

硫化氢预处理改善大鼠肺泡II型上皮细胞缺氧/复氧损伤的机制研究

王肖婷¹ 骆珍珍¹ 徐俊鹏¹ 张淇昊¹ 曹文傑¹ 黄曼¹ 田云娜¹ 石璐^{2*} 王万铁^{1*}

(¹温州医科大学缺血/再灌注损伤研究所, 温州 325035; ²宜宾学院体育与大健康学院, 宜宾 644000)

摘要 该研究探讨硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)预处理对大鼠肺泡II型上皮细胞(alveolar epithelial cell type II, AEC II)缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤的影响及其潜在作用机制。采用免疫荧光法进行细胞鉴定, 检测各组细胞活性, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和乳酸(lactate)含量; ELISA检测IL-1 β 、IL-18含量; Western blot检测有氧糖酵解指标HK2、PKM2和细胞焦亡指标NLRP3、GSDMD-N、cleaved-Caspase1、cleaved-IL-1 β 、cleaved-IL-18蛋白水平; qRT-PCR检测HK2、PKM2、NLRP3 mRNA水平; 免疫荧光法观察HK2、NLRP3的表达, 评估H/R中有氧糖酵解和细胞焦亡的表达情况及H₂S对H/R损伤的影响。此外, 为深入研究有氧糖酵解与细胞焦亡间的联系, 使用HK2抑制剂2-脱氧葡萄糖(2-deoxy-glucose, 2-DG), 并通过上述实验室方法检测有氧糖酵解和细胞焦亡指标表达情况。研究结果显示H/R可激活有氧糖酵解和细胞焦亡, 使用H₂S后有氧糖酵解和细胞焦亡指标表达水平均下调且改善H/R诱导的细胞损伤; 使用2-DG后细胞焦亡表达下调且细胞损伤得到改善。研究结果表明, H₂S可显著改善大鼠AEC II缺氧/复氧损伤, 其机制可能与抑制HK2-NLRP3-GSDMD通路减轻细胞焦亡有关。

关键词 硫化氢; 大鼠肺泡II型上皮细胞; 缺氧/复氧损伤; HK2-NLRP3-GSDMD通路

Mechanism of Hydrogen Sulfide in Improving Hypoxia/Reoxygenation Injury in Rat Alveolar Epithelial Cell Type II

WANG Xiaoting¹, LUO Zhenzhen¹, XU Junpeng¹, ZHANG Qihao¹, CAO Wenjie¹, HUANG Man¹,
TIAN Yunna¹, SHI Lu^{2*}, WANG Wantie^{1*}

(¹Institute of Ischemia/Reperfusion Injury, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;

²College of Physical Education and Health, Yibin University, Yibin 644000, China)

Abstract This study aims to investigate the effect of H₂S (hydrogen sulfide) preconditioning on H/R (hypoxia/reoxygenation) injury in rat AEC II (alveolar epithelial cell type II) and the underlying mechanism. The cells were identified by immunofluorescence. Detection of each cell activity, SOD (superoxide dismutase) activity, MDA (malondialdehyde) and lactate content were measured. The levels of IL-1 β and IL-18 were detected by ELISA. The protein levels of aerobic glycolysis markers HK2 and PKM2 and pyroptosis markers NLRP3, GSDMD-N, cleaved-Caspase1, cleaved-IL-1 β , and cleaved-IL-18 were detected by Western blot. qRT-PCR was used to detect the mRNA

收稿日期: 2024-03-05

接受日期: 2024-05-22

浙江省介入肺脏病重点实验室建设项目(批准号: 2019E10014)和宜宾学院科研培育项目(批准号: 2022PY24)资助的课题

*通信作者。Tel: 0831-3545790, E-mail: 21381916@qq.com; Tel: 0577-86689817, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

Received: March 5, 2024

Accepted: May 22, 2024

This work was supported by the Zhejiang Key Laboratory of Interventional Pulmonary Disease (Grant No.2019E10014) and the Scientific Research Cultivation Program of Yibin University (Grant No.2022PY24)

*Corresponding authors. Tel: +86-831-3545790, E-mail: 21381916@qq.com; Tel: +86-577-86689817, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

levels of *HK2*, *PKM2*, and *NLRP3*. Immunofluorescence was used to observe the expression of *HK2* and *NLRP3*, and to evaluate the expression of aerobic glycolysis and pyroptosis indicators in H/R and the effect of H_2S on H/R injury. In addition, to further investigate the link between aerobic glycolysis and pyroptosis, the *HK2* inhibitor 2-DG (2-deoxyglucose) was used and its expression was detected by the laboratory methods described above. The results showed that H/R could activate aerobic glycolysis and pyroptosis. H_2S treatment down-regulated the expression of aerobic glycolysis and pyroptosis indicators and ameliorated H/R-induced cell injury. After using 2-DG, pyroptosis indicators expression was down-regulated and cell damage was improved. This study indicates that H_2S can significantly improve hypoxia/reoxygenation injury of AEC II in rats, and its mechanism may be related to inhibiting the *HK2-NLRP3-GSDMD* pathway and reducing pyroptosis.

Keywords hydrogen sulfide; rat alveolar epithelial cell type II; hypoxia/reoxygenation injury; the *HK2-NLRP3-GSDMD* pathway

肺缺血/再灌注损伤(lung ischemia/reperfusion injury, LIRI)常作为并发症发生在某些手术治疗过程中^[1-2],目前尚无有效的预防及治疗措施,且LIRI的病理生理过程尚不完全清楚,在临床中有高发病率和死亡率的特点。

近20年 H_2S 一直是人们关注热点, H_2S 属于一类被称为气体递质的分子,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等^[3-4]作用。哺乳动物细胞通过酶途径^[5]产生内源性 H_2S :半胱氨酸和同型半胱氨酸作为底物,由胱硫氨酸- γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CSE)和胱硫氨酸- β -合酶(cystathionine- β -synthase, CBS)催化的多种反应产生硫化氢。硫化氢(sodium hydrosulfide, NaHS)作为常见的外源性 H_2S 供体,已被广泛证明对缺血/再灌注损伤动物模型有保护作用。有研究显示给予 H_2S 供体NaHS预处理能减轻大鼠急性肺组织损伤^[6]。还有研究报道,内源性 H_2S 通过清除氧自由基、抗氧化而对缺血/再灌注的肺组织起到保护作用^[7]。

有氧糖酵解(aerobic glycolysis)是指葡萄糖在非氧化的条件下经过多种酶的催化代谢最终生成乳酸的复杂过程^[8]。有氧糖酵解又称“Warburg”效应,过去被认为是肿瘤细胞独有的产能方式。最近许多研究发现,“Warburg”效应不再是肿瘤细胞的专属,也可发生在慢性肺疾病患者以及动物模型中^[9-10]。肺是代谢旺盛的器官,葡萄糖利用率比其他脏器如心、脑、肾都高。ZHANG等^[11]发现,在大脑缺血/再灌注损伤期间,有氧糖酵解水平增加。HU等^[12]发现,急性肺损伤(acute lung injury, ALI)时有氧糖酵解程度增加,且抑制有氧糖酵解可减轻肺部炎症反应,从而改善肺损伤。以上数据提示,有氧糖酵解不失为防治ALI的重要靶点。更重要的是,脂多糖(lipopolysaccharide,

LPS)处理巨噬细胞可诱导细胞焦亡,同时伴有有氧糖酵解速率增加,且抑制有氧糖酵解能够逆转LPS诱导的细胞焦亡^[13]。这一发现提示有氧糖酵解与细胞焦亡存在一定的联系。AEC II是肺表面活性物质的主要来源也是LIRI中主要的效应细胞,故本研究以大鼠肺泡II型上皮细胞为主要研究对象,通过建立细胞H/R损伤模型,模拟大鼠在体LIRI,旨在进一步明确 H_2S 在H/R损伤中的作用机制;同时以有氧糖酵解为研究靶点,通过*HK2*抑制剂2-DG对肺泡II型上皮细胞进行处理,研究有氧糖酵解在H/R诱导的肺泡损伤中的可能作用以及调控机制,从而为在体肺缺血/再灌注损伤的防治提供参考。

1 材料和方法

1.1 细胞与主要试剂

RLE-6TN大鼠肺泡II型上皮细胞系,由常州灏天启生物技术有限公司提供;RPMI-1640培养液、RPMI-1640无糖培养液购自美国Gibco公司;胎牛血清购自上海富衡生物科技有限公司;PBS缓冲液、青-链霉素双抗混合液和无血清细胞冻存液购自北京索莱宝科技有限公司;CCK-8试剂盒购自上海陶术生物科技有限公司;硫化氢钠购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;2-DG购自美国APE_xBIO公司;BCA试剂盒、TRizol购自上海雅酶生物医药科技有限公司;总超氧化物歧化酶、丙二醛和乳酸试剂盒购自南京建成生物工程研究所; β -tubulin一抗购自Abmart公司;*NLRP3*一抗购自沈阳万类生物科技有限公司;*GSDMD-N*、Caspase1一抗、IL-1 β 一抗、IL-18一抗、*HK2*一抗、*PKM2*一抗均购自Proteintech公司,SP-C一抗购自美国Abcam公司;*HK2*、*PKM2*、

