

· 论著 ·

活性氧调控 Bcl-2、Bax 表达参与热打击后人脐静脉内皮细胞凋亡的研究

李莉 古正涛 刘志锋 苏磊

【摘要】 目的 观察热打击后人脐静脉内皮细胞(HUVEC)内活性氧(ROS)爆发性增高调控 Bcl-2、Bax 表达对凋亡的影响,探讨重症中暑所致血管内皮损害的发病机制。**方法** 建立 HUVEC 热打击模型。将细胞分别置于 39、41、43 ℃ 细胞培养箱中进行热打击 2 h, 然后置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱后继续孵育 24 h; 在 43 ℃ 热打击前以 10 μmol/L ROS 特异性清除剂 MnTMPyP 预处理 1 h 进行干预。对照细胞仅置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中孵育。应用二氯二氢荧光素-乙酞乙酸酯(DCFH-DA)法及二氢乙啶(DHE)法检测细胞内 ROS 表达; 使用 Hoechst33258 荧光染色检测细胞凋亡; 采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达; 采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 Bcl-2、Bax 及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)的蛋白表达; 同时检测 MnTMPyP 对热打击后细胞凋亡的影响。**结果** 与对照组比较, 39 ℃ 热打击对细胞凋亡无影响, 随着热打击温度增加至 41 ℃、43 ℃ 时, 细胞存活率呈进行性下降, ROS 爆发性增加, Bax 的 mRNA 和蛋白表达以及 caspase-3 蛋白表达显著增加, Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达显著降低, 且呈温度依赖性, 其变化以 43 ℃ 热打击最为明显[细胞存活率: (46.00 ± 4.00)% 比 (96.33 ± 1.53)%, $t=20.164$, $P=0.001$; ROS(荧光相对值): 400.67 ± 12.10 比 99.33 ± 4.04, $t=32.909$, $P=0.001$; Bax mRNA(A 值): 3.03 ± 0.15 比 1.00 ± 0.00, $t=23.056$, $P=0.001$; Bax 蛋白(灰度值): 3.97 ± 0.21 比 1.00 ± 0.00, $t=24.684$, $P=0.001$; caspase-3 蛋白(灰度值): 4.80 ± 0.20 比 1.00 ± 0.00, $t=32.909$, $P=0.001$; Bcl-2 mRNA(A 值): 0.42 ± 0.30 比 1.00 ± 0.00, $t=33.072$, $P=0.001$; Bcl-2 蛋白(灰度值): 0.39 ± 0.25 比 1.00 ± 0.00, $t=42.212$, $P=0.001$]。MnTMPyP 预处理可明显逆转 43 ℃ 热打击对 HUVEC 的损害, 可明显抑制 Bax、caspase-3 表达, 上调 Bcl-2 表达[Bax mRNA(A 值): 2.00 ± 0.20 比 3.33 ± 0.25, $t=7.184$, $P=0.002$; Bax 蛋白(灰度值): 2.03 ± 0.25 比 3.23 ± 0.25, $t=5.840$, $P=0.004$; caspase-3 蛋白(灰度值): 2.07 ± 0.21 比 5.00 ± 0.20, $t=17.600$, $P=0.001$; Bcl-2 mRNA(A 值): 0.71 ± 0.40 比 0.42 ± 0.26, $t=8.126$, $P=0.002$; Bcl-2 蛋白(灰度值): 0.57 ± 0.31 比 0.40 ± 0.06, $t=5.091$, $P=0.007$]。**结论** 热打击后 HUVEC 内 ROS 爆发性增高在凋亡中发挥了重要作用, 其机制与调控凋亡相关基因 Bcl-2、Bax 的表达有关; 血管内皮细胞凋亡可能是重症中暑的发病机制之一。

【关键词】 热打击; 中暑, 重症; 凋亡; 活性氧; Bcl-2; Bax; 人脐静脉内皮细胞

The effect of reactive oxygen species regulation of expression of Bcl-2 and Bax in apoptosis of human umbilical vein endothelial cell induced by heat stress Li Li*, Gu Zhengtao, Liu Zhifeng, Su Lei. *Department of Critical Care Medicine, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, PLA, Guangzhou 510010, Guangdong, China

