

· 研究论文 ·

硫化氢对缺氧/复氧诱导的大鼠肺泡II型上皮细胞铜死亡的干预作用

程缘^{1#} 骆珍珍^{1#} 陈纪豪^{2#} 韩丛美¹ 林芷漪³ 黄曼¹ 戴雍月¹ 陈玲珑²
陈新国² 王万铁^{1*}

(¹温州医科大学基础医学院, 温州 325035; ²温州市人民医院急诊科, 温州 325000;

³温州医科大学精神医学学院, 温州 325035)

摘要 该文旨在探讨外源性硫化氢供体硫化氢钠(sodium hydrosulfide, NaHS)对缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导的大鼠肺泡II型上皮细胞(alveolar epithelial type II cells, ATII)损伤的影响及可能机制, 重点关注铜死亡(cuproptosis)相关分子通路在其中的作用。采用RLE-6TN大鼠肺泡II型上皮细胞系, 建立H/R损伤模型。CCK-8法检测细胞活力; 荧光探针检测细胞内Cu⁺水平; Western blot检测铜转运蛋白及铜死亡相关蛋白的表达水平; RT-qPCR检测铜死亡相关基因的mRNA表达水平; JC-1染色检测线粒体膜电位; 化学发光法检测ATP含量; ELISA法检测PDHA1水平; 磺基水杨酸法检测柠檬酸含量。结果显示, H/R处理可显著抑制ATII活力并诱导氧化应激, 导致细胞内Cu⁺蓄积, CTR1表达上调, ATP7A、ATP7B表达下调; 同时, 铜死亡相关蛋白DLAT、DLST表达下调, 而FDX1、LIAS表达上调, DLAT寡聚体形成量增加; 铜死亡相关基因FDX1、LIAS表达水平上调, DLAT、DLD基因表达下调, 线粒体膜电位下降, ATP、PDHA1及柠檬酸含量降低。50 μmol/L NaHS预处理可显著逆转上述变化。研究表明: H/R可激活大鼠ATII细胞中铜死亡相关分子通路, 伴随铜代谢紊乱、线粒体功能障碍及代谢中间产物水平降低; NaHS预处理可通过调节铜代谢稳态、抑制铜死亡相关通路活化、改善线粒体功能, 减轻ATII的H/R损伤, 从而发挥保护作用。

关键词 硫化氢钠; 缺氧/复氧; 肺泡II型上皮细胞; 铜死亡; 线粒体

Intervention of Sodium Hydrosulfide on Cuproptosis of Rat Alveolar Epithelial Type II Cells Induced by Hypoxia/Reoxygenation

CHENG Yuan^{1#}, LUO Zhenzhen^{1#}, CHEN Jihao^{2#}, HAN Congmei¹, LIN Zhiyi³, HUANG Man¹, DAI Yongyue¹,
CHEN Linglong², CHEN Xinguo², WANG Wantie^{1*}

(¹School of Basic Medical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; ²Emergency Department, Wenzhou People's Hospital, Wenzhou 325000, China; ³School of Psychiatry, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China)

Abstract This study aims to investigate the effects and potential mechanisms of NaHS (sodium hydrosulfide), an exogenous hydrogen sulfide donor, on H/R (hypoxia/reoxygenation)-induced injury in rat ATII (alveolar epi-

收稿日期: 2026-05-18

接受日期: 2026-09-11

温州市基础性科研项目(批准号: YC20250400)资助的课题

[#]共同第一作者

*通信作者. Tel: 0577-86689817, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

Received: May 18, 2026

Accepted: September 11, 2026

This work was supported by the Wenzhou Basic Scientific Research Project (Grant No.YC20250400)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-577-86689817, E-mail: wwt@wmu.edu.cn

thelial type II cells), focusing on the role of cuproptosis-related molecular pathways. The RLE-6TN rat ATII cell line was used to establish an H/R injury model. Cell viability was assessed by CCK-8 assay; intracellular Cu^+ levels were measured using a fluorescent probe; protein expression levels of copper transporters and cuproptosis-related proteins were determined by Western blot; mRNA expression levels of cuproptosis-related genes were quantified by RT-qPCR; mitochondrial membrane potential was evaluated by JC-1 staining; ATP content was measured by chemiluminescence; PDHA1 level was detected by ELISA; and citric acid content was quantified by the sulfosalicylic acid method. H/R treatment significantly suppressed ATII cell viability and induced oxidative stress. H/R also led to intracellular Cu^+ accumulation, upregulation of the copper importer CTR1, and downregulation of the copper exporters ATP7A and ATP7B. Meanwhile, the cuproptosis-related proteins DLAT and DLST were significantly downregulated, while FDX1 and LIAS were upregulated, accompanied by increased formation of DLAT oligomers. The expression levels of the cuproptosis-related genes *FDX1* and *LIAS* were upregulated, whereas *DLAT* and *DLD* were downregulated. In addition, H/R decreased mitochondrial membrane potential, ATP content, PDHA1 level and citric acid content. Pretreatment with 50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS significantly reversed all of the above changes. H/R activates cuproptosis-related molecular pathways in rat ATII cells, accompanied by copper metabolic dysregulation, mitochondrial dysfunction and decreased levels of metabolic intermediates. NaHS pretreatment alleviates H/R-induced ATII injury by restoring copper metabolic homeostasis, suppressing cuproptosis-related pathway activation and improving mitochondrial function.

Keywords sodium hydrosulfide; hypoxia/reoxygenation; alveolar epithelial type II cells; cuproptosis; mitochondria

肺缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是胸外科手术如肺移植及袖状肺叶切除术后常见的严重并发症,其病理特征主要表现为氧自由基与细胞毒性代谢产物大量生成,其常导致术后肺功能下降甚至移植肺失功^[1]。肺泡II型上皮细胞(alveolar epithelial type II cells, ATII)是肺泡上皮的重要组成细胞之一,具有合成和分泌肺表面活性物质、修复受损肺泡上皮、维持肺泡液体平衡等多种生理功能^[2]。在急性肺损伤、I/R损伤等病理状态下,ATII的损伤与死亡是导致肺功能障碍的重要环节之一^[3]。缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型是模拟缺血/再灌注损伤的细胞水平模型,深入研究ATII在H/R损伤中的死亡机制,对于寻找新的干预靶点具有重要意义。

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)是继一氧化氮和一氧化碳之后发现的第三种气体信号分子,具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等多种细胞保护作用^[4]。本课题组前期研究发现,硫化氢预处理可减轻大鼠ATII的H/R损伤^[5],降低氧化应激水平并减少细胞死亡,但其具体机制尚未完全明确。现有基础研究证实,硫化氢能够调控胞内铜离子稳态,进而参与铜死亡相关分子通路的调控过程^[6]。

铜是几乎所有生物体中的一种必需元素,研究表明铜作为多种关键代谢酶的辅因子,驱动着广泛的生理过程^[7]。铜死亡是近年来发现的一种新型

调节性细胞死亡方式,其发生依赖于铜离子与三羧酸循环中脂酰化蛋白的直接结合,该结合可诱导脂酰化蛋白聚集与铁硫簇蛋白丢失,并最终引发蛋白毒性应激和细胞死亡。铁氧还蛋白1(ferredoxin 1, FDX1)是铜死亡的关键调控分子,可将 Cu^{2+} 还原为毒性更高的 Cu^+ ,并调控脂酰化蛋白的合成^[8]。研究表明,铜死亡在多种疾病中发挥重要作用^[9-10],但其在ATII H/R损伤中的角色尚不清楚。

本研究采用RLE-6TN大鼠ATII细胞系建立H/R损伤模型,观察硫化氢(sodium hydrosulfide, NaHS)对铜死亡的干预作用,为肺I/R损伤的防治提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

细胞培养相关试剂: RPMI-1640培养液、RPMI-1640无糖培养液及胰蛋白酶购自美国Gibco公司;胎牛血清购自上海富衡生物科技有限公司;磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)及青-链霉素双抗混合液购自北京索莱宝科技有限公司。

细胞活力检测: CCK-8试剂盒购自上海陶术生物科技有限公司。

氧化应激检测: 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒和丙二醛(malondialdehyde,

MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

Western blot相关抗体及试剂: FDX1一抗购自北京博奥龙生物科技有限公司; β -肌动蛋白(β -actin)、硫辛酸合成酶(lipoic acid synthetase, LIAS)、二氢硫辛酰胺 S-乙酰转移酶(dihydrolipoamide S-acetyltransferase, DLAT)、二氢硫辛酰胺 S-琥珀酰转移酶(dihydrolipoamide S-succinyltransferase, DLST)、铜转运蛋白1(copper transporter 1, CTR1)、铜转运ATP酶 α (ATPase copper transporting alpha, ATP7A)及铜转运ATP酶 β (ATPase copper transporting beta, ATP7B)一抗均购自武汉博士德生物工程有限公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗及增强化学发光液均购自上海雅酶生物医药有限公司。

