

二甲双胍对急性肺损伤细胞凋亡、迁移和上皮-间质转化的影响及机制研究



扫描二维码
查看更多

欧阳运萍¹, 陈涛¹, 李鹏¹, 赵博², 杨小军³

【摘要】 目的 探讨二甲双胍对急性肺损伤细胞凋亡、迁移和上皮-间质转化(EMT)的影响及机制。方法 本实验时间为2022年6—11月。将人肺泡上皮细胞(A549细胞)分为对照组、过氧化氢(H₂O₂)组、2.5 mmol/L二甲双胍组、5.0 mmol/L二甲双胍组、10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组,对照组不做任何干预;H₂O₂组加入400 μmol/L H₂O₂作用24 h,以构建急性肺损伤细胞模型;2.5 mmol/L二甲双胍组、5.0 mmol/L二甲双胍组、10.0 mmol/L二甲双胍组在H₂O₂组基础上分别加入2.5、5.0、10.0 mmol/L二甲双胍进行干预;SB203580组在H₂O₂组基础上加入10.0 mmol/L p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路抑制剂——SB203580进行干预,选取细胞活力最佳时的药物浓度进行后续实验。将A549细胞分为对照组、H₂O₂组、10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组、抑制剂组和激活剂组,对照组、H₂O₂组、10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组干预方法同前,抑制剂组和激活剂组在10.0 mmol/L二甲双胍组基础上分别加入10 μmol/L SB203580和10 μmol/L p38 MAPK信号通路激活剂——C16-PAF。采用CCK-8法测定对照组、H₂O₂组、2.5 mmol/L二甲双胍组、5.0 mmol/L二甲双胍组、10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组细胞活力。采用Hoechst 33258染色法测定对照组、H₂O₂组、10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组、抑制剂组、激活剂组细胞凋亡率,划痕试验测定细胞迁移率,RT-qPCR法测定EMT相关因子[E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白、纤维连接蛋白(FN)] mRNA相对表达量,Western blot法测定EMT相关因子蛋白及p38 MAPK信号通路相关蛋白(p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK)相对表达量。**结果** H₂O₂组细胞活力低于对照组,5.0 mmol/L二甲双胍组、10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组细胞活力高于H₂O₂组,10.0 mmol/L二甲双胍组细胞活力高于5.0 mmol/L二甲双胍组($P<0.05$),选取10.0 mmol/L二甲双胍进行后续实验。H₂O₂组细胞凋亡率、细胞迁移率,N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量,磷酸化p38 MAPK相对表达量高于对照组,E-钙黏蛋白mRNA和蛋白相对表达量低于对照组($P<0.05$);10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组细胞凋亡率、细胞迁移率,N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量,磷酸化p38 MAPK相对表达量低于H₂O₂组,E-钙黏蛋白mRNA和蛋白相对表达量高于H₂O₂组($P<0.05$);抑制剂组细胞凋亡率、细胞迁移率,N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量,磷酸化p38 MAPK相对表达量低于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组,E-钙黏蛋白mRNA和蛋白相对表达量高于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组($P<0.05$);激活剂组细胞凋亡率、细胞迁移率,N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量,磷酸化p38 MAPK相对表达量高于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组,E-钙黏蛋白mRNA和蛋白相对表达量低于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组($P<0.05$)。**结论** 二甲双胍可抑制H₂O₂诱导的急性肺损伤的细胞凋亡、迁移和EMT,其作用机制可能与其抑制p38 MAPK信号通路激活有关。

【关键词】 急性肺损伤;肺泡上皮细胞;二甲双胍;细胞凋亡;细胞迁移;上皮-间质转化;p38丝裂原活化蛋白激酶类

【中图分类号】 R 563.9 **【文献标识码】** A **DOI:** 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.118

Effect and Mechanism of Metformin on Apoptosis, Cell Migration and Epithelial-Mesenchymal Transition in Acute Lung Injury OUYANG Yunping¹, CHEN Tao¹, LI Peng¹, ZHAO Bo², YANG Xiaojun³

1. Department of Emergency, Tangshan Union Hospital, Tangshan 063000, China

2. Department of Gastroenterology, Tangshan Union Hospital, Tangshan 063000, China

3. Department of Critical Care Medicine, Tangshan Union Hospital, Tangshan 063000, China

Corresponding author: YANG Xiaojun, E-mail: flyyv088@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect and mechanism of metformin on apoptosis, cell migration and

基金项目: 2022年度河北省医学科学研究课题项目(20221833)

