

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.002190

线粒体损伤在脂多糖诱导的血管内皮细胞凋亡中的作用

张 钊¹, 蒋绪顺², 杨 珊¹, 陈雪梅¹

(重庆医科大学附属第一医院 1. 急诊科; 2. 肾内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)对血管内皮细胞凋亡的影响及线粒体损伤在其中的作用。**方法:**LPS 刺激体外培养人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)后,采用 CCK-8 检测血管内皮细胞存活率, Western blot 检测 HUVECs 细胞内 Bax、Bcl-2、细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)和 Cleaved-caspase 3 蛋白的表达,用流式细胞计数检测细胞的凋亡情况,用荧光探针 Mitotracker、JC-1、Mito SOX 染色检测细胞内线粒体形态及其膜电位的变化,以及线粒体来源活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生水平;用 MitoTEMPOL+LPS 干预细胞,检测 Bax、Bcl-2、Cyt C 蛋白表达以及凋亡。**结果:**LPS 浓度依赖性降低细胞存活率($F=99.31, P=0.000$)。与对照组相比, LPS 可以明显诱导 HUVECs 细胞凋亡($t=17.184, P=0.000$),并呈浓度依赖性增加 Cleaved-caspase 3 ($F=13.52, P=0.001$)、Cyt C ($F=21.008, P=0.000$)和 Bax ($F=16.325, P=0.000$)蛋白表达,并减少 Bcl-2 ($F=17.287, P=0.000$)蛋白的表达。LPS 刺激后 HUVECs 细胞内线粒体发生明显的片段化和颗粒状变、线粒体膜电位下降($F=92.286, P=0.000$),线粒体来源的 ROS 产生明显增加($t=5.324, P=0.006$)。采用线粒体 ROS 清除剂(MitoTEMPOL)处理,可抑制 LPS 刺激的 HUVECs 细胞 Bax ($F=19.854, P=0.002$)和 Cyt C ($F=11.594, P=0.009$)蛋白表达,增加 Bcl-2 ($F=8.077, P=0.020$)蛋白表达,同时降低 Cleaved-caspase 3 ($F=15.941, P=0.004$)蛋白表达和减少细胞凋亡($F=57.482, P=0.000$)。**结论:**LPS 可以诱导 HUVECs 细胞凋亡和线粒体损伤,损伤线粒体所释放的 ROS 可能在 LPS 诱导的血管内皮细胞凋亡的过程中发挥了重要的作用。

【关键词】脂多糖;血管内皮细胞;线粒体损伤;活性氧;凋亡

【中图分类号】R515.3;R631.2

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-04-09

Role of mitochondrial injury in lipopolysaccharide-induced vascular endothelial cell apoptosis

Zhang Zhao¹, Jiang Xushun², Yang Shan¹, Chen Xuemei¹

(1. Department of Emergency; 2. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of lipopolysaccharide (LPS) on vascular endothelial cell apoptosis and the role of mitochondrial injury in the process. **Methods:** The human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) cultured in vitro were stimulated with LPS, then Cell Counting Kit-8 was used to determine the viability of vascular endothelial cells; Western blot was used to determine the protein expression of Bax, Bcl-2, cytochrome C (Cyt C), and cleaved caspase-3 (CC3); flow cytometry was used to detect cell apoptosis; fluorescent staining with Mitotracker, JC-1, and Mito SOX was employed to determine the changes in mitochondrial morphology in the cells and their membrane potentials as well as the production level of reactive oxygen species (ROS) of mitochondrial origin. The cells were treated with MitoTEMPOL and LPS, and then were tested for cell apoptosis and the protein expression of Bax, Bcl-2, and Cyt C. **Results:** LPS reduced cell viability in a concentration-dependent manner ($F=99.310, P=0.000$). Compared with those in the control group, LPS significantly induced the apoptosis of HUVECs ($t=17.184, P=0.000$), concentration-dependently increased the protein expression of CC3, Cyt C, and Bax ($F=13.520, 21.008$, and 16.325 , respectively, $P=0.001, 0.000$, and 0.000 , respectively), and reduced the protein expression of Bcl-2 ($F=17.287, P=0.000$). LPS stimulation resulted in significant fragmentation and granular

degeneration of the mitochondria in HUVECs, decreased mitochondrial membrane potential ($F=92.286, P=0.000$), and significantly increased production of ROS of mitochondrial origin ($t=5.324, P=0.006$). Treatment with the mitochondrial ROS scavenger MitoTEMPOL inhibited the protein expression of Bax and Cyt C ($F=19.854$ and 11.594 , respectively, $P=0.002$ and 0.009 ,

作者介绍: 张 钊, Email: 370320696@qq.com,

研究方向: 脓毒症。

通信作者: 陈雪梅, Email: 1557451771@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81202318)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190530.1407.004.html>

(2019-05-31)

respectively), increased the protein expression of Bcl-2 ($F=8.077, P=0.020$), reduced the protein expression of CC3 ($F=15.941, P=0.004$), and reduced cell apoptosis ($F=57.482, P=0.000$) in the LPS-stimulated HUVECs. **Conclusion:** LPS can induce mitochondrial injury and apoptosis in HUVECs, and the ROS released from injured mitochondria may play an important role in LPS-induced vascular endothelial cell apoptosis.

