

Akt/SIRT3 依赖的线粒体自噬通过抑制肺泡上皮细胞凋亡减轻高氧性急性肺损伤

苏德¹ 余虹¹ 郑杰¹ 刘君亚¹ 梅鸿¹ 刘鑫鑫¹ 余琨¹ 冯帮海² 程丽婷³ 覃松¹

¹遵义医科大学附属医院重症医学科,遵义 563000; ²遵义市中医院重症医学科,遵义 563000;

³贵州茅台医院重症医学科,仁怀 564500

通信作者:覃松, Email: 120647053@qq.com

【摘要】目的 探讨蛋白激酶 B(Akt)/沉默信息调节因子 3(SIRT3)信号通路在高氧性急性肺损伤(HALI)中的作用及相关机制。**方法** ①体内实验:将 C57BL/6J 小鼠分为对照组(常氧)和 HALI 组($\geq 95\%$ 氧气),每组 6 只。制模后 24 h,经苏木素-伊红(HE)染色后光镜下观察肺组织病理学改变,计算肺湿/干质量(W/D)比值;用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肺组织总蛋白中凋亡相关蛋白[活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(cleaved caspase-3)、Bax、Bcl-2]和线粒体蛋白中自噬相关蛋白[p62、Beclin-1、微管相关蛋白轻链 3-II/I(LC3-II/I)]的表达。②体外实验:体外培养小鼠 II 型肺泡上皮细胞(AEC II)细胞株 MLE-12,取对数生长期细胞用于实验。将细胞分为对照组、H₂O₂ 组(500 μ mol/L H₂O₂ 模拟 HALI)和 H₂O₂+3-甲基腺嘌呤(3-MA)组,制模后 24 h 用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测细胞活性,用流式细胞仪检测细胞凋亡率,用 Western blotting 检测相关蛋白表达,通过制模前 2 h 给予 10 μ mol/L 线粒体自噬抑制剂 3-MA,探讨线粒体自噬在 H₂O₂ 诱导 AEC II 细胞凋亡中的作用。另外,将细胞分为对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂+Ly294002 组、H₂O₂+SC-79 组,通过制模前 2 h 给予 10 μ mol/L Akt 抑制剂 Ly294002 或 Akt 激活剂 SC-79,探讨 Akt 信号通路参与线粒体自噬对 H₂O₂ 诱导 AEC II 细胞凋亡的保护作用;并通过敲低 SIRT3 探讨其是否也在 Akt 介导的线粒体自噬对抗 H₂O₂ 诱导 AEC II 细胞凋亡中发挥保护作用。**结果** ①体内实验结果:光镜下可见对照组肺泡结构清晰,排列规则;HALI 组可见大量炎症细胞浸润、水肿和肺泡壁增厚,肺 W/D 比值高于对照组(11.5 \pm 1.1 比 5.4 \pm 0.8, $P < 0.05$)。与对照组相比,HALI 组促凋亡蛋白 Bax、cleaved caspase-3 表达上调[Bax(Bax/GAPDH): 0.49 \pm 0.06 比 0.18 \pm 0.05, cleaved caspase-3(cleaved caspase-3/GAPDH): 1.71 \pm 0.07 比 0.63 \pm 0.06, 均 $P < 0.05$], 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调(Bcl-2/GAPDH: 0.39 \pm 0.05 比 1.03 \pm 0.08, $P < 0.05$), 自噬相关蛋白 LC3-II/I 比值(2.16 \pm 0.06 比 1.10 \pm 0.10)、Beclin-1 表达(Beclin-1/GAPDH: 1.04 \pm 0.08 比 0.42 \pm 0.04)升高(均 $P < 0.05$), p62 表达降低(p62/GAPDH: 0.41 \pm 0.04 比 0.99 \pm 0.08, $P < 0.05$)。表明细胞凋亡与线粒体自噬可能促进了 HALI 的进展。②体外实验结果:与对照组比较,经 H₂O₂ 处理后 MLE-12 细胞活性、Bcl-2 和 p62 表达水平降低[细胞活性:(48.45 \pm 6.48)% 比 (96.80 \pm 2.27)%, Bcl-2(Bcl-2/GAPDH): 0.57 \pm 0.07 比 0.82 \pm 0.05, p62(p62/GAPDH): 0.39 \pm 0.06 比 1.03 \pm 0.07, 均 $P < 0.05$], 细胞凋亡率、LC3-II/I 比值、Beclin-1、Bax 和 cleaved caspase-3 表达水平升高[细胞凋亡率:(16.12 \pm 1.76)% 比 (6.54 \pm 0.75)%, LC3-II/I 比值: 2.05 \pm 0.12 比 0.97 \pm 0.07, Beclin-1(Beclin-1/GAPDH): 0.69 \pm 0.05 比 0.18 \pm 0.03, Bax(Bax/GAPDH): 0.53 \pm 0.07 比 0.29 \pm 0.04, cleaved caspase-3(cleaved caspase-3/GAPDH): 0.63 \pm 0.04 比 0.19 \pm 0.04, 均 $P < 0.05$];与 H₂O₂ 组比较,给予 3-MA 预处理后细胞凋亡增加差异均有统计学意义[细胞活性:(34.00 \pm 5.05)% 比 (48.45 \pm 6.48)%, 细胞凋亡率:(22.21 \pm 3.05)% 比 (16.12 \pm 1.76)%, cleaved caspase-3(cleaved caspase-3/GAPDH): 1.03 \pm 0.09 比 0.63 \pm 0.04, Bax(Bax/GAPDH): 0.69 \pm 0.07 比 0.53 \pm 0.07, Bcl-2(Bcl-2/GAPDH): 0.30 \pm 0.04 比 0.57 \pm 0.07, p62(p62/GAPDH): 0.64 \pm 0.05 比 0.39 \pm 0.06, Beclin-1(Beclin-1/GAPDH): 0.34 \pm 0.04 比 0.69 \pm 0.05, LC3-II/I 比值: 1.64 \pm 0.05 比 2.05 \pm 0.12 比, 均 $P < 0.05$], 表明抑制线粒体自噬会促进 MLE-12 细胞凋亡。加入 Akt 抑制剂 Ly294002 后,细胞表现出与 3-MA 预处理相似的变化;而给予 Akt 激活剂 SC-79 则产生与 3-MA 预处理相反的效应。说明 Akt 的激活能够促进线粒体自噬的发生,从而抑制细胞凋亡。与 H₂O₂+SC-79 组相比,H₂O₂+SC-79+SIRT3 小干扰 RNA(siSIRT3) 组细胞凋亡率、cleaved caspase-3、Bax 和 p62 表达水平升高[细胞凋亡率:(10.30 \pm 0.96)% 比 (8.82 \pm 0.95)%, cleaved caspase-3(cleaved caspase-3/GAPDH): 0.69 \pm 0.05 比 0.44 \pm 0.05, Bax(Bax/GAPDH): 0.99 \pm 0.06 比 0.49 \pm 0.04, p62(p62/GAPDH): 0.59 \pm 0.06 比 0.38 \pm 0.04, 均 $P < 0.05$], SIRT3、Bcl-2 及 Beclin-1 表达水平降低[SIRT3(SIRT3/GAPDH): 0.48 \pm 0.05 比 0.68 \pm 0.04, Bcl-2(Bcl-2/GAPDH): 0.64 \pm 0.05 比 0.78 \pm 0.05, Beclin-1(Beclin-1/GAPDH): 0.68 \pm 0.04 比 0.79 \pm 0.04, 均 $P < 0.05$]。表明进一步敲低 SIRT3 后,尽管给予 Akt 激活剂 SC-79,细胞线粒体自噬仍受抑制,凋亡显著增加,提示 SIRT3 是 Akt 通路下游介导细胞保护作用的重要靶点。**结论** 激活 Akt/SIRT3 信号通路可通过促进线粒体自噬抑制肺泡上皮细胞凋亡,从而减轻 HALI。