作者单位: 1.063000河北省唐山市协和医院急诊科 2.063000河北省唐山市协和医院消化内科 3.063000河北省唐山市协和医院重症医学科

通信作者: 杨小军, E-mail: flyyv088@163.com

epithelial-mesenchymal transition (EMT) in acute lung injury. **Methods** The experiment was conducted from June to November 2022. Human alveolar epithelial cells (A549 cells) were divided into control group, hydrogen peroxide (H_2O_2) group, 2.5 mmol/L metformin group, 5.0 mmol/L metformin group, 10.0 mmol/L metformin group, SB203580 group, the control group were not intervened; the H_2O_2 group was added with 400 μ mol/L H_2O_2 for 24 hours to construct an in vitro model of acute lung injury; the 2.5 mmol/L metformin group, 5.0 mmol/L metformin group, and 10.0 mmol/L metformin group were added with 2.5, 5.0, and 10.0 mmol/L metformin on the basis of the H_2O_2 group, respectively; the SB203580 group was added with 10.0 mmol/L p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway inhibitor SB203580 on the basis of the H_2O_2 group. The drug concentration with optimal cell viability was selected for subsequent experiments. A549 cells were divided into control group, H_2O_2 group, 10.0 mmol/L metformin group, SB203580 group, inhibitor group and activator group, the intervention method was same as before in control group, H_2O_2 group, 10.0 mmol/L metformin group, SB203580 group, the inhibitor group and the activator group were added with 10 μ mol/L SB203580 and 10 μ mol/L p38 MAPK signaling pathway activator C16-PAF on the basis of the 10.0 mmol/L metformin group, respectively. CCK-8 method was used to measure the cell viability in the control group, H_2O_2 group, 2.5 mmol/L metformin group, 5.0 mmol/L metformin group, 10.0 mmol/L metformin group and SB203580 group. Hoechst 33258 staining method was used to determine the apoptosis rate, and scratch test was used to determine the cell migration rate, RT-qPCR was used to measure the mRNA relative expression of EMT-related factors [E-cadherin, N-cadherin, vimentin, and fibronectin (FN)], Western blot was used to detect the protein relative expression of EMT-related factors and relative expression of p38 MAPK signaling pathway-related proteins (p38 MAPK, p-p38 MAPK) in the control group, H_2O_2 group, 10.0 mmol/L metformin group, SB203580 group, inhibitor group, activator group. **Results** The cell viability of H_2O_2 group was lower than that of control group, the cell viability of 5.0 mmol/L metformin group, 10.0 mmol/L metformin group and SB203580 group was higher than that of H_2O_2 group, the cell viability of 10.0 mmol/L metformin group was higher than that of 5.0 mmol/L metformin group ($P < 0.05$), and 10.0 mmol/L metformin was selected for subsequent experiments. The apoptosis rate, cell migration rate, N-cadherin, vimentin, and FN mRNA and protein relative expression, and p-p38 MAPK relative expression in the H_2O_2 group were higher than those in the control group, and the E-cadherin mRNA and protein relative expression was lower than that in the control group ($P < 0.05$). The apoptosis rate, cell migration rate, N-cadherin, vimentin, and FN mRNA and protein relative expression, and p-p38 MAPK protein relative expression in the 10.0 mmol/L metformin group and SB203580 group were lower than those in the control group, and the E-cadherin mRNA and protein relative expression was higher than that in the H_2O_2 group ($P < 0.05$). The apoptosis rate, cell migration rate, N-cadherin, vimentin, and FN mRNA and protein relative expression, and p-p38 MAPK relative expression in the inhibitor group were lower than those in the 10.0 mmol/L metformin group and SB203580 group, and the E-cadherin mRNA and protein relative expression was higher than that in the 10.0 mmol/L metformin group and SB203580 group ($P < 0.05$). The apoptosis rate, cell migration rate, N-cadherin, vimentin, and FN mRNA and protein relative expression, and p-p38 MAPK relative expression in the activator group were higher than those in the 10.0 mmol/L metformin group and SB203580 group, and the E-cadherin mRNA and protein relative expression was lower than that in the 10.0 mmol/L metformin group and SB203580 group ($P < 0.05$). **Conclusion** Metformin can inhibit the apoptosis, cell migration and EMT of H_2O_2 -induced acute lung injury, and its mechanism may be related to the inhibition of p38 MAPK signaling pathway.

【Key words】 Acute lung injury; Alveolar epithelial cells; Metformin; Apoptosis; Cell migration; Epithelial-mesenchymal transition; p38 mitogen-activated protein kinases

急性肺损伤属于临床严重呼吸系统疾病之一, 具有高发病率和高死亡率, 是临床许多危重病患者发生急性呼吸衰竭的重要原因^[1]。目前, 临床上急性肺损伤的治疗手段对于提高患者生存质量效果不佳, 因此寻求治疗急性肺损伤的有效手段具有重要意义。二甲双胍是临床广泛用于治疗糖尿病的药物, 其疗效及安全性已得到充分证实。研究发现, 二甲双胍在减轻肺损伤方面具有一定作用^[2], 包括对脂多糖诱导的急性肺损伤^[3]。但二甲双胍对氧化应激造成急性肺损伤的作用机制研究较少。既往研究显示, 二甲双胍与p38丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase,

p38 MAPK) 信号通路关系密切^[4]。p38 MAPK是人体关键细胞内信号通路之一, 可参与多种呼吸系统疾病的发生与发展^[5]。近年来有p38 MAPK信号通路与急性肺损伤、慢性阻塞性肺疾病、哮喘等常见呼吸系统疾病相关的报道^[6]。另有研究显示, p38 MAPK信号通路参与了上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 进程^[7]。II型肺泡上皮细胞是氧化损伤的主要靶点, 其特点是较难分离获取且难以在体外传代^[8]。而人肺泡上皮细胞与II型肺泡上皮细胞的形态及生化特性相似, 因而本实验选择人肺泡上皮细胞作为研究对象, 探讨二甲双胍对急性肺损伤细胞凋亡、迁移和EMT