[Key words] lipopolysaccharide; vascular endothelial cell; mitochondrial injury; reactive oxygen species; apoptosis

脓毒症是机体对感染的反应失调所导致的一种临床危重症,常导致多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。全球每年10万人中约535人发生脓毒症,并且发病率有逐年上升的趋势^[1]。其中,脓毒症住院死亡率达25%~30%^[2],但其具体发病机制并未完全阐明。血管内皮细胞是衬覆于血管内壁构成血管通透性的主要屏障,对维持正常器官功能和血管代谢平衡起着重要作用。脓毒症环境下,血管内皮细胞易损伤、活化、功能失调,进而导致的微循环障碍是引发器官功能障碍的核心和关键机制^[3-4]。其中,脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)作为革兰阴性菌细胞壁的主要成分^[5],在脓毒症时可以引发大量炎症因子的释放损伤血管内皮细胞,导致内皮细胞的脱落和死亡,进一步加重微循环的损伤和多器官功能障碍^[6]。但是,在脓毒症状态下,LPS诱导的内皮细胞凋亡的具体机制有待进一步研究。

线粒体是细胞的能量代谢中心,对维持细胞正常的生理功能起着重要作用,而线粒体损伤可以导致细胞的功能障碍,介导细胞凋亡^[7]。但LPS对内皮细胞线粒体损伤与凋亡的影响,还需进一步研究。本文拟通过研究LPS对内皮细胞凋亡及线粒体损伤的影响,以阐明LPS导致的线粒体损伤在内皮细胞凋亡中的作用,对寻找防治血管内皮细胞凋亡的有效措施具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

RPMI1640、胎牛血清(美国Gibco),LPS(美国Sigma), β -actin抗体(美国Sigma),Bax抗体(美国CST),Bcl-2抗体(美国CST),细胞色素C(cytochrome C, Cyt C)抗体(美国CST),Cleaved-caspase3抗体(美国CST),CCK-8(日本,DOJINDO),Mitotracker Red(美国Invitrogen),JC-1染液(中国Beyotime),

CCCP(中国Beyotime),Mitotracker Green(中国Beyotime),MitoTEMPOL(美国Sigma),Mito SOX 染液(美国Thermo)。

1.2 细胞培养和处理

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)购自美国模式菌种收集(ATCC)细胞库,用含10%灭活的胎牛血清、1 000 U/L青霉素和100 μ g/mL链霉素的RPMI1640培养基在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中传代培养,选择处于对数期的细胞,给予不同浓度LPS刺激24 h进行后续的实验研究。

1.3 CCK-8 检测细胞存活率

细胞贴壁80%左右,接种于96孔板,24 h后分别予以不同浓度(0、5、10、15、20 μ g/mL)LPS干预,同时设空白对照组。每组设3~5个复孔,37 $^{\circ}$ C孵箱中培养;24 h后每孔加入10 μ L CCK-8原液和90 μ L无血清培养基,继续孵育1~4 h。酶标仪450 nm波长下测定各孔光密度(optical density, OD)值。细胞存活率(%)=(实验组OD值-空白对照组OD值)/(对照组OD值-空白对照组OD值) $\times$ 100%。

1.4 Mitotracker 染色观察线粒体形态

取适量的HUVECs接种于12孔板中,待细胞贴壁长至融合度达70%~80%时,用10 μ g/mL LPS刺激HUVECs 24 h。PBS润洗细胞3次,加入用无血清培养基稀释的Mitotracker工作液(50 nmol/L)在37 $^{\circ}$ C避光染色30 min, PBS润洗细胞3次,荧光显微镜下采集图像。

1.5 JC-1 染色观察 HUVECs 线粒体膜电位

取适量HUVECs接种于12孔板中,待细胞贴壁长至融合度达70%~80%时,细胞经10 μ g/mL LPS处理24 h或10 μ mol/L线粒体氧化磷酸化解偶联剂(carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone, CCCP)处理2 h后,去除细胞培养液,加入0.5 mL稀释好的JC-1染色工作液(1 $\times$),充分混合均匀,在37 $^{\circ}$ C细胞培养箱中孵育30 min。孵育结束后,用预冷的JC-1染色缓冲液(1 $\times$)洗涤3次,荧光显微镜下采集图像。

1.6 Mito SOX 检测 HUVECs 线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生水平

取适量的HUVECs接种于12孔板中,待细胞贴壁长至密度达70%~80%时,用10 μ g/mL LPS刺激HUVECs 24 h。去除细胞培养液,加入用无血清培养基稀释好的MitoSOX Red染色工作液(5 μ mol/L)1 mL,在37 $^{\circ}$ C细胞培养箱内孵育