NLRP3引物购自上海生工生物工程股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂配制 (1) 硫化氢钠溶液: 根据文献[14-17]及预实验, 称取22.4 mg硫化氢钠固体溶于4 mL PBS缓冲液中, 配制成母液, 现用现配, 使用时稀释。(2) 2-DG溶液: 根据文献[18-19]及预实验, 配制成50 mmol/L的母液, 现用现配, 使用时稀释。(3) 10%完全培养液: 按照RPMI-1640:FBS:双抗=89%:10%:1%的比例进行配制。

1.2.2 实验分组及AEC II缺氧/复氧模型的制备 按照随机原则将细胞随机分为6组。(1) 常氧组(Control): 用完全培养液在常氧箱内37 °C孵育6 h 5 min; (2) 常氧+硫化氢钠组(Control+NaHS): 用含终浓度为50 μmol/L NaHS的完全培养液于常氧箱中37 °C孵育6 h 5 min; (3) 常氧+2-DG组(Control+2-DG): 用含终浓度为0.02 mmol/L 2-DG的完全培养液于37 °C常氧箱中孵育6 h 5 min; (4) 缺氧/复氧组(H/R): 置换无糖无血清培养液并放于低氧培养箱(1% O₂)中, 缺氧处理6 h后更换为完全培养液, 再放回常氧箱内复氧5 min; (5) 硫化氢钠+缺氧/复氧组(NaHS+H/R): 缺氧处理前用完全培养液配制的50 μmol/L NaHS溶液预处理30 min, 缺氧处理同H/R组; (6) 2-DG+缺氧/复氧组(2-DG+H/R): 缺氧处理前用完全培养液配制的0.02 mmol/L 2-DG溶液预处理1 h, 缺氧处理同H/R组; 实验结束, 收集细胞进行后续处理。模型复制在借鉴周卓琳等^[20-23]其他学者研究方法的基础上, 通过多次预实验并改进。首先, 选取对数生长期, 形态正常的AEC II饥饿处理24 h。完成后更换为无糖无血清培养液, 放于提前设置好参数的低氧培养箱(37 °C、94% N₂、1% O₂、5% CO₂)中培养6 h, 此为缺氧。再将无糖无血清培养液更换为完全培养液, 放于常氧培养箱(37 °C、74% N₂、21% O₂、5% CO₂)中复氧5 min。通过以上处理, 模拟细胞缺氧/复氧损伤的病理生理过程。

1.2.3 免疫荧光标记法 用4%多聚甲醛室温固定细胞30 min, 经打孔处理后, 进行封闭处理, 滴加相应一抗(SP-C、HK2、NLRP3稀释比例均为1:500)后放于湿盒内避光, 4 °C冰箱孵育过夜, 磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤后用对应的荧光二抗(1:500)室温避光孵育1 h, 再次PBS充分洗涤, 用含DAPI的抗荧光淬灭封片剂小心封片, 蔡司荧光倒置显微镜下观察荧光强度并定量分析。

1.2.4 CCK-8法检测细胞活性 根据CCK-8试剂盒说明书进行实验, 37 °C孵育1 h, 于450 nm波长处测每孔的吸光度(D)值。

1.2.5 检测肺泡细胞超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力 首先, 用蛋白酶抑制剂(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)+细胞组织快速裂解液(radio immunoprecipitation assay, RAPI)法提取细胞蛋白样品, 用BCA法测蛋白浓度, 再按照SOD试剂盒使用说明步骤对试剂反应液进行配制和添加, 水浴锅37 °C孵育30 min后在450 nm波长处测定吸光度(D)值, 计算SOD活力, 计算公式如下:

$$\text{SOD活力} = \text{SOD抑制率} \div 50\% \times 12 \div C_{\text{待测}}$$

$$\text{SOD抑制率} = \frac{(D_{\text{对照}} - D_{\text{对照空白}}) - (D_{\text{测定}} - D_{\text{测定空白}})}{(D_{\text{对照}} - D_{\text{对照空白}})} \times 100\%$$

$C_{\text{待测}}$: 待测样品蛋白浓度(mgprot/mL)(prot指蛋白); 12: 反应体系稀释倍数。

1.2.6 检测肺泡细胞丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量 提取细胞蛋白并测定蛋白浓度。按照试剂盒说明书滴加反应液, EP管用针头刺一小孔, 放于95 °C水浴锅高温孵育40 min, 流水下冲洗使之逐渐冷却, 低温低速离心机2 200 ×g离心, 吸取等体积上清液在96孔板中, 酶标仪立即测定各孔在532 nm波长处的吸光度(D)值, 计算MDA含量, 公式如下:

$$\text{MDA (nmol/mgprot)} = \frac{D_{\text{测定}} - D_{\text{对照}}}{D_{\text{标准}} - D_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{待测}}$$

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, 10 nmol/mL; $C_{\text{待测}}$: 待测样本蛋白浓度(mgprot/mL)。

1.2.7 肺组织乳酸(lactate, LA)检测 提取细胞蛋白并测定蛋白浓度, 再按照MDA试剂盒使用说明步骤对试剂反应液进行配制和添加, 37 °C水浴锅孵育30 min后立即在酶标仪530 nm波长处测定吸光度(D)值, 计算乳酸含量, 计算公式如下:

$$\text{LA (mmol/gprot)} = \frac{D_{\text{测定}} - D_{\text{空白}}}{D_{\text{标准}} - D_{\text{空白}}} \times C_{\text{标准}} \div C_{\text{pr}}$$

$C_{\text{标准}}$: 标准品浓度, 3 mmol/L; C_{pr} : 组织匀浆蛋白浓度, gprot/L。

1.2.8 ELISA检测肺泡细胞IL-1β、IL-18的含量 实验采用双抗体夹心法测定大鼠AEC II中IL-1β、IL-18水平。按说明书步骤进行操作, 于450 nm波长处测量各孔的吸光度(D)值。

1.2.9 Western blot检测HK2、PKM2、NLRP3、GS-DMD-N、cleaved-Caspase1、cleaved-IL-1β、cleaved-

IL-18蛋白的表达情况 造模结束后立即按照PMSF:RAPI裂解液=1:100配制裂解混合液,冰上裂解细胞30 min后收集6孔板裂解液,超声后离心收集细胞上清液并用BCA法测定蛋白浓度,变性制样。依次经电泳仪电泳、转膜(湿转)、10%脱脂牛奶室温封闭2 h, Tris-HCl缓冲盐溶液+Tween 20(TBST)洗膜3次。HK2一抗、PKM2一抗(均1:6 000); NLRP3、GSDMD-N(均1:500); Caspase1、IL-1 β 、IL-18(均1:300) 4 °C孵育过夜。蛋白条带经TBST洗涤(4 min/次),共洗涤3次,再用二抗(1:20 000)室温孵育1 h, 5 min/次TBST洗膜,共3次洗膜后,滴加ECL发光液,用化学发光成像系统进行曝光拍摄,半定量分析。

1.2.10 qRT-PCR检测 HK2、PKM2、NLRP3表达水平 使用Trizol法提取细胞总RNA。将RNA逆转录成cDNA, 然后进行PCR扩增。HK2引物序列 Forward: 5'-GGT GCT GTG GCG AAT CAA AG-3'; Reverse: 5'-CCT TAT GGA GAC GCT TGG CA-3'; PKM2引物序列 Forward: 5'-GTG GAC ATG GTG TTT GCG TC-3'; Reverse: 5'-TCG GTT GCA TCG TCC AAT CA-3'; NLRP3引物序列 Forward: 5'-GTA CGC TTC CTC TTT GGC CT-3'; Reverse: 5'-GCT TCT TGG CCT TGG CTT TC-3'; β -tubulin引物序列 Forward: 5'-CAA CTA TGT GGG GGA CTC GG-3'; Reverse: 5'-TGG CTC TGG GCA CAT ACT TG-3'。

1.2.11 统计学分析 采用GraphPad Prism 9软件统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺泡II型上皮细胞的鉴定

用免疫荧光标记法检测肺泡II型上皮细胞的

特异性表达标志物之一: SP-C。荧光显微镜观察结果显示:蓝色荧光标记为细胞核;绿色荧光标记为SP-C蛋白位置,定位于AEC II胞质。以此为据,证实本实验细胞为AEC II(图1)。

2.2 CCK-8检测NaHS改善细胞H/R损伤的最佳浓度

CCK-8结果显示: 0~3 200 $\mu\text{mol/L}$ 的NaHS溶液正常培养AEC II 24 h无明显细胞毒性($P > 0.05$)(图2A); 与Control组相比, H/R组细胞活性下降($P < 0.000 1$); 与H/R组相比, 50 $\mu\text{mol/L}$ 的NaHS可明显增加H/R损伤的细胞活性($P < 0.001$)。因此选择50 $\mu\text{mol/L}$ 的NaHS作为治疗浓度进行后续实验(图2B)。

