

论 著
(基础研究)

抑制乙酰转移酶 p300 对大鼠体外循环肺损伤及自噬的影响

张仁鸿, 陈 卓, 吴汉华, 罗俊丽, 窦雪娇, 张 红

[摘要] 目的 探讨抑制乙酰转移酶 p300 对大鼠体外循环肺损伤及自噬的影响。方法 18 只雄性健康 SD 大鼠随机分为 3 组: 假手术组 (Sham 组)、体外循环左肺损伤组 (I/R 组)、体外循环左肺损伤+p300 抑制剂组 (C646 组)。各 6 只。Sham 组做穿刺及开胸处理, 不建立 CPB; I/R 组及 C646 组建立 CPB 左肺损伤模型, 并在 CPB 前 10 min 经尾静脉分别注射等量等渗盐水及 p300 选择性抑制剂 C646; 实验在 3 个时间点行血气分析, 包括体外循环前 (T1)、开放肺门 10 min 后 (T2) 以及实验结束时 (T3), 同时计算得出氧合指数 (OI) 和呼吸指数 (RI) 的值; T3 时取左肺支气管肺泡灌洗液 (BALF) 及左侧肺组织, ELISA 检测左肺 BALF 中 TNF- α 和总蛋白含量, 透射电镜下观察左肺组织自噬小体和自噬溶酶体, Western blot 检测肺组织 p300 及自噬相关蛋白 Beclin1、p62 表达。结果 与 Sham 组比较, T2、T3 时刻 I/R 组和 C646 组 OI 明显降低, RI 明显升高 ($P<0.05$)、TNF- α 和总蛋白含量明显增加, I/R 组 p300 和 Beclin1、P62 表达增加 ($P<0.05$), C646 组 p300、Beclin1 表达减少, p62 表达增加 ($P<0.05$), 病理损伤评分明显升高 ($P<0.05$), II 型肺泡上皮细胞胞浆内自噬明显; 与 I/R 组比较, T3 时刻 C646 组 OI 明显升高, RI 明显降低 ($P<0.05$), TNF- α 和总蛋白含量明显降低, p300 和自噬相关蛋白 Beclin1、P62 表达减少 ($P<0.05$), 病理损伤评分明显降低, II 型肺泡上皮细胞胞质内自噬减少 ($P<0.05$)。结论 抑制乙酰转移酶 p300 后大鼠 CPB 后肺组织自噬蛋白 Beclin1、P62 表达明显减少; 乙酰转移酶 p300 抑制剂 C646 可减轻肺部炎症反应, 改善肺功能, 可能与其抑制过度自噬有关。

[关键词] 体外循环; 肺损伤; 乙酰转移酶 p300; 自噬**[中图分类号]** R563**[文献标志码]** A**[文章编号]** 2097-2768(2025)01-0009-07**[DOI]** 10.16571/j.cnki.2097-2768.2025.01.002

Effects of inhibition of acetyltransferase p300 on lung injury and autophagy during extracorporeal circulation in rats

ZHANG Renhong¹, CHEN Zhuo¹, WU Hanhua², LUO Junli², DOU Xuejiao², ZHANG Hong²

(1.School of Graduate, Zunyi Medical University, Zunyi 563006, Guizhou, China; 2.Anesthesia Department, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563099, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective** This study aims at exploring the effects of inhibition of acetyltransferase p300 on lung injury and autophagy during extracorporeal circulation in rats. **Methods** Eighteen healthy male SD rats were randomly divided into three groups ($n=6$): Sham operation group (Sham group), left lung injury group after extracorporeal circulation (I/R group), extracorporeal circulation left lung injury + p300 inhibitor group (C646 group). The Sham group underwent puncture and thoracotomy without establishing CPB; the I/R group and the C646 group established CPB left lung injury models, and the same amount of normal saline and the p300 selective inhibitor C646 were injected through the tail vein 10 minutes before CP. Blood gas analysis was performed at three time points in the experiment, including before extracorporeal circulation (T1), 10 minutes after opening the hilum (T2), and at the end of the experiment (T3). The oxygenation index (OI) and respiratory index (RI) were calculated. At T3, the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and left lung tissue of the left lung were collected, and the

基金项目: 国家自然科学基金 (82060083)**作者单位:** 563006 遵义, 遵义医科大学研究生院 (张仁鸿、陈卓); 563099 遵义, 遵义医科大学附属医院麻醉科 (吴汉华、罗俊丽、窦雪娇、张 红)**通信作者:** 张 红, E-mail: zh-zmc@foxmail.com

