

高氧肺损伤幼鼠 II 型肺泡上皮细胞蛋白质组学变化的相关研究

鲁雪 汪超 张超 肖长雪 梁木林 许峰

重庆医科大学附属儿童医院 PICU, 儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室,
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆重点实验室 400014

通信作者: 许峰, Email: Xufeng9899@163.com

【摘要】 目的 通过蛋白质组学研究探讨高氧暴露后幼鼠 II 型肺泡上皮细胞(AEC II)的损伤机制。**方法** 将早产 SD 大鼠原代 AEC II 细胞分为常氧组和高氧组, 分别置于常氧(21%O₂)和高氧(95%O₂)中培养 24 h, 于倒置相差显微镜下观察细胞形态学改变, 用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)表达水平, 以保证高氧模型的成功建立; 收集 AEC II 细胞总蛋白, 采用串联质谱标签(TMT)标记定量蛋白质组技术检测其蛋白谱, 以高氧暴露后差异倍数(FC) > 1.5、 $P < 0.05$ 双标准筛选差异蛋白, 并对其进行生物信息学分析; 依据分析结果, 将 AEC II 细胞分为常氧组、高氧组及高氧 + MW167 组[细胞置于含 95%O₂ 的氧舱前 30 min 加入 10 μ mol/L 的 γ 分泌酶抑制剂 MW167], 培养 24 h 后, 用 CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒检测细胞活性, 用实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)检测 Notch 通路下游蛋白毛状蛋白(Hes1)和促凋亡蛋白 Bax 的 mRNA 表达。**结果** ① 光镜下观察, 常氧组细胞明显增殖、延展, 胞质颗粒物质丰富; 高氧组细胞核固缩, 胞质内颗粒物质明显减少。与常氧组相比, 高氧组细胞 caspase-3 蛋白表达明显增高, Bcl-2 蛋白表达明显降低(caspase-3/GAPDH: 1.352 ± 0.086 比 0.769 ± 0.080 , Bcl-2/GAPDH: 0.614 ± 0.060 比 1.361 ± 0.078 , 均 $P < 0.01$)。② 蛋白质组学鉴定出差异蛋白 162 个, 其中高氧暴露后上调的差异蛋白主要参与各种刺激的应答, 定位于胞外区; 高氧暴露后下调的差异蛋白主要与物质合成相关, 定位于细胞基质区域。对差异蛋白通路富集分析(KEGG Pathway 分析)结果表明, 细胞色素 P450 代谢、线粒体氧化磷酸化、Notch 信号通路等可能与高氧损伤 AEC II 细胞机制相关。③ 与常氧组比较, 高氧组 AEC II 细胞活性显著下降, Hes1、Bax mRNA 表达水平明显升高[细胞活性(A 值): 0.060 ± 0.003 比 1.058 ± 0.017 , Hes1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.235 ± 0.606 比 1.144 ± 0.107 , Bax mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.210 ± 0.240 比 1.084 ± 0.096 , 均 $P < 0.05$]。与高氧组比较, 高氧 + MW167 组细胞活性明显升高, Hes1、Bax mRNA 表达水平明显下降[细胞活性(A 值): 0.271 ± 0.025 比 0.060 ± 0.003 , Hes1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.489 ± 0.046 比 2.235 ± 0.606 , Bax mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.289 ± 0.041 比 2.210 ± 0.240 , 均 $P < 0.05$]。**结论** 高氧肺损伤幼鼠 AEC II 细胞损伤机制可能与细胞色素 P450 代谢、线粒体氧化磷酸化等途径的改变以及 Notch 信号通路的激活有关。

【关键词】 高氧; II 型肺泡上皮细胞; 蛋白质组学

基金项目: 国家自然科学基金(81341021); 重庆市渝中区科技计划项目(20170110)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.04.020

Proteome analysis of type II alveolar epithelial cell in hyperoxia induced lung injury

Lu Xue, Wang Chao, Zhang Chao, Xiao Changxue, Liang Mulin, Xu Feng

Department of Pediatric Intensive Care Unit, Chongqing Medical University Children's Hospital, Ministry of Education Key Laboratory of Child Developmental Disease Research, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, National International Science and Technology Cooperation Base for Children with Major Developmental Diseases, Chongqing 400014, China
Corresponding author: Xu Feng, Email: Xufeng9899@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the damage mechanism of type II alveolar epithelial cells (AEC II) after hyperoxia exposure by proteomics. **Methods** The primary AEC II of preterm Sprague-Dawley (SD) rats were divided into normoxia and hyperoxia groups, and cultured in room air (21% O₂) or hyperoxia (95% O₂) condition, respectively. The cell morphology change was observed under an inverted contrast microscope; the protein expressions of Bcl-2 and caspase-3 were detected by Western Blot to ensure a successful model. Total protein in AEC II was collected, and mass spectrometry-based tandem mass tag (TMT)-labeled quantitative proteomics were used to detect the change of protein profile. Proteins with changes greater than 1.5-fold and $P < 0.05$ were considered differentially expressed, and bioinformatics analysis was performed. According to the proteomic results, AEC II were divided into three groups: normoxia group, hyperoxia group and hyperoxia+MW167 group (γ -secretase inhibitor MW167 was added to culture medium 30 minutes before they were placed into the chamber). The cell viability was detected by the cell proliferation and toxicity kit (CCK-8), and the expressions of Hes1, Bax mRNA were detected by real-time fluorescence quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** ① The cells in the normoxia group proliferated and prolonged significantly, and the cytoplasmic particulate matter was abundant. In the hyperoxia group, nucleus

