DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.011
第24卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 3
2002年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2002

文章编号:1000-5404(2002)03-0267-04

论著

过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 mRNA 的影响

李建明,周 红,蔡 黔,肖光夏 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察过氧化氢处理对体外培养肠上皮细胞株SW-480线粒体编码基因mRNA的影响。方法 以400μmol/L和4 mmol/L的过氧化氢处理人肠上皮细胞细胞株(SW-480)3 h后,分离RNA,应用RT-PCR检测ATPase6、ATPase8、COI、COII及COIII mRNA的变化。结果 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因mRNA的表达具有明显影响,但是这种改变不与过氧化氢的剂量呈现出一种一致的变化。结论 过氧化氢引起肠上皮细胞线粒体编码基因mRNA的明显改变。

关键词:过氧化氢,线粒体,基因表达,逆转录PCR
中图法分类号:R322.45;R394.3 文献标识码:A

Effects of hydrogen peroxide on human mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells

LI Jian-ming, ZHOU Hong, CAI Qian, XIAO Guang-xia (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effects of hydrogen peroxide on human mitochondrial gene expression of intestinal epithelial cells by using *in vitro* model of hydrogen peroxide stimulated SW-480 cell line. Methods Human intestinal epithelial cell were treated with 400 μmol/L and 400 mmol/L hydrogen peroxide and RNA of hydrogen peroxide-induced SW-480 cell line was isolated. Changes in ATPase 6, ATPase 8, COI, COII and COIII gene expressions were studied through reverse-transcriptional polymerase chain reaction(RT-PCR). Results Hydrogen peroxide induced significant changes in mitochondrial gene expression, but the changes were not in consistence with changes in dosage of hydrogen peroxide. Conclusion Differential expressions of mithochondrial gene may be one of the mechanisms involved in hydrogen peroxide induced apoptosis of human intestinal epithelial cells.

Key words: hydrogen peroxide, mitochondria, gene expression, intestinal epithelial cells

严重烧伤早期甚至在复苏后易存在肠道的隐匿性损伤,其中中性粒细胞——血管内皮细胞粘附活化后活性氧的释放在其中起重要作用。活性氧的释放可以通过诱导肠上皮细胞的死亡,参与肠粘膜结构屏障的损伤。近年对线粒体在细胞死亡中的作用已越来越受到关注。值得关注的是线粒体本身具有相对独立的基因组,它们编码部分线粒体呼吸链有关蛋白,这些蛋白的基因表达可能与过氧化氢对肠上皮细胞线粒体的损伤有关。本研究对过氧化氢对线粒体自主基因中编码细胞色素氧化酶和ATP合成酶的部分基因表达进行研究。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人肠上皮细胞细胞株(SW-480)购自美国ATCC。以含10%新生牛血清(Hyclone)的RPMI1640(Hyclone)37 ℃5% CO_2条件下培养。待细胞接近融合进行实验。

1.2 细胞处理及分组

细胞以400μmol/L或4 mmol/L浓度的过氧化氢处理3 h,未处理肠上皮细胞作为对照组(Control cell)。

1.3 引物的设计

根据最新的Human Mitochondrial DNA "Cambridge" Sequence应用Whitehead Institute for Biomedical Research www primer picking software (primer3)进行引物设计。以看家基因β-actin作为内对照或外对照,引物设计如下。

COI	5′-GTTGTAGCCCACTTCCAC-3′	
	5′-CATCGGGGTAGTCCGAGTAA-3′	222 bp
COII	5′-TTCATGATCACGCCCTCATA-3′	
	5′-TAAAGGATGCGTAGGGATGG-3′	187 bp
COⅢ	5′-AAAGCACATACCAAGGCCAC-3′	
	5′-CTTCTAGGGGATTTAGCGGG-3′	195 bp
ATPase 6	5′-GCCCTAGCCCACTTCTTACC-3′	
	5′-TTAAGGCGACAGCGATTTCT-3′	256 bp
ATPase 8	5′-CCCACCATAATTACCCCCAT-3′	
	5′-TTTTATGGGCTTTGGTGAGG-3′	102 bp
β-actin	5′-TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3′	
	5′-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3′	661 bp

1.4 总RNA的分离

应用Tripure isolation reagent (Roche)分离细胞总RNA,按说

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目("973"项目)(G1999054202)
作者简介:李建明(1970—),男,江西省余江县人,博士研究生,讲师,主要从事严重创(烧)伤早期全身损害的机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68780591
通信作者:周 红,电话:(023)68752266,E-mail:Zhouh64@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2001-04-13;修回日期:2001-06-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

明书要求操作。RNA 分离的有关物品均以 DEPC(Sigma)处理后高压消毒。其 A260/ A280 在 1.6~2.0.

