

网络出版时间:2024-03-27 10:51:45 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.019

脓毒症相关肺损伤中内质网应激诱导的铁死亡机制研究

金子琦¹,唐波²,吴章宏¹,肖宝¹,刘斌¹,钟扬¹,胡霞¹

摘要 **目的** 探讨急性呼吸窘迫综合征(ARDS)中内质网应激(ERs)诱导的铁死亡机制。**方法** 为了确定LPS对小鼠毛细血管肺泡上皮细胞(MLE12细胞)氧化应激和 Fe^{2+} 水平的影响,用LPS(0、1、2、5 $\mu\text{g/ml}$)处理细胞24 h。将MLE12细胞分为对照(Con)组、脱铁抑制剂(Fer-1)组、LPS组和LPS + Fer-1组以验证铁死亡在脂多糖(LPS)诱导的细胞死亡中的作用。LPS + Fer-1组用10 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1预处理6 h,随后将细胞暴露于5 $\mu\text{g/ml}$ LPS 24 h;Con组用融媒DM-SO处理24 h,Fer-1组用10 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1预处理6 h,随后用DMSO处理24 h;LPS组将细胞暴露于5 $\mu\text{g/ml}$ LPS 24 h。将MLE12细胞分为Con + 载体(Vector)组、Con + 序列相似性家族134成员B(FAM134B)组、LPS + Vector组、LPS + FAM134B组,细胞用Vector或FAM134B过表达质粒转染48 h后,暴露或不暴露于5 $\mu\text{g/ml}$ LPS 24 h。使用CCK-8法测定细胞活力;测量不同组的丙二醛(MDA)、谷胱甘肽和铁的水平,以及铁死亡标志物[环加氧酶2(PTGS2)、谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)]和ERs标志物[葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、活化转录因子4(ATF4)和C/EBP同源蛋白(CHOP)]的蛋白水平;为了进一步证实体外细胞实验结果,将40只小鼠随机分成Con + Vector组、Con + FAM134B组、LPS + Vector组、LPS + FAM134B组,每组10只,在LPS + Vector组、LPS + FAM134B组小鼠中建立LPS诱导的脓毒症模型,并通过免疫荧光染色和蛋白质印迹评估肺组织中GPX4和ERs水平。**结果** LPS处理的MLE12细胞中PTGS2和MDA水平以剂量依赖性增加,GPX4和谷胱甘肽(GSH)水平剂量依赖性降低;与LPS组相比,LPS + Fer-1组细胞活力、GPX4和GSH水平增加($P < 0.05$),PTGS2蛋白水平和MDA水平降低($P < 0.05$);与LPS + Vector组相比,LPS + FAM134B组细胞活力增加($P < 0.05$),MDA水平和PTGS2蛋白水平降低($P < 0.05$),GPX4和GSH水平增加($P < 0.05$);动物实验中,与LPS + Vector组相比,LPS + FAM134B组小鼠肺组织中4-HNE、ATF4和CHOP表达水平降低($P < 0.05$),GPX4、FAM134B表达水平增加($P < 0.05$)。

结论 LPS以剂量依赖的方式诱导MLE12细胞铁死亡和ERs通过激活内质网自噬相关FAM134B受体有助于抑制ERs,并减轻细胞铁死亡。

关键词 内质网应激;急性呼吸窘迫综合征;脂多糖;肺泡上皮细胞;铁死亡;内质网自噬

中图分类号 R 563.8

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0491-09
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.019

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是一种复杂的病理生理综合征,发病率高,但其发病机制仍有待探讨^[1]。铁死亡是一种独特的铁依赖形式的程序性细胞死亡,其生化特征主要包括细胞内铁的积聚和大量脂质过氧化^[2]。目前,铁死亡被认为是参与脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的重要因素,用铁抑制素-1(ferrostatin-1, Fer-1)抑制铁死亡可显著缓解ALI^[3]。因此,阻断铁死亡可能作为ARDS的一个新的治疗靶点。研究^[4]表明,铁死亡受内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERs)的调节,如蛋白激酶RNA样ER激酶(protein kinase RNA-like-ER kinase, PERK)-激活转录因子4(activating transcription factor 4, ATF4)途径参与介导铁死亡。在ERs情况下,内质网形状和功能通过内质网部分的选择性自噬得到良好维持^[5]。内质网自噬由各种受体介导;其中,序列相似性家族134成员B(family with sequence similarity 134 member B, FAM134B)是在哺乳动物细胞中发现的第一个自噬体受体,其能靶向自噬体中的片段化内质网膜,用于溶酶体降解^[6]。最近研究^[7]显示FAM134B介导的内质网自噬保护脓毒症诱导的小鼠心肌损伤。此外,FAM134B介导的内质网自噬参与激活肝细胞癌铁死亡^[8]。该研究通过探讨FAM134B介导的ER自噬和铁死亡之间的相互作用,旨在揭示ERs相关铁死亡在ARDS肺损伤中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 小鼠肺泡上皮细胞(alveol epitheli-

2024-02-04 接收

基金项目:湖南省自然科学基金(编号:2021JJ70322)

作者单位:¹长沙市第一医院(中南大学湘雅医学院附属长沙医院)急诊科,长沙 410008

²湖南省脑科医院(湖南省第二人民医院)重症医学科,长沙 410007

作者简介:金子琦,女,主治医师;

吴章宏,女,医师,责任作者,E-mail:839473231@qq.com

al cells, AECs)系 MLE12 细胞购自美国模式培养物集存库。

1.1.2 实验动物 40 只 SPF 级成年雄性 C57BL/6J 小鼠(6 周龄, 22 ~ 24 g)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。所有小鼠饲养在湿度为 50% ~ 60%、温度为 24 ~ 26 °C 且光照/黑暗周期为 12 h 的受控环境中。

