

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.24.006

## 高压氧对兔颈内动脉和基底动脉内皮细胞凋亡影响的实验研究\*

范祯祯<sup>1</sup>, 刘志艳<sup>1</sup>, 蔡宏斌<sup>1</sup>, 张翠杰<sup>2</sup>, 张旭东<sup>1</sup>, 张兰芳<sup>1</sup>, 梁成<sup>1</sup>, 葛朝明<sup>1△</sup>

(1. 兰州大学第二医院神经内科, 兰州 730030; 2. 兰州大学第一医院高压氧中心, 兰州 730000)

**[摘要]** **目的** 探讨高压氧(HBO)对兔颈内动脉和基底动脉内皮细胞 Caspase-3 和 Bcl-2 mRNA 表达的影响。**方法** 健康成年新西兰白兔 24 只, 随机分为 HBO 组和对照组各 12 只。HBO 组每日持续暴露于 2.2 ATA HBO 下 60 min, 连续 3 d; 对照组正常饲养, 不予任何处理。实时荧光定量 PCR 法检测 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 在 2 组颈内动脉和基底动脉内皮细胞的表达水平。**结果** HBO 可使颈内动脉内皮细胞 Caspase-3 mRNA 表达明显下降 [(0.038±0.006) vs. (1.000±0.225)], Bcl-2 mRNA 表达明显增高 [(1.877±0.169) vs. (1.000±0.364)]; 使基底动脉内皮细胞 Caspase-3 mRNA 表达明显降低 [(0.419±0.091) vs. (1.000±0.175)], Bcl-2 mRNA 的表达明显升高 [(1.269±0.270) vs. (1.000±0.117)], 差异均有统计学意义 ( $P<0.01$ )。**结论** HBO 对兔脑血管内皮细胞凋亡的发生有抑制作用, 其机制可能与 HBO 对促凋亡基因 Caspase-3 的抑制和抗凋亡基因 Bcl-2 的促进作用有关。

**[关键词]** 高压氧; 颈内动脉; 基底动脉; 细胞凋亡; Caspase-3; Bcl-2; 实时荧光定量 PCR**[中图分类号]** R743.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)24-3328-03

## Apoptotic effect of HBO exposure on cerebral vascular endothelial cells in rabbits\*

Fan Zhenzhen<sup>1</sup>, Liu Zhiyan<sup>1</sup>, Cai Hongbin<sup>1</sup>, Zhang Cuijie<sup>2</sup>, Zhang Xudong<sup>1</sup>,  
Zhang Lanfang<sup>1</sup>, Liang Cheng<sup>1</sup>, Ge Zhaoming<sup>1△</sup>

(1. Department of Neurology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China;

2. Department of Hyperbaric Oxygen, First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730000, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of hyperbaric Oxygen (HBO) exposure on Caspase-3 and Bcl-2 mRNA expressions in both internal carotid artery (ICA) and basal artery (BA) in rabbits. **Methods** Twenty-four healthy adult New Zealand rabbits were randomly divided into 2 groups; HBO group and the control group, with each group consisted of 12 animals. The rabbits in the HBO group were exposed to HBO at 2.2 ATA for 60 minutes each day for 3 successive days. The rabbits in the control group were normally fed without any treatment. Real-time PCR was used to detect Caspase-3 and Bcl-2 mRNA expressions in both ICA and BA in 2 groups. **Results** HBO significantly decreased the Caspase-3 mRNA expression [(0.038±0.006) vs. (1.000±0.225)] and increased the Bcl-2 mRNA expression [(1.877±0.169) vs. (1.000±0.364)]. In ICA, HBO similarly decreased the Caspase-3 mRNA expression [(0.419±0.091) vs. (1.000±0.175)] and increased the Bcl-2 mRNA expression [(1.269±0.270) vs. (1.000±0.117)] in BA. All the differences mentioned above were of statistical significance ( $P<0.01$ ). **Conclusion** HBO exerts an inhibition effect on apoptosis in cerebral vascular endothelial cells. The mechanism may be related to inhibiting the expression of Caspase-3 mRNA and promoting the expression of Bcl-2 mRNA.

