

线粒体途径在慢性低氧高二氧化碳小鼠骨骼肌凋亡中的作用

陈永青 郑 续 邵蒙蒙 王小同

摘 要 **目的** 探讨线粒体途径在慢性低氧高二氧化碳小鼠骨骼肌凋亡中的作用。**方法** 成年 storage protect feature (SPF) 级雄性 C57BL/6 小鼠 16 只随机分成两组:正常对照组($n=8$)和实验组($n=8$),将实验组小鼠置于常压低氧高二氧化碳舱内,通过氮气调节舱内氧浓度,使其维持在 9% ~ 11%,通入二氧化碳使其浓度维持在 5% ~ 6%,每天 8h,共 4 周。用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测骨骼肌细胞胞质内半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 3(caspase-3)的含量,荧光实时定量 PCR 法检测胞浆内细胞色素 C(Cyt-C)及细胞凋亡因子 Bax、Bcl-2 基因的表达情况。**结果** 与正常对照组相比,实验组骨骼肌细胞内的 caspase-3 含量增加($P<0.05$),Cyt-C mRNA 表达增多,Bax mRNA 表达增多,而 Bcl-2 mRNA 表达减少,Bcl-2/Bax 比值下降。**结论** 线粒体途径可能参与了慢性低氧高二氧化碳小鼠骨骼肌细胞的凋亡,Bcl-2/Bax 比值下降可能是促进骨骼肌线粒体途径凋亡的重要因素。

关键词 低氧 高二氧化碳 细胞凋亡 线粒体途径

Effect of Mitochondrial Pathway in The Apoptosis of Skeletal Muscle of The Mice Exposed to Chronic Hypoxia - hypercapnia. Chen Yongqing, Zheng Xu, Shao Mengmeng, Wang Xiaotong. Center of Neurology & Rehabilitation, The 2nd Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To observe the effect of mitochondrial pathway in the apoptosis of skeletal muscle of the mice which was exposed to chronic hypoxia - hypercapnia. **Methods** Sixteen adult male C57BL/6 mice of storage protect feature (SPF) level were divided randomly into two groups; the control group ($n=8$) and the experiment group ($n=8$). The latter group was placed in the special closed cabin where concentration of oxygen was maintained within 9% ~ 11% by inputting N_2 and concentration of carbon dioxide was regulated within 5% ~ 6% for 8 hours a day, for 4 weeks. Caspase-3 protein was assayed by ELISA, and the expression of Cyt-C mRNA, Bax mRNA and Bcl-2 mRNA was analyzed by real-time PCR. **Results** Compared with the control group, caspase-3 protein was more increased in the experiment group and the expression of Cyt-C mRNA and Bax mRNA in the skeletal muscle of the experiment group was more increased, and the expression of Bcl-2 mRNA was less increased, and the ratio of Bcl-2/Bax was declined. **Conclusion** The mitochondrial pathway may play an important role in the apoptosis of the skeletal muscle of the mice which exposed to chronic hypoxia - hypercapnia. The ratio of Bcl-2/Bax declining may accelerate the occurrence of the apoptosis of mitochondrial pathway.

Key words Hypoxia; Hypercapnia; Apoptosis; Mitochondrial pathway

目前,慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)已经不再单纯的被认为是一个肺脏疾病,还累及多个肺外器官,其肺外表现有骨骼肌功能障碍、体重减轻、骨质疏松症、心血管疾病等^[1]。尤其是骨骼肌萎缩及体重减轻,在 COPD 患者的自然病程中普遍存在,近年来有关研究认为骨骼肌

萎缩与 COPD 患者的病死率密切相关,Agusti 等^[2,3]在严重体重下降的 COPD 患者中发现骨骼肌细胞凋亡增加,导致骨骼肌纤维数量减少,从而引起骨骼肌萎缩,提示凋亡引起的细胞死亡也许是 COPD 骨骼肌萎缩的重要机制之一。本课题组前期研究已发现,慢性低氧高二氧化碳血症可导致小鼠骨骼肌凋亡指数明显升高,并出现肌纤维局部萎缩和线粒体部分损害,伴有炎症细胞浸润增多,提示凋亡可能参与了 COPD 引起的小鼠骨骼肌萎缩,炎症反应激活的死亡受体途径及线粒体途径可能参与了 COPD 引起的骨骼肌细胞凋亡^[4]。本实验模拟 COPD 的发病机制,建立 COPD 模型,通过观察干预后的 caspase-3 的含量