2.3 CCK-8检测2-DG改善细胞H/R损伤的最佳浓度

CCK-8结果显示: 在0~20 mmol/L的2-DG溶液正常培养AEC II 24 h的条件下, 大于1 mmol/L的2-DG显著降低细胞活性($P < 0.000 1$)(图3A); 故采用0~1 mmol/L的2-DG在H/R损伤细胞中进一步检测, 结果显示: 与Control组相比, H/R组细胞活性下降($P < 0.000 1$), 与H/R组相比, 0.02 mmol/L的2-DG可明显增加缺氧/复氧诱导AEC II损伤的活力($P < 0.01$)(图3B)。因此, 选择0.02 mmol/L的2-DG进行后续实验。

2.4 H/R激活有氧糖酵解和细胞焦亡

Western blot检测有氧糖酵解和细胞焦亡相关指标显示: 与Control组相比, H/R组HK2、PKM2、NLRP3、cleaved-Caspase1、cleaved-IL-1 β 、cleaved-IL-18蛋白表达水平平均上调($P < 0.05$), GSDMD-N蛋白表达水平明显上调($P < 0.01$)(图4)。以上结果提示, 大鼠肺泡II型上皮细胞H/R可激活有氧糖酵解和细胞焦亡。

2.5 NaHS预处理对H/R诱导AEC II损伤的影响

2.5.1 NaHS预处理对H/R诱导AEC II损伤具有保护

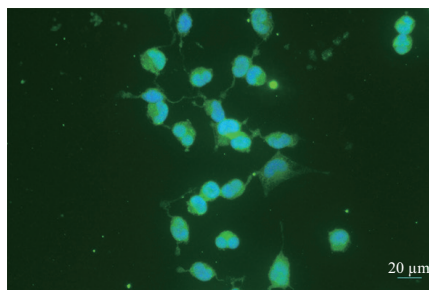


图1 肺泡II型上皮细胞鉴定图

Fig.1 Identification of type II alveolar epithelial cells

作用 与Control组相比, Control+NaHS组的细胞活力无显著差异($P>0.05$); 与Control组相比, H/R组细胞活力显著降低($P<0.0001$); 与H/R组相比, NaHS+H/R组细胞活力明显上升($P<0.01$)(图5)。这证实H/R可以降低细胞活力, 引起细胞损伤; 而NaHS预处理可减轻H/R引起的AEC II损伤, 对细胞起到一定的保护作用。

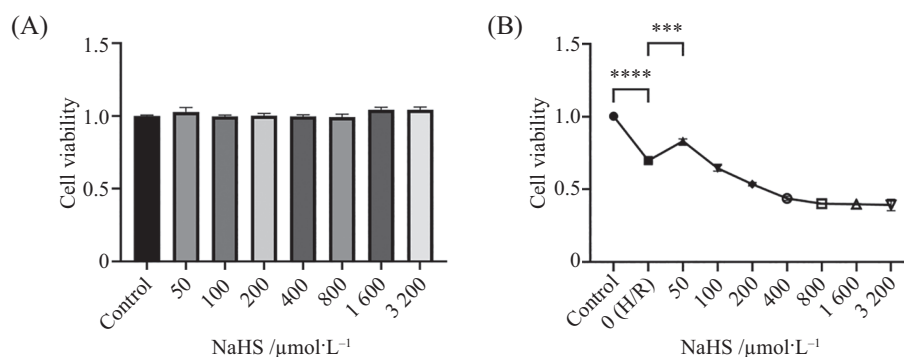
2.5.2 NaHS预处理减轻AEC II缺氧/复氧引起的氧化应激反应和降低乳酸含量 与Control组相比, Control+NaHS组的SOD活力、MDA含量、Lactate含量无显著差异($P>0.05$); 与Control组相比, H/R组SOD活力明显降低, MDA含量明显增加, Lactate含量上升($P<0.0001$); 与H/R组相比, NaHS+H/R组SOD活力明显上升, MDA含量明显下降, Lactate含量下降($P<0.0001$)(图6A~图6C)。

2.5.3 NaHS预处理可抑制细胞缺氧/复氧损伤引起的炎症因子的释放 与Control组相比,

Control+NaHS组细胞中IL-1 β 、IL-18含量无差异($P>0.05$); 与Control组相比, H/R组细胞中IL-1 β 、IL-18含量显著上升($P<0.0001$); 与H/R组相比, NaHS+H/R组细胞中IL-1 β 含量明显下降($P<0.001$), IL-18含量显著下降($P<0.0001$)(图7A和图7B)。

2.5.4 各组大鼠肺泡上皮II型细胞中有氧糖酵解和细胞焦亡相关蛋白的表达情况 Western blot结果显示: 与Control组相比, Control+NaHS组

HK2、PKM2、NLRP3、GSDMD-N、cleaved-IL-1 β 、cleaved-IL-18蛋白水平无显著差异($P>0.05$); 与Control组相比, H/R组HK2、cleaved-Caspase1蛋白表达水平上调($P<0.01$), GSDMD-N蛋白表达水平上调($P<0.001$), PKM2、NLRP3、cleaved-Caspase1、

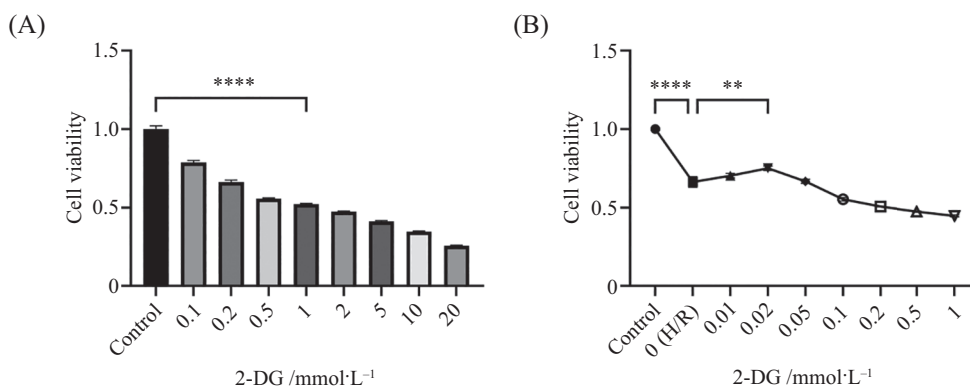


A: CCK-8检测不同浓度NaHS作用24 h对正常细胞的影响; B: CCK-8检测不同浓度NaHS对H/R模型细胞的影响。 $n=4$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

A: CCK-8 was used to detect the effect of different concentrations of NaHS on normal cells; B: CCK-8 was used to detect the effect of different concentrations of NaHS on H/R model cells. $n=4$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图2 CCK-8检测NaHS改善细胞H/R损伤的最佳浓度

Fig.2 The optimal concentration of NaHS for ameliorating H/R injury in cells detected by CCK-8

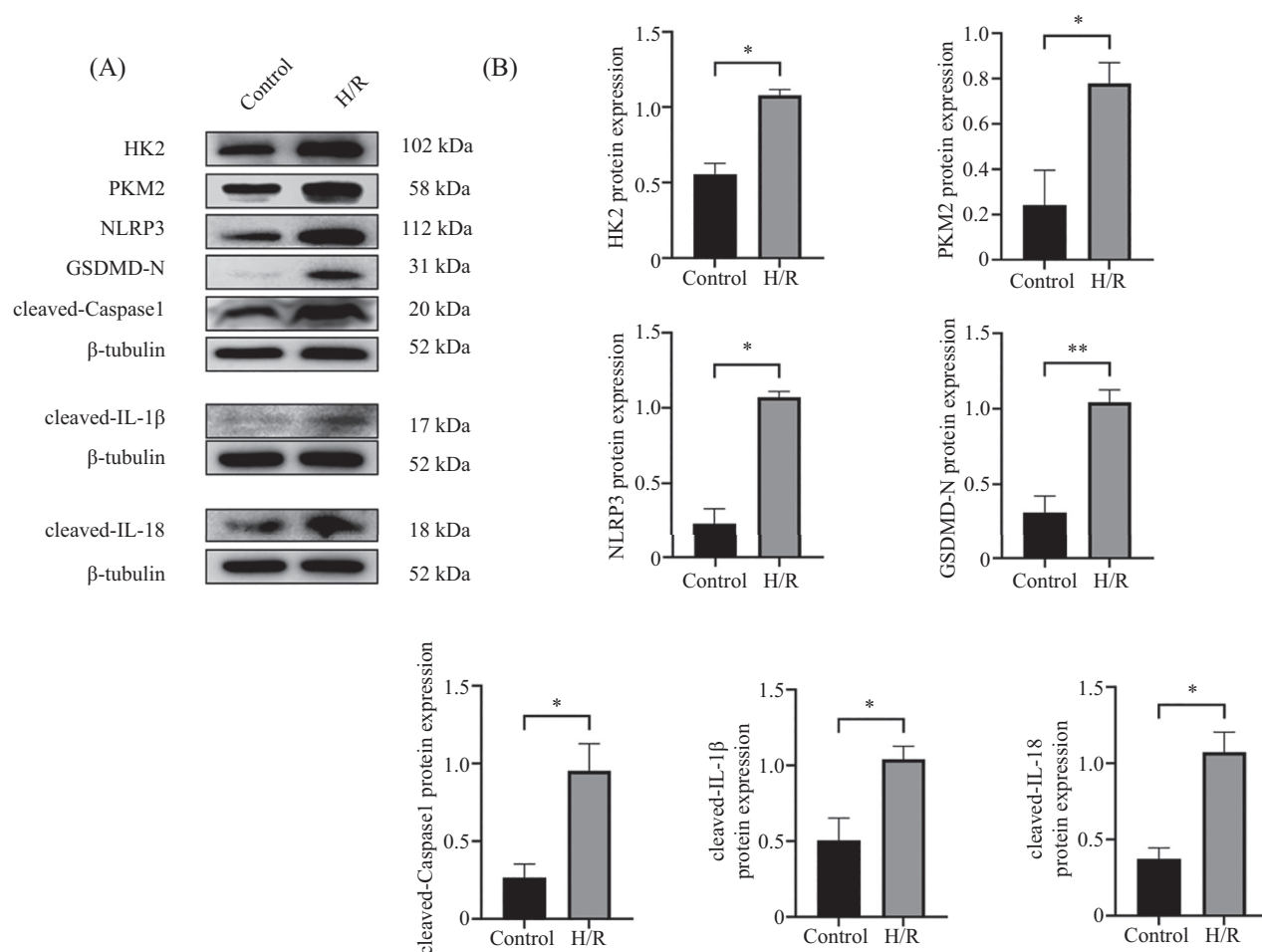


A: CCK-8检测不同浓度2-DG作用24 h对正常细胞的影响; B: CCK-8检测不同浓度2-DG对H/R模型细胞的影响。 $n=4$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

