.49	7.29	7.81			12.33	10.00	5.35		
P 值	<0.01	<0.01	<0.01			<0.05	<0.01	<0.01		

注: [GRP78] 葡萄糖调节蛋白 78; [IRE1] 需肌醇酶 1; [XBP1] X 盒结合蛋白 1; [CHOP] C/EBP 同源蛋白。a 示与同组 24 h 比较, $P<0.05$; b 示与同组 48 h 比较, $P<0.05$ 。

2.4 ERS 相关因子蛋白表达变化

Western blot 结果表明, 随着高氧暴露时间延长, 高氧组 GRP78、IRE1、XBP1s、CHOP 蛋白表达呈逐渐上升趋势 ($P<0.05$); 与同时间点空气组相比升高明显, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 2 及表 4。

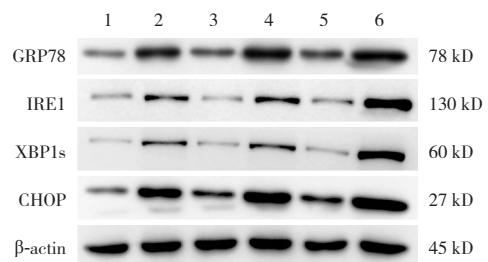


图 2 Western blot 检测 ERS 相关因子蛋白表达 1: 空气组 24 h; 2: 高氧组 24 h; 3: 空气组 48 h; 4: 高氧组 48 h; 5: 空气组 72 h; 6: 高氧组 72 h。[GRP78] 葡萄糖调节蛋白 78; [IRE1] 需肌醇酶 1; [XBP1] X 盒结合蛋白 1; [CHOP] C/EBP 同源蛋白。

表4 两组各时间点 ERS 相关因子蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	GRP78					IRE1				
	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
空气组	0.34 ± 0.07	0.57 ± 0.08	0.67 ± 0.14 ^a	5.58	<0.05	0.21 ± 0.04	0.19 ± 0.02	0.26 ± 0.06	1.97	>0.05
高氧组	0.90 ± 0.11	1.04 ± 0.10 ^a	1.07 ± 0.22 ^{ab}	4.54	<0.05	0.38 ± 0.06	0.45 ± 0.08 ^a	0.85 ± 0.18 ^{ab}	14.74	<0.05
t 值	10.61	10.25	4.42			6.23	8.46	8.83		
P 值	<0.01	<0.01	<0.01			<0.01	<0.01	<0.01		

续表 4

组别	XBP1					CHOP				
	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值	24 h	48 h	72 h	F 值	P 值
空气组	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.11 ± 0.03	2.57	>0.05	0.33 ± 0.04	0.52 ± 0.07 ^a	0.61 ± 0.10 ^a	10.60	<0.05
高氧组	0.19 ± 0.03	0.24 ± 0.05 ^a	0.47 ± 0.12 ^{ab}	9.14	<0.05	0.76 ± 0.09	0.91 ± 0.09 ^a	0.98 ± 0.17 ^{ab}	9.73	<0.05
t 值	12.07	8.23	8.18			12.33	10.00	5.35		
P 值	<0.01	<0.01	<0.01			<0.01	<0.01	<0.01		

注: [GRP78] 葡萄糖调节蛋白 78; [IRE1] 需肌醇酶 1; [XBP1] X 盒结合蛋白 1; [CHOP] C/EBP 同源蛋白。a 示与同组 24 h 比较, $P < 0.05$; b 示与同组 48 h 比较, $P < 0.05$ 。

2.5 CHOP 免疫荧光变化

免疫荧光显示 CHOP 定位于 AEC II 细胞核内。在 24、48 及 72 h, 空气组荧光强度较弱, CHOP

表达量较少; 而在各时间点高氧组, 荧光强度增强, CHOP 表达量增多。见图 3。

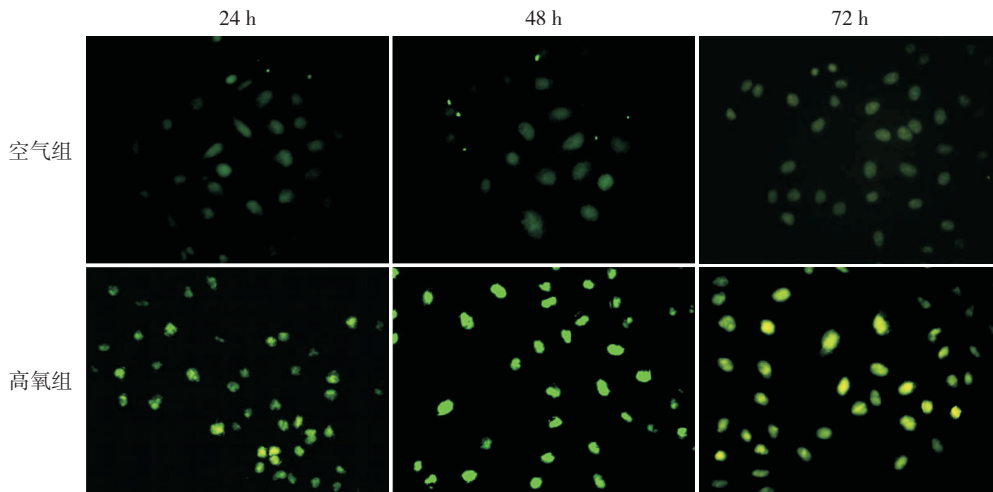


图3 免疫荧光检测 CHOP 表达 (免疫荧光, $\times 400$) CHOP 呈绿色荧光。24、48 及 72 h, 空气组荧光强度较弱, CHOP 表达较少; 同时时间点高氧组, 荧光强度增强, CHOP 表达增多。

