

· 论著 ·

细胞外信号调节激酶 1/2 磷酸化参与高压氧预处理对脂多糖诱发人肺泡 II 型上皮细胞损伤的保护机制

佟冬怡¹ 王微微² 于威威¹ 徐莹¹ 刘坤¹ 苏鹏^{3,4} 赵平¹

¹ 中国医科大学附属盛京医院麻醉科, 沈阳 110004; ² 名古屋大学大学院医学系研究科生物化学讲座分子细胞化学分野, 名古屋市 23100-2, 日本; ³ 辽宁省环境与代谢疾病动物模型研究与应用重点实验室, 本溪 117004; ⁴ 中国医科大学附属盛京医院动物实验中心, 本溪 117004

通信作者: 赵平, Email: zhaop@sj-hospital.org

【摘要】 目的 评价高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)预处理对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱发人肺泡 II 型上皮细胞损伤的影响以及细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular regulated protein kinase1/2, Erk1/2)磷酸化调节线粒体功能参与该保护作用的机制。**方法** 人肺泡 II 型上皮细胞株 A549 细胞, 长至对数生长期时, 以 0.5×10^6 个/ml 密度接种于培养板, 2 ml/孔, 147 个培养孔采用随机数字表法分为 7 组(每组 21 孔): 对照组(C 组)、LPS 组、HBO 预处理+LPS 组(HBO+LPS 组)、Erk1/2 磷酸化阻断+HBO+LPS 组(PD+HBO+LPS 组)、HBO 预处理对照组(HBO 组)、Erk1/2 磷酸化阻断组(PD 组)、Erk1/2 磷酸化阻断+LPS 组(PD+LPS 组)。其中 Erk1/2 磷酸化阻断处理方法为向培养基内加入 Erk1/2 磷酸化阻断剂 PD98059, 终浓度为 $30 \mu\text{mol/L}$, 处理时间为 1 h。HBO 预处理方法为将培养基置于高压氧舱内, 以 76 mmHg/min ($1 \text{ mmHg}=0.133 \text{ kPa}$) 的速率向舱内匀速加压 760 mmHg , 并保持 1 h。LPS 处理终浓度为 1 mg/L , 处理 4 h。采用膜联蛋白 V/碘化丙啶双染流式细胞术检测细胞凋亡情况, 采用免疫荧光法测定纤维状肌动蛋白(filament actin, F-actin)表达, 采用荧光素-荧光素酶试剂盒测定 ATP 含量, 采用 Western blot 法测定磷酸化 Erk1/2 以及促凋亡因子 Bid、Bim 和 Puma 的表达水平。**结果** 与 C 组比较, LPS 组和 HBO+LPS 组细胞凋亡率升高, F-actin 重构程度增加, ATP 含量下降, 磷酸化 Erk1/2 表达下降, 促凋亡因子 Bid、Bim 和 Puma 表达升高($P<0.05$); 与 LPS 组比较, HBO+LPS 组细胞凋亡率降低, F-actin 重构程度降低, ATP 含量升高, 磷酸化 Erk1/2 表达上升, 促凋亡因子 Bid、Bim 和 Puma 表达下降($P<0.05$); 与 HBO+LPS 组比较, PD+HBO+LPS 组细胞凋亡率升高, F-actin 重构程度增加, ATP 含量下降, 磷酸化 Erk1/2 表达下降, 促凋亡因子 Bid、Bim 和 Puma 表达升高($P<0.05$)。**结论** HBO 预处理对 LPS 诱发人肺泡 II 型上皮细胞损伤的保护作用可能与 Erk1/2 磷酸化后保护线粒体功能相关。

【关键词】 高压氧; 肺泡; 上皮细胞; 内毒素血症; 线粒体; 细胞外信号调节激酶 1/2

基金项目: 辽宁省高等学校基本科研课题项目(LQNK201712); 国家自然科学基金面上项目(81870838, 81671311); 盛京自由研究者项目(201708); 辽宁省重点研发项目(2018225004); 国家自然科学基金青年项目(81701219)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.05.005

Effects of hyperbaric oxygen preconditioning on lipopolysaccharide-induced damage to human alveolar type II epithelial cells via extracellular regulated protein kinases 1/2 signal pathwayTong Dongyi¹, Wang Weiwei², Yu Weiwei¹, Xu Ying¹, Liu Kun¹, Su Peng^{3,4}, Zhao Ping¹