A: CCK-8 was used to detect the effect of different concentrations of 2-DG on normal cells for 24 h; B: CCK-8 was used to detect the effects of different concentrations of 2-DG on H/R model cells. $n=4$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$ 。

图3 CCK-8检测2-DG改善细胞H/R损伤的最佳浓度

Fig.3 Optimal concentration of 2-DG for ameliorating cell H/R injury as determined by CCK-8

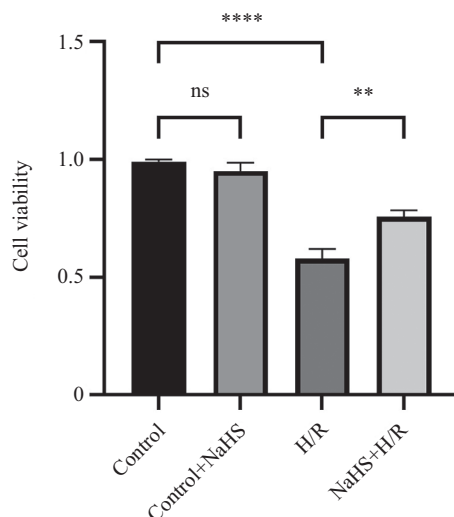


A: HK2、PKM2、NLRP3、GSDMD-N、cleaved-Caspase1、cleaved-IL-1 β 、cleaved-IL-18蛋白表达变化; B: Western blot统计图。n=3, * P <0.05, ** P <0.01。

A: protein expression changes of HK2, PKM2, NLRP3, GSDMD-N, cleaved-Caspase1, cleaved-IL-1 β and cleaved-IL-18; B: Western blot statistical plot. n=3, * P <0.05, ** P <0.01.

图4 H/R诱导AEC II损伤中有氧糖酵解和细胞焦亡相关指标的变化

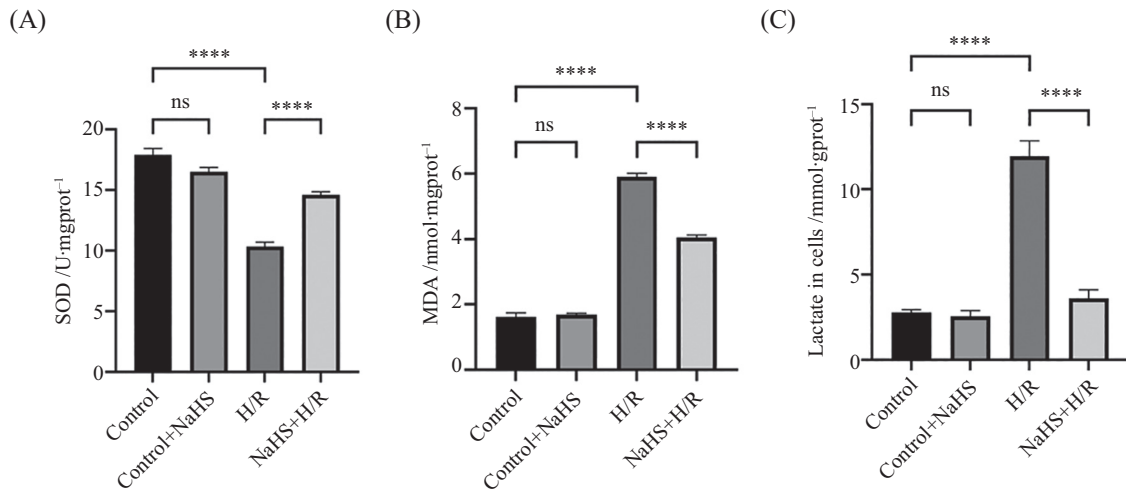
Fig.4 Changes in indicators related to glycolysis and pyroptosis in H/R-induced AEC II injury



n=4, ^{ns} P >0.05, ** P <0.01, **** P <0.000 1.

图5 各组AEC II细胞活力变化统计图

Fig.5 Statistical plot of changes in AEC II cell viability in each group

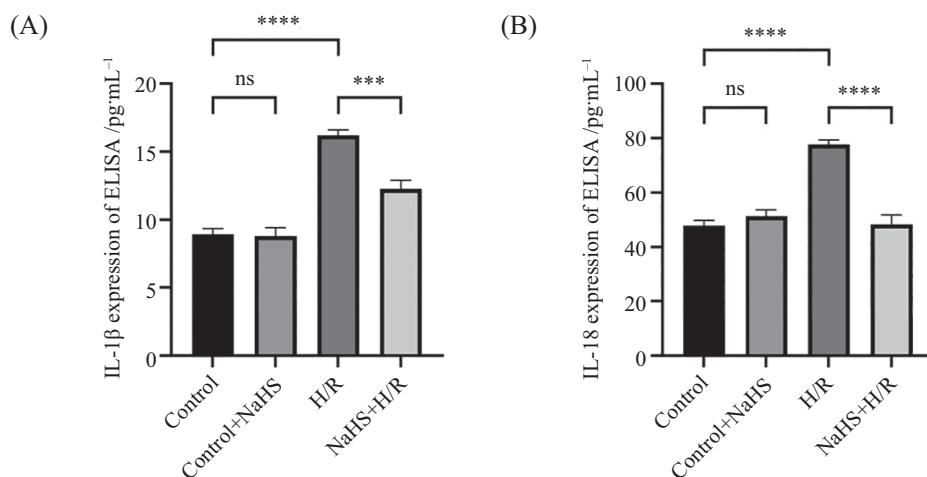


A: NaHS预处理对各组SOD活性变化的影响; B: NaHS预处理对各组MDA水平变化的影响; C: NaHS预处理对各组Lactate含量变化的影响。 $n=4$, $^{ns}P>0.05$, $^{****}P<0.0001$ 。

A: effect of NaHS pretreatment on SOD activity in each group; B: effect of NaHS pretreatment on MDA level in each group; C: effect of NaHS pretreatment on Lactate content in each group. $n=4$, $^{ns}P>0.05$, $^{****}P<0.0001$ 。

图6 各组SOD活性、MDA水平、Lactate含量变化统计图

Fig.6 Statistical plots of changes in SOD activity, MDA level, and Lactate content in each group



A: 各组AEC II中IL-1β含量; B: 各组AEC II中IL-18含量。 $n=4$, $^{ns}P>0.05$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$ 。

A: IL-1β content in AEC II of each group; B: IL-18 content in AEC II of each group. $n=4$, $^{ns}P>0.05$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$ 。