**[Key words]** hyperbaric Oxygen; internal carotid artery; basal artery; cell apoptosis; Caspase-3; Bcl-2; Real-time F. Q. PCR

流行病学调查显示, 脑血管疾病、颅脑损伤及各种中毒性脑病已成为严重影响人类生活质量的三大疾病。目前高压氧(hyperbaric Oxygen, HBO)对一氧化碳中毒、颅脑外伤的疗效已得到广泛的认可<sup>[1]</sup>。本文通过检测 HBO 对兔颈内动脉和基底动脉内皮细胞凋亡相关因子 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 表达的影响, 探讨 HBO 抗凋亡作用的可能机制, 为 HBO 在临床治疗脑部疾病提供理论依据。

## 1 材料与方法

## 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 健康成年新西兰白兔 24 只, 雌雄各半, 空腹体质量 2.0~2.5 kg, 由兰州大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为实验组( $n=12$ )和对照组( $n=12$ )。实验组行 HBO 处理, 对照组正常饲养不予任何处理。

**1.1.2 主要试剂与仪器** (1)主要试剂: 组织总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus, PrimeScript™ RT Master Mix 逆转录试剂, SYBR® Premix Ex Taq II 荧光定量 PCR 试剂, 兔  $\beta$ -actin、Caspase-3 和 Bcl-2 基因 cDNA 引物, 上述试剂均由 TaKaRa 公司提供。(2)主要仪器: PCR 仪(Light Cycler480, 瑞士 Roche 公司); 山东烟台冰轮氧舱厂中型高低压舱(兰州大学第一医院提供)。

## 1.2 方法

**1.2.1 HBO 处理** 将实验组置于特制密闭实验箱中, 箱顶设供氧管入口和出口, 放入 HBO 舱, 实验前给纯氧 3~5 min 洗箱, 测得箱内氧浓度大于 98% 为止。采用直排式给氧, 100% 纯氧, 约 0.01 MPa/min 匀速加压 15 min, 压力 2.2 ATA, 稳压吸氧 60 min, 匀速减压 25 min, 1 次/天, 每天进出舱时间固定,

\* 基金项目: 甘肃省自然科学基金计划(1107RJZA082)。 作者简介: 范祯祯(1989-), 在读硕士, 主要从事神经康复和高压氧研究。

△ 通讯作者, E-mail: gezhaoming@163.com。

表 1 FQ-RT-PCR 引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	扩增片段(bp)	参考基因(GenBank 序列号)
β-actin	FW:GATCGTGCGGGACATCAA	180	AF309819.1
	RW:AGGAAGGAGGGCTGGAACA		
Caspase-3	FW:AGACAGACAGTGGGGTTGACTATG	145	NM_001082117.1
	RW:GCACACAGGGACTGGATGAA		
Bcl-2	FW:AAGCTGTACAGAGGGGCTA	256	DQ529234.1
	RW:GACGGTAGCGACGAGAGAAG		

