

• 论 著 •

诱骗受体 3 对内毒素诱导的血管内皮细胞凋亡的影响*

陈洪卫, 侯彦强[△]

(上海市松江区中心医院检验科, 上海 201600)

摘要:目的 观察过表达或干扰诱骗受体 3(DcR3)表达对内毒素诱导的血管内皮细胞凋亡的影响。方法 培养人脐静脉内皮细胞(HUVEC),将细胞平均分成 6 组:正常对照组、单纯脂多糖(LPS)刺激组、LPS+小干扰 RNA(siRNA) DcR3 组、LPS+siRNA 对照组、LPS+质粒增强绿色荧光蛋白(pEGFP)-DcR3 组、LPS+pEGFP 对照组。利用蛋白免疫印迹(Western blot)方法检测各组细胞内 DcR3 的表达水平,通过流式细胞术及 Western blot 方法比较各组之间凋亡率的差异。结果 LPS+pEGFP-DcR3 组 DcR3 表达水平较正常对照组升高($P<0.05$),而 LPS+siRNA DcR3 组 DcR3 表达水平下降($P<0.05$);单纯 LPS 刺激可以诱导 HUVEC 凋亡,使细胞凋亡率明显高于正常对照组($P<0.05$),干扰 DcR3 的表达可以促进 LPS 的诱导凋亡作用($P<0.05$),而 DcR3 过表达可以显著抑制 LPS 诱导的细胞凋亡($P<0.05$)。结论 DcR3 可以抑制 LPS 诱导的血管内皮细胞凋亡,促进其表达可能减轻由于内皮细胞凋亡带来的毛细血管渗漏。

关键词:诱骗受体 3; 内毒素; 血管内皮细胞; 凋亡
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.23.014 **中图法分类号:**R446.9
文章编号:1673-4130(2020)23-2876-06 **文献标识码:**A

Effect of decoy receptor 3 on endotoxin induced apoptosis of vascular endothelial cells*

CHEN Hongwei, HOU Yanqiang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Songjiang District Central Hospital, Shanghai 201600, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of overexpression or interference with decoy receptor 3(DcR3) expression on endotoxin induced apoptosis of vascular endothelial cells. **Methods** Human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) were cultured and divided into six groups equally: normal control group, simple lipopolysaccharide(LPS) stimulation group, LPS+small interfering RNA(siRNA) DcR3 group, LPS+siRNA control group, LPS+plasmid Enhanced Green Fluorescent Protein(pEGFP)-DcR3 group and LPS+pEGFP-control group. Western blot was used to detect the expression of DcR3 in each group, and the difference in apoptosis rate between each group was compared by flow cytometry and western blot. **Results** The expression level of DcR3 in the LPS+pEGFP-DcR3 group was higher than that in the normal control group ($P<0.05$), while the expression level of DcR3 in the LPS+siRNA DcR3 group decreased ($P<0.05$). Simple LPS stimulation could induce HUVEC apoptosis and make the cell apoptosis rate was higher than normal control group ($P<0.05$). Interference of DcR3 expression could promote the apoptosis induced by LPS ($P<0.05$), and overexpression of DcR3 could inhibit the apoptosis induced by LPS ($P<0.05$). **Conclusion** DcR3 can inhibit the apoptosis of endothelial cells induced by LPS, promoting its expression may reduce the blood capillary leakage caused by endothelial cell apoptosis.

Key words: decoy receptor 3; endotoxin; vascular endothelial cells; apoptosis

脓毒症发生时毛细血管的通透性增加,形成第三交换障碍。有研究资料显示,严重脓毒症患者,毛细血管间隙液体引起组织水肿(如肺泡水肿),造成组织的氧血管渗漏综合征(CLS)的发生率几乎达 100%,并且

* 基金项目:上海市卫生和计划生育委员会青年科研项目(20164Y0025);上海市松江区科学技术攻关项目(2017sjkjjg48)。
作者简介:陈洪卫,男,主管技师,主要从事感染免疫实验诊断方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail:houyanqiang@aliyun.com。
本文引用格式:陈洪卫,侯彦强. 诱骗受体 3 对内毒素诱导的血管内皮细胞凋亡的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(23): 2876-2881.