RT-qPCR引物: *FDX1*、*LIAS*、*DLAT*及二氢硫辛酰胺脱氢酶(dihydrolipoamide dehydrogenase, *DLD*)的引物均由浙江鹭鸣生物科技有限公司合成。

线粒体功能检测: JC-1线粒体膜电位检测试剂盒购自美国APEX BIO公司; ATP检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

代谢相关检测: 丙酮酸脱氢酶E1亚基 α 1(pyruvate dehydrogenase E1 subunit alpha 1, PDHA1)及柠檬酸(citric acid, CA)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒均购自杭州臻优品生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂配制 硫氢化钠(NaHS)溶液: 参照文献[11-13]并结合预实验结果, 称取22.4 mg NaHS固体溶于4 mL PBS缓冲液中, 配制成100 mmol/L储存液, 于 -20°C 冰箱中避光保存(有效期为1周)。临用前以RPMI-1640培养液稀释至所需浓度。完全培养液: RPMI-1640培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)及青-链霉素双抗混合液以89:10:1的体积比配制。

1.2.2 ATII细胞缺氧/复氧(H/R)损伤模型的建立在文献[14-16]研究方法的基础上, 经预实验优化后建立ATII细胞的H/R损伤模型。具体操作步骤如下。细胞饥饿处理: 选取处于对数生长期、形态正常的ATII细胞, 进行饥饿处理24 h。缺氧: 弃去旧细胞培养液, 用PBS缓冲液洗涤3次, 加入经高纯氮气预饱和的无糖无血清RPMI-1640培养液(缺氧液), 将细胞转移至低氧培养箱(37°C 、94% N_2 、1% O_2 、5% CO_2)中培养6 h。复氧: 弃去缺氧液, 更换为完全培养液, 将细胞转移至常氧培养箱(37°C 、74% N_2 、

21% O_2 、5% CO_2)中继续培养5 min。通过上述连续处理, 模拟细胞在I/R过程中的H/R损伤病理生理状态。

1.2.3 实验分组 细胞经饥饿处理24 h后, 按随机原则分为以下4组(每组设6个复孔)。常氧对照组(Control): 细胞于常氧培养箱中用完全培养液常规培养6 h 5 min; NaHS对照组(Control+NaHS): 细胞于常氧培养箱中用含50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS的完全培养液培养6 h 5 min; 缺氧/复氧模型组(H/R): 细胞按照1.2.2中的H/R流程进行处理; NaHS干预组(H/R+NaHS): 细胞在缺氧处理前, 用含50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS的完全培养液预处理30 min, 随后按照1.2.2中的H/R流程进行处理。各组处理结束后, 收集细胞用于后续指标检测。

1.2.4 免疫荧光(immunofluorescence, IF)染色 细胞接种于共聚焦培养皿中培养至合适密度。造模结束后, 弃去培养液, 用4%多聚甲醛于室温下固定细胞20 min。移除固定液, 以PBS洗涤3次, 每次5 min。随后加入200 μL 的0.1% Triton X-100, 室温静置30 min进行透膜处理, PBS充分洗涤后, 滴加200 μL 的5%山羊血清, 室温封闭1 h。封闭结束后, 弃去封闭液, 滴加稀释后的一抗[抗SP-C(surfactant protein C)抗体、抗FDX1抗体及抗DLAT抗体, 稀释比例均为1:100], 置于 4°C 冰箱中孵育过夜(12 h)。次日回收一抗, PBS洗涤3次(每次5 min), 然后加入荧光标记的二抗(稀释比例为1:1 000), 室温避光孵育1 h。最后用DAPI染液复染细胞核, 于荧光显微镜下观察拍照, 并对荧光强度进行定量分析。

1.2.5 CCK-8检测细胞活力 弃去旧培养液, 用无菌PBS洗涤细胞1次, 加入0.25%胰蛋白酶-EDTA消化液, 等待2~3 min; 倒置显微镜下观察, 待细胞皱缩变圆、细胞间隙增大时, 加入含血清完全培养液终止消化, 轻柔吹打收集细胞悬液。根据96孔板底面积计算铺板所需细胞数, 每孔接种 1×10^4 个细胞。 37°C 、5% CO_2 条件下培养24 h后, 换用无生长因子、无血清的培养液饥饿处理12 h。提前避光配制CCK-8工作液(无血清培养液:CCK-8=100:10)。弃去原培养液, PBS洗涤后弃去PBS, 每孔迅速加入100 μL 预先配制的CCK-8工作液, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中孵育1 h, 最后用酶标仪于450 nm波长处测定吸光度(D)值。

1.2.6 检测肺泡细胞SOD的活力 按1:200比例混合底物贮备液与缓冲液制备底物应用液, 酶贮备液与酶稀释液以1:10配比制成酶工作液。细胞经PBS

清洗后, 用PMSF:RAPI=1:100的裂解液冰上裂解30 min, 4 °C、12 500 ×g离心20 min获取上清液, 经BCA法定量蛋白后, 按试剂盒说明书加样, 37 °C孵育20~30 min, 用酶标仪检测450 nm波长处的 D 值。

1.2.7 检测肺泡细胞MDA的表达变化 将试剂一、试剂二与试剂三按0.2:3:1的比例配制成工作液, 现配现用。细胞经提取液处理后破碎制成匀浆, 分别设置空白管、标准管和测定管, 按试剂盒说明依次加样, 加入工作液后充分混匀, 95 °C水浴40 min, 流水冷却后于4 °C、1 521 ×g离心10 min, 取上清液在530 nm波长处检测 D 值, 以BCA法定量蛋白, 计算MDA含量(nmol/mgprot)。

1.2.8 荧光法检测细胞中Cu⁺的含量 试剂一、试剂二均在-20 °C避光保存, 检测前恢复至25 °C, 将试剂一与双蒸水按1:9配制工作液。取1×10⁶个细胞, 加入200 μL生理盐水并匀浆后, 4 °C、10 000 ×g离心10 min, 取上清液并置于冰上待测(当天有效)。检测时于黑色酶标孔中加入20 μL待测样本, 然后依次加入100 μL试剂一、100 μL试剂二, 振板5 s后37 °C避光孵育10 min, 随即用酶标仪检测对应波长(激发波长为395 nm, 发射波长为480 nm)下的荧光值。

1.2.9 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测 造模结束后, 弃去细胞培养液, 用预冷的PBS洗涤细胞3次。加入含1% PMSF的RIPA裂解液, 冰上裂解30 min, 裂解期间每隔5 min轻摇培养皿以保证充分裂解。4 °C、12 000 ×g离心20 min, 收集上清液。采用BCA法进行蛋白定量, 将各组样本蛋白浓度调整至一致。加入5×上样缓冲液, 沸水浴加热10 min使蛋白变性。为检测DLAT寡聚体, 取等量蛋白样本加入不含二硫苏

糖醇(dithiothreitol, DTT)的5×非还原性上样缓冲液, 不进行沸水浴加热。为检测DLAT及其他蛋白, 取等量蛋白样本加入含DTT的5×还原性上样缓冲液, 沸水浴加热10 min使蛋白变性。取等量蛋白进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 分离后将蛋白湿转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜。转膜完成后, 用5%脱脂牛奶室温封闭1 h。分别加入一抗(1:1 500), 4 °C孵育过夜。次日用TBST缓冲液洗膜3次, 每次10 min, 然后加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:10 000), 室温孵育1~2 h。再次用TBST洗膜3次后, 滴加增强化学发光液显影, 使用化学发光成像仪采集条带图像, 以ImageJ软件分析条带灰度值, 计算目标蛋白的相对表达量。

1.2.10 RT-qPCR检测 采用Trizol法提取细胞总RNA。弃去培养液后, 用预冷的PBS洗涤细胞2次, 加入Trizol试剂充分吹打裂解细胞, 室温静置5 min。加入氯仿剧烈振荡15 s, 室温静置3 min后, 4 °C、12 000 ×g离心15 min。小心吸取上层水相至新EP管中, 加入异丙醇沉淀RNA, 4 °C、12 000 ×g离心10 min。弃去上清液, 用75%预冷乙醇洗涤RNA沉淀, 室温干燥后, 用无RNA酶水溶解RNA。检测RNA浓度及纯度(D_{260}/D_{280} 比值在1.8~2.0之间为合格)。取合格的总RNA, 按照逆转录试剂盒说明书反转录合成互补DNA(complementary DNA, cDNA)。以cDNA为模板进行RT-qPCR扩增, 设置 β -actin为内参基因, 每个样本设3个复孔。采用2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算目的基因($FDX1$ 、 $LIAS$ 、 $DLAT$ 、 DLD)的相对表达量。所用引物序列见表1。