Corresponding author: Su Lei, Email: slei_icu@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of heat stress-induced reactive oxygen species (ROS) burst on the regulation of expression of Bcl-2 and Bax in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) apoptosis induced by heat stress, and explore the pathogenesis of vascular endothelial damage caused by severe heat stroke. **Methods** HUVEC heat stress model was reproduced. Cells of heat stress group were incubated at either 39, 41, or 43 ℃ for 2 hours, then all the cells were further incubated at 37 ℃ and 5% CO₂ for 24 hours. Before heat stress, cells of 43 ℃ heat stress group were pretreated with 10 μmol/L MnTMPyP, which was a specific scavenger of ROS, for 1 hour. Cells of control group were incubated at 37 ℃ and 5% CO₂. The amount of ROS was assayed with 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and dihydroethidium (DHE) staining. Apoptosis was determined by using staining with Hoechst33258. The mRNA expressions of Bcl-2 and Bax were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein levels of Bcl-2, Bax, caspase-3 were analyzed by Western Blot. In addition, the effect of

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.07.003

基金项目: 国家自然科学基金(81071529, 81101467); 广东省自然科学基金(10151001002000001); 广东省科技计划项目(2012B031800416); 全军医学科技研究“十二五”发展计划(BWS12J018)

作者单位: 510010 广东, 广州军区广州总医院重症医学科, 全军热区创伤救治与组织修复重点实验室(李莉、刘志锋、苏磊); 南方医科大学(李莉); 南方医科大学附属第三医院重症医学科(古正涛)

通信作者: 苏磊, Email: slei_icu@163.com

MnTMPyP on heat stress-induced apoptosis was also studied. **Results** Compared with control group, there was no obvious change in cells after 39 °C heat stress. With the increase in heat stress temperature up to 41 °C and 43 °C, viability of cells showed a lowering trend, with a burst of ROS, and an increase of mRNA and protein of Bax, and the protein of caspase-3 was significantly increased, the mRNA and protein of Bcl-2 were significantly decreased in a temperature-dependent manner. These changes were marked in 43 °C heat stress group as compared with those of the control group [cell viability: $(46.00 \pm 4.00)\%$ vs. $(96.33 \pm 1.53)\%$, $t=20.164$, $P=0.001$; ROS (fluorescence relative value): 400.67 ± 12.10 vs. 99.33 ± 4.04 , $t=32.909$, $P=0.001$; Bax mRNA (A value): 3.03 ± 0.15 vs. 1.00 ± 0.00 , $t=23.056$, $P=0.001$; Bax protein (gray value): 3.97 ± 0.21 vs. 1.00 ± 0.00 , $t=24.684$, $P=0.001$; caspase-3 protein (gray value): 4.80 ± 0.20 vs. 1.00 ± 0.00 , $t=32.909$, $P=0.001$; Bcl-2 mRNA (A value): 0.42 ± 0.30 vs. 1.00 ± 0.00 , $t=33.072$, $P=0.001$; Bcl-2 protein (gray value): 0.39 ± 0.25 vs. 1.00 ± 0.00 , $t=42.212$, $P=0.001$]. It was shown that pre-condition with the antioxidant MnTMPyP significantly decreased the heat stress-induced expression of Bax, caspase-3, and apoptosis, and the expression of Bcl-2 was elevated [Bax mRNA (A value): 2.00 ± 0.20 vs. 3.33 ± 0.25 , $t=7.184$, $P=0.002$; Bax protein (gray value): 2.03 ± 0.25 vs. 3.23 ± 0.25 , $t=5.840$, $P=0.004$; caspase-3 protein (gray value): 2.07 ± 0.21 vs. 5.00 ± 0.20 , $t=17.600$, $P=0.001$; Bcl-2 mRNA (A value): 0.71 ± 0.40 vs. 0.42 ± 0.26 , $t=8.126$, $P=0.002$; Bcl-2 protein (gray value): 0.57 ± 0.31 vs. 0.40 ± 0.06 , $t=5.091$, $P=0.007$]. **Conclusions** A burst in an increase of ROS plays an important role on heat stress-induced HUVEC apoptosis, and the mechanism is probably related to the expressions of Bcl-2 and Bax. The vascular endothelial cells apoptosis may be one of the pathogenetic factor in severe heat stroke.

[Key words] Heat stress; Severe heat stroke; Apoptosis; Reactive oxygen species; Bcl-2; Bax; Human umbilical vein endothelial cell

重症中暑发病率和病死率均较高,其特征为中心体温超过 40 °C,伴谵妄、抽搐或昏迷,常合并多器官功能障碍综合征(MODS)^[1-3]。研究发现,血管内皮细胞(VEC)的功能、结构受损是引发重症中暑患者 MODS 等严重并发症的重要因素^[4]。随着对重症中暑病理机制研究的不断深入,凋亡的作用越来越受到重视,热暴露后可诱导机体发生大量凋亡早已被证实^[5-6]。本研究旨在通过观察热打击后人脐静脉内皮细胞(HUVEC)内活性氧(ROS)爆发性增高与 Bcl-2、Bax 及凋亡的关系,阐明热打击后细胞凋亡的信号转导机制,探讨重症中暑所致血管内皮损害的发病机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂:Bcl-2、Bax、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)激活型一抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司;CCK-8 细胞计数试剂盒、羊抗兔二抗、Hoechst33258 荧光染液、二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯(DCFH-DA)、二氢乙啶(DHE)分子探针购自碧云天生物技术研究;ROS 特异性清除剂锰叶啉(MnTMPyP)购自德国 Calbiochem 公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司,脱氧核苷酸混合物(dNTP)购自日本 TaKaRa 公司;cDNA 逆转录试剂盒、TaqDNA 聚合酶购自美国 Promega 公司;电化学发光(ECL)试剂盒购自美国 Amersham 公司。

