DOI:10.16016/j.2097-0927.202108152

不同程度的过劳对大鼠动脉血管平滑肌细胞的影响

甘 露[1],陈苏衡[1],庄 苗[1],张小晓[1],郭 鸿[1],黄蓉蓉[1],李玉兰[2] 730000 兰州,兰州大学第一临床医学院[1];730000,兰州,兰州大学第一医院麻醉科[2]

[摘要] **目的** 研究不同程度的过劳对大鼠动脉血管中层平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMC)的影响。**方法** 将清洁级 SD 大鼠分为对照组(CON)、过劳组(OW)及过劳+睡眠不足组(OW+SD)。OW 组采用力竭游泳法建立过劳模型;OW+SD 组在力竭游泳的基础上加水中平台法限制睡眠时间。15 d 后取出大鼠腹主动脉,行 HE 染色进行病理学观察并测量中膜厚度,透射电镜观察细胞内超微结构,用 TUNEL 法检测各组大鼠腹主动脉中层 VSMC 的凋亡率,用 RT-qPCR 法检测 VSMC 中 Caspsae-3、Bax、Bcl-2 和 Ki67 的 mRNA 表达水平,用免疫组化法检测血管中层凋亡蛋白 Caspase-3 的含量。**结果** ①HE 染色示:与 CON 组相比,OW 组和 OW+SD 组大鼠血管壁 VSMC 排列紊乱,有"空泡"样细胞形成,血管中膜厚度较 CON 组明显增加($P<0.05$);②电镜示:OW 组和 OW+SD 组大鼠 VSMC 细胞中可见凋亡小体形成;③TUNEL 结果显示:OW 组和 OW+SD 组大鼠 VSMC 凋亡率明显高于 CON 组($P<0.05$);④RT-qPCR 结果显示:与 CON 组相比,OW 组和 OW+SD 组血管中膜 Bax、Ki67 的 mRNA 表达明显增加($P<0.05$),OW 组和 OW+SD 组血管中膜 Caspase-3 和 Bcl-2 的 mRNA 表达无明显变化($P>0.05$);⑤免疫组化结果显示:与 CON 组相比,OW 组和 OW+SD 组血管中膜 Caspase-3 的蛋白含量明显增加($P<0.05$)。**结论** 过劳可引起大鼠动脉血管中层 VSMC 凋亡,诱发动脉血管壁中层 VSMC 异常增殖和修复,可形成动脉病变的早期病理基础;并且在实验时间内,睡眠未能改善过劳对血管平滑肌细胞的损伤。

[关键词] 过劳;动脉血管壁;血管平滑肌细胞;凋亡;增殖
[中图法分类号] R163;R322.12;R329.25 [文献标志码] A

Effects of different levels of overworking on rat arterial smooth muscle cells

GAN Lu[1], CHEN Suheng[1], ZHUANG Miao[1], ZHANG Xiaoxiao[1], GUO Hong[1], HUANG Rongrong[1], LI Yulan[2]
[1]The First Clinical Medical College, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [2]Department of Anesthesiology, the First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of overworking on vascular smooth muscle cells (VSMC) in rats. **Methods** Clean SD rats were randomly divided into control group (CON), overworking group (OW) and overworking and sleep deficiency group (OW+SD). The rat model of overworking was established by exhaustive swimming in the latter 2 groups, and the rats of the last group was subjected to sleep deprivation with an underwater platform. In 15 d later, the abdominal aorta of rats was collected for pathological observation by HE staining, and the thickness of media was measured with aid of Image J software. The intracellular ultrastructure was observed by transmission electron microscopy. The apoptotic rate of VSMC was detected by TUNEL, the mRNA expression of Caspsae-3, Bax, Bcl-2 and Ki67 in the VSMC were detected by RT-qPCR, and the content of apoptotic protein Caspase-3 was measured by immunohistochemical assay. **Results** ① The results of HE staining showed that VSMC were in disordered arrangment and formed vacuole-like cells in the OW and OW+SD groups, and the vascular intima-media

[基金项目] 甘肃省卫生健康行业科研项目(GSWSKY2021-079)
[通信作者] 李玉兰,E-mail:jasm@sina.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

thickness was significantly thicker in the OW and OW+SD groups than the CON group ($P<0.05$). ② Electron microscopy displayed the apoptotic bodies in the VSMC of the OW and OW+SD groups. ③TUNEL results showed that the apoptotic rate of VSMC was significantly higher in the OW and OW+SD groups than the CON group ($P<0.05$). ④RT-qPCR showed that the expression levels of Bax and Ki67 were significantly increased ($P<0.05$), while those of Caspase-3 and Bcl-2 were not obviously changed in OW and OW+SD groups ($P>0.05$) when compared with the CON group. ⑤ Immunohistochemical results showed that the protein content of Caspase-3 in vascular middle membrane of the OW and OW+SD groups was increased significantly than that in the CON group ($P<0.05$). **Conclusion** Overworking aggravates the apoptosis of VSMC and induces the proliferation and repair of VSMC, which form the pathological basis of early arterial lesions. During the experimental time, sleep could not alleviate the injury of VSMC caused by overworking.