TNF- α and total protein contents in the left lung BALF were detected by ELISA. The autophagosomes and autophagolysosomes of left lung were observed under transmission electron microscope, Western-Blot detects the expression of p300 and autophagy-related proteins Beclin1 and p62 in lung tissue. **Results** Compared with the Sham group, OI was significantly decreased and RI was significantly increased in the I/R group and C646 group at T2 and T3 ($P<0.05$), TNF- α and total protein levels significantly increased, and the expression of p300, Beclin1 and P62 increased in the I/R group ($P<0.05$); the expression of p300 and Beclin1 decreased and the expression of p62 increased in the C646 group ($P<0.05$); the pathological damage score increased significantly ($P<0.05$); autophagy is evident in the cytoplasm of type II alveolar epithelial cells. Compare with I/R group, OI was significantly increased and RI was significantly decreased in the C646 group at T3 ($P<0.05$); TNF- α and total protein levels were significantly reduced; the expression of p300 and autophagy-related proteins Beclin1 and P62 decreased ($P<0.05$); the pathological damage score was significantly reduced; and autophagy in the cytoplasm of type II alveolar epithelial cells was reduced ($P<0.05$). **Conclusion** After inhibiting acetyltransferase p300, the expression of autophagy proteins Beclin1 and P62 in the lung tissue of rats after CPB was significantly reduced; acetyltransferase p300 inhibitor C646 can reduce pulmonary inflammatory response and improve lung function, which may be related to its inhibition of excessive autophagy.

[Key words] cardiopulmonary bypass; lung injury; acetyltransferase p300; autophagy

0 引言

体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)后急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是心脏术后患者常见的并发症之一,甚至发展为更严重的急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress, ARDS)^[1]。有研究发现,在大鼠 CPB 后促进中性粒细胞的凋亡可以减轻肺部炎症,减轻肺损伤^[2]; CPB 后大鼠肺组织自噬蛋白 Beclin-1、自噬相关基因 5 (autophagy-related gene 5, Atg5)及 LC3-II 表达增加,肺组织损伤加重, CPB 后肺损伤机制可能与自噬有关^[3]; 因此探寻体外循环肺损伤的发生机制以及肺保护措施一直是人们关注的热点和难点。研究发现,乙酰转移酶 p300 是重要的乙酰转移酶,能够通过乙酰化作用调节下游基因表达, p300 能与 Ct- BP2、NF- κ B 形成转录复合物作用于巨噬细胞基因,释放 IL-1 β 、IL-6、IL-15 以及 TNF- α 等炎性细胞因子,导致肺损伤发生,同时发现在 ARDS 患者急性期血清中 p300 水平明显增高^[4]。也有研究证明,通过乙酰化 PIK3C3 和 BECN1, EP300 /p300 可能有效抑制 PIK3C3 活性和自噬诱导,乙酰转移酶 p300 可能参与了自噬信号通路的调节^[5]。因此,本研究拟建立大鼠体外循环左肺损伤模型,观察 CPB 后大鼠肺组织乙酰转移酶 p300、自噬相关蛋白表达及肺损伤的变化,探讨抑制乙酰转移酶 p300 是否减轻大鼠体外循环肺损伤及对自噬的影响,为寻找减轻 CPB 肺损伤的措施及机制提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 乙酰转移酶 p300 抑制剂

C646(MCE 公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(索莱宝), 大鼠 TNF- α 酶联免疫试剂盒(上海江莱), 大鼠总蛋白酶联免疫试剂盒(武汉赛培), Anti - Rabbit IgG (H+L)、Anti-p62、Anti-Beclin1 (CST, 美国), 小动物呼吸机 (ALCOTT 生物科技有限公司, 上海), 大鼠膜式人工肺(东莞科威医疗器械有限公司), BT100-2J 蠕动泵 (LongerPump 有限公司, 中国), MD3000 型生物信号采集处理系统(正华生物仪器设备有限公司, 中国), BIO-RAD 电泳仪 (Bio-Rad, 美国), 雅培手持式血气分析仪(雅培), 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific, 美国), 生物显微镜 (OLYMPUS, 日本), 透射电子显微镜 (JEM-1400LFASH, 日本)。