【关键词】 高氧性急性肺损伤;细胞凋亡;线粒体自噬;蛋白激酶 B;沉默信息调节因子 3

基金项目:贵州省科技计划项目(ZK-2022-660)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20241230-01074

Akt/SIRT3-dependent mitochondrial autophagy inhibits apoptosis of alveolar epithelial cells and alleviates hyperoxia-induced acute lung injury

Su De¹, Yu Hong¹, Zheng Jie¹, Liu Junya¹, Mei Hong¹, Liu Xinxin¹, Yu Kun¹, Feng Banghai², Cheng Liting³, Qin Song¹

¹Department of Critical Care Medicine, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China;

²Department of Critical Care Medicine, Zunyi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zunyi 563000, China;

³Department of Critical Care Medicine, Guizhou Moutai Hospital, Renhuai 564500, China

Corresponding author: Qin Song, Email: 120647053@qq.com

[Abstract] Objective To investigate the role and underlying mechanism of the protein kinase B (Akt)/sirtuin 3 (SIRT3) signaling pathway in hyperoxia-induced acute lung injury (HALI). **Methods** 1) *In vivo* experiments: C57BL/6J mice were randomly assigned to a control group (normoxia) or a HALI group ($\geq 95\%$ oxygen), with six mice in each group. After 24 hours of exposure, lung histopathological changes were evaluated by hematoxylin-eosin (HE) staining, and the lung wet/dry weight (W/D) ratio was calculated. Apoptosis-related proteins in total lung lysates (cleaved caspase-3, Bax, and Bcl-2) and mitophagy-related proteins in mitochondrial fractions [p62, Beclin-1, and microtubule-associated protein light chain 3-II/I (LC3-II/I)] were measured by Western blotting. 2) *In vitro* experiments: Mouse type II alveolar epithelial cells (AEC II) MLE-12 in the logarithmic growth phase were used. Cells were divided into control group, H₂O₂ group (500 μ mol/L H₂O₂ to mimic the HALI), and H₂O₂+3-methyladenine (3-MA) group. After 24 hours, cell viability was assessed by cell counting kit-8 (CCK-8), apoptosis was quantified by flow cytometry, and related proteins were detected by Western blotting. To explore the role of mitophagy in H₂O₂-induced apoptosis, cells were pretreated 2 hours before modeling with 10 μ mol/L 3-MA, a mitophagy inhibitor. In additional experiments, cells were divided into control, H₂O₂, H₂O₂+Ly294002, and H₂O₂+SC-79 groups; 10 μ mol/L Ly294002 (Akt inhibitor) or SC-79 (Akt activator) was added 2 hours before modeling to investigate the involvement of Akt signaling in mitophagy-mediated protection against H₂O₂-induced apoptosis. SIRT3 was further knocked down to determine whether it functions downstream of Akt in this protective pathway. **Results** 1) *In vivo* results: Under light microscopy, the control group exhibited clear and regularly arranged alveolar structures, whereas the HALI group showed marked inflammatory cell infiltration, edema, and thickened alveolar walls. The lung W/D ratio was higher in the HALI group than that in the control group (11.5 ± 1.1 vs. 5.4 ± 0.8 , $P < 0.05$). Compared with the control group, the HALI group showed increased expression of pro-apoptotic proteins Bax, cleaved caspase-3 [Bax (Bax/GAPDH): 0.49 ± 0.06 vs. 0.18 ± 0.05 , cleaved caspase-3 (cleaved caspase-3/GAPDH): 1.71 ± 0.07 vs. 0.63 ± 0.06 , both $P < 0.05$], and decreased expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 (Bcl-2/GAPDH: 0.39 ± 0.05 vs. 1.03 ± 0.08 , $P < 0.05$). Mitophagy-related markers were also altered, with increased LC3-II/I ratio and Beclin-1 [LC3-II/I ratio: 2.16 ± 0.06 vs. 1.10 ± 0.10 , Beclin-1 (Beclin-1/GAPDH): 1.04 ± 0.08 vs. 0.42 ± 0.04 , both $P < 0.05$], and decreased p62 (p62/GAPDH: 0.41 ± 0.04 vs. 0.99 ± 0.08 , $P < 0.05$), suggesting that apoptosis and mitophagy may be involved in HALI progression. 2) *In vitro* results: Compared with the control group, H₂O₂ treatment reduced cell viability, Bcl-2, and p62 [cell viability: $(48.45 \pm 6.48)\%$ vs. $(96.80 \pm 2.27)\%$, Bcl-2 (Bcl-2/GAPDH): 0.57 ± 0.07 vs. 0.82 ± 0.05 , p62 (p62/GAPDH): 0.39 ± 0.06 vs. 1.03 ± 0.07 , all $P < 0.05$], while increasing apoptosis rate, LC3-II/I ratio, Beclin-1, Bax, and cleaved caspase-3 [apoptosis rate: $(16.12 \pm 1.76)\%$ vs. $(6.54 \pm 0.75)\%$, LC3-II/I ratio: 2.05 ± 0.12 vs. 0.97 ± 0.07 , Beclin-1 (Beclin-1/GAPDH): 0.69 ± 0.05 vs. 0.18 ± 0.03 , Bax (Bax/GAPDH): 0.53 ± 0.07 vs. 0.29 ± 0.04 , cleaved caspase-3 (cleaved caspase-3/GAPDH): 0.63 ± 0.04 vs. 0.19 ± 0.04 , all $P < 0.05$]. Compared with the H₂O₂ group, 3-MA pretreatment further aggravated apoptosis [cell viability: $(34.00 \pm 5.05)\%$ vs. $(48.45 \pm 6.48)\%$, apoptosis rate: $(22.21 \pm 3.05)\%$ vs. $(16.12 \pm 1.76)\%$, cleaved caspase-3 (cleaved caspase-3/GAPDH): 1.03 ± 0.09 vs. 0.63 ± 0.04 , Bax (Bax/GAPDH): 0.69 ± 0.07 vs. 0.53 ± 0.07 , Bcl-2 (Bcl-2/GAPDH): 0.30 ± 0.04 vs. 0.57 ± 0.07 , p62 (p62/GAPDH): 0.64 ± 0.05 vs. 0.39 ± 0.06 , Beclin-1 (Beclin-1/GAPDH): 0.34 ± 0.04 vs. 0.69 ± 0.05 , LC3-II/I ratio: 1.64 ± 0.05 vs. 2.05 ± 0.12 , all $P < 0.05$], indicating that inhibition of mitophagy promotes MLE-12 apoptosis. Similar changes were observed after adding the Akt inhibitor Ly294002, whereas the Akt activator SC-79 produced effects opposite to those of 3-MA, suggesting that Akt activation promotes mitophagy and thereby suppresses apoptosis. Compared with the H₂O₂+SC-79 group, SIRT3 knockdown (H₂O₂+SC-79+siSIRT3) increased apoptosis rate, cleaved caspase-3, Bax, and p62 [apoptosis rate: $(10.30 \pm 0.96)\%$ vs. $(8.82 \pm 0.95)\%$, cleaved caspase-3 (cleaved caspase-3/GAPDH): 0.69 ± 0.05 vs. 0.44 ± 0.05 , Bax (Bax/GAPDH): 0.99 ± 0.06 vs. 0.49 ± 0.04 , p62 (p62/GAPDH): 0.59 ± 0.06 vs. 0.38 ± 0.04 , all $P < 0.05$], and decreased SIRT3, Bcl-2, and Beclin-1 [SIRT3 (SIRT3/GAPDH): 0.48 ± 0.05 vs. 0.68 ± 0.04 , Bcl-2 (Bcl-2/GAPDH): 0.64 ± 0.05 vs. 0.78 ± 0.05 , Beclin-1 (Beclin-1/GAPDH): 0.68 ± 0.04 vs. 0.79 ± 0.04 , all $P < 0.05$]. These findings indicate that SIRT3 knockdown attenuates SC-79-induced mitophagy and enhances apoptosis, supporting SIRT3 as an important downstream effector of the Akt pathway. **Conclusion** Activation of the Akt/SIRT3 signaling pathway promotes mitophagy to inhibit alveolar epithelial cell apoptosis, thereby attenuating HALI.

