

# 线粒体辅酶 Q 通过 PI3K/Akt 途径减轻脂多糖诱导的 II 型肺泡上皮细胞线粒体依赖性凋亡

周家奇<sup>1</sup> 高静<sup>2</sup> 方强<sup>1</sup>

<sup>1</sup>浙江大学医学院附属第一医院重症医学科,杭州 310003; <sup>2</sup>浙江大学医学院附属儿童医院麻醉科,杭州 310052

通信作者:方强, Email: 1183005@zju.edu.cn

**【摘要】** 目的 观察线粒体辅酶 Q (MitoQ) 在脂多糖 (LPS) 诱导的 II 型肺泡上皮细胞线粒体依赖性凋亡中的保护作用及分子机制。方法 体外培养 II 型肺泡上皮细胞株 A549, 采用不同浓度 LPS 处理细胞, 构建急性肺损伤 (ALI) 模型, 根据半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 得出 LPS 最佳刺激浓度; 采用不同浓度 MitoQ 对细胞进行预处理, 确定 MitoQ 最佳干预浓度。将细胞分为 4 组: 空白对照组使用正常培养基; LPS 组在正常培养基中加入 10 mg/L 的 LPS 刺激细胞 24 h; MitoQ+LPS 组用 1 μmol/L 的 MitoQ 预处理细胞 60 min, 然后用含 10 mg/L LPS 的培养基处理细胞 24 h; MitoQ+磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 选择性抑制剂 LY294002+LPS 组用 1 μmol/L 的 MitoQ 和 20 μmol/L 的 LY294002 预处理细胞 60 min, 然后用含 10 mg/L LPS 的培养基处理细胞 24 h。采用细胞增殖与毒性检测试剂盒 (CCK-8) 检测细胞活性; 采用流式细胞仪和原位末端缺刻标记法 (TUNEL) 检测细胞凋亡率; 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测凋亡蛋白 Bax、抗凋亡蛋白 Bcl-2 及 PI3K/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 (Akt) 通路蛋白 PI3K 的表达和 Akt 磷酸化水平。结果 根据抑制率曲线计算得出 LPS 对 A549 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 11.06 mg/L, 故选择 10 mg/L 作为 LPS 的刺激浓度。随着 MitoQ 预处理浓度增加, 经 10 mg/L 的 LPS 刺激后, 细胞活性呈先上升后下降趋势。根据细胞活性曲线计算得出 MitoQ 对细胞的最适浓度为 1 μmol/L。MitoQ 预处理可减弱 LPS 诱导的线粒体依赖性凋亡, 表现为细胞凋亡率较 LPS 组明显降低 [流式细胞仪: (8.73 ± 0.25)% 比 (18.10 ± 0.70)%, TUNEL: (12.30 ± 0.82)% 比 (21.43 ± 0.86)%, 均  $P < 0.05$ ], Bax 表达显著下降 (Bax/β-actin: 0.58 ± 0.03 比 1.06 ± 0.10,  $P < 0.05$ ), Bcl-2 表达显著上升 (Bcl-2/β-actin: 1.03 ± 0.06 比 0.53 ± 0.07,  $P < 0.05$ ), 且 PI3K 表达及 Akt 磷酸化水平显著升高 [PI3K 蛋白 (PI3K/β-actin): 1.20 ± 0.02 比 0.96 ± 0.04, 磷酸化 Akt (p-Akt) 蛋白 (p-Akt/t-Akt): 1.22 ± 0.08 比 0.92 ± 0.04, 均  $P < 0.05$ ]。LY294002 预处理可抑制 MitoQ 对细胞的抗凋亡作用, 表现为凋亡率较 MitoQ+LPS 组显著增加 [流式细胞仪: (14.50 ± 0.57)% 比 (8.73 ± 0.25)%, TUNEL: (16.50 ± 0.53)% 比 (12.30 ± 0.82)%, 均  $P < 0.05$ ], Bax 表达显著上升 (Bax/β-actin: 0.95 ± 0.03 比 0.58 ± 0.03,  $P < 0.05$ ), Bcl-2 显著下降 (Bcl-2/β-actin: 0.62 ± 0.03 比 1.03 ± 0.06,  $P < 0.05$ ), 同时 PI3K 表达及 Akt 磷酸化水平均显著降低 [PI3K 蛋白 (PI3K/β-actin): 0.90 ± 0.05 比 1.20 ± 0.02, p-Akt 蛋白 (p-Akt/t-Akt): 0.89 ± 0.02 比 1.22 ± 0.08, 均  $P < 0.05$ ]。结论 MitoQ 可通过激活 PI3K/Akt 通路改善 LPS 诱导的 A549 细胞线粒体依赖性凋亡, 为治疗 LPS 诱导的 ALI 提供了新的思路。