2.6 相关性分析

高氧组 AEC II CHOP 蛋白表达与 AEC II 凋

亡率、IRE1 及 XBP1s 蛋白表达均呈显著正相关 ($r=0.97、0.85、0.88$, 均 $P < 0.05$), 见图 4~6。

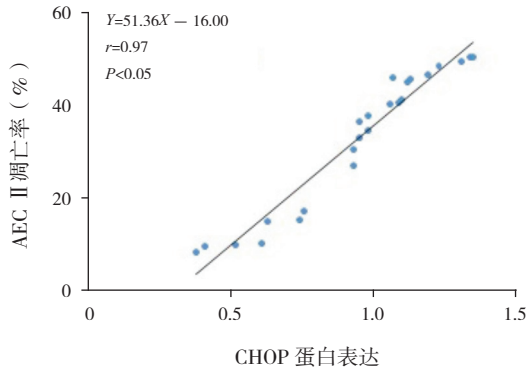


图4 CHOP 蛋白表达与 AECII 凋亡率相关分析图

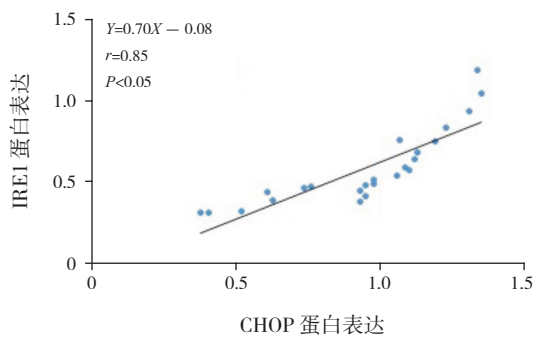


图5 CHOP 蛋白表达与 IRE1 蛋白表达相关分析图

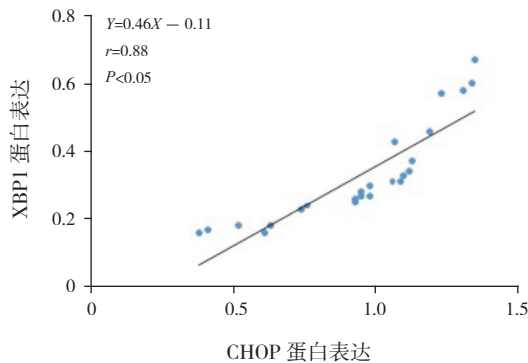


图6 CHOP 蛋白表达与 XBP1 蛋白表达相关分析图

3 讨论

AEC II 是肺内主要干细胞。Hou 等^[8]利用新生大鼠 BPD 模型及原代培养 AEC II 研究发现,高氧暴露后,BPD 组大鼠肺泡间隔中断增多,高氧组 AEC II 凋亡及转分化较对照组明显增加。本实验研究结果显示,高氧暴露后,AEC II 出现了颜色变暗、细胞伸展,细胞中出现细小颗粒并有空泡化改变,漂浮细胞增多等改变。Annexin V/PI 双染流式细胞术结果表明,空气组 AEC II 凋亡率较

低,而高氧组 AEC II 凋亡率较同时间点空气组明显增加,说明高氧使 AEC II 发生了形态改变并诱导 AEC II 凋亡增加。

ERS 相关凋亡是新近研究发现的非经典凋亡途径,AEC II 含有大量板层小体和粗面内质网,具有发生 ERS 的基础。正常情况下,GRP78 与跨膜蛋白结合以维持内质网稳态,但任何应激破坏内质网稳态,即发生 ERS 时,GRP78 便与跨膜蛋白解离,因此 GRP78 被认为是 ERS 标志性蛋白之一^[9]。本研究结果显示,高氧组 GRP78 mRNA 及蛋白表达水平随着给氧时间延长逐渐增高,且显著高于同时间点空气组,说明高氧确实启动了 AEC II 过程。

CHOP 是 ERS 特异的早期凋亡相关转录因子,可阻滞细胞分裂诱导细胞凋亡。CHOP 凋亡途径已被证实与多种疾病有关,包括糖尿病,神经退行性疾病,癌症等^[10]。有研究表明^[11],沉默 CHOP 基因可改善小鼠肾纤维化,减轻肾细胞凋亡及氧化应激损伤。利用高氧暴露小鼠 BPD 模型及小鼠肺上皮细胞损伤模型研究发现^[12],沉默 CHOP 基因可使不成熟肺组织损伤后发生重构,出现肺泡化,肺细胞死亡减少。但 CHOP 凋亡途径与 AEC II 凋亡的关系目前还不十分清楚。在本研究中,CHOP 表达于核内,空气组 CHOP 荧光强度较弱,高氧组 CHOP 荧光强度较空气组明显增强。空气组 CHOP mRNA 及蛋白表达均较低,而随着给氧时间延长,CHOP mRNA 及蛋白表达均呈逐渐上升趋势,与同时间点空气组比较,增加明显,且 CHOP 表达与细胞凋亡率呈显著正相关。以上结果进一步从细胞层面说明,高氧可激活 CHOP 途径并参与 AEC II 凋亡,但是沉默 CHOP 基因是否能抑制 AEC II 凋亡仍需进一步研究。