[Key words] Hyperoxia-induced acute lung injury; Apoptosis; Mitophagy; Protein kinase B; Sirtuin 3

Fund program: Guizhou Provincial Science and Technology Plan Project (ZK-2022-660)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20241230-01074

氧疗被广泛应用于缓解重症肺炎合并急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 患者的严重呼吸衰竭^[1]。然而,长时间暴露于高浓度氧会导致多器官损伤,

其中肺是受氧毒性影响最大的组织之一^[2]。高氧性急性肺损伤 (hyperoxia-induced acute lung injury, HALI) 以肺部炎症和蛋白渗漏为特征^[3]。II 型肺泡

上皮细胞(type II alveolar epithelial cell, AEC II)主要覆盖在肺泡表面,通过合成、分泌和回收肺表面活性物质,对于维持肺内环境稳定至关重要^[4]。在 HALI 过程中,高氧诱导氧化应激和线粒体功能障碍,导致 AEC II 细胞凋亡和随后的肺组织损伤^[5]。因此,保持 AEC II 细胞活性和功能是治疗 HALI 的一种有前途的方法。线粒体通过调节三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)合成和细胞代谢为细胞提供能量^[6]。而线粒体自噬通过将受损的线粒体选择性地靶向溶酶体降解,成为细胞稳态中的关键调节机制^[7-8]。线粒体自噬可有效抑制活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,从而抑制细胞凋亡和促进细胞存活^[8-9]。沉默信息调节因子 3(sirtuin 3, SIRT3)作为线粒体去乙酰化酶,在维持线粒体稳态和能量代谢中发挥关键作用^[10]。部分研究表明,SIRT3 激活可抑制 ROS 过度活化并增强线粒体自噬^[11-12];过表达 SIRT3 可减轻 HALI^[13],但具体机制不明,部分研究表明,蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)激活可增强线粒体自噬,有利于选择性清除受损的线粒体^[14-15]。前期研究表明,激活 Akt 信号通路可抑制 AEC II 凋亡,在 HALI 中发挥保护作用^[16-17]。SIRT3 作为 Akt 下游分子,可抑制细胞凋亡^[18]。然而 Akt/SIRT3 信号通路是否可以调控 HALI 中的线粒体自噬从而影响细胞凋亡目前尚不清楚。本研究旨在探讨 HALI 中线粒体自噬与细胞凋亡之间的复杂相互作用,特别关注 Akt/SIRT3 信号通路在激活线粒体自噬对抗 H₂O₂ 诱导的 AEC II 细胞凋亡中的保护作用,并阐明 AEC II 细胞中 Akt/SIRT3 依赖的线粒体自噬的分子机制,为开发 HALI 靶向治疗策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 体内实验

1.1.1 实验动物及伦理学:SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体质量(22±2)g,购于长沙市天勤生物科技公司,动物合格证号:SCXK(湘)2021-0004。动物实验过程符合动物伦理学标准,并通过遵义医科大学附属医院伦理委员会批准(审批号:KLL-2021-095)。

1.1.2 动物分组及模型制备:按随机数字表法将小鼠分为对照组和 HALI 组,每组 6 只。将小鼠暴露于高浓度(≥95%)氧气中 24 h 制备 HALI 模型^[19];对照组则在常氧状态下正常饲养。制模后 24 h 颈椎脱臼法处死小鼠,取肺组织,苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色观察病理学改变,并计

算肺湿/干质量(wet/dry weight, W/D)比值;用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测肺组织蛋白表达。

1.2 体外实验

1.2.1 抑制线粒体自噬观察 H₂O₂ 对小鼠 AEC II 细胞株 MLE-12 细胞凋亡的影响:MLE-12 细胞购于 ATCC 细胞库,并在含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)的 DMEM/F12 培养基中培养(待细胞融合约 80% 时,各组细胞同步化 12 h),将细胞分为对照组、H₂O₂ 组和 H₂O₂+3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)组。将细胞暴露于 500 μmol/L H₂O₂ 中 24 h 模拟 HALI^[20];H₂O₂+3-MA 组于制模前 2 h 用 10 μmol/L 3-MA 处理细胞;对照组细胞常规培养,加入等体积生理盐水。于制模后 24 h 收集细胞,用细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)检测细胞活性;用流式细胞仪检测细胞凋亡;用 Western blotting 检测蛋白表达。

1.2.2 Akt 激活及抑制实验:取对数生长期的 MLE-12 细胞,在含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中培养,待细胞融合约 80% 时,将细胞分为对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂+Ly294002 及 H₂O₂+SC-79 组。以 500 μmol/L H₂O₂ 干预 24 h 模拟 HALI;H₂O₂+Ly294002 和 H₂O₂+SC-79 组分别于制模前 2 h 用 Akt 抑制剂 Ly294002 (10 μmol/L)或激活剂 SC-79 (10 μmol/L)干预;对照组常规培养。制模后 24 h 收集细胞,用流式细胞仪检测细胞凋亡;用 Western blotting 检测蛋白表达。

1.2.3 沉默 SIRT3 观察 Akt 激活剂 SC-90 对 MLE-12 细胞线粒体自噬和凋亡的影响:取对数生长期的 MLE-12 细胞,在含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基中培养,待细胞融合约 80% 时,将细胞分为对照组、H₂O₂ 组、H₂O₂+SC-79 组及 H₂O₂+SC-79+si-SIRT3 组。用 500 μmol/L H₂O₂ 干预 24 h 模拟 HALI;H₂O₂+SC-79 组于制模前 2 h 用 Akt 激活剂 SC-79 (10 μmol/L)干预;H₂O₂+SC-79+siSIRT3 组利用 Gene Pharma 合成靶向 SIRT3 的小干扰 RNA (small interfering RNA of SIRT3, siSIRT3)转染细胞,培养 46 h 后加入 SC-79 (10 μmol/L);对照组常规培养。制模后 24 h,用流式细胞仪检测细胞凋亡;用 Western blotting 检测蛋白表达。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 病理学观察:取小鼠左肺上叶,浸泡在 4% 多聚甲醛中,石蜡包埋,切成 5 μm 厚切片,脱蜡和水化后进行 HE 染色,光镜下观察肺组织病理学改变。