**【关键词】** 脂多糖; 线粒体辅酶 Q; 急性肺损伤; 凋亡

基金项目: 国家自然科学基金 (81901937)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20211221-01899

## Mitochondrial coenzyme Q attenuates lipopolysaccharide-induced mitochondria-dependent apoptosis in type II alveolar epithelial cells via phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway

Zhou Jiaqi<sup>1</sup>, Gao Jing<sup>2</sup>, Fang Qiang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Critical Care Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, Zhejiang, China; <sup>2</sup>Department of Anesthesiology, the Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, Zhejiang, China

Corresponding author: Fang Qiang, Email: 1183005@zju.edu.cn

**【Abstract】** **Objective** To investigate the protective effect and potential mechanism of mitochondrial coenzyme Q (MitoQ) on mitochondria-dependent apoptosis in type II alveolar epithelial cells induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** The type II lung epithelial cell line (A549) were cultured with different concentrations of LPS *in vitro*, a cell model of acute lung injury (ALI) was reproduced, the optimal concentration of LPS was obtained according to the half maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>). The cells were pretreated with different concentrations of MitoQ to determine the best intervention concentration of MitoQ. The cells were divided into four groups: the cells in blank control group were cultured in DMEM; the cells in LPS group were stimulated with 10 mg/L of LPS for 24 hours; the cells in MitoQ+LPS group were pretreated with 1 μmol/L MitoQ for 60 minutes, and then were co-cultured with 10 mg/L of LPS for 24 hours; and the cells in MitoQ+phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) selective inhibitor LY294002+LPS group were pretreated with 1 μmol/L MitoQ and 20 μmol/L LY294002 for 60 minutes, and then were co-cultured with

10 mg/L of LPS for 24 hours. Cell viability was measured using cell counting kit-8 (CCK-8). The cell apoptosis rate was determined by flow cytometry and TdT-mediated dUTP-nick end labeling (TUNEL) method. The protein expression levels of apoptosis protein Bax, anti-apoptotic protein Bcl-2 and PI3K-serine/threonine kinase (Akt) protein PI3K expression and Akt phosphorylation level were detected by Western blotting. **Results** According to the inhibition rate curve, the  $IC_{50}$  of LPS on A549 cells was 11.06 mg/L. Therefore, 10 mg/L was selected as the stimulating concentration of LPS. After stimulation with 10 mg/L LPS, the cell viability first increased and then decreased with the increase in MitoQ pretreatment concentration. According to the cell viability curve, 1  $\mu$ mol/L was selected as the optimum concentration of MitoQ. Compared with LPS group, after pretreated with 1  $\mu$ mol/L MitoQ, cell mitochondrial dependent apoptosis was significantly attenuated, which was characterized by the apoptosis rate was significantly decreased [flow cytometry:  $(8.73 \pm 0.25)\%$  vs.  $(18.10 \pm 0.70)\%$ , TUNEL:  $(12.30 \pm 0.82)\%$  vs.  $(21.43 \pm 0.86)\%$ , both  $P < 0.05$ ], the expression of Bax was significantly down-regulated (Bax/ $\beta$ -actin:  $0.58 \pm 0.03$  vs.  $1.06 \pm 0.10$ ,  $P < 0.05$ ) and Bcl-2 level was significantly up-regulated (Bcl-2/ $\beta$ -actin:  $1.03 \pm 0.06$  vs.  $0.53 \pm 0.07$ ,  $P < 0.05$ ), meanwhile the expression of PI3K and Akt phosphorylation level were significantly increased [PI3K protein (PI3K/ $\beta$ -actin):  $1.20 \pm 0.02$  vs.  $0.96 \pm 0.04$ , phosphorylated Akt (p-Akt) protein (p-Akt/t-Akt):  $1.22 \pm 0.08$  vs.  $0.92 \pm 0.04$ , both  $P < 0.05$ ]. Pretreatment with LY294002 could inhibit the anti-apoptotic effect of MitoQ on cells, it was characterized by the apoptotic rate was significantly increased as compared with MitoQ+LPS group [flow cytometry:  $(14.50 \pm 0.57)\%$  vs.  $(8.73 \pm 0.25)\%$ , TUNEL:  $(16.50 \pm 0.53)\%$  vs.  $(12.30 \pm 0.82)\%$ , both  $P < 0.05$ ], the expression of Bax was significantly up-regulated (Bax/ $\beta$ -actin:  $0.95 \pm 0.03$  vs.  $0.58 \pm 0.03$ ,  $P < 0.05$ ) and Bcl-2 level was significantly down-regulated (Bcl-2/ $\beta$ -actin:  $0.62 \pm 0.03$  vs.  $1.03 \pm 0.06$ ,  $P < 0.05$ ), meanwhile the expression of PI3K and Akt phosphorylation level were significantly decreased [PI3K protein (PI3K/ $\beta$ -actin):  $0.90 \pm 0.05$  vs.  $1.20 \pm 0.02$ , p-Akt protein (p-Akt/t-Akt):  $0.89 \pm 0.02$  vs.  $1.22 \pm 0.08$ , both  $P < 0.05$ ]. **Conclusion** MitoQ improved LPS induced mitochondria-dependent apoptosis of A549 cells by significantly activating PI3K/Akt signal pathway, which provided a new treatment for LPS induced ALI.