30 min,待孵育结束后,用 PBS 润洗细胞 3 次,荧光显微镜下采集图像。

1.7 流式细胞仪检测 HUVECs 凋亡

细胞处理后,0.25%胰酶消化细胞收集细胞悬液,用 PBS 清洗 2 次,将细胞重悬于 400 μ L 缓冲液中,采用 FITC-An-nexin V/PI 双染色法,通过流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.8 Western blot 检测蛋白的表达

细胞被处理后,用预冷的 PBS 润洗 1 次,加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液,冰上裂解 10 min,超声 10 次,4 $^{\circ}$ C 离心机、12 000 g 离心 10 min,收集上清,BCA 法测定蛋白浓度,等量蛋白上样,12%SDS-PAGE 电泳,转膜 1 h,5%脱脂牛奶 4 $^{\circ}$ C 封闭 3 h。一抗分别为 Bax(1:1 000),Bcl-2(1:1 000),Cyt C(1:1 000),Cleaved-caspase 3(1:1 000), β -actin(1:5 000),4 $^{\circ}$ C 摇床孵育过夜。摇床上用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,洗涤完毕后加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 h,ECL 化学发光试剂盒(美国 Advanta)显色,图片使用 Image J 软件进行灰度定量分析。

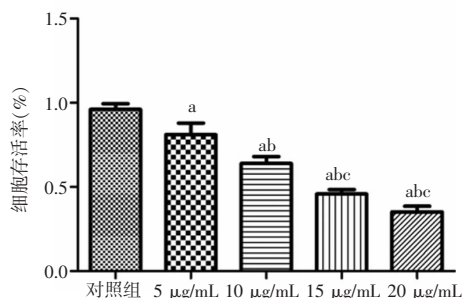
1.9 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析。实验均重复 3 次,正态分布计量资料数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。2 组间的比较采用 t 检验。多组间采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

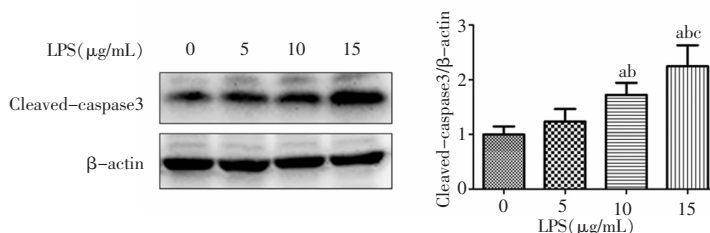
2.1 LPS 刺激对 HUVECs 凋亡的影响

本文采用 CCK-8 检测不同浓度(0、5、10、15、20 μ g/mL) LPS 刺激的 HUVECs 细胞存活率,结果发现,0 μ g/mL LPS 组细胞存活率(0.960 ± 0.034),5 μ g/mL LPS 组细胞存活率(0.811 ± 0.068),10 μ g/mL LPS 组细胞存活率(0.639 ± 0.041),15 μ g/mL LPS 组细胞存活率(0.458 ± 0.027),20 μ g/mL LPS 组细胞存活率(0.351 ± 0.034),提示随 LPS 浓度增加,细胞存活率下降,组间差异有统计学意义($F=99.31, P=0.000$),如图 1A 所示。10 μ g/mL LPS 浓度刺激 HUVECs 细胞时,细胞存活率 60%左右,因此,在后续实验中选用 10 μ g/mL LPS 刺激细胞。我们采用 Western blot 检测发现,Cleaved-caspase3 蛋白表达分别为:对照组(1.000 ± 0.146),5 μ g/mL LPS 组(1.233 ± 0.231),10 μ g/mL LPS 组(1.724 ± 0.2194),15 μ g/mL LPS 组(2.246 ± 0.385),提示 LPS 可以呈浓度依赖性增加 HUVECs 细胞内 Cleaved-caspase3 蛋白的表达($F=13.52, P=0.001$),如图 1B 所示;进一步采用流式细胞计数分析发现,对照组及 LPS 组细胞凋亡率分别为(4.053 ± 1.514)%、(32.087 ± 2.385)%,提示 10 μ g/mL LPS 刺激 HUVECs 24 h 后细胞凋亡明显增加($t=17.180, P=0.000$),如图 1C 所示。



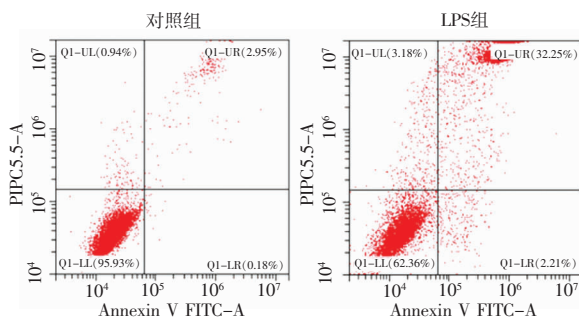
注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b,与 5 μ g/mL LPS 组比较, $P<0.05$;c,与 10 μ g/mL LPS 组比较, $P<0.05$

A. CCK-8 检测细胞存活率



注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b,与 5 μ g/mL LPS 组比较, $P<0.05$;c,与 10 μ g/mL LPS 组比较, $P<0.05$