1.1.3 主要材料 CCK-8 试剂盒(货号: CA1215-100T)、二甲苯(货号: DM0105)、苏木精和曙红(货号: G1120)、Triton X-100(货号: P1080)和二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(货号: D8370)购自北京 Solarbio 公司, 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(货号: L-2880)、脂质过氧化丙二醛(malondialdehyde, MDA)分析试剂盒(货号: MAK085)购自美国 Sigma 公司, 铁分析试剂盒(货号: D153-6)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(货号: A006-2)购自南京建成生物工程研究所, 抗谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)(货号: CL594-67763)、 β -肌动蛋白(货号: bsm-33036M)、环加氧酶 2(prostaglandin endoperoxide synthase 2, PTGS2)(货号: 66351-1-Ig)、葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78, GRP78)(货号: 66574-1-Ig)、ATF4(货号: 60035-1-Ig)、CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(C/EBP homologous protein, CHOP)(货号: 66741-1-Ig)、FAM134B(货号: 21537-1-AP)、Alexa Fluor 568 偶联的次级抗体(货号: A20185)购自美国 Proteintech 公司, DAPI(货号: H-1200)购自美国 Vector Laboratory 公司, 组织蛋白提取物缓冲液(货号: 89900)、BCA 蛋白测定试剂盒(货号: 23227)购自美国 Thermo Fisher 公司, 4-羟基壬烯醛(4-HNE)(货号: GP2035)、山羊抗兔 IgG 二抗(货号: GB25303)、兔抗小鼠 IgG 二抗(货号: GB23303)购自武汉 Servicebio 公司。Vector、FAM134B 过表达质粒(货号: D02008、M-21542)购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.1.4 主要仪器 DM2000 荧光显微镜购自德国 Leica 公司, Tanon V8 快速蛋白质印迹系统购自上海 Tanon 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组与处理 MLE12 细胞在 37 °C 下在含有 2% 新生小牛血清的 DMEM/F12 培养基中培养。当细胞达到细胞培养瓶体积的 80% ~ 90% 时, 在 6 孔板中培养细胞。用 LPS(0、1、2、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)处理细胞 24 h 以确定 LPS 对 MLE12 氧化应激和 Fe^{2+}

水平的影响。为了验证铁死亡在 LPS 诱导的细胞死亡中的作用, 将细胞分为对照(Con)组、铁死亡特异性抑制剂(Fer-1)组、LPS 组和 LPS + Fer-1 组; LPS + Fer-1 组在 LPS 处理前 6 h, 用 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Fer-1 预处理, 随后将细胞暴露于 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS(预实验确定的在 24 h 诱导几乎一半的 MLE12 细胞活力降低的浓度)24 h, Con 组用融媒 DMSO 处理 24 h, Fer-1 组用 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ Fer-1 预处理 6 h, 随后用 DMSO 处理 24 h, LPS 组将细胞暴露于 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 24 h; 为了研究 ER 自噬在 LPS 引起的细胞铁死亡中的作用, 将细胞分为 Con + 载体(Vector)组、Con + FAM134B 组、LPS + Vector 组、LPS + FAM134B 组, 细胞用 Vector 或 FAM134B 过表达质粒转染 48 h 后, 暴露或不暴露于 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 24 h。

1.2.2 CCK-8 法测定细胞活力 采用 CCK-8 试剂盒说明书检测所有组 MLE12 细胞活力。

1.2.3 铁含量测定 使用按照铁分析试剂盒说明书测量不同浓度(0、1、2、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) LPS 处理组和 Con 组、Fer-1 组、LPS 组和 LPS + Fer-1 组细胞的铁浓度。将 MLE12 细胞(2×10^6 个细胞)在 6 倍体积铁分析缓冲液中快速匀浆, 加入相关试剂。最后, 在 593 nm 处测量吸光度, 并使用标准曲线计算铁浓度。

1.2.4 实验动物分组和处理 将 40 只小鼠随机分成 Con + Vector 组、Con + FAM134B 组、LPS + Vector 组、LPS + FAM134B 组, 每组 10 只; LPS + Vector 组、LPS + FAM134B 组小鼠用 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)进行麻醉, 腹腔注射 30 mg/kg LPS 诱导脓毒症^[9]。Con + Vector 组、Con + FAM134B 组小鼠腹腔注射相同剂量的 PBS, Con + FAM134B 组和 LPS + FAM134B 组小鼠在腹腔注射 LPS 前 3 天, 用经鼻滴注的方法将基于腺相关病毒(adeno-associated virus, AAV)的 FAM134B 过表达质粒(1×10^{12} vg/ml, 60 μl)对小鼠进行干预, 用于特异性表达 FAM134B, 腹腔注射 LPS 12 h 后处死小鼠。

1.2.5 HE 染色和免疫组化染色 将小鼠的整个左肺固定在 4% 多聚甲醛中, 石蜡包埋, 并切成 4 μm 的切片。然后将切片进行 HE 染色、4-羟基壬烯醛(4-Hydroxynonenal, 4-HNE)免疫组化染色和 GPX4 免疫荧光分析。对于 HE 染色, 将切片用苏木精和曙红染色, 并固定在载玻片上, 通过显微镜观察。对于免疫组化染色, 组织切片首先在 60 °C 下烘烤 2 h, 然后用二甲苯脱蜡, 并通过乙醇梯度再水合。然后在枸橼酸盐缓冲液中于 95 °C 加热 30 min 并冷

却至室温,对载玻片进行抗原修复,阻断内源性过氧化物酶活性和血清封闭后,将切片与抗 4-HNE 单克隆抗体(1:50)4℃ 孵育过夜,随后,将切片与生物素化连接的第二抗体在 37℃ 孵育 1 h,然后用 DAB 显色溶液进行 DAB 显色反应,细胞核复染和脱水后,用倒置显微镜拍摄组织切片图像。

1.2.6 免疫荧光染色 切片用 10% 山羊血清和 0.1% Triton X-100 37℃ 封闭 1 h,然后加入抗 GPX4 (1:100) 初级抗体,4℃ 孵育过夜,然后将切片与 Alexa Fluor 568 偶联的次级抗体在 37℃ 孵育 1 h,用 DAPI 对细胞核进行染色。在荧光显微镜下观察并拍摄图像。

1.2.7 Fe^{2+} 水平、MDA 和 GSH 测定 收集肺组织 (10 mg) 或 MLE12 细胞 (1×10^6 个细胞),并使用 Fe^{2+} 、脂质过氧化 MDA 分析试剂盒和 GSH 试剂盒测量 MDA、GSH 含量。

1.2.8 蛋白质印迹法 采用组织蛋白提取物缓冲液制备小鼠肺组织及所有组的细胞的总蛋白,并使用 BCA 蛋白测定试剂盒进行定量。根据蛋白质分子大小使用 10% 或 15% SDS-PAGE 分离目标蛋白质,然后将蛋白质结合到 PVDF 膜上,随后用 5% 脱脂乳封闭 3 h。此外,根据制造商提供的参考浓度,将 PVDF 膜与特异性一抗 β -肌动蛋白 (1:2 000)、PTGS2 (1:800)、GPX4 (1:1 000)、GRP78 (1:1 200)、ATF4 (1:1 000)、CHOP (1:1 000) 和 FAM134B (1:1 000) 在 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后, PVDF 膜与山羊抗兔或兔抗小鼠 IgG 二抗 (1:20 000) 在室温下孵育 2 h。最后,使用 ECL 蛋白印迹检测系统测定铁死亡标记物 PTGS2 和 GPX4、ERs 标志物 GRP78、ATF4 和 CHOP 以及介导内质网自噬的主要受体之一的 FAM134B 的蛋白水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 进行统计分析。所有数据均表示为 $\bar{x} \pm s$ 。两组之间的比较采用 *t* 检验。多组间比较采用重复测量方差分析或单因素方差分析,随后通过 SNK 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPS 对 MLE12 细胞活力、铁死亡、氧化应激和 Fe^{2+} 水平的影响 CCK-8 实验检测结果显示, LPS 处理以剂量依赖性降低 MLE12 细胞活力 ($F = 23.54, P < 0.001$), 并且当 LPS 的浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, MLE12 细胞活力下降至 52% (图 1)。LPS 处理