**[Key words]** Lipopolysaccharide; Mitochondrial coenzyme Q; Acute lung injury; Apoptosis

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81901937)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20211221-01899

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是脓毒症常见的并发症, 发病率及病死率高, 对社会造成了重大负担<sup>[1]</sup>。目前认为脓毒症相关的多器官功能障碍可归因于病理生理损伤级联反应, 包括炎症反应、线粒体功能障碍、内质网应激和细胞凋亡<sup>[2-4]</sup>。线粒体辅酶 Q (mitochondrial coenzyme Q, MitoQ) 是一种新型的抗氧化剂, 能很好地被线粒体吸收并发挥抗氧化作用<sup>[5]</sup>。越来越多的证据表明, MitoQ 可通过改善线粒体功能并恢复细胞呼吸在多种疾病中发挥保护作用, 对治疗缺血/再灌注损伤、肾脏疾病、慢性阻塞性肺疾病、非酒精性脂肪肝疾病和神经退行性疾病都有帮助<sup>[6-10]</sup>。但是, MitoQ 对 ALI 是否有保护作用研究甚少。本研究旨在从细胞水平观察 MitoQ 对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 所致 ALI 的保护作用及相关机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞来源及培养:** II型肺泡上皮细胞株 A549 购于中国科学院上海细胞库。用含青霉素 (100 kU/L)、链霉素 (100 mg/L) 和 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基 (美国 Gibco 公司), 在 37 °C 和 5% CO<sub>2</sub> 下培养 A549 细胞, 1~2 d 换液 1 次, 待细胞生长至密度为 70%~80% 时进行细胞传代。

**1.2 伦理学:** 本实验内容来源于国家自然科学基金 (81901937), 所有实验操作符合伦理学标准, 均经过

浙江大学医学院附属第一医院实验动物伦理委员会审查 (审批号: 2022-1029)。

**1.3 实验分组和 ALI 细胞模型建立:** 细胞分为 4 组。空白对照组使用正常培养基; LPS 组在正常培养基中加入 10 mg/L 的 LPS 刺激细胞 24 h; MitoQ+LPS 组用 1  $\mu$ mol/L 的 MitoQ 预处理细胞 60 min, 然后再用含 10 mg/L LPS 的培养基处理细胞 24 h; MitoQ+ 磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 选择性抑制剂 LY294002+LPS 组用 1  $\mu$ mol/L MitoQ 和 20  $\mu$ mol/L LY294002 预处理 60 min, 然后用含 10 mg/L LPS 的培养基处理细胞 24 h。

**1.4 细胞增殖与毒性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测 A549 细胞活性:** 收集对数生长期且状态良好的 A549 细胞, 按每孔  $2 \times 10^3$  个接种到 96 孔板, 于培养箱孵育 24 h; 加 1、5、10、20、50 mg/L 浓度梯度 LPS, 于培养箱继续培养 24 h。加 10  $\mu$ L CCK-8 试剂, 于培养箱孵育 90 min, 测定 450 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值, 并计算细胞活性及半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )。同时收集另一批生长状况良好的细胞, 分别加入 0.1、0.5、1、5、10  $\mu$ mol/L 浓度梯度 MitoQ 置于培养箱 60 min, 加入上一步骤中得到的  $IC_{50}$  的 LPS 继续培养 24 h, 测定 450 nm 处 A 值。每组实验设立 3 个重复孔, 并设立空白孔。细胞活性 (%) = (实验组 A 值 - 空白组

