

大黄酚对H₂O₂诱导EA.hy926细胞凋亡的改善作用及其机制

李思琪^{1,2}, 陈广道³, 曾其毅²

(1. 暨南大学粤港澳中枢神经再生研究院神经生物学系, 广东 广州 510632; 2. 南方医科大学珠江医院儿科, 广东 广州 510282; 3. 广东省妇幼保健院儿科, 广东 广州 511400)

[摘要] **目的:** 探讨大黄酚对过氧化氢(H₂O₂)诱导EA.hy926细胞氧化损伤的作用, 并阐明其对支气管肺发育不良(BPD)的治疗作用及其相关机制。**方法:** 分别采用25、50、100、200、400、800和1 600 μmol·L⁻¹ H₂O₂及0、8、16、32、64、128和256 μmol·L⁻¹大黄酚诱导EA.hy926细胞, CCK-8法检测不同浓度H₂O₂和大黄酚处理后EA.hy926细胞活性。将细胞分为对照组、模型组(200 μmol·L⁻¹ H₂O₂)、低剂量大黄酚组(8 μmol·L⁻¹大黄酚和200 μmol·L⁻¹ H₂O₂)和高剂量大黄酚组(256 μmol·L⁻¹大黄酚和200 μmol·L⁻¹ H₂O₂)。Western blotting法检测各组细胞质和细胞核中凋亡诱导因子(AIF)蛋白表达水平, 免疫荧光法检测各组细胞AIF核转位情况, 试剂盒检测各组细胞中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶(Caspase)-8及Caspase-9水平。**结果:** 不同浓度H₂O₂作用下, EA.hy926细胞呈倒置S形细胞活性曲线, 细胞活性良好, 半数抑制浓度(IC₅₀)为261.52 μmol·L⁻¹, 采用200 μmol·L⁻¹ H₂O₂干预24 h诱导建立细胞模型。随着大黄酚药物浓度升高, EA.hy926细胞活性无明显变化(P>0.05), 采用8和256 μmol·L⁻¹大黄酚进行细胞干预。Western blotting法检测, 与对照组比较, 模型组细胞核中AIF蛋白表达水平明显升高(P<0.05), 细胞质中AIF蛋白表达水平明显降低(P<0.05); 与模型组比较, 低和高剂量大黄酚组细胞核中AIF蛋白表达水平均明显降低(P<0.05), 细胞质中AIF蛋白表达水平均明显升高(P<0.05)。免疫荧光法检测, 对照组细胞AIF定位于细胞核内较少; 与对照组比较, 模型组细胞AIF核转位阳性值明显升高(P<0.05); 与模型组比较, 低和高剂量大黄酚组细胞AIF核转位阳性值均明显降低(P<0.05)。与对照组比较, 模型组细胞中SOD活性明显降低(P<0.05), MDA水平明显升高(P<0.01); 与模型组比较, 低和高剂量大黄酚组细胞中SOD活性均明显升高(P<0.05), MDA水平均明显降低(P<0.05或P<0.01); 各组细胞中Caspase-8和Caspase-9水平比较差异均无统计学意义(P>0.05)。**结论:** 大黄酚通过抑制氧化应激和AIF核转位改善H₂O₂诱导的EA.hy926细胞凋亡, 有助于治疗BPD。

[关键词] 大黄酚; 支气管肺发育不良; 凋亡诱导因子; 核转位; 细胞凋亡; 氧化应激

[中图分类号] R725.6 **[文献标志码]** A

Improvement effect of chrysophanol on hydrogen peroxide-induced apoptosis of EA.hy926 cells and its mechanism

LI Siqi^{1,2}, CHEN Guangdao³, ZENG Qiyi²

(1. Department of Neurobiology, Guangdong-Hong Kong-Macau Institute of Central Nervous System Regeneration, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Department of Pediatrics, Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282, China; 3. Department of Pediatrics, Women

[收稿日期] 2023-12-01

[基金项目] 广东省中医药局科研项目(20212020)