[**Key words**] overworking; arterial wall; vascular smooth muscle cells; apoptosis; proliferation

Supported by the Scientific Research Project for Health Industry of Gansu Province (GSWSKY2021-079). Corresponding author: LI Yulan, E-mail: jasm@sina.com

近年国内外各行业中因工作时间过长而猝死的报道越来越多,过劳已成为一个重大社会问题。日本中央大学教授齐藤良夫把过劳定义为“由于活动产生的疲劳不能因休息(包括睡眠)而得到恢复的状态”[1]。目前过劳及过劳死在社会和法律学方面的研究已有一定的成就,但在病理生理方面的研究还很欠缺。以往认为,过劳能使高血压和动脉粥样硬化等疾病逐步恶化,导致心脑血管不良事件的发生,造成永久不能工作甚至死亡的结果[2]。新近研究认为,过劳本身就是一种直接致病或致死的危险因素,会引发特定疾病如高血压、心脏病、糖尿病、高脂血症和抑郁症等[3-4]。其中,心脑血管疾病(如脑出血、脑梗、心梗等)被认为是过劳相关猝死的主要病因之一[5]。在我国一项对云南省猝死病例的研究中发现,猝死的前十大原因中,与血管相关的就占到了一半,包括冠状动脉性心脏病、脑出血、主动脉夹层破裂、动脉瘤破裂、肺栓塞[6]。但对于无心血管相关症状而突发猝死的人来说,现有的研究结果无法解释其病因。

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)位于血管中膜且为其主要结构细胞,是血管壁病理变化的物质基础。在动脉粥样硬化、动脉瘤、高血压、血管再狭窄等血管疾病过程中,VSMC 均起到关键作用[7]。VSMC 的增殖、凋亡及表型决定着血管壁的功能状态,当 VSMC 凋亡与增殖的平衡状态被打破,血管壁的结构及功能会被破坏,进而引发血管功能障碍甚至破裂[8]。过劳是否能够直接损伤血管,成为心脑血管病变的基础,目前国内外少见研究报道。本实验拟建立大鼠过劳动物模型,检测过劳及睡眠不足对大鼠腹主动脉中膜病理形态、VSMC 凋亡及增殖相关指标的影响,探究过劳引起血管病变的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂与仪器

HE 染色试剂盒(博士德生物公司),兔抗 Caspase-3 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司),FITC Tunel 试剂盒、qPCR 引物、山羊抗兔二抗(武汉赛维尔生物科技有限公司),全景切片扫描仪(3DHISTECH),台式高速冷冻型微量离心机(Dragon Lab),荧光定量 PCR 仪(Thermo)。

1.2 实验动物及分组

健康清洁级雄性 SD 大鼠 18 只,初始体质量 180~220 g,由兰州大学实验动物中心提供。将 18 只大鼠分为 3 组:对照组(CON 组)、过劳组(OW 组)和过劳+睡眠不足组(OW+SD 组)($n=6$)。每只大鼠分笼饲养,喂食标准饲料,自由饮水。饲养环境为室温(25±2)℃、湿度(50±10)%,通风流畅,无噪音。本研究经兰州大学实验动物福利和伦理管理委员会批准。

1.3 过劳模型的建立

每天固定时间将 OW 组和 OW+SD 组的大鼠单独放入水桶中游泳至力竭[水桶高 65 cm、直径 45 cm,水深(40±2)cm,水温(24±1)℃],上午和下午各 1 次,连续 15 d。力竭标准为大鼠游泳时出现明显的动作失调,或观察到大鼠完全潜入水中(鼻尖低于水平面),超过 10 s 以上才浮出水面或不能自行浮出水面,这种情况连续发生 3 次,捞出后翻正反射消失,即认为大鼠完成了 1 次力竭游泳[9]。游泳结束后将大鼠放回笼中,自由活动及饮食。OW+SD 组于每天 2 次游泳之间被放入水中平台装置中(时长为 6 h),以对其睡眠时间予以限制。水中平台装置为一 35 cm×40 cm×60 cm 的水槽,其内有数个高约 12 cm、直径约 4 cm 的圆柱形

平台,水深约 10 cm;大鼠被放置在圆柱形平台上,当大鼠在入睡后会因为睡眠期间肌肉张力丧失掉入水中而苏醒。CON 组正常饲养,不做特殊处理。

1.4 标本获取

造模完成后,大鼠过量麻醉后打开胸腔,暴露心脏,找到主动脉弓,沿主动脉下行,分离腹主动脉。切取腹主动脉 2.5 cm,用无菌 PBS 缓冲液清洗,剥离血管外周结缔组织。取其中 0.5 cm 腹主动脉置于 2.5%戊二醛溶液固定,4 ℃保存;1 cm 腹主动脉置于多聚甲醛溶液中固定,常温保存;余 1 cm 剥除血管外膜与内膜后置于-80 ℃保存备用。

1.5 HE 染色法行病理形态学观察

取出多聚甲醛溶液固定的腹主动脉,沿管腔剪开,PBS 冲洗多聚甲醛固定液,乙醇脱水,石蜡包埋。将石蜡组织块以 2 μm 厚度连续切片并置于载玻片上,37 ℃培养箱过夜,然后 65 ℃保持 2 h,石蜡切片用水脱蜡。将切片置于苏木精溶液中数分钟,乙酸及氨水分色各数秒,流水冲洗 1 h 后入蒸馏水数秒,70%~90%乙醇溶液由低到高浓度依次脱水各 10 min,再入乙醇伊红染色液染色 2~3 min,无水乙醇脱水,经二甲苯使切片透明。最后,切片用中性树胶包裹覆盖。光学显微镜下观察,采集图形进行分析,使用 Image J 软件测量血管壁中膜厚度。