以剂量依赖性增加 PTGS2 和降低 GPX4 水平 ($F = 21.77, 28.72$, 均 $P < 0.001$) (图 2), 表明 LPS 暴露导致细胞铁死亡。此外, LPS 处理还导致 MLE12 细胞中 MDA、 Fe^{2+} 的剂量依赖性增加 ($F = 12.19, 10.96$, 均 $P < 0.001$) (图 3A、B), 表明 LPS 暴露导致细胞内大量脂质过氧化和铁的积聚。此外, LPS 处理以剂量依赖的方式降低了 MLE12 细胞中的 GSH 水平 ($F = 18.64, P < 0.001$) (图 3C), 表明 LPS 处理使 MLE12 细胞抗氧化系统受损。

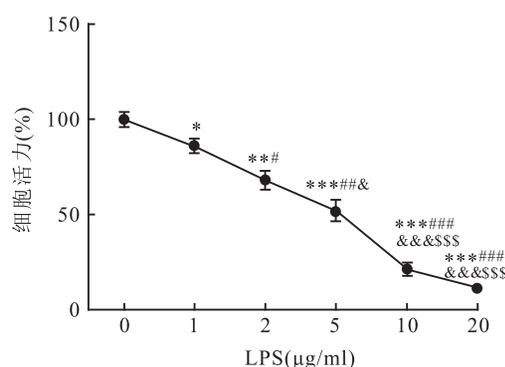


图 1 不同浓度 LPS 对 MLE12 细胞活力的影响

与 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 比较: & $P < 0.05$, && $P < 0.001$; 与 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 比较: &&& $P < 0.001$

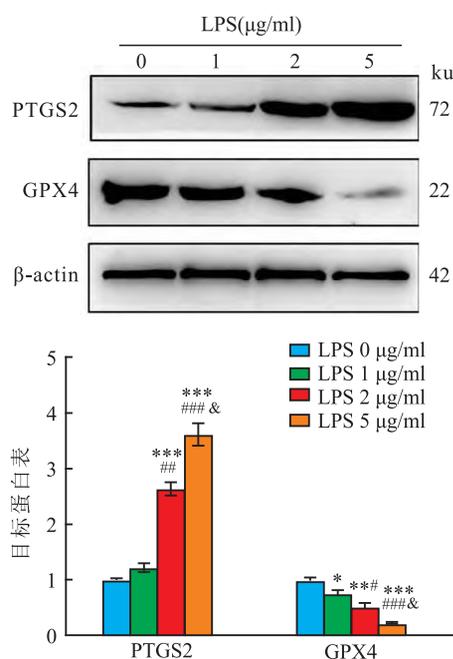


图 2 蛋白质印迹分析检测不同浓度 LPS 对 MLE12 细胞铁死亡的影响

与 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 比较: & $P < 0.05$

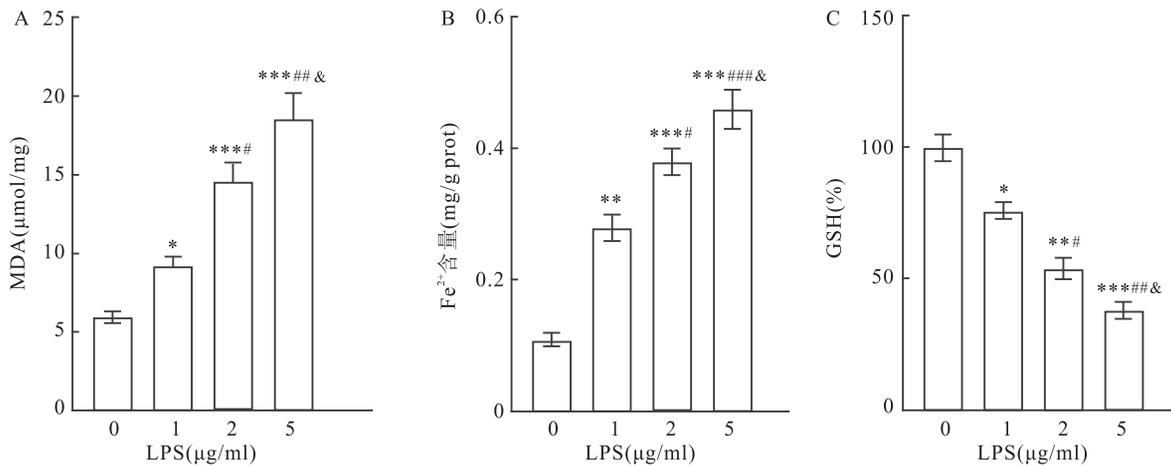


图3 不同浓度 LPS 处理 MLE12 细胞中丙二醛、Fe²⁺ 含量和相对谷胱甘肽的比较

与 0 μg/ml 比较: **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001; 与 1 μg/ml 比较: #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001; 与 2 μg/ml 比较: &*P* < 0.05

2.2 Fer-1 减轻 LPS 诱导的 MLE12 细胞活力降低、铁死亡、氧化应激和 Fe²⁺ 水平的增加 如图 4-6 所示,与 Con 组相比,LPS 组活力降低降低(*t* = 4.28, *P* < 0.001),PTGS2 蛋白水平、MDA 和 Fe²⁺ 水平增加(*t* = 12.03、5.52、8.17, 均 *P* < 0.001),GPX4 蛋白和 GSH 水平降低(*t* = 4.60、4.98, *P* < 0.001); 与 LPS 组相比,LPS + Fer-1 组细胞活力增加(*t* = 3.51, *P* = 0.005),PTGS2 蛋白水平、MDA 和 Fe²⁺ 水平降低(*t* = 6.90、3.07、3.50, 均 *P* < 0.05),GPX4 蛋白和 GSH 水平增加(*t* = 3.39、3.45, *P* = 0.008、0.006)。提示 Fer-1 能够减轻 LPS 诱导的 MLE12 细胞活力降低、铁死亡、氧化应激和 Fe²⁺ 水平的增加。