[作者简介] 李思琪(1997—), 女, 广东省佛山市人, 在读博士研究生, 主要从事儿科危重症疾病基础和临床方面的研究。

[通信作者] 陈广道, 主任医师, 硕士研究生导师(E-mail: doctor_cgd79@126.com);

曾其毅, 主任医师, 博士研究生导师(E-mail: zqy_88@aliyun.com)

and Children's Hospital, Guangdong Province, Guangzhou 511400, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the effect of chrysophanol on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative damage of the EA.hy926 cells, and to clarify its therapeutic role in bronchopulmonary dysplasia (BPD) and related mechanism. **Methods:** The EA.hy926 cells were induced with 25, 50, 100, 200, 400, 800, and 1 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂, and 8, 16, 32, 64, 128, and 256 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chrysophanol. CCK-8 method was used to detect the viabilities of the EA.hy926 cells treated with different concentrations of H₂O₂ and chrysophanol. The cells were divided into control group, model group (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂), low dose of chrysophanol group (8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chrysophanol and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂), and high dose of emodin group (256 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chrysophanol and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂). Western blotting method was used to detect the expression levels of apoptosis-inducing factor (AIF) protein in the cytoplasm and nucleus in various groups; immunofluorescence staining was used to detect the AIF nuclear translocation in the cells in various groups; kits were used to detect the activities of superoxide dismutase (SOD) and the levels of malondialdehyde (MDA), cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase)-8, and Caspase-9 in the cells in various groups. **Results:** Under different concentrations of H₂O₂, the viabilities of EA.hy926 cells showed an inverted S-shaped curve, with good cell viability, and the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was 261.52 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The cell model was induced by 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂ for 24 h. As the increasing of concentration of chrysophanol, there was no significant change of the viability in the EA.hy926 cells ($P > 0.05$), and interventions were performed using 8 and 256 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ chrysophanol. The Western blotting results showed that compared with control group, the expression level of AIF protein in the nucleus in model group was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression level of AIF protein in the cytoplasm was significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the expression levels of AIF protein in the nucleus in both low and high doses of chrysophanol groups were significantly decreased ($P < 0.05$), and the expression level of AIF protein in the cytoplasm was significantly increased ($P < 0.05$). The immunofluorescence staining results showed that AIF was less localized in the nucleus in the cells in control group. Compared with control group, the positive value of AIF nuclear translocation in model group was significantly increased ($P < 0.05$); compared with model group, the positive values of AIF nuclear translocation in both low and high doses of chrysophanol groups were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with control group, the activity of SOD in the cells in model group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the level of MDA was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the activities of SOD in the cells in low and high doses of chrysophanol groups were significantly increased ($P < 0.05$), and the level of MDA was significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There were no significant differences in the levels of Caspase-8 and Caspase-9 in the cells among various groups ($P > 0.05$). **Conclusion:** Chrysophanol improves the H₂O₂-induced apoptosis of the EA.hy926 cells by inhibiting the oxidative stress and AIF nuclear translocation, which may be beneficial for the treatment of BPD.

KEYWORDS Chrysophanol; Bronchopulmonary dysplasia; Apoptosis-inducing factor; Nuclear translocation; Apoptosis; Oxidative stress

支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 是威胁早产儿生命的常见慢性呼吸系统疾病, 可以导致反复住院并引起多种后遗症, 严重影响患儿生活质量, 远期影响甚至可能持续至青春期和成年期, 给患儿、家庭和社会带来巨大的经济和心理负担^[1]。研究^[2]显示: 经典型 BPD 发病率已明显降低, 然而新型 BPD 发病率呈

上升趋势。不同于以肺部感染及炎症、肺纤维化和氧化应激为特征的经典型 BPD, 新型 BPD 以肺泡结构简化、毛细血管形态畸形、间质细胞变化和纤维增生为主要特征。目前, BPD 的潜在发病机制及其具体病因尚未完全阐明, 仍然缺乏有效的治疗手段和干预药物, 是全球性的妇幼重点健康问题^[1]。