的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 实验时间 本实验时间为2022年6—11月。

1.2 主要材料、试剂及仪器 人肺泡上皮细胞(A549细胞)购自中国科学院细胞库。二甲双胍、过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2) (上海碧云天生物技术有限公司, 纯度 $\geq 98\%$), p38 MAPK信号通路抑制剂——SB203580、p38 MAPK信号通路激活剂——C16-PAF (上海源叶生物科技有限公司, 纯度 $\geq 99\%$), 胎牛血清(美国Gibco公司), F-12K培养基(含10%胎牛血清、1%青-链霉素)、RIPA裂解液、CCK-8试剂盒(日本Dojindo公司), Hoechst 33258染色液(上海爱必信生物科技有限公司), 鼠抗人抗体[E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)、p38 MAPK、磷酸化p38 MAPK、 β -actin一抗]、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG(二抗)(英国Abcam公司), 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。MCO18AIC型 CO_2 培养箱(日本三洋电机公司), MF52-N型倒置荧光显微镜(广州市明美光电技术有限公司), IMARK型酶标仪(美国BIO-RAD公司), FluorChem HD2型凝胶成像系统(美国Proteinsimple公司)。

1.3 细胞培养 取液氮中冻存的A549细胞进行复苏, 将其置于F-12K培养基中, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 5% CO_2 条件下培养, 待细胞贴壁达80%以上时进行细胞传代, 取第3代对数生长期细胞进行后续实验。

1.4 分组及给药 将A549细胞分为对照组、 H_2O_2 组、 2.5 mmol/L 二甲双胍组、 5.0 mmol/L 二甲双胍组、 10.0 mmol/L 二甲双胍组、SB203580组, 对照组不做任何干预; H_2O_2 组加入 $400\text{ }\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 作用24 h, 以构建体外急性肺损伤细胞模型; 2.5 mmol/L 二甲双胍组、 5.0 mmol/L 二甲双胍组、 10.0 mmol/L 二甲双胍组在 H_2O_2 组基础上分别加入 2.5 、 5.0 、 10.0 mmol/L 二甲双胍进行干预; SB203580组在 H_2O_2 组基础上加入 10.0 mmol/L SB203580进行干预, 选取细胞活力最佳时的药物浓度进行后续实验。

将A549细胞分为对照组、 H_2O_2 组、 10.0 mmol/L 二甲双胍组、SB203580组、抑制剂组和激活剂组, 对照组、 H_2O_2 组、 10.0 mmol/L 二甲双胍组、SB203580组干预方法同前, 抑制剂组和激活剂组在 10.0 mmol/L 二甲双胍组基础上分别加入 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ SB203580和 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ C16-PAF。在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 5% CO_2 条件下培养, 每组设置3个复孔。

1.5 CCK-8法测定细胞活力 取对照组、 H_2O_2 组、 2.5 mmol/L 二甲双胍组、 5.0 mmol/L 二甲双胍组、 10.0 mmol/L 二甲双胍组、SB203580组A549细胞, 调整

密度为 2×10^5 个/ml, 将其接种至96孔板中, 每孔加入细胞悬液 $100\text{ }\mu\text{l}$ 。各组干预24 h后, 加入 $10\text{ }\mu\text{l}$ CCK-8溶液孵育2 h, 使用酶标仪测定各组OD值(450 nm 处), 计算细胞活力, 细胞活力($\%$) = (目标组OD值-空白组OD值)/空白组OD值 $\times 100\%$ 。实验独立重复3次。

1.6 Hoechst 33258染色法测定细胞凋亡率 取对照组、 H_2O_2 组、 10.0 mmol/L 二甲双胍组、SB203580组、抑制剂组、激活剂组A549细胞, 用PBS洗涤2次、 5 min/次 , 加入 4% 多聚甲醛溶液, 于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 环境下固定 10 min ; 用PBS洗涤3次, 加入 5 mg/L Hoechst 33258染色液染色 10 min ; 用PBS洗涤3次, 封固后在倒置荧光显微镜下观察细胞凋亡情况。细胞凋亡特征为细胞核体积浓缩变小, 染色不均, 浓染且所发荧光较强, 呈亮蓝色。计算细胞凋亡率, 细胞凋亡率($\%$) = 凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。实验独立重复3次。

1.7 划痕试验测定细胞迁移率 取对照组、 H_2O_2 组、 10.0 mmol/L 二甲双胍组、SB203580组、抑制剂组、激活剂组A549细胞, 将细胞接种于6孔板, 密度达到 90% 时, 采用 $200\text{ }\mu\text{l}$ 移液器枪头进行划痕试验, 在 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、 5% CO_2 条件下培养24 h。采用倒置荧光显微镜拍照记录0 h和24 h划痕情况, 计算划痕面积并将其分别记为 $S_{0\text{ h}}$ 和 $S_{24\text{ h}}$, 计算细胞迁移率, 细胞迁移率 = ($S_{0\text{ h}} - S_{24\text{ h}}$)/ $S_{0\text{ h}} \times 100\%$ 。实验独立重复3次。