1.3.2 肺 W/D 比值:取小鼠左肺下叶,擦干称湿质量,然后将肺组织置于 80 °C 下干燥,并称干质量,计

算肺 W/D 比值以评估肺组织水肿情况。

1.3.3 线粒体蛋白提取:取小鼠右肺上叶组织 20 mg, 冰上保存, 用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤 1 次, 置于冰上离心管或培养皿, 剪成组织碎片; 加入预冷的线粒体分离试剂 A 或临用前使用添加丝氨酸蛋白酶苯甲基磺酰氟的线粒体分离试剂 A, 在冰浴上匀浆 10 次左右, 4 °C 下 1 000 ×g 离心 5 min 取上清液, 转移到另一个离心管中, 4 °C 下 11 000 ×g 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀即为线粒体, 提取线粒体蛋白定量后备用。

1.3.4 Western blotting 检测蛋白表达:取小鼠右肺中叶及下叶肺组织 50 mg, 使用裂解液提取总蛋白(线粒体自噬相关蛋白检测需用提取的线粒体蛋白); 等量蛋白经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后, 转移至甲醇化的聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上, 然后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 加入一抗促凋亡蛋白[活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved caspase-3; 1 : 1 000)、Bax (1 : 2 000)]、抗凋亡蛋白(Bcl-2; 1 : 1 000)及线粒体自噬蛋白[p62 (1 : 1 000)、Beclin-1 (1 : 500)、微管相关蛋白轻链 3- II / I (microtubule-associated protein light chain 3- II / I, LC3- II / I ; 1 : 1 000)] 4 °C 孵育过夜, 用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗室温孵育 2 h。使用 Image Lab 软件曝光、拍照, 以靶蛋白与 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的灰度值比值作为靶蛋白表达量。

1.3.5 CCK-8 法检测细胞活性:将 MLE-12 细胞接种于 96 孔板(每孔 8×10^3 个细胞), 待细胞融合 80% ~ 90% 时加入 500 μmol/L H₂O₂ 干预 24 h, 加入 CCK-8 溶液(每孔 10 μL), 继续孵育 2 h。用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度(A)值, 代表细胞活性。

1.3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡:收集处理后的 MLE-12 细胞, 用 PBS 冲洗, 800 ×g 离心, PBS 重悬; 将细胞与膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-fluorescein isothiocyanate, Annexin V-FITC)和碘化丙啶(propidium iodide, PI)在 37 °C 下培养 30 min; 用流式细胞仪分析细胞凋亡情况。

1.4 统计学分析:应用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。所有计量资料均符合正态分布, 以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较用 Student-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 体内实验:HE 染色显示(图 1), 对照组小鼠肺组织结构正常, 未见明显病理学改变; 而 HALI 组小鼠肺组织出现明显的炎症细胞浸润、肺泡间隔增厚及水肿。定量分析结果显示, HALI 组小鼠肺 W/D 比值高于对照组 (11.5 ± 1.1 比 5.4 ± 0.8 , $P < 0.05$)。提示 HALI 模型建立成功。进一步检测显示, 与对照组相比, HALI 组小鼠肺组织中促凋亡蛋白 cleaved caspase-3、Bax 表达升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低; 同时, 自噬相关标志物 Beclin-1、LC3- II / I 比值升高, 而 p62 表达下降(均 $P < 0.05$; 图 2; 表 1)。以上结果提示, HALI 可同时诱导细胞凋亡和线粒体自噬的活化, 这一过程可能参与了 HALI 的病理进展。

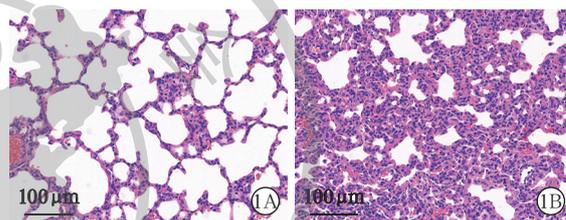


图 1 光镜下观察两组小鼠肺组织病理学改变 对照组(A)肺泡结构清晰, 排列规则; 高氧性急性肺损伤(HALI)组(B)可见肺泡水肿和肺泡壁增厚 苏木素-伊红(HE)染色 中倍放大



注: HALI 为高氧性急性肺损伤, cleaved caspase-3 为活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3

图 2 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测两组小鼠肺组织蛋白表达

2.2 体外实验

2.2.1 抑制线粒体自噬可加重 H₂O₂ 诱导的 AEC II 细胞凋亡:表 2 和图 3~4 显示, 与对照组相比, H₂O₂ 组细胞活性、Bcl-2 和 p62 蛋白表达降低, 细胞凋亡率、LC3- II / I 比值、Beclin-1、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达升高(均 $P < 0.05$), 表明抑制线粒体自噬能够促进 MLE-12 细胞凋亡。与 H₂O₂ 组相比, H₂O₂+3-MA 组细胞活性、LC3- II / I 比值、Bcl-2 和 Beclin-1 表达降低, 细胞凋亡率、Bax、cleaved caspase-3 和 p62 表达升高(均 $P < 0.05$), 表明抑制线粒体自噬可促进 MLE-2 细胞凋亡。

表 1 两组小鼠肺组织中凋亡及自噬相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

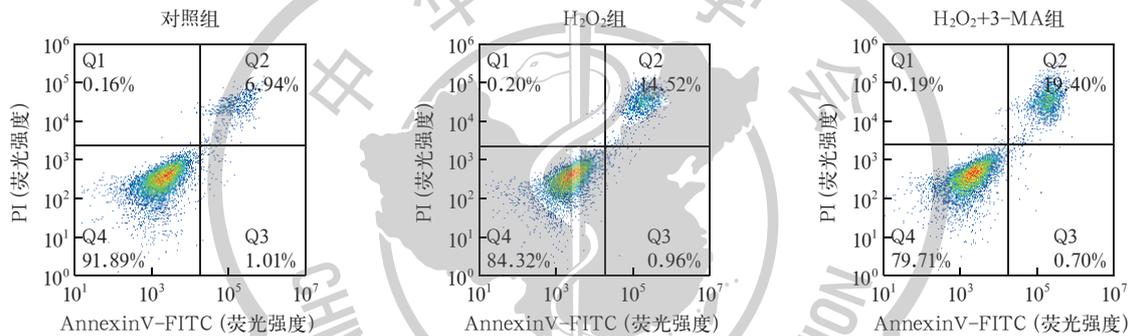
组别	动物数 (只)	cleaved caspase-3 (cleaved caspase-3/GAPDH)	Bax 蛋白 (Bax/GAPDH)	Bcl-2 蛋白 (Bcl-2/GAPDH)	p62 (p62/GAPDH)	Beclin-1 (Beclin-1/GAPDH)	LC3- II / I 比值
对照组	6	0.63 ± 0.06	0.18 ± 0.05	1.03 ± 0.08	0.99 ± 0.08	0.42 ± 0.04	1.10 ± 0.10
HALI 组	6	1.71 ± 0.07 ^a	0.49 ± 0.06 ^a	0.39 ± 0.05 ^a	0.41 ± 0.04 ^a	1.04 ± 0.08 ^a	2.16 ± 0.06 ^a