pyknosis and cytoplasmic particulate matter decreased significantly. Compared with the normoxia group, the expression of caspase-3 in the hyperoxia group was significantly increased, and the expression of Bcl-2 was significantly decreased (caspase-3/GAPDH: 1.352 ± 0.086 vs. 0.769 ± 0.080 , Bcl-2/GAPDH: 0.614 ± 0.060 vs. 1.361 ± 0.078 , both $P < 0.01$).

② A total of 162 differentially expressed proteins were identified between normoxia and hyperoxia groups, the proteins up-regulated by hyperoxia were commonly associated with response processes to various stimuli, and located in the extracellular region; the proteins down-regulated by hyperoxia were commonly associated with synthesis of substances, and located in the cellular matrix. KEGG Pathway analyses suggested that metabolism by cytochrome P450, oxidative phosphorylation, and Notch signaling pathway were associated with the mechanism of hyperoxia injury on AEC II.

③ Compared with the normoxia group, the viability of cells in the hyperoxia group was significantly decreased, and the expressions of Hes1 and Bax mRNA were significantly increased [cell viability (*A* value): 0.060 ± 0.003 vs. 1.058 ± 0.017 , Hes1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.235 ± 0.606 vs. 1.144 ± 0.107 , Bax mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 2.210 ± 0.240 vs. 1.084 ± 0.096 , all $P < 0.05$]. Compared with the hyperoxia group, the viability of cells in the hyperoxia+MW167 group was significantly increased, and the expressions of Hes1 and Bax mRNA were significantly decreased [cell viability (*A* value): 0.271 ± 0.025 vs. 0.060 ± 0.003 , Hes1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 0.489 ± 0.046 vs. 2.235 ± 0.606 , Bax mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$): 1.289 ± 0.041 vs. 2.210 ± 0.240 , all $P < 0.05$].

Conclusion The mechanism of hyperoxia injury on AEC II may be related to the metabolism by cytochrome P450, oxidative phosphorylation and activation of Notch signaling pathway.

[Key words] Hyperoxia; Type II alveolar epithelial cell; Proteomics

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81341021); Chongqing Yuzhong Science and Technology Project (20170110)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.04.020

氧疗是抢救新生儿尤其是早产儿低氧血症必不可少的治疗手段,但长时间高浓度氧疗又可导致患儿发生急性肺损伤、慢性肺疾病^[1]。II 型肺泡上皮细胞(AEC II)作为肺的“干细胞”,在肺组织修复过程中起着不可替代的作用^[2],其损伤与修复是一系列基因、蛋白质的有序组合。本研究旨在对高氧暴露后 AEC II 细胞的蛋白质组学变化进行全面分析,进一步阐明高氧中 AEC II 细胞的损伤机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂:SPF 级 SD 孕鼠购自重庆医科大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(渝)2012-0001。胎牛血清、胰蛋白酶和 DMEM/F12 培养基购自美国 Gibco 公司;I 型胶原酶购自北京索莱宝公司;CCK-8 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自日本同仁公司;兔抗 Bcl-2、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)单克隆抗体购自美国 Abcam 公司;鼠抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体、羊抗兔二抗、蛋白提取试剂盒及 BCA 试剂盒购自北京碧云天生物技术公司;TRIzol、反转录试剂盒、荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, γ 分泌酶抑制剂 MW167 购自美国 Millipore 公司。

1.2 早产鼠原代 AEC II 细胞的分离、纯化及培养^[3]:取孕 20 d 的 SD 大鼠,剖宫产取出胎鼠,分离其肺组织,经胰酶、胶原酶消化后,差速离心和差速贴壁法纯化细胞,锥虫蓝染色检测细胞存活率大于 95%、巴氏染色鉴定细胞纯度大于 90% 的细胞用于后续实验。本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,

研究获得重庆医科大学实验动物伦理委员会审批(审批号:201730)。

1.3 AEC II 细胞高氧损伤模型制备与验证

1.3.1 细胞分组:将 AEC II 细胞分为常氧组和高氧组,原代 AEC II 细胞培养 24 h 后换液,常氧组细胞暴露于常氧(21%O₂)环境中,高氧组细胞暴露于密闭氧舱中(95%O₂),37℃继续培养 24 h,收集细胞以备后续实验。