连续 3 d。

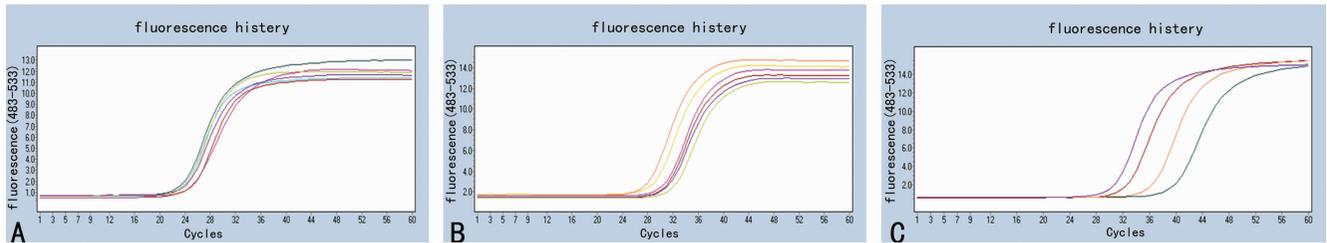
**1.2.2 实时荧光定量 PCR(FQ-RT-PCR)法检测 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 的表达** (1)组织取材:HBO 处理结束后 1 h 内,对照组和实验组均给予 3% 戊巴比妥钠麻醉,在相对无酶环境中分离血管,提取颈内动脉和基底动脉,置 -80 °C 冰箱中保存备用。(2)FQ-RT-PCR:采用 TaKaRa 公司 RNAiso Plus 试剂提取总 RNA,并检测 RNA 浓度。按照每 10 μL 逆转录体系 500 ng 总 RNA 反转录为 cDNA,反转录条件:37 °C 15 min,85 °C 5 s,4 °C 骤冷。以 10 μL 体系扩增 cDNA,其中 SYBR® Premix Ex Taq II (1X) 5.0 μL,上游引物 0.4 μL,下游引物 0.4 μL,cDNA 1 μL,dH<sub>2</sub>O 3.2 μL,扩增条件:95 °C 30 s;95 °C 5 s,60 °C 30 s,共 40 个循环。每组设置 3 个复孔,实验共重复 3 次,取各次实验的  $\bar{x} \pm s$  为计算各基因相对表达量的 CT 值。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法分析数据,计算 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 的相对

表达量<sup>[2]</sup>。计算公式:改变的倍数 =  $2^{-\Delta\Delta CT}$ ,即实验组目的基因 mRNA 的表达水平是对照组的  $2^{-\Delta\Delta CT}$  倍。其中,  $\Delta\Delta CT = (\text{实验组样本基因均值 CT} - \text{实验组 } \beta\text{-actin 基因均值 CT}) - (\text{对照组样本基因均值 CT} - \text{对照组 } \beta\text{-actin 基因均值 CT})$ 。FQ-RT-PCR 引物序列见表 1。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,对 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 表达水平进行单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