注: HALI 为高氧性急性肺损伤, cleaved caspase-3 为活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, LC3- II / I 为微管相关蛋白轻链 3- II / I ;与对照组比较, ^a $P < 0.05$

表 2 各组小鼠 AEC II 细胞活性、凋亡率以及凋亡和自噬相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

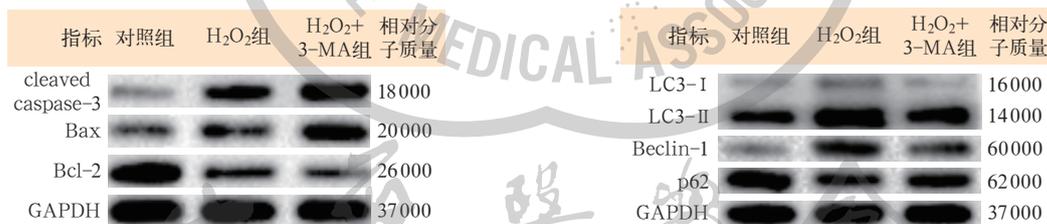
组别	样本数 (孔)	细胞活性 (%)	细胞凋亡率 (%)	cleaved caspase-3 (cleaved caspase-3/GAPDH)	Bax 蛋白 (Bax/GAPDH)	Bcl-2 蛋白 (Bcl-2/GAPDH)	p62 (p62/GAPDH)	Beclin-1 (Beclin-1/GAPDH)	LC3- II / I 比值
对照组	6	96.80 ± 2.27	6.54 ± 0.75	0.19 ± 0.04	0.29 ± 0.04	0.82 ± 0.05	1.03 ± 0.07	0.18 ± 0.03	0.97 ± 0.07
H ₂ O ₂ 组	6	48.45 ± 6.48 ^a	16.12 ± 1.76 ^a	0.63 ± 0.04 ^a	0.53 ± 0.07 ^a	0.57 ± 0.07 ^a	0.39 ± 0.06 ^a	0.69 ± 0.05 ^a	2.05 ± 0.12 ^a
H ₂ O ₂ +3-MA 组	6	34.00 ± 5.05 ^b	22.21 ± 3.05 ^b	1.03 ± 0.09 ^b	0.69 ± 0.07 ^b	0.30 ± 0.04 ^b	0.64 ± 0.05 ^b	0.34 ± 0.04 ^b	1.64 ± 0.05 ^b

注: 3-MA 为 3-甲基腺嘌呤, AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, cleaved caspase-3 为活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, LC3- II / I 为微管相关蛋白轻链 LC3- II / I ;与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 H₂O₂ 组比较, ^b $P < 0.05$



注: 3-MA 为 3-甲基腺嘌呤, AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, Annexin V-FITC 为膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素, PI 为碘化丙啶

图 3 流式细胞仪检测各组小鼠 AEC II 细胞凋亡情况



注: 3-MA 为 3-甲基腺嘌呤, AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, cleaved caspase-3 为活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3

图 4 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组小鼠 AEC II 细胞蛋白表达

2.2.2 激活 Akt 促进线粒体自噬抑制 MLE-12 细胞凋亡:表 3 和图 5 ~ 6 显示,与对照组相比, H₂O₂ 组细胞凋亡率、LC3- II / I 比值、Beclin-1、Bax 和 cleaved caspase-3 蛋白表达升高, Bcl-2、p62 蛋白表达降低 (均 $P < 0.05$)。与 H₂O₂ 组相比, H₂O₂+Ly294002 组 LC3- II / I 比值、Beclin-1、Bcl-2 表达降低,细胞凋亡率、cleaved caspase-3、Bax 和 p62 蛋白表达升高 (均 $P < 0.05$),说明抑制 Akt 激活可抑制线粒体自噬促进 H₂O₂ 诱导的 MLE-12 细胞凋亡。与 H₂O₂+Ly294002 组相比, H₂O₂+SC-79 组细胞凋亡率、cleaved caspase-3、Bax 和 p62 蛋白表达降低, LC3- II / I 比值、Bcl-2 和

Beclin-1 表达升高 (均 $P < 0.05$),说明激活 Akt 可促进线粒体自噬抑制 H₂O₂ 诱导的 MLE-12 细胞凋亡。

2.2.3 敲低 SIRT3 后线粒体自噬抑制及细胞凋亡增加, SC-79 能部分逆转 SIRT3 沉默致 H₂O₂ 诱导的细胞损伤:表 4 和图 7 ~ 8 显示,与对照组相比, H₂O₂ 组细胞凋亡率、cleaved caspase-3、Bax 和 Beclin-1 表达升高, Bcl-2、p62 和 SIRT3 表达降低 (均 $P < 0.05$)。与 H₂O₂ 组相比, H₂O₂+SC-79 组细胞凋亡率、cleaved caspase-3、Bax 和 p62 表达降低, Bcl-2、Beclin-1 和 SIRT3 表达升高 (均 $P < 0.05$)。与 H₂O₂+SC-79 组相比, H₂O₂+SC-79+siSIRT3 组细胞凋亡率、cleaved

表 3 各组小鼠 MLE-12 细胞凋亡率以及凋亡和自噬相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

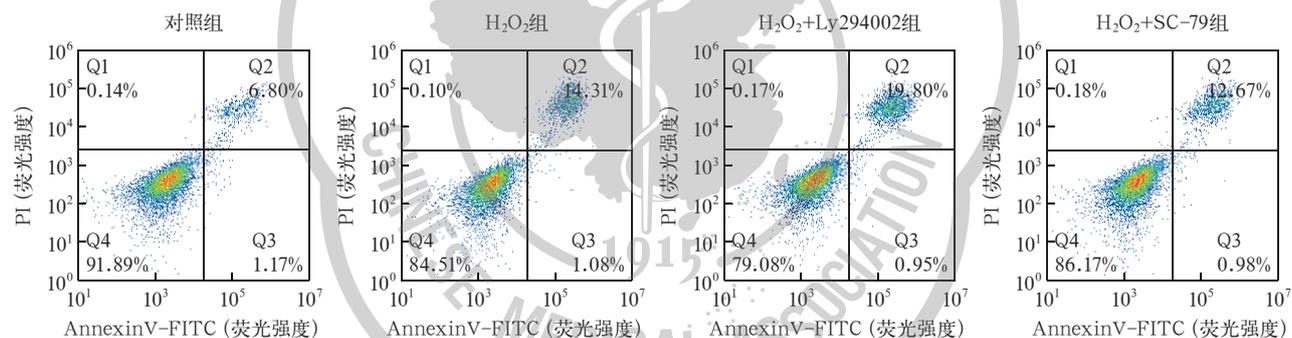
组别	样本数 (孔)	细胞凋亡率 (%)	cleaved-caspase-3 (cleaved caspase-3/GAPDH)	Bax 蛋白 (Bax/GAPDH)	Bcl-2 蛋白 (Bcl-2/GAPDH)	p62 (p62/GAPDH)	Beclin-1 (Beclin-1/GAPDH)	LC3- II / I 比值
对照组	6	6.13 ± 0.75	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.03	1.07 ± 0.08	1.03 ± 0.08	0.25 ± 0.03	0.62 ± 0.10
H ₂ O ₂ 组	6	16.43 ± 1.94 ^a	0.48 ± 0.05 ^a	0.72 ± 0.06 ^a	0.48 ± 0.04 ^a	0.70 ± 0.04 ^a	0.65 ± 0.04 ^a	1.21 ± 0.05 ^a
H ₂ O ₂ +Ly294002 组	6	22.38 ± 2.95 ^b	0.68 ± 0.05 ^b	1.04 ± 0.08 ^b	0.24 ± 0.05 ^b	0.79 ± 0.04 ^b	0.38 ± 0.04 ^b	0.89 ± 0.08 ^b
H ₂ O ₂ +SC-79 组	6	10.94 ± 1.46 ^c	0.29 ± 0.04 ^c	0.55 ± 0.05 ^c	0.64 ± 0.05 ^c	0.38 ± 0.05 ^c	0.97 ± 0.08 ^c	1.99 ± 0.12 ^c