1.3.2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测细胞中 Bcl-2、caspase-3 蛋白表达:取蛋白裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,经电泳、转膜、封闭后,加入 1:1000 稀释的 GAPDH、Bcl-2、caspase-3 抗体 4℃孵育过夜,室温孵育二抗 1 h,用 Millipore 显影剂进行化学发光,Quantity One 4.5.0 软件分析蛋白条带灰度值,以目的蛋白与内参 GAPDH 的灰度值比值作为蛋白表达量。

1.4 蛋白质组鉴定与数据库检索:提取各组细胞总蛋白并定量,用胰蛋白酶酶解后的蛋白进行串联质谱标签(TMT)标记、液相色谱分离、质谱鉴定。使用 Proteome DiscovererTM 2.2 软件分析数据,采用 Uniprot 大鼠数据库,肽段鉴定的假阳性率控制在 1% 以下,以 Sequest 程序得分(Score Sequest HT)>0、肽段数(unique peptides)≥1 条筛选可信蛋白。考虑到生物和技术的变异性,实验重复 3 次,以差异倍数(FC)>1.5 和 $P < 0.05$ 的双标准筛选差异蛋白。采用 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov>)和 OmicsBean 数据库(<http://www.omicsbean.com>)对差异蛋白进行生物信息学分析。

1.5 蛋白质组学结果验证

1.5.1 细胞分组:将原代 AEC II 细胞分为常氧组、高氧组和高氧 + MW167 组。高氧 + MW167 组细胞置于氧舱前 30 min 加入 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 Notch 通路抑制剂 MW167。

1.5.2 CCK-8 检测细胞活性:原代 AEC II 细胞接种于 96 孔板,每孔 2×10^4 个。各组相应培养 24 h,吸弃培养基,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL 、DMEM/F12 完全培养基 90 μL 继续培养 4 h 后,用酶标仪检测波长 450 nm 处吸光度(A)值。

1.5.3 实时荧光定量 PCR 检测 Notch 通路下游蛋白毛状蛋白(Hes1)和促凋亡蛋白 Bax 的 mRNA 表达:TRIzol 法提取细胞总 RNA,紫外分光光度计测量 RNA 的纯度与浓度。将 RNA 反转录为 cDNA,以 Hes1、Bax 和内参 GAPDH 的基因序列设计 PCR 引物, Hes1 正义链:5'-CAACACGACACCGGACAAAC-3', 反义链:5'-TTGGAATGCCGGGAGCTATC-3'; Bax 正义链:5'-GAATTGGCGATGAACTGGAC-3', 反义链:5'-GCAAAGTAGAAAAGGGCAAC-3'。实时荧光定量 PCR 仪扩增,反应体系 10 μL ,反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 s,最适温度退火 30 s,共 39 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各基因表达水平。

1.6 统计学分析:使用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 高氧暴露对幼鼠 AEC II 细胞的影响

2.1.1 形态学改变:体外培养 24 h 的 AEC II 细胞呈岛状贴壁生长,细胞连接紧密,呈立方形或者多边形,细胞透亮度高(图 1A)。常氧组 AEC II 细胞于常氧环境中继续培养 24 h 后,细胞延展、增殖明显,形状饱满,胞质分泌颗粒丰富(图 1B);高氧组 AEC II 细胞于高氧环境中继续培养 24 h,细胞形状明显改变,核固缩,胞质丢失(图 1C)。

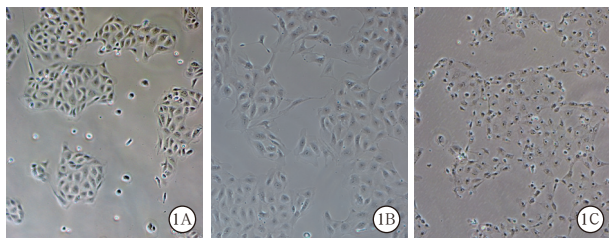
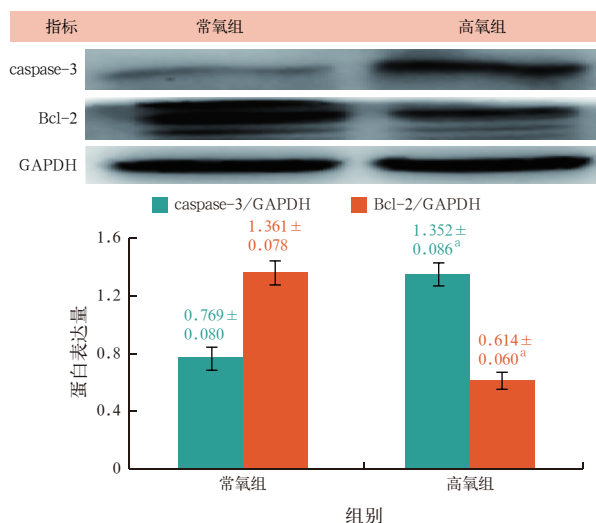