1.2.11 细胞线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)检测 JC-1原液经双蒸水溶解后,

表1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因名称 Gene name	引物序列(5'→3') Primer sequences (5'→3')
<i>FDX1</i>	Forward: CAG TCC ACT TCA AGA ACC GAG ATG Reverse: GAT GAC AGG TAG AGC AAG CCA AAG
<i>LIAS</i>	Forward: ACA GTG TCA TGC TTG AAG GAA AGG Reverse: ATT CTG GAA CCG TCT CTA CAT TGT G
<i>DLAT</i>	Forward: GGT GTT CGT TAG CCC TCT TGC Reverse: TGT CCT TCT TGA TGA TTC TGC CTT C
<i>DLD</i>	Forward: CCA GGT GCT GGA GAA ATG GT Reverse: TGG TTT GCC AAA AGA CGC AG
β -actin	Forward: AGA TGA CCC AGA TCA TGT TTG AGA Reverse: CGG ACT CAT CGT ACT CCT GC

加入浓缩缓冲液配制成JC-1工作液, 现配现用; 取浓缩缓冲液, 加入双蒸水稀释得到 $1\times$ 染色缓冲液, 配制后置于冰上预冷备用。弃去培养液后, 加入JC-1工作液与培养液的1:1混合液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育20 min, 预冷 $1\times$ 染色缓冲液洗涤2次。分别于激发波长490 nm/发射波长530 nm和激发波长525 nm/发射波长590 nm条件下检测绿色荧光强度和红色荧光强度, 以红/绿荧光强度比值评估线粒体膜电位变化。

1.2.12 化学发光法检测细胞中的ATP含量 在冰浴条件下, 取 5×10^6 个细胞, 加入1 mL提取液并进行超声破碎; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $10\,000\times g$ 离心10 min, 收集上清液, 加入氯仿处理后再离心, 吸取上清液置于冰上待测。按说明书上的比例配制工作液, 将ATP标准品配制成 $0.625\text{ }\mu\text{mol/mL}$ 的标准溶液。将多功能酶标仪上的检测波长设置为340 nm, 对测定管、标准管依次进行加样; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应3 min, 分别读取反应前后的 D 值, 计算细胞中的ATP含量($\mu\text{mol}/10^6$ 个细胞)。

1.2.13 ELISA法检测细胞中PDHA1含量 细胞经裂解液裂解、离心($10\,000\sim 14\,000\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、3~5 min)后取上清液备测。试剂盒组分复温至 $20\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 浓缩洗涤液按1:20稀释, 校准品复溶后倍比稀释为梯度浓度。酶标板中加入50 μL 校准品或待测样本, 每孔加入100 μL 生物素抗体, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育60 min, 洗板5次后加入100 μL 辣根过氧化物酶标记的亲和素, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育20 min并再次洗板。各孔加入100 μL TMB显色液避光孵育15 min, 加入50 μL 终止液终止反应, 用酶标仪测定450 nm波长处的 D 值, 以四参数Logistic曲线拟合标准曲线, 计算样本中PDHA1浓度。

1.2.14 磺基水杨酸法检测细胞中CA含量 取 5×10^6 个细胞并加入1 mL提取液, 冰浴条件下超声破

碎后于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $12\,000\times g$ 离心10 min, 取上清液冰浴待测。试剂一、试剂二临用前用蒸馏水溶解, 将多功能酶标仪上的检测波长设置为470 nm, 按测定管、空白管依次加样并混匀, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min, 计算细胞柠檬酸含量($\text{mg}/10^4$ 个细胞)。

1.2.15 统计学处理 数据用平均值 $\pm$ 标准误(mean $\pm$ SEM)表示。采用Shapiro-Wilk检验来确定数据是否符合正态分布。若数据符合正态分布, 则两组间比较采用独立样本 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 事后多重比较采用Tukey法。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。所有统计分析均使用GraphPad Prism(version 9)软件进行。

2 结果

2.1 AII细胞的鉴定

采用免疫荧光染色法鉴定AII细胞的特异性标志物——SP-C。如图1所示, 荧光显微镜下可观察到: 细胞核被DAPI染成蓝色荧光, SP-C蛋白呈现绿色荧光, SP-C蛋白主要分布于细胞质中。上述染色结果证实, 本实验所用细胞为小鼠AII细胞。

2.2 CCK-8检测细胞H/R损伤的最佳时间点

CCK-8结果显示: 与Control组相比, AII细胞在H/R 0 min(缺氧6 h)时细胞活力下降($P<0.000\,1$); 与H/R 0 min相比, H/R 5 min(缺氧6 h/复氧5 min)时细胞活力显著下降($P<0.000\,1$)(图2)。故后续H/R模型的构建条件采用缺氧6 h/复氧5 min。

2.3 NaHS预处理浓度的筛选

为确定NaHS的最佳预处理浓度, 我们评估了不同浓度NaHS对AII细胞的毒性作用。CCK-8检测结果显示, $0\sim 3\,200\text{ }\mu\text{mol/L}$ NaHS处理正常细胞

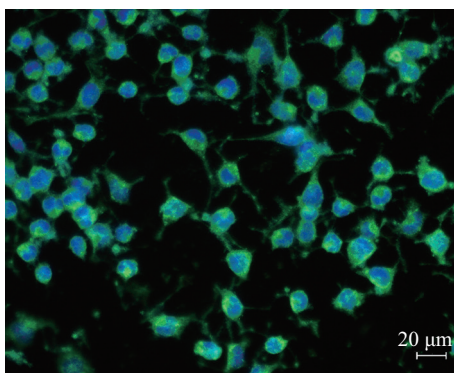
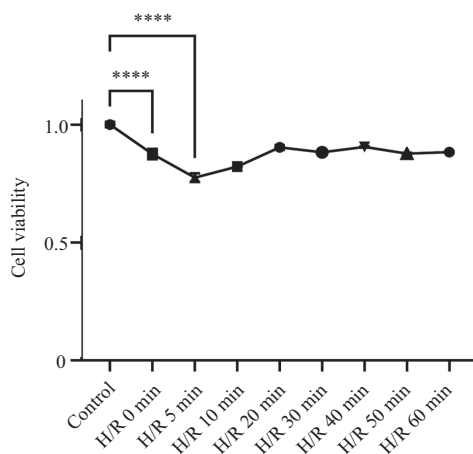


图1 肺泡II型上皮细胞鉴定图

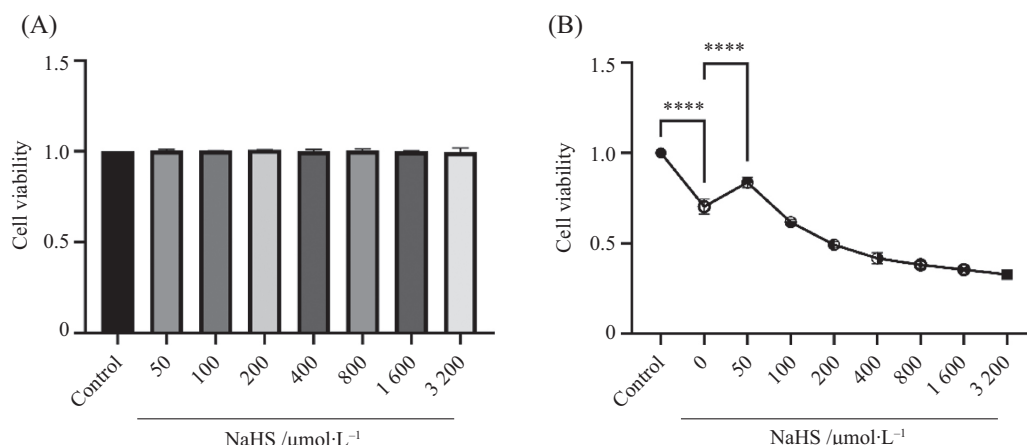
Fig.1 Identification of alveolar epithelial type II cells



$n=6$; **** $P<0.0001$.

图2 CCK-8检测不同复氧时间点对细胞活力的影响

Fig.2 Effects of different reoxygenation time points on cell viability were measured by CCK-8 assay



A: 不同浓度NaHS对正常ATII细胞活力的影响; B: 不同浓度NaHS预处理对H/R损伤ATII细胞活力的影响。 $n=6$; **** $P<0.0001$ 。

A: effects of different concentrations of NaHS on viability of normal ATII cells; B: effects of different concentrations of NaHS pretreatment on viability of ATII cells with H/R injury. $n=6$; **** $P<0.0001$.