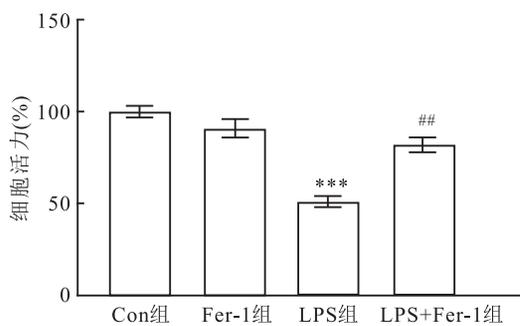


图4 Fer-1 对 LPS 诱导的 MLE12 细胞活力降低的影响
与 Con 组比较: ****P* < 0.001; 与 LPS 组比较: ##*P* < 0.01

2.3 FAM134B 通过抑制 ERs 改善 LPS 诱导的细胞活力降低、铁死亡和氧化应激增加 LPS 处理以剂量依赖性增加 MLE12 细胞中 GRP78、ATF4 和 CHOP 水平 (*F* = 11.63、24.92、10.10, 均 *P* < 0.001),降低 FAM134B 水平 (*F* = 19.72, *P* < 0.001) (图 7)。表明 LPS 诱导 MLE12 细胞 ERs 并抑制内

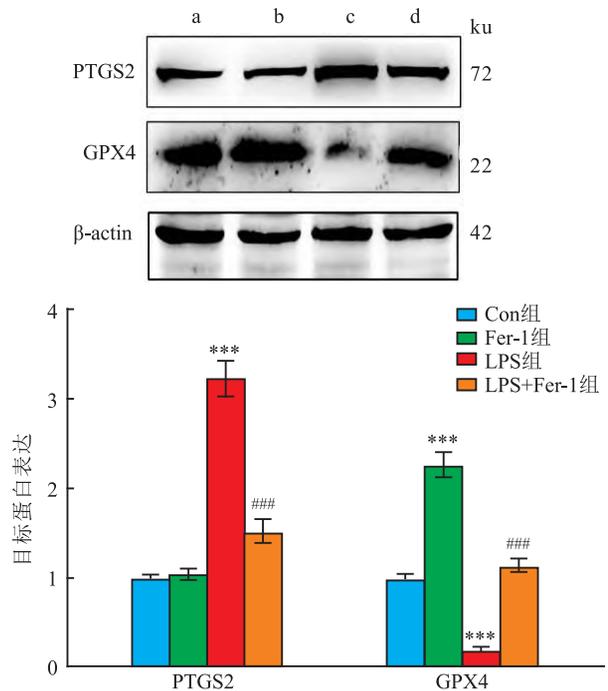


图5 Fer-1 对 LPS 诱导的 MLE12 细胞铁死亡的影响
与 Con 组比较: ****P* < 0.001; 与 LPS 组比较: ###*P* < 0.001

质网自噬。与 LPS + Vector 组相比,LPS + FAM134B 组细胞中 ATF4、CHOP 和 PTGS2 蛋白水平降低(*t* = 6.50、5.83、5.38, *P* < 0.001),GPX4 和 FAM134B 蛋白水平增加(*t* = 6.22、6.65, *P* < 0.001),细胞活力增加(*t* = 3.526, *P* = 0.004) (图 8-10)。同时,LPS + FAM134B 组细胞的 MDA 水平低于 LPS + Vector 组 (*t* = 3.11, *P* = 0.021),和 GSH 水平高于 LPS + Vector 组 (*t* = 3.41, *P* = 0.006) (图 11)。提示 FAM134B 通过抑制 ERs 改善 LPS 诱导的细胞活力降低、铁死亡和氧化应激增加。

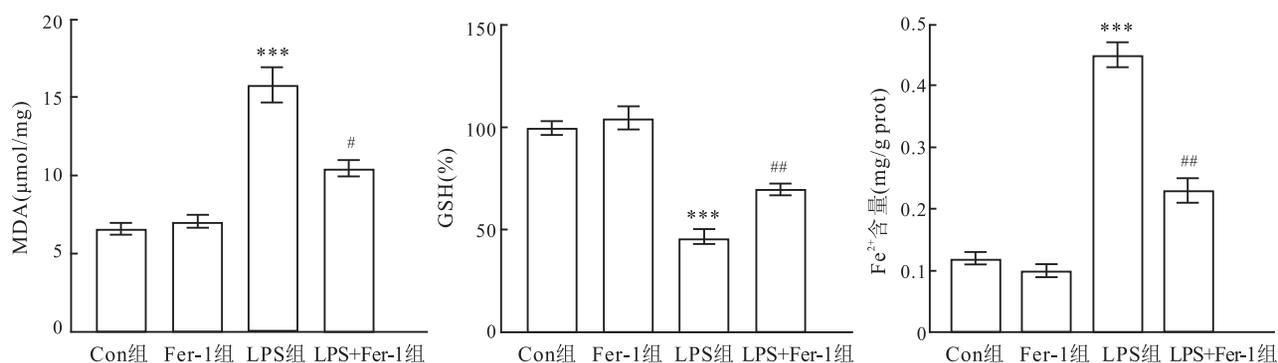


图6 Fer-1对LPS诱导的MLE12细胞氧化应激和Fe²⁺水平增加的影响
与Con组比较:***P<0.001;与LPS组比较:#P<0.05,##P<0.01

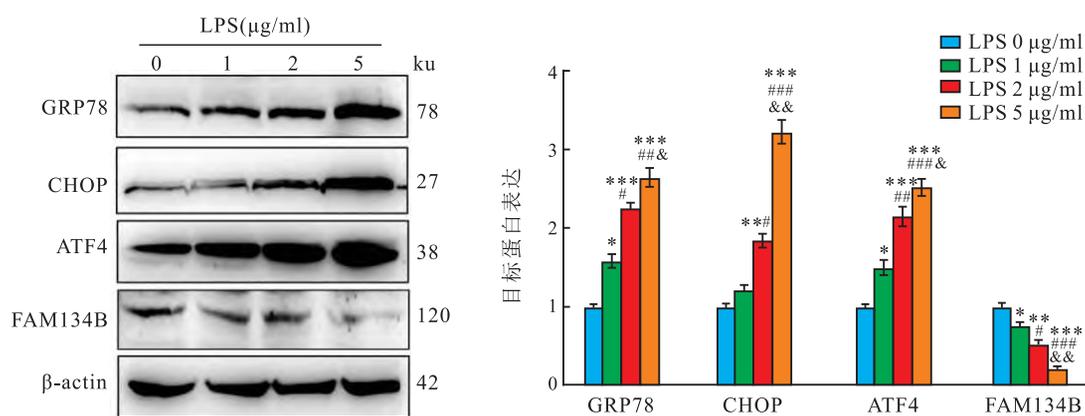


图7 不同浓度LPS对MLE12细胞ERs和内质网自噬的影响

与0 μg/ml比较:*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001;与1 μg/ml比较:#P<0.05,##P<0.01,###P<0.001;与2 μg/ml比较:&P<0.05,&&P<0.01