1.6 透射电镜观察细胞内超微结构

取出固定于 10%戊二醛中的血管组织,PBS 漂洗 3 次,每次 15 min;PBS 配制的 1%锇酸避光室温固定 2 h,PBS 漂洗 3 次,每次 15 min;组织依次入 30%→50%→70%→80%→95%→100%→100%酒精上行脱水,每次 20 min,100%丙酮 2 次,每次 15 min;丙酮∶812 包埋剂=1∶1,37 ℃ 2~4 h, 丙酮∶812 包埋剂=1∶2,37 ℃渗透过夜,纯 812 包埋剂 37 ℃ 5~8 h;将纯 812 包埋剂倒入包埋板,将样品插入包埋板后 37 ℃烤箱过夜;包埋板放于 60 ℃烤箱聚合 48 h;取出树脂块于超薄切片机 60~80 nm 超薄切片,150 目方华膜铜网捞片;铜网于 2%醋酸铀饱和酒精溶液避光染色 8 min;70%酒精清洗 3 次;超纯水清洗 3 次;2.6%枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色 8 min;超纯水清洗 3 次,滤纸稍吸干;铜网切片放入铜网盒内室温干燥过夜。透射电子显微镜下观察,采集图像分析。

1.7 TUNEL 法检测血管平滑肌细胞的凋亡率

按照 TUNEL 试剂盒的说明书将准备好的石蜡切片在室温下脱蜡至水,PBS 润洗,蛋白酶 K 修复,破膜通透,孵育 TUNEL 反应液,DAPI 染核,抗荧光素淬灭剂封片,最后 3D 全景扫描拍照,使用 Image J 软件分析中膜 VSMC 凋亡率。

凋亡率=双阳性荧光细胞/DAPI 阳性荧光细胞×100%

1.8 RT-qPCR 检测 mRNA 表达

根据试剂盒说明书要求,取出保存于-80 ℃的腹主动脉标本,提取各组大鼠血管组织中总 RNA,对浓度过高的 RNA 进行适当比例的稀释,使其终浓度为 200 ng/μL;配置反转录体系对 RNA 进行反转录,获得 cDNA;而后配制 RT-PCR 反应体系,并在实时定量 PCR 仪上进行 PCR 反应;ΔΔCt 法对结果进行分析处理。引物序列见表 1。

表 1 Caspase-3、Bax、Bcl-2、Ki67 基因的引物序列和片段大小

基因	引物序列(5′→3′)	片段大小/bp
Caspase-3	CTGGACTGCGGTATTGAGACA CGGGTGCGGTAGAGTAAGC	103
Bax	TGAACTGGACAACAACATGGAG AGCAAAGTAGAAAAGGGCAACC	148
Bcl-2	TTGTGGCCTTCTTTGAGTTCG GCATCCCAGCCTCCGTTAT	151
Ki67	CCATTAACAAGAGTGAGGGAGTG TGAGTGGAGTATTAGGAGGCAAG	108

1.9 免疫组化染色

制备好的石蜡切片脱蜡水化,柠檬酸抗原修复缓冲液进行抗原修复,PBS 洗涤后放入 3%双氧水溶液中孵育以阻断内源性过氧化物酶,PBS 洗涤后血清封闭,加入一抗(兔抗 Caspase-3 抗体)孵育过夜,PBS 洗涤脱色,加入二抗(兔抗,HRP 标记)孵育 50 min,PBS 洗涤后 DAB 显色,苏木精复染细胞核,脱水封片,中性树胶封片。显微镜镜检,采集图像分析。

1.10 统计学分析

选用 SPSS 25.0 统计软件对实验数据进行分析,所得实验数据满足正态分布和方差齐性,计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 法,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 HE 染色结果

对各组大鼠腹主动脉血管壁行 HE 染色,如图 1。可见 CON 组血管壁中膜的平滑肌细胞排列整齐,OW 组和 OW+SD 组平滑肌细胞排列较紊乱,部分 VSMC 细胞内可见胞质空泡化现象。血管壁中膜厚度测量结果显示:与 CON 组相比,OW 组和 OW+SD 组的血管中膜明显增厚($P<0.05$),OW 组和 OW+SD 组间无明显差异($P=0.083$,表 2)。

表 2　3 组大鼠腹主动脉中膜厚度比较($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	血管中膜厚度/μm
CON 组	78.80±7.94
OW 组	111.90±22.06[a]
OW+SD 组	114.61±27.67[a]

a:$P<0.05$,与 CON 组比较

2.2　透射电镜结果

电镜下观察各组大鼠血管中膜细胞超微结构,如图 2。与 CON 组相比,OW 组和 OW+SD 组大鼠的 VSMC 胞质内细胞器数量较多,大量聚集,肿胀;线粒体数量丰富,大多明显肿胀,线粒体膜内基质变淡,嵴断裂、减少,少量严重者膜破损、基质外溢;粗面内质网明显扩张,脱颗粒,空泡变;形成具有膜结构的包裹着胞浆内容物和核物质的凋亡小体。