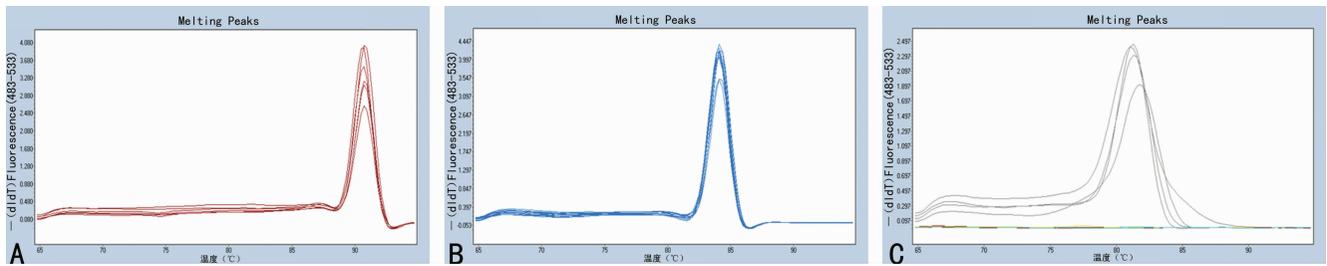
**2 结 果**

**2.1 兔脑血管内皮细胞目的基因 RT-PCR 的扩增曲线和熔解曲线** 实验组和对照组脑血管内皮细胞目的基因的扩增曲线包括指数扩增期、线性期及平台期(图 1);熔解曲线呈单峰曲线(图 2)。



A: β-actin; B: Caspase-3; C: Bcl-2。

图 1 目的基因的扩增曲线



A: β-actin; B: Caspase-3; C: Bcl-2。

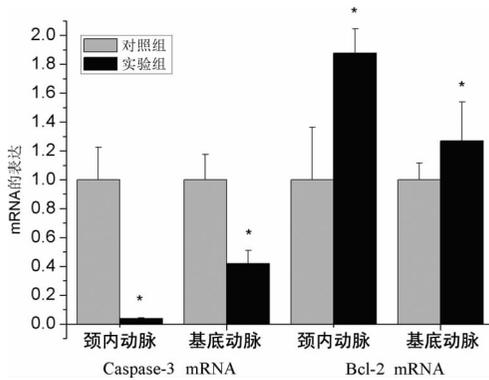
图 2 目的基因的熔解曲线

表 2 两组 Caspase-3 和 Bcl-2 mRNA 相对表达水平的 FQ-RT-PCR 比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	颈内动脉		基底动脉	
		Caspase-3 mRNA	Bcl-2 mRNA	Caspase-3 mRNA	Bcl-2 mRNA
对照组	12	1.000 ± 0.225	1.000 ± 0.364	1.000 ± 0.175	1.000 ± 0.117
实验组	12	0.038 ± 0.006 <sup>a</sup>	1.877 ± 0.169 <sup>a</sup>	0.419 ± 0.091 <sup>a</sup>	1.269 ± 0.270 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

2.2 兔脑血管内皮细胞 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 的定量表达水平 分别以对照组颈内动脉和基底动脉 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 表达作为参照。HBO 暴露 3 d 后, 实验组颈内动脉内皮细胞促凋亡基因 Caspase-3 mRNA 的表达明显降低, 抗凋亡基因 Bcl-2 mRNA 的表达明显增高; 基底动脉促凋亡因子 Caspase-3 mRNA 的表达明显减少, 抗凋亡因子 Bcl-2 mRNA 的表达明显升高, 与对照组比较差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 见表 2 和图 3。



\*:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

图 3 HBO 对兔颈内动脉和基底动脉 Caspase-3、Bcl-2 mRNA 的影响

### 3 讨论

细胞凋亡是指由基因决定的细胞程序性死亡, 凋亡是可干预的生理过程<sup>[3]</sup>。凋亡的最终通路是激活凋亡执行因子 Caspase-3, 通过启动“瀑布式”的级联反应, 导致靶细胞 DNA 断裂, 最终导致细胞死亡<sup>[4]</sup>。Bcl-2 是目前最重要的凋亡抑制基因, 其通过控制细胞器下游 Caspase 的活化, 发挥重要的抗凋亡作用<sup>[5]</sup>。脑细胞对缺氧尤为敏感, 缺氧可导致脑细胞过度凋亡。近年来的临床实践发现, HBO 可抑制脑细胞的凋亡, 改善患者的神经功能缺损从而发挥脑保护作用<sup>[6]</sup>。为此, 本实验选择兔脑血管内皮细胞作为研究对象, 检测 Caspase-3 和 Bcl-2 mRNA 的表达水平, 旨在发掘 HBO 可能的抗凋亡作用机制。

目前脑损伤后 Caspases 介导的细胞凋亡途径主要是线粒体途径。线粒体在凋亡早期的信号转导中起主要作用, 其中细胞色素 C (Cyt C) 的释放是该路径启动的关键环节<sup>[7]</sup>。脑损伤通过各种途径改变线粒体的形态、功能和膜电位, 开放线粒体膜的通透性转运孔 (MPTP), 同时线粒体内呼吸链解耦联, ATP 合成减少外膜破裂, 使大量 Cyt C 释放入细胞质, 细胞质内 Cyt C 浓度升高而线粒体内 Cyt C 浓度降低, 引发 Caspases 酶的活化和级联反应, 导致脑循环细胞凋亡<sup>[8]</sup>。Bcl-2 的编码产物通过其 C 末端疏水性氨基酸片段锚定于线粒体外膜上, 通过阻止线粒体膜的渗透性转换 (PT) 防止线粒体 Cyt C 的释放, 从而抑制细胞凋亡<sup>[9]</sup>。