图3 CCK-8检测不同浓度NaHS对ATII细胞活力的影响

Fig.3 The effects of different concentrations of NaHS on viability of ATII cells were measured by CCK-8 assay

24 h后, 各组细胞活力与Control组相比均无显著差异($P>0.05$, 图3A), 表明该浓度范围的NaHS对ATII细胞无明显细胞毒性。

进一步观察NaHS对H/R损伤后细胞活力的影响。结果显示, 与Control组相比, H/R组(即0 $\mu\text{mol/L}$ NaHS组)细胞活力显著下降($P<0.0001$)。与H/R组相比, 不同浓度NaHS预处理组中, 50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS恢复H/R损伤后细胞活力的效果最为显著($P<0.0001$, 图3B)。因此, 后续实验选用50 $\mu\text{mol/L}$ 作为NaHS的干预浓度。

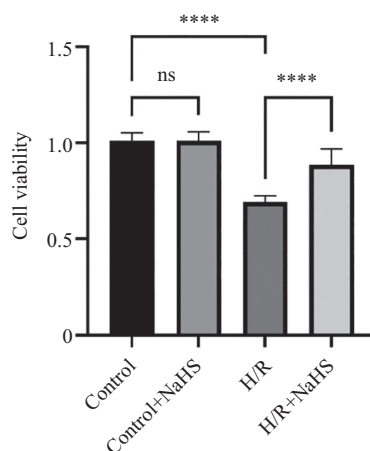
2.4 NaHS预处理对H/R诱导ATII损伤的保护作用

CCK-8检测结果(图4)显示: Control+NaHS组细胞活力与Control组相比差异无统计学意义($P>0.05$),

表明50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS对正常ATII细胞无毒性作用; 与Control组相比, H/R组细胞活力显著降低($P<0.0001$), 提示H/R处理成功诱导了ATII细胞损伤; 与H/R组相比, H/R+NaHS组细胞活力显著回升($P<0.0001$), 说明NaHS预处理可有效减轻H/R引起的ATII细胞损伤, 并发挥细胞保护效应。

2.5 NaHS预处理对H/R诱导的ATII细胞氧化应激反应的影响

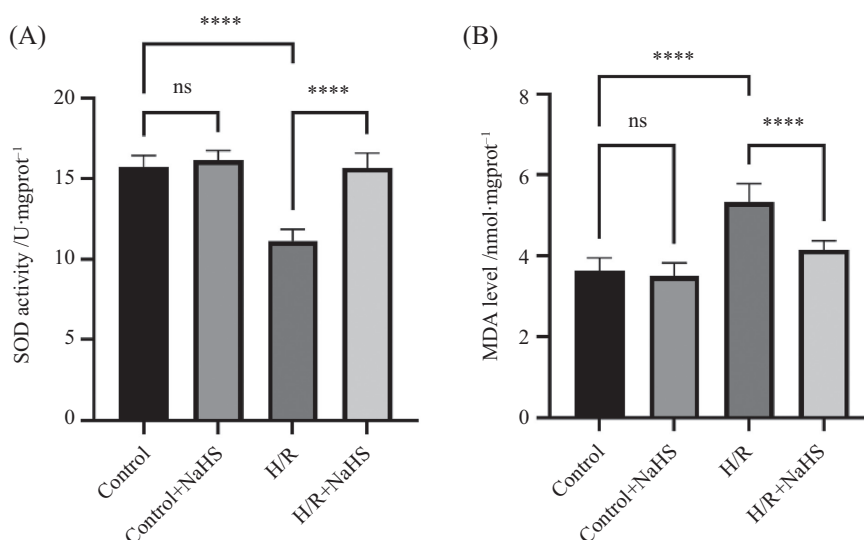
为评估NaHS预处理对H/R损伤后ATII细胞氧化应激水平的调节作用, 检测了各组细胞中SOD活力和MDA含量。结果(图5)显示: Control组与Control+NaHS组的SOD活力及MDA含量均无统计



$n=6$; $^{ns}P>0.05$, $^{****}P<0.0001$.

图4 各组ATII细胞活力变化统计图

Fig.4 Statistical plot of changes in ATII cell viability in each group



A: NaHS预处理对SOD活性的影响; B: NaHS预处理对MDA水平的影响。 $n=6$; $^{ns}P>0.05$, $^{****}P<0.0001$ 。

A: effect of NaHS pretreatment on SOD activity in each group; B: effect of NaHS pretreatment on MDA level in each group. $n=6$; $^{ns}P>0.05$, $^{****}P<0.0001$.

图5 各组ATII细胞SOD活力及MDA含量比较

Fig.5 Comparison of SOD activity and MDA content in ATII cells among groups

学差异($P>0.05$), 表明NaHS本身不干扰细胞的基础氧化还原状态; 与Control组相比, H/R组SOD活力显著降低, 同时MDA含量显著升高($P<0.0001$), 提示H/R处理导致ATII细胞氧化应激水平显著上升; 与H/R组相比, H/R+NaHS组SOD活力明显回升, MDA含量明显下降($P<0.0001$), 表明NaHS预处理可有效减轻H/R诱导的氧化应激反应。

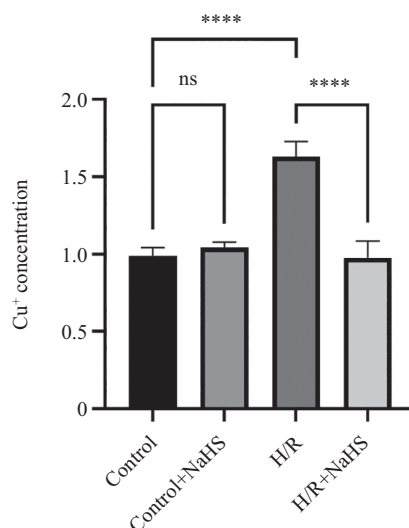
2.6 NaHS预处理对H/R诱导的ATII细胞内Cu⁺浓度的影响

采用Cu⁺特异性荧光探针检测各组ATII细胞内Cu⁺浓度。实验结果表明: Control组与Control+NaHS

组之间的Cu⁺浓度差异无统计学意义($P>0.05$), 说明50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS处理不影响正常ATII细胞内的Cu⁺水平; 与Control组相比, H/R组细胞内Cu⁺浓度显著升高($P<0.0001$), 提示H/R处理可导致ATII细胞内Cu⁺蓄积; 与H/R组相比, H/R+NaHS组细胞内Cu⁺浓度显著降低($P<0.0001$, 图6)。上述结果证实, H/R损伤可诱导ATII细胞内Cu⁺浓度升高, 而NaHS预处理可有效逆转这一变化, 减轻铜离子过载。

2.7 NaHS预处理对H/R诱导的ATII细胞中铜转运蛋白及铜死亡相关蛋白表达的影响

采用Western blot法检测各组ATII细胞中铜转



$n=6$; $^{ns}P>0.05$, $^{****}P<0.0001$.

图6 各组细胞中Cu⁺浓度的变化

Fig.6 Changes in Cu⁺ concentration in each group of cells

运蛋白(CTR1、ATP7A、ATP7B)及铜死亡相关蛋白(FDX1、LIAS、DLAT、DLST、DLAT寡聚体)的表达水平,结果如图7所示。

铜转运蛋白表达变化如下。与Control组相比,Control+NaHS组各蛋白表达水平均无显著差异($P>0.05$),表明NaHS本身不影响这些蛋白的基础表达。与Control组相比,H/R组CTR1表达水平显著升高($P<0.05$),而ATP7A及ATP7B表达水平显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。与H/R组相比,H/R+NaHS组CTR1表达水平显著下降($P<0.05$),ATP7A及ATP7B表达水平显著回升($P<0.01$ 或 $P<0.001$)。上述结果表明,H/R处理可诱导铜摄入量增加及铜外排量减少,而NaHS预处理可逆转这一失衡。

铜死亡相关蛋白表达变化如下。与Control组相比,H/R组FDX1、LIAS表达水平显著升高($P<0.01$),而DLAT及DLST表达水平显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),同时DLAT寡聚体表达水平显著升高($P<0.01$)。与H/R组相比,H/R+NaHS组FDX1、LIAS表达水平显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),DLAT及DLST表达水平显著回升($P<0.01$ 或 $P<0.0001$),DLAT寡聚体表达水平显著降低($P<0.05$)。以上结果提示,NaHS预处理可有效逆转H/R诱导的ATII细胞铜死亡通路相关分子事件的激活。