1.5 RT-PCR 检测

ATPase 6、ATPase 8、COI、COII、COIII mRNA 的变化应用Titan One Tube RT-PCR Kit (Roche), 按要求操作。50 ℃ 30 min, 然后 94 ℃变性 2 min, 然后进入下述循环(共 35 个循环): 94 ℃变性 30 s, 56 ℃退火 30 s, 68 ℃延伸 45 s。最后在 68 ℃延伸 10 min. 1%凝胶电泳检测, 紫外灯下观察, 凝胶成像系统扫描存盘。记录各条带密度, 将各个检测基因与自身 β-actin 条带密度相比较得到其相对密度。

2 结果

2.1 过氧化氢对肠上皮细胞看家基因 β-actin mRNA 的改变

应用不同浓度的过氧化氢对肠上皮细胞处理后, 其看家基因β-actin mRNA 表达无明显改变, 表明应用其作为内对照及外对照是可行的。

2.2 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 COI mRNA 的改变

正常情况下, 肠上皮细胞 COI mRNA 有一定程度的表达。过氧化氢处理肠上皮细胞后, 其表达明显降低, 随浓度的增加, 其降低程度越明显, 见图 1。

2.3 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 COII mRNA 的改变

正常情况下, COⅡ mRNA 表达较弱, 400 μmol/L 过氧化氢处理, 其表达无明显增加, 4 mmol/L 过氧化氢处理其表达增加, 见图 2。

2.4 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 COIII mRNA 的改变

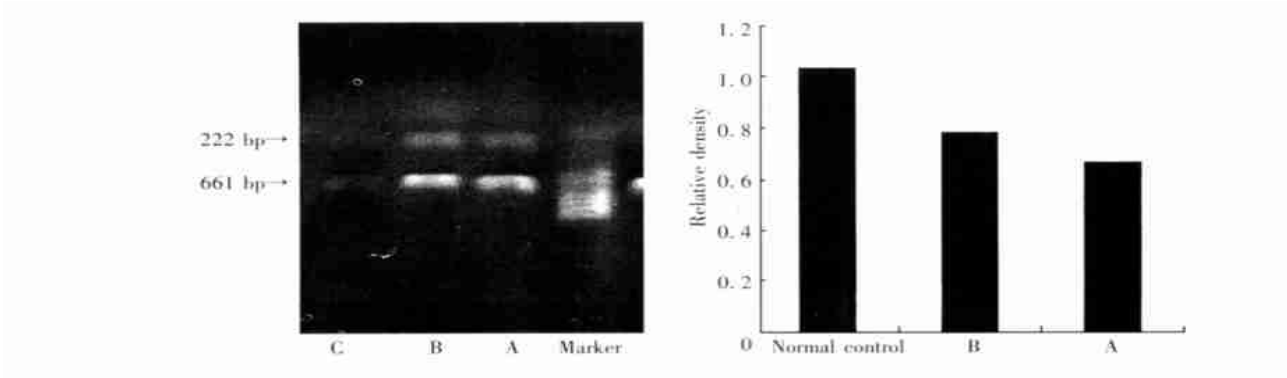
正常情况下, COIII mRNA 稳定表达, 过氧化氢处理后, 其表达有明显的增加, 见图 3。