1.8 RT-qPCR法测定EMT相关因子mRNA相对表达量 取对照组、 H_2O_2 组、 10.0 mmol/L 二甲双胍组、SB203580组、抑制剂组、激活剂组A549细胞, 采用RNA抽提试剂盒提取细胞样本总RNA, 采用NanoDrop检测RNA的浓度及纯度, 并将其反转录合成模板链cDNA, 取 $2\text{ }\mu\text{l}$ 反转录产物进行PCR(引物序列: GAPDH上游引物为 $5'$ -TGACTTCAACAGCGACACCCA- $3'$, 下游引物为 $5'$ -CACCTGTTGCTGTAGCCAAA- $3'$; E-钙黏蛋白上游引物为 $5'$ -CGAGAGCTACACGTTTACGG- $3'$, 下游引物为 $5'$ -GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG- $3'$; N-钙黏蛋白上游引物为 $5'$ -AGAGGAAGAC CAGGACTATGACTTGAG- $3'$, 下游引物为 $5'$ -TACTGTGGCTCAGCGTGGATAGG- $3'$; 波形蛋白上游引物为 $5'$ -GCGTGACGTACGTCAGCAATATGA- $3'$, 下游引物为 $5'$ -GTTCCAGGGACTCATTGGTTCCTT- $3'$; FN上游引物为 $5'$ -TGGAGGAAGCCGAGGTTT- $3'$, 下游引物为 $5'$ -CAGCGGTTTGCGATGGA- $3'$), 以GAPDH作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的mRNA相对表达量。实验独立重复3次。

1.9 Western blot法测定EMT相关因子蛋白及p38 MAPK信号通路相关蛋白相对表达量 取对照组、 H_2O_2 组、 10.0 mmol/L 二甲双胍组、SB203580组、抑制剂组、激活剂组A549细胞, 提取蛋白并进行

定量后上样,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE),转至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,封闭2 h后参照抗体说明书加入按照一定比例稀释的一抗,4 ℃孵育过夜,次日用TBST洗涤后加入山羊抗鼠IgG二抗,孵育2 h,洗涤3次,最后加入显影液,使用凝胶成像系统拍照记录。蛋白灰度值用G表示,计算蛋白相对表达量,蛋白相对表达量= $G_{目的蛋白}/G_{\beta-actin}$ 。实验独立重复3次。

1.10 统计学方法 采用SPSS 25.0统计学软件进行数据分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活力 干预24 h后,对照组细胞活力为(0.967 ± 0.098), H_2O_2 组为(0.423 ± 0.063),2.5 mmol/L二甲双胍组为(0.500 ± 0.062),5.0 mmol/L二甲双胍组为(0.746 ± 0.086),10.0 mmol/L二甲双胍组为(0.826 ± 0.097),SB203580组为(0.856 ± 0.090)。六组细胞活力比较,差异有统计学意义($F=19.386$, $P < 0.001$);其中 H_2O_2 组细胞活力低于对照组,5.0 mmol/L二甲双胍组、10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组细胞活力高于 H_2O_2 组,10.0 mmol/L二甲双胍组细胞活力高于5.0 mmol/L二甲双胍组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。本研究选取细胞活力最佳时的药物浓度(10.0 mmol/L二甲双胍)进行后续实验。

2.2 细胞凋亡率、细胞迁移率 六组细胞凋亡率、细胞迁移率比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);其中 H_2O_2 组细胞凋亡率、细胞迁移率高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组细胞凋亡率、细胞迁移率低于 H_2O_2 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);抑制剂组细胞凋亡率、细胞迁移率低于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组,差异有统计学意义($P < 0.05$);激活剂组细胞凋亡率、细胞迁移率高于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1、图1~2。

2.3 EMT相关因子mRNA和蛋白相对表达量 六组E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);其中 H_2O_2 组E-钙黏蛋白mRNA和蛋白相对表达量低于对照组,N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组E-钙黏蛋白mRNA和蛋白相对表达量高于 H_2O_2 组,N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量低于 H_2O_2 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);抑制剂组E-钙黏蛋白

表1 六组细胞凋亡率、细胞迁移率比较($\bar{x} \pm s$, %, $n=3$)

Table 1 Comparison of apoptosis rate and cell migration rate among the six groups

组别	细胞凋亡率	细胞迁移率
对照组	5.00 ± 1.00	5.06 ± 0.52
H_2O_2 组	60.00 ± 6.35^a	50.36 ± 6.54^a
10.0 mmol/L二甲双胍组	33.67 ± 3.42^b	20.83 ± 2.78^b
SB203580组	33.33 ± 3.51^b	20.14 ± 2.23^b
抑制剂组	9.00 ± 1.73^{cd}	3.22 ± 0.33^{cd}
激活剂组	54.33 ± 6.21^{cd}	34.51 ± 4.39^{cd}
F值	85.654	76.906
P值	< 0.001	< 0.001