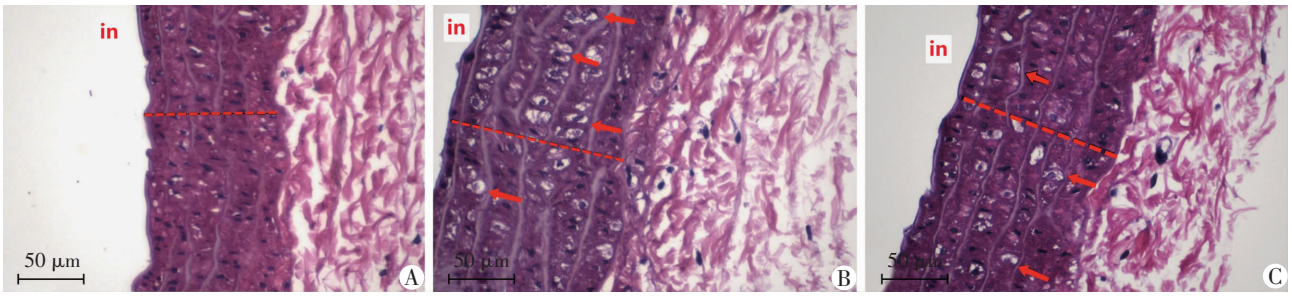
2.3　各组大鼠腹主动脉中层 VSMC 凋亡率测定

用 TUNEL 法对各组大鼠腹主动脉中膜 VSMC 的凋亡率进行分析,如图 3:DAPI 染出来的细胞核在紫外线的激发下为蓝色,FITC 荧光素标记的阳性凋亡细胞核为绿色。结果显示:OW 组和 OW+SD 组大鼠 VSMC 凋亡率明显高于 CON 组($P<0.05$),OW 组和 OW+SD 组间差异无统计学意义($P=0.396$,表 3)。

表 3　3 组大鼠 VSMC 凋亡率比较($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	VSCMC 凋亡率/%
CON 组	27.08±2.23
OW+SD 组	39.16±2.75[a]
OW 组	35.72±1.69[a]

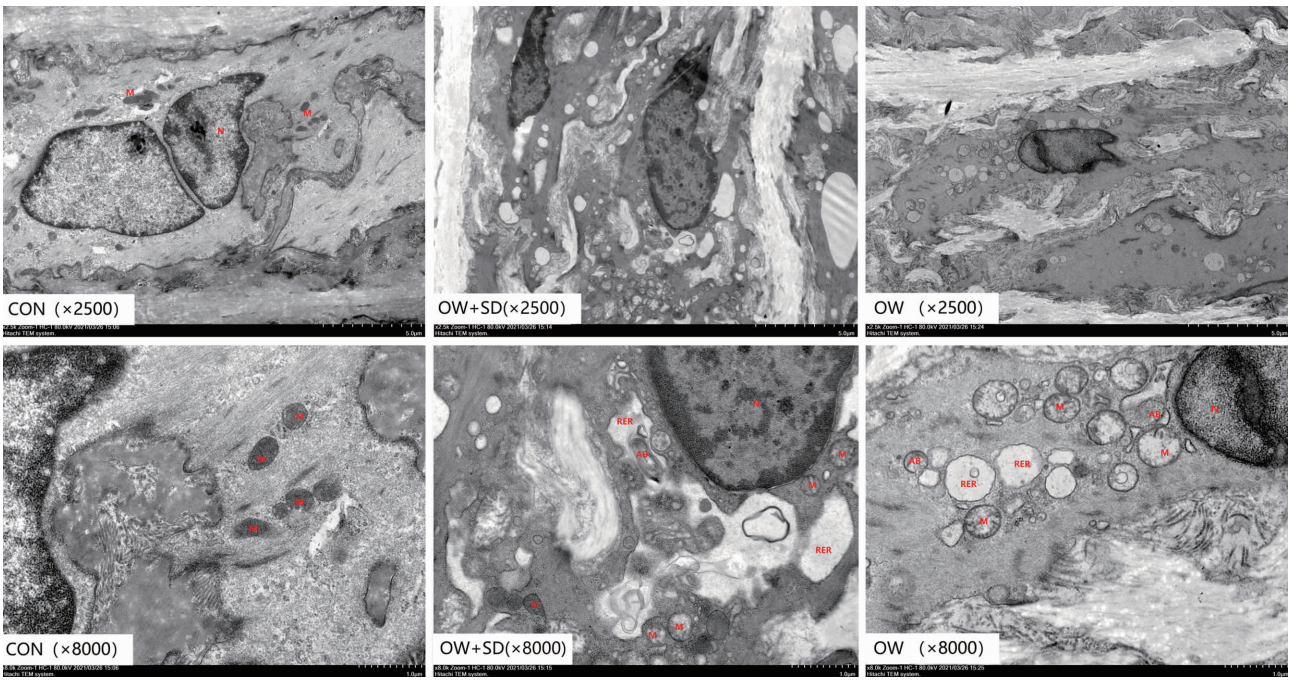
a:$P<0.05$,与 CON 组比较



in 示管腔侧,虚线示中膜厚度,箭头示"空泡"样细胞

A:CON 组;B:OW+SD 组;C:OW 组

图 1　3 组大鼠动脉血管壁病理学变化　(HE×400)



N:细胞核;M:线粒体;RER:粗面内质网;AB:凋亡小体

图 2　透射电镜观察各组大鼠 VSMC 超微结构变化

2.4　Caspase-3、Bax、Bcl-2 和 Ki67 基因表达水平

RT-qPCR 法检测各组大鼠腹主动脉中膜的 Caspase-3、Bax、Bcl-2 和 Ki67 的 mRNA 表达水平,结果见表 4:与 CON 组相比,OW 组和 OW+SD 组大鼠血管中膜的 Bax 表达明显增加($P<0.05$),OW 组和 OW+SD 组无显著差异($P=0.977$);OW 组和 OW+SD 组血管中膜 Ki67 表达较 CON 组有明显增加($P<0.05$),OW 组和 OW+SD 组差异无统计学意义($P=0.257$);3 组大鼠血管中膜 Caspase-3 和 Bcl-2 表达差异无统计学意义($P=0.948$ 和 $P=0.636$,>0.05)。