1.2 实验动物与分组 健康雄性 SD 大鼠(体重 350 ~ 450 g) 18 只, 在斯莱克景达有限公司购买, 实验动物使用许可证编号: SCXK(湘)2019-0004; 大鼠在 12 h 的光照/黑暗循环饲养期间均自由采食和饮水, 温度控制在 20 ~ 26 $^{\circ}$ C 之间, 湿度控制在 40% ~ 70% 之间, 确保良好通风。本实验研究在遵义医科大学附属医院伦理委员会审查通过后开展, 伦理审查编号: KLLY(A)-2021-017。大鼠随机(抽签法)分为 3 组(每组 6 只): 假手术组(Sham 组)、体外循环左肺损伤组(I/R 组)、体外循环左肺损伤+ p300 抑制剂组(C646 组)。Sham 组大鼠单纯行动静脉穿刺、气管插管机械通气, 只开胸使左侧肺暴露, 不连接 CPB 管道, 直至实验结束; C646 组建立大鼠 CPB 左肺损伤模型, 且在 CPB 前 10 min 经尾静脉给予 P300 抑制剂 C646(2.5 mg/kg^[6]), 随后进行 CPB、停机、机械通气直至实验结束; I/R 组在 CPB 前 10 min 经尾静脉给予相同容量的 0.9% 氯化钠注射液, 余实验步骤同 C646 组。

1.3 实验方法

1.3.1 建立 CPB 左肺损伤模型 参考文献[7]的方法腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠,经喉镜下气管插管,调整插管深度,连接呼吸机进行机械通气(潮气量 12 mL/kg,频率 70 次/min, I:E=1:2.5, FiO₂=99%)。固定大鼠体位后,分别在大鼠尾静脉、右股静脉、左股动脉、右颈总动脉穿刺置管;管道预充注,经尾静脉给予 3 mg/kg 肝素后,右股静脉作为静脉端引流,右颈总动脉端为动脉回流端,左股动脉端连接信号采集系统用于术中监测,当激活全血凝固时间≥480 s 或更长时间后开始转机,建立大鼠 CPB;转机 10 min 后,通过左侧第四肋间打开胸腔,使用无创血管夹阻断左肺门 45 min 后,松开无创血管夹打开左肺门,肺门开放 30 min 后,经尾静脉注射 2~6 mg/kg 鱼精蛋白中和多余肝素,停止体外循环,继续机械通气 90 min 后实验结束。实验过程中记录心率和平均动脉压,术中根据大鼠心率血压变化经尾静脉给予血管活性药物(肾上腺素 5 μg/mL、阿托品 0.05 mg/mL)维持大鼠生命体征的稳定,动态复查血气分析维持内环境稳定。

1.3.2 标本采集 血气分析分别于体外循环前(T1)、开放肺门后 10 min(T2)、机械通气 90 min 后实验结束时(T3)这 3 个时间点抽取动脉血,同时根据结果计算出氧合指数(OI)和呼吸指数(RI)的值。公式分别如下:

$$OI = PaO_2 / FiO_2$$

$$RI = P(A-a)O_2 / PaO_2$$

在 T3 时刻,从左肺收集支气管肺泡灌洗液(BALF)和左侧肺组织:剥离出肺脏夹闭右主支气管,通过气管导管向左肺注入 5 mL 等渗盐水,重复洗涤 3 次,将 3 次灌洗液收集于 15 mL EP 管中,在 4 ℃、3000 r/min(离心半径 100 mm)离心条件下离心 15 min,收集上清液和左肺组织,于-80 ℃冰箱保存待检。

1.3.3 ELISA 法 ELISA 法检测 BALF 中 TNF-α、总蛋白含量。准备试剂样品和标准品,分别设空白孔、标准孔、待测样品孔,加入准备好的样品和标准品,封板膜封板后 37 ℃温育 30 min,洗板 5 次,加入酶标试剂后重复温育,洗涤操作,加入显色液 A 液、B 液,37 ℃避光显色 10 min,加入终止液比色,450 nm 测得各孔 A 值,根据 A 值计算待测样品的浓度。

1.3.4 Western blot 法 Western blot 法检测肺组织中 p300,自噬相关蛋白 Beclin1、p62 表达;提取组织蛋

白,经 BCA 法测定样本蛋白含量,根据待测目的蛋白分子量配制相应浓度的分离胶(p300 使用浓度为 8% 的分离胶, p62、Beclin1 使用浓度为 15% 的分离胶),电泳槽电泳,根据目的蛋白及内参分子量,选择合适的转膜参数转膜(p300 在恒流 300 mA, 4 ℃转膜 3 h, p62、Beclin1 在恒流 300 mA, 4 ℃转膜 1 h),5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h, p300、Beclin1、p62 一抗 4 ℃孵育过夜,二抗室温孵育 2 h,曝光及显影,统计分析。