B. Western blot 检测 Cleaved-caspase 3 蛋白表达



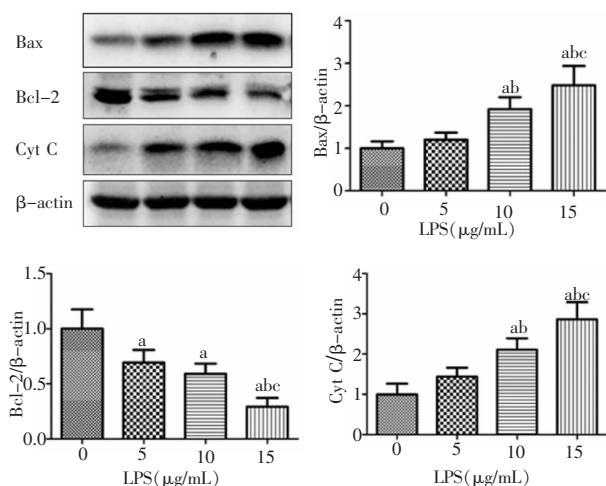
注:a,与对照组比较

C. 流式细胞仪检测细胞凋亡

图 1 LPS 刺激对 HUVECs 凋亡的影响

2.2 LPS 对 HUVECs 内 Bax、Bcl-2 和 Cyt C 蛋白表达的影响

本文进一步通过 Western blot 检测 HUVECs 内 Bax、Bcl-2 和 Cyt C 蛋白表达的变化,结果发现 Bax 蛋白的表达分别为:对照组 1.000 ± 0.161 , 5 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组 1.201 ± 0.171 , 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组 1.921 ± 0.283 , 15 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组 2.485 ± 0.454 , 组间差异有统计学意义($F=16.325, P=0.001$)。Bcl-2 蛋白的表达分别为:对照组 1.000 ± 0.176 , 5 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组 0.693 ± 0.115 , 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组 0.590 ± 0.093 , 15 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组 0.292 ± 0.080 , 组间差异有统计学意义($F=17.287, P=0.001$)。Cyt C 蛋白的表达分别为:对照组 1.000 ± 0.266 , 5 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组 1.439 ± 0.222 , 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组 2.108 ± 0.283 , 15 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组 2.866 ± 0.423 , 组间差异有统计学意义($F=21.008, P=0.000$)(图 2)。这些结果提示 LPS 可以呈浓度依赖性增加 Bax 及 Cyt C 蛋白表达,并减少 Bcl-2 蛋白表达。



注:a,与对照组比较, $P < 0.05$; b,与 5 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组比较, $P < 0.05$; c,与 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 组比较, $P < 0.05$

图 2 LPS 对 HUVECs 内 Bax、Bcl-2 和 Cyt C 蛋白表达的影响

2.3 LPS 刺激对 HUVECs 线粒体形态的影响

本文采用 Mitotracker 染色观察 HUVECs 线粒体形态的改变,结果发现,LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) 刺激 HUVECs 24 h 后, HUVECs 内线粒体的形态发生明显的片段化,线粒体从簇状变为颗粒状(图 3)。

2.4 LPS 刺激对 HUVECs 线粒体膜电位的影响

本文采用 JC-1 染色观察 HUVECs 内线粒体膜电位的变化。结果显示,各组膜电位相对荧光强度(红光/绿光)分别为:对照组 2.872 ± 0.271 , LPS 组 0.570 ± 0.247 , CCCP 组 0.516 ± 0.205 , 各组之间差异有统计学意义($F=92.27, P=0.000$),提示 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 HUVECs 24 h 后,可导致细胞内线粒体的膜电位明显下降(图 4)。

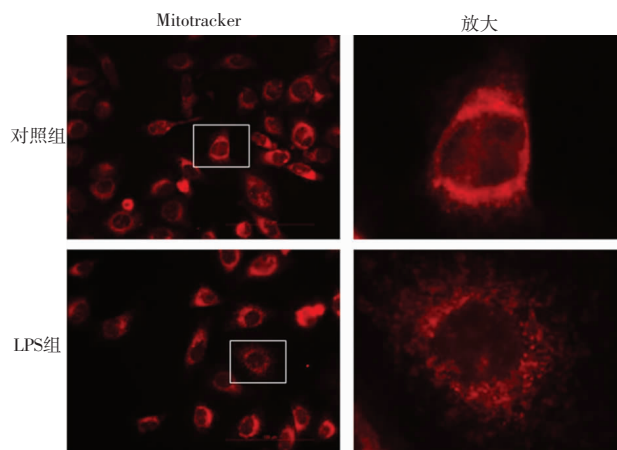
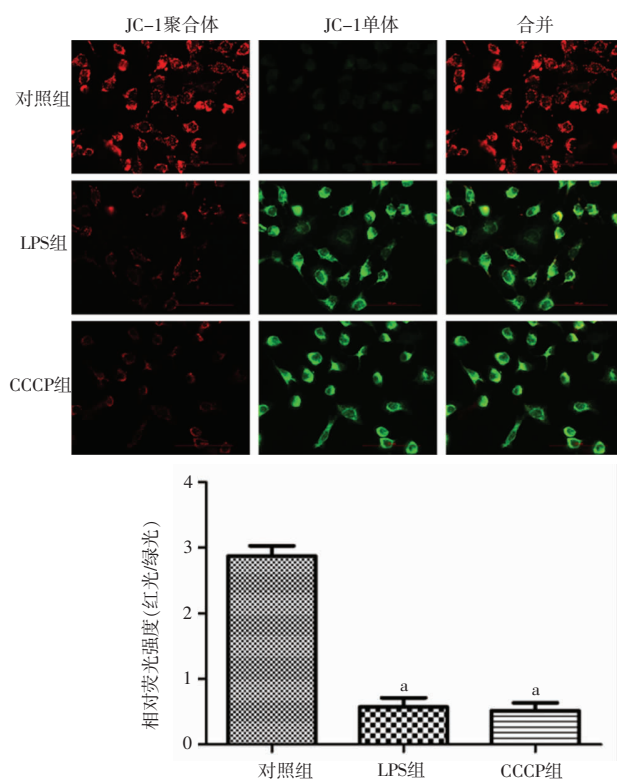