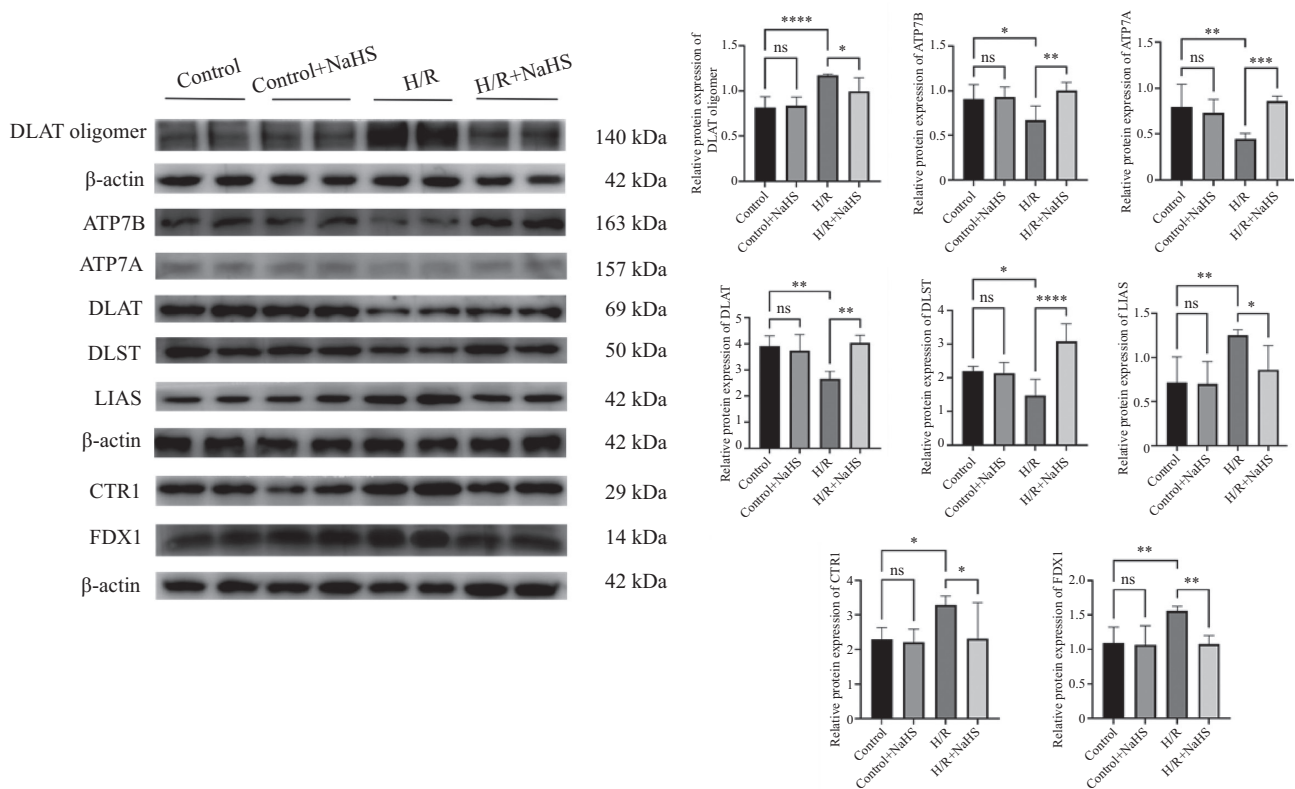
2.8 NaHS预处理对H/R诱导的ATII细胞中铜死亡相关基因表达的影响

RT-qPCR检测结果(图8)显示:Control组与

Control+NaHS组之间各基因表达水平均无显著差异($P>0.05$)。与Control组相比,H/R组FDX1和LIAS的mRNA表达水平升高($P<0.01$),DLAT和DLST的mRNA表达水平降低($P<0.0001$)。与H/R组相比,H/R+NaHS组FDX1和LIAS的mRNA表达水平降低($P<0.05$ 或 $P<0.0001$),DLAT和DLST的mRNA表达水平升高($P<0.001$ 或 $P<0.0001$)。该结果与Western blot结果(图7)一致,表明NaHS预处理可逆转H/R诱导的ATII细胞铜死亡通路相关分子事件的激活。

2.9 NaHS预处理对H/R诱导的ATII细胞中FDX1和DLAT蛋白表达的影响

采用免疫荧光染色法检测各组ATII细胞中FDX1和DLAT蛋白的表达水平及分布情况,结果如图9所示。Control组与Control+NaHS组相比,FDX1和DLAT的绿色荧光强度均无显著差异($P>0.05$),表明50 $\mu\text{mol/L}$ NaHS处理不影响这两种蛋白的基础表达水平。与Control组相比,H/R组FDX1的绿色荧光强度显著增强($P<0.001$),而DLAT的绿色荧光强度显著减弱($P<0.01$),提示H/R处理可诱导FDX1表达上调及DLAT表达下调。与H/R组相比,H/R+NaHS组FDX1的绿色荧光强度显著减弱($P<0.05$),而DLAT的绿色荧光强度显著增强($P<0.01$),表明NaHS预处理可逆转H/R诱导的FDX1表达上调和DLAT表达下调。上述免疫荧光结果与Western blot检测结果(图7)相一致,进一步证实NaHS预处理可逆转H/R诱导的ATII细胞铜死亡通路相关分子事件的激活。



$n=6$; $^{ns}P>0.05$, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$, $^{****}P<0.0001$.

图7 各组细胞中铜转运蛋白以及铜死亡相关蛋白的表达变化

Fig.7 Changes in the expression of copper transporters proteins and cuproptosis related proteins in each group of cells

2.10 NaHS预处理对H/R诱导的ATII细胞线粒体功能的影响

采用JC-1探针检测线粒体膜电位(MMP),同时检测细胞内ATP含量,结果如图10所示。Control组与Control+NaHS组之间MMP水平及ATP含量均无显著差异($P>0.05$),表明NaHS本身不影响ATII细胞的线粒体功能。与Control组相比,H/R组MMP水平及ATP含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.0001$),提示H/R处理可导致ATII细胞线粒体膜电位下降及能量代谢障碍。与H/R组相比,H/R+NaHS组MMP水平及ATP含量均显著回升($P<0.01$ 或 $P<0.0001$),表明NaHS预处理可有效减轻H/R诱导的线粒体功能损伤。

2.11 NaHS预处理对H/R诱导的ATII细胞三羧酸循环相关指标的影响

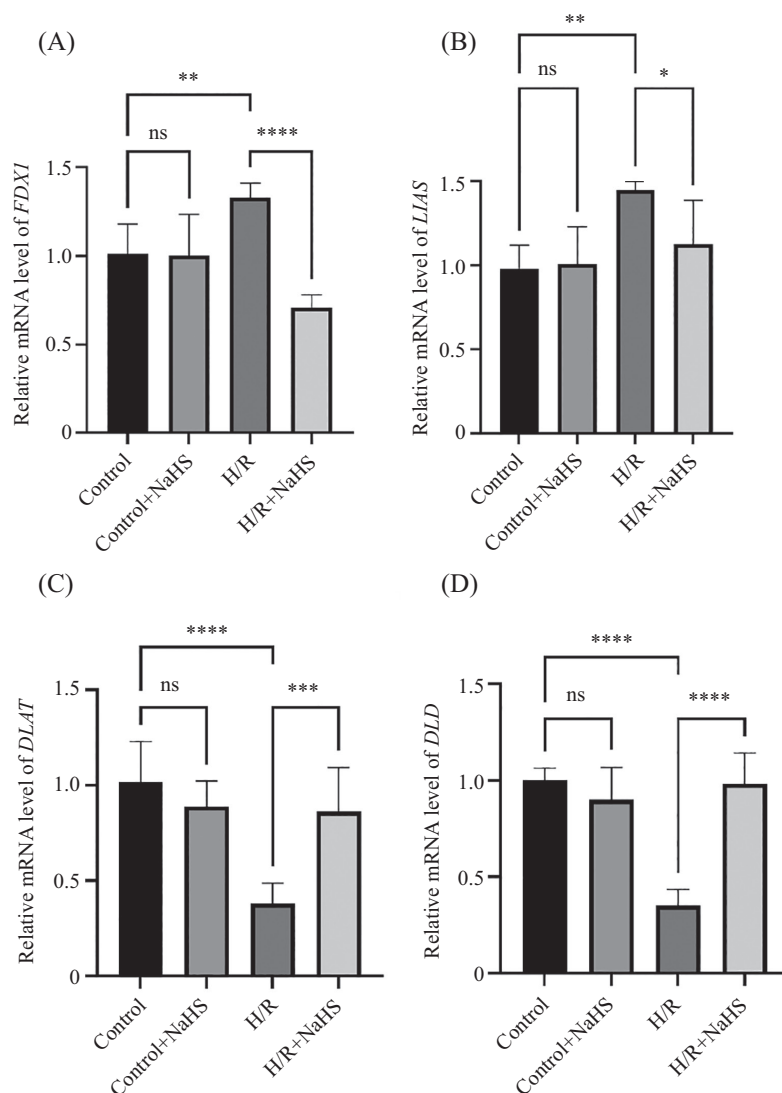
采用ELISA法检测各组ATII细胞中PDHA1和CA含量,结果如图11所示。Control组与Control+NaHS组的PDHA1和CA含量均无显著差异($P>0.05$)。与Control组相比,H/R组的PDHA1和CA含量均显著降低($P<0.0001$),提示三羧酸循环中间代谢物池萎缩,这可