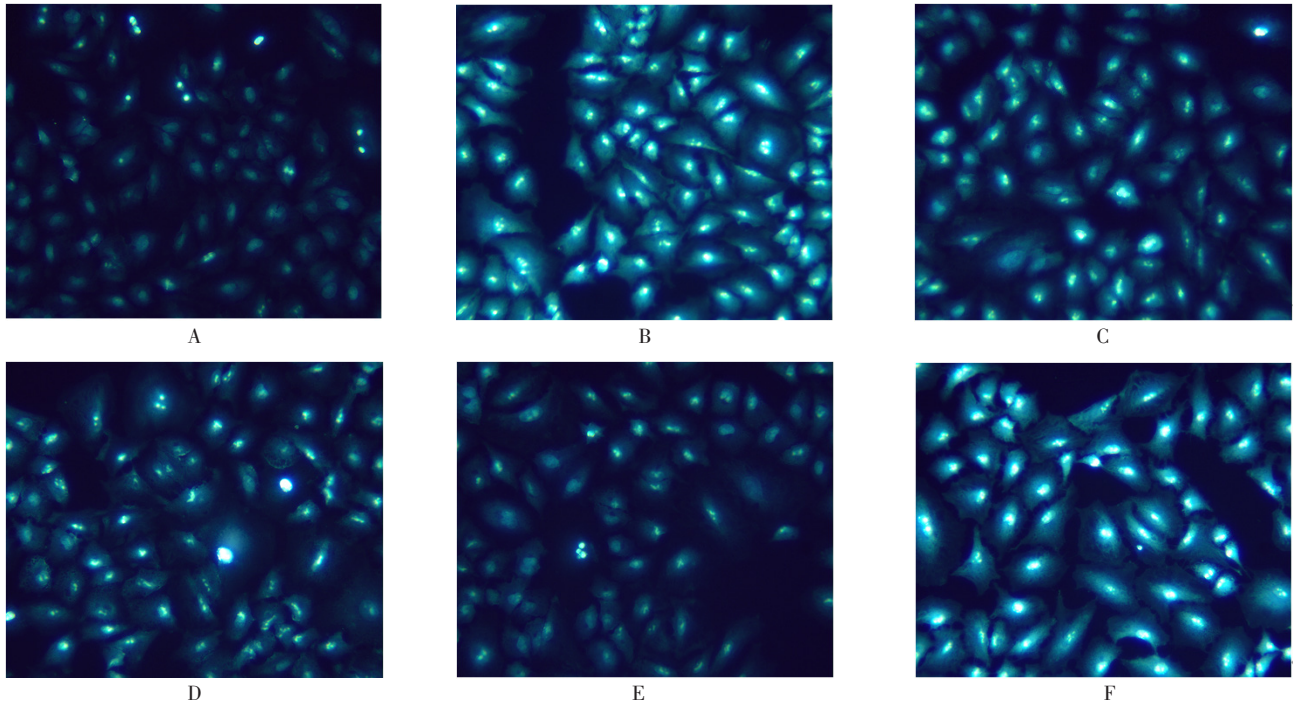
注: H_2O_2 =过氧化氢;^a表示与对照组比较, $P < 0.05$;^b表示与 H_2O_2 组比较, $P < 0.05$;^c表示与10.0 mmol/L二甲双胍组比较, $P < 0.05$;^d表示与SB203580组比较, $P < 0.05$

mRNA和蛋白相对表达量高于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组,N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量低于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组,差异有统计学意义($P < 0.05$);激活剂组E-钙黏蛋白mRNA和蛋白相对表达量低于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组,N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量高于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2、图3。

2.4 p38 MAPK信号通路相关蛋白相对表达量 六组p38 MAPK相对表达量比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。六组磷酸化p38 MAPK相对表达量比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);其中 H_2O_2 组磷酸化p38 MAPK相对表达量高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组磷酸化p38 MAPK相对表达量低于 H_2O_2 组,差异有统计学意义($P < 0.05$);抑制剂组磷酸化p38 MAPK相对表达量低于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组,差异有统计学意义($P < 0.05$);激活剂组磷酸化p38 MAPK相对表达量高于10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表3、图4。

3 讨论

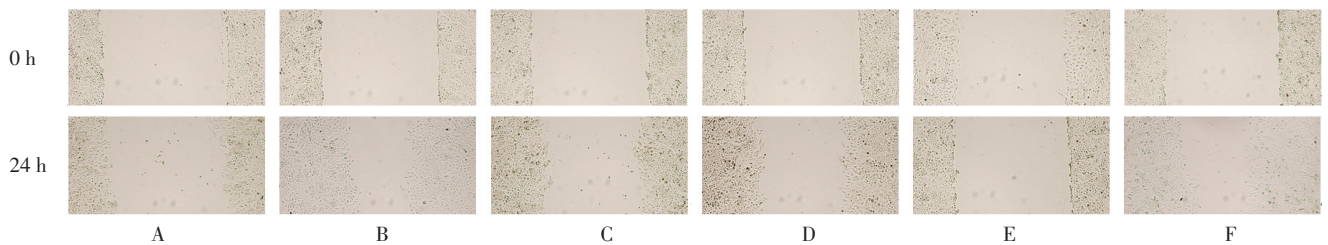
急性肺损伤的发病机制较为复杂且尚未完全明确,属于临床常见的危重症。急性肺损伤能够造成弥漫性肺间质及肺泡水肿,促使机体出现急性低氧性呼吸功能不全,对患者生命造成严重威胁^[9]。目前临床上仍以机械通气为基础对症治疗急性肺损伤,但患者病死率较高^[10]。因此,探究能够有效抑制急性肺损伤发生及发展的药物意义重大。二甲双胍为双胍类口服降糖药,在临床上已经应用多年^[11],近年来研究发现,二甲双胍除了具有降糖作用外,还能发挥抗炎作用以及减少氧化应激损伤^[12]。据报道,二甲双胍能够对内毒素诱导的急性肺损伤发挥抗炎作用^[13]。盛琦等^[14]研究显