生命早期高浓度氧暴露是最终导致 BPD 的独立

危险因素^[3]。氧化应激在高氧诱导的肺泡上皮细胞和血管内皮细胞损伤中发挥重要作用,细胞凋亡过度是氧化应激导致肺泡上皮细胞和血管内皮细胞损伤的重要机制之一^[4]。研究^[5]发现:肺泡上皮细胞和血管内皮细胞过度凋亡是BPD的重要组织学特点,肺组织凋亡细胞数随高氧暴露时间延长而明显增加。新型BPD病理损伤明显减轻,因此内源性凋亡途径激活可能在新型BPD的发生发展中发挥重要作用,凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)核转位是内源性凋亡通路激活的标志^[6-7]。当机体处于高氧刺激下,活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生增加和线粒体通透性转变孔开放,致使线粒体内膜电位丧失、基质肿胀及外膜破裂, AIF由线粒体释放并向细胞核转移,启动细胞凋亡程序。

大黄是我国传统中草药,已证实有助于治疗BPD^[8-9]。蒽醌类化合物是大黄的主要有效化学成分,其中大黄酚结构较为简单,可由此合成其他蒽醌类化合物^[10]。研究^[11]显示:大黄酚可以减轻肺损伤,但大黄酚改善BPD的临床疗效及其作用机制尚未完全阐明。因此本研究以人脐静脉内皮细胞株EA.hy926通过过氧化氢(hydrogen peroxide solution, H₂O₂)诱导其凋亡建立高氧损伤模型,探讨大黄酚治疗对EA.hy926高氧损伤细胞模型AIF核转位及氧化应激的影响,旨在为BPD的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人脐静脉内皮细胞株EA.hy926(CL-0272)购自武汉普诺赛生命科技公司。H₂O₂溶液(CAS: 7722-84-1)、大黄酚粉(CAS: 481-74-3)、N-N-二甲基乙酰胺(CAS: 127-19-5)和聚山梨酯80(CAS: 9005-65-6)均购自上海阿拉丁生化科技公司,胰蛋白酶(25200056)和DMEM培养基(12100046)均购自美国Gibico公司,胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(FSP500)购自上海依科赛生物尔科技公司,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶(cysteinyI aspartate specific proteinase, Caspase)-8活性检测试剂盒、Caspase-9活性检测试剂盒、Hoechst染色试剂盒、细胞核蛋白和细胞浆蛋白抽提试剂盒、BCA检测试剂盒及蛋白浓度测定试剂盒均购自江苏海门碧云

天生物技术研究所, CCK-8检测试剂盒(K1018)购自美国APEX-BIO公司, AIF抗体(17984-1-AP)和HistoneH3(17168-1-AP)均购自武汉Proteintech公司, β -actin(T0022)购自江苏Affinity公司。CO₂培养箱购自美国赛默飞公司,酶联免疫检测仪购自美国NanoDrop公司,聚焦光学显微镜购自日本Nikon公司。

1.2 大黄酚和H₂O₂应用液制备和EA.hy926细胞培养 大黄酚采用N-N-二甲基乙酰胺和聚山梨酯-80溶解后混匀,实验前用0.9%氯化钠溶液稀释至0、8、16、32、64、128和256 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 药物浓度。取453 μL 30% H₂O₂溶液配制为母液后,定容至100 mL备用。本研究已通过广东省妇幼保健院医学伦理委员会批准,伦理审查编号:202001075。

采用含1%青-链霉素和10% FBS的DMEM培养基进行培养,EA.hy926细胞复苏后,置入37℃、5% CO₂培养箱中培养,显微镜下观察EA.hy926细胞生长至汇合后,采用0.25%胰酶消化细胞,分瓶传代培养,备用。