CLS 的持续时间越长,多器官功能障碍综合征发生率和病死率也越高^[1]。另有研究表明,CLS 的发生同血管内皮细胞凋亡有密切关系^[2]。本课题组在前期研究中发现,脓毒症患者其血清诱骗受体 3(DcR3)表达会升高。DcR3 是 20 世纪末发现的肿瘤坏死因子受体的新成员,是一类可以和肿瘤坏死因子超家族第 14 个成员(LIGHT)、死亡因子配体(FasL)及肿瘤坏死因子配体相关分子 1A(TL1A)特异性结合的受体蛋白,从而阻断该配体诱导产生的凋亡。DcR3 与多种肿瘤性及炎性疾病的发生发展密切相关,但 DcR3 在脓毒症发病过程中发挥何种作用尚不清楚^[3-4]。因此,本研究通过观察过表达或干扰 DcR3 对内毒素诱导的血管内皮细胞凋亡的影响,探讨 CLS 的发生机制和防治策略。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 1640 培养液和胎牛血清购于美国 GIBCO 公司;脂多糖(LPS)购于美国 Sigma 公司;质粒增强绿色荧光蛋白(pEGFP)-DcR3 和 DcR3 小干扰 RNA(siRNA)由上海和元生物技术公司合成,DcR3 siRNA 序列为: Sense5'-UCGACUUUGUGGCUUUC-CA-3', Antisense5'-UGGAAAGCCAC AAAGUCGA-3';胱天蛋白酶(Caspase)3 和 Cleave PARP 抗体均购自美国 Cell Signaling 公司。

1.2 血管内皮细胞的培养及传代 -80℃冰箱中取出人脐静脉内皮细胞(HUVEC)冻存管,迅速放入 37℃水浴中,不停摇动,使其在 1 min 内融化,无菌条件下吸出细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入适量培养液重悬细胞接种于培养瓶中,5% CO₂、37℃培养箱培养。待细胞长满细胞瓶时,进行传代,弃去旧培养液,磷酸盐缓冲液漂洗一次,再加入 1.5 mL 胰酶消化,镜下观察细胞回缩变圆、间隙增大时,加入新鲜培养基终止反应,反复吹打细胞重悬,1:3 转移入培养瓶,5% CO₂、37℃培养箱继续培养。

1.3 细胞处理 将细胞分成 6 组:正常对照组、单纯 LPS 刺激组、LPS+siRNA DcR3 组、LPS+siRNA 对照组、LPS+pEGFP-DcR3 组和 LPS+pEGFP 对照组,分别置于 6 孔板中培养,调整并计数,使各孔含有 10⁶ 个细胞,每个处理重复 3 次。具体处理如下:细胞贴壁后 12 h,正常对照组和单纯 LPS 刺激组先不做任何处理;LPS+siRNA DcR3 组和 LPS+pEGFP-DcR3 组利用 Liporin2000 转染 25 nmol/L DcR3 siRNA 和 pEGFP-DcR3 进行预处理;LPS+siRNA 对照组和 LPS+pEGFP 对照组转染相同剂量的 siRNA 和 pEGFP 进行预处理。预处理 48 h 后,除正常对照组

外,其余各组均加入 10 μg/mL LPS 刺激细胞,24 h 后,收集细胞上清液及细胞进行下一步实验。

1.4 实时荧光定量 PCR 用总 RNA 提取试剂(Trizol)裂解细胞抽提总 RNA 并反转录成 cDNA,采用 SYBR green 法对 DcR3 mRNA 的表达水平进行检测。DcR3 特异性引物由上海生工生物工程有限公司合成。利用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪进行基因扩增。PCR 反应条件为:95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s,60℃退火并延伸 34 s,进行 40 个循环。收集每个 PCR 延伸期的荧光,反应产物经溶解曲线检测特异性,经 SDS2.2 软件分析循环阈值(Ct)值。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算 mRNA 的表达水平,其中 ΔΔCt = ΔCt_{实验组} - ΔCt_{对照组}, ΔCt = Ct_{靶基因} - Ct_{内参基因}。