图1 倒置相差显微镜下观察各组早产SD大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞(AEC II)形态学改变 原代 AEC II 细胞体外培养 24 h 可见细胞岛状生长特性,形态饱满,连接紧密(A);常氧组 AEC II 细胞于常氧环境中继续培养 24 h,细胞明显增殖、延展,胞质颗粒物质丰富(B);高氧组 AEC II 细胞于高氧环境中继续培养 24 h,可见细胞核固缩,胞质组分丢失,胞质内颗粒物质明显减少(C) 低倍放大

2.1.2 caspase-3、Bcl-2 蛋白表达(图 2):与常氧组比较,高氧组 AEC II 细胞的促凋亡蛋白 caspase-3 表达水平明显升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平明显降低(均 $P < 0.01$),表明高氧处理后 AEC II 细胞生长受抑、凋亡增加。



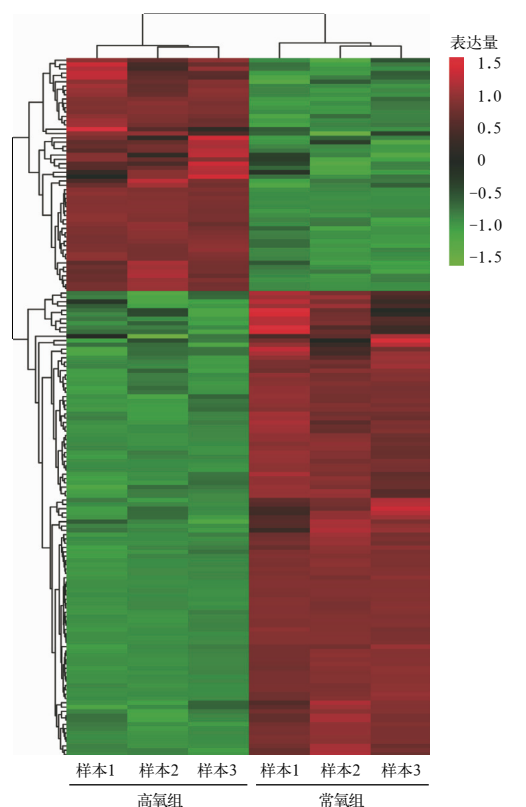
Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;与常氧组比较, ^a $P < 0.01$

图2 Western Blot 检测各组早产SD大鼠 AEC II 细胞 caspase-3、Bcl-2 蛋白表达

2.2 蛋白质组学结果

2.2.1 串联质谱质谱结果:共识别出 6228 个蛋白,根据标准筛选出可信蛋白 5782 个,以 $\text{FC} > 1.5$ 、 $P < 0.05$ 双标准筛选出差异蛋白 162 个,其中 54 个上调差异蛋白,108 个下调差异蛋白,高氧组蛋白合成较常氧组明显减少。差异蛋白的热图结果显示(图 3),常氧组样本蛋白的总体表达模式与高氧组存在明显差异,各组内样本蛋白的表达模式相似,证明各组样本重复性较好,实验数据可信、可靠。

2.2.2 功能富集(GO)分析(表 1~2):分别对上调、下调的差异蛋白进行功能富集,结果显示,与常氧组相比,高氧组上调差异蛋白的生物过程主要富集在对胞外刺激、脂质、含氧化合物、有机物的应答方面,主要定位于细胞外泌体、胞外囊泡、脂蛋白颗粒等,分子功能主要富集在还原型辅酶 II (NADPH) 氧化酶激活、阴离子结合、磷脂结合、蛋白质结合等方面;下调差异蛋白的生物过程主要与细胞外基质合成、胆固醇合成、类异戊二烯生物合成等相关,主要定位于细胞外基质、基底膜区等,分子功能主要富集于细胞外基质结构成分、糖胺聚糖结合、氧化还原酶活性、细胞色素蛋白结合、蛋白质结合、肝素结合等方面。



注: AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, 颜色表示蛋白 / 基因表达量, 表达量越高颜色越深 (红色代表上调, 绿色代表下调); 上方树形图对两组不同样品的聚类分析结果; 左侧树状图对对不同样本不同基因的聚类分析结果

图 3 两组早产 SD 大鼠 AEC II 细胞差异表达蛋白的热图分析

表 1 高氧干预后早产 SD 大鼠 AEC II 细胞较常氧培养 AEC II 细胞上调的差异蛋白功能富集 (GO) 分析结果

生物过程	基因数 (个)	细胞亚定位	基因数 (个)	分子功能	基因数 (个)
对胞外刺激的应答	27	胞膜结合细胞器	44	超氧化物生成 NADPH	2
对化学刺激的应答	27	细胞器	46	氧化酶激活剂活性	
对脂质的应答	18	囊泡	19	阴离子结合	19
对含氧化合物的应答	21	细胞外泌体	14	磷脂结合	6
对有机化合物的应答	26	脂蛋白颗粒	3	药物跨膜转运活性	2
对化学物质的应答	32	血浆脂蛋白颗粒	3	脂质结合	7
应激反应	26	胞外囊泡	14	蛋白结合	28
对激素的应答	16	胞外细胞器	14	抗氧化活性	3
对细菌的应答	12	脂蛋白复合物	3	小管胆汁酸跨膜转运活性	1
对有毒物质的应答	9	细胞质	33	糖蛋白结合	3
				药物转运蛋白活性	2