注: Ly294002 为蛋白激酶 B (Akt) 抑制剂, SC-79 为 Akt 激活剂, cleaved caspase-3 为活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, LC3- II / I 为微管相关蛋白轻链 3- II / I ; 与对照组比较, ^a*P*<0.05; 与 H₂O₂ 组比较, ^b*P*<0.05; 与 H₂O₂+Ly294002 组比较, ^c*P*<0.05

表 4 各组小鼠 MLE-12 细胞凋亡率以及凋亡和自噬相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

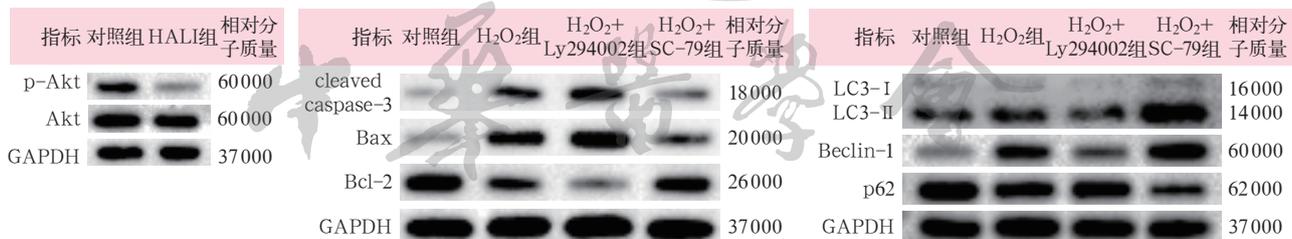
组别	样本数 (孔)	细胞凋亡率 (%)	cleaved-caspase-3 (cleaved caspase-3/GAPDH)	Bax 蛋白 (Bax/GAPDH)	Bcl-2 蛋白 (Bcl-2/GAPDH)	p62 (p62/GAPDH)	Beclin-1 (Beclin-1/GAPDH)	SIRT3 (SIRT3/GAPDH)
对照组	6	0.75 ± 0.25	0.32 ± 0.04	0.22 ± 0.03	1.03 ± 0.08	0.93 ± 0.05	0.32 ± 0.04	0.98 ± 0.05
H ₂ O ₂ 组	6	15.75 ± 1.55 ^a	0.82 ± 0.04 ^a	0.68 ± 0.05 ^a	0.36 ± 0.04 ^a	0.79 ± 0.04 ^a	0.57 ± 0.04 ^a	0.54 ± 0.04 ^a
H ₂ O ₂ +SC-79 组	6	8.82 ± 0.95 ^b	0.44 ± 0.05 ^b	0.49 ± 0.04 ^b	0.78 ± 0.05 ^b	0.38 ± 0.04 ^b	0.79 ± 0.04 ^b	0.68 ± 0.04 ^b
H ₂ O ₂ +SC-79+siSIRT3 组	6	10.30 ± 0.96 ^c	0.69 ± 0.05 ^c	0.99 ± 0.06 ^c	0.64 ± 0.05 ^c	0.59 ± 0.06 ^c	0.68 ± 0.04 ^c	0.48 ± 0.05

注: SC-79 为蛋白激酶 B (Akt) 激活剂, siSIRT3 为沉默信息调节因子 3 (SIRT3) 小干扰 RNA, cleaved caspase-3 为活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, 与对照组比较, ^a*P*<0.05; 与 H₂O₂ 组比较, ^b*P*<0.05; 与 H₂O₂+SC-79 组比较, ^c*P*<0.05



注: Ly294002 为蛋白激酶 B (Akt) 抑制剂, SC-79 为 Akt 激活剂, Annexin V-FITC 为膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素, PI 为碘化丙啶

图 5 流式细胞仪检测各组小鼠 MLE-12 细胞凋亡情况



注: Ly294002 为蛋白激酶 B (Akt) 抑制剂, SC-79 为 Akt 激活剂, p-Akt 为磷酸化 Akt, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, cleaved caspase-3 为活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3

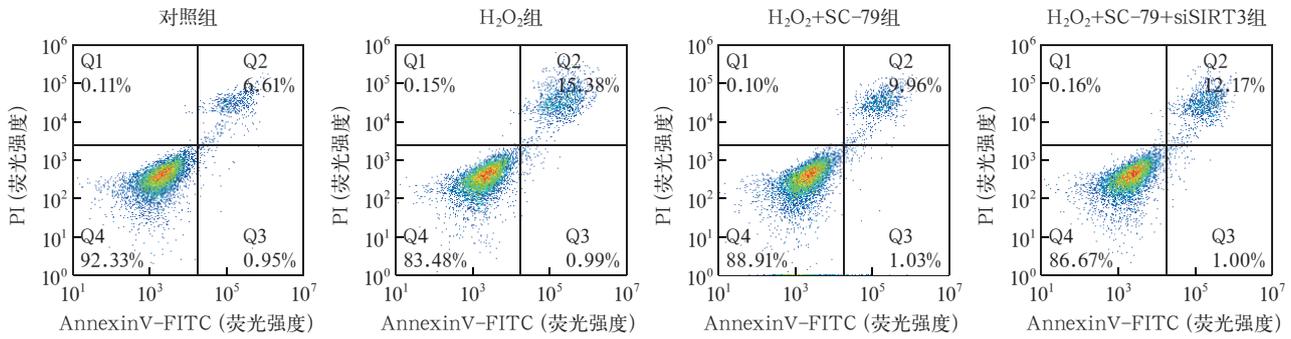
图 6 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组小鼠 MLE-12 细胞蛋白表达