图7 NaHS预处理对H/R诱导的细胞损伤中各组IL-1β、IL-18含量变化的影响

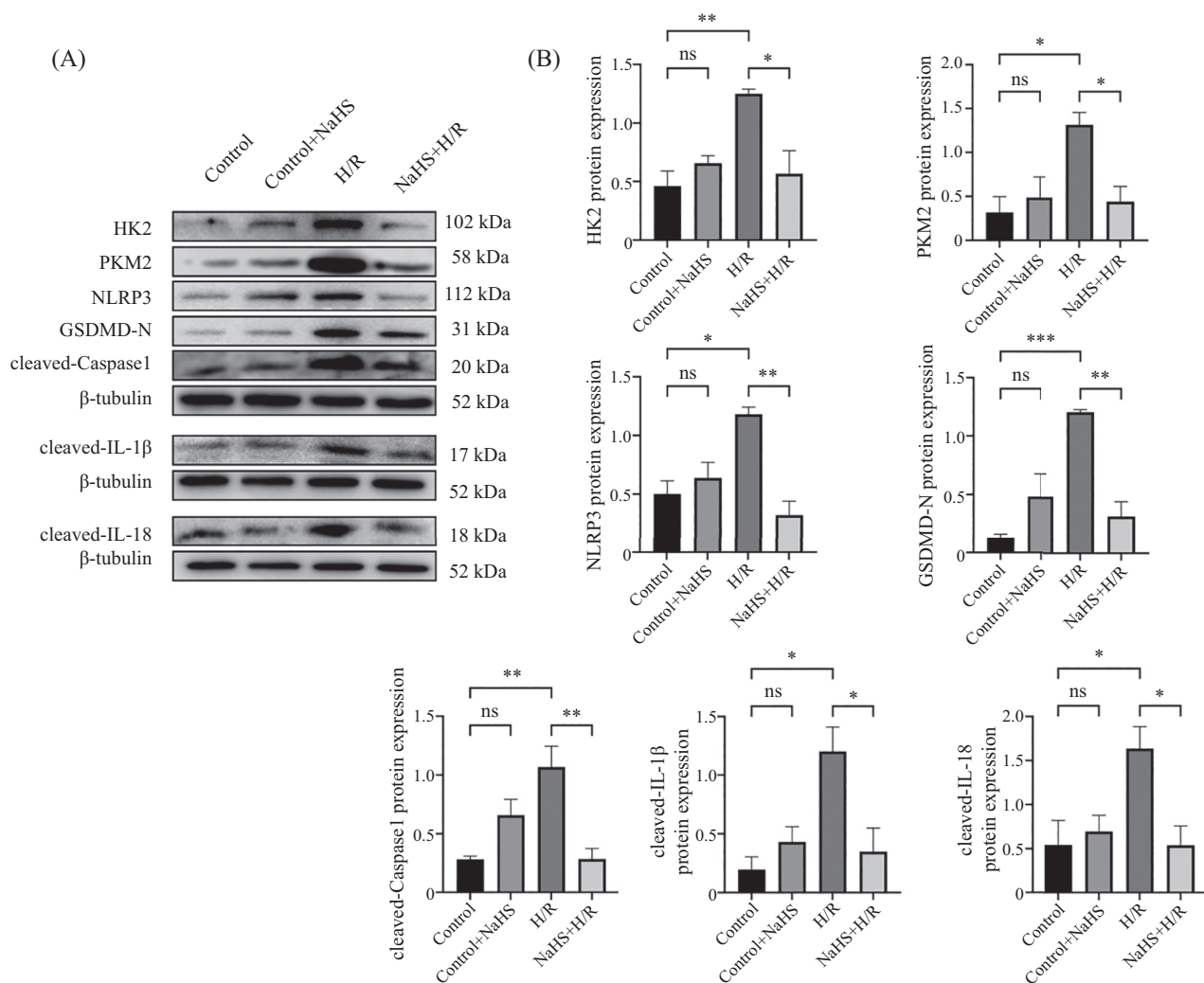
Fig.7 Effects of NaHS preconditioning on the levels of IL-1β and IL-18 in H/R-induced cell injury in each group

cleaved-IL-1β、cleaved-IL-18蛋白表达水平上调($P<0.05$); 与H/R组相比, NaHS+H/R组NLRP3、GSDMD-N、cleaved-Caspase1蛋白表达水平下降($P<0.01$), HK2、PKM2、cleaved-IL-1β、cleaved-IL-18蛋白水平下降($P<0.05$)(图8)。

2.5.5 各组大鼠肺泡上皮II型细胞中HK2、PKM2、NLRP3的基因表达情况 qRT-PCR结果显示: 与Control组相比, Control+NaHS组HK2、PKM2、NLRP3基因表达水平均无显著差异($P>0.05$); 与

Control组相比, H/R组HK2、NLRP3基因表达水平上调($P<0.0001$), PKM2基因表达水平上调($P<0.001$); 与H/R组相比, NaHS+H/R组HK2基因表达水平下降($P<0.05$), PKM2、NLRP3基因表达水平下降($P<0.001$)(图9A~图9C)。

2.5.6 各组大鼠肺泡上皮II型细胞中HK2、NLRP3免疫荧光表达变化 免疫荧光结果显示: 与Control组相比, Control+NaHS组未见HK2、NLRP3阳性表达细胞; 与Control组相比, H/R组HK2、NLRP3阳性

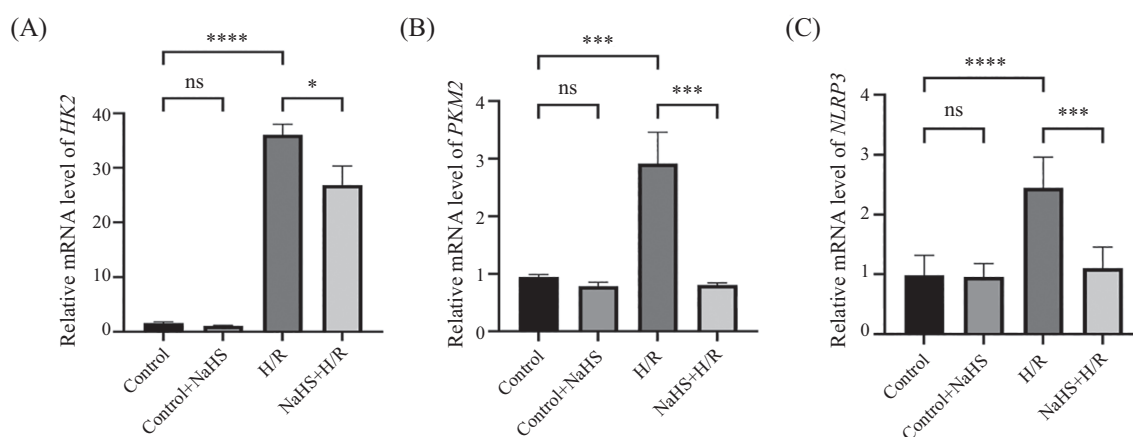


A: HK2、PKM2、NLRP3、GSDMD-N、cleaved-Caspase1、cleaved-IL-1β、cleaved-IL-18蛋白表达变化; B: Western blot统计图。n=3, ^{ns}P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

A: protein expression changes of HK2, PKM2, NLRP3, GSDMD-N, cleaved-Caspase1, cleaved-IL-1β and cleaved-IL-18; B: Western blot statistical plot. n=3, ^{ns}P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

图8 H/R诱导AEC II损伤中各组有氧糖酵解和细胞焦亡相关指标的变化

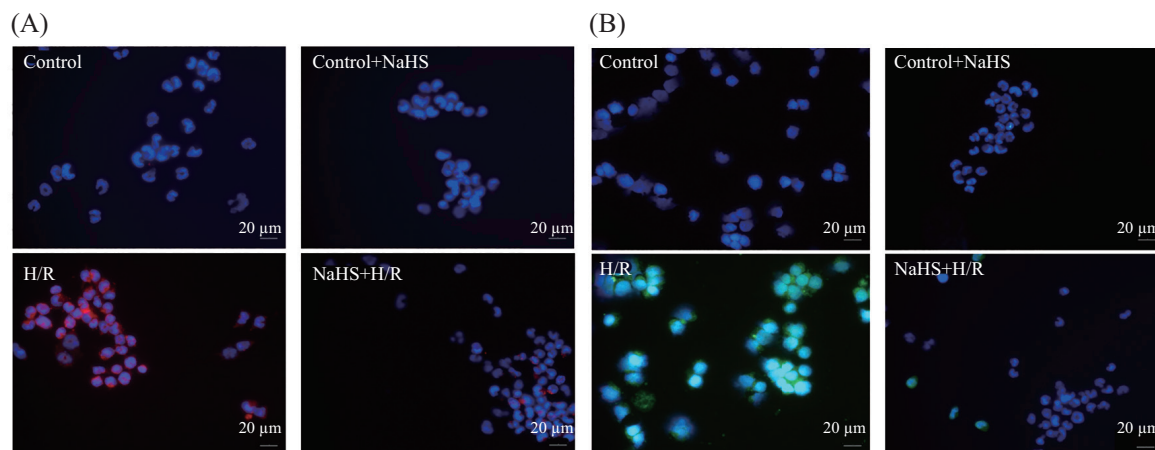
Fig.8 Changes in markers related to pyroptosis and aerobic glycolysis in each group during H/R-induced AEC II injury



n=5, ^{ns}P>0.05, *P<0.05, ***P<0.001, ****P<0.0001.

图9 H/R诱导AEC II损伤中各组HK2、PKM2、NLRP3的mRNA水平

Fig.9 mRNA levels of HK2, PKM2 and NLRP3 in each group during H/R-induced AEC II injury



A: 各组AEC II中HK2免疫荧光表达; B: 各组AEC II中NLRP3免疫荧光表达。

A: HK2 immunofluorescence expression in AEC II of each group; B: immunofluorescence expression of NLRP3 in AEC II of each group.