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y205233);温州市科技局科研基金资助项目(Y2005A001)

作者单位:325000 温州医学院附属第二医院脑科(陈永青、郑续、邵蒙蒙);康复中心(王小同)

通讯作者:王小同,主任医师,硕士生导师,电子信箱:wangxt22@163.com

变化,进一步探讨凋亡是否参与了 COPD 导致的骨骼肌萎缩,同时观察实验组与正常对照组 Cyt - C 及细胞凋亡因子 Bax、Bcl - 2 基因的表达情况,探讨线粒体途径在慢性低 O₂ 高 CO₂ 小鼠骨骼肌细胞凋亡中的作用及其可能的调节机制。

材料与方法

1. 仪器与设备:动物实验复合模拟舱(潍坊华信氧业有限公司)、酶标仪(芬兰 Thermo 公司)、洗板机(芬兰 Thermo 公司)、LithtCycler480 实时定量 PCR 仪(罗氏公司)。

2. 实验动物及分组:成年 storage protect feature(SPF)级雄性 C57BL/6 小鼠 16 只(由温州医学院实验动物中心提供),体重 20 ~ 30g,按随机数字表法分为实验组 8 只和正常对照组 8 只。

3. 模型建立:实验组置于低 O₂ 高 CO₂ 舱中(吸入气 O₂ 浓度为 9.0% ~ 11.0%,CO₂ 浓度为 5.0% ~ 6.0%),每天 8h,每周 6 天。其余时间与对照组在同一室内(室温 15 ~ 20℃,相对湿度 50% ~ 70%),对照组除吸入空气外(正常空气中 O₂ 浓度为 21%,CO₂ 浓度为 0.03%),其他条件与实验组相同^[5]。

4. 骨骼肌组织取材:干预结束后,用 1% 水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,仰卧固定,迅速分离,取左右两侧股外侧肌,经液氮冷冻后放入 -70℃ 冰箱保存,用于 ELISA 测定和实时定量荧光 PCR 测定。

5. ELISA 法测定 caspase - 3 含量:称量骨骼肌重量,加入 90% 体积冰 PBS 液(pH = 7.4),研磨钵充分研磨,1500r/min 离心 10min(4℃ 中进行),取上清液,制成 10% 的组织溶液,4℃ 保存待测。用 ELISA 法检测样本中 caspase - 3 的含量。严格按照说明书操作步骤进行,于酶标仪上 450nm 波长检测各孔的光密度(optical density,OD)值。用 Ascent software for Multiskan 分析软件,以 OD 值为纵坐标,标准品浓度为横坐标绘制标准曲线,根据样本的 OD 值在标准曲线上读出样本中所测物质的量。

6. 实时荧光定量 PCR 检测 Cyt - C mRNA、Bax mRNA、Bcl - 2 mRNA 的表达:用 Trizol(Invitrogen 公司)抽提总 mRNA,提取 1μl RNA 样品,采用紫外分光光度法测定 RNA 纯度,以 OD260/OD280 的比值表示,要求比值在 1.8 ~ 2.0 之间。根据反转录试剂盒(Fermentas 公司)说明书操作,进行反转录。PCR 引物由大连宝生物工程有限公司设计并合成。Cyt - C 引物序列为上游:5' - agcctgggtacacagagaa - 3',下游:5' - actcacacaacctgtctgcac - 3';Bax 引物序列为上游:5' - tgcagaggatgattgctgac - 3',下游:5' - gatcagctcgggcactttag - 3';Bcl - 2 引物序列为上游:5' - aggagcaggtgctacaaga - 3',下游:5' - gcaatttcccacactgtct - 3',采用 GAPDH 作为内参照。用 LithtCycler 480 实时定量 PCR 仪(罗氏公司)检测,实验重复 3 次。通过比较 ΔCt 的方法进行目的基因表达的定量分析,Cyt - C、Bax、Bcl - 2 的相对表达量用 2^{-ΔΔCt} 表示。Ct 为每个反应管内荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数,ΔCt 为 Cyt - C mRNA、Bax mRNA、Bcl - 2 mRNA 值与内参照 Ct 值之差。ΔΔCt 值为实验组 Cyt - C mRNA、Bax mRNA、Bcl - 2 mRNA ΔCt 值与正常对照组 ΔCt 值之差。