1.2 HUVEC 细胞株培养:HUVEC 细胞株由广州军区广州总医院医学实验科创建并保存。HUVEC 细胞培养于含 600 mg/mL 葡萄糖的 DMEM 加 10%胎牛血清、100 kU/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的培养液

中。将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的孵箱中培养,2~3 d 按 1:2~3 的比例传代 1 次,细胞长至对数生长期后进行实验。

1.3 细胞分组及热打击:在 6 孔培养板内放置盖玻片,玻片上滴加适量多聚赖氨酸,于孵箱中至干。取对数生长期 HUVEC 细胞,按 5×10^4 /孔的密度铺入 96 孔板,待细胞贴壁稳定后进行热打击处理。

1.3.1 实验 1:对照组将细胞置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱 2 h;热打击组分别置于 39、41、43 °C 细胞培养箱 2 h,各组分别设 5 个复孔。热打击后继续在 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱孵育 24 h 后用于检测。

1.3.2 实验 2:在 43 °C 热打击前使用 10 μmol/L 的 MnTMPyP 预处理 1 h,热打击 2 h 后继续培养 24 h,进行指标测定。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 细胞存活率测定:细胞孵育 24 h 后每孔加入 CCK-8 10 μL,用酶联免疫检测仪于波长 450 nm 处读取吸光度(A)值,计算细胞存活率。

1.4.2 Hoechst33258 荧光染色检测细胞凋亡:吸弃各孔上清,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,每次 3 min,加 4%多聚甲醛溶液 0.5 mL,4 °C 固定 10 min,弃去固定液,PBS 洗 2 次,再加 Hoechst33258 荧光染液 0.5 mL,室温染色 10 min,PBS 洗 2~3 次,用抗淬灭封片剂封片,荧光显微镜下于波长 340 nm 处观察。

1.4.3 细胞内 ROS 检测

1.4.3.1 DCFH-DA 法:用 DCFH-DA 分子探针(终浓度为 10 μmol/L)悬浮各组细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /mL,置入 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min,

3~5 min 颠倒混匀 1 次使探针和细胞充分接触,激发波长 488 nm、发射波长 525 nm 处检测荧光强弱。

1.4.3.2 DHE 法:吸弃各孔上清,PBS 洗 2 次,每次 3 min,加入 4%多聚甲醛溶液 0.5 mL,4℃固定 10 min,弃去固定液,PBS 洗 2 次,再加入稀释好的 DHE 分子探针 5 μ L,室温染色 30 min,PBS 洗 2~3 次,用抗淬灭封片剂封片,荧光显微镜下于激发波长 300 nm、发射波长 610 nm 处观察。

1.4.4 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达:TRIzol 提取细胞总 RNA,测定 RNA 纯度并定量,合成 cDNA。Bcl-2、Bax 及内参三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的 PCR 扩增引物由美国 Invitrogen 公司设计并合成。扩增条件:94℃ 5 min 预变性;94℃ 30 s 变性,55℃ 45 s(Bcl-2)、57℃ 1 min(Bax)、55℃ 30 s(GAPDH)退火,72℃ 1 min 延伸,共 30 个循环;72℃加热 10 min 终止反应。扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳鉴定,用凝胶图像分析系统摄片并分析,结果以目的基因与内参基因的 A 值比值表示。

1.4.5 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 Bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达:BCA 法定量,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将蛋白转移至硝酸纤维素膜上,用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,洗膜后加入 Bcl-2、Bax、caspase-3 激活型抗体(1:1 000)一抗,4℃过夜,含吐温 20 的 PBS (TBST)洗 3 次后,加入结合辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:5 000)二抗室温孵育 2 h,用 ECL 进行反应、曝光。结果以待测蛋白与内参 β -肌动蛋白(β -actin)的灰度值比值表示。

1.5 统计学处理:采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐时应用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较用 LSD 法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 热打击后 HUVEC 细胞活性变化(表 1):39℃热打击对细胞活性无影响,但随着热打击温度增高至 41℃、43℃时,细胞活性进行性下降,与对照组比较差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。