注: AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, NADPH 为还原型辅酶 II

表 2 高氧干预后早产 SD 大鼠 AEC II 细胞较常氧培养 AEC II 细胞下调的差异蛋白功能富集 (GO) 分析结果

生物过程	基因数 (个)	细胞亚定位	基因数 (个)	分子功能	基因数 (个)
细胞外基质构建	17	细胞外基质	18	细胞外基质结构成分	6
细胞外结构构建	17	细胞外基质组分	11	糖胺聚糖结合蛋白质	8
对创伤的应答	18	蛋白质类细胞外基质	15	氧化还原酶活性	3
仲醇生物合成	6	胞外区组分	39	细胞骨架蛋白结合	16
胆固醇生物合成	6	基底膜	8	蛋白结合	51
类异戊二烯生物合成	6	细胞外区	41	肝素结合	6
固醇生物合成	6	超分子纤维	17	同种蛋白结合	17
心血管系统发育	17	细胞外间隙	23	结构分子活性	15
细胞组分合成	50	膜结合囊泡	26	细胞外基质结合	4
解剖结构发育	47	胶原蛋白	6	肌动蛋白结合	10

注: AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞

表 3 早产 SD 大鼠 AEC II 细胞高氧暴露后前 10 位上调差异蛋白通路富集分析结果

通路 ID	通路名称	P 值	蛋白 / 基因名称
rno00860	Porphyryn and chlorophyll metabolism (卟啉与叶绿素代谢)	0.000	Hmox1、Ugt1a6、Ugt1a7c、Alas1
rno00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450 (细胞色素 P450 对外源性物质的代谢)	0.000	Ugt1a6、Ugt1a7c、Mgst1、Cyp2s1
rno05204	Chemical carcinogenesis (化学物致癌作用)	0.000	Ugt1a6、Ugt1a7c、Mgst1、Sult1a1
rno00790	Folate biosynthesis (叶酸生物合成)	0.000	Alpl、Mocs2
rno00982	Drug metabolism-cytochrome P450 (药物代谢 - 细胞色素 P450)	0.000	Ugt1a6、Ugt1a7c、Mgst1
rno00830	Retinol metabolism (视黄醇代谢)	0.000	Ugt1a6、Ugt1a7c、Cyp2s1
rno00053	Ascorbate and aldarate metabolism (抗坏血酸和醛糖代谢)	0.000	Ugt1a6、Ugt1a7c
rno00040	Pentose and glucuronate interconversions (戊糖和葡萄糖醛酸盐的相互转化)	0.000	Ugt1a6、Ugt1a7c
rno04330	Notch signaling pathway (Notch 信号通路)	0.000	Notch1

注: AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, Hmox1 为血红素加氧酶 1, Ugt1a 为 UDP-葡萄糖醛酸基转移酶 1a, Alas1 为 5-氨基酮戊酸合成酶 1, Mgst1 为微粒体谷胱甘肽转移酶 1, Cyp2s1 为细胞色素 P4502S1, Sult1a1 为磺基转移酶 1A, Alpl 为碱性磷酸酶, Mocs2 钼多核苷酸合成酶催化亚基, Notch1 为 Notch1 蛋白

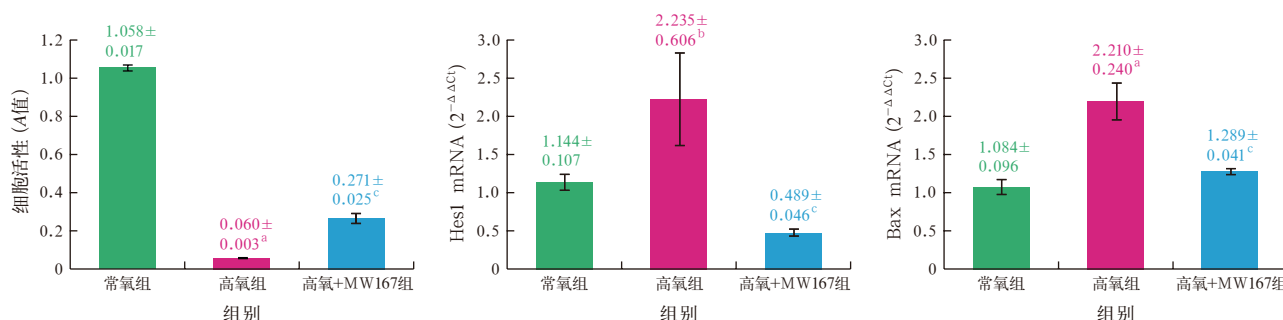
2.2.3 差异蛋白通路富集分析 (KEGG Pathway 分析): 表 3 和表 4 分别根据差异蛋白的 *P* 值展示了早产 SD 大鼠 AEC II 细胞高氧暴露后差异有统计学意义的前 10 个通路。与常氧组相比, 高氧组上调差异蛋白相关的通路富集在卟啉与叶绿素代谢、细胞色素 P450 对外源性物质的代谢、化学物致癌作用、叶酸生物合成、抗坏血酸和醛糖代谢、视黄醇代谢、戊