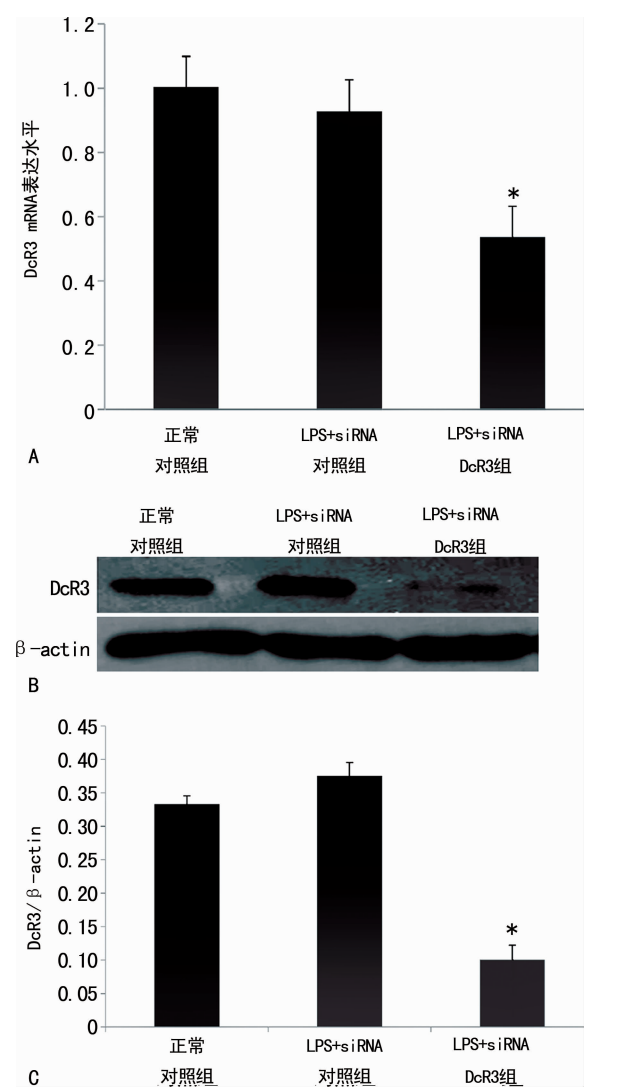
1.5 蛋白免疫印迹(Western blot) 使用 RIPA 裂解细胞,经 BCA 蛋白定量试剂盒定量后,取 50 μg 蛋白,水浴煮沸 10 min 后行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺蛋白电泳,转移至聚偏二氟乙烯膜上。5%脱脂蛋白室温封闭 2 h,加入适量的 DcR3、Caspase3 和 β-actin 抗体,4℃孵育过夜,0.1%的磷酸盐吐温缓冲液(PBST)漂洗 3 次,每次 5 min。加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h 后,PBST 洗 3 次,每次 5 min。结果用 ECL-Plus 化学发光试剂盒检测,X 光胶片曝光、显影、定影、观察结果。

1.6 流式细胞术检测细胞凋亡 各组细胞处理后,用 Annexin V-FITC Apoptosis Detection kit (Becton Dickinson 美国)检测细胞凋亡率。

1.7 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 siRNA 干扰后细胞内 DcR3 mRNA 及蛋白的表达水平 实验共设置 3 组,第 1 组为 48 h 正常对照组,第 2 组为 48 h LPS+siRNA 对照组,第 3 组为 48 h LPS+siRNA DcR3 组。定量 PCR 和 Western blot 结果显示,与正常对照组相比,LPS+siRNA 对照组细胞内 DcR3 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义(1.003±0.098 vs. 0.928±0.096 和 0.333±0.012 vs. 0.375±0.020, $P > 0.05$),而 LPS+siRNA DcR3 组细胞内 DcR3 mRNA 和蛋白表达水平下降(1.003±0.098 vs. 0.536±0.028 和 0.333±0.012 vs. 0.101±0.016),差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。