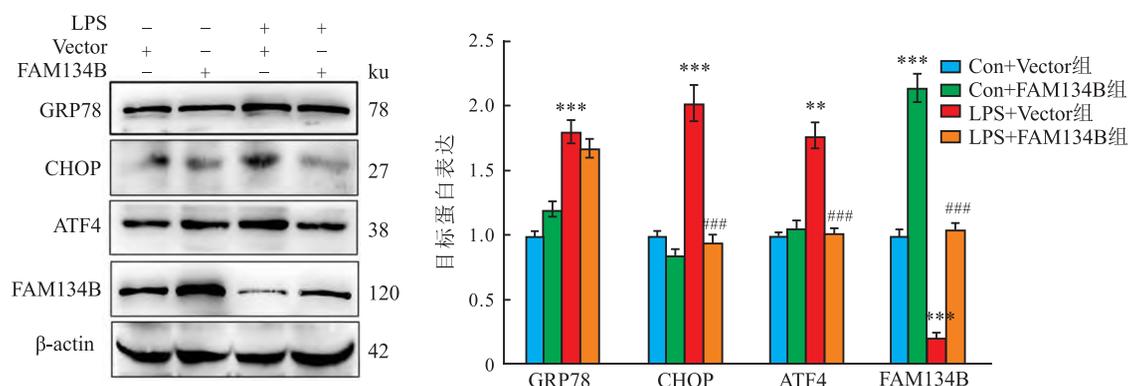


图8 FAM134B对LPS诱导的MLE12细胞ERs和内质网自噬抑制的影响

与Con+Vector组比较:**P<0.01,***P<0.001;与LPS+Vector组比较:###P<0.001

2.4 FAM134B 过度表达减轻 LPS 诱导的小鼠肺部炎症损伤 HE 染色分析结果显示,与 Con + Vector 组小鼠相比,LPS + Vector 组小鼠肺组织中出现中性粒细胞浸润、肺泡隔膜增厚、肺泡水肿。FAM134B + LPS 组小鼠肺组织中中性粒细胞浸润、肺泡隔膜增厚以及肺泡水肿较 LPS + Vector 组减轻

(图 12A);与 Con + Vector 组小鼠相比,LPS + Vector 组小鼠肺组织中 4-HNE、ATF4 和 CHOP 表达水平增加 ($t = 5.36、3.87、4.35$, 均 $P < 0.01$), GPX4、FAM134B 表达水平降低 ($t = 5.07、5.64$, 均 $P < 0.001$)。说明 LPS 诱导小鼠肺组织 ERs 并抑制内质网自噬。与 LPS + Vector 组相比,LPS + FAM134B

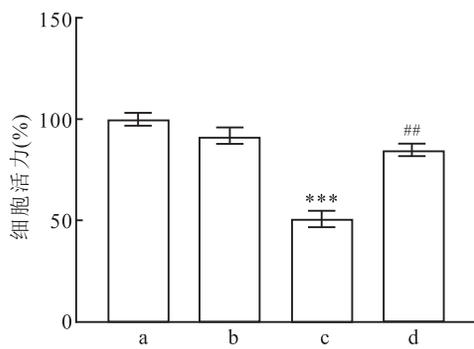


图9 FAM134B对LPS诱导的MLE12细胞活力降低的影响

a: Con + Vector组; b: Con + FAM134B组; c: LPS + Vector组; d: LPS + FAM134B组; 与 Con + Vector组比较: *** $P < 0.001$; 与 LPS + Vector组比较: ## $P < 0.01$

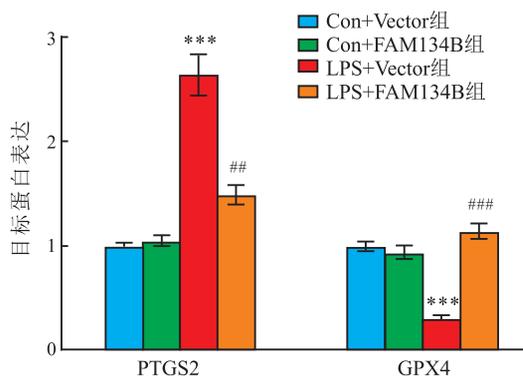
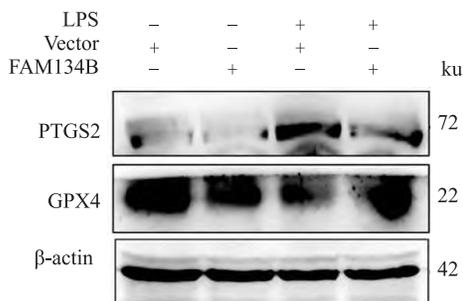


图10 FAM134B对LPS诱导的MLE12细胞铁死亡的影响

与 Con + Vector组比较: *** $P < 0.001$; 与 LPS + Vector组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

组小鼠肺组织中 4-HNE、ATF4、CHOP 表达水平降低 ($t = 3.88, 3.55, 5.61$, 均 $P < 0.01$), GPX4、FAM134B 表达水平增加 ($t = 2.87, 5.07$, 均 $P < 0.05$) (图 12B-G)。说明 FAM134B 过度表达减轻 LPS 诱导的小鼠肺部炎症损伤。