A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值) × 100%。

**1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡情况:** 收集细胞悬液, 取 100 μL 细胞悬液, 加入 5 μL 膜联蛋白 V - 异硫氰酸荧光素 (Annexin V - fluorescein isothiocyanate, Annexin V - FITC), 避光孵育 5 min, 加入 10 μL 碘化丙啶 (propidium iodide, PI), 混匀避光 10 min, 1 h 内用流式细胞仪检测细胞凋亡率 (细胞凋亡率 = 早期凋亡细胞数 / 晚期凋亡细胞数 × 100%)。

**1.6 原位末端缺刻标记法 (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 检测细胞凋亡情况:** 将细胞接种于 12 孔板上, 待细胞贴壁后用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.3% 曲通 X -100 室温孵育 5 min, 0.3% 过氧化氢溶液中室温孵育 20 min, 随后每孔加入 50 μL TUNEL 液 37 °C 避光孵育细胞 1 h, 4, 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4, 6-diamino-2-phenyl indole, DAPI) 染核, 荧光显微镜下计数并拍照。用 Image J 软件统计细胞凋亡率 [ 细胞凋亡率 = 凋亡细胞数 (绿色荧光) / 细胞总数 (蓝色荧光) × 100% ]。

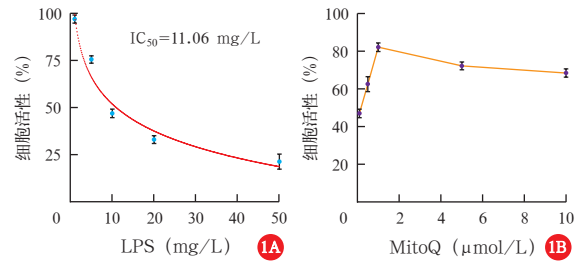
**1.7 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测相关蛋白表达量:** 24 h 后收集细胞进行裂解, 蛋白电泳后转膜, 封闭 90 min, 一抗孵育。洗膜后加入二抗 (1 : 5 000), 常温孵育 60 min, 洗膜后倒入发光液, 充分浸泡, 置于光密度扫描系统检测条带并拍照。应用 Image J 分析条带灰度值, 以 β-肌动蛋白 (β-actin, 1 : 1 000) 为内参, 以目的蛋白与内参的灰度值比值作为目的蛋白的表达量。

**1.8 统计学方法:** 采用 GraphPad Prism 9.0.0 软件分析数据。计量资料均符合正态分布, 以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 体现, 两两比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较用方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 MitoQ 预处理可抑制 LPS 诱导的 A549 细胞活性下降:** 图 1A 显示, 随着 LPS 浓度增加, 细胞活性逐渐下降; 拟合曲线得到 IC<sub>50</sub> = 11.06 mg/L。当 LPS 为 10 mg/L 时, 细胞活性为 52%, 为了方便计算, 选用该浓度作为 LPS 刺激细胞的 IC<sub>50</sub>。图 1B 显示, 在 LPS 刺激前用不同浓度 MitoQ 预处理后, 细胞活性呈先升高后下降趋势。当 MitoQ 为 1 μmol/L 时, 细胞活性最高, 选用该浓度作为 MitoQ 的干预浓度。

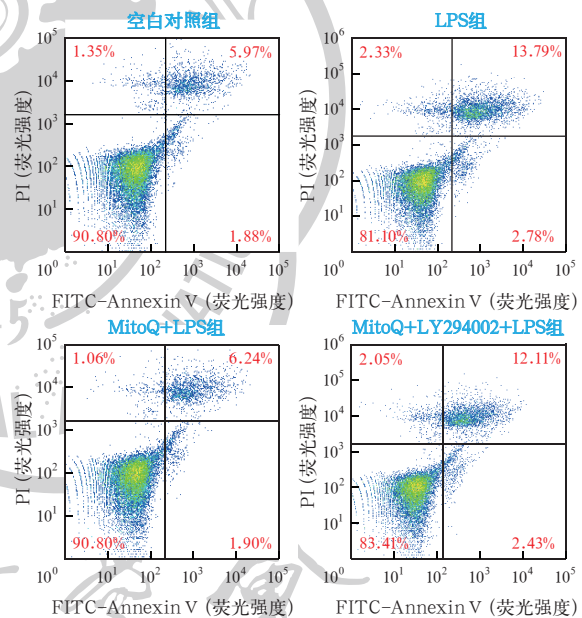
**2.2 MitoQ 预处理可抑制 A549 细胞线粒体依赖性凋亡:** 流式细胞仪检测结果显示 (图 2; 表 1), 与空白对照组相比, LPS 组细胞凋亡率显著升高 (P < 0.05); 与 LPS 组相比, MitoQ+LPS 组细胞凋亡率显著降低