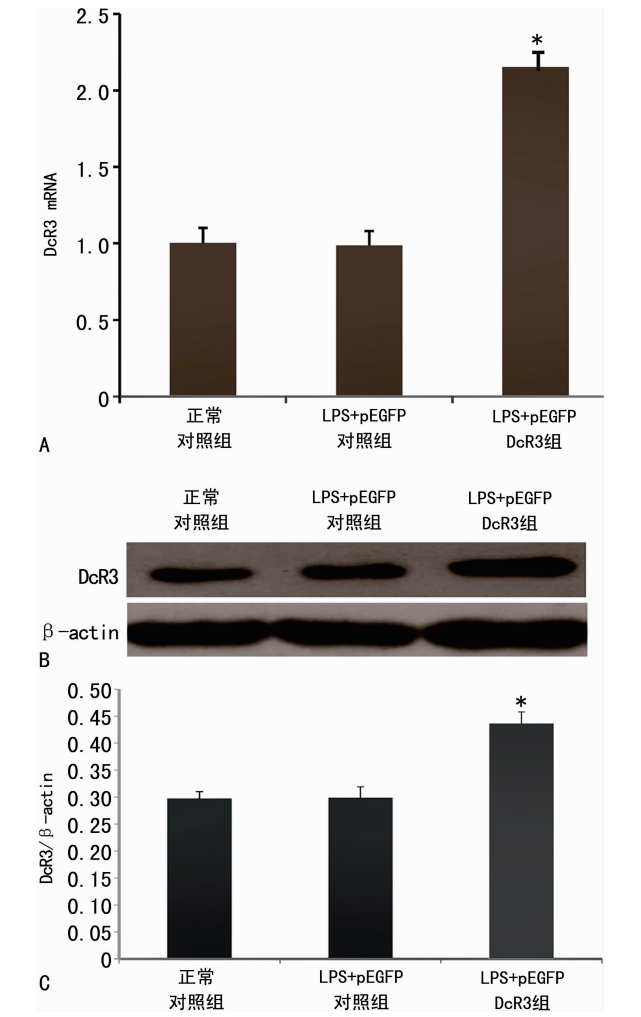
注:A为细胞内DcR3 mRNA的表达水平,结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示;B为细胞内DcR3蛋白的表达水平;C为DcR3与内参actin的灰度比。与正常对照组比较,* $P<0.05$ 。

图1 siRNA干扰后细胞内DcR3 mRNA及蛋白的表达水平

2.2 DcR3 过表达处理后细胞内 DcR3 mRNA 及蛋白的表达水平 试验共设置 3 组,第 1 组为 48 h 正常对照组,第 2 组为 48 h LPS+pEGFP 对照组,第 3 组为 48 h LPS+pEGFP-DcR3 组。定量 PCR 和 Western blot 结果显示,与正常对照组相比,LPS+pEGFP 对照组细胞内 DcR3 mRNA 和蛋白表达水平差异无统计学意义(1.005 ± 0.079 vs. 0.974 ± 0.086 和 0.298 ± 0.015 vs. 0.299 ± 0.017 , $P>0.05$),而 LPS+pEGFP-DcR3 组细胞内 DcR3 mRNA 和蛋白表达水平升高(1.005 ± 0.079 vs. 2.178 ± 0.021 和 0.298 ± 0.015 vs. 0.437 ± 0.019),差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 2。

2.3 siRNA DcR3 对 LPS 诱导的细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示,LPS 可诱导血管内皮细胞

凋亡,其凋亡率从诱导前的(10.10 ± 0.09)%增至(31.80 ± 0.15)%,siRNA DcR3 表达对此有加强作用,可使 LPS 诱导的 HUVEC 凋亡明显增加,凋亡率从(31.80 ± 0.15)%增至(42.70 ± 0.23)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 检测细胞内凋亡蛋白同样显示,LPS 可诱导血管内皮细胞凋亡,其细胞内 Caspase 3 和 Cleave PARP 表达较正常对照组增加($P<0.05$),siRNA DcR3 表达对此有加强作用,可使细胞内 Caspase 3 和 Cleave PARP 表达较单纯 LPS 刺激组增加($P<0.05$)。见图 3。