3 讨论

铁死亡是最近发现的一种氧化性细胞死亡,其特征是铁依赖性脂质过氧化,并与多种疾病过程有关,包括癌症、缺血再灌注损伤、感染和神经退行性

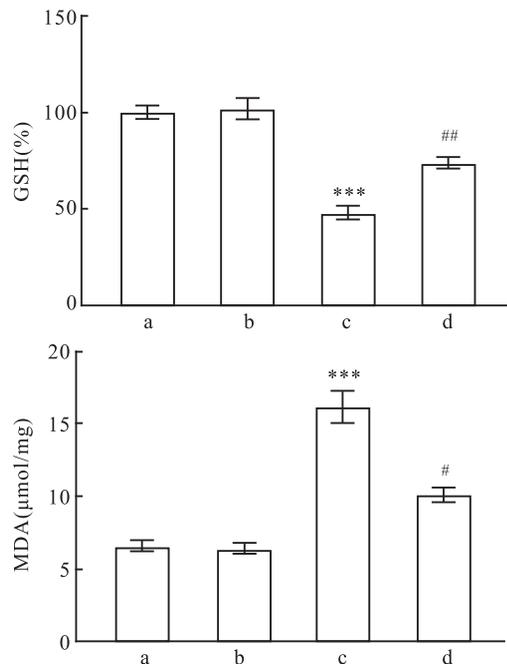


图11 FAM134B对LPS诱导的MLE12细胞氧化应激的影响

a: Con + Vector组; b: Con + FAM134B组; c: LPS + Vector组; d: LPS + FAM134B组; 与 Con + Vector组比较: *** $P < 0.001$; 与 LPS + Vector组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

疾病^[5]。肺中的各种细胞类型,包括上皮细胞和巨噬细胞,可以产生铁代谢相关蛋白,以调节铁稳态,保护肺组织免受氧化应激^[2]。铁代谢紊乱与 ARDS 患者的肺组织损伤密切相关^[3],即过多的铁可以通过芬顿反应产生活性氧和细胞毒性。临床研究^[10]表明,ARDS 的严重程度与铁和铁相关蛋白的水平有关。研究^[11]表明,血液制品中的铁会导致受血者体内铁的增加,从而促进输血相关 ALI 的发生。在 ARDS 患者的支气管肺泡灌洗液中可以检测到 Fe^{2+} 和铁调节剂水平升高^[12]。由于肺泡上皮细胞死亡可能是 ARDS 中肺泡损伤的一个关键特征,受损的 AECs 产生过量活性氧进一步加重 ARDS 肺损伤^[13]。因此,本研究选择 MLE12 细胞作为体外研究对象。先前研究^[14]表明 Fer-1 抑制脂质过氧化减轻了 LPS 诱导的人支气管上皮细胞系 BEAS-2B 细胞死亡。本研究发现 LPS 以剂量依赖的方式诱导 MLE12 细胞活力降低、铁死亡、氧化应激增加,这与先前的研究一致。

众所周知,内质网是一种重要的细胞器,对活性氧敏感。活性氧在内质网中的持续积聚引发 ERs,可能是导致 ALI 进展的重要机制^[4]。证据^[3]表明,抑制 ERs 可以改善脓毒症相关的肺损伤。GRP78 是 ERs 的主要调节蛋白,ATF4 在 ERs 中显著上调,

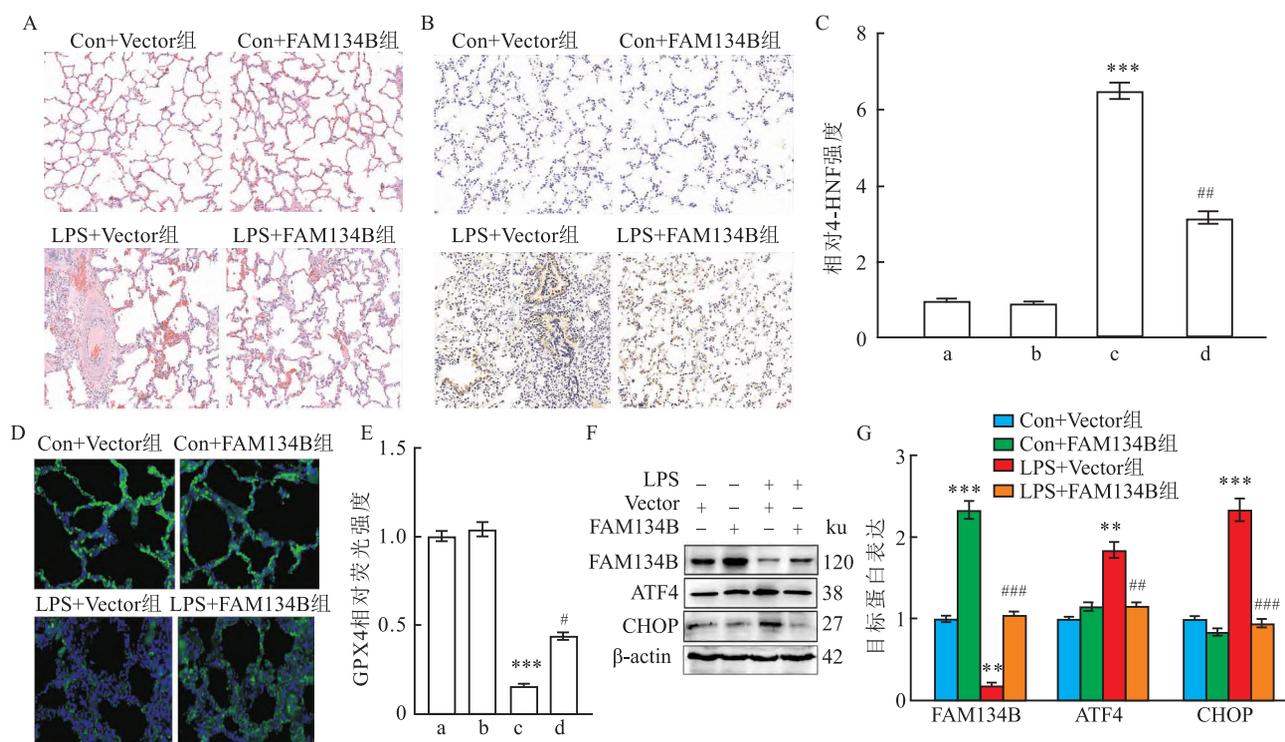


图 12 FAM134B 过度表达对 LPS 诱导的小鼠肺部损伤的影响 ($n=6$)

A: HE 染色分析小鼠肺部损伤 $\times 50$; B, C: 免疫组化染色分析小鼠肺部 4-HNE 表达及定量 $\times 50$; D, E: 免疫荧光分析小鼠肺部 GPX4 表达及定量 $\times 200$; F, G: 小鼠肺中 ATF4、CHOP、FAM134B 的代表性蛋白质印迹图像及定量; a: Con + Vector 组; b: Con + FAM134B 组; c: LPS + Vector 组; d: LPS + FAM134B 组; 与 Con + Vector 组比较: * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$; 与 LPS + Vector 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