本研究结果显示, HBO 暴露可使颈内动脉和基底动脉内皮细胞促凋亡因子 Caspase-3 表达明显减少, 抗凋亡因子 Bcl-2 的表达相对增高, 与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。表明 HBO 暴露可能通过调控凋亡相关因子的表达水平, 延缓和减少脑血管内皮细胞的凋亡。其可能机制是: (1) HBO 增加了脑组织的血氧含量, 加强了氧的弥散量和脑细胞对氧和葡萄糖的利用, 从而保证脑循环细胞的能量代谢, 稳定了线粒体结构, 抑制 Cyt C 从线粒体释放入细胞质<sup>[10]</sup>。(2)

HBO 可减少某些导致线粒体膜通透性、膜电位及结构改变的因子的表达, 使线粒体外膜的稳定性得以维持, 从而减少 Cyt C 的释放。(3) HBO 诱导抗凋亡因子 Bcl-2 的表达增加, 其抑制了线粒体 MPTP 的开放, 阻止了 Cyt C 从线粒体的释放<sup>[11]</sup>。(4) HBO 暴露使促凋亡因子 Caspase-3 表达量减少, 延缓和减少凋亡级联反应的启动, 进而抑制凋亡。由此可以看出, 上述机制多是通过抑制 Cyt C 从线粒体释放入细胞质, 从凋亡启动环节和最终效应部分截断了凋亡进程的进展和凋亡执行的发生, 使脑循环细胞得以存活。

综上, HBO 对脑血管内皮细胞的凋亡具有抑制作用, 这在维持内皮细胞增殖和凋亡的动态平衡、保证脑血管的正常舒缩功能方面具有一定的保护性意义, 对脑损伤后的临床恢复和预后的改善方面可能是有益的。

### 参考文献

- [1] 彭慧平, 卢晓欣. 高压氧医学的发展现状[J]. 海南医学, 2013, 24(19): 2890-2893.
- [2] Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method[J]. Nat Protoc, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [3] Wang KW. Molecular mechanisms of liver injury: poptosis or necrosis[J]. Exp Toxicol Pathol, 2014, 66(8): 351-356.
- [4] Cheng G, Wei L, Zhi-Dan S, et al. Atorvastatin ameliorates cerebral vasospasm and early brain injury after subarachnoid hemorrhage and inhibits caspase-dependent apoptosis pathway[J]. BMC Neurosci, 2009, 10: 7.
- [5] Tehranian R, Rose ME, Vagni V, et al. Disruption of Bax protein prevents neuronal cell death but produces cognitive impairment in mice following traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2008, 25(7): 755-767.
- [6] 刘勇, 陈向林, 朱玉辐, 等. 早期高压氧治疗对颅脑损伤神经细胞凋亡的影响[J]. 徐州医学院学报, 2008, 28(12): 819-822.
- [7] Heusch G, Boengler K, Schulz R. Cardioprotection: nitric oxide, protein kinases, and mitochondria[J]. Circulation, 2008, 118(19): 1915-1919.
- [8] 许少年, 刘家传, 王金标, 等. 兔颅脑爆炸伤后早期行高压氧治疗对 Cyt C、Bax、Bcl-2 表达的影响[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2012, 17(6): 270-273.
- [9] Solá S, Morgado AL, Rodrigues CM. Death receptors and mitochondria: two prime triggers of neural apoptosis and differentiation[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1830(1): 2160-2166.
- [10] Huang L, Obenaus A. Hyperbaric Oxygen therapy for traumatic brain injury[J]. Med Gas Res, 2011, 1(1): 21.
- [11] Peng Z, Xiao P, Guo H, et al. Effect of early hyperbaric Oxygen on neuronal apoptosis and learning and memory of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2009, 34(6): 468-475.