图10 各组AEC II中HK2、NLRP3的免疫荧光染色

Fig.10 Immunofluorescence staining of HK2 and NLRP3 in AEC II of each group

表达细胞数显著增加;与H/R组相比,NaHS+H/R组HK2、NLRP3阳性表达细胞数显著下降(图10A和图10B)。以上结果表明,H/R激活有氧糖酵解和细胞焦亡,NaHS通过抑制有氧糖酵解和细胞焦亡发挥对AEC II的保护作用。

2.6 2-DG对H/R诱导AEC II损伤的影响

2.6.1 2-DG对H/R诱导AEC II损伤具有保护作用
与Control组相比,Control+2-DG组的细胞活力无显著差异($P>0.05$);与Control组相比,H/R组细胞活力显著下降($P<0.0001$);与H/R组相比,2-DG+H/R组细胞活力明显上升($P<0.01$)(图11)。该结果显示,2-DG可减轻H/R诱导的AEC II损伤。

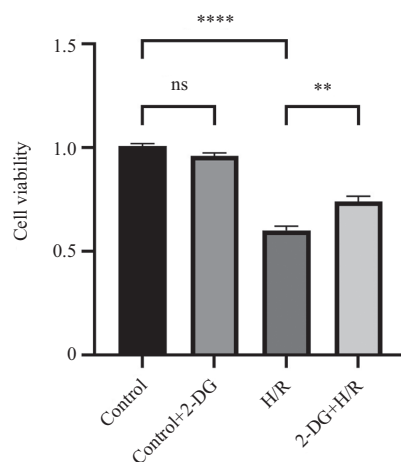
2.6.2 2-DG减轻AEC II缺氧/复氧引起的氧化应激反应和降低乳酸含量
与Control组相比,Control+2-DG组的SOD活力、MDA含量、Lactate含量无显著差异($P>0.05$);与Control组相比,H/R组SOD活力下降,MDA水平增加,乳酸含量上升($P<0.0001$);与H/R组相比,2-DG+H/R组SOD活力明显上升($P<0.001$),MDA含量明显下降($P<0.0001$),Lactate含量下降($P<0.0001$)(图12)。

2.6.3 2-DG抑制细胞缺氧/复氧损伤引起的炎症因子的释放
ELISA结果显示:与Control组相比,Control+2-DG组细胞中IL-1 β 、IL-18含量无显著差异($P>0.05$);与Control组相比,H/R组细胞中IL-1 β 、IL-18含量显著上升($P<0.0001$);与H/R组相比,2-DG+H/R组细胞中IL-1 β 含量明显下降($P<0.0001$),IL-18含量明显下降($P<0.001$)(图13)。

2.6.4 各组大鼠肺泡II型上皮细胞中有氧糖酵解和细胞焦亡相关蛋白的表达
Western blot结果显示:与Control组相比,Control+2-DG组HK2、PKM2、NLRP3、GSDMD-N、cleaved-Caspase1、cleaved-IL-1 β 、cleaved-IL-18蛋白水平均无显著差异($P>0.05$);与Control组相比,H/R组HK2、PKM2、cleaved-IL-18蛋白水平上调($P<0.05$);NLRP3、GSDMD-N、cleaved-Caspase1、cleaved-IL-1 β 蛋白表达水平上调($P<0.01$);与H/R组相比,2DG+H/R组HK2、PKM2、NLRP3、GSDMD-N、cleaved-IL-18蛋白表达水平下降($P<0.05$),cleaved-Caspase1、cleaved-IL-1 β 蛋白水平下降($P<0.01$)(图14)。

2.6.5 各组大鼠肺泡II型上皮细胞中HK2、PKM2、NLRP3的基因表达情况
qRT-PCR结果显示:与Control组相比,Control+2-DG组HK2、PKM2、NLRP3基因表达水平均无显著差异($P>0.05$);与Control组相比,H/R组HK2、NLRP3基因表达水平上调($P<0.0001$),PKM2基因表达水平上调($P<0.01$);与H/R组相比,2-DG+H/R组HK2基因表达水平下降($P<0.0001$),PKM2、NLRP3基因表达水平下降($P<0.001$)(图15)。

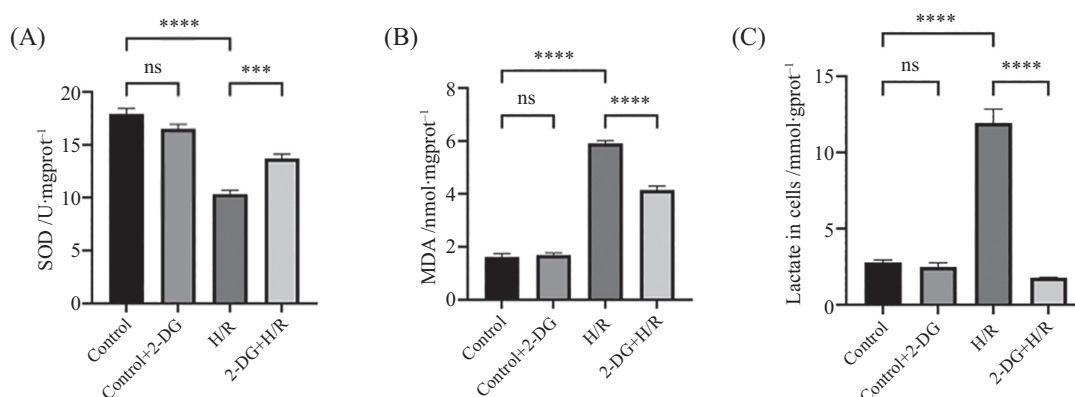
2.6.6 各组大鼠肺泡II型上皮细胞中HK2、NLRP3免疫荧光表达变化
免疫荧光结果显示:与Control组相比,Control+2-DG组HK2、NLRP3阳性表达细胞数未见明显增加;与Control组相比,H/R组HK2、NLRP3阳性表达细胞数显著增加;与H/R组相比,2-DG+H/R组HK2、NLRP3阳性表达细胞数显著下降(图16)。



$n=4$, $^{ns}P>0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{****}P<0.0001$.

图11 各组AEC II细胞活力变化统计图

Fig.11 Statistical plot of changes in AEC II cell viability in each group

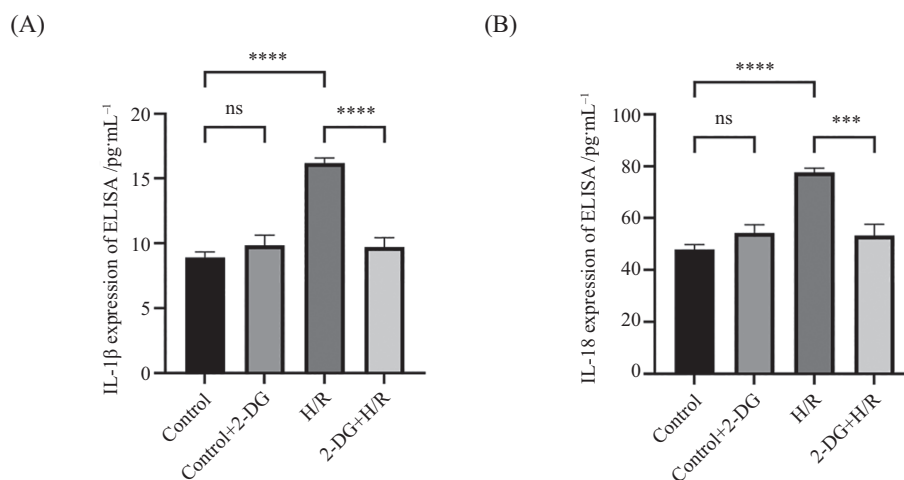


A: 2-DG对各组SOD活性变化的影响; B: 2-DG对各组MDA水平变化的影响; C: 2-DG对各组Lactate含量变化的影响; $n=4$, $^{ns}P>0.05$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$.

A: effect of 2-DG on SOD activity in each group; B: effect of 2-DG on MDA level in each group; C: effect of 2-DG on Lactate content in each group; $n=4$, $^{ns}P>0.05$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$.

图12 各组SOD活性、MDA水平、Lactate含量变化统计图

Fig.12 Statistical plots of changes in SOD activity, MDA level, and Lactate content in each group