能与PDHC功能受损有关。与H/R组相比,NaHS+H/R组的PDHA1和CA含量均显著回升($P<0.0001$),表明NaHS预处理可部分恢复PDHA1和CA含量。

3 讨论

ATII细胞是维持肺泡结构和功能完整性的关键细胞群体,在生理状态下通过分泌肺表面活性物质降低肺泡表面张力,在肺损伤发生时能够增殖分化并参与受损肺泡上皮的修复与再生^[7],因此其功能状态直接决定了急性肺损伤与I/R损伤的转归与预后。本研究采用RLE-6TN大鼠ATII细胞系建立H/R模型,SP-C免疫荧光检测证实该细胞为ATII细胞。通过预实验筛选,本研究采用缺氧6 h/复氧5 min为本研究的H/R处理条件,此时细胞活力显著下降,SOD活性降低、MDA含量升高,表明模型构建成功且伴随明显的氧化应激反应。

铜死亡是2022年由Tsvetkov等^[8]在*Science*杂志上首次定义的一种新型调节性细胞死亡方式,其分子机制与已知的凋亡、坏死、自噬、铁死亡等截然不同。



A: 各组ATII细胞中*FDX1* mRNA的相对表达量; B: 各组ATII细胞中*LIAS* mRNA的相对表达量; C: 各组ATII细胞中*DLAT* mRNA的相对表达量; D: 各组ATII细胞中*DLD* mRNA的相对表达量。n=6; ^{ns}P>0.05, *P<0.01, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001。

A: relative expression of *FDX1* mRNA in ATII cells of each group; B: relative expression of *LIAS* mRNA in ATII cells of each group; C: relative expression of *DLAT* mRNA in ATII cells of each group; D: relative expression of *DLD* mRNA in ATII cells of each group. n=6; ^{ns}P>0.05, *P<0.01, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

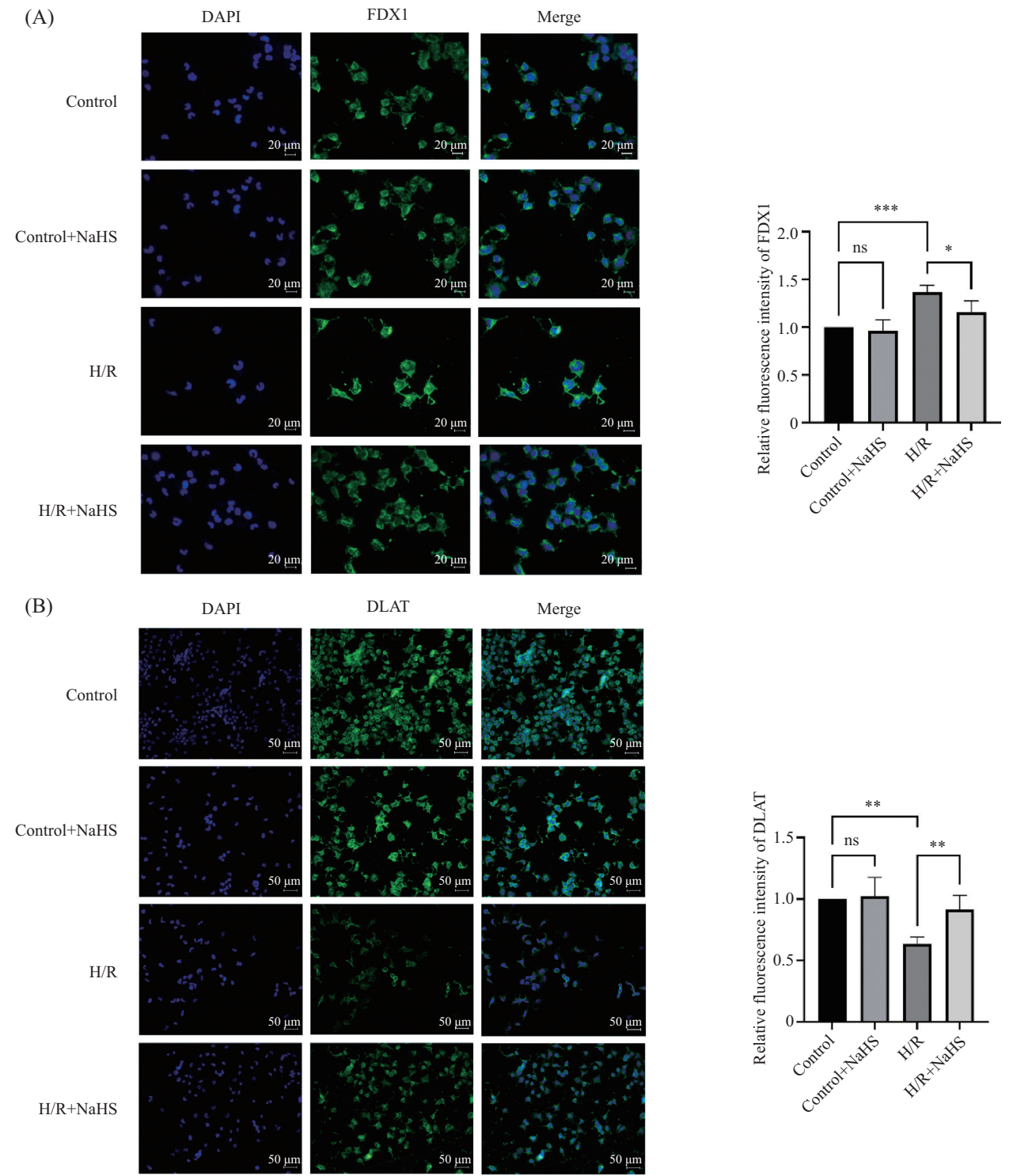
图8 各组ATII细胞中铜死亡相关基因(*FDX1*、*LIAS*、*DLAT*、*DLD*)的mRNA表达水平

Fig.8 mRNA expression levels of cuproptosis-related genes (*FDX1*, *LIAS*, *DLAT*, *DLD*) in ATII cells among groups

与铁死亡依赖脂质过氧化不同,铜死亡的核心驱动因素是铜离子与三羧酸循环中脂酰化蛋白的直接结合。深入理解铜死亡的分子机制,对于解释本研究结果至关重要。细胞内铜离子的稳态受到严格调控,铜摄入主要依赖细胞膜上的CTR1^[18],而铜外排则由ATP7A和ATP7B介导^[19]。本研究发现,H/R处理后ATII细胞中的CTR1表达显著上调,而ATP7A和ATP7B表达显著下调,这种“摄入量增加、外排量减少”的双重改变导致细胞内Cu⁺水平升高。值得注意的是,铜死亡的发生依赖于Cu⁺而非Cu²⁺,因为Cu⁺具有更强的氧化还

原活性和蛋白结合能力,Tsvetkov等^[8]的研究证实Cu⁺是直接与脂酰化蛋白结合的活性形式。综合上述铜代谢相关分子改变,本研究的结果提示H/R处理可激活ATII细胞中铜死亡相关分子通路。

FDX1是铜死亡通路中的关键上游调控分子^[8],其功能具有双重性:一方面可将Cu²⁺还原为Cu⁺,为铜离子与靶蛋白结合提供活性形式;另一方面可调控脂酰化蛋白的合成,FDX1的缺失可使细胞对铜死亡产生抵抗,而FDX1过表达则可增强细胞对铜的敏感性。本研究一个重要的发现是,H/R处理后FDX1