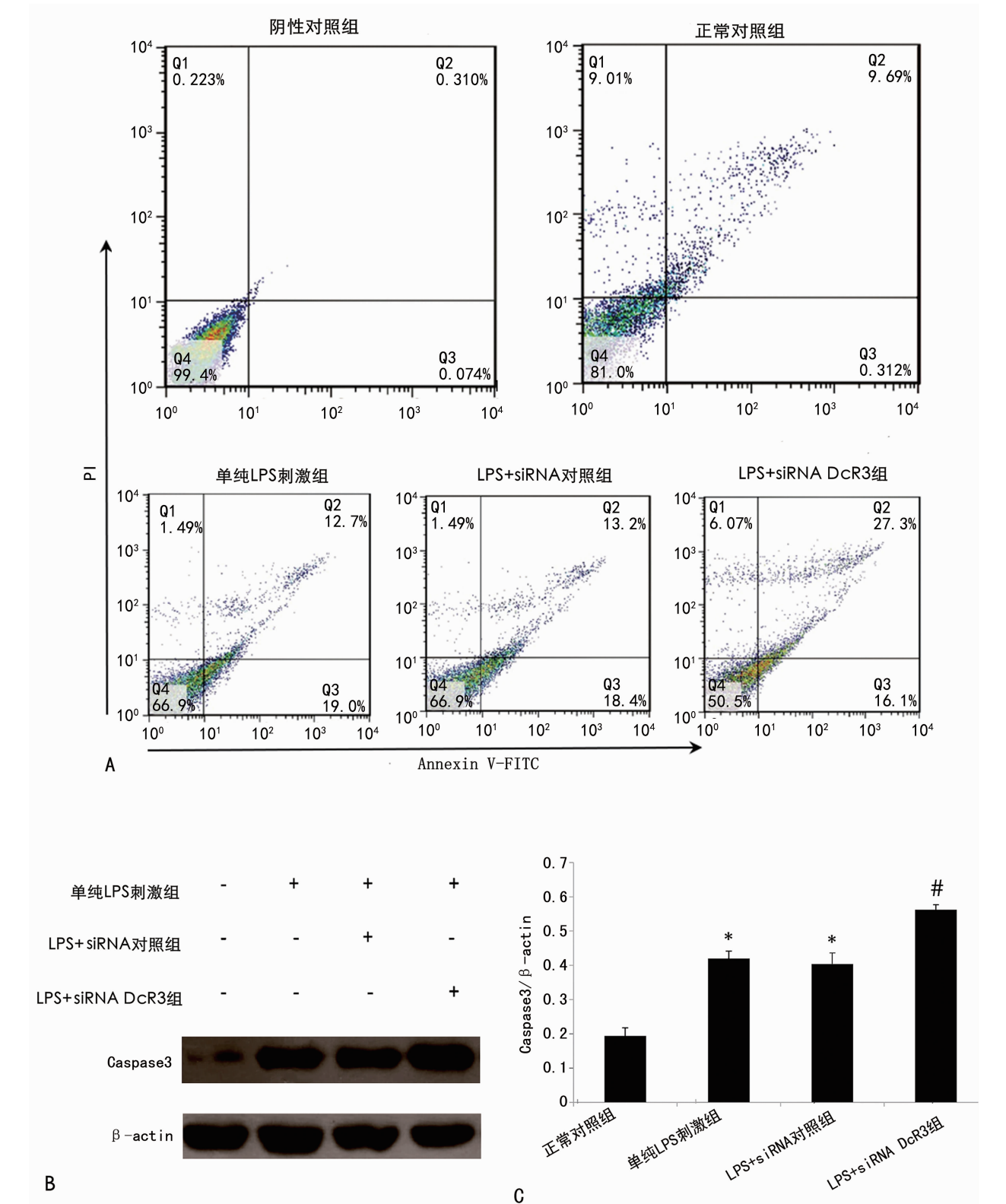
注:A为细胞内DcR3 mRNA的表达水平,结果以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示;B为细胞内DcR3蛋白的表达水平;C为DcR3与内参actin的灰度比。与正常对照组相比,* $P<0.05$ 。

图2 转染DcR3质粒后细胞内DcR3 mRNA及蛋白的表达水平

2.4 DcR3 过表达处理对 LPS 诱导的细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示,LPS 可诱导血管内皮细胞凋亡,其凋亡率从诱导(10.10 ± 0.09)%增至(31.80 ± 0.15)%,DcR3 过表达对此有明显抑制作用,可使凋亡率从(31.80 ± 0.15)%降至(21.50 ± 0.16)%,差异有统计学意义($P<0.05$)。Western blot 检测细胞内