1.3.5 光镜检查及病理损伤评分 术后采集大鼠新鲜左肺组织,4% 甲醛固定,石蜡包埋,切成约 4 μm 薄片,经脱蜡、染色、脱水、透明、封固后,即可用于显微形态学观察;每张切片随机选择 3 个高倍视野观察肺组织形态,拍照并保存,并根据肺组织结构损伤和炎症情况进行病理学评估^[8],肺组织结构损伤可依据肺的病理改变评为 0~4 分,通过肺部炎症情况可按 0~3 分进行评分。

1.3.6 透射电镜检查 先取样品育 3% 戊二醛固定,再给予 1% 四氧化锇固定,最后经脱水、渗透和包埋处理,采用超薄切片机制备约 60~90 nm 超薄切片,捞至铜网,在室温下经醋酸铀染色 10~15 min 后柠檬酸铅染色 1~2 min 后透射电镜对铜网进行图像采集,观察自噬小体和自噬溶酶体变化。

1.4 统计学分析 采用 SPSS 29.0 软件进行统计分析,定量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用重复测量方差分析方法和单因素方差分析进行数据分析,对差异显著的组进行两两比较,方差齐采用 LSD 法进行组间两两比较,方差不齐则采用 Dunnett's T3 法进行两两比较。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠肺功能比较

2.1.1 OI 值比较 与 Sham 组比较, T2、T3 时刻, I/R 组、C646 组的 OI 值明显降低($P < 0.01$), 与 I/R 组比较, T3 时刻 C646 组的 OI 值有所升高($P < 0.01$); I/R 组 OI 值在 T2、T3 时刻明显低于 T1 时刻($P < 0.01$), T3 时刻明显低于 T2 时刻($P < 0.01$), C646 组 OI 值在 T2、T3 时刻明显低于 T1 时刻($P < 0.01$), T3 时刻与 T2 时刻 OI 值差异无统计学意义($P = 0.077$)。Sham 组、I/R 组、C646 组大鼠的 OI 值在时间效应、组间效应及两者交互作用中,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.1.2 RI 值比较 与 Sham 组比较, T2、T3 时刻, I/R 组、C646 组的 RI 值明显升高($P < 0.01$); 与 I/R 组比较,

T3时刻C646组的RI值降低($P<0.01$);I/R组RI值在T2、T3时刻明显高于T1时刻($P<0.01$),T3时刻明显高于T2时刻($P<0.01$),C646组RI值在T2、T3时刻明显高于T1时刻($P<0.01$),T3时刻与T2时刻RI值差异无统计学意义($P=0.235$)。Sham组、I/R组,C646组大鼠的RI值在时间效应、组间效应及两者交互作用中,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表2。

表 1 各组大鼠不同时间点OI的比较($\bar{x}\pm s$,mmHg, $n=6$)
Table 1 Comparison of OI at different time points among the three groups of rats ($\bar{x}\pm s$, mmHg, $n=6$)

组别	T1	T2	T3	F值	P值
Sham组	456.53±13.57	459.66±17.79	424.21±28.20	3.03	0.81
I/R组	440.43±26.15	208.10±39.66 ^{*△}	131.86±15.13 ^{*△}	385.39	$P<0.01$
C646组	436.83±21.56	223.39±35.02 ^{*△}	195.49±10.79 ^{*△▲}	234.66	$P<0.01$
F值	3.19	114.91	244.56	—	—
P值	0.07	$P<0.01$	$P<0.01$	—	—

与组内T1时刻比较,* $P<0.05$,与组内T2时刻比较,# $P<0.05$;与Sham组比较,△ $P<0.05$,与I/R组比较,▲ $P<0.05$

表 2 各组大鼠不同时间点RI的比较($\bar{x}\pm s$,mmHg, $n=6$)
Table 2 Comparison of RI at different time points among the three groups of rats ($\bar{x}\pm s$, mmHg, $n=6$)

组别	T1	T2	T3	F值	P值
Sham组	0.46±0.08	0.47±0.06	0.57±0.13	0.07	0.93
I/R组	0.53±0.08	2.35±0.628 ^{*△}	3.96±0.40 ^{*△}	146.83	$P<0.01$
C646组	0.55±0.10	2.09±0.54 ^{*△}	2.45±0.18 ^{*△▲}	48.03	$P<0.01$
F值	2.85	27.50	57.20	—	—
P值	0.09	$P<0.01$	$P<0.01$	—	—