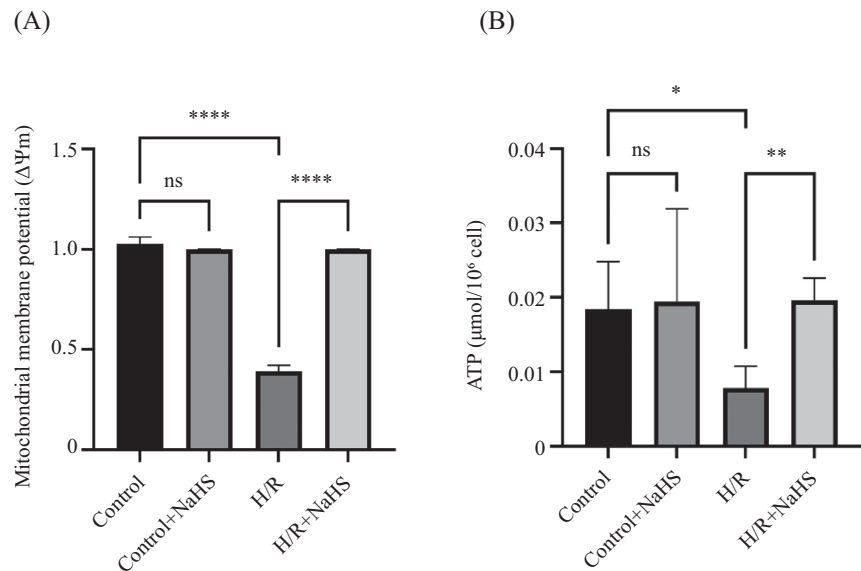


A: FDX1的相对荧光强度(绿); B: DLAT的相对荧光强度(绿)。n=4; ^{ns}P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。
A: relative fluorescence intensity of FDX1 (green); B: relative fluorescence intensity of DLAT (green). n=4; ^{ns}P>0.05, *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

图9 各组ATII中FDX1、DLAT的免疫荧光染色情况
Fig.9 Immunofluorescence staining of FDX1 and DLAT in ATII cells of each group

在蛋白和mRNA水平均显著上调, 这一结果与Tsvetkov等^[8]报道的铜死亡模型中FDX1表达变化趋势一致。在H/R应激条件下, ATII细胞中FDX1表达上调

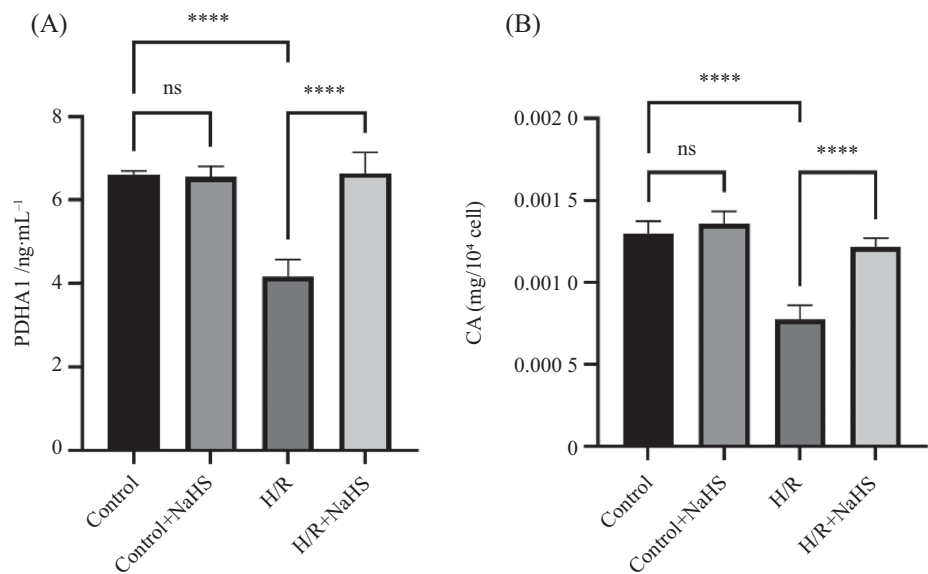
可能作为一种促死亡信号, 通过促进Cu⁺的生成和脂酰化蛋白的合成, 使细胞处于“铜死亡易感状态”。
脂酰化是一种高度保守的赖氨酸共价修饰, 仅



A: MMP水平; B: ATP含量。n=4; ^{ns}*P*>0.05, **P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.000 1。
A: MMP level; B: ATP content. n=4; ^{ns}*P*>0.05, **P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.000 1.

图10 各组A7II细胞中MMP水平及ATP含量比较

Fig.10 Comparison of MMP level and ATP content in A7II cells among groups



A: PDHA1含量; B: CA含量。n=4; ^{ns}*P*>0.05, *****P*<0.000 1。
A: PDHA1 content; B: CA content. n=4; ^{ns}*P*>0.05, *****P*<0.000 1.

图11 各组A7II细胞中PDHA1及CA含量比较

Fig.11 Comparison of PDHA1 and CA contents in A7II cells among groups

存在于三羧酸循环中的4个关键酶, 其中DLAT是丙酮酸脱氢酶复合物的核心亚基, 对细胞能量代谢至关重要^[20]。在本研究中, H/R处理后DLAT和DLST的表达均显著下调。值得注意的是, 我们平行使用含DTT的还原性上样缓冲液和不含DTT的非还原性上样缓冲液处理等量细胞裂解物, 并在相同SDS-PAGE凝胶体系中分别检测DLAT的两种存在状态。还原性Western

blot用于检测可溶性DLAT的总量, 非还原性Western blot用于检测SDS抗性的DLAT寡聚体/聚集体。结果显示, H/R处理后可溶性DLAT水平显著下降, 而DLAT寡聚体形成量显著增加。这一“可溶性池消耗-聚集体池积累”的模式并非逻辑矛盾, 而是铜死亡相关通路激活的特征性表现: Cu⁺与DLAT脂酰化位点结合可诱导DLAT发生异常聚集, 形成对SDS和还原剂均稳

定的聚集体,促使可溶性DLAT向不溶性聚集池转移。 Cu^+ 与DLAT脂酰化位点直接结合可诱导DLAT发生构象改变,形成寡聚体与高阶寡聚体,进而造成PDHC结构解聚、整体功能受损。DLAT是PDHC的关键骨架亚基,DLAT异常寡聚会破坏复合物完整性,进一步引起复合体核心组分PDHA1稳定性下降、发生降解,最终表现为PDHA1蛋白含量降低。PDHA1作为丙酮酸脱氢酶复合物的催化亚基^[21],其功能受损可直接阻断丙酮酸向乙酰辅酶A转化,乙酰辅酶A供给不足使三羧酸循环起始底物匮乏,进而造成胞内CA等三羧酸循环中间产物含量显著下降。本研究中PDHA1蛋白水平与CA含量的降低,提示三羧酸循环中间代谢物池的萎缩,这可能与PDHC功能受损有关,表明再灌注早期铜离子失衡启动上述级联扰动,干扰线粒体三羧酸循环稳态。

由于三羧酸循环是细胞产生NADH和FADH₂的主要途径,而NADH和FADH₂是线粒体电子传递链的电子供体^[22],因此在代谢物池萎缩及PDHC功能受损的情况下,电子传递链功能可能受损,进而影响线粒体膜电位的维持和ATP的合成。本研究中JC-1染色结果显示H/R组线粒体膜电位显著下降,ATP含量也显著降低,与上述机制分析高度吻合。

H₂S是体内重要的气体信号分子,其细胞保护作用已被广泛证实。研究表明,H₂S可与肿瘤细胞中的Cu²⁺特异性结合,降低超氧化物歧化酶1活性,从而调控氧化还原状态^[23];亦可增强Cu/Zn-SOD活性,减轻缺氧心肌细胞中由铜离子水平下降引发的氧化应激^[24]。上述证据提示,H₂S可能通过多条途径调控铜离子稳态。本研究发现,NaHS预处理可显著下调H/R诱导的CTR1高表达,同时上调ATP7A和ATP7B的表达,这种“双管齐下”的调节作用有效地恢复了铜代谢稳态,使细胞内Cu⁺水平显著降低。与团队前期研究发现的H₂S通过抑制HK2-NLRP3-GSDMD通路减轻ATII细胞焦亡^[9]不同,本研究进一步揭示H₂S可能通过恢复铜代谢稳态、抑制DLAT异常聚集,降低铜死亡相关通路的活化水平。两项研究共同提示H₂S在ATII H/R损伤中通过“抗氧化+多通路”调控,发挥综合性保护作用。

本研究中最为核心的发现之一是,NaHS预处理可显著下调H/R诱导的FDX1过表达。FDX1表达的下调意味着Cu²⁺还原为Cu⁺的过程受到抑制,这是降低细胞内Cu⁺水平的关键上游机制。同时,FDX1表达下调可减弱其对脂酰化蛋白合成的促进效应,进

而降低铜死亡通路的活化水平。值得注意的是,本研究中NaHS同时上调了DLAT、DLST的表达,这提示NaHS对铜死亡通路相关蛋白存在差异化调控效应:一方面下调铜死亡通路正向调控分子FDX1的表达,另一方面可恢复受抑的脂酰化蛋白的表达。这种调节模式体现了H₂S作为信号分子的精细调控能力。本研究中最为直接的保护证据是NaHS显著减少了H/R诱导的DLAT寡聚体形成,提示NaHS可能阻断了Cu⁺与DLAT的结合。免疫荧光结果同样证实H/R+NaHS组DLAT荧光强度较H/R组显著增强,与Western blot结果一致。