2.5 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 ATPase6 mRNA 的改变

过氧化氢处理后肠上皮细胞 ATPase6 mRNA 表达下降明显, 见图 4。

2.6 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 ATPase8 mRNA 的改变

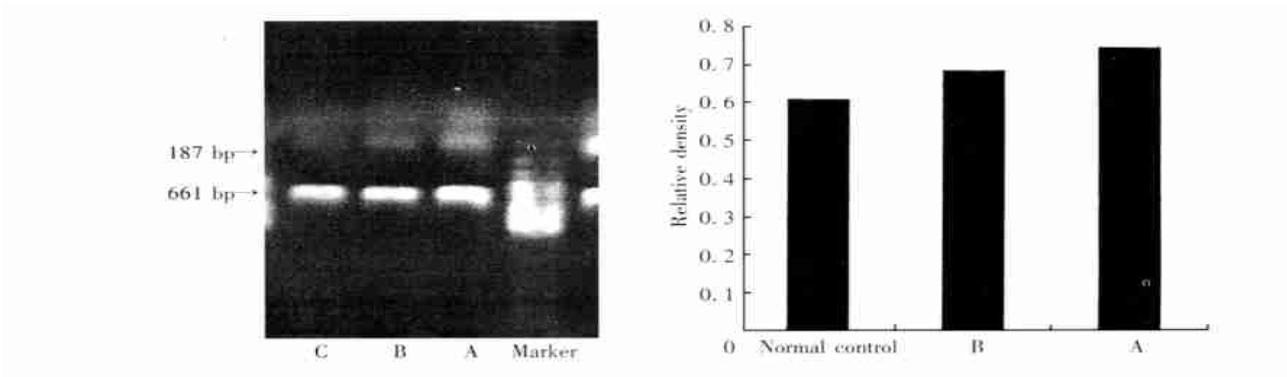
过氧化氢处理后肠上皮细胞 ATPase8 mRNA 表达无明显改变。



A: 4 mmol/L H_2O_2 treated cells(3 h); B: 400 μmol/L H_2O_2 treated cells(3 h); C: Control

图 1 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 **COI mRNA** 的改变

Fig 1 Effects of hydrogen peroxide on expression of COI mRNA

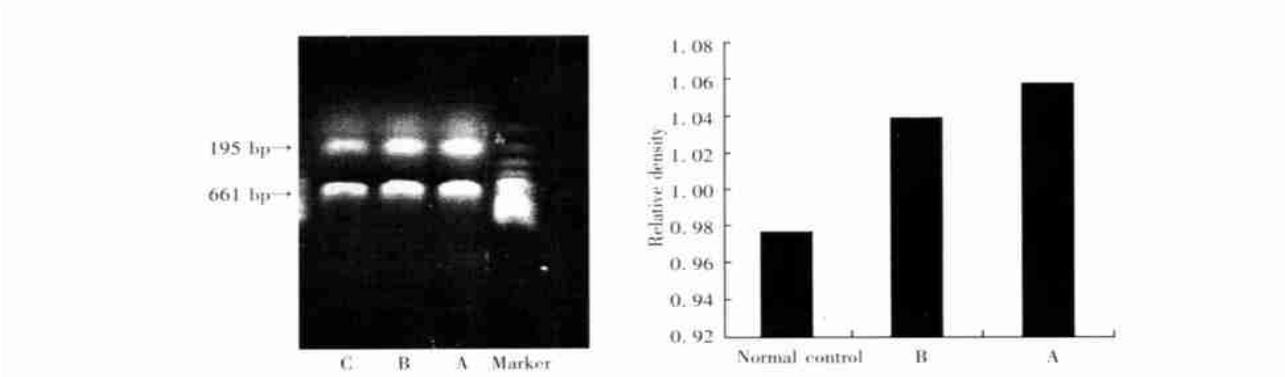


A: 4 mmol/L H_2O_2 treated cells(3 h); B: 400 μmol/L H_2O_2 treated cells(3 h); C: Control