2.2 热打击后 HUVEC 细胞凋亡的荧光染色(图 1):荧光显微镜下观察,对照组细胞核呈圆形或椭圆形,荧光分布均匀;39℃热打击后细胞凋亡不明显;随着热打击温度增加至 41℃、43℃时,细胞出现典型的凋亡形态,细胞核固缩,致密深染,染色质边集,细胞质内可见亮蓝色强荧光,且热打击后细胞凋亡呈温度依赖性增加。

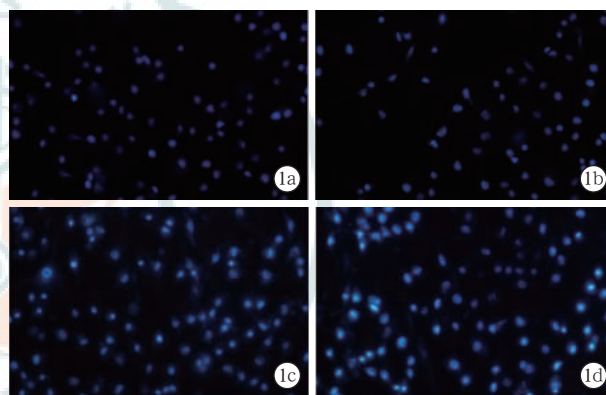


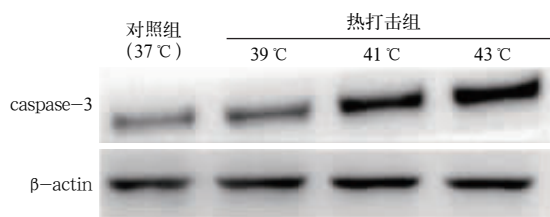
图 1 荧光显微镜下观察不同温度热打击后人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡情况 对照组(a)细胞核未见明显固缩,胞质荧光分布均匀;39℃热打击组(b)细胞凋亡不明显,仅见少量细胞核固缩,无明显亮蓝色强荧光;41℃热打击组(c)可见细胞核固缩、胞质内亮蓝色强荧光明显增多;43℃热打击组(d)可见大量细胞核固缩,胞质呈亮蓝色强荧光 Hoechst33258 荧光染色 中倍放大

2.3 caspase-3 蛋白表达(表 1;图 2):与对照组相比,39℃热打击后 caspase-3 表达无明显差异;而随着热打击温度增加至 41℃、43℃时,caspase-3 蛋白表达明显增强(均 $P<0.01$),与细胞凋亡趋势一致。

表 1 不同温度热打击对 HUVEC 细胞活性、凋亡相关蛋白及 ROS 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数 (次)	细胞存活率 (%)	Bcl-2 mRNA (A 值)	Bax mRNA (A 值)	Bcl-2 蛋白 (灰度值)	Bax 蛋白 (灰度值)	caspase-3 蛋白 (灰度值)	ROS (荧光相对值)
对照组(1)	3	96.33 $\pm$ 1.53	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	99.33 $\pm$ 4.04
39℃热打击组(2)	3	93.00 $\pm$ 1.00	0.96 $\pm$ 0.06	1.17 $\pm$ 0.11	0.96 $\pm$ 0.15	1.23 $\pm$ 0.58	1.23 $\pm$ 0.11	116.33 $\pm$ 4.16
41℃热打击组(3)	3	72.33 $\pm$ 2.51	0.74 $\pm$ 0.30	2.03 $\pm$ 0.21	0.72 $\pm$ 0.46	2.70 $\pm$ 0.20	4.10 $\pm$ 0.26	220.33 $\pm$ 16.50
43℃热打击组(4)	3	46.00 $\pm$ 4.00	0.42 $\pm$ 0.30	3.03 $\pm$ 0.15	0.39 $\pm$ 0.25	3.97 $\pm$ 0.21	4.80 $\pm$ 0.20	400.67 $\pm$ 12.10
F 值		251.303	465.182	130.819	319.721	265.046	369.189	508.283
P 值		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
组间比较 1:2 的 t/P 值		2.598/0.060	4.000/0.057	2.500/0.130	2.219/0.910	2.000/0.057	2.000/0.073	2.620/0.590
1:3 的 t/P 值		13.858/0.001	15.011/0.001	8.598/0.013	10.583/0.001	14.722/0.001	20.294/0.001	20.294/0.002
1:4 的 t/P 值		20.164/0.001	33.072/0.001	23.056/0.001	42.212/0.001	24.684/0.001	32.909/0.001	32.909/0.001