线粒体是铜死亡的主要效应器部位,也是H₂S发挥保护作用的重要靶点。在本研究中,NaHS预处理显著改善了H/R诱导的线粒体功能障碍:JC-1红/绿荧光比值显著升高,表明线粒体膜电位得到部分恢复;ATP含量显著升高,表明能量代谢得到改善;PDHA1和CA含量显著升高,提示NaHS预处理可部分恢复PDHA1蛋白水平及CA含量,改善线粒体功能;但三羧酸循环通量是否真正恢复仍有待进一步验证。线粒体是细胞能量代谢的中心,也是细胞死亡信号的整合平台,NaHS对线粒体保护作用是其抑制铜死亡相关通路、最终维持细胞存活的关键环节。

本研究发现H/R组SOD活性显著降低、MDA含量显著增加,表明氧化应激在H/R损伤中扮演重要角色。铜离子与氧化应激之间存在复杂的双向关系:一方面,过量的铜可通过Fenton样反应催化ROS生成^[25];另一方面,ROS可影响铜转运蛋白的活性,进一步加剧铜代谢紊乱^[26],这种正反馈循环可能加速了铜死亡的进程。NaHS本身具有抗氧化作用,本研究中H/R+NaHS组SOD活力显著升高、MDA含量显著降低。NaHS的抗氧化效应与其抑制铜死亡之间存在协同关系:一方面NaHS通过清除ROS直接减轻氧化应激损伤,另一方面NaHS通过降低Cu⁺水平减少Cu⁺介导的ROS的催化生成^[6]。NaHS同时抑制了氧化应激和铜死亡,其保护作用的广度可能优于单一通路的特异性抑制剂。

综上所述,H/R可诱导大鼠ATII激活铜死亡相关分子通路,其分子事件涉及铜代谢紊乱、细胞内Cu⁺蓄积、FDX1和LIAS表达上调、DLAT和DLST表达下调、DLAT寡聚体形成量增加、三羧酸循环中间代谢物池萎缩及线粒体功能障碍;而外源性H₂S供体NaHS可通过恢复铜代谢稳态、下调FDX1和LIAS表达、上

调DLAT和DLST表达、抑制DLAT异常聚集, 保护线粒体功能, 从而抑制铜死亡相关通路, 减轻ATII的H/R损伤。本研究为急性肺损伤和I/R损伤的防治提供了新的理论依据和潜在的干预靶点。

然而本研究仍存在若干局限性。首先, 实验仅采用体外ATII细胞(RLE-6TN) H/R模型开展机制探究, 体外细胞体系脱离体内复杂微环境, 相关结论有待通过动物肺I/R模型进一步验证。体外ATII细胞实验仅采用复氧5 min单一时间点, 聚焦再灌注极早期通路启动事件, 无法反映持续复氧条件下完整的铜死亡进程, 存在机制解读偏倚。其次, 本课题未利用基因干预验证关键分子的功能必要性。最后, 三羧酸循环通量的确切变化有待¹³C-代谢流分析进一步验证。后续将设置多梯度复氧时间, 对比不同刺激时长下铜死亡通路的动态变化; 并结合基因编辑策略, 进一步明确H₂S发挥保护作用的特异性靶点。

参考文献 (References)

- [1] Liu H Q, Wang Z C, Qiu T, et al. Dexmedetomidine alleviates lung ischemia-reperfusion injury by inhibiting cuproptosis: an *in vivo* study [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2025, 16: 1562535.
- [2] Zhang Y H, Zhou Y M, Wang J, et al. Unlocking alveolar regeneration: AT2 stem cells, signaling networks, and therapeutic frontiers [J]. *Stem Cell Reviews and Reports*, 2026, 22(4): 1568-1582.
- [3] Li J W, Guan H, Miao P, et al. OXCT1-induced succinylation at K81 shields HADH from HSPA8-mediated degradation in alveolar epithelial cells to attenuate lung ischemia-reperfusion injury [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2026, 249: 43-59.
- [4] Jiang T, Yang W W, Zhang H L, et al. Hydrogen sulfide ameliorates lung ischemia-reperfusion injury through SIRT1 signaling pathway in type 2 diabetic rats [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 596.
- [5] 王肖婷, 骆珍珍, 徐俊鹏, 等. 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 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2024, 46(7): 1419-1431.
Wang X T, Luo Z Z, Xu J P, et al. Mechanism of hydrogen sulfide in improving hypoxia/reoxygenation injury in rat alveolar epithelial cell type II [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2024, 46(7): 1419-1431.
- [6] Jiang L, Lu Q Y, Gong E M, et al. A self-driving and self-reporting petal-like Au-Cu₂O metalloenzyme for probing H₂S-mediated cuproptosis [J]. *ACS Nano*, 2026, 20(12): 10151-10162.
- [7] Festa R A, Thiele D J. Copper: an essential metal in biology [J]. *Current Biology*, 2011, 21(21): R877-R883.
- [8] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins [J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254-1261.
- [9] Xie J M, Yang Y N, Gao Y B, et al. Cuproptosis: mechanisms and links with cancers [J]. *Molecular Cancer*, 2023, 22(1): 46.
- [10] Huang M, Zhang Y, Liu X H. The mechanism of cuproptosis in Parkinson's disease [J]. *Ageing Research Reviews*, 2024, 95: 102214.
- [11] Bibli S I, Yang G D, Zhou Z M, et al. Role of cGMP in hydrogen sulfide signaling [J]. *Nitric Oxide*, 2015, 46: 7-13.
- [12] Katsouda A, Bibli S I, Pyriochou A, et al. Regulation and role of endogenously produced hydrogen sulfide in angiogenesis [J]. *Pharmacological Research*, 2016, 113(Pt A): 175-185.
- [13] Lo Faro M L, Fox B, Whatmore J L, et al. Hydrogen sulfide and nitric oxide interactions in inflammation [J]. *Nitric Oxide*, 2014, 41: 38-47.
- [14] 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*, 2021, 37(10): 1822-1827.
Zhou Z L, Liu X J, Wang X Y, et al. Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in hypoxia/reoxygenation injury of rat type II alveolar epithelial cells [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2021, 37(10): 1822-1827.
- [15] 刘秀洁, 王新雨, 宋正阳, 等. 细胞自噬在大鼠II型肺泡上皮细胞低氧/复氧损伤中的作用 [J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(10): 1440-1445.
Liu X J, Wang X Y, Song Z Y, et al. Role of autophagy in hypoxia-reoxygenation-induced injury of rat alveolar epithelial cell type II [J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2021, 41(10): 1440-1445.
- [16] 高慧, 周卓琳, 楼国强, 等. 维甲酸X受体对缺氧/复氧诱导的大鼠肺泡II型上皮细胞自噬的调控作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(10): 1825-1832.
Gao H, Zhou Z L, Lou G Q, et al. Role of retinoic acid X receptor in regulation of autophagy in rat alveolar type II epithelial cells induced by hypoxia/reoxygenation [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2020, 36(10): 1825-1832.
- [17] Nanhan A N, Brownfield D G, Harbury P B, et al. Single-cell Wnt signaling niches maintain stemness of alveolar type 2 cells [J]. *Science*, 2018, 359(6380): 1118-1123.
- [18] Mason K E. A conspectus of research on copper metabolism and requirements of man [J]. *Journal of NutriLife*, 1979, 109(11): 1979-2066.
- [19] Palmgren M G, Nissen P. P-type ATPases [J]. *Annual Review of Biophysics*, 2011, 40: 243-266.
- [20] Rowland E A, Snowden C K, Crisyea I M. Protein lipoylation: an evolutionarily conserved metabolic regulator of health and disease [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2018, 42: 76-85.
- [21] Li W, Long Q, Wu H, et al. Nuclear localization of mitochondrial TCA cycle enzymes modulates pluripotency via histone acetylation [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 7414.
- [22] Martínez-Reyes I, Chandel N S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 102.
- [23] Mantle D, Yang G D. Hydrogen sulfide and metal interaction: the pathophysiological implications [J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2022, 477(9): 2235-2248.
- [24] Sun W H, Liu F, Chen Y, et al. Hydrogen sulfide decreases the levels of ROS by inhibiting mitochondrial complex IV and increasing SOD activities in cardiomyocytes under ischemia/reperfusion [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 421(2): 164-169.
- [25] Husain N, Mahmood R. Copper(II) generates ROS and RNS, impairs antioxidant system and damages membrane and DNA in human blood cells [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(20): 20654-20668.
- [26] Tsang T, Davis C I, Brady D C. Copper biology [J]. *Current Biology*, 2021, 31(9): R421-R427.