注: CCK-8 为细胞增殖与毒性检测试剂盒, LPS 为脂多糖, MitoQ 为线粒体辅酶 Q, A549 细胞为 II 型肺泡上皮细胞株, IC<sub>50</sub> 为半数抑制浓度

**图 1 CCK-8 检测不同浓度 LPS 处理 (A) 或不同浓度 MitoQ 预处理 (B) A549 细胞活性的变化趋势**

(P < 0.05); 与 MitoQ+LPS 组相比, MitoQ+LY294002+LPS 组细胞凋亡率显著升高 (P < 0.05)。TUNEL 法检测结果与流式细胞仪检测结果一致 (表 1; 图 3)。说明 MitoQ 可抑制 LPS 诱导的 A549 细胞凋亡, 而抑制 PI3K 通路则可削弱 MitoQ 的抗凋亡作用。



注: LPS 为脂多糖, MitoQ 为线粒体辅酶 Q, LY294002 为磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 选择性抑制剂, A549 细胞为 II 型肺泡上皮细胞株, FITC 为异硫氰酸荧光素, Annexin V 为膜联蛋白 V, PI 为碘化丙啶

**图 2 流式细胞仪检测各组 A549 细胞凋亡情况**

**表 1 各组 A549 细胞凋亡情况比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	样本数 (孔)	细胞凋亡率 (%)	
		流式细胞仪	TUNEL 法
空白对照组	3	6.57 ± 0.26	8.50 ± 0.29
LPS 组	3	18.10 ± 0.70 <sup>a</sup>	21.43 ± 0.86 <sup>a</sup>
MitoQ+LPS 组	3	8.73 ± 0.25 <sup>ab</sup>	12.30 ± 0.82 <sup>ab</sup>
MitoQ+LY294002+LPS 组	3	14.50 ± 0.57 <sup>abc</sup>	16.50 ± 0.53 <sup>abc</sup>

注: LPS 为脂多糖, MitoQ 为线粒体辅酶 Q, LY294002 为磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 选择性抑制剂, A549 细胞为 II 型肺泡上皮细胞株, TUNEL 为原位末端缺刻标记法; 与空白对照组比较, <sup>a</sup>P < 0.05; 与 LPS 组比较, <sup>b</sup>P < 0.05; 与 MitoQ+LPS 组比较, <sup>c</sup>P < 0.05