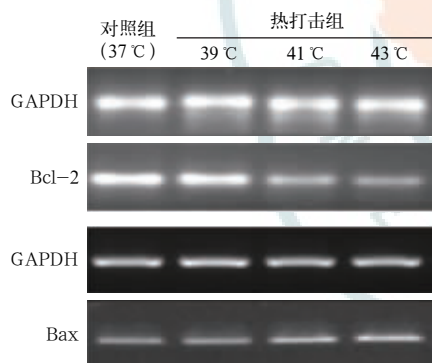
注:HUVEC 为人脐静脉内皮细胞,ROS 为活性氧,caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3



HUVEC 为人脐静脉内皮细胞, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, β-actin 为 β-肌动蛋白

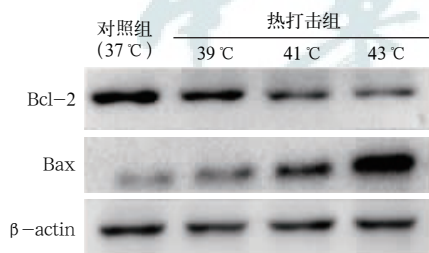
图 2 蛋白质免疫印迹试验检测不同温度热打击后 HUVEC 内 caspase-3 的蛋白表达

2.4 热打击后 HUVEC 内 Bcl-2、Bax 的 mRNA 和蛋白表达(表 1; 图 3~4): 与对照组比较, 39 °C 热打击对细胞内 Bcl-2、Bax 的 mRNA 和蛋白表达无明显影响(均 $P>0.05$); 41 °C、43 °C 热打击时细胞内 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达显著降低, Bax 的 mRNA 和蛋白表达显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 以 43 °C 热打击最为明显。推测热打击后细胞凋亡的发生与下调 Bcl-2、上调 Bax 的表达相关。



HUVEC 为人脐静脉内皮细胞, GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 逆转录-聚合酶链反应检测不同温度热打击后 HUVEC 内 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达



HUVEC 为人脐静脉内皮细胞, β-actin 为 β-肌动蛋白

图 4 蛋白质免疫印迹试验检测不同温度热打击后 HUVEC 内 Bcl-2、Bax 的蛋白表达

2.5 热打击后 HUVEC 内 ROS 变化: 39 °C 热打击后细胞内 ROS 水平与对照组无明显差异; 随着热打击温度的增加, 细胞内 ROS 水平爆发性增加, 43 °C 时增加了约 3 倍($P<0.01$; 表 1)。DHE 染色后荧光

显微镜下观察, 43 °C 热打击后, 细胞核内可见大量亮红色强荧光的氧化应激反应(图 5)。

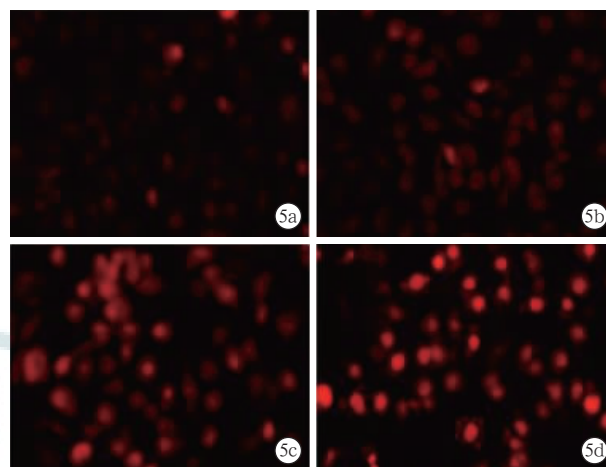


图 5 荧光显微镜下观察不同温度热打击后人脐静脉内皮细胞(HUVEC)内活性氧(ROS)水平 对照组(a)细胞分布均匀, 核内无明显亮红色强荧光染色; 39 °C 热打击组(b)细胞分布尚均匀, 核内可见少量亮红色强荧光染色; 41 °C 热打击组(c)细胞分布不均, 核内可见亮红色强荧光染色明显增多; 43 °C 热打击组(d)细胞分布不均, 核内可见大量亮红色强荧光染色 DHE 染色 高倍放大

2.6 MnTMPyP 对热打击后 HUVEC 细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、caspase-3 表达的影响: 荧光显微镜下观察发现, MnTMPyP 预处理可明显抑制热打击诱导的细胞凋亡, 细胞内亮蓝色强荧光的凋亡细胞明显减少(图 6)。Western Blot 检测结果显示, MnTMPyP 预处理后可明显抑制促凋亡基因 Bax 及凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达(均 $P<0.01$), 而抗凋亡基因 Bcl-2 表达明显增高($P<0.01$; 表 2; 图 7)。RT-PCR 检测 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达结果(表 2; 图 8)与 Western Blot 一致。推测 ROS 通过下调 Bcl-2、上调 Bax 表达参与热打击后细胞凋亡。