7. 统计学方法:计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 16.0 统计软件进行分析。检验采用独立样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 骨骼肌细胞质内 caspase - 3 的水平:与正常对照组(*n* = 8)25.76 ± 5.20ng/ml 相比,实验组(*n* = 8)骨骼肌细胞内 caspase - 3 水平(39.69 ± 14.66ng/ml)升高(*P* < 0.05)。

2. 荧光实时定量 PCR 结果:定量 PCR 结果采用 2^{-ΔΔCt} 相对表达量分析法,以正常对照组基因表达量作为基数,在此基础上比较实验组的 Cyt - C mRNA、Bax mRNA、Bcl - 2 mRNA 表达量。实验组的 Cyt - C mRNA、Bax mRNA、Bcl - 2 mRNA 的 2^{-ΔΔCt} 值分别为 5.80 ± 0.70、20.56 ± 3.03、0.93 ± 0.23。说明相对于正常对照组,实验组的 Cyt C mRNA、Bax mRNA 呈高表达,而 Bcl - 2 mRNA 呈低表达(表 1)。

表 1 实验组小鼠骨骼肌 Cyt C mRNA、Bax mRNA、Bcl - 2 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

指标	ΔΔCt 值	2 ^{-ΔΔCt} 值
Cyt - C mRNA	-2.57 ± 0.14	5.80 ± 0.70
Bax mRNA	-4.34 ± 0.22	20.56 ± 3.03
Bcl - 2 mRNA	4.34 ± 0.58	0.05 ± 0.01

讨 论

COPD 是一种全身性疾病,除了有典型的肺部病理表现外,肺外表现如骨骼肌功能障碍也成为近几年的研究热点。骨骼肌萎缩作为 COPD 的肺外效应愈来愈受到人们的关注,引起骨骼肌萎缩的原因有很多,如能量摄入不足、能量消耗过多、蛋白质分解代谢异常及炎症刺激、组织缺氧、皮质激素的使用等,但其具体的分子生物学机制尚未明确。近年来,有研究认为细胞凋亡是 COPD 骨骼肌萎缩的原因之一,也有研究认为在 COPD 的稳定期,体重相对恒定的患者并未发现骨骼肌细胞凋亡^[5,6]。因此,细胞凋亡是否参与了 COPD 骨骼肌萎缩,及其可能的作用机制,有待进一步证实。

细胞凋亡是细胞循自身程序结束其生命的主动死亡的过程,具有特征的形态和生化改变,是由基因控制的个别细胞发生的自主有序的死亡。本研究结果显示,与正常对照组比较,实验组小鼠骨骼肌细胞

胞质内 caspase - 3 含量增加, caspase - 3 处于凋亡有序级联反应的下游, 是细胞凋亡的内源性途径(线粒体途径)和外源性途径(死亡受体途径)的重要汇聚点, 主要与细胞凋亡的最终执行有关, 是效应 caspase。本实验进一步证实凋亡参与了 COPD 导致的骨骼肌萎缩^[7]。

Cyt - C 是第 1 个被发现的促凋亡蛋白, 在线粒体呼吸链中传递电子, 起到载体的作用, 其从线粒体释放到胞质这一过程是引起细胞凋亡的关键^[8]。本实验慢性低 O₂ 高 CO₂ 导致小鼠骨骼肌线粒体损伤, Cyt - C 被释放到胞质中, 与凋亡蛋白酶激活因子(Apaf - 1)、dATP、procaspase - 9 组成凋亡体(apoptosome), 凋亡体使 procaspase - 9 激活, 进而激活其下游的 procaspase - 3, 活化的 caspase - 3 启动细胞凋亡^[9]。本研究通过 RT - PCR 检测到实验组骨骼肌细胞胞质内 Cyt - C mRNA 表达较正常对照组增加 ($P < 0.05$), 提示线粒体途径是 COPD 骨骼肌细胞凋亡的可能机制之一。