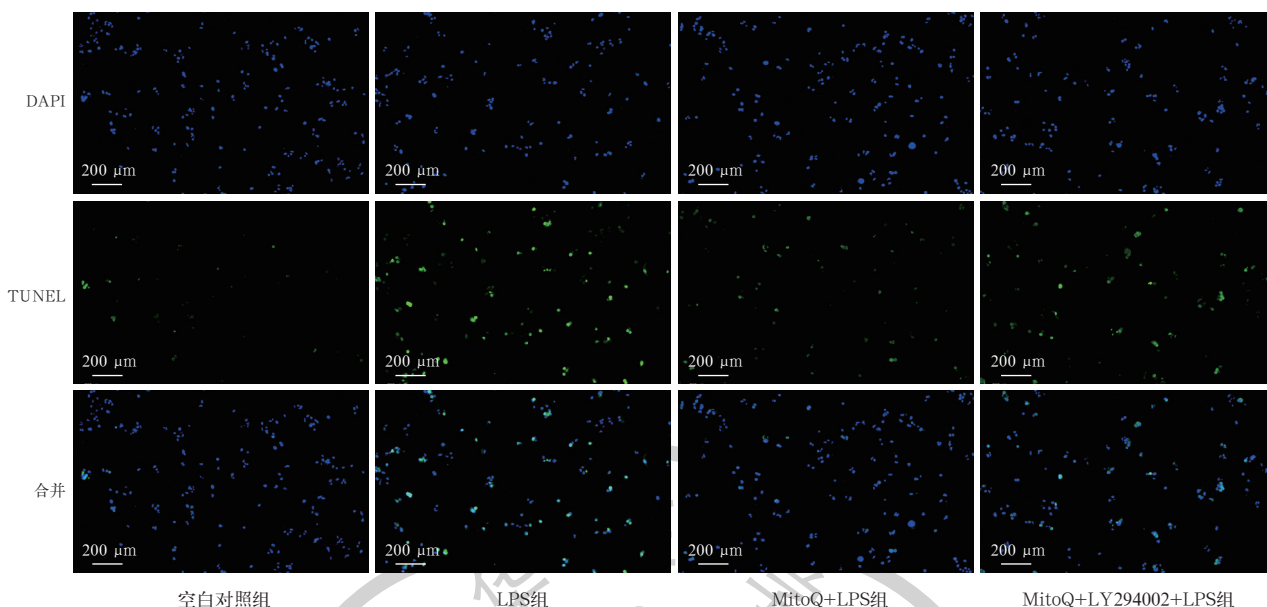
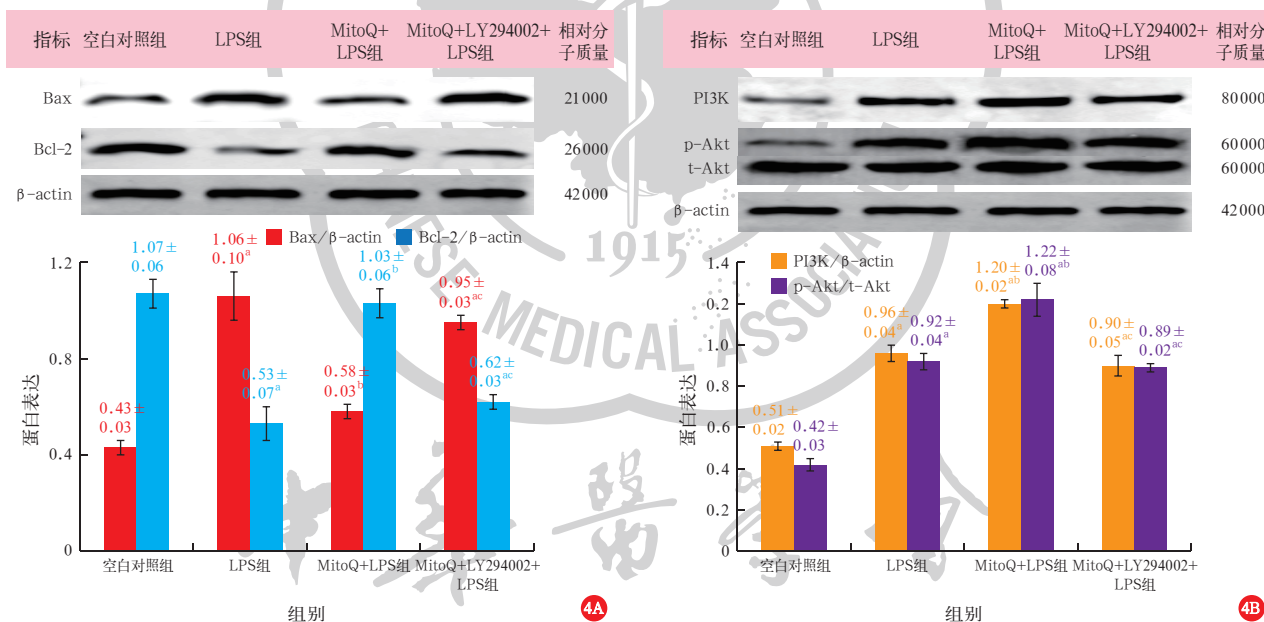


图3 光镜下观察各组Ⅱ型肺泡上皮细胞株 A549 凋亡情况。4,6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染色后细胞核呈蓝色荧光;原位末端缺刻标记法(TUNEL)染色后凋亡细胞核呈绿色荧光。空白对照组罕见凋亡细胞;脂多糖(LPS)组凋亡细胞增加;线粒体辅酶 Q(MitoQ)+LPS 组凋亡细胞较 LPS 组显著减少;MitoQ+磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)选择性抑制剂 LY294002+LPS 组凋亡细胞则较 MitoQ+LPS 组显著增加 TUNEL 染色。中倍放大



LPS 为脂多糖, MitoQ 为线粒体辅酶 Q, LY294002 为磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)选择性抑制剂, Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, A549 细胞为Ⅱ型肺泡上皮细胞株, β-actin 为 β-肌动蛋白, Akt 为丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, p-Akt 为磷酸化 Akt, t-Akt 为总 Akt; 与空白对照组比较, <sup>a</sup>*P*<0.05; 与 LPS 组比较, <sup>b</sup>*P*<0.05; 与 MitoQ+LPS 组比较, <sup>c</sup>*P*<0.05