¹Department of Anesthesiology, China Medical University, Shengjing Hospital, Shenyang 110004, China; ²Department of Molecular Biochemistry, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 23100-2, Japan; ³Key Laboratory of Research and Application of Animal Model for Environmental and Metabolic Disease, Benxi 117004, China; ⁴Animal Research Center, China Medical University, Shengjing Hospital, Benxi 117004, China

Corresponding author: Zhao Ping, Email: zhaop@sj-hospital.org

【Abstract】 Objective To investigate effects of hyperbaric oxygen (HBO) preconditioning on lipopolysaccharide (LPS)-induced damage to human alveolar type II epithelial cells via extracellular regulated protein kinases 1/2 (Erk1/2) signal pathway. **Methods** A549 cells at the logarithmic growth phase were seeded in plates (density 0.5×10^6 cells/ml, 2 ml/well), a total of 147 wells. The cells were randomly divided into 7 groups ($n=21$): C group, LPS group, HBO+LPS group, PD+HBO+LPS group, HBO group, PD group and PD+LPS group. LPS was stimulated by LPS 1 mg/L for 4 h. After LPS exposure, the culture of HBO+LPS, PD+HBO+LPS groups were treated with 100 kPa HBO for 1 h. The cultures in PD+HBO+LPS, PD and PD+LPS groups were treated with PD98059 ($30 \mu\text{mol/L}$) to inhibit phosphorylation of Erk1/2, but C group without any treatment. The effects of apoptosis were assessed by Annexin V-FITC/PI assay. The expressions of cytoskeleton filament actin (F-actin) were assessed by immunofluorescence assay. ATP content was assessed by fluorescein-luciferase assay kit. The expressions of phosphorylational Erk1/2 were assessed by Western blot

measurement. **Results** Compared with C group, there were significant increases of apoptosis, recombining of F-actin, and expression in phosphorylation of Erk1/2, Bid, Bim, Puma but decrease of ATP content in LPS group ($P<0.05$). Compared with LPS group, there were significant decreases of apoptosis, recombining of F-actin, ATP content and expression in Bid, Bim, Puma but decrease of phosphorylation of Erk1/2 in LPS group ($P<0.05$), while the neuroprotection of HBO was partially restored by PD98059 in PD+HBO+LPS group ($P<0.05$). **Conclusions** The protection of HBO preconditioning on LPS-induced damage to human alveolar type II epithelial cells may be related with stabilization of mitochondrial function via Erk1/2 signal pathway.

【Key words】 Hyperbaric oxygen; Pulmonary alveoli; Epithelial cells; Endotoxemia; Mitochondria; Extracellular regulated protein kinase 1/2

Fund program: Basic Research Program of Junior University of Liaoning Province (LQNK201712); National Natural Science Foundation of China (General Program)(81870838, 81671311); The Outstanding Scientific Fund of Shengjing Hospital (201708); Key Research Program of Liaoning Province (2018225004); National Natural Science Foundation of China (Youth Project)(81701219)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.05.005

急性肺损伤是脓毒症患者死亡的主要原因,如何保护肺上皮细胞特别是肺泡 II 型上皮细胞的功能是治疗脓毒症患者急性肺损伤的重要研究方向^[1]。已有研究表明,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)预处理可减轻内毒素血症诱发急性肺损伤人肺泡 II 型上皮细胞损伤^[2]。细胞外信号调节激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinase1/2, Erk1/2)作为丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族的重要成员,在肺泡上皮细胞损伤与凋亡的调控中发挥了重要作用^[3]。Erk1/2 减轻细胞凋亡的保护机制可能与稳定线粒体外膜、减少促凋亡因子表达有关^[4]。本研究拟评价 HBO 预处理对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱发人肺泡 II 型上皮细胞损伤的影响并对其机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人肺泡 II 型上皮细胞株(A549 细胞)获赠于中国医科大学盛京医院,培养于含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,培养基中含 1×10^5 U/L 青霉素和 1×10^5 U/L 链霉素,于 37℃、5%CO₂ 孵育箱培养。将 A549 细胞以 0.5×10^6 个/ml 的密度接种于包被胶原基底膜胶原蛋白 I 的 BioFlex 6 孔培养板,2 ml/孔,培养过夜。细胞贴壁并融合 50%后,用 RPMI 1640 培养基清洗 3 遍,更换为 PMI 1640 培养基进行分组处理。