1.3 CCK-8法检测不同浓度H₂O₂处理后EA.hy926细胞活性 取对数生长期EA.hy926细胞,采用0.25%胰酶消化细胞,DMEM培养基稀释细胞使细胞密度为 $1\times 10^5\text{ mL}^{-1}$,将细胞悬液转移至96孔细胞培养板中,分别用浓度为25、50、100、200、400、800和1 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂溶液干预24 h后,根据CCK-8试剂盒说明书操作,采用酶标仪检测波长450 nm处细胞吸光度(A)值,计算细胞活性。细胞活性=(实验孔A值-对照孔A值)/对照孔A值 $\times 100\%$ 。

1.4 CCK-8法检测不同浓度大黄酚和H₂O₂处理后EA.hy926细胞活性 取对数生长期EA.hy926细胞,稀释至细胞密度为 $1\times 10^5\text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液,接种于96孔细胞培养板,待细胞贴壁汇合后,生理盐水溶解大黄酚溶液至0、8、16、32、64、128和256 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度梯度,细胞中加入不同浓度的大黄酚溶液和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂溶液,共同培养24 h,根据CCK-8试剂盒说明书操作,采用酶标仪检测波长450 nm处细胞A值,计算细胞活性。细胞活性=(实验孔A值-对照孔A值)/对照孔A值 $\times 100\%$ 。

1.5 实验分组 取对数生长期EA.hy926细胞,分为对照组、模型组、低剂量大黄酚组和高剂量大黄酚组。对照组EA.hy926细胞不作处理;模

型组 EA.hy926 细胞加入 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 溶液, 培养 24 h; 低和高剂量大黄酚组细胞培养至汇合后, 分别加入 8 和 $256 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 大黄酚溶液及 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 溶液, 干预 24 h。

1.6 Western blotting 法检测各组细胞核和细胞质中 AIF 蛋白表达水平 收集各组 EA.hy926 细胞, 按照细胞核蛋白和细胞浆蛋白抽提试剂盒说明书操作, 分离提取细胞核和细胞质中蛋白, -80°C 保存备用。取各组 EA.hy926 细胞, 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗后裂解, 收集细胞总蛋白, 将提取的蛋白进行细胞质和细胞核中 AIF 蛋白定量, 分离得到的细胞质蛋白和细胞核蛋白通过 SDS-PAGE 电泳, 转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, 孵育 AIF (1:1 000)、Histone H3 (1:5 000) 和 β -actin (1:10 000) 一抗, TBST 溶液中漂洗 3 次, 二抗室温孵育 1 h, TBST 溶液中漂洗 3 次, 经 ECL 成像显影。采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 Histone H3 和 β -actin 为内参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。

1.7 免疫荧光法检测各组细胞 AIF 核转位情况

取对数生长期 EA.hy926 细胞株, 制备为细胞悬液, 接种至共聚焦皿中。按照上述分组干预后, PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 4% 多聚甲醛固定, 室温作用 15 min, PBS 缓冲液漂洗 3 次, 0.3% Triton X-100 溶液作用 10 min, PBS 缓冲液漂洗 3 次, 使用 10% 正常山羊血清封闭, 室温静置孵育 2 h, 加入一抗, 4°C 孵育过夜, PBS 缓冲液漂洗 3 次, 再加入二抗, 室温孵育 1 h, PBS 缓冲液漂洗 3 次, 加入 Hoechst 染色剂染色, 使用抗荧光淬灭封片液封片, 于光学显微镜下观察并拍照, 每组随机选取 3 个视野, 采用 Image J 软件对发生 AIF 核转位的细胞进行计数, 计算各组细胞 AIF 核转位阳性值。AIF 核转位阳性值 = 实验组 AIF 核转位阳性细胞数 / 对照组 AIF 核转位阳性细胞数。

1.8 采用试剂盒检测各组细胞中 SOD 活性和 MDA 水平 收集细胞上清液, 按照 SOD 和 MDA 检测试剂盒说明书操作, 各组细胞待测溶液加入至 96 孔细胞培养板中, 采用酶标仪于波长 450 nm 和 532 nm 处检测细胞 A 值, 按照试剂盒说明书方法计算各组细胞中 SOD 活性和 MDA 水平。