注：A表示对照组，B表示过氧化氢（H₂O₂）组，C表示10.0 mmol/L二甲双胍组，D表示SB203580组，E表示抑制剂组，F表示激活剂组

图1 六组细胞凋亡情况（Hoechst 33258染色，×20）

Figure 1 Cell apoptosis in six groups



注：A表示对照组，B表示H₂O₂组，C表示10.0 mmol/L二甲双胍组，D表示SB203580组，E表示抑制剂组，F表示激活剂组

图2 六组细胞迁移情况

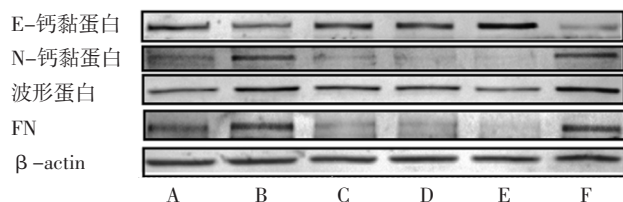
Figure 2 Cell migration of the six groups

表2 六组EMT相关因子mRNA和蛋白相对表达量比较（ $\bar{x} \pm s$, n=3）

Table 2 Comparison of mRNA and protein relative expression of EMT-related factors among the six groups

组别	E-钙黏蛋白		N-钙黏蛋白		波形蛋白		FN	
	mRNA相对表达量	蛋白相对表达量	mRNA相对表达量	蛋白相对表达量	mRNA相对表达量	蛋白相对表达量	mRNA相对表达量	蛋白相对表达量
对照组	1.01 ± 0.10	0.85 ± 0.09	0.43 ± 0.05	0.39 ± 0.04	0.64 ± 0.07	0.65 ± 0.07	0.57 ± 0.06	0.59 ± 0.06
H ₂ O ₂ 组	0.58 ± 0.06 ^a	0.50 ± 0.07 ^a	0.66 ± 0.07 ^a	0.51 ± 0.06 ^a	0.89 ± 0.09 ^a	0.87 ± 0.07 ^a	0.95 ± 0.10 ^a	0.89 ± 0.09 ^a
10.0 mmol/L二甲双胍组	0.71 ± 0.08 ^b	0.69 ± 0.07 ^b	0.49 ± 0.06 ^b	0.37 ± 0.03 ^b	0.76 ± 0.08 ^b	0.79 ± 0.08 ^b	0.76 ± 0.08 ^b	0.26 ± 0.03 ^b
SB203580组	0.71 ± 0.08 ^b	0.63 ± 0.07 ^b	0.49 ± 0.04 ^b	0.23 ± 0.03 ^b	0.75 ± 0.09 ^b	0.73 ± 0.08 ^b	0.76 ± 0.09 ^b	0.26 ± 0.02 ^b
抑制剂组	0.91 ± 0.07 ^{cd}	1.04 ± 0.11 ^{cd}	0.26 ± 0.02 ^{cd}	0.20 ± 0.02 ^{cd}	0.61 ± 0.07 ^{cd}	0.56 ± 0.06 ^{cd}	0.56 ± 0.06 ^{cd}	0.11 ± 0.01 ^{cd}
激活剂组	0.39 ± 0.04 ^{cd}	0.30 ± 0.04 ^{cd}	0.60 ± 0.07 ^{cd}	0.51 ± 0.06 ^{cd}	0.88 ± 0.09 ^{cd}	0.89 ± 0.09 ^{cd}	0.94 ± 0.08 ^{cd}	0.77 ± 0.08 ^{cd}
F值	27.233	33.247	19.606	28.827	6.058	8.615	13.657	91.938
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.005	0.001	<0.001	<0.001

注：FN=纤维连接蛋白；^a表示与对照组比较，P<0.05；^b表示与H₂O₂组比较，P<0.05；^c表示与10.0 mmol/L二甲双胍组比较，P<0.05；^d表示与SB203580组比较，P<0.05



注: FN=纤维连接蛋白; A表示对照组, B表示H₂O₂组, C表示10.0 mmol/L二甲双胍组, D表示SB203580组, E表示抑制剂组, F表示激活剂组

图3 六组EMT相关因子蛋白表达SDS-PAGE图

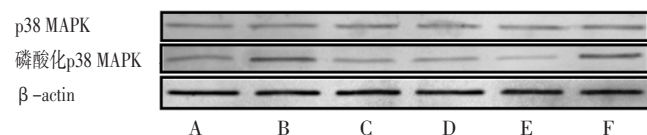
Figure 3 SDS-PAGE of protein expression of EMT-related factors in the six groups

表3 六组p38 MAPK信号通路相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Comparison of protein relative expression of p38 MAPK signaling pathway-related among the six groups

组别	p38 MAPK	磷酸化p38 MAPK
对照组	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.04
H ₂ O ₂ 组	0.38 ± 0.04	0.64 ± 0.07 ^a
10.0 mmol/L二甲双胍组	0.40 ± 0.05	0.27 ± 0.03 ^b
SB203580组	0.40 ± 0.05	0.26 ± 0.03 ^b
抑制剂组	0.38 ± 0.04	0.13 ± 0.02 ^{cd}
激活剂组	0.40 ± 0.05	0.49 ± 0.05 ^{cd}
F值	0.259	53.464
P值	0.927	<0.001

注: p38 MAPK=p38丝裂原活化蛋白激酶; ^a表示与对照组比较, $P<0.05$; ^b表示与H₂O₂组比较, $P<0.05$; ^c表示与10.0 mmol/L二甲双胍组比较, $P<0.05$; ^d表示与SB203580组比较, $P<0.05$



注: p38 MAPK=p38丝裂原活化蛋白激酶; A表示对照组, B表示H₂O₂组, C表示10.0 mmol/L二甲双胍组, D表示SB203580组, E表示抑制剂组, F表示激活剂组