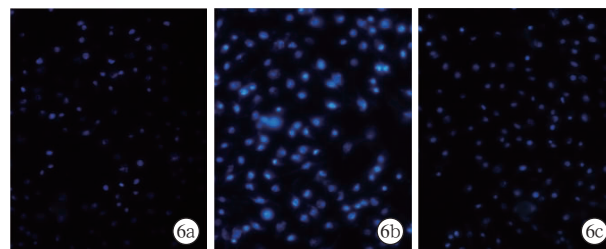
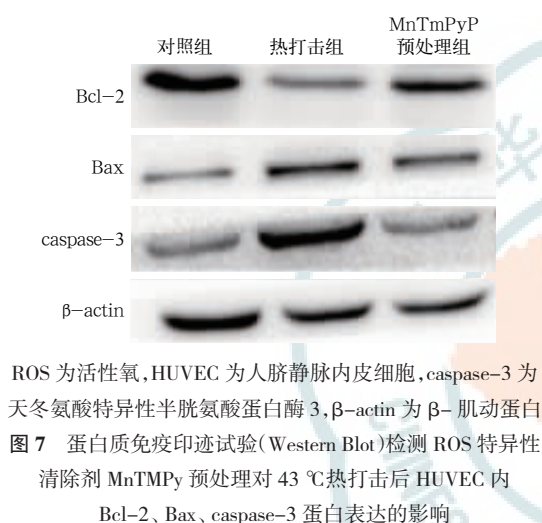


图 6 荧光显微镜下观察活性氧特异性清除剂 MnTMPyP 预处理对 43 °C 热打击后人脐静脉内皮细胞(HUVEC)凋亡的影响 对照组(a)未见明显细胞核固缩, 胞质荧光分布均匀; 43 °C 热打击组(b)可见大量细胞核固缩, 胞质呈亮蓝色强荧光; MnTMPyP 预处理组(c)细胞核固缩、胞质内亮蓝色强荧光明显减少 Hoechst33258 荧光染色 中倍放大

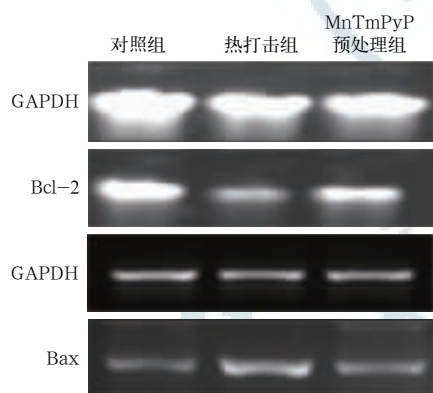
表 2 ROS 特异性清除剂 MnTMPyP 对热打击后 HUVEC 细胞凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (次)	Bcl-2 蛋白 (灰度值)	Bax 蛋白 (灰度值)	caspase-3 蛋白 (灰度值)	Bcl-2 mRNA (A 值)	Bax mRNA (A 值)
对照组(1)	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.61
43 °C 热打击组(2)	3	0.40 ± 0.06	3.23 ± 0.25	5.00 ± 0.20	0.42 ± 0.26	3.33 ± 0.25
MnTMPyP 预处理组(3)	3	0.57 ± 0.31	2.03 ± 0.25	2.07 ± 0.21	0.71 ± 0.40	2.00 ± 0.20
F 值		210.380	88.763	463.360	202.750	119.355
P 值		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
组间比较 1 : 2 的 t/P 值		18.665 / 0.001	15.371 / 0.001	34.614 / 0.001	21.922 / 0.001	16.059 / 0.001
1 : 3 的 t/P 值		23.434 / 0.001	7.122 / 0.002	8.875 / 0.012	12.571 / 0.001	8.660 / 0.001
2 : 3 的 t/P 值		5.091 / 0.007	5.840 / 0.004	17.600 / 0.001	8.126 / 0.002	7.184 / 0.002

注:ROS 为活性氧,HUVEC 为人脐静脉内皮细胞,caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3



ROS 为活性氧,HUVEC 为人脐静脉内皮细胞,caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3,β-actin 为 β-肌动蛋白
图 7 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测 ROS 特异性清除剂 MnTMPyP 预处理对 43 °C 热打击后 HUVEC 内 Bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达的影响



ROS 为活性氧,HUVEC 为人脐静脉内皮细胞,GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶
图 8 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 ROS 特异性清除剂 MnTMPyP 预处理对 43 °C 热打击后 HUVEC 内 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响