1.9 采用试剂盒检测各组细胞中 Caspase-8 和 Caspase-9 水平 取对数生长期 EA.hy926 细胞, 1:3 传代至 75T 培养瓶中, 待细胞贴壁汇合后按照上述分组干预 24 h, 用胰蛋白酶消化细胞, 按照 Caspase-8 和 Caspase-9 活性检测试剂盒说明书操作, 检测各组细胞中 Caspase-8 和 Caspase-9 水平。

1.10 统计学分析 采用 SPSS 22.0 和 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行统计学分析。各组细胞活性、细胞核和细胞质中 AIF 蛋白表达水平、AIF 核转位阳性值、细胞中 SOD 活性和 MDA 水平及 Caspase-8 和 Caspase-9 水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 H_2O_2 处理后 EA.hy926 细胞活性

EA.hy926 细胞呈倒置 S 形细胞活性曲线, 细胞活性良好, 半数抑制浓度 (median inhibition concentration, IC_{50}) 为 $261.52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 本研究采用 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 干预 24 h 诱导建立细胞模型。见图 1。

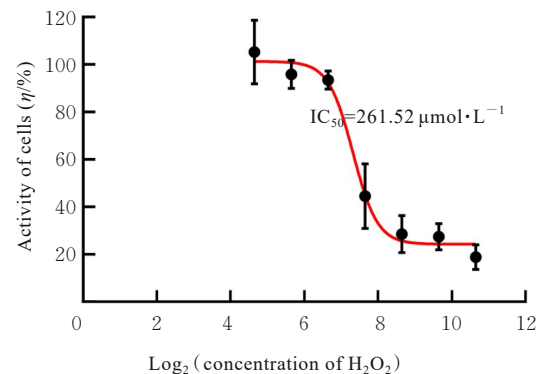


图 1 不同浓度 H_2O_2 作用 24 h EA.hy926 细胞活性

Fig. 1 Activities of EA.hy926 cells after treated with different concentrations of H_2O_2 for 24 h

2.2 不同浓度大黄酚和 H_2O_2 处理后 EA.hy926 细胞活性 随着大黄酚药物浓度的升高, EA.hy926 细胞活性无明显变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。本研究采用 8 和 $256 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 大黄酚进行细胞干预。见图 2。

2.3 各组细胞核和细胞质中 AIF 蛋白表达水平 与对照组 (1.296 ± 0.014) 比较, 模型组细胞核中 AIF 蛋白表达水平 (1.692 ± 0.026) 明显升高

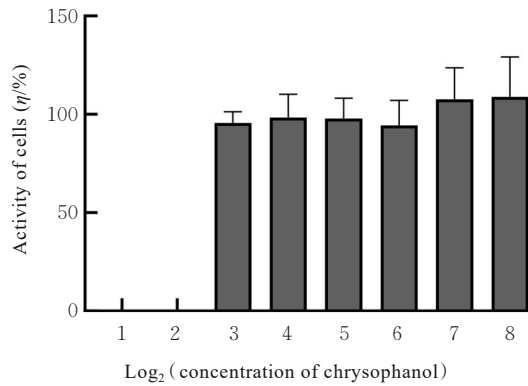
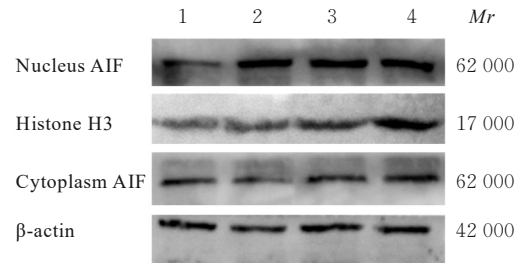


图2 不同浓度大黄酚和H₂O₂处理后EA.hy926细胞活性
Fig. 2 Activities of EA.hy926 cells after treated with different concentrations of H₂O₂ and chrysophanol

($P < 0.05$), 细胞质中 AIF 蛋白表达水平 (0.910 ± 0.523) 明显降低 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 低和高剂量大黄酚组细胞核中 AIF 蛋白表达水平 (1.583 ± 0.051 和 1.069 ± 0.043) 均明显降低 ($P < 0.05$), 细胞质中 AIF 蛋白表达水平 (1.566 ± 0.060 和 1.096 ± 0.013) 均明显升高 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 各组细胞 AIF 核转位情况 对照组细胞 AIF 定位于核内较少。与对照组 (1.00 ± 0.00) 比较, 模型组细胞 AIF 核转位阳性值 (4.00 ± 0.82) 明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 低和高剂量大



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group; Lane 3: Low dose of chrysophanol group; Lane 4: High dose of chrysophanol group.