图4 Western blotting 检测各组 A549 细胞凋亡相关蛋白(A)及 PI3K/Akt 信号通路蛋白(B)的表达

2.3 MitoQ 预处理对 A549 细胞线粒体依赖性凋亡中凋亡蛋白 Bax 及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的影响(图 4A): 与空白对照组相比, LPS 组 Bax 蛋白表达显著升高, Bcl-2 显著降低(均 *P*<0.05); 与 LPS 组相比, MitoQ+LPS 组 Bax 显著降低, Bcl-2 显著升高(均 *P*<0.05); 与 MitoQ+LPS 组相比, MitoQ+LY294002+LPS 组 Bax 显著升高, Bcl-2 显著降低(均 *P*<0.05)。证实 MitoQ 对 A549 细胞的抗凋亡作用与 PI3K 途径有关。

2.4 MitoQ 预处理可促进 A549 细胞 PI3K/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, Akt) 通路蛋白表达(图 4B): 与空白对照组相比, LPS 组 PI3K 表达及 Akt 磷酸化显著增加(均 *P*<0.05); MitoQ 预处理后 PI3K 表达及 Akt 磷酸化进一步增加(均 *P*<0.05); 而加入 LY294002 后 PI3K 表达及 Akt 磷酸化明显减少(均 *P*<0.05)。说明 MitoQ 可促进 A549 细胞 PI3K/Akt 通路激活, 而 LY294002 可抑制通路激活。

### 3 讨论

脓毒症是由宿主对入侵病原体失去防御作用造成的<sup>[11]</sup>。ALI是脓症患者死亡的主要原因<sup>[12]</sup>。肺水肿、炎症细胞浸润和肺泡出血被认为是ALI的典型病理表现<sup>[13-14]</sup>，故本实验中采用LPS对II型肺泡上皮细胞株A549进行损伤刺激。

MitoQ是一种脂溶性膜成分，广泛存在于从细菌到哺乳动物等生物体中<sup>[5]</sup>。研究表明，MitoQ可减少创伤性脑损伤小鼠神经细胞凋亡<sup>[15]</sup>；MitoQ预处理可下调肠缺血/再灌注诱导的氧化应激，恢复肠道屏障功能<sup>[16]</sup>。本研究中，MitoQ预处理后，A549细胞活性显著提高，LPS诱导的A549细胞凋亡率明显降低，表明MitoQ可减轻LPS诱导的急性肺泡上皮细胞损伤。此外，凋亡蛋白Bax是Bcl-2蛋白家族重要成员，在线粒体凋亡过程中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。本研究显示，MitoQ预处理后，LPS诱导A549细胞中凋亡蛋白Bax表达增加，而抗凋亡蛋白Bcl-2表达显著降低，表明MitoQ可减轻LPS诱导的II型肺泡上皮细胞线粒体依赖性凋亡，增加细胞活性。

PI3K/Akt信号通路广泛存在于哺乳动物细胞中，涉及细胞增殖、凋亡和自噬等<sup>[18-20]</sup>。De Blasio等<sup>[21]</sup>指出，MitoQ10可通过调节PI3K信号转导来减轻糖尿病心脏病。本研究显示，MitoQ预处理后，LPS诱导的A549细胞PI3K蛋白表达增加，Akt磷酸化水平升高；PI3K选择性抑制剂LY294002对细胞进行预处理后，MitoQ减轻LPS诱导细胞凋亡的作用受到抑制，且Akt磷酸化明显减少。结合本研究结果，MitoQ预处理可能通过激活PI3K/Akt通路，在LPS诱导A549细胞线粒体依赖性凋亡中发挥保护作用。

本研究的不足之处：首先，仅在细胞层面验证了MitoQ对LPS诱导II型肺泡上皮细胞损伤的保护作用，需要在动物模型上进一步验证。其次，本研究观察了MitoQ对细胞凋亡的作用，对其他细胞现象的影响还有待探讨。

综上所述，MitoQ可通过激活PI3K/Akt信号通路调节细胞凋亡相关蛋白的表达，从而增加细胞活性，减轻LPS诱导的II型肺泡上皮细胞线粒体依赖性凋亡，为临床上治疗ALI提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

[1] Luo X, Liu RM, Zhang ZH, et al. Mitochondrial division inhibitor 1 attenuates mitophagy in a rat model of acute lung injury [J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019: 2193706. DOI: 10.1155/2019/2193706.  
[2] Li T, Liu YT, Li GC, et al. Polydatin attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014,