2.5　大鼠腹主动脉中层 Caspase-3 蛋白含量测定

对 3 组大鼠腹主动脉血管壁进行免疫组化染色,使用 Image J 软件对图像进行测量分析,用平均光密度值 MOD 表示 Caspase-3 蛋白含量,结果显示:OW 组(0.234±0.003)和 OW+SD 组(0.244±0.005)大鼠 VSMC 的 Caspase-3 蛋白含量明显高于 CON 组(0.191±0.005)($P<0.05$),OW 组与 OW+SD 组差异无统计学意义($P=0.095$,图 4)。

表 4　各组大鼠 Caspase-3、Bax、Bcl-2 和 Ki67 的 mRNA 表达水平($n=6$,$\bar{x}\pm s$)

组别	Caspase-3	Bcl-2	Bax	Ki67
CON 组	1.00±0.103	1.09±0.49	1.00±0.07	1.00±0.055
OW+SD 组	1.02±0.059	1.25±0.55	1.15±0.09[a]	1.28±0.155[a]
OW 组	1.01±0.134	1.38±0.40	1.15±0.12[a]	1.21±0.06[a]

a:$P<0.05$,与 CON 组比较

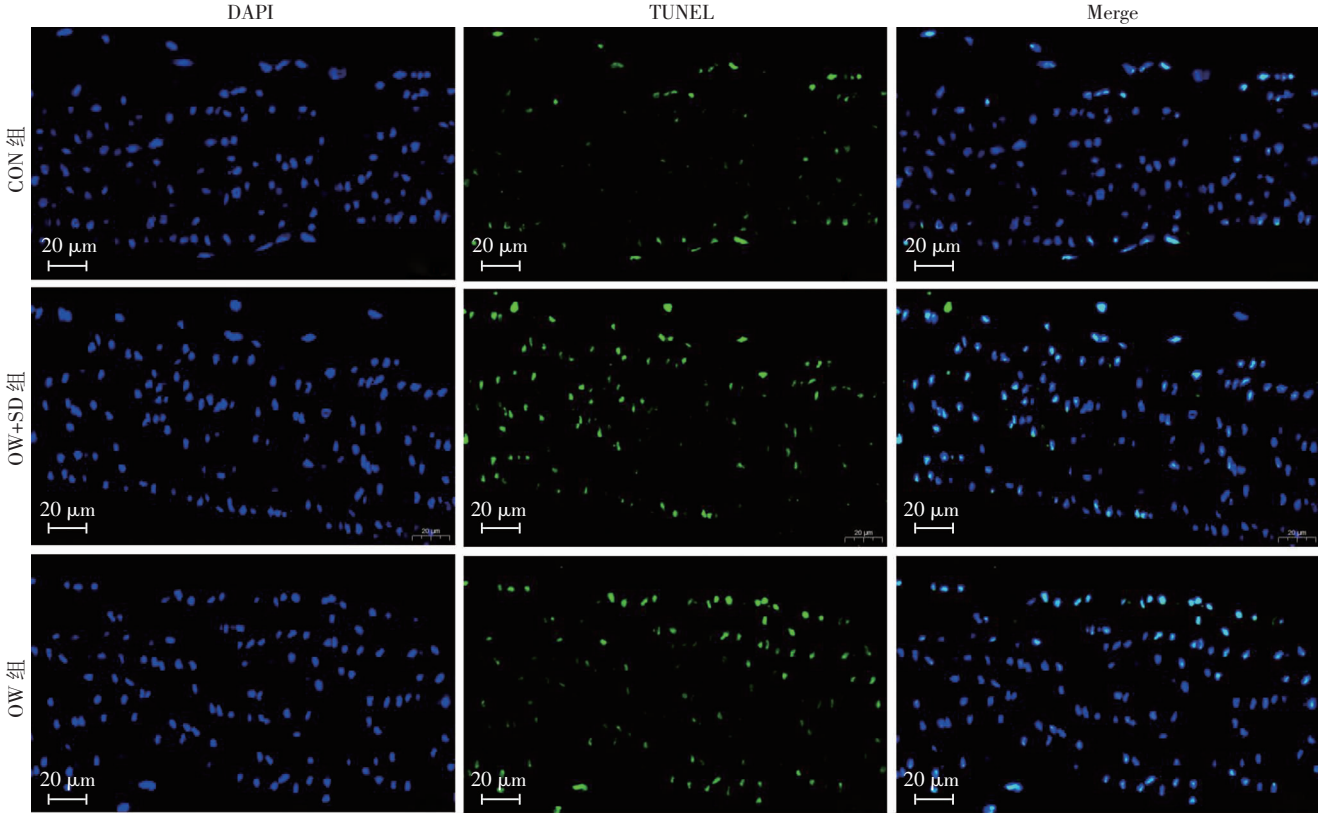
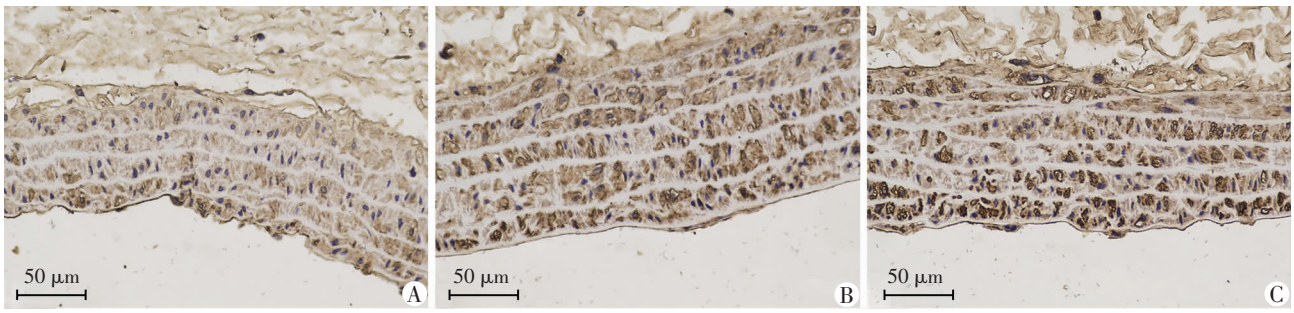