Bcl - 2 家族是目前较为公认的与凋亡密切相关的基因, 包括抗凋亡的 Bcl - 2 和促凋亡的 Bax 蛋白等, 其主要调控线粒体途径。有研究表明, Bcl - 2 家族成员定位于线粒体膜上, 其主要通过调节线粒体外膜的通透性和完整性来发挥作用^[10]。本实验观察到: 与正常对照组相比, 实验组小鼠骨骼肌 Bax mRNA 表达增高, 而 Bcl - 2 mRNA 表达降低, Bax 受到慢性低 O₂ 高 CO₂ 刺激后能够发生空间构象改变, 通过被暴露的 C 末端疏水结构域插入到线粒体外膜上, 改变线粒体膜的通透性致使 Cyt - C 释放, 进而激活下游的 caspases - 3, 最终导致细胞凋亡^[11]。Bcl - 2 是一种最早被发现的抑制细胞凋亡的蛋白, 主要位于线粒体, 可以调节膜的通透性, 其抑制细胞凋亡的作用与 Bax 的促凋亡作用相对^[12,13]。Bcl - 2 与 Bax 的比值对细胞凋亡起决定作用, Bcl - 2/Bax 下降是促进细胞线粒体途径凋亡的重要因素。本研究显示, 实验组小鼠骨骼肌细胞内 Bcl - 2/Bax 下降, 加速了线粒体途径的细胞凋亡, 促进骨骼肌细胞的死亡。

总之, 本研究进一步证实凋亡参与了 COPD 引起的骨骼肌萎缩, 线粒体途径可能是 COPD 骨骼肌细胞凋亡的机制之一, 至于 COPD 是否同时通过其他机制促进骨骼肌细胞的凋亡, 尚有待进一步研究探讨。另

外, Bcl - 2/Bax 下降可能是促进骨骼肌细胞线粒体途径凋亡的重要因素。

参考文献

- 1 Van Helvoort HA, Heijdra YF, De Boer RC, *et al*. Six - minute walking - induced systemic inflammation and oxidative stress in muscle - wasted COPD patients [J]. *Chest*, 2007, 131 (2) : 439 - 445
- 2 Mador MJ. Muscle mass, not body weight, predicts outcome in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166 : 787 - 789
- 3 Agusti AG, Sauleda J, Miralles C, *et al*. Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002, 166 : 485 - 489
- 4 包绍智, 房春燕, 王小同, 等. 慢性低氧高二氧化碳对小鼠骨骼肌形态的影响 [J]. *温州医学院学报*, 2009, 39 : 8 - 11
- 5 徐漫欢, 范小芳, 王小同, 等. 吸入低氧高二氧化碳对小鼠右心室收缩压及肺小动脉重建的影响 [J]. *浙江医学*, 2008, 30 : 41 - 43
- 6 Gosker HR, Kubat B, Schaart, *et al*. Myopathological features in skeletal muscle of patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Eur Respir J*, 2003, 22 (2) : 280 - 285
- 7 Fuentes P, Salvesen P. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition [J]. *Biochem*, 2004, 384 : 201 - 232
- 8 Bank A, Wang P, Du C, *et al*. SMAC mimetics sensitize nonsteroidal antiinflammatory drug - induced apoptosis by promoting caspase - 3 - mediated cytochrome c release [J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (1) : 276 - 284
- 9 Careppi P, Sinibaldi F, Fiomucci L, *et al*. Apoptosis and human diseases: mitochondrion damage and lethal role of released cytochrome c as proapoptotic protein [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16 (31) : 4058 - 4065
- 10 Lin HH, Chen JH, Huang CC, *et al*. Apoptotic effect of 3, 4 - dihydroxy - benzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38MAPK signaling activation [J]. *Int J Cancer*, 2007, 120 (11) : 2306 - 2316
- 11 Kim BM, Chung HW. Hypoxia/reoxygenation induces apoptosis through a ROS - mediated caspase - 8/Bid/Bax pathway in human lymphocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363 (3) : 745 - 750
- 12 Luo T, Xia Z, Ansley DM, *et al*. Propofol dose - dependently reduces tumor necrosis factor - alpha - induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis; effects on Bcl - 2 and Bax expression and nitric oxide generation [J]. *Anesth Analg*, 2005, 100 (6) : 1653 - 1659
- 13 Haddad JJ. The role of Bax/Bcl - 2 and pro - caspase peptides in hypoxia/reperfusion - dependent regulation of MAPK (ERK): discordant proteomic effect of MAPK (p38) [J]. *Protein Pept Lett*, 2007, 14 (4) : 361 - 371

(收稿: 2011 - 10 - 28)

(修回: 2011 - 11 - 22)