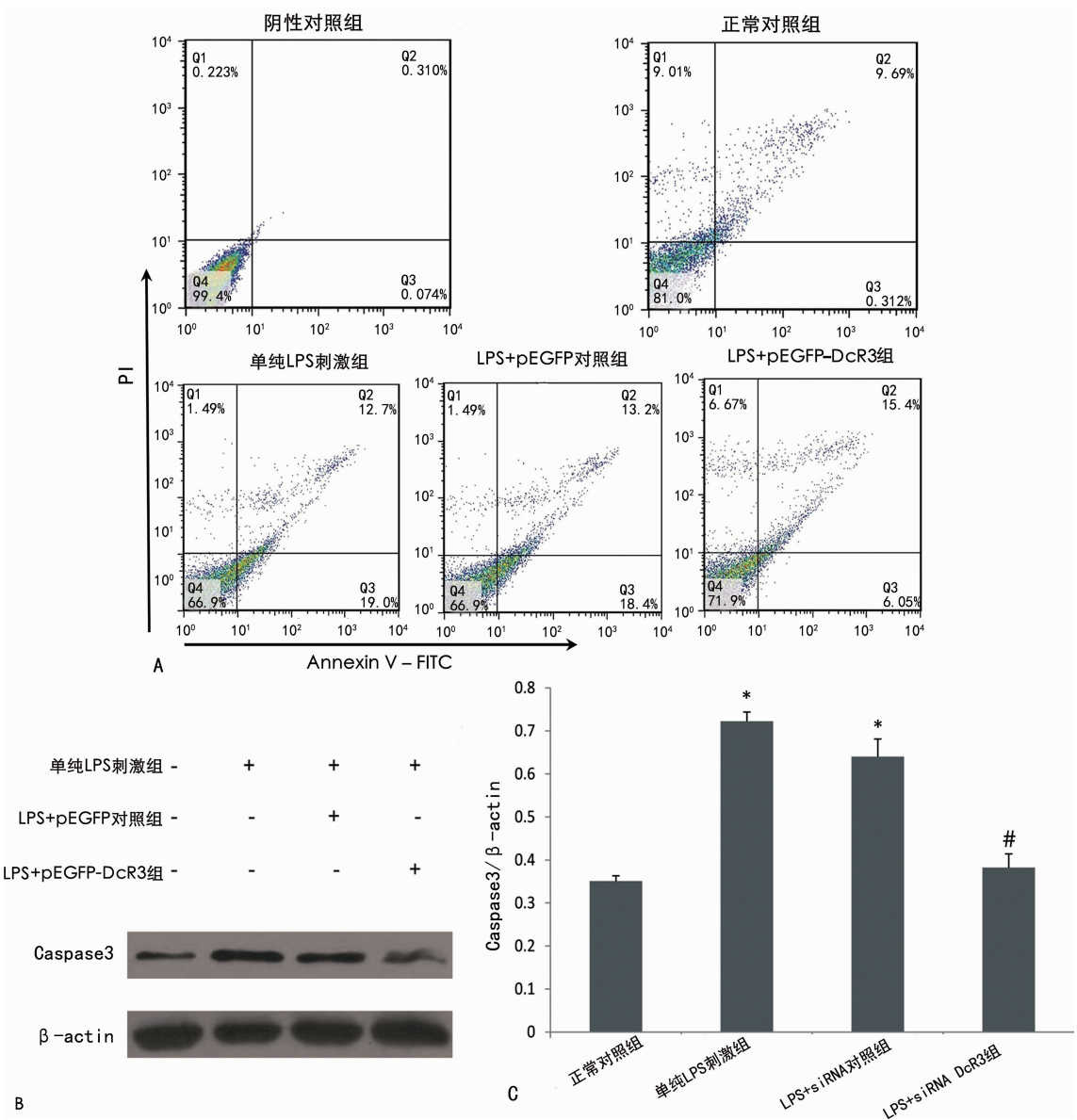
凋亡蛋白同样显示,LPS 可诱导血管内皮细胞凋亡,其细胞内 Caspase 3 和 Cleave PARP 表达较正常对照组增加 ($P<0.05$),DcR3 过表达对此有抑制作用,可

使细胞内 Caspase 3 和 Cleave PARP 表达较单纯 LPS 刺激组降低 ($P<0.05$)。见图 4。



注:A 为流式细胞术检测细胞凋亡情况;B 为 Western blot 检测细胞凋亡蛋白的表达水平;C 为 Western blot 结果中蛋白与内参 β-actin 的灰度比。与正常对照组相比,* $P<0.05$;与单纯 LPS 刺激组相比,# $P<0.05$ 。