图 3　3 组大鼠动脉中层 VSMC 凋亡率对比　(TUNEL ×400)



A:CON 组;B:OW+SD 组;C:OW 组

图 4　三组大鼠血管 VSMC 中 Caspase-3 蛋白含量　(S-P ×400)

3 讨论

过劳是一种社会医学疾病,其特点为超长的工作时间伴随巨大的心理压力,这使得过劳动物模型难以模拟。本实验参考既往关于过劳对心肌损伤的研究[10],选用大鼠力竭游泳模型结合使用水中平台的方法,使动物在强迫"劳动"基础上,实现睡眠时间限制,构建了比较符合人类过劳情景的动物模型。

本实验结果显示:①过劳可以使大鼠腹主动脉血管壁中层的 VSMC 发生"空泡"样改变,从细胞层面证明过劳会刺激 VSMC 并使其产生应激反应;②过劳使大鼠腹主动脉 VSMC 凋亡率增加,且 Bax 的基因表达水平、Caspase-3 的蛋白含量明显高于正常大鼠,结合电镜下细胞内凋亡小体的形成,说明过劳可激活血管壁 VSMC 的凋亡程序并促进了 VSMC 的凋亡;③过劳大鼠腹主动脉 VSMC 中 Ki67 的表达增加、血管壁中膜增厚,说明过劳促进 VSMC 凋亡的同时诱发了 VSMC 的异常增殖与修复。

在光镜下观察血管组织切片时,看到过劳大鼠血管壁中层出现了大量的空泡样细胞,具体表现为细胞状似空泡,胞质不能被染色。这种细胞的空泡化现象,与细胞应激反应密切相关[11],多发生于细胞受到有害物质刺激时(如病原体侵袭、化学物质及生物活性物质刺激等),为细胞适应环境而发生的一种形态学改变,是一种比较常见的现象。因此,细胞空泡化现象的出现,提示过劳使 VSMC 发生了应激反应。

凋亡是一种细胞程序化死亡的形式,可通过内源性或外源性两种途径实现。同型半胱氨酸蛋白酶家族(Caspase)和 Bcl-2 家族是凋亡的主要调控因子,不论内源性或是外源性凋亡途径的激活均可由 Caspase 家族介导,且 Caspase-3 为大多数凋亡途径的执行蛋白;Bcl-2 家族成员包括促凋亡基因(Bax、Bak、Bok 等)和抗凋亡基因(Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w 等),其中 Bcl-2、Bax 位于线粒体上游,是线粒体膜的通透性改变的重要调控因素[12],并直接参与凋亡的调节。诱导细胞凋亡后,它们从细胞质转位到线粒体,破坏线粒体外膜的完整性,控制细胞色素 C 向细胞质的释放[13]。然后细胞色素 C 与 Caspase-9 及凋亡相关因子 1 形成凋亡小体,导致下游凋亡执行蛋白 Caspase-3 和 Caspase-7 的激活[14-15]。本实验检测了 Caspase-3 的蛋白水平及 Bax 和 Bcl-2 的基因表达。结果显示过劳的大鼠血管中层 Bax 基因表达上调,Caspase-3 的蛋白含量增多,VSMC 凋亡率增高,结合电镜下观察到细胞内超微结构的改变,表明过劳促进了大鼠 Caspase-3 依赖性的凋亡。

关于本研究中检测到 Caspase-3 的 mRNA 和蛋白表达水平不一致,其原因可能是真核细胞基因表达的转录和翻译具有时空差异所致,在转录后,还有转录后加工、翻译、翻译后加工及修饰等多个环节,每个环节都受多种因素影响;并且 mRNA 的降解速率和蛋白质的降解速率也存在差异[16-17],所以转录水平和翻译水平并不完全一致。