1.2 分组处理

147 个培养孔,采用随机数字表法分为 7 组(每组 21 孔):对照组(C 组)、LPS 组、HBO 预处理+LPS 组(HBO+LPS 组)、Erk1/2 磷酸化阻断+HBO+LPS 组(PD+HBO+LPS 组)、HBO 预处理对照组(HBO 组)、Erk1/2 磷酸化阻断组(PD 组)、Erk1/2 磷酸化阻断+LPS 组(PD+LPS 组)。其中 Erk1/2 磷酸化阻断处理方法为向培养基内加入 Erk1/2 磷酸化阻断剂 PD98059

(生产批号:S1177, Selleck Chemicals 公司,美国),终浓度为 $30 \mu\text{mol/L}$,处理时间为 1 h。HBO 预处理方法为将培养基置于高压氧舱(型号:DS400-IV,山东潍坊华信氧业公司)内,以 76 mmHg/min($1 \text{ mmHg}=0.133 \text{ kPa}$)的速率向舱内匀速加压 760 mmHg 并保持 1 h。然后以 76 mmHg/min 的速率匀速减压至正常大气压。LPS(生产批号:L4005, Sigma Chemical 公司,美国)处理终浓度为 1 mg/L,处理 4 h。

1.3 细胞凋亡检测

每组取 3 孔,经 0.125%胰蛋白酶消化后收集细胞, PBS 洗涤 2 次后,重悬于 200 μl 缓冲液中;加入 5 μl Annexin V-FITC 试剂(生产批号:C1062S,上海碧云天生物技术有限公司),避光室温孵育 15~20 min;加入 10 μl 碘化丙啶染液(生产批号:MX4205,上海懋康生物科技有限公司,50 mg/L),补加缓冲液 200 μl ,采用流式细胞仪(型号:FACS420, Becton Dickinson 公司,美国)检测。

1.4 纤维状肌动蛋白(filament actin, F-actin)表达测定

每组取 3 孔,采用免疫荧光染色法测定细胞 F-actin 表达。加入 4%多聚甲醛溶液室温固定 10 min,用 0.1%Triton X-100 溶液渗透 20 min;加入经 3%白蛋白溶液(生产批号:VNA1M105, Baxter 公司,奥地利)稀释的 1%Actin-Trakcer Green 染色工作试剂(生产批号:C1033,上海碧云天生物技术有限公司),室温避光孵育 60 min,荧光倒置显微镜(型号:IX73, Olympus 公司,日本)下观察。呈明亮的绿色荧光为 F-actin 表达阳性。

1.5 ATP 含量测定

每组取 3 孔,用 0.125%胰蛋白酶消化后收集细胞,将细胞悬液加入 96 孔板,使用不含有细胞的 PBS 缓冲液作为空白对照孔;使用荧光素-荧光素酶试剂盒(生产批号:RG027,上海碧云天生物技术有限公司)测定人肺泡 II 型上皮细胞中 ATP 含量。首

先测定背景荧光值,于 25 ℃下加入等体积的 ATP 检测试剂(生产批号:S0026,上海碧云天生物技术有限公司),混匀细胞;孵育 10 min 后,使用酶标仪(型号:ELX800,BioTek 公司,美国)检测荧光。实验重复 3 次并取均值,以 C 组 ATP 含量作为 100%。

1.6 Western blot 分析

收集细胞并使用裂解液(RIPA,生产批号:P0013C,上海碧云天生物技术有限公司)将细胞裂解,煮沸法蛋白变性,使用 BCA 蛋白定量试剂盒(生产批号:P0012S,上海碧云天生物技术有限公司)检测蛋白质浓度。50 μg 蛋白质上样后 6% SDS-PAGE 中电流恒定进行电泳,电压恒定湿转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h 后,TBST 缓冲液(Tris-Buffered Saline and Tween 20)洗膜,分别加入兔抗鼠 Erk1/2、Bid、Bim 和 Puma(1:1 000,生产批号分别为:ab17942、ab201754、ab7888、ab9643,Abcam 公司,美国)等相应多克隆抗体,37 ℃下孵育 1 h 后,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。山羊抗兔二抗(1:1 000,生产批号:BA1056,武汉博士德生物工程有限公司)25 ℃孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,ECL 发光,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶作为内参照。目的蛋白含量以目的蛋白灰度值除以内参的灰度值表示。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 11.5 统计学软件进行数据分析,正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较使用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBO 预处理减轻 LPS 诱发人肺泡 II 型上皮细胞的损伤