图4 六组p38 MAPK信号通路相关蛋白表达SDS-PAGE图

Figure 4 SDS-PAGE of protein expression of p38 MAPK signaling pathway-related in the six groups

示,二甲双胍对H₂O₂诱导的细胞损伤具有保护作用。另有研究表明,二甲双胍能够减轻脂多糖诱导的急性肺损伤^[15],但二甲双胍对H₂O₂诱导的急性肺损伤的作用未见报道。本研究结果显示,H₂O₂组细胞活力低于对照组,提示H₂O₂可以诱导A549细胞氧化损伤,降低细胞活力。加入二甲双胍处理后,5.0 mmol/L二甲双胍组、10.0 mmol/L二甲双胍组和SB203580组细胞活力高于H₂O₂组,说明5.0、10.0 mmol/L二甲双胍和SB203580可以减轻H₂O₂诱导的氧化损伤,提高细胞活力。本研究选取干预细胞活力的最佳药物浓度(10.0 mmol/L二甲双胍)进行后续实验,结果显示,H₂O₂组细胞凋亡率、细胞迁移

率高于对照组,说明H₂O₂可促进人肺泡上皮细胞凋亡和细胞迁移;加入10.0 mmol/L二甲双胍和SB203580后,细胞凋亡率、细胞迁移率降低,说明10.0 mmol/L二甲双胍和SB203580均可以抑制H₂O₂诱导的细胞凋亡和细胞迁移,这与熊存全等^[16]研究报道相符。EMT典型特征是在一系列生物学过程中获得具有迁移性与侵袭性间充质表型,其进程与细胞侵袭、迁移能力关系密切,E-钙黏蛋白和N-钙黏蛋白是EMT进程中极为重要的调控因子^[17-18]。本研究结果显示,与对照组比较,H₂O₂组E-钙黏蛋白mRNA和蛋白相对表达量降低,N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量升高,10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组E-钙黏蛋白mRNA和蛋白相对表达量高于H₂O₂组,N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量低于H₂O₂组,提示10.0 mmol/L二甲双胍和SB203580可抑制H₂O₂诱导的急性肺损伤EMT。

p38 MAPK信号通路在炎症和应激反应中发挥着重要作用,其可诱导炎症及细胞凋亡^[19]。近年来研究表明,p38 MAPK信号通路与急性肺损伤关系密切^[20]。陈昱晓等^[21]研究显示,急性肺损伤小鼠体内存在p38 MAPK信号通路相关蛋白过度激活情况,而阻断该信号通路则能够减轻肺损伤。王贵佐等^[22]研究显示,二甲双胍可对脂多糖诱导的急性肺损伤发挥保护作用。武丽涛等^[23]研究表明,二甲双胍可能通过抑制p38 MAPK信号通路来发挥抗炎作用。另有研究表明,黄芩苷能够通过抑制p38 MAPK信号通路而有效减轻脂多糖所致的急性肺损伤^[24]。既往关于二甲双胍对脂多糖诱导的急性肺损伤影响的研究较多,但关于二甲双胍在H₂O₂诱导A549细胞发生急性肺损伤过程中对p38 MAPK信号通路的调控作用未见报道,本研究结果显示,H₂O₂组磷酸化p38 MAPK相对表达量高于对照组,10.0 mmol/L二甲双胍组、SB203580组磷酸化p38 MAPK相对表达量低于H₂O₂组,提示二甲双胍和SB203580可能抑制了p38 MAPK信号通路的激活。本研究在10.0 mmol/L二甲双胍组基础上分别加入SB203580和C16-PAF发现,与10.0 mmol/L二甲双胍组比较,抑制剂组细胞凋亡率、细胞迁移率、N-钙黏蛋白、波形蛋白、FN mRNA和蛋白相对表达量、磷酸化p38 MAPK相对表达量降低,E-钙黏蛋白mRNA和蛋白相对表达量升高,激活剂组则与抑制剂组结果相反,提示二甲双胍可能通过抑制p38 MAPK信号通路激活而抑制H₂O₂诱导的细胞凋亡、迁移及EMT。

综上所述,二甲双胍可能通过抑制p38 MAPK信号通路激活而抑制H₂O₂诱导的急性肺损伤人肺泡上皮细胞凋亡、迁移及EMT。下一步需在动物模型中探究二甲双胍对H₂O₂诱导的急性肺损伤的作用机制,为阻断急性肺损伤的相关研究提供更为全面的理论参考。