图 3 LPS 刺激对 HUVECs 线粒体形态的影响 (400 ×)



注:a,与对照组比较, $P < 0.05$

图 4 LPS 刺激对 HUVECs 线粒体膜电位的影响 (400 ×)

2.5 LPS 刺激对 HUVECs 线粒体来源 ROS 产生的影响

本文采用 Mito SOX 染色观察 HUVECs 线粒体来源 ROS 水平的变化。结果显示,对照组相对荧光强度为 0.922 ± 0.328 , LPS 组相对荧光强度为 2.507 ± 0.398 ,提示 10 $\mu\text{g/mL}$ LPS 刺激 24 h 可明显增加 HUVECs 线粒体来源的 ROS 产生($t=5.324, P=0.006$)(图 5)。

2.6 MitoTEMPOL 减轻 LPS 诱导的 HUVECs 凋亡

为了进一步研究线粒体产生的 ROS 在 LPS 诱导的内皮细胞凋亡中的作用,本研究采用线粒体 ROS 特异性清除剂 MitoTEMPOL (100 ng/L) 预处理 HUVECs,然后再用 LPS

(10 $\mu\text{g/mL}$)刺激细胞 24 h,结果发现,细胞凋亡分别为:对照组 3.640 ± 0.987 ,LPS 组 21.000 ± 2.406 ,MitoTEMPOL 组 10.880 ± 2.269 ;Cleaved-caspase 3 蛋白表达分别为:对照组 1.000 ± 0.099 ,LPS 组 1.442 ± 0.120 ,MitoTEMPOL 组 1.100 ± 0.080 ;Bax 蛋白表达分别为:对照组 1.000 ± 0.130 ,LPS 组 1.806 ± 0.207 ,MitoTEMPOL 组 1.274 ± 0.1927 ;Bcl-2 蛋白表达分别为:对照组 1.000 ± 0.240 ,LPS 组 0.496 ± 0.142 ,MitoTEMPOL 组 $0.951 \pm$

0.092 ;Cyt C 蛋白表达分别为:对照组 1.010 ± 0.149 ,LPS 组 1.680 ± 0.179 ,MitoTEMPOL 组 1.192 ± 0.197 ,提示 MitoTEMPOL 可明显减少 LPS 诱导的细胞凋亡($F=57.43, P=0.000$),明显下调 LPS 诱导的细胞内Cleaved-caspase 3 ($F=15.94, P=0.004$)、Bax ($F=16.32, P=0.000$)和 Cyt C ($F=22.01, P=0.000$)蛋白表达,同时上调 LPS 诱导的 Bcl-2 蛋白表达($F=17.29, P=0.000$),各组比较,差异有统计学意义(图 6)。