促进 CHOP 等因子表达,这些因子通常被视为 ERs 的生物标志物^[3]。本研究发现,随着 LPS 剂量的增加,GRP78、ATF4 和 CHOP 的表达水平增加,表明 LPS 可以诱导 MLE12 细胞的 ERs。近年来,证据^[7]表明 ERs 增加与 LPS 诱导的铁死亡相关。FAM134B 作为介导内质网自噬的主要受体之一,在 ERs 情况下,可以通过整合进入自噬体来介导 ER 进入溶酶体。FAM134B 可以通过其膜弯曲能力促进膜重塑和减轻 ERs 破坏,并通过与 LC3 的结合诱导内质网自噬,FAM134B 的下调将导致内质网的扩张^[7]。此外,研究^[15]表明,未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)可以激活 FAM134B 的表达以识别内质网腔中错误折叠或聚集的蛋白质。本研究发现 LPS 激活了 MLE12 细胞中的 ERs 和抑制内质网自噬,通过上调 FAM134B,减轻了 LPS 诱导的 MLE12 细胞活力降低、铁死亡和氧化应激增加,提示内质网自噬抑制参与介导 LPS 诱导的 MLE12 细胞铁死亡。此外,本研究通过体内研究验证了体外发现,LPS 诱导的小鼠肺部组织中 4-HNE 上调和 GPX4 表达抑制,伴随着 ERs 激活和 FAM134B 水平的下降,而 FAM134B 预处理逆转了 LPS 诱导的这

些变化。研究^[7]表明,脓毒症相关肺损伤中 4-HNE 超载通过上调 ERs 基因(如 ATF4、CHOP)激活所有 UPR 途径,并促进铁死亡。因此,上调 FAM134B 对于抑制 ARDS 病理过程相关的铁死亡至关重要。

总之,本研究显示 LPS 以剂量依赖的方式诱导 MLE12 细胞铁死亡和 ERs。通过激活内质网自噬相关 FAM134B 受体有助于抑制 ERs,并减轻细胞铁死亡。本研究的发现为 LPS 诱导的 ARDS 提供了新的见解,这有助于更好地理解 ARDS 相关病理机制,并作为寻找预防 ARDS 的有效策略的基础。然而,本研究主要集中在 FAM134B 自噬受体上,不能排除其他受体以及其他形式的自噬(如铁蛋白自噬)是否参与 LPS 诱导的肺上皮细胞铁死亡,未来需要更多研究以扩展本研究发现。

参考文献

- [1] Bos L D J, Ware L B. Acute respiratory distress syndrome: causes, pathophysiology, and phenotypes [J]. Lancet, 2022, 400 (10358): 1145–56.
- [2] 王晓丹, 宋国庆, 姜 丹. miR-28-5p 通过抑制 FSP1 介导的铁死亡逆转肺腺癌细胞顺铂耐药的机制[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(4): 630–6.

- [3] Ma A, Feng Z, Li Y, et al. Ferroptosis-related signature and immune infiltration characterization in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome[J]. *Respir Res*,2023,24(1):154.
- [4] Ishii S, Chino H, Ode K L, et al. CCPG1 recognizes endoplasmic reticulum luminal proteins for selective ER-phagy[J]. *Mol Biol Cell*,2023,34(4):ar29.
- [5] Liu S, Fang X, Zhu R, et al. Role of endoplasmic reticulum autophagy in acute lung injury [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1152336.
- [6] Li T, Chen Y, Li Y, et al. FAM134B-mediated endoplasmic reticulum autophagy protects against sepsis myocardial injury in mice [J]. *Aging (Albany NY)*,2021,13(10):13535–47.
- [7] Liu Z, Ma C, Wang Q, et al. Targeting FAM134B-mediated reticulophagy activates sorafenib-induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*,2022,589:247–53.
- [8] Hwang S J, Wang J H, Lee J S, et al. Ginseng sprouts attenuate mortality and systemic inflammation by modulating TLR4/NF- κ B signaling in an LPS-induced mouse model of sepsis[J]. *Int J Mol Sci*,2023,24(2):1583.
- [9] Liu X, Zhang J, Xie W. The role of ferroptosis in acute lung injury[J]. *Mol Cell Biochem*,2022,477(5):1453–61.
- [10] Saad H K M, Abd Rahman A A, Ab Ghani A S, et al. Activation of STAT and SMAD signaling induces hepcidin re-expression as a therapeutic target for β -Thalassemia patients [J]. *Biomedicines*, 2022,10(1):189.
- [11] Li Y, Yang Y, Yang Y. Multifaceted roles of ferroptosis in lung diseases[J]. *Front Mol Biosci*,2022,9:919187.
- [12] Zhao Q, Hao C, Wei J, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate silica-induced pulmonary fibrosis by inhibiting apoptosis and pyroptosis but not autophagy in rats[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*,2021,216:112181.
- [13] Liu P, Feng Y, Li H, et al. Ferrostatin-1 alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury *via* inhibiting ferroptosis [J]. *Cell Mol Biol Lett*,2020,25:10.
- [14] Wang F, He J, Xing R, et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and their role in inflammation[J]. *Int Rev Immunol*,2023,42(1):71–81.
- [15] Jin S, Li L, Ren Z, et al. FAM134B-mediated ER-phagy alleviates endoplasmic reticulum stress of rat soleus muscle in response to acute exercise[J]. *Gen Physiol Biophys*,2022,41(1):71–8.

Mechanism of ferroptosis induced by endoplasmic reticulum stress in sepsis related lung injury

Jin Ziqi¹, Tang Bo², Wu Zhanghong¹, Xiao Bao¹, Liu Bin¹, Zhong Yang¹, Hu Xia¹

[¹*Dept of Emergency Department, Changsha First Hospital (Changsha Hospital Affiliated to Xiangya Hospital, Central South University), Changsha 410008;* ²*Dept of Critical Care Medicine, Hunan Provincial Brain Hospital (Hunan Second People's Hospital), Changsha 410007]*