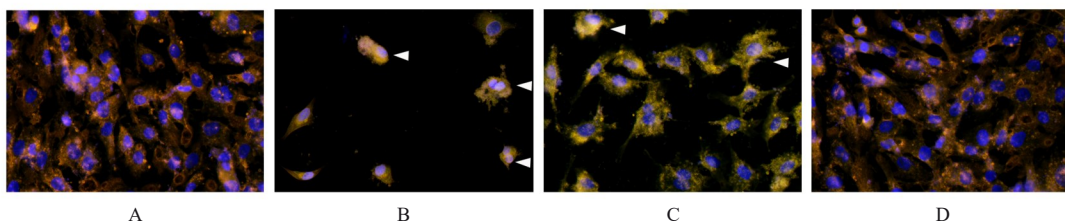
图3 各组细胞质和细胞核中 AIF 蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of AIF protein in cytoplasm and nucleus in cells in various groups

黄酚组细胞 AIF 核转位阳性值 (2.25 ± 0.95 和 1.50 ± 0.58) 均明显降低 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.5 各组细胞中 SOD 活性和 MDA、Caspase-8 及 Caspase-9 水平

与对照组比较, 模型组细胞中 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$), MDA 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 低和高剂量大黄酚组细胞中 SOD 活性均明显升高 ($P < 0.05$), MDA 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组细胞中 Caspase-8 和 Caspase-9 水平比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。



Arrows pointed to cells with nuclear translocations of AIF molecules. A: Control group; B: Model group; C: Low dose of chrysophanol group; D: High dose of chrysophanol group.

图4 各组细胞 AIF 免疫荧光定位($\times 400$)

Fig. 4 Immunofluorescence localizations of AIF of cells in various groups($\times 400$)

表1 各组细胞中 SOD 活性和 MDA、Caspase-8 及 Caspase-9 水平

Tab. 1 Activities of SOD and levels of MDA, Caspase-8, and Caspase-9 in cells in various groups

Group	SOD [$\lambda_B / (U \cdot mg^{-1})$]	MDA [$m_B / (mmol \cdot g^{-1})$]	Caspase-8 [$c_B / (\mu mol \cdot L^{-1})$]	Caspase-9 [$c_B / (\mu mol \cdot L^{-1})$]
Control	3.724 ± 0.072	4.406 ± 0.206	4.932 ± 0.518	3.208 ± 0.079
Model	$2.581 \pm 0.276^*$	$10.750 \pm 2.449^{**}$	6.194 ± 1.303	3.261 ± 0.199
Low dose of chrysophanol	$3.265 \pm 0.072^\Delta$	$5.894 \pm 1.642^\Delta$	5.075 ± 1.555	3.260 ± 0.075
High dose of chrysophanol	$3.331 \pm 0.154^\Delta$	$4.794 \pm 0.181^{\Delta\Delta}$	5.266 ± 0.943	3.143 ± 0.038

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with control group; $^\Delta P < 0.05$, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$ compared with model group.