与组内T1时刻比较,* $P<0.05$,与组内T2时刻比较,# $P<0.05$;与Sham组比较,△ $P<0.05$,与I/R组比较,▲ $P<0.05$

2.2 大鼠BALF中TNF-α和总蛋白含量变化 I/R组、C646组肺泡灌洗液中TNF-α含量显著高于Sham组($P<0.01$);C646组肺泡灌洗液中TNF-α显著低于I/R组($P<0.01$);I/R组、C646组肺泡灌洗液中总蛋白含量显著高于Sham组($P<0.01$);C646组肺泡灌洗液中总蛋白显著低于I/R组($P<0.01$)。见图1。

2.3 大鼠肺组织电镜检查结果比较 Sham组Ⅱ型肺泡上皮细胞形态结构较完整清晰,细胞核位于细胞中央,染色质分布均匀,线粒体形态结构较正常;内质网出现扩张;板层小体结构完整清晰;该视野下细胞质内可见1个自噬小体。I/R组Ⅱ型肺泡上皮细胞形态结构异常。细胞核位于细胞中央,染色质分布均匀;线粒体形态结构较正常,但少部分细胞中线粒体出现轻度肿胀;内质网扩张;板层小体

结构受损,溶解空化;该视野下细胞质内可见2个自噬小体和6个自噬溶酶体。C646组Ⅱ型肺泡上皮细胞形态结构出现异常。细胞核位于细胞中央,染色质分布均匀;线粒体肿胀;内质网扩张;板层小体溶解空化;该视野下细胞质内可见2个自噬溶酶体。见图2。

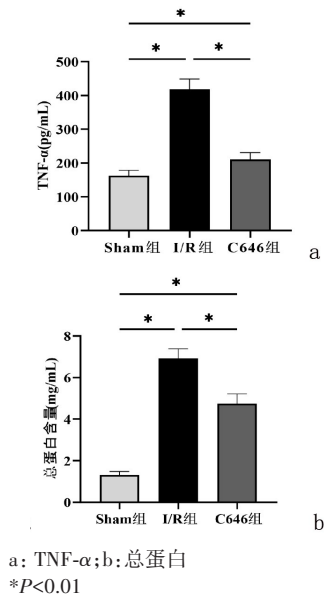
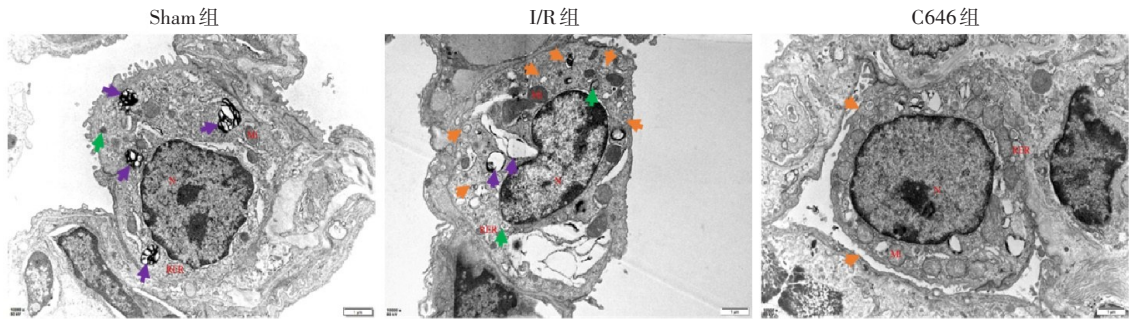


图 1 各组大鼠实验结束时BALF中TNF-α和总蛋白的含量变化
Figure 1 Changes in TNF-α and total protein content in BALF of rats

2.4 大鼠肺组织HE染色结果及病理损伤评分 光镜下Sham组可见肺组织各级结构完整,无明显异常改变,肺泡腔内未见明显渗出改变。I/R组肺组织结构严重破坏,肺泡间隔断裂不完整,肺泡腔内明显可见弥漫性血细胞浸润,肺间质可见中性粒细胞浸润。C646组可见肺组织结构较为完整,一部分肺泡间隔有轻至中度增厚,肺泡腔内可见少量炎症性渗出,少量中性粒细胞浸润。见图3。相较于Sham组[(1.94±0.27)分],I/R组和C646组肺组织病理损伤评分[(4.80±0.28)分、(3.27±0.43)分]显著升高($P<0.01$),C646组病理损伤评分较I/R组显著降低($P<0.05$)。