过劳引起的生理变化复杂,既往研究表明过劳状态下人体内的儿茶酚胺类物质[18]、皮质醇及自由基(特别是活性氧)[19]等均可升高;其中氧化应激反应产物如活性氧等被证明可诱发血管平滑肌细胞的凋亡[20],而儿茶酚胺类物质如肾上腺素被证明可促进血管平滑肌细胞的增殖[21],但不论是凋亡还是增殖均会影响 VSMC 的表型,进而影响血管的正常功能。Ki67 是一种细胞增殖相关的抗原,其功能主要与细胞有丝分裂相关,在除 G_0 期外的各细胞周期中高度表达[22],是细胞增殖能力的评判指标。本实验结果显示过劳大鼠 Ki67 表达水平明显增加,血管壁中膜明显增厚,提示过劳在促进 VSMC 凋亡的同时还可能诱使 VSMC 发生异常增殖。

在正常的血管壁中,VSMC 的凋亡与增殖维持在一个相对稳定的平衡状态,当 VSMC 的增殖与凋亡能力失去平衡,会诱使血管壁发生血管重构。血管重构是血管结构功能发生改变的主动过程,涉及内皮细胞、VSMC 等细胞的增殖、迁移、分化、自噬、凋亡、ECM 重塑、降解及重新排列,既是维持血管稳态的适应性生理过程又是诸多重要血管疾病共同的关键病理环节[23]。在血管发生紊乱的初期,机体能够启动内源性的代偿机制,引起血管发生适应性的变化与修复,从而维持血管稳态及正常的生理功能[24];然而,修复不当或过度修复会引起血管稳态的失衡,进一步引发心脑血管疾病,例如高血压、肺动脉高压以及动脉粥样硬化等。

本实验还研究了睡眠时间对过劳造成的血管损伤的影响。既往有研究证明,睡眠不足不仅会使血管壁的顺应性变差[25],还会导致血管壁组织受损[26]。这可能与睡眠不足引发氧化应激和脂质过氧化有关[27],氧化应激反应产物如活性氧等被证明可诱发血管平滑肌细胞的凋亡[20]。另有研究表明,相对较长的睡眠时间可明显保护心血管器官,并降低心血管疾病的发病风险[28]。本实验结果显示,睡眠限制的过劳大鼠各项检测指标与非睡眠限制的大鼠相比差异无统计学意义,说明在实验时间内,睡眠未能改善过劳对血管平滑

肌细胞的损伤。

综上,过劳可通过激活 Caspase-3 依赖的凋亡途径,加剧大鼠腹主动脉中层 VSMC 的凋亡,并可诱发 VSMC 的修复增殖。这可能是过劳后心、脑等生命脏器动脉血管发生病理性改变,最终引发恶性心血管事件的基础原因。

参考文献:

[1] YAMAUCHI T, YOSHIKAWA T, TAKAMOTO M, *et al*. Overwork-related disorders in Japan: recent trends and development of a national policy to promote preventive measures[J]. Ind Heal, 2017, 55(3): 293-302. DOI:10.2486/indhealth.2016-0198.

[2] 杨博帆,史婧卓,李倩璟,等.过劳死的概念、现状及法医病理学思考[J].法医学杂志,2019,35(4):455-458. DOI:10.12116/j.issn.1004-5619.2019.04.015.
YANG B F, SHI J Z, LI Q J, *et al*. The concept, status quo and forensic pathology of karoshi[J]. J Forens Med, 2019, 35(4): 455-458. DOI:10.12116/j.issn.1004-5619.2019.04.015.

[3] MURATSUBAKI T, HATTORI T, LI J, *et al*. Relationship between job stress and hypo-high-density lipoproteinemia of Chinese workers in Shanghai: the rosai karoshi study[J]. Chin Med J (Engl), 2016, 129(20): 2409-2415. DOI:10.4103/0366-6999.191750.

[4] TAYAMA J, LI J, MUNAKATA M. Working long hours is associated with higher prevalence of diabetes in urban male Chinese workers: the rosai karoshi study[J]. Stress Health, 2016, 32(1): 84-87. DOI:10.1002/smi.2580.

[5] MIAO Q, LI J, PAN Y P, *et al*. Three cases of karoshi without the typical pathomorphological features of cardiovascular/cerebrovascular disease[J]. Am J Forensic Med Pathol, 2020, 41(4): 305-308. DOI:10.1097/PAF.0000000000000600.

[6] 孙仲春,杨启琨,贾彭林,等.云南 363 例猝死案例的法医病理学分析[J].法医学杂志,2018,34(4):384. DOI:10.12116/j.issn.1004-5619.2018.04.008.
SUN Z C, YANG Q K, JIA P L, *et al*. Forensic pathology analysis of 363 sudden death cases in Yunnan Province[J]. J Forens Med, 2018, 34(4): 384. DOI:10.12116/j.issn.1004-5619.2018.04.008.

[7] QI Y, DAI F, GU J, *et al*. Biomarkers in VSMC phenotypic modulation and vascular remodeling[J]. Pharmazie, 2019, 74(12): 711-714. DOI:10.1691/ph.2019.9743.

[8] FRISMANTIENE A, PHILIPPOVA M, ERNE P, *et al*. Smooth muscle cell-driven vascular diseases and molecular mechanisms of VSMC plasticity[J]. Cell Signal, 2018, 52: 48-64. DOI:10.1016/j.cellsig.2018.08.019.

[9] 代朋乙,黄昌林.运动性疲劳研究进展[J].解放军医学杂志,2016,41(11):955-964. DOI:10.11855/j.issn.0577-7402.2016.11.14.
DAI P Y, HUANG C L. Research progress of exercise-induced fatigue[J]. Med J Chin PLA, 2016,41(11):955-964. DOI:10.11855/j.issn.0577-7402.2016.11.14.