2.1.1 HBO 预处理对 LPS 诱发人肺泡 II 型上皮细胞凋亡及促凋亡因子的影响

与 C 组比较,LPS 组和 HBO+LPS 组细胞凋亡率升高,促凋亡因子 Bid、Bim 和 Puma 表达升高($P < 0.05$);与 LPS 组比较,HBO+LPS 组细胞凋亡率降低,促凋亡因子 Bid、Bim 和 Puma 表达下降($P < 0.05$);与 HBO+LPS 组比较,PD+HBO+LPS 组细胞凋亡率升高,促凋亡因子 Bid、Bim 和 Puma 表达升高($P < 0.05$);与 PD+HBO+LPS 组比较,PD+LPS 组细胞凋亡率升高,促凋亡因子 Bid、Bim 和 Puma 表达升高($P < 0.05$,表 1、图 1)。

2.1.2 HBO 预处理对 LPS 诱发人肺泡 II 型上皮细胞 F-actin 形态分布的影响

C 组 F-actin 主要分布于细胞周边,排列紧密圆滑,无明显间隙,细胞界限清晰;LPS 组 F-actin 出现周边肌动蛋白丝带模糊、断裂、重排,胞内应力纤维形成;与 LPS 组比较,HBO+LPS 组细胞周边 F-actin 断裂和重排减轻,周边肌动蛋白丝带清晰,胞内应力纤维减少;与 HBO+LPS 组比较,PD+HBO+LPS 组周边 F-actin 断裂和重排加重,周边肌动蛋白丝带模糊,胞内应力纤维增加;与 PD+HBO+LPS 组比较,PD+LPS 组细胞周边 F-actin 断裂和重排加重,周边肌动蛋白丝带模糊,胞内应力纤维增加(图 2)。

2.1.3 HBO 预处理对 LPS 诱发人肺泡 II 型上皮细胞线粒体 ATP 含量变化的影响

与 C 组比较,LPS 组和 HBO+LPS 组细胞 ATP 含量下降($P < 0.05$);与 LPS 组比较,HBO+LPS 组 ATP 含量升高($P < 0.05$);与 HBO+LPS 组比较,PD+HBO+LPS 组细胞 ATP 含量下降($P < 0.05$);与 PD+HBO+LPS 组比较,PD+LPS 组 ATP 含量下降($P < 0.05$,表 1)。

表 1 各组人肺泡 II 型上皮细胞(A549 细胞)凋亡率、ATP 含量、Erk1/2 磷酸化比值及凋亡因子 Bid、Bim、Puma 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数(个)	细胞凋亡率(%)	ATP(%)	Erk1/2 磷酸化比值	Bid	Bim	Puma
C 组	18	6.1±0.6	100	0.217±0.042	0.124±0.024	0.172±0.024	0.092±0.009
LPS 组	18	26.8±1.6 ^a	33±5 ^a	0.314±0.019 ^a	0.643±0.053 ^a	0.543±0.043 ^a	0.525±0.018 ^a
HBO+LPS 组	18	15.4±1.1 ^{ab}	68±8 ^{ab}	0.722±0.054 ^{ab}	0.308±0.016 ^{ab}	0.324±0.036 ^{ab}	0.269±0.044 ^{ab}
PD+HBO+LPS 组	18	22.7±1.5 ^c	40±4 ^c	0.263±0.024 ^c	0.426±0.023 ^c	0.467±0.024 ^c	0.452±0.034 ^c
HBO 组	18	6.5±0.5	98±6	0.215±0.017	0.124±0.014	0.135±0.013	0.081±0.021
PD 组	18	6.3±0.8	98±5	0.236±0.046	0.118±0.012	0.151±0.024	0.074±0.013
PD+LPS 组	18	28.6±1.4 ^d	29±3 ^d	0.224±0.043 ^d	0.713±0.038 ^d	0.693±0.025 ^d	0.652±0.043 ^d