Abstract Objective To explore the mechanism of ferroptosis induced by endoplasmic reticulum stress (ERs) in acute respiratory distress syndrome (ARDS). **Methods** In order to determine the effects of LPS on oxidative stress and Fe²⁺ level of mouse capillary alveolar epithelial cells (MLE12 cells), the cells were treated with LPS (0, 1, 2, 5 μ g/ml) for 24 h. To verify the role of ferroptosis in lipopolysaccharide (LPS)-induced cell death, MLE12 cells were divided into control (Con) group, iron removal inhibitor (Fer-1) group, LPS group and LPS + Fer-1 group. LPS + Fer-1 group was pretreated with 10 μ mol/L Fer-1 for 6 h, then the cells were exposed to 5 μ g/ml LPS for 24 h. Con group was treated with solvent DMSO for 24 h. Fer-1 group was pretreated with 10 μ mol/L Fer-1 for 6 h, and then treated with DMSO for 24 h. The cells in LPS group were exposed to 5 μ g/ml LPS for 24 h. The MLE12 cells were divided into three groups: Con + Vector group, Con + sequence similarity family 134 member B (FAM134B) group, LPS + Vector group and LPS + FAM134B group. After transfected with vector or FAM134B overexpression plasmid for 48 h, the cells were exposed or not exposed to 5 μ g/ml LPS for 24 h. Cell viability was measured by CCK-8. The levels of malondialdehyde (MDA), glutathione and iron, the protein levels of ferroptosis markers [cyclooxygenase 2 (PTGS2), glutathione peroxidase 4 (GPX4)] and ERs markers [glucose regulatory protein 78 (GRP78), activated transcription factor 4 (ATF4) and C/EBP homologous protein (CHOP)] were measured in different groups. In order to further confirm the results of in vitro cell experiments, 40 mice were randomly divided into Con + Vector group, Con + FAM134B group, LPS + Vector group and LPS + FAM134B group, with 10 mice in each group. LPS-induced sepsis models were established in LPS + Vector group and LPS + FAM134B group, and the levels of GPX4 and ERs in lung tissue were evaluated by immunofluorescence staining

网络出版时间:2024-03-21 20:35:54 网络出版地址:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.020

乙醇脱氢酶 1A 和血管内皮生长因子-A 在肝细胞癌中的表达

薛乐乐,井玉莹,杨凯歌,祁力文,吴桐,任祎琳,臧翌辰,王良海,张海俊,梁伟华,胡建明

摘要 **目的** 探讨乙醇脱氢酶 1A (ADH1A) 和血管内皮生长因子-A (VEGFA) 在肝细胞癌 (HCC) 中的表达和临床意义。**方法** 通过基因表达谱交互 (GEPiA) 分析 ADH1A 和 VEGFA 在 HCC 以及癌旁正常组织中的表达情况及相关性; 肿瘤基因组图谱 (TCGA) 和基因富集分析 (GSEA) 探讨 ADH1A 在 HCC 中的相关通路; 收集 84 例 HCC 患者的样本及临床病理资料, 并选取 54 例癌旁正常组织样本做对照, 分析 ADH1A 和 VEGFA 与 HCC 中临床病理参数的相关性; 采用免疫组化法检测并分析病例组和对照组 ADH1A 和 VEGFA 的蛋白表达情况, 结合临床病理参数并通过 Kaplan-Meier 法分析 ADH1A 和 VEGFA 的表达与 HCC 患者的临床进展和预后的关系。**结果** 生物信息学分析发现 ADH1A 在 HCC 中低表达而 VEGFA 在 HCC 中高表达, 并且两者呈负相关

关系 ($P < 0.001$); 免疫组化检测结果显示 ADH1A 在 HCC 组织中的表达率低于癌旁正常组织 ($P < 0.01$), 而 VEGFA 在 HCC 组织中表达率高于癌旁正常组织 ($P < 0.01$); HCC 组织中 ADH1A 高表达组的脉管癌栓及 HCC 患者的复发比例更低 ($P < 0.05$); HCC 组织中 VEGFA 高表达组的肿瘤直径 > 5 cm, 高 TNM 分期、有微卫星以及 G2-G3 分化程度比例更高 ($P < 0.05$); Kaplan-Meier 生存分析显示, ADH1A 高表达同时 VEGFA 低表达患者的五年生存率较高。**结论** HCC 患者肿瘤组织中 ADH1A 的低表达以及 VEGFA 的高表达与肿瘤的进展有关, 可作为 HCC 患者预后评估指标之一。

关键词 肝细胞癌; 乙醇脱氢酶; 血管内皮生长因子-A; 肿瘤复发; 生物信息学; 预后

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0499-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.020

2024-02-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81960435); 兵团指导性科技计划项目 (编号: 2023ZD027); 石河子大学医学院第一附属医院临床-基础联合基金项目 (编号: LJ202202); 石河子大学医学院第一附属医院青年基金项目 (编号: QN202003); 国家大学生创新创业训练项目 (编号: 202310759018)

作者单位: 石河子大学医学院病理学系/石河子大学第一附属医院病理科, 石河子 832000

作者简介: 薛乐乐, 女, 硕士研究生;

胡建明, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: jianming.120@163.com

肝癌是常见的恶性消化系统肿瘤之一, 其病死率位居全球高发肿瘤的第三位, 预后较差^[1]。尽管最近在肝癌诊断和治疗方面有所突破, 但多数肝癌患者在确诊时均为中晚期癌, 接受手术切除的患者只占 20% ~ 30%, 术后 5 年转移/复发率达 60% ~ 70%。虽然目前越来越多学者对肝癌发病和演进机制进行深入研究, 但肿瘤复发、转移机制仍未完全明确。目前, 病毒性肝炎和饮酒是肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 发生的主要原因。乙醇脱

and protein blot. **Results** LPS treatment increased the levels of PTGS2 and MDA, and decreased the levels of GPX4 and GSH in MLE12 cells in a dose-dependent manner. Compared with LPS group, the cell viability, GPX4 and GSH levels in LPS + Fer-1 group increased significantly ($P < 0.05$), while the PTGS2 protein level and MDA level decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with LPS + Vector group, LPS + FAM134B group significantly increased cell viability ($P < 0.05$), decreased PTGS2 protein level ($P < 0.05$) and increased GPX4 level ($P < 0.05$). At the same time, the level of MDA in LPS + FAM134B group was lower than that in LPS + Vector group ($P < 0.05$), and the level of GSH was higher than that in LPS + Vector group ($P < 0.05$). In animal experiment, compared with LPS + Vector group, the expression levels of 4-HNE, ATF4 and CHOP in lung tissue of LPS + FAM134B group decreased significantly ($P < 0.05$), and the expression levels of GPX4, FAM134B group increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** LPS induces ferroptosis and ERs in MLE12 cells in a dose-dependent manner. Activating the endoplasmic reticulum autophagy associated FAM134B receptor helps to inhibit ERs and alleviate cell ferroptosis.

Key words endoplasmic reticulum stress; acute respiratory distress syndrome; lipopolysaccharide; alveolar epithelial cells; ferroptosis; endoplasmic reticulum autophagy