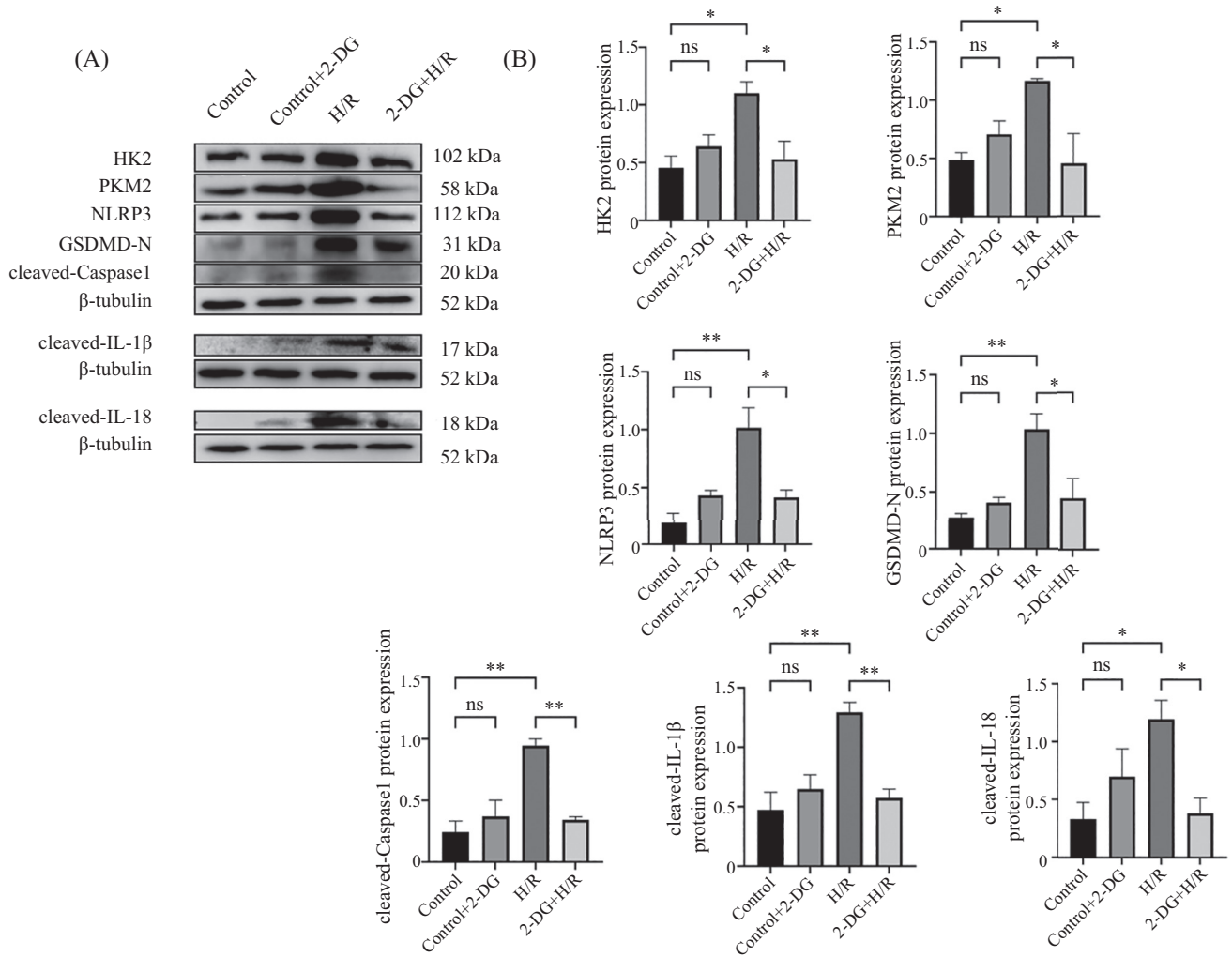


A: 各组AEC II中IL-1β含量; B: 各组AEC II中IL-18含量。 $n=4$, $^{ns}P>0.05$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$ 。

A: IL-1β content in AEC II of each group; B: IL-18 content in AEC II of each group. $n=4$, $^{ns}P>0.05$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$.

图13 2-DG对H/R诱导的细胞损伤中各组IL-1β、IL-18含量变化的影响

Fig.13 Effects of 2-DG on the changes of IL-1β and IL-18 contents in H/R-induced cell injury in each group

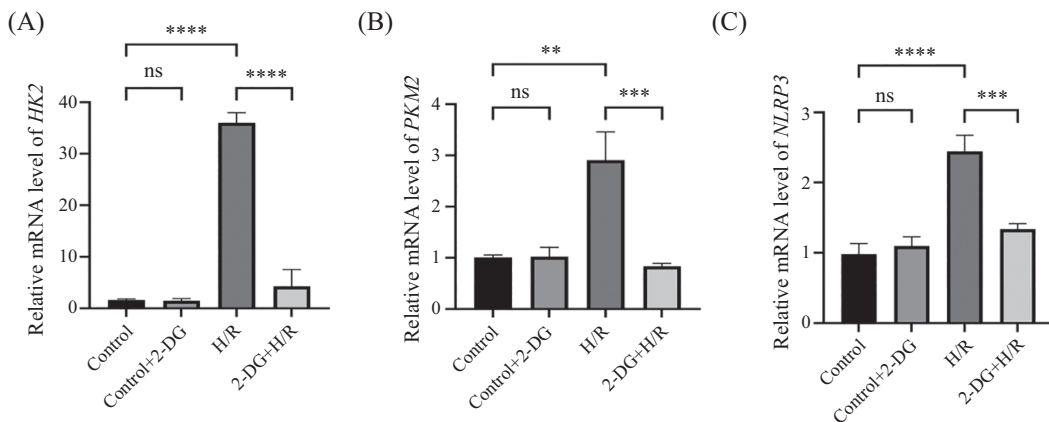


A: HK2、PKM2、NLRP3、GSDMD-N、cleaved-Caspase1、cleaved-IL-1β、cleaved-IL-18蛋白表达变化; B: Western blot统计图。n=3, ^{ns}P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

A: protein expression changes of HK2, PKM2, NLRP3, GSDMD-N, cleaved-Caspase1, cleaved-IL-1β and cleaved-IL-18; B: Western blot statistical plot. n=3, ^{ns}P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

图14 H/R诱导AEC II损伤中各组有氧糖酵解和细胞焦亡相关指标的变化

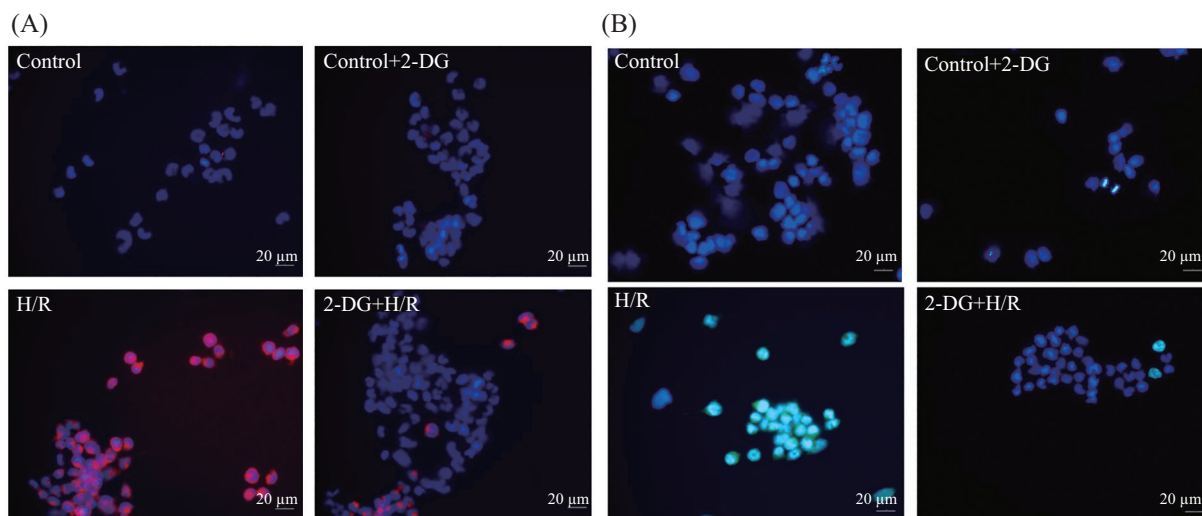
Fig.14 Changes in markers related to aerobic glycolysis and pyroptosis in each group during H/R-induced AEC II injury



n=5, ^{ns}P>0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

图15 H/R诱导AEC II损伤中各组HK2、PKM2、NLRP3的mRNA水平

Fig.15 mRNA levels of HK2, PKM2 and NLRP3 in each group during H/R-induced AEC II injury



A: 各组AEC II中HK2免疫荧光表达; B: 各组AEC II中NLRP3免疫荧光表达。

A: HK2 immunofluorescence expression in AEC II of each group; B: NLRP3 immunofluorescence expression in AEC II of each group.

图16 各组AEC II中HK2、NLRP3的免疫荧光染色

Fig.16 Immunofluorescence staining of HK2 and NLRP3 in AEC II of each group

3 讨论

缺血/再灌注损伤在临床上并不罕见,因其复杂的病理生理机制,想要预防或者改善存在一定难度。 H_2S 是一种具有多种生物学效应的新型气体信号分子,发挥着抗炎、抗氧化、调节血管功能等积极作用。近年来 H_2S 在LIRI中的作用备受关注。 H_2S 可通过抑制细胞凋亡、氧化应激、严重反应等途径,以达到减轻LIRI的保护作用^[24-25]。由此可见, H_2S 对LIRI的保护作用已得到广泛认可,有望成为防治LIRI的新手段。然而,有关 H_2S 改善LIRI的机制仍未被完全阐明。本实验研究发现H/R组细胞活力显著下降,氧化应激反应增加,抗氧化能力下降。 H_2S (50 $\mu\text{mol/L}$)预处理可有效改善H/R诱导的细胞损伤,结果显示细胞活性增加, SOD活性上调, MDA含量下降, 抗氧化能力增加, 氧化应激反应下降。以上结果提示 H_2S 有抗氧化作用,对H/R诱导的细胞损伤有保护作用。

XIE等^[26]研究发现,在大鼠脊髓缺血再灌注损伤中 GYY4137(H_2S 缓释供体)通过下调NLRP3、GSDMD等表达发挥保护神经作用。课题组前期研究发现抑制细胞焦亡可改善H/R诱导的大鼠AEC II损伤^[23]。越来越多的研究资料表明,炎症细胞的能量代谢状态是显著影响炎症结局转归的可控性因素,调控能量代谢可望成为减轻炎症损伤的新途径^[27], 有氧糖酵解途径作为主要能量供应被广泛研究。AKI等^[13]在巨噬细胞中研究发现抑制有氧糖酵解能够逆转细