[10] 杨博帆,史婧卓,李晶,等.大鼠过劳模型心脏 Cx43 和 Cx45 的表达[J].法医学杂志,2019,35(5):567-571. DOI:10.12116/j.issn.1004-5619.2019.05.010.
YANG B F, SHI J Z, LI J, *et al*. Expression of Cx43 and Cx45 in cardiomyocytes of an overworked rat model[J]. J Forens Med, 2019, 35(5): 567-571. DOI:10.12116/j.issn.1004-5619.2019.05.010.

[11] 刘丹骐,雷俊,黄凯,等.自噬在草酸诱导人肾小管上皮细胞损伤中的作用[J].中南大学学报(医学版),2021,46(3):221-226. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2021.190299.
LIU D Q, LEI J, HUANG K, *et al*. Effect of autophagy on oxalate-induced toxicity of human proximal renal tubular epithelial cell[J]. J Central South Univ (Med Sci), 2021, 46(3): 221-226. DOI:10.11817/j.issn.1672-7347.2021.190299.

[12] LIN H H, CHEN J H, HUANG C C, *et al*. Apoptotic effect of 3, 4-dihydroxybenzoic acid on human gastric carcinoma cells involving JNK/p38 MAPK signaling activation[J]. Int J Cancer, 2007, 120(11): 2306-2316. DOI:10.1002/ijc.22571.

[13] POPGEORGIEV N, JABBOUR L, GILLET G. Subcellular localization and dynamics of the Bcl-2 family of proteins[J]. Front Cell Dev Biol, 2018, 6: 13. DOI:10.3389/fcell.2018.00013.

[14] KOLB J P, OGUIN T H, OBERST A, *et al*. Programmed cell death and inflammation: winter is coming[J]. Trends Immunol, 2017, 38(10): 705-718. DOI:10.1016/j.it.2017.06.009.

[15] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 175-193. DOI:10.1038/s41580-018-0089-8.

[16] CHEN C A, SHYU A B. Emerging themes in regulation of global mRNA turnover in Cis[J]. Trends Biochem Sci, 2017, 42(1): 16-27. DOI:10.1016/j.tibs.2016.08.014.

[17] DAVIS P R, MILLER S G, VERHOEVEN N A, *et al*. Increased AMP deaminase activity decreases ATP content

and slows protein degradation in cultured skeletal muscle [J]. Metabolism, 2020, 108: 154257. DOI:10.1016/j.metabol.2020.154257.

[18] SHAN H P, YANG X H, ZHAN X L, *et al*. Overwork is a silent killer of Chinese doctors: a review of Karoshi in China 2013-2015[J]. Public Health, 2017, 147: 98-100. DOI: 10.1016/j.puhe.2017.02.014.

[19] BIGANEH J, ASHTARINEZHAD A, BEHZADIPOUR D, *et al*. Investigating the relationship between job stress, workload and oxidative stress in nurses[J]. Int J Occup Saf Ergo, 2021: 1-7. DOI: 10.1080/10803548.2021.1877456.

[20] POPOWICH D A, VAVRA A K, WALSH C P, *et al*. Regulation of reactive oxygen species by p53: implications for nitric oxide-mediated apoptosis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(6): H2192-H2200. DOI:10.1152/ajpheart.00535.2009.

[21] SHIN E, KO K S, RHEE B D, *et al*. Different effects of prolonged β-adrenergic stimulation on heart and cerebral artery[J]. Integr Med Res, 2014, 3(4): 204-210. DOI: 10.1016/j.imr.2014.10.002.

[22] MILLER I, MIN M, YANG C, *et al*. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence [J]. Cell Rep, 2018, 24(5): 1105-1112.e5. DOI:10.1016/j.celrep.2018.06.110.

[23] ZHANG Z, CHEN L, ZHONG J, *et al*. ACE2/Ang-(1-7) signaling and vascular remodeling[J]. Sci China Life Sci, 2014, 57(8): 802-808. DOI:10.1007/s11427-014-4693-3.

[24] QI D, WEI M, JIAO S Y, *et al*. Hypoxia inducible factor 1α in vascular smooth muscle cells promotes angiotensin II-induced vascular remodeling via activation of CCL7-mediated macrophage recruitment[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(8): 1-15. DOI:10.1038/s41419-019-1757-0.

[25] LIU X, YAN G, BULLOCK L, *et al*. Sleep moderates the association between arterial stiffness and 24-hour blood pressure variability[J]. Sleep Med, 2021, 83: 222-229. DOI:10.1016/j.sleep.2021.04.027.

[26] SCHEI J L, RECTOR D M. Evoked electrical and cerebral vascular responses during sleep and following sleep deprivation[J]. Prog Brain Res, 2011, 193: 233-244. DOI:10.1016/b978-0-444-53839-0.00015-6.

[27] NAWI A, EU K L, FARIS A N A, *et al*. Lipid peroxidation in the descending thoracic aorta of rats deprived of REM sleep using the inverted flowerpot technique [J]. Exp Physiol, 2020, 105(8): 1223-1231. DOI: 10.1113/ep088667.

[28] ALCÁNTARA C, GIORGIO COSENZO L, LEIGH A K K, *et al*. Longer sleep duration and endothelial cell health among a multiethnic sample of adolescents[J]. Psychosom Med, 2019, 81(9): 778-781. DOI: 10.1097/psy.0000000000000745.

(收稿:2021-08-22;修回:2021-11-11)

(编辑 王 红)