3 讨论

脐静脉内皮细胞株 Ea. hy926 的结构和功能均与人肺泡微血管内皮细胞相似, 可广泛用于构建 BPD 肺泡体外模型^[12]。氧化应激在高氧诱导的肺泡上皮细胞和血管内皮细胞损伤中发挥重要作用, 而 H₂O₂ 诱导的氧化应激细胞模型普遍用于研究内皮细胞发生氧化损伤的机制及药物对氧化损伤的保护作用^[13]。本研究设置不同浓度梯度 H₂O₂ 溶液干预 EA. hy926 细胞 24 h 后, 细胞活性呈倒置 S 形细胞活性曲线, 提示造模成功。

氧化应激和细胞凋亡是 BPD 发生发展的重要机制^[4-5]。本研究结果显示: 在血管内皮细胞高氧损伤模型中, 大黄酚可升高 SOD 活性和降低 MDA 水平, 提示其具有抗氧化应激作用。此外, 与对照组比较, 给予大黄酚和 H₂O₂ 共同处理后 Ea. hy926 细胞活性无明显差异, 提示大黄酚有助于减轻高氧诱导的 EA. hy926 细胞凋亡。

过度细胞凋亡是氧化应激诱导肺泡上皮细胞和血管内皮细胞损伤的重要病理生理机制^[14]。研究^[15]证实: 肺泡上皮细胞和血管内皮细胞过度凋亡是 BPD 的重要组织学特点, 肺组织凋亡细胞数与 BPD 肺损伤程度存在显著正相关关系。由线粒体损伤介导的内源性凋亡通路和由死亡受体激活的外源性凋亡通路是目前已知的 2 种细胞凋亡途径, 均被证实参与了 BPD 的病理过程^[8, 16]。外源性凋亡通路激活启动于 Fas 与其受体结合, 随后与细胞质 Fas 相关死亡结构域蛋白和 Caspase-8 结合, 进一步形成死亡诱导信号复合体, 最终活化 Caspase-3, 并启动细胞程序化死亡程序^[17]。内源性凋亡通路是由于细胞受促凋亡因子刺激作用下, 线粒体跨膜电位明显降低, 线粒体膜通透性明显升高, 从而导致多种促凋亡蛋白, 如 AIF 和细胞色素 C 的释放, 细胞色素 C 可先后激活 Caspase-9 和 Caspase-3 (依赖于 Caspase 的凋亡途径), AIF 则经核定位信号转移至细胞核, 直接引起染色体聚集和 DNA 等大分子断裂 (非 Caspase 依赖性通路), 最终引起细胞凋亡^[18]。新型 BPD 病理损伤较传统 BPD 明显减轻, 因此内源性凋亡通路可能在新型 BPD 中发挥关键作用^[6]。本研究结果显示: 各组细胞中 Caspase-8 和 Caspase-9 水平比较差异均无统计学意义; 与对照组比较, 模型组细胞质中 AIF 蛋白表达水平明显降低, 细胞核中 AIF 蛋白表达水平明显升高; 而大黄酚干预下细胞质中 AIF 蛋白表达水平较

模型组明显升高, 而细胞核中 AIF 蛋白水平明显降低, 提示轻度 BPD 主要为 AIF 核转位引发的非 Caspase-3 依赖性凋亡通路发挥作用, 大黄酚可有效抑制 AIF 核转位引起的 EA. hy926 细胞凋亡。而 H₂O₂ 处理和大黄酚干预后 Caspase-9 水平变化不明显, 可能与 Caspase-9 为线粒体损伤激活的 Caspase 依赖性通路的下游分子, 而 AIF 核转位反映线粒体损伤后凋亡蛋白的早期变化有关, 且 AIF 的激活依赖于腺苷二磷酸核糖聚合酶-1, 而非依赖于 Caspase 的外源性和内源性细胞凋亡信号通路^[19-20]。

综上所述, 大黄酚通过抑制氧化应激和 AIF 核转位, 改善 H₂O₂ 诱导的 EA. hy926 细胞凋亡, 提示大黄酚有助于治疗 BPD。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李思琪参与实验操作、数据统计学分析和论文撰写, 陈广道参与实验设计、论文指导和审校, 曾其毅参与研究选题。

[参考文献]