糖和葡萄糖醛酸盐的相互转化、Notch 信号通路等; 下调差异蛋白相关的通路富集在类固醇生物合成、非酒精性脂肪肝、核苷类骨架生物合成、氧化磷酸化、帕金森综合征、酮体的合成与降解、糖尿病并发症中晚期糖基化终末产物 - 晚期糖基化终末产物受体 (AGE-RAGE) 信号通路、阿尔茨海默病、白细胞跨内皮迁移。

表 4 早产 SD 大鼠 AEC II 细胞高氧暴露后前 10 位下调差异蛋白通路富集分析结果

通路 ID	通路名称	P 值	蛋白 / 基因名称
rno00100	Steroid biosynthesis (类固醇生物合成)	0.000	Fdft1、Cyp51a1、Sc5d
rno04932	Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD, 非酒精性脂肪肝)	0.000	Ndufs1、Ndufa7、Ndufa12、Ndufs8、LOC100912599、Pik3r3
rno00900	Terpenoid backbone biosynthesis (萜类骨架生物合成)	0.000	Hmgcs1、Acat2、Hmger
rno00190	Oxidative phosphorylation (氧化磷酸化)	0.000	Ndufs1、Ndufa7、Ndufa12、Ndufs8、LOC100912599
rno05012	Parkinson disease (帕金森综合征)	0.000	Ndufs1、Ndufa7、Ndufa12、Ndufs8、LOC100912599
rno00072	Synthesis and degradation of ketone bodies (酮体的合成与降解)	0.000	Hmgcs1、Acat2
rno04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications (糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 信号通路)	0.000	Serpine1、Col1a1、Col1a2、Pik3r3
rno05010	Alzheimer disease (阿尔茨海默病)	0.000	Ndufs1、Ndufa7、Ndufa12、Ndufs8、LOC100912599
rno04670	Leukocyte transendothelial migration (白细胞跨内皮转移)	0.000	Myl9、Esam、Pik3r3、Cldn23
rno05016	Huntington disease (亨廷顿舞蹈病)	0.000	Ndufs1、Ndufa7、Ndufa12、Ndufs8、LOC100912599

注: AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, AGE-RAGE 为晚期糖基化终末产物-晚期糖基化终末产物受体, Fdft1 为鲨烯合酶, Cyp51a1 为烯胆固醇 14- α 脱甲基酶, Sc5d 为烯胆固醇氧化酶, Ndufs 为 NADH 脱氢酶(泛素酮)Fe-S 蛋白, Ndufa 为 NADH 脱氢酶(泛素酮) α 亚基, LOC100912599 为 NADH 脱氢酶(泛素酮)铁硫蛋白 6, Pik3r3 为磷脂酰肌醇 3 激酶调节亚基, Hmgcs1 为羟甲基戊二酰辅酶 A 合酶, Acat2 为乙酰辅酶 A 乙酰基转移酶, Hmger 为 3-羟基-3-甲基戊二酸-辅酶 A 还原酶, Serpine1 为纤溶酶原激活物抑制因子 1, Col1a 为胶原蛋白 α 轻链, Myl9 为肌球蛋白调节轻链激酶 9, Esam 为内皮细胞选择性黏附分子, Cldn23 为 Claudin-23 蛋白



注: AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, MW167 为 γ 分泌酶抑制剂, Hes1 为毛状蛋白; 与常氧组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与高氧组比较, ^c $P < 0.01$

图 4 各组早产 SD 大鼠 AEC II 细胞活性及 Hes1 和 Bax 的 mRNA 表达水平比较

2.3 高氧暴露与 Notch 通路

2.3.1 蛋白质组学分析结果: TMT 标记蛋白质组学结果提示, 与常氧组比较, 高氧组 Notch1 蛋白含量显著升高, FC 值为 1.663, Notch 信号通路显著富集, 提示高氧暴露对早产 SD 大鼠 AEC II 细胞的损伤机制可能与 Notch 通路的上调相关。

2.3.2 细胞活性 (图 4): 高氧组细胞活性明显低于常氧组 ($P < 0.01$); 高氧 + MW167 组细胞活性明显高于高氧组 ($P < 0.01$)。