3 讨论

已知正常 VEC 对维持机体组织和器官正常功能活动起重要作用。早在 1976 年 Ross 与 Glomset 就提出了内皮细胞损伤学说,越来越多的研究发现凋亡是血管内皮损伤的机制之一^[4,7]。重症中暑时,由于高热刺激可诱导细胞凋亡,并在其病理生理过程

中起着不可忽视的作用^[5-6]。已有研究发现,重症中暑时 VEC 的损伤较早,是重症中暑发病机制之一,其损伤可以导致微循环障碍、启动弥散性血管内凝血(DIC),最终诱发或加重 MODS^[8-9]。本实验结果显示,随着热打击温度的增加(41 ~ 43 °C),HUVEC 细胞凋亡不断增加,尤其是 43 °C 热打击可导致细胞发生大量凋亡。

细胞凋亡是一种基因指导的细胞程序化死亡方式,其广泛参与许多疾病的病理机制^[10-14]。Bcl-2 是一个多基因家族,在哺乳动物中发现其家族成员至少有 15 个,它们所形成的同源或异源二聚体通过调控蛋白酶及核酸酶的活性而双向调节细胞凋亡,其中促凋亡家族成员有 Bax、Bak、Bcl-Xs、Bad 等,抗凋亡家族成员包括 Bcl-2、Bcl-XL、Bcl-1 等^[15-17]。Bcl-2、Bax 是该家族中最具代表性的抑制和促进细胞凋亡的基因,分别以同源二聚体的形式存在,也可形成异源二聚体;Bax 过度表达时,可形成大量的 Bax-Bax 同源二聚体,使细胞凋亡增多;而 Bcl-2 过度表达时,大量的 Bax-Bax 同源二聚体被分开,与 Bcl-2 形成 Bax-Bcl-2 异源二聚体,从而抑制细胞凋亡^[16-18]。Caspase-3 作为 caspase 家族中的一员,是凋亡机制的核心成分、直接诱导细胞凋亡最重要效应蛋白酶之一、凋亡的主要执行者,其一旦活化,凋亡不可避免^[19-22]。本实验发现,随着热打击程度的加重(41 ~ 43 °C),抗凋亡基因 Bcl-2 的 mRNA 及蛋白表达不断减少,而促凋亡基因 Bax 的 mRNA 及蛋白表达不断增高,呈温度依赖性,以 43 °C 热打击最为明显。进一步研究发现,凋亡主要执行者 caspase-3 表达随着热打击程度的加重不断增加,以 43 °C 最为明显,呈温度依赖性,其趋势与细胞凋亡趋势一致。因此,我们推测:热打击后 Bcl-2 下调、Bax 上调与 HUVEC 凋亡发生相关,进一步研究发现 Bcl-2、Bax 的调控与热打击后 ROS 的爆发性增高有关。

ROS 广泛存在于机体内并参与调节机体重要

的生理及病理过程^[23-26]。正常生理条件下 ROS 呈低水平,可作为细胞内氧化还原的信使,传递、调控细胞内信号;而过多的 ROS 会导致细胞内大分子氧化修饰,抑制蛋白质的功能,最终导致细胞凋亡^[26-29]。已有研究证实,热打击可导致细胞内 ROS 爆发性增加,而致细胞凋亡发生^[30];其诱导细胞凋亡可能涉及上调 Bax 及下调 Bcl-2 的表达^[31]。但目前没有直接证据支持,热打击后 ROS 的增高诱导 HUVEC 凋亡与上调 Bax 及下调 Bcl-2 直接相关。本实验使用 ROS 特异性清除剂 MnTMPyP 对热打击后 HUVEC 内的 ROS 水平进行干预发现,MnTMPyP 预处理除明显抑制热打击后 HUVEC 凋亡外,还可明显抑制促凋亡基因 Bax 及活化凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达,而抗凋亡基因 Bcl-2 明显增高。因此,我们推测:ROS 通过下调 Bcl-2、上调 Bax 的表达参与热打击后 HUVEC 的凋亡。

综上所述,本实验通过观察热打击后 HUVEC 内 ROS 的爆发性增高与 Bcl-2、Bax 及凋亡之间的关系,发现 ROS 通过下调 Bcl-2、上调 Bax 表达参与了热打击后 HUVEC 的凋亡,但其具体通路是什么以及这其中涉及的详细机制仍需进一步研究证明。