图 3 siRNA DcR3 对 LPS 诱导的细胞凋亡的影响



注:A 为流式细胞术检测细胞凋亡情况;B 为 Western blot 检测细胞凋亡蛋白的表达水平;C 为 Western blot 结果中蛋白与内参 β -actin 的灰度比。与正常对照组相比, * $P < 0.05$;与单纯 LPS 刺激组相比, # $P < 0.05$ 。

图 4 DcR3 过表达对 LPS 诱导的细胞凋亡的影响

3 讨 论

细胞凋亡在脓毒症发病过程中越来越受到人们的重视,特别是血管内皮细胞凋亡导致的微血管通透性增高,这是器官功能受损的重要特征之一^[5]。内皮细胞是脓毒症诱导事件的主要目标且内皮细胞的损伤在脓毒休克病理学中占重要作用,血管内皮细胞是机体首先接触循环中细菌的细胞之一^[6-7]。脓毒症时细菌首先通过内皮细胞表面的识别受体启动炎性介质的表达,细胞的高反应可能造成血管内皮细胞损伤、死亡或间隙改变,使得内皮细胞通透性增高,导致组织、器官水肿及发生相应的功能障碍,临床上表现为 CLS^[8]。血管壁内皮细胞凋亡和脱落是血管损伤的重要标志,也是 CLS 发生的重要因素之一。因此,降低脓毒症时血管内皮细胞的凋亡可能对改善毛细血管功能有重要意义。

DcR3 是新近发现的一种与凋亡密切相关的抗凋亡分子,通过竞争性结合 FasL、LIGHT 和 TL1A 3 种肿瘤坏死因子超家族配体,在调控细胞增殖、分化和凋亡中发挥重要作用^[9-10]。研究发现,通过过表达 DcR3 能够保护放线菌酮诱导的单核细胞凋亡^[11],而干扰 DcR3 表达可以促进胰腺腺癌肿瘤细胞的凋亡^[12]。本课题组前期研究发现脓症患者血清中 DcR3 表达水平升高,DcR3 作为一个抗炎、抗凋亡因子,其表达水平升高可能是机体的一个防御机制。为了进一步证实 DcR3 在脓毒症发病机制中的作用,本研究以体外培养的 HUVEC 为模型,以内毒素作为刺激物,通过过表达及干扰 DcR3 观察细胞的凋亡情况。结果显示,HUVEC 内 DcR3 在正常培养状态下即存在一定的表达率,siRNA DcR3 预处理后,细胞内 DcR3 表达明显被抑制,LPS 可以诱导血管内皮细胞

凋亡,使细胞凋亡率从诱导前的 $(10.1 \pm 0.09)\%$ 增至 $(31.8 \pm 0.15)\%$,抑制 DcR3 表达能够加强 LPS 的诱导作用,LPS+siRNA DcR3 组细胞凋亡明显高于单纯 LPS 刺激组($P < 0.05$)。而 LPS+pEGFP-DcR3 组细胞内 DcR3 表达明显升高,流式和 Western blot 检测细胞凋亡情况显示,过表达 DcR3 能够显著抑制 LPS 诱导的细胞凋亡,可使凋亡率降至 $(21.5 \pm 0.16)\%$ 。

4 结 论

脓毒症时存在静脉内皮细胞损伤,且内皮细胞凋亡增加,DcR3 在脓毒症引起的内皮细胞凋亡中起重要作用,过表达 DcR3 能够抑制 LPS 诱导的细胞凋亡。试验结果在脓毒症的治疗和预后判断中具有潜在研究价值,尚需进一步证实。

参考文献

- [1] 隆彩霞,朱之尧,胥志跃,等.儿童脓毒症发生毛细血管渗漏综合征的临床危险因素分析[J].中国当代儿科杂志,2013,15(3):219-222.
- [2] DOS SANTOS M H B,DA COSTA A F E,FERREIRA B J,et al. A phosphoramidon-sensitive metalloprotease induces apoptosis of human endothelial cells by Group B Streptococcus[J]. Antonie Van Leeuwenhoek,2013,104(6):1125-1133.
- [3] HOU Y Q,XU P,ZHANG M,et al. Serum decoy receptor 3,a potential new biomarker for sepsis[J]. Clin Chim Acta,2012,413(7/8):744-748.
- [4] LANZIOTTI V S,PÓVOA P,SOARES M,et al. Use of biomarkers in pediatric sepsis: literature review[J]. Rev