2.3.3 Notch 通路下游蛋白 Hes1、促凋亡蛋白 Bax 的 mRNA 表达 (图 4): 与常氧组相比, 高氧组 Hes1、Bax 的 mRNA 表达水平均明显升高 (均 $P < 0.05$); 高氧 + MW167 组 Hes1、Bax 的 mRNA 表达水平均较高氧组明显下降 (均 $P < 0.01$)。表明 MW167 可通过抑制 Notch 通路缓解高氧暴露引起的 AEC II 细胞凋亡。

3 讨论

氧疗是临床挽救新生儿生命不可或缺的治疗手段, 但与之相随的氧毒性一直是临床致力于避免

的问题, 长时间暴露于高浓度氧可导致急、慢性肺损伤, 而 AEC II 细胞在肺组织损伤修复中起着重要的作用。本研究中比较了正常 AEC II 细胞与高氧暴露后 AEC II 细胞的蛋白质谱, 共鉴定出可信蛋白 5782 个, 其中差异蛋白 162 个, 包括 54 个上调差异蛋白, 108 个下调差异蛋白。上调差异蛋白主要参与各种刺激的应答, 定位于胞外区; 下调差异蛋白主要参与物质合成, 定位于细胞基质区域。差异蛋白通路富集分析鉴定了高氧损伤后差异调节的分子通路主要与细胞色素 P450 (CYP) 代谢、线粒体氧化磷酸化、酮体的合成与降解等相关, 并意外发现高氧暴露激活了 Notch 信号通路, 且抑制 Notch 信号通路激活后可以改善高氧导致的 AEC II 细胞凋亡。

CYP 参与对内源性、外源性物质的代谢。有研究报道, CYP 可通过氧化还原反应缓解高氧导致的损伤^[4], 改善肺损伤的血管渗透性^[5]。Lingappan 等^[6]研究显示, CYP1 基因敲除小鼠比野生型小鼠对高氧肺损伤易感性更高, 表明 CYP1 可缓解高氧导致的肺损伤。目前的研究大多集中在 CYP1 与高

氧肺损伤相关性方面^[7-9],对于 CYP2 与高氧肺损伤的研究较少。本研究显示, CYP 对外源性物质的代谢相关途径显著上调,位于此通路上的 CYP2、UDP-葡萄糖醛酸转移酶以及谷胱甘肽 S-转移酶在高氧暴露后表达显著增高,提示 AEC II 细胞可能通过增加 CYP2、UDP-葡萄糖醛酸转移酶和微粒体谷胱甘肽转移酶 1 的表达,增加 CYP 对内源性刺激物或者外源性刺激物的代谢,缓解高氧暴露引起的肺损伤。

在高氧暴露后,下调的蛋白质富集于氧化磷酸化过程,主要为一系列铁硫蛋白,包括 NADH 脱氢酶(泛素酮)Fe-S 蛋白(Ndufs1、Ndufs6、Ndufs8)以及 NADH 脱氢酶(泛素酮) α 亚基(Ndufa7、Ndufa12)表达显著降低。Ndufs 和 Ndufa 作为 NADH 脱氢酶复合体 I 重要的组成部分,参与呼吸链中电子的传递过程,高氧暴露后 Ndufs 和 Ndufa 的降低会引起 NADH 脱氢酶复合体 I 的缺陷,导致三磷酸腺苷(ATP)生成减少、活性氧簇(ROS)增加、线粒体膜电位降低,从而对细胞产生损伤。Sepehr 等^[10]发现,与常氧组相比,高氧暴露组 NADH 氧化还原比(NADH/FAD)下降 30%,提示高氧抑制了呼吸链的作用,这与本研究结果相同,高氧会导致 NADH 脱氢酶复合体 I 的功能缺陷^[11-14],从而引起 ROS 的生成增加。本研究进一步提示,高氧可能是通过影响 Ndufs1、Ndufs6、Ndufs8、Ndufa7、Ndufa12 蛋白的功能,从而引起 NADH 脱氢酶复合体 I 的功能障碍。

Notch 信号通路可通过调节细胞增殖、分化以及细胞间接触,从而调节众多生理和病理过程^[15]。既往研究表明,Notch 通过上调凋亡相关信号通路诱导细胞凋亡^[16]。Zhang 等^[17]研究显示,在缺血/再灌注损伤模型中,Notch 蛋白表达随着损伤程度的增加而增加,而 Notch 通路抑制剂可缓解氧化损伤程度和细胞凋亡。本研究同样显示,高氧暴露后 Notch1 蛋白在 AEC II 细胞中表达增加,用 γ 分泌酶抑制剂 MW167 抑制 Notch 信号通路后,细胞增殖抑制有所改善,提示高氧暴露可能通过激活 Notch 通路诱导细胞凋亡。