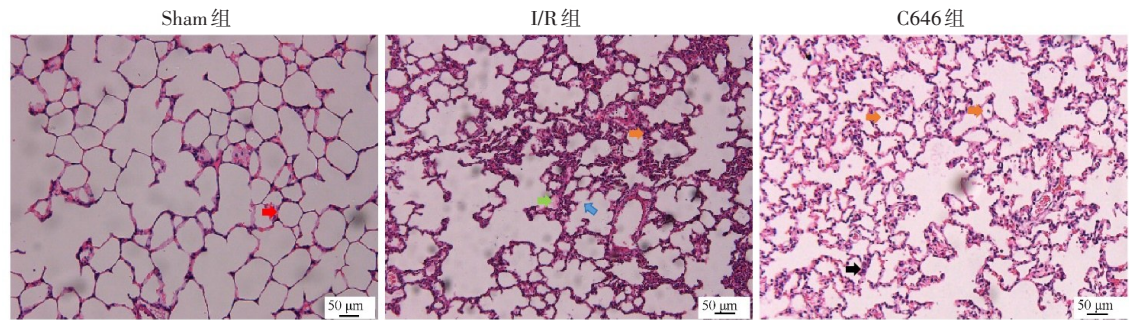
2.5 大鼠肺组织p300及自噬相关蛋白表达比较 p300蛋白和Beclin1蛋白含量I/R组明显高于Sham组和C646组($P<0.01$),C646组明显低于Sham组($P<0.01$),p62蛋白含量I/R组相较于Sham组和C646组显著升高($P<0.01$),C646组相较于Sham组明显升高($P=0.005$),而C646组p62蛋白含量显著低于I/R组($P<0.01$)。见图4。



N:细胞核;Mit:线粒体;RER:粗面内质网;紫色箭头示板层小体、溶解空化的板层小体;绿色箭头示自噬小体;黄色箭头示自噬溶酶体

图 2 各组大鼠 T3 时肺组织电镜结果 (×8000)

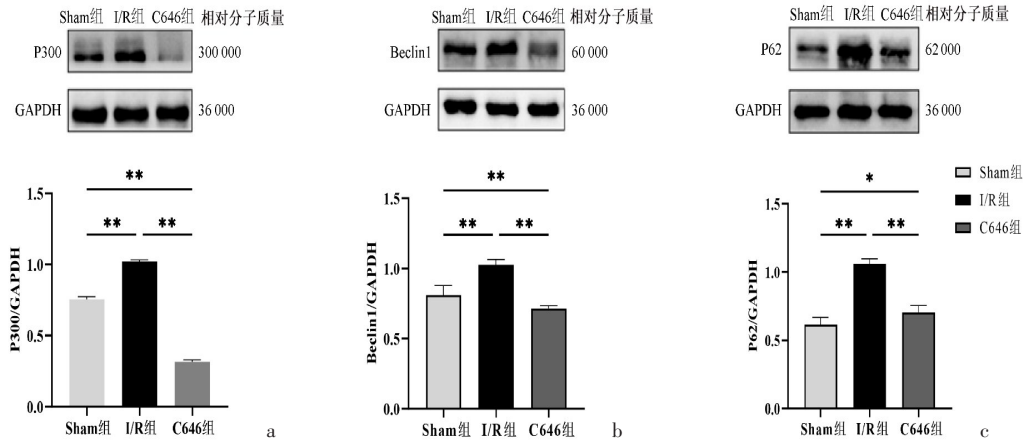
Figure 2 Electron microscopy results of lung tissue at the end of the experiment (T3) (×8000)



图中红色箭头示正常肺泡结构,蓝色箭头示肺泡间隔断裂,绿色箭头示血细胞浸润,黄色箭头示中性粒细胞浸润,黑色箭头示肺泡间隔增厚

图 3 镜下观察各组大鼠 T3 时肺组织形态 (HE 染色 ×200)

Figure 3 Results of lung tissue of rats in each group at the end of the experiment (HE staining ×200)



a: P300; b: Beclin1; c: P62

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 各组大鼠 T3 时左肺组织各蛋白的表达情况

Figure 4 The expression of each protein in the left lung tissue of rats in each group at the end of the experiment

3 讨 论

本实验研究结果显示: Sham组: T1、T2、T3 3 个时刻 OI 和 RI 有显著性差异; 随着时间的延长, 大鼠 CPB 后 I/R 组大鼠 OI 逐渐降低, RI 则显著升高。T3