caspase-3、Bax 和 p62 表达升高, Bcl-2、Beclin-1 和 SIRT3 表达降低 (均 *P*<0.05)。

3 讨论

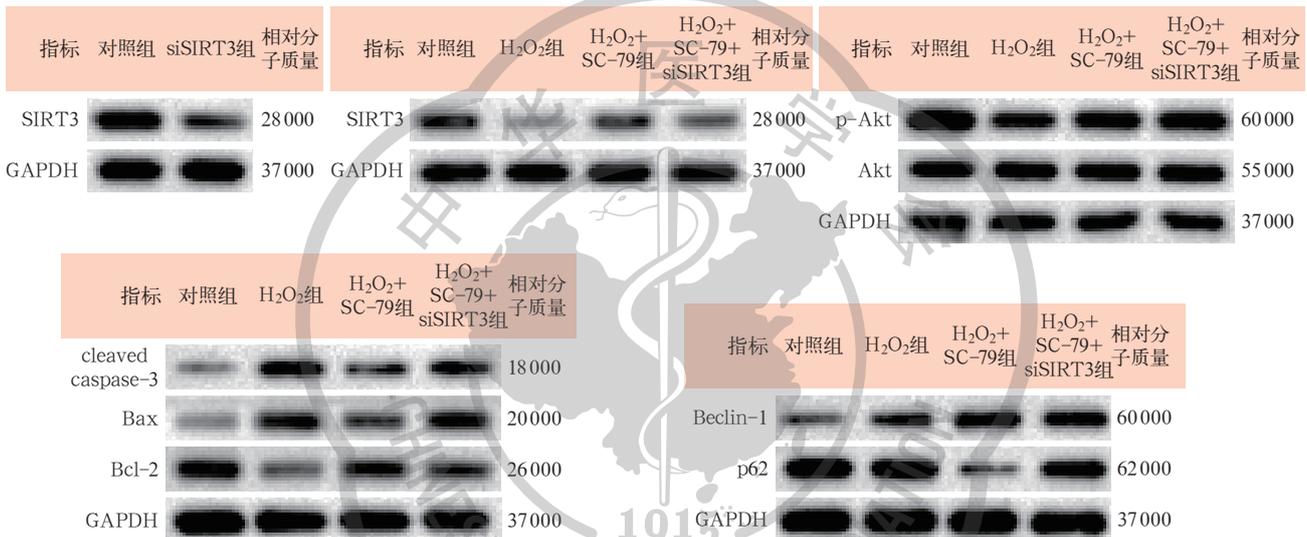
HALI 是一种严重疾病,其特征是暴露于高水平的氧气导致肺部炎症和损伤^[21-22]。细胞凋亡是一种高度调节的程序性细胞死亡过程,与 ALI 的发病机制有关^[23],特别是在 HALI 中^[24]。本研究表

明, HALI 诱导肺组织细胞凋亡,表现为促凋亡蛋白 Bax、cleaved caspase-3 上调和抗凋亡蛋白 Bcl-2 下调。这种凋亡相关蛋白的失调表明细胞凋亡途径在应对高氧时被激活。此外,在暴露于 H₂O₂ 的 AEC II 细胞中也观察到类似的凋亡相关蛋白变化,提示 HALI 相关凋亡至少部分源于氧化应激驱动的 AEC II 细胞凋亡。



注: SC-79 为蛋白激酶 B(Akt) 激活剂, siSIRT3 为沉默信息调节因子 3(SIRT3) 小干扰 RNA, Annexin V-FITC 为 Annexin V-异硫氰酸荧光素, PI 为碘化丙啶

图 7 流式细胞仪检测各组小鼠 MLE-12 细胞凋亡情况



注: SC-79 为蛋白激酶 B(Akt) 激活剂, siSIRT3 为沉默信息调节因子 3(SIRT3) 小干扰 RNA, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶, p-Akt 为磷酸化 Akt, cleaved caspase-3 为活化的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, LC3 为微管相关蛋白 1 轻链 3

图 8 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组小鼠 MLE-12 细胞蛋白表达

线粒体自噬是一种选择性自噬形式,已经成为维持线粒体质量控制和细胞稳态的关键过程^[25]。线粒体自噬是一种选择性降解线粒体的过程,可以清除受损的线粒体,防止 ROS 过度产生^[26]。维持线粒体健康及其生物能量平衡在 ALI 治疗中是必要的^[27]。本研究中通过提取线粒体蛋白并检测自噬相关指标,证明了 HALI 可诱导肺组织中线粒体自噬,自噬相关蛋白 LC3-II/I、Beclin-1、p62 表达水平改变有利于线粒体自噬激活,这表明线粒体自噬是应对高氧触发的一种保护机制,以清除受损的线粒体,维持线粒体健康。与此一致,在 H₂O₂ 刺激的 AEC II 细胞中,使用 3-MA 抑制线粒体自噬,加剧了细胞凋亡并破坏了细胞活性,突出了线粒体自噬在对抗 HALI 细胞损伤中的保护作用。

Akt 信号通路在细胞存活中起至关重要的作用,并广泛参与增殖、代谢、生长、抑制凋亡及调节自噬等多个关键细胞过程^[18]。前期研究已明确

了 Akt 激活在 HALI 中的保护作用^[17, 28-30]。本研究结果显示, Akt 信号通路在 HALI 小鼠和 H₂O₂ 处理的 AEC II 细胞中被抑制,并证实 Akt 激活可保护 AEC II 细胞对抗 H₂O₂ 诱导的细胞凋亡,增强细胞活性, Akt 激活还可促进线粒体自噬,表现为自噬相关蛋白调节和自噬流改变;相反,抑制 Akt 则进一步加剧细胞凋亡,破坏线粒体自噬,证实 Akt 介导的信号在减轻 H₂O₂ 诱导 AEC II 细胞凋亡中的重要性。

SIRT3 是一种线粒体去乙酰化酶,参与调节线粒体功能和细胞对氧化应激的反应^[31]。有研究表明, SIRT3 作为 Akt 下游靶点^[18],具有抗炎、抗凋亡作用^[32]。本研究结果显示,敲低 SIRT3 后,尽管给予 Akt 激活剂 SC-79,细胞线粒体自噬仍受抑制,凋亡显著增加,提示 SIRT3 是 Akt 通路下游介导细胞保护作用的重要靶点。

综上所述, HALI 启动了线粒体自噬和凋亡。此外, Akt/SIRT3 激活可促进保护性线粒体自噬,抑

制 H₂O₂ 诱导的 AEC II 细胞凋亡。因此,靶向 Akt/SIRT3 信号通路将是 HALI 的潜在治疗策略。本研究揭示了 Akt/SIRT3 信号通路通过线粒体自噬调控 HALI 中 AEC II 细胞凋亡的机制。与既往在心肌缺血再灌注及神经退行性疾病中报道的作用不同,HALI 具有独特的氧毒性病理环境和 AEC II 细胞特异性损伤模式,不仅补充了 Akt/SIRT3 信号通路在肺损伤中的作用证据,还提示了其在肺保护治疗中的潜在靶点价值。需要指出的是,本研究的线粒体自噬证据主要依赖于蛋白学检测,相关结论仍需通过透射电镜、共聚焦成像及体内功能学挽救实验进一步验证。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 苏德: 酝酿和设计实验、起草文章;余虹、梅鸿、冯帮海: 实施研究、采集数据、分析/解释数据、对文章的知识性内容作批评性审阅;郑杰: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、统计分析;刘君亚、刘鑫鑫、程丽婷: 实施研究、采集数据、分析/解释数据、统计分析;余琨: 实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章;覃松: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、获取研究经费