7 (12): 8401-8410.  
[3] Li T, Cai SM, Zeng ZH, et al. Protective effect of polydatin against burn-induced lung injury in rats [J]. *Respir Care*, 2014, 59 (9): 1412-1421. DOI: 10.4187/respcare.02831.  
[4] Tian XL, Liu ZJ, Yu T, et al. Ghrelin ameliorates acute lung injury induced by oleic acid via inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. *Life Sci*, 2018, 196: 1-8. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.07.023.  
[5] Zhou L, Li M, Wang XY, et al. Biosynthesis of coenzyme Q in the phytopathogen *Xanthomonas campestris* via a yeast-like pathway [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2019, 32 (2): 217-226. DOI: 10.1094/MPMI-07-18-0183-R.  
[6] 陈胜利, 黄锦达, 曾其毅, 等. 自噬和线粒体辅酶Q对急性脓毒症大鼠胰腺外分泌功能的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (2): 86-91. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.002.  
[7] Tang DY, Liu X, Chen J. Mitoquinone intravitreal injection ameliorates retinal ischemia-reperfusion injury in rats involving SIRT1/Notch1/NADPH axis [J]. *Drug Dev Res*, 2022: 21911. DOI: 10.1002/ddr.21911.  
[8] Pabla N, Bajwa A. Role of mitochondrial therapy for ischemic-reperfusion injury and acute kidney injury [J]. *Nephron*, 2021: 1-6. DOI: 10.1159/000520698.  
[9] Chen S, Wang Y, Zhang HL, et al. The antioxidant MitoQ protects against CSE-induced endothelial barrier injury and inflammation by inhibiting ROS and autophagy in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15 (7): 1440-1451. DOI: 10.7150/ijbs.30193.  
[10] Zhang LL, Reyes A, Wang XD. The role of mitochondria-targeted antioxidant MitoQ in neurodegenerative disease [J]. *J Green Engin*, 2018, 6: 1-8. DOI: 10.13052/2052-8426-2018-01.  
[11] 何招辉, 朱政, 杨小刚, 等. 雷公藤红素通过抑制Toll样受体4/核转录因子- $\kappa$ B炎症通路减轻脓毒症诱导的大鼠急性肺损伤 [J]. *中华危重病急救医学*, 2021, 33 (5): 541-545. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20210122-00099.  
[12] Dare AJ, Bolton EA, Pettigrew GJ, et al. Protection against renal ischemia-reperfusion injury *in vivo* by the mitochondria targeted antioxidant MitoQ [J]. *Redox Biol*, 2015, 5: 163-168. DOI: 10.1016/j.redox.2015.04.008.  
[13] Zhang QY, Wu D, Yang Y, et al. Dexmedetomidine alleviates hyperoxia-induced acute lung injury via inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42 (5): 1907-1919. DOI: 10.1159/000479609.  
[14] Ma CH, Zhu LP, Wang J, et al. Anti-inflammatory effects of water extract of *Taraxacum mongolicum* hand.-Mazz on lipopolysaccharide-induced inflammation in acute lung injury by suppressing PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 168: 349-355. DOI: 10.1016/j.jep.2015.03.068.  
[15] Zhou J, Wang HD, Shen RM, et al. Mitochondrial-targeted antioxidant MitoQ provides neuroprotection and reduces neuronal apoptosis in experimental traumatic brain injury possibly via the Nrf2-ARE pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10 (6): 1887-1899.  
[16] Hu QY, Ren JN, Li GW, et al. The mitochondrially targeted antioxidant MitoQ protects the intestinal barrier by ameliorating mitochondrial DNA damage via the Nrf2/ARE signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (3): 403. DOI: 10.1038/s41419-018-0436-x.  
[17] Gahl RF, Dwivedi P, Tjandra N. Bcl-2 proteins bid and bax form a network to permeabilize the mitochondria at the onset of apoptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7 (10): e2424. DOI: 10.1038/cddis.2016.320.  
[18] Torrealba N, Rodriguez-Berriguete G, Fraile B, et al. PI3K pathway and Bcl-2 family. Clinicopathological features in prostate cancer [J]. *Aging Male*, 2018, 21 (3): 211-222. DOI: 10.1080/13685538.2018.1424130.  
[19] Bao RK, Zheng SF, Wang XY. Selenium protects against cadmium-induced kidney apoptosis in chickens by activating the PI3K/AKT/Bcl-2 signaling pathway [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2017, 24 (25): 20342-20353. DOI: 10.1007/s11356-017-9422-6.  
[20] Chang L, Graham PH, Ni J, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015, 96 (3): 507-517. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2015.07.005.  
[21] De Blasio MJ, Huynh K, Qin CX, et al. Therapeutic targeting of oxidative stress with coenzyme Q10 counteracts exaggerated diabetic cardiomyopathy in a mouse model of diabetes with diminished PI3K(p110 $\alpha$ ) signaling [J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 87: 137-147. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.028.

(收稿日期: 2021-12-21)