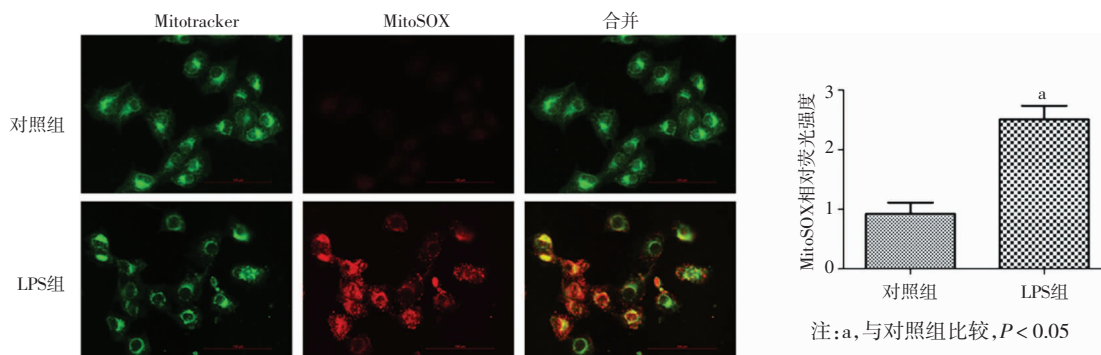
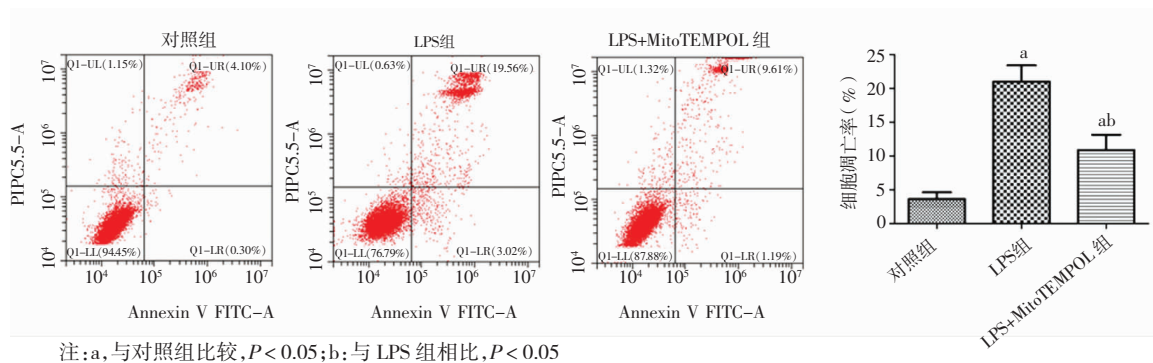
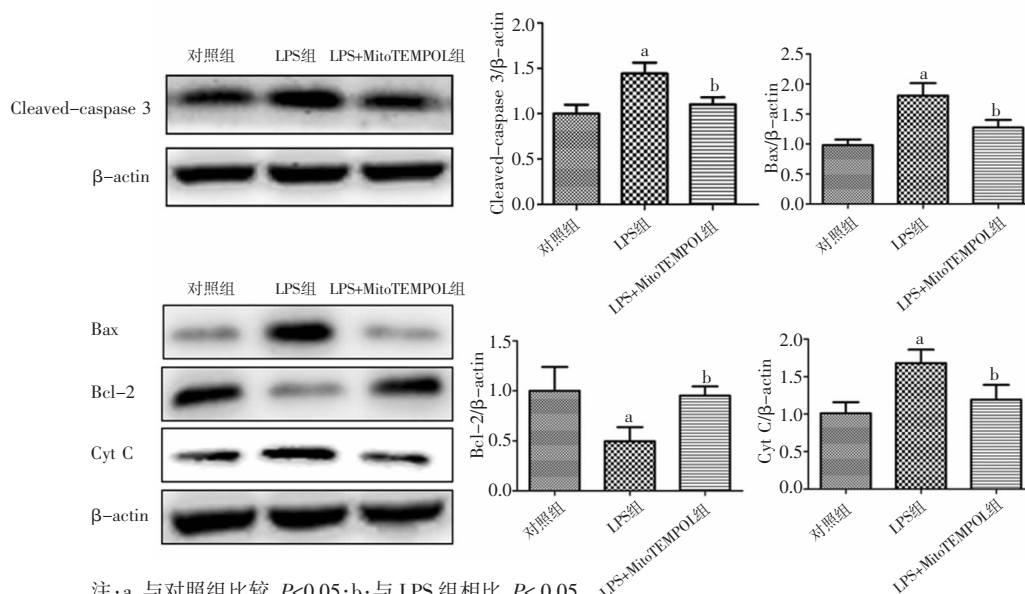


图5 LPS 刺激对 HUVECs 内线粒体来源的 ROS 产生的影响 (400 $\times$)