- Bras Ter Intensiva,2016,28(4):472-482.
- [5] HOTCHKISS R S,NICHOLSON D W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis[J]. Nat Rev Immunol,2006,6(11):813-822.
- [6] LIANG Y J,LI X,ZHANG X J,et al. Elevated levels of plasma TNF- α are associated with microvascular endothelial dysfunction in patients with sepsis through activating the NF- κ B p38 mitogen-activated protein kinase in endothelial cells[J]. Shock,2014,41(4):275-281.
- [7] 李苗,王丽丽,常冰梅.血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展[J].中国动脉硬化杂志,2019,27(8):730-736.
- [8] KRÜTTGEN A,ROSE-JOHN S. Interleukin-6 in sepsis and capillary leakage syndrome[J]. J Interferon Cytokine Res,2012,32(2):60-65.
- [9] 娄晓丽,梁冬雨,侯彦强.诱骗受体 3 在疾病中的检测进展[J].中华检验医学杂志,2011,34(10):877-880.
- [10] LIN W W,HSIEH S L. Decoy receptor 3: a pleiotropic immunomodulator and biomarker for inflammatory diseases, autoimmune diseases and cancer[J]. Biochem Pharmacol,2011,81(7):838-847.
- [11] TATEISHI K,MIURA Y,HAYASHI S,et al. DcR3 protects THP-1 macrophages from apoptosis by increasing integrin α 4[J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,389(4):593-598.
- [12] ZHOU J,SONG S D,HE S B,et al. Silencing of decoy receptor 3 (DcR3) expression by siRNA in pancreatic carcinoma cells induces Fas ligand-mediated apoptosis in vitro and in vivo[J]. Int J Mol Med,2013,32(3):653-660.

(收稿日期:2020-02-03 修回日期:2020-06-26)

(上接第 2875 页)

- [7] ALVAREZ-ORTEGA C,WIEGAND I,OLIVARES J,et al. Genetic determinants involved in the susceptibility of Pseudomonas aeruginosa to beta-lactam antibiotics[J]. Antimicrob Agents Chemother,2010,54(10):4159-4167.
- [8] 李彦媚,赵喜红,徐泽智,等.新型细菌耐药元件——整合子系统[J].中国抗生素杂志,2012,37(1):1-7.
- [9] GUERIN E,CAMBRAY G,SANCHEZ-ALBEROLA N,et al. The SOS response controls integron recombination[J]. Science,2009,324(5930):1034.
- [10] 李智伟,王昌敏,郭淑丽,等.铜绿假单胞菌金属 β -内酰胺酶基因检测研究[J].中华医院感染学杂志,2015,25(20):4561-4563.
- [11] 姚建平,黄永茂. TEM 型 β -内酰胺酶的研究进展[J].中国感染与化疗杂志,2014,14(6):550-555.
- [12] ARABESTANI M R,RAJABPOUR M,YOUSEFIMA SHOUF R,et al. Expression of efflux pump MexAB-OprM and OprD of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from clinical samples using qRT-PCR[J]. Arch Iran Med,2015,18(2):102-108.
- [13] QUALE J,BRATU S,GUPTA J,et al. Interplay of efflux system, AmpC, and OprD expression in carbapenem

- resistance of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates[J]. Antimicrob Agents Chemother,2006,50(5):1633-1641.
- [14] 牛付轩,吴亮,王廷廷,等.临床分离鲍氏不动杆菌生物膜形成能力与耐药性关系研究[J].中华医院感染学杂志,2018,28(18):2721-2724.
- [15] TAHA M N,SAAFAN A E,AHMEDY A,et al. Two novel synthetic peptides inhibit quorum sensing-dependent biofilm formation and some virulence factors in Pseudomonas aeruginosa PAO1[J]. J microbiol,2019,57(7):618-625.
- [16] ORAZI G,RUOFF K L,O'TOOLE G A. Pseudomonas aeruginosa increases the sensitivity of biofilm-grown staphylococcus aureus to membrane-targeting antiseptics and antibiotics[J]. mBio,2019,10(4):e01501-e01519.
- [17] VILLALÓN P,VALDEZATE S,CABEZAS T,et al. Endemic and epidemic Acinetobacter baumannii clones: a twelve-year study in a tertiary care hospital[J]. BMC microbiol,2015,15:47.

(收稿日期:2020-02-18 修回日期:2020-06-29)