注:与 C 组比较,^a $P < 0.05$;与 LPS 组比较,^b $P < 0.05$;与 HBO+LPS 组比较,^c $P < 0.05$;与 PD+HBO+LPS 组比较,^d $P < 0.05$;C 组:对照组;LPS 组:脂多糖组;HBO+LPS 组:HBO 预处理+LPS 组;PD+HBO+LPS 组:Erk1/2 磷酸化阻断+HBO+LPS 组;HBO 组:HBO 预处理对照组;PD 组:Erk1/2 磷酸化阻断组;PD+LPS 组:Erk1/2 磷酸化阻断+LPS 组;LPS:脂多糖;HBO:高压氧;PD:Erk1/2 磷酸化阻断剂;Erk1/2:细胞外信号调节激酶 1/2;Bid:Bcl-2 家族中促凋亡类的蛋白;Bim:前凋亡蛋白;Puma:p53 上调凋亡调控因子

2.2 Erk1/2 磷酸化参与改善 HBO 预处理对 LPS 诱发人肺泡 II 型上皮细胞的损伤

与 C 组比较, LPS 组和 HBO+LPS 组细胞磷酸化 Erk1/2 表达上升($P<0.05$); 与 LPS 组比较, HBO+LPS 组细胞磷酸化 Erk1/2 表达上升($P<0.05$); 与 HBO+LPS 组比较, PD+HBO+LPS 组细胞磷酸化 Erk1/2 表达下降($P<0.05$); 与 PD+HBO+LPS 组比

较, PD+LPS 组细胞磷酸化 Erk1/2 表达下降($P<0.05$, 表 1、图 3)。

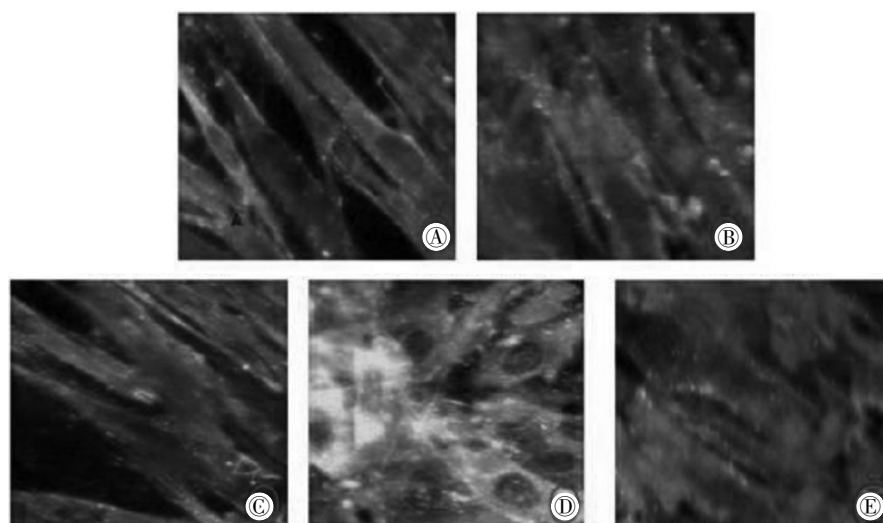
3 讨论

F-actin 在细胞通透性的维持中发挥着重要的作用, 细胞通透性升高后, F-actin 可观察到明显的重构^[5]。本研究中结果显示, 1 mg/L LPS 孵育人肺泡