时, I/R 组大鼠 OI 显著低于 Sham 组, RI 则相反, 说明大鼠 CPB 后肺功能明显下降。同时 I/R 组检测 BAFL 中 TNF- α 和总蛋白含量明显高于 Sham 组; 肺组织的病理损伤评分也明显增加; 表明 CPB 可加重肺组织损伤。

自噬是一种对细胞内无用的物质进行代谢再利用的途径,是一种进化上保守的代谢途径,是维持正常细胞内稳态的一种重要生物学过程^[9];有研究表明,其与人类许多疾病的发病机制有关,自噬参与了 ALI、慢性阻塞性肺疾病、肺癌等肺部疾病的调节^[10]。自噬过程中存在许多自噬相关蛋白参与其调控,当自噬开始启动,多种辅因子可以与自噬相关蛋白 Beclin-1 相结合来启动膜的成核反应,不断聚集的自噬相关蛋白最终形成双层膜结构的自噬前体^[11]。在小鼠 I/R 模型中,肺组织中自噬相关蛋白 LC3B、Beclin1 蛋白表达明显升高,同时 I/R 小鼠肺组织损伤严重,肺组织炎症因子水升高^[12]。Liu 等^[13]的研究也证实,大鼠原位肺移植后肺损伤模型中,自噬标志物 Beclin1 等蛋白的含量明显增加;这些研究表明,在肺损伤的发生发展过程中,自噬是增强的。p62 是一种泛素依赖性接头蛋白,参与 LC3 的转运,并最终在自噬溶酶体中降解,在通畅的自噬过程中 p62 会被不断消耗,其表达减少^[14]。本实验结果显示,大鼠体外循环术后肺功能下降,肺部炎症损伤加重;电镜观察可观察到大量自噬溶酶体与自噬小体存在;Western blot 法可见肺组织中 Beclin1、p62 表达相较于 Sham 组显著增加,这些实验结果表明 I/R 组大鼠肺组织存在自噬的过度激活并伴有自噬流的受阻,提示大鼠体外循环肺损伤可能与肺组织自噬过度激活有关。

研究发现,人肺泡上皮细胞 A549 加入 LPS 损伤后, p300 mRNA 及蛋白表达水平均增加, Si-RNA 转染敲低 p300 后肺部炎症得到改善^[15]; Chen 等^[16]发现 ARDS 急性期患者,其血清单核细胞中 p300 表达明显增加,在小鼠 ALI 模型中发现抑制 p300 活性可改善 LPS 诱导的小鼠急性肺损伤。本实验结果显示, CPB 后大鼠肺组织中 p300 表达及自噬蛋白 Beclin1、p62 的表达含量明显增加,且肺损伤严重,表明大鼠 CPB 后肺组织乙酰转移酶 p300 表达增加,自噬增强,乙酰转移酶 p300 与自噬均参与了 CPB 肺损伤的过程。

有研究认为,在自噬体标记蛋白 GFP-LC3 的细胞中, p300 敲低后可以诱导自噬体的形成;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1 介导 p300 磷酸化可以明显抑制自噬体的形成和自噬性降解^[17]。但 Qiu 等^[18]研究也表明,在心肌缺血再灌注损伤模中,大鼠心肌组织中 p300/CBP 表达明显增加,通过转染腺

病毒下调 p300 可以通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制过度自噬来减轻心肌缺血再灌注损伤;两种不同的研究结果可能的原因是,乙酰转移酶 p300 与自噬的激活是一个动态变化的过程, p300 在不同状态通过不同的途径可以抑制自噬或激活自噬。C646 是 p300 的小分子抑制剂,对 p300 具有高选择性,它是一种可逆的、可穿透细胞的吡唑啉酮基抑制剂,与乙酰辅酶 A 竞争含有 p300 的赖氨酸-辅酶 A 结合位点^[19]; Xu 等^[6]发现 C646 可减轻 LPS 诱导的小鼠急性全身炎症反应,减轻小鼠肺组织的病理损伤。本实验在 CPB 过程中加入 C646 后发现,大鼠肺组织的损伤显著减轻,肺组织的血管通透性降低,肺功能显著改善, BALF 中炎症因子的含量也减少,病理损伤评分降低。此外,透射电镜下发现左肺组织中自噬溶酶体减少, Beclin1、p62 的表达含量降低。说明乙酰转移酶 p300 抑制剂 C646 可抑制大鼠 CPB 后肺组织自噬过度激活,减轻肺部炎症反应,明显改善肺功能,与 Qiu 等^[18]的研究结果一致。