注:a,与对照组比较, $P < 0.05$; b:与 LPS 组相比, $P < 0.05$

A. 流式细胞仪检测细胞凋亡



注:a,与对照组比较, $P < 0.05$; b:与 LPS 组相比, $P < 0.05$

B. Western blot 检测蛋白表达

图6 MitoTEMPOL 对 LPS 诱导的 HUVECs 凋亡

3 讨论

脓毒症是由宿主对感染的反应失调引起的危及生命的器官功能障碍^[8],可通过炎症反应、免疫功能紊乱和凝血系统异常等机制引起血管内皮细胞的损伤(如内皮细胞通透性的增加、内皮细胞黏附性增加、血管张力改变及内皮细胞凋亡等),而血管内皮细胞的损伤反过来又可导致微血管屏障的完整性遭到破坏,进而引发组织水肿、休克和多器官功能衰竭,从而加重脓毒症的进展。研究表明,内皮细胞的功能状态能够预测脓毒症状态下器官功能障碍的程度,同时反映脓毒症的病程进展并预测其预后^[9]。在脓毒症小鼠动物模型中研究发现,血管内皮细胞的功能障碍是导致脓毒症小鼠多器官功能障碍和小鼠死亡的重要关键因素^[10]。很多内皮细胞生物标志物如黏附分子、血栓调节蛋白、血管生成素-2 等都可以反映内皮细胞受损的程度。研究发现,升高的血清血管生成素-2 水平与脓症患者院内死亡率呈正相关^[11],而血清血栓调节蛋白水平与严重脓症患者弥漫性血管内凝的进程、MODS 及其病死率密切相关^[12]。因此,研究脓症患者血清内皮功能损伤的机制,对于如何防治继发 MODS 具有极其重要的意义。HUVECs 是在体外实验中,用于模拟脓毒症状态下机体内皮细胞状态的一种最常见工具细胞^[13],能够部分反映脓毒症状态下血管内皮细胞发生的一系列病理生理变化。因此,本研究采用 HUVECs 株作为工具细胞,研究发现在 LPS 刺激下,脐静脉内皮内凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase 3 表达呈剂量依赖性增加,流式细胞计数也提示 LPS 可诱导 HUVECs 凋亡增加。进一步研究发现,LPS 可以浓度依赖性增加促凋亡蛋白 Bax、Cyt C 的表达,并减少抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,导致 Bax/Bcl-2 值减少,表明内毒素确实可以诱导血管内皮细胞凋亡发生,这可能是脓毒症继发 MODS 的关键机制。

线粒体作为细胞的能量代谢中心,在维持细胞正常的功能和代谢方面发挥了极为重要的作用。线粒体功能障碍则可导致细胞凋亡等损伤,在帕金森病^[14]、心血管疾病^[15]、糖尿病肾病^[16]、非酒精性脂肪肝^[17],甚至在脓毒症诱导的多器官功能障碍中也发挥重要的作用^[18-19],其机制与损伤的线粒体释放出促凋亡蛋白 Cyt C 入细胞质中进而诱发细胞凋亡有

关^[20-21]。本研究发现,LPS 刺激下,内皮细胞线粒体形态发生片段化、颗粒状改变,进一步通过 JC-1 染色观察显示 LPS 刺激下 HUVECs 线粒体膜电位明显下降,提示 LPS 可诱导内皮细胞线粒体损伤发生。事实上,线粒体是一个高度动态的细胞器,通过不断融合和分裂来维持细胞正常的代谢和功能^[22]。研究显示,线粒体的融合/分裂与细胞凋亡密切相关,凋亡早期线粒体网络往往发生明显的片段化^[23]。同时,很多证据表明线粒体分裂是细胞凋亡的最早阶段,线粒体的片段化可以引发线粒体膜渗漏,线粒体膜电位下降,位于线粒体膜间隙的 Cyt C、AIF 及 caspase 酶原等释放至细胞质内,通过激活下游的 caspase,启动 caspase 的级联反应,最终促使细胞凋亡^[24-25]。因此,结合本研究结果,推测 LPS 诱导的血管内皮细胞线粒体分裂和线粒体膜电位下降导致的线粒体损伤,可能是血管内皮细胞凋亡的一个早期表现。

线粒体是 ROS 的主要来源,特别是受损伤的线粒体可以释放出大量 ROS,同时线粒体也是 ROS 攻击的靶点,容易受到 ROS 的攻击而受到损伤^[26]。研究发现过量的 ROS 产生可以促进 Cyt C 释放、诱导细胞损伤和凋亡^[27-28]。本文采用 Mito SOX 染色发现,LPS 刺激下血管内皮细胞内线粒体来源的 ROS 产生水平明显增高,使用特异性线粒体 ROS 清除剂 MitoTEMPOL 处理后 LPS 诱导的内皮细胞凋亡和 Cleaved-caspase 3 蛋白表达明显减低,表明 LPS 可以诱导血管内皮细胞的凋亡,而受损的线粒体产生的 ROS 在介导血管内皮细胞凋亡的过程中发挥了重要作用。研究发现,线粒体膜的完整性可以受到凋亡调控相关蛋白如 Bcl-2 家族蛋白(包括抗凋亡蛋白 Bcl-2 和促凋亡蛋白 Bax)的调节^[29]。Bax/Bcl-2 值增加,可导致细胞线粒体膜的完整性破坏,促进 Cyt C 释放而介导凋亡^[30-31]。本文研究发现,线粒体 ROS 特异性清除剂 MitoTEMPOL 处理后,LPS 诱导的内皮细胞 Bax 和 Cyt C 蛋白表达下降,Bcl-2 蛋白表达增加,表明损伤线粒体来源的 ROS-凋亡调控相关蛋白在 LPS 诱导的血管内皮细胞凋亡中发挥重要作用。

综上所述,本文在体外实验中研究了 LPS 对血管内皮细胞线粒体损伤与凋亡的影响及其机制,结果表明 LPS 刺激可以改变血管内皮细胞线粒体的形态,导致血管内皮细胞线粒体膜电位下降,增加

血管内皮细胞线粒体来源的 ROS 产生,诱导血管内皮细胞凋亡,而受损伤的线粒体产生的 ROS 在 LPS 诱导血管内皮细胞凋亡过程中发挥了重要作用。上述机制仍需进一步在脓毒症动物模型中验证。