参考文献

- [1] 苏磊.重症中暑防治回顾与启示[J].解放军医学杂志,2011,36(9):883-885.
- [2] Bouchama A, Knochel JP. Heat stroke [J]. N Engl J Med, 2002, 346(25):1978-1988.
- [3] 李莉,刘志锋,古正涛,等.重症中暑中枢神经系统病变机制的研究进展[J].中华危重病急救医学,2013,25(9):570-572.
- [4] Winn RK, Harlan JM. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases [J]. J Thromb Haemost, 2005, 3(8):1815-1824.
- [5] Palapati P, Averill-Bates DA. Mild thermotolerance induced at 40 °C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide[J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(6):667-679.
- [6] Roberts GT, Ghebeh H, Chishti MA, et al. Microvascular injury, thrombosis, inflammation, and apoptosis in the pathogenesis of heatstroke: a study in baboon model [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(6):1130-1136.
- [7] Lum H, Roebuck KA. Oxidant stress and endothelial cell dysfunction [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280(4):C719-741.
- [8] 耿焱,彭娜,刘亚楠,等.热打击对培养人脐静脉内皮细胞增殖能力的影响[J].感染、炎症、修复,2013,14(1):7-10.
- [9] 赵佳佳,周京江,胡婕,等.影响劳力性热射病预后的危险因素分析[J].中华危重病急救医学,2013,25(9):515-518.
- [10] Trieb K, Eberl T, Steger M, et al. Apoptosis is involved in endothelial cell damage during preservation and influenced by organ storage solutions[J]. Transplant Proc, 1997, 29(1-2):416-418.
- [11] Sorrentino G, Mioni M, Giorgi C, et al. The prolyl-isomerase Pin1 activates the mitochondrial death program of p53 [J]. Cell Death Differ, 2013, 20(2):198-208.
- [12] 王建,沈锋.盐酸吸入性急性肺损伤大鼠肺组织细胞凋亡及异丙酚对其的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2012,19(5):279-282.
- [13] Jimenez GS, Khan SH, Stommel JM, et al. p53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses[J]. Oncogene, 1999, 18(53):7656-7665.
- [14] 王卫东,陈正堂. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2007,14(4):393-396.
- [15] 上官海娟,徐江,官洪山,等.当归对心肌梗死后心肌细胞凋亡和心室重构的影响[J].中国中西医结合急救杂志,2008,15(1):39-44.
- [16] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis[J]. Apoptosis, 2007, 12(5):887-896.
- [17] 任妙丹,何爱文,陈寿权,等.心肺复苏后大鼠皮质区凋亡相关性微小 RNA 的表达变化[J].中国中西医结合急救杂志,2014,21(2):95-98.
- [18] 张丽群,符州. Bcl-2、Bax 与气道上皮细胞凋亡的研究进展[J]. 检验医学与临床,2007,4(4):285-287.
- [19] Hayashi M, Araki T. Caspase in renal development [J]. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17 Suppl 9:8-10.
- [20] 焦霞霞,高维娟.细胞凋亡的信号转导机制研究进展[J].中国老年学杂志,2010,30(6):853-856.
- [21] 王宇辉,陈森,吴艳,等.血红素加氧酶-1 对大鼠 II 型肺泡上皮细胞凋亡及水通道蛋白-1 表达的影响[J].中华危重病急救医学,2013,25(6):351-355.
- [22] 刘海霞,陈森,杨秀娟,等.血红素加氧酶-1 对过氧化氢损伤的 II 型肺泡上皮细胞凋亡的影响[J].中华危重病急救医学,2014,26(2):110-114.
- [23] Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(6):749-762.
- [24] 刘亚华,张杰,代正,等.山莨菪碱对心搏骤停猪氧化应激致心肌线粒体损伤的保护作用[J].中华危重病急救医学,2013,25(5):290-293.
- [25] Bhandary B, Marahatta A, Kim HR, et al. An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases[J]. Int J Mol Sci, 2012, 14(1):434-456.
- [26] 李鑫,马晓春.血必净注射液对肾脏微血管内皮细胞发挥保护作用的机制探讨[J].中国中西医结合急救杂志,2012,19(2):94-97.
- [27] McAnulty SR, McAnulty L, Pascoe DD, et al. Hyperthermia increases exercise-induced oxidative stress [J]. Int J Sports Med, 2005, 26(3):188-192.
- [28] Burdon RH, Gill VM, Rice-Evans C. Oxidative stress and heat shock protein induction in human cells [J]. Free Radic Res Commun, 1987, 3(1-5):129-139.
- [29] 魏燕,辛晓燕.活性氧调控的细胞凋亡信号[J].现代肿瘤医学,2011,19(2):371-373.
- [30] Pucciariello C, Banti V, Perata P. ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses [J]. Plant Physiol Biochem, 2012, 59:3-10.
- [31] Schwarz M, Andrade-Navarro MA, Gross A. Mitochondrial carriers and pores: key regulators of the mitochondrial apoptotic program? [J]. Apoptosis, 2007, 12(5):869-876.

(收稿日期:2014-02-09)

(本文编辑:李银平)