综上所述,大鼠 CPB 后肺组织乙酰转移酶 p300 表达增加,自噬增强可能是 CPB 肺损伤的机制之一;抑制乙酰转移酶 p300 可下调肺组织 p300 的表达,抑制自噬激活,减轻大鼠 CPB 肺损伤。

【参考文献】

- [1] 何苗,张红.细胞凋亡在体外循环肺损伤中的研究进展[J].医学研究生学报,2015,28(10):1102-1106.
- [2] 张元杰,吴汉华,罗俊丽,等.膜联蛋白 A1 拟肽 Ac2-26 对体外循环大鼠肺损伤及中性粒细胞凋亡的影响[J].遵义医科大学学报,2020,43(1):1-6.
- [3] 秦莉,窦雪娇,张红,等.体外循环对大鼠肺组织细胞自噬的影响[J].中华实验外科杂志,2023,40(8):1508-1511.
- [4] 曾祥丽,张红.乙酰转移酶 p300 调节细胞因子在急性肺损伤中的研究进展[J].医学研究生学报,2021,34(10):1092-1096.
- [5] Xu Y, Wan W. Acetylation in the regulation of autophagy [J]. Autophagy, 2023, 19(2):379-387.
- [6] Xu X, Li J, Long X, et al. C646 Protects Against DSS-Induced Colitis Model by Targeting NLRP3 Inflammasome [J]. Front Pharmacol, 2021, 12(12):707610.
- [7] 刘科宇,张红,何苗,等.心脏不停跳大鼠单肺体外循环肺损伤模型的建立[J].中国现代医学杂志,2020,30(3):16-21.
- [8] Cheng C, Li SS, Wang Y, et al. Ischemic postconditioning alleviates lung injury and maintains a better expression of aquaporin-1 during cardiopulmonary bypass [J]. Chin Med J (Engl), 2014,

- 127(23):4012-4018.
- [9] 曹雪丽, 张 红. 乙酰转移酶 p300 及其对自噬分子调控机制的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2022, 35(5):549-554.
- [10] Liao SX, Sun PP, Gu YH, *et al.* Autophagy and pulmonary disease[J]. *Ther Adv Respir Dis*, 2019, 13:1-13.
- [11] Shim MS, Nettesheim A, Hirt J, *et al.* The autophagic protein LC3 translocates to the nucleus and localizes in the nucleolus associated to NUFIP1 in response to cyclic mechanical stress[J]. *Autophagy*, 2020, 16(7):1248-1261.
- [12] Dai SH, Chen LJ, Qi WH, *et al.* microRNA-145 Inhibition Upregulates SIRT1 and Attenuates Autophagy in a Mouse Model of Lung Ischemia/Reperfusion Injury via NF- κ B-dependent Beclin 1[J]. *Transplantation*, 2021, 105(3):529-539.
- [13] Liu WC, Chen SB, Liu S, *et al.* Inhibition of mitochondrial autophagy protects donor lungs for lung transplantation against ischaemia-reperfusion injury in rats via the mTOR pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5):3190-3201.
- [14] Ma X, McKeen T, Zhang J, *et al.* Role and Mechanisms of Mitophagy in Liver Diseases[J]. *Cells*, 2020, 9(4):837.
- [15] Liu Q, Yang H, Xu S, *et al.* Downregulation of p300 alleviates LPS-induced inflammatory injuries through regulation of RhoA / ROCK/NF- κ B pathways in A549 cells[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97:369-374.
- [16] Chen Y, Wang D, Zhao Y, *et al.* p300 promotes differentiation of Th17 cells via positive regulation of the nuclear transcription factor ROR γ t in acute respiratory distress syndrome[J]. *Immunol Lett*, 2018, 202(76):8-15.
- [17] Wan W, You Z, Xu Y, *et al.* mTORC1 Phosphorylates Acetyltransferase p300 to Regulate Autophagy and Lipogenesis[J]. *Mol Cell*, 2017, 68(2):323-335.
- [18] Qiu L, Xu C, Xia H, *et al.* Downregulation of P300/CBP-associated factor attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibiting autophagy[J]. *Int J Med Sci*, 2020, 17(9):1196-1206.
- [19] Bowers EM, Yan G, Mukherjee C, *et al.* Virtual ligand screening of the p300/CBP histone acetyltransferase: Identification of a selective small molecule inhibitor[J]. *Chem Biol*, 2010, 17(5):471-482.

(收稿日期:2024-03-13; 修回日期:2024-05-25)

(责任编辑:缪 琴; 英文编辑:龙宝仪)