胞焦亡。因此,本实验室检测乳酸、IL-1 β 和IL-18含量, 有氧糖酵解和细胞焦亡相关指标的蛋白、mRNA、免疫荧光表达,发现H/R显著上调损伤细胞中乳酸、IL-1 β 和IL-18含量以及有氧糖酵解和细胞焦亡水平。而NaHS+H/R组中乳酸、IL-1 β 和IL-18含量显著下降, 有氧糖酵解和细胞焦亡水平下调。以上结果提示 H_2S 保护大鼠AEC II可能与其下调有氧糖酵解和细胞焦亡有关。为明确有氧糖酵解和细胞焦亡间的联系,本实验在大鼠AEC II H/R模型上应用HK2抑制剂2-DG, 实验结果发现2-DG+H/R组细胞活力增加, 氧化应激反应下降, 抗氧化能力增强; 乳酸、IL-1 β 和IL-18含量显著下降; 细胞焦亡相关指标低表达。结果提示2-DG(0.02 mmol/L)通过抑制细胞焦亡发挥对大鼠AEC II的保护作用。

综上所述, H/R可激活并上调有氧糖酵解和细胞焦亡表达水平; H_2S 预处理可显著改善大鼠AEC II缺氧/复氧损伤, 其机制可能与其抑制HK2-NLRP3-GSDMD通路减轻细胞焦亡有关。本研究仅为细胞实验, 还需从动物实验中进一步探讨 H_2S 改善大鼠LIRI的机制。

参考文献 (References)

- [1] LAUBACH V E, SHARMA A K. Mechanisms of lung ischemia-reperfusion injury [J]. *Curr Opin Organ Transplant*, 2016, 21(3): 246-52.
- [2] WEYKER P D, WEBB C A, KIAMANESH D, et al. Lung isch-

- emia reperfusion injury: a bench-to-bedside review [J]. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*, 2013, 17(1): 28-43.
- [3] CORSELLO T, KOMARAVELLI N, CASOLA A. Role of hydrogen sulfide in NRF2- and sirtuin-dependent maintenance of cellular redox balance [J]. *Antioxidants*, 2018, 7(10): 129.
- [4] QUINZII C M, LOPEZ L C. Abnormalities of hydrogen sulfide and glutathione pathways in mitochondrial dysfunction [J]. *Adv Res*, 2020, 27: 79-84.
- [5] CIRINO G, SZABO C, PAPAPETROPOULOS A. Physiological roles of hydrogen sulfide in mammalian cells, tissues, and organs [J]. *Physiol Rev*, 2023, 103(1): 31-276.
- [6] ALI F F, MOHAMMED H H, ELROBY ALI D M. Protective effect of hydrogen sulfide against stress-induced lung injury: involvement of Nrf2, NF κ B/iNOS, and HIF-1 α signaling pathways [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2022, 27(1): 55-70.
- [7] 田凤军, 凌亦凌, 黄新莉, 等. 内源性H₂S在CCK-8减轻脂多糖所致急性肺损伤中的作用[J]. *中国病理生理杂志* (TIAN F J, LING Y L, HUANG X L, et al. The role of endogenous H₂S in the reduction of lipopolysaccharide-induced acute lung injury by CCK-8 [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*), 2007, 23(4): 761-6.
- [8] 郑杰. 肿瘤生长的能量代谢特点及其临床应用[J]. *中国细胞生物学学报* (ZHENG J. Characteristics of energy metabolism in tumor growth and its clinical application [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2011, 33(10): 1158-65.
- [9] ZHAO H, DENNERY P A, YAO H. Metabolic reprogramming in the pathogenesis of chronic lung diseases, including BPD, COPD, and pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(4): L544-54.
- [10] XIE N, TAN Z, BANERJEE S, et al. Glycolytic reprogramming in myofibroblast differentiation and lung fibrosis [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(12): 1462-74.
- [11] ZHANG X C, GU A P, ZHENG C Y, et al. YY1/LncRNA GAS5 complex aggravates cerebral ischemia/reperfusion injury through enhancing neuronal glycolysis [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 158: 107682.
- [12] HU X, XU Q, WAN H, et al. PI3K-Akt-mTOR/PFKFB3 pathway mediated lung fibroblast aerobic glycolysis and collagen synthesis in lipopolysaccharide-induced pulmonary fibrosis [J]. *Lab Invest*, 2020, 100(6): 801-11.
- [13] AKI T, FUNAKOSHI T, NORITAKE K, et al. Extracellular glucose is crucially involved in the fate decision of LPS-stimulated RAW264.7 murine macrophage cells [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 10581.
- [14] MAO Z, LI H, ZHAO X L, et al. Hydrogen sulfide protects Sertoli cells against toxicant Acrolein-induced cell injury [J]. *Food Chem Toxicol*, 2023, 176: 113784.
- [15] 吴昌学, 董艳军, 黄赞, 等. 外源性H₂S对氧糖剥夺再灌注后SH-SY5Y细胞损伤的保护作用[J]. *西安交通大学学报(医学版)* (WU C X, DONG Y J, HUANG Y, et al. The protective effect of exogenous H₂S on SH-SY5Y cells after oxygen-glucose deprivation and reperfusion [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University, Medical Edition*), 2021, 42(5): 659-65.
- [16] 林春喜, 林建聪, 郭润民, 等. 硫化氢通过调控JNK通路对抗高糖诱导的心肌细胞氧化应激损伤[J]. *中国动脉硬化杂志* (LIN C X, LIN J C, GUO R M, et al. Hydrogen sulfide protects cardiomyocytes against high glucose-induced oxidative stress by regulating JNK pathway [J]. *Chinese Journal of Atherosclerosis*), 2013, 21(1): 1-5.
- [17] 李岩, 李洪民, 刘磊, 等. 硫化氢通过CaMKK β -AMPK信号通路延缓大鼠主动脉内皮细胞老化[J]. *中国细胞生物学学报* (LI Y, LI H M, LIU L, et al. Hydrogen sulfide retards the aging of rat aortic endothelial cells through CaMKK β -AMPK signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2016, 38(5): 566-75.
- [18] GRANT R W, BOUDREAUX J I, STEPHENS J M. 2-deoxyglucose inhibits induction of chemokine expression in 3T3-L1 adipocytes and adipose tissue explants [J]. *Obesity*, 2017, 25(1): 76-84.
- [19] 郝帅, 卢从华, 林采余, 等. 2-脱氧葡萄糖逆转非小细胞肺癌细胞对奥希替尼继发性耐药的作用及机制[J]. *中华结核和呼吸杂志* (HAO S, LU C H, LIN C Y, et al. Role of 2-deoxyglucose in reversing osimertinib acquired resistance in non-small cell lung cancer cells and its mechanism [J]. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory*), 2019, 42(3): 198-205.
- [20] 李百玲, 柴家科, 段红杰, 等. 肺泡II型上皮细胞在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中的研究进展[J]. *中华损伤与修复杂志(电子版)* (LI B L, CHAI J K, DUAN H J, et al. Research progress of alveolar type II epithelial cells in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. *Chinese Journal of Injury and Repair, Electronic Edition*), 2014, 9: 323-5.
- [21] 陈鑫. 缺氧后处理影响肺泡II型上皮细胞死亡受体途径凋亡机制的研究[D]. 武汉: 遵义医学院 (CHEN X. Effects of hypoxic postconditioning on apoptosis of alveolar type II epithelial cells through death receptor pathway [D]. Wuhan: Zunyi Medical College), 2012: 1-41.
- [22] 杨会, 李珊珊, 陈磊杰, 等. 雌二醇调控PI3K/Akt通路在大鼠肺泡II型上皮细胞缺氧/复氧损伤中的作用[J]. *中国细胞生物学学报* (YANG H, LI S S, CHEN L J, et al. Effect of estradiol on hypoxia/reoxygenation injury in rat alveolar type II epithelial cells by regulating PI3K/Akt pathway [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2022, 44(12): 2251-8.
- [23] 周卓琳, 刘秀洁, 王新雨, 等. NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡在大鼠肺泡II型上皮细胞缺氧/复氧损伤中的作用机制研究[J]. *中国病理生理杂志* (ZHOU Z L, LIU X J, WANG X Y, et al. Role of NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in hypoxia/reoxygenation injury of rat alveolar type II epithelial cells [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*), 2021, 37(10): 1822-7.
- [24] JIANG T, YANG W, ZHANG H, et al. Hydrogen sulfide ameliorates lung ischemia-reperfusion injury through SIRT1 signaling pathway in type 2 diabetic rats [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 596.
- [25] FU Z, LIU X, GENG B, et al. Hydrogen sulfide protects rat lung from ischemia-reperfusion injury [J]. *Life Sci*, 2008, 82(23/24): 1196-202.
- [26] XIE L, WU H, HE Q, et al. A slow-releasing donor of hydrogen sulfide inhibits neuronal cell death via anti-PANoptosis in rats with spinal cord ischemia-reperfusion injury [J]. *Cell Commun Signal*, 2024, 12, 22(1): 33.
- [27] GABER T, STREHL C, BUTTGEREIT F. Metabolic regulation of inflammation [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2017, 13(5): 267-79.