- [1] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 早产儿支气管肺发育不良临床管理专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2020, 58(5): 358-365.
- [2] VOYNOW J A. "New" bronchopulmonary dysplasia and chronic lung disease[J]. Paediatr Respir Rev, 2017, 24: 17-18.
- [3] 魏文新, 梅 花, 刘春枝, 等. miR-876-3p 在高氧诱导新生大鼠支气管肺发育不良模型中的表达分析[J]. 中国小儿急救医学, 2023, 30(1): 57-61.
- [4] 杨 威, 陈运彬, 王文建, 等. 骨髓间充质干细胞外泌体在高氧诱导的新生大鼠支气管肺发育不良模型中的修复作用[J]. 广东医学, 2023, 44(8): 962-969.
- [5] 卢红艳, 张 婷, 王秋霞, 等. 内质网应激相关的蛋白激酶 R 样内质网激酶-转录活化因子 4-CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白通路参与支气管肺发育不良大鼠肺细胞凋亡[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2015, 30(4): 305-309.
- [6] 郑 瑜, 厉 兰, 胡绘平, 等. 自噬体及凋亡小体对新生小鼠支气管肺发育不良调控作用[J]. 河北医科大学学报, 2020, 41(11): 1296-1300.
- [7] 曾 玥, 罗思晴, 马鑫喆, 等. N-甲基-4-异亮氨酸环孢素通过抑制线粒体通透性转换孔减轻凋亡诱导因子的核易位和细胞凋亡[J]. 宁夏医科大学学报, 2022, 44(7): 663-668, 676.

- [8] 尹玲玲,唐丽君,黄为民. 大黄对新生大鼠支气管肺发育不良的保护作用[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2019, 34(1): 60-63.
- [9] 郭亮,叶贞志,唐丽君,等. 大黄对氧应激诱导大鼠新型支气管肺发育不良的保护作用研究及机制探讨[J]. 国际医药卫生导报, 2019, 25(15): 2414-2416, 2436.
- [10] 王亦君,冯舒涵,程锦堂,等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(13): 227-234.
- [11] SONG G H, ZHANG Y, YU S P, et al. Chrysophanol attenuates airway inflammation and remodeling through nuclear factor-kappa B signaling pathway in asthma[J]. *Phytother Res*, 2019, 33(10): 2702-2713.
- [12] 丁悦,黄为民,唐丽君. 人EGFL7真核表达载体的构建及稳定转染EA.hy926细胞系的建立[J]. 现代医学与健康研究(电子版), 2022, 6(23): 1-4.
- [13] 章良,孙浩博,杜和坤,等. miR-26a-5p对H₂O₂诱导的EA.hy926血管内皮细胞损伤的影响[J]. 山西医科大学学报, 2023, 54(8): 1083-1091.
- [14] GILFILLAN M, BHANDARI A, BHANDARI V. Diagnosis and management of bronchopulmonary dysplasia[J]. *BMJ*, 2021, 375: n1974.
- [15] ZHANG X Y, XU J, WANG J J, et al. Reduction of microRNA-206 contributes to the development of bronchopulmonary dysplasia through up-regulation of fibronectin 1[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74750.
- [16] 李娟,蔡成,龚小慧,等. 长链非编码RNA MALAT1与细胞凋亡诱导因子在早产儿支气管肺发育不良中表达及意义[J]. 临床儿科杂志, 2019, 37(8): 583-586.
- [17] ORNING P, LIEN E. Multiple roles of caspase-8 in cell death, inflammation, and innate immunity[J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 109(1): 121-141.
- [18] 白丹,阴怀清,武师润,等. 高胆红素血症新生大鼠脑组织凋亡诱导因子、细胞色素C表达的实验研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(15): 2785-2789.
- [19] BANO D, PREHN J H M. Apoptosis-inducing factor (AIF) in physiology and disease: the tale of a repented natural born killer[J]. *EBioMedicine*, 2018, 30: 29-37.
- [20] MONDAL A, ROBERGE J, GILLERAN J, et al. Bone morphogenetic protein inhibitors and mitochondria targeting agents synergistically induce apoptosis-inducing factor (AIF) caspase-independent cell death in lung cancer cells[J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 99.