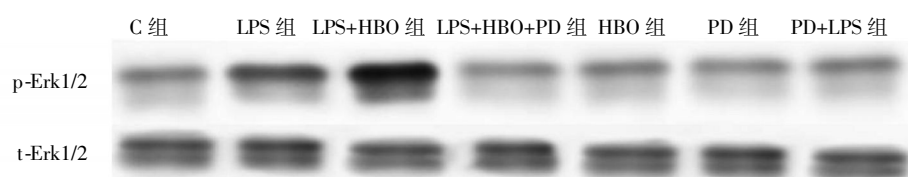
注: C 组: 对照组; LPS 组: 脂多糖组; HBO+LPS 组: HBO 预处理+LPS 组; PD+HBO+LPS 组: Erk1/2 磷酸化阻断+HBO+LPS 组; HBO 组: HBO 预处理对照组; PD 组: Erk1/2 磷酸化阻断组; PD+LPS 组: Erk1/2 磷酸化阻断+LPS 组; LPS: 脂多糖; HBO: 高压氧; PD: Erk1/2 磷酸化阻断剂; Erk1/2: 细胞外信号调节激酶 1/2; Bid: Bcl-2 家族中促凋亡类的蛋白; Bim: 前凋亡蛋白; Puma: p53 上调凋亡调控因子; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图 1 各组人肺泡 II 型上皮细胞(A549 细胞)Bid、Bim 和 Puma 蛋白电泳图



注: LPS: 脂多糖; HBO: 高压氧; PD: Erk1/2 磷酸化阻断剂; F-actin: 纤维状肌动蛋白; Erk1/2: 细胞外信号调节激酶 1/2

图 2 各组人肺泡 II 型上皮细胞(A549 细胞)F-actin 的表达(免疫荧光染色 $\times 400$) A: C 组(对照组); B: LPS 组(脂多糖组); C: HBO+LPS 组(HBO 预处理+LPS 组); D: PD+HBO+LPS 组(Erk1/2 磷酸化阻断+HBO+LPS 组); E: PD+LPS 组(Erk1/2 磷酸化阻断+LPS 组)



注: C 组: 对照组; LPS 组: 脂多糖组; HBO+LPS 组: HBO 预处理+LPS 组; PD+HBO+LPS 组: Erk1/2 磷酸化阻断+HBO+LPS 组; HBO 组: HBO 预处理对照组; PD 组: Erk1/2 磷酸化阻断组; PD+LPS 组: Erk1/2 磷酸化阻断+LPS 组; LPS: 脂多糖; HBO: 高压氧; PD: Erk1/2 磷酸化阻断剂; Erk1/2: 细胞外信号调节激酶 1/2; p-Erk1/2: 磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2; t-Erk1/2: 非磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2

图 3 各组人肺泡 II 型上皮细胞(A549 细胞)磷酸化、非磷酸化 Erk1/2 蛋白电泳图

II 型上皮细胞 4 h 后细胞的凋亡率明显升高, F-actin 重构明显, 提示 LPS 诱发人肺泡 II 型上皮细胞损伤的模型建立成功。

HBO 治疗脓毒血症的机制包括提高缺氧器官组织灌注、刺激血管再生、增强抗氧化酶的表达、抑制白细胞的聚集、减轻炎症因子的释放等^[6]。本研究参考文献[7]的 HBO 预处理条件, 以 76 mmHg/min 的速率向舱内匀速加压 760 mmHg 并保持 1 h, 结果发现 HBO 预处理能够减少人肺泡 II 型上皮细胞凋亡率, 减少 F-actin 重构, 提示 HBO 预处理对 LPS 诱发人肺泡 II 型上皮细胞损伤具有保护作用。

线粒体是细胞内能量的主要生成场所, ATP 含量可作为反映线粒体功能水平的重要标志^[8]。本研究显示 HBO 预处理能够明显提升接受 LPS 孵育后 A549 细胞的 ATP 含量, 这表明 HBO 预处理的肺保护功能可能与线粒体功能相关。Bid、Bim 和 Puma 属于 Bcl-2 家族中的唯 BH3 域蛋白, 是线粒体内重要的促凋亡蛋白, 通过促进线粒体外膜的 Bax、Bak 构成的线粒体膜寡聚蛋白通道的开放, 触发细胞色素 C 由线粒体进入细胞质, 从而激活 caspase 家族, 引发细胞凋亡^[9-11]。本研究中, HBO 预处理能够减少 LPS 诱发人肺泡 II 型上皮细胞造成的促凋亡因子 Bid、Bim、Puma 蛋白表达的增加, 进一步表明 HBO 预处理减少人肺泡 II 型上皮细胞凋亡的机制与保护线粒体功能相关。