参考文献

- [1] Sohn MH, Kang MJ, Matsuura H, et al. The chitinase-like proteins breast regression protein-39 and YKL-40 regulate hyperoxia-induced acute lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010, 182(7): 918-928. DOI: 10.1164/rccm.200912-1793OC.
- [2] Hong JY, Kim MN, Kim EG, et al. Clusterin deficiency exacerbates hyperoxia-induced acute lung injury[J]. *Cells*, 2021, 10(4): 944. DOI: 10.3390/cells10040944.
- [3] Mizushima Y, Shirasuna K, Usui F, et al. NLRP3 protein deficiency exacerbates hyperoxia-induced lethality through Stat3 protein signaling independent of interleukin-1 β [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(8): 5065-5077. DOI: 10.1074/jbc.M114.603217.
- [4] Kim TS, Dodia C, Chen X, et al. Cloning and expression of rat lung acidic Ca²⁺-independent PLA2 and its organ distribution[J]. *Am J Physiol*, 1998, 274(5): L750-L761. DOI: 10.1152/ajplung.1998.274.5.L750.
- [5] Liu GY, Mei H, Chen M, et al. Protective effect of agmatine against hyperoxia-induced acute lung injury via regulating lncRNA gadd7[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(1): 68-74. DOI: 10.1016/j.bbrc.2019.04.164.
- [6] Chun KS, Jang JH, Kim DH. Perspectives regarding the intersections between STAT3 and oxidative metabolism in cancer[J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2202. DOI: 10.3390/cells9102202.
- [7] Gottlieb RA, Carreira RS. Autophagy in health and disease. 5. Mitophagy as a way of life[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2010, 299(2): C203-C210. DOI: 10.1152/ajpcell.00097.2010.
- [8] Zhu JB, Lee MJ, An JH, et al. ATF5 attenuates the secretion of pro-inflammatory cytokines in activated microglia[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3322. DOI: 10.3390/ijms24043322.
- [9] Hou HL, Er PC, Cheng JJ, et al. High expression of FUNDC1 predicts poor prognostic outcomes and is a promising target to improve chemoradiotherapy effects in patients with cervical cancer[J]. *Cancer Med*, 2017, 6(8): 1871-1881. DOI: 10.1002/cam4.1112.
- [10] Zheng J, Akbari M, Schirmer C, et al. Hippocampal tau oligomerization early in tau pathology coincides with a transient alteration of mitochondrial homeostasis and DNA repair in a mouse model of tauopathy[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8(1): 25. DOI: 10.1186/s40478-020-00896-8.
- [11] Yapyntseva MA, Maximchik PV, Zhivotovsky B, et al. Mitochondrial sirtuin 3 and various cell death modalities[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 947357. DOI: 10.3389/fcell.2022.947357.
- [12] Hu XM, Leak RK, Shi YJ, et al. Microglial and macrophage polarization: new prospects for brain repair[J]. *Nat Rev Neurol*, 2015, 11(1): 56-64. DOI: 10.1038/nrneuro.2014.207.
- [13] Tian YG, Zhang J. Protective effect of SIRT3 on acute lung injury by increasing manganese superoxide dismutase-mediated antioxidant[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5557-5565. DOI: 10.3892/mmr.2018.8469.
- [14] Koseoglu S, Lu ZM, Kumar C, et al. AKT1, AKT2 and AKT3-dependent cell survival is cell line-specific and knockdown of all three isoforms selectively induces apoptosis in 20 human tumor cell lines[J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6(5): 755-762. DOI: 10.4161/cbt.6.5.3995.
- [15] Liu XM, Li DL, Pi WH, et al. LCZ696 protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting ferroptosis via AKT/SIRT3/SOD2 signaling pathway activation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A): 109379. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109379.
- [16] Soutar MPM, Kempthorne L, Miyakawa S, et al. AKT signalling selectively regulates PINK1 mitophagy in SHSY5Y cells and human iPSC-derived neurons[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8855. DOI: 10.1038/s41598-018-26949-6.
- [17] 冯帮海, 梅鸿, 刘鑫鑫, 等. 微小 RNA-21-5p 通过激活 PI3K/Akt 信号通路调控 II 型肺泡上皮细胞凋亡减轻大鼠高氧性急性肺损伤[J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35(2): 140-145. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220317-00259.
- [18] Zuo HJ, Wang PX, Ren XQ, et al. Gastrodin regulates PI3K/AKT-Sirt3 signaling pathway and proinflammatory mediators in activated microglia [J]. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(5): 2728-2744. DOI: 10.1007/s12035-023-03743-8.
- [19] Qin S, Chen M, Ji H, et al. miR-21-5p regulates type II alveolar epithelial cell apoptosis in hyperoxic acute lung injury[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(4): 5796-5804. DOI: 10.3892/mmr.2018.8560.
- [20] Wang Y, Feinstein SI. Peroxiredoxin 6 as an antioxidant enzyme: protection of lung alveolar epithelial type II cells from H₂O₂-induced oxidative stress[J]. *J Cell Biochem*, 2008, 104(4): 1274-1285. DOI: 10.1002/jcb.21703.
- [21] Chu SJ, Tang SE, Pao HP, et al. A high-fiber diet or dietary supplementation of acetate attenuate hyperoxia-induced acute lung injury[J]. *Nutrients*, 2022, 14(24): 5231. DOI: 10.3390/nu14245231.
- [22] 王太珊, 尹贵珍, 刘国跃. 非编码 RNA 在高氧性急性肺损伤中作用的研究进展[J]. *中华危重病急救医学*, 2024, 36(4): 430-434. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230809-00597.
- [23] Li YC, Cao YM, Xiao J, et al. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 inhibits ferroptosis and alleviates intestinal ischemia/reperfusion-induced acute lung injury[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(9): 2635-2650. DOI: 10.1038/s41418-020-0528-x.
- [24] Cao Y, Zhang D, Moon HG, et al. miR-15a/16 regulates apoptosis of lung epithelial cells after oxidative stress[J]. *Mol Med*, 2016, 22: 233-243. DOI: 10.2119/molmed.2015.00136.
- [25] Shi J, Fung G, Deng H, et al. NBR1 is dispensable for PARK2-mediated mitophagy regardless of the presence or absence of SQSTM1[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(10): e1943. DOI: 10.1038/cddis.2015.278.
- [26] Zhong WJ, Yang XS, Zhou H, et al. Role of mitophagy in the pathogenesis of stroke: from mechanism to therapy[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 6232902. DOI: 10.1155/2022/6232902.
- [27] Ten VS, Ratner V. Mitochondrial bioenergetics and pulmonary dysfunction: current progress and future directions[J]. *Paediatr Respir Rev*, 2020, 34: 37-45. DOI: 10.1016/j.prrv.2019.04.001.
- [28] Cao HF, Feng Y, Ning YY, et al. Edaravone protects rats and human pulmonary alveolar epithelial cells against hyperoxia injury: heme oxygenase-1 and PI3K/Akt pathway may be involved[J]. *Exp Lung Res*, 2015, 41(7): 404-414. DOI: 10.3109/01902148.2015.1054053.
- [29] Ruan Y, Dong WB, Kang L, et al. The changes of Twist1 pathway in pulmonary microvascular permeability in a newborn rat model of hyperoxia-induced acute lung injury[J]. *Front Pediatr*, 2020, 8: 190. DOI: 10.3389/fped.2020.00190.
- [30] Soundararajan R, Hernández-Cuervo H, Stearns TM, et al. A-kinase anchor protein 1 deficiency causes mitochondrial dysfunction in mouse model of hyperoxia induced acute lung injury[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 980723. DOI: 10.3389/fphar.2022.980723.
- [31] Ren JH, Chen X, Zhou L, et al. Protective role of Sirtuin3 (SIRT3) in oxidative stress mediated by hepatitis B virus X protein expression[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0150961. DOI: 10.1371/journal.pone.0150961.
- [32] 廖贞亮, 冯帮海, 任颖聪, 等. 沉默信息调节因子 2 相关酶 3 调控自噬减轻 H₂O₂ 诱导的肺泡 II 型上皮细胞凋亡[J]. *实用医学杂志*, 2023, 39(11): 1389-1395. DOI: 10.3969/j.issn.1006-5725.2023.11.012.

(收稿日期: 2024-12-30)
(本文编辑: 保健媛 张耘菲)