参 考 文 献

- [1] Walkey AJ, Lagu T, Lindenauer PK. Trends in sepsis and infection sources in the United States. A population-based study[J]. *Ann Am Thorac Soc*, 2015, 12(2):216-220.
- [2] Cohen J, Vincent JL, Adhikari NK, et al. Sepsis: a roadmap for future research[J]. *Lancet Infect Dis*, 2015, 15(5):581-614.
- [3] Lee WL, Liles WC. Endothelial activation, dysfunction and permeability during severe infections[J]. *Curr Opin Hematol*, 2011, 18(3):191-196.
- [4] Vallet B. Bench-to-bedside review: endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? [J]. *Crit Care*, 2003, 7(2):130-138.
- [5] Auer GK, Weibel DB. Bacterial cell mechanics[J]. *Biochemistry*, 2017, 56(29):3710-3724.
- [6] Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome[J]. *Blood*, 2003, 101(10):3765-3777.
- [7] Vakifahmetoglu-Norberg H, Ouchida AT, Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death[J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017, 482(3):426-431.
- [8] Sheats MK. A comparative review of equine SIRS, sepsis, and neutrophils[J]. *Front Vet Sci*, 2019, 6:69.
- [9] Bermejo-Martin JF, Martin-Fernandez M, Lopez-Mestanza C, et al. Shared features of endothelial dysfunction between sepsis and its preceding risk factors (aging and chronic disease) [J]. *J Clin Med*, 2018, 7(11):E400.
- [10] Ye X, Ding J, Zhou X, et al. Divergent roles of endothelial NF- κ B in multiple organ injury and bacterial clearance in mouse models of sepsis[J]. *J Exp Med*, 2008, 205(6):1303-1315.
- [11] Siner JM, Bhandari V, Engle KM, et al. Elevated serum angiopoietin 2 levels are associated with increased mortality in sepsis[J]. *Shock*, 2009, 31(4):348-353.
- [12] Lin SM, Wang YM, Lin HC, et al. Serum thrombomodulin level relates to the clinical course of disseminated intravascular coagulation, multiorgan dysfunction syndrome, and mortality in patients with sepsis [J]. *Crit Care Med*, 2008, 36(3):683-689.
- [13] Eichhorn T, Fischer MB, Weber V. Mechanisms of endothelial activation in sepsis and cell culture models to study the heterogeneous host response[J]. *Int J Artif Organs*, 2017, 40(1):9-14.
- [14] Liu XL, Wang YD, Yu XM, et al. Mitochondria-mediated damage to dopaminergic neurons in Parkinson's disease (review) [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2):615-623.
- [15] Chistiakov DA, Shkurat TP, Melnichenko AA, et al. The role of mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease: a brief review[J]. *Ann Med*, 2018, 50(2):121-127.
- [16] Forbes JM, Thorburn DR. Mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(5):291-312.
- [17] Ajith TA. Role of mitochondria and mitochondria-targeted agents in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2018, 45(5):413-421.
- [18] Singer M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure[J]. *Virulence*, 2014, 5(1):66-72.
- [19] Duran-Bedolla J, Montes de Oca-Sandoval MA, Saldana-Navor V, et al. Sepsis, mitochondrial failure and multiple organ dysfunction[J]. *Clin Invest Med*, 2014, 37(2):E58-69.
- [20] Linkermann A, Chen G, Dong G, et al. Regulated cell death in AKI[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(12):2689-2701.
- [21] Sanz AB, Santamaria B, Ruiz-Ortega M, et al. Mechanisms of renal apoptosis in health and disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(9):1634-1642.
- [22] Bereiter-Hahn J, Voth M. Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria [J]. *Microsc Res Tech*, 1994, 27(3):198-219.
- [23] Tanaka A, Youle RJ. A chemical inhibitor of DRP1 uncouples mitochondrial fission and apoptosis[J]. *Mol Cell*, 2008, 29(4):409-410.
- [24] Chandra D, Liu JW, Tang DG. Early mitochondrial activation and cytochrome c up-regulation during apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(52):50842-50854.
- [25] Chen M, Guerrero AD, Huang L, et al. Caspase-9-induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic Bcl-2 family members[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(46):33888-33895.
- [26] Mammucari C, Rizzuto R. Signaling pathways in mitochondrial dysfunction and aging[J]. *Mech Ageing Dev*, 2010, 131(7-8):536-543.
- [27] Wang CH, Wu SB, Wu YT, et al. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2013, 238(5):450-460.
- [28] Odinkova IV, Sung KF, Mareninova OA, et al. Mechanisms regulating cytochrome c release in pancreatic mitochondria[J]. *Gut*, 2009, 58(3):431-442.
- [29] Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis[J]. *Oncogene*, 2003, 22(53):8590-8607.
- [30] Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B, et al. Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(15):11615-11623.
- [31] Zhang H, Huang Q, Ke N, et al. Drosophila pro-apoptotic Bcl-2/Bax homologue reveals evolutionary conservation of cell death mechanisms[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(35):27303-27306.

(责任编辑:张辉洁)