PD98059 能够直接透过细胞膜, 通过特异性结合 Erk1/2 上游 MAPK 激酶, 阻止 Erk1/2 在 Ser¹⁹⁹/Ser²⁰² 位点的磷酸化^[12]。本研究参照文献[13]选择浓度为 30 μ mol/L 的 PD98059 处理接受 HBO 预处理和 LPS 孵育的 A549 细胞 1 h 后, 与 HBO 预处理和 LPS 孵育组相比, Erk1/2 磷酸化水平下降, 导致促凋亡因子 Bid、Bim、Puma 蛋白表达的增加, 从而证明 HBO 预处理对人肺泡 II 型上皮细胞的线粒体功能的保护作用与 Erk1/2 磷酸化水平相关。

综上所述, HBO 预处理可减轻 LPS 诱发人肺泡 II 型上皮细胞损伤, 其机制与 HBO 预处理增加 Erk1/2 磷酸化水平从而保护线粒体功能相关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Kim KH, Sadikot RT, Joo M. Therapeutic effect of ent-kaur-16-en-19-oic acid on neutrophilic lung inflammation and sepsis is

- mediated by Nrf2 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 474 (3): 534-540. DOI:10.1016/j.bbrc.2016.04.122.
- [2] Feng Y, Zhang Z, Li Q, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning protects lung against hyperoxic acute lung injury in rats via heme oxygenase-1 induction [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 456(2): 549-554. DOI:10.1016/j.bbrc.2014.09.074.
- [3] Li Y, Zeng Z, Cao Y, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 prevents lipopolysaccharide-induced rat acute lung injury via suppressing the ERK1/2 and NF- κ B signaling pathways [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 27911. DOI:10.1038/srep27911.
- [4] Zhang LM, Zhao XC, Sun WB, et al. Sevoflurane post-conditioning protects primary rat cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/resuscitation via down-regulation in mitochondrial apoptosis axis of Bid, Bim, Puma-Bax and Bak mediated by Erk1/2 [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 357(1-2): 80-87. DOI: 10.1016/j.jns.2015.06.070.
- [5] Filgueiras LR, Capelozzi VL, Martins JO, et al. Sepsis-induced lung inflammation is modulated by insulin [J]. *BMC Pulm Med*, 2014, 14: 177. DOI:10.1186/1471-2466-14-177.
- [6] Yamanel L, Kaldirim U, Oztas Y, et al. Ozone therapy and hyperbaric oxygen treatment in lung injury in septic rats [J]. *Int J Med Sci*, 2011, 8(1): 48-55.
- [7] Koch AE, Koch I, Kowalski J, et al. Physical exercise might influence the risk of oxygen-induced acute neurotoxicity [J]. *Undersea Hyperb Med*, 2013, 40 (2): 155-163. DOI:10.1095/biolreprod.112.105379.
- [8] Ye Z, Guo Q, Wang N, et al. Delayed neuroprotection induced by sevoflurane via opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channels and p38 MAPK phosphorylation [J]. *Neurol Sci*, 2012, 33 (2): 239-249. DOI:10.1007/s10072-011-0665-6.
- [9] Kim H, Tu HC, Ren D, et al. Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2009, 36 (3): 487-499. DOI:10.1016/j.molcel.2009.09.030.
- [10] Ren D, Tu HC, Kim H, et al. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX- and BAK-dependent cell death program [J]. *Science*, 2010, 330 (6009): 1390-1393. DOI: 10.1126/science.1190217.
- [11] 蔡朦朦, 鲍红光, 杨建平. 脓毒症肺损伤肺组织细胞线粒体损伤的研究进展 [J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2014, 35(2): 165-169, 192. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2014.02.17.
- [12] Pelaez D, Arita N, Cheung HS. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) dictates osteogenic and/or chondrogenic lineage commitment of mesenchymal stem cells under dynamic compression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417 (4): 1286-1291. DOI:10.1016/j.bbrc.2011.12.131.
- [13] Zhang L, Zhao X, Jiang X. Sevoflurane post-conditioning protects primary rat cortical neurons against oxygen-glucose deprivation/resuscitation: roles of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and Bid, Bim, Puma [J]. *Neurochem Res*, 2015, 40 (8): 1609-1619. DOI:10.1007/s11064-015-1639-5.

(本文编辑:孙婷)