ERS 有三条跨膜感受器,均可诱导 CHOP 表达。IRE1 是内质网跨膜蛋白之一,与 GRP78 解离后发生自身寡聚化和磷酸化,同时激活自身核糖核酸内切酶活性,剪切 XBP1 前体 mRNA 生成能编码 XBP1s 的 mRNA,XBP1s 具有转录活性,可激活 CHOP 凋亡途径。IRE1 通路对于细胞的生存和凋亡,发挥重要调控作用,并已被证实与多种疾病相关,包括糖尿病、癌症等^[13]。van Schadewijk 等^[14]利用毒胡萝卜素诱导肺上皮细胞 ERS,研究发现,XBP1 在发生 ERS 的肺上皮细胞中表达明显增高,

且和 GRP78、CHOP 表达呈显著正相关。本实验研究发现, 空气组 IRE1 及 XBP1 表达均较低, 随着给氧时间延长, 高氧组 IRE1 及 XBP1 mRNA 及蛋白表达逐渐上升, 且与同时间点空气组比较差异有统计学意义。IRE1、XBP1s 蛋白表达均与 CHOP 蛋白表达呈显著正相关, 说明高氧启动了 AEC II 中 IRE1-XBP1-CHOP 通路, 且很可能与 AEC II 凋亡密切相关。Ghosh 等^[15]利用大量细胞和动物 ERS 模型研究发现, 抑制 IRE1 通路可缓解 ERS, 拮抗细胞凋亡, 保护细胞生理功能。因此推测, 在高氧所致 AEC II 凋亡过程中抑制 IRE1 通路可能对 AEC II 具有保护作用。

综上所述, 高氧激活了 ERS 相关的 IRE1-XBP1-CHOP 途径, 并参与 AEC II 凋亡。应用基因敲除技术或拮抗剂抑制 CHOP 功能, 或调控 IRE1-XBP1-CHOP 途径, 对于高氧所致 AEC II 损伤是否具有保护作用仍有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Balany J, Bhandari V. Understanding the impact of infection, inflammation, and their persistence in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2015, 2: 90.
- [2] Jin L, Yang H, Fu J, et al. Association between oxidative DNA damage and the expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 in lung epithelial cells of neonatal rats exposed to hyperoxia[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4079-4086.
- [3] Kim SR, Lee YC. Endoplasmic reticulum stress and the related signaling networks in severe asthma[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*, 2015, 7(2): 106-117.
- [4] Koyama M, Furuhashi M, Ishimura S, et al. Reduction of endoplasmic reticulum stress by 4-phenylbutyric acid prevents the development of hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(9): H1314-H1323.
- [5] Lu HY, Zhang J, Wang QX, et al. Activation of the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP in the lungs of rats with hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 4494-4500.
- [6] Wang LL, Hu RC, Dai AG, et al. Bevacizumab induces A549 cell apoptosis through the mechanism of endoplasmic reticulum stress in vitro[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 5291-5299.
- [7] 卢红艳, 常立文, 汪鸿, 等. 高氧对早产大鼠 II 型肺泡上皮细胞转分化的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2006, 22(6): 706-709.
- [8] Hou A, Fu J, Yang H, et al. Hyperoxia stimulates the transdifferentiation of type II alveolar epithelial cells in newborn rats[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015, 308(9): L861-L872.
- [9] Feng J, Chen X, Sun X, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress markers GRP78 and CHOP induced by oxidative stress in blue light-mediated damage of A2E-containing retinal pigment epithelium cells[J]. *Ophthalmic Res*, 2014, 52(4): 224-233.
- [10] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 381-389.
- [11] Liu SH, Wu CT, Huang KH, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) deficiency ameliorates renal fibrosis in unilateral ureteral obstructive kidney disease[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(16): 21900-21912.
- [12] Choo-Wing R, Syed MA, Harijith A, et al. Hyperoxia and interferon- γ -induced injury in developing lungs occur via cyclooxygenase-2 and the endoplasmic reticulum stress-dependent pathway[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(6): 749-757.
- [13] Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, et al. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(4): 1219-1243.
- [14] van Schadewijk A, van't Wout EF, Stolk J, et al. A quantitative method for detection of spliced X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA as a measure of endoplasmic reticulum (ER) stress[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2012, 17(2): 275-279.
- [15] Ghosh R, Wang L, Wang ES, et al. Allosteric inhibition of the IRE1 α RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell*, 2014, 158(3): 534-548.

(本文编辑: 万静)