综上所述,本研究通过蛋白质组学描述了常氧和高氧环境中 AEC II 细胞差异蛋白的相关生物过程、分子功能,发现细胞色素 P450 代谢、线粒体氧化磷酸化、Notch 信号通路等通路可能与高氧损伤 AEC II 细胞的机制有关,为进一步体外干预治疗高氧肺损伤提供了理论基础,但蛋白质组学结果仍需进一步验证。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wang J, Dong W. Oxidative stress and bronchopulmonary dysplasia [J]. Gene, 2018, 678: 177-183. DOI: 10.1016/j.gene.2018.08.031.
- [2] 汪娟, 黄栋, 莫连芹, 等. 高氧环境下肺细胞形态及功能变化[J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30 (8): 737-742. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.08.005.
- [3] Wang J, Huang D, Mo LQ, et al. Morphological and functional changes of lung cells in hyperoxia environment [J]. Chin Crit Care Med, 2018, 30 (8): 737-742. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.08.005.
- [4] Wu D, Liang M, Dang H, et al. Hydrogen protects against hyperoxia-induced apoptosis in type II alveolar epithelial cells via activation of PI3K/Akt/Foxo3a signaling pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495 (2): 1620-1627. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.193.
- [5] Srejber M, Navrátilová V, Paloncýová M, et al. Membrane-attached mammalian cytochromes P450: an overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners [J]. J Inorg Biochem, 2018, 183: 117-136. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2018.03.002.
- [6] Veith AC, Bou Aram B, Jiang W, et al. Mice lacking the cytochrome P450 1B1 gene are less susceptible to hyperoxic lung injury than wild type [J]. Toxicol Sci, 2018, 165 (2): 462-474. DOI: 10.1093/toxsci/kfy154.
- [7] Lingappan K, Maity S, Jiang W, et al. Role of cytochrome P450 (CYP) 1A in hyperoxic lung injury: analysis of the transcriptome and proteome [J]. Sci Rep, 2017, 7 (1): 642. DOI: 10.1038/s41598-017-00516-x.
- [8] Dinu D, Chu C, Veith A, et al. Mechanistic role of cytochrome P450 (CYP) 1B1 in oxygen-mediated toxicity in pulmonary cells: a novel target for prevention of hyperoxic lung injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 476 (4): 346-351. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.05.125.
- [9] Lingappan K, Jiang W, Wang L, et al. Sex-specific differences in hyperoxic lung injury in mice: role of cytochrome P450 (CYP) 1A [J]. Toxicology, 2015, 331: 14-23. DOI: 10.1016/j.tox.2015.01.019.
- [10] Lingappan K, Jiang W, Wang L, et al. Mice deficient in the gene for cytochrome P450 (CYP) 1A1 are more susceptible than wild-type to hyperoxic lung injury: evidence for protective role of CYP1A1 against oxidative stress [J]. Toxicol Sci, 2014, 141 (1): 68-77. DOI: 10.1093/toxsci/kfu106.
- [11] Sepehr R, Audi SH, Maleki S, et al. Optical imaging of lipopolysaccharide-induced oxidative stress in acute lung injury from hyperoxia and sepsis [J]. J Innov Opt Health Sci, 2013, 6 (3): 1350017. DOI: 10.1142/S179354581350017X.
- [12] Sepehr R, Audi SH, Staniszevski KS, et al. Novel fluorometric tool to assess mitochondrial redox state of isolated perfused rat lungs after exposure to hyperoxia [J]. IEEE J Transl Eng Health Med, 2013, 1. pii: 1500210. DOI: 10.1109/JTEHM.2013.2285916.
- [13] Ferrari M, Jain IH, Goldberger O, et al. Hypoxia treatment reverses neurodegenerative disease in a mouse model of Leigh syndrome [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114 (21): E4241-4250. DOI: 10.1073/pnas.1621511114.
- [14] Jafari G, Wasko BM, Kaerberlein M, et al. New functional and biophysical insights into the mitochondrial Rieske iron-sulfur protein from genetic suppressor analysis in *C. elegans* [J]. Worm, 2016, 5 (2): e1174803. DOI: 10.1080/21624054.2016.1174803.
- [15] Das KC. Thioredoxin-deficient mice, a novel phenotype sensitive to ambient air and hypersensitive to hyperoxia-induced lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2015, 308 (5): L429-442. DOI: 10.1152/ajplung.00285.2014.
- [16] Coraggio F, Püschel R, Marti A, et al. Polycomb and Notch signaling regulate cell proliferation potential during *Caenorhabditis elegans* life cycle [J]. Life Sci Alliance, 2018, 2 (1): e201800170. DOI: 10.26508/lsa.201800170.
- [17] Zhang Z, Yan R, Zhang Q, et al. Hes1, a Notch signaling downstream target, regulates adult hippocampal neurogenesis following traumatic brain injury [J]. Brain Res, 2014, 1583: 65-78. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.07.037.
- [18] Zhang HM, Liu P, Jiang C, et al. Notch signaling inhibitor DAPT provides protection against acute craniocerebral injury [J]. PLoS One, 2018, 13 (2): e0193037. DOI: 10.1371/journal.pone.0193037.

(收稿日期: 2019-01-25)