作者贡献：欧阳运萍进行文章的构思与设计，论文的修订；陈涛进行研究的实施与可行性分析；李鹏进行资料收集；欧阳运萍、陈涛负责论文撰写；赵博进行统计学处理；杨小军进行资料整理，负责文章的质量控制及审校，对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] 陈国兵, 马琪林. 丹参对实验动物急性肺损伤的保护作用研究进展 [J]. 儿科药学杂志, 2020, 26 (12): 59-62. DOI: 10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2020.12.018.
- [2] ZHANG X C, SHANG F T, HUI L L, et al. The alleviative effects of metformin for lipopolysaccharide-induced acute lung injury rat model and its underlying mechanism [J]. Saudi Pharm J, 2017, 25 (4): 666-670. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.05.001.
- [3] VAEZ H, NAJAFI M, TOUTOUNCHI N S, et al. Metformin alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through suppressing Toll-like receptor 4 signaling [J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2016, 15 (6): 498-507.
- [4] 姚新明, 孔祥, 赵咏莉, 等. 二甲双胍抑制高糖培养大鼠肾小球系膜细胞内P38MAPK信号通路与氧化应激 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 23 (6): 614-620. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2018.06.003.
- [5] 姚忠岩, 瞿敏, 孙文波, 等. 甲泼尼龙减轻大鼠呼吸机相关性肺损伤机制与p38 MAPK/NLRP3通路的关系 [J]. 中华麻醉学杂志, 2021, 41 (12): 1528-1531. DOI: 10.3760/ema.j.cn131073.20210926.01228.
- [6] 吕天宜, 李得民, 程思益, 等. 呼吸系统疾病中p38 MAPK信号通路对糖皮质激素受体的调控 [J]. 医学综述, 2021, 27 (4): 625-630. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2021.04.001.
- [7] 黄丽丽, 祝小林, 邓伟谦, 等. p38 MAPK信号通路介导晚期氧化蛋白产物诱导的肾小管上皮细胞间充质转分化 [J]. 南方医科大学学报, 2016, 36 (9): 1209-1214. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2016.09.08.
- [8] 高健美, 李德芬, 牛爽, 等. 金丝桃苷对过氧化氢诱导的A549细胞氧化损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (11): 128-133. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110128.
- [9] SUZUKI A, KONDOH Y, BROWN K K, et al. Acute exacerbations of fibrotic interstitial lung diseases [J]. Respirology, 2020, 25 (5): 525-534. DOI: 10.1111/resp.13682.
- [10] DAI Y L, HSU R J, HUANG H K, et al. Adaptive support ventilation attenuates postpneumonectomy acute lung injury in a porcine model [J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2020, 31 (5): 718-726. DOI: 10.1093/icvts/ivaa157.
- [11] SONNENBLICK A, AGBOR-TARH D, BRADBURY I, et al. Impact of diabetes, insulin, and metformin use on the outcome of patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive primary breast cancer: analysis from the ALTO phase III randomized trial [J]. J Clin Oncol, 2017, 35 (13): 1421-1429. DOI: 10.1200/JCO.2016.69.7722.
- [12] 宋翠豪, 王睿, 陈双景, 等. 二甲双胍对HaCaT细胞增殖分化和炎症因子分泌的影响 [J]. 中华皮肤科杂志, 2019, 52 (1): 25-32. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0412-4030.2019.01.006.
- [13] 吴柯佳. 二甲双胍通过AMPK抑制mTORC1并减轻内毒素诱导的急性肺损伤 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2017.
- [14] 盛琦, 王国涛, 徐道剑. 二甲双胍通过激活Nrf2通路干预PC12细胞H₂O₂氧化损伤的机制研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2021, 31 (10): 904-908. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4561.2021.10.006.
- [15] WANG Y P, CHEN H Q, SUN C L, et al. Metformin attenuates lipopolysaccharide-induced epithelial cell senescence by activating autophagy [J]. Cell Biol Int, 2021, 45 (5): 927-935. DOI: 10.1002/cbin.11536.
- [16] 熊存全, 胡君, 周红成, 等. 姜黄素对H₂O₂诱导A549细胞氧化损伤的保护作用及机制研究 [J]. 现代预防医学, 2018, 45 (21): 3937-3941.
- [17] CHEN S M, ZHAO E F. Development and validation of a robust epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related prognostic signature for hepatocellular carcinoma [J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2021, 45 (5): 101587. DOI: 10.1016/j.clinre.2020.101587.
- [18] NAN Y, GUO L Y, LU Y L, et al. MiR-451 suppresses EMT and metastasis in glioma cells [J]. Cell Cycle, 2021, 20 (13): 1270-1278. DOI: 10.1080/15384101.2021.1933303.
- [19] LIU K H, LIU E S, LIN L, et al. L-Theanine mediates the p38MAPK signaling pathway to alleviate heat-induced oxidative stress and inflammation in mice [J]. Food Funct, 2022, 13 (4): 2120-2130. DOI: 10.1039/d1fo03077a.
- [20] LI D D, REN W Y, JIANG Z L, et al. Regulation of the NLRP3 inflammasome and macrophage pyroptosis by the p38 MAPK signaling pathway in a mouse model of acute lung injury [J]. Mol Med Rep, 2018, 18 (5): 4399-4409. DOI: 10.3892/mmr.2018.9427.
- [21] 陈昱晓, 王娜, 徐李玲, 等. 金桔精油通过抑制p38MAPK和NF- κ B信号通路减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36 (6): 863-868. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2019.06.001.
- [22] 王贵佐, 韩冬, 马惠辉, 等. 二甲双胍对小鼠急性肺损伤的保护作用及可能机制研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36 (8): 919-922. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2020.08.005.
- [23] 武丽涛, 孙娟, 王愉涵, 等. 二甲双胍对D-氨基半乳糖联合Pam3CSK4诱导的SD大鼠的急性肝损伤及炎症反应的作用及机制 [J]. 西安交通大学学报 (医学版), 2018, 39 (1): 41-46. DOI: 10.7652/jdyxb201801010.
- [24] 夏金婵, 从人愿, 袁静, 等. 黄芩苷通过p38 MAPK/NLRP3通路对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28 (2): 79-86. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20220104.

(收稿日期: 2022-12-29; 修回日期: 2023-03-25)

(本文编辑: 陈素芳)