图 2 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 **COII mRNA** 的改变

Fig 2 Effects of hydrogen peroxide on expression of COII mRNA

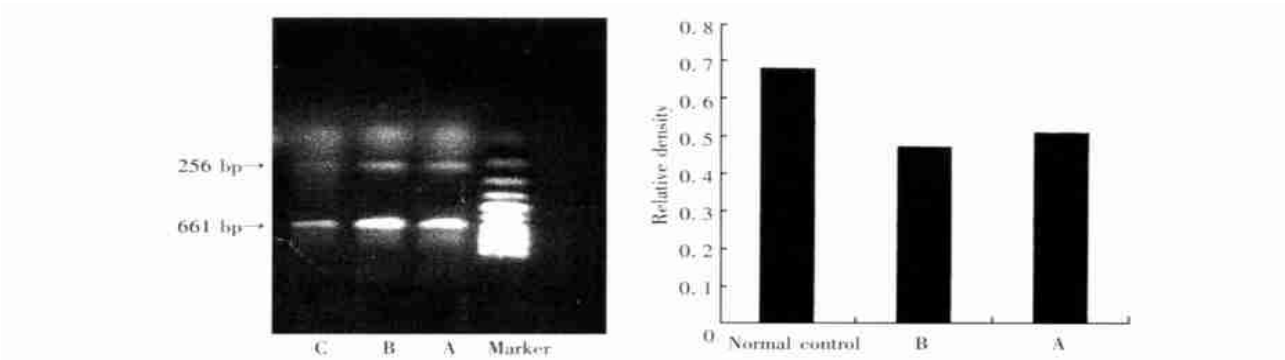
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: 4 mmol/L H_2O_2 treated cells(3 h); B: 400 μmol/L H_2O_2 treated cells(3 h); C: Control

图 3　过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 **COⅢ mRNA** 的改变

Fig 3　Effects of hydrogen peroxide on expression of COⅢ mRNA



A: 4 mmol/L H_2O_2 treated cells; B: 400 μmol/L H_2O_2 treated cells; C: Control

图 4　过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 **ATPase6 mRNA** 的改变

Fig 4　Effects of hydrogen peroxide on expression of ATPase6 mRNA

3　讨论

线粒体在细胞死亡中的作用已得到确认。线粒体是控制真核细胞生长繁殖、死亡的重要细胞器, 其突出的功能表现在以下几个方面: ①产生 ATP 供应细胞能量; ②活性氧的主要产生地; ③活性氧有调节胞核基因表达的功能; ④线粒体与胞浆和胞核存在联系; ⑤线粒体自身对胞外的应激或者刺激信号有较敏感的反应能力; ⑥线粒体有启动死亡的能力[1,2]。大量的研究表明线粒体在细胞凋亡发生中起中心作用。多种因素如活性氧、Ca^{2+}、细胞因子等可以通过刺激线粒体释放细胞色素 C 引起 Caspases 类的活化, 从而触发细胞凋亡发生的级联反应[3]。

线粒体自身具有相对独立的基因组, 它可以编码共 13 种蛋白。它们参与线粒体氧化磷酸化的酶的组成。而线粒体基因组相对于核基因组, 因为缺乏组蛋白的保护更加易受损害。我们的研究也证实了这一点。许多研究表明氧化应激可以引起线粒体基因的突变, 而它与基因表达之间的关系很值得探讨。应用差异显示技术发现大鼠肺上皮细胞在应用 H_2O_2 处理 8 h 或 24 h 后, 其中编码 NADH 脱氢酶的亚基 ND5 和 ND6 以及 16S 核糖体 RNA. 的线粒体基因均有明显改变, 结果提示提示线粒体基因表达的变化可能参与细胞凋亡的调控[5]。

从我们的研究看, 过氧化氢对于线粒体编码基因 mRNA 的表达具有明显影响, 它在上调某些基因的同时可下调某些基因的改变。这种差异性表达的特点揭示线粒体自主编码基因之间存在对氧化应激敏感性的差异。这种差异的存在可能与细胞下一步的改变密切相关。它与细胞线粒体细胞色素氧化酶和 ATP 合成酶功能改变的关系、与细胞线粒体氧化磷酸化的关系以及在调控凋亡中的可能作用是我们需要重点了解的课题之一。有研究发现, 过氧化氢处理的血管内皮细胞和平滑肌细胞, 其线粒体 DNA 的损伤和线粒体功能障碍与线粒体编码基因之间存在联系[6]。

需要注意的是, 线粒体中存在许多蛋白, 它们是由核基因所编码的, 它们的种类远多于线粒体自身, 例如线粒体仅编码 ATP 合成酶中的 6 亚基和 8 亚基, 其余的

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

亚基均由核基因所编码。并且线粒体编码基因的表达也受到核转录因子的调控。因而线粒体基因与核基因之间的交会(Cross-talk)的研究将是研究的难点和关键。随着基因组研究和蛋白组研究的进一步深入和基因芯片技术的进一步发展,从基因组和蛋白组角度对线粒体内基因蛋白质及其他相关分子进行研究成为可能。

参考文献:

[1] Kluck R M, Bossy Wetzel E, Green D R, *et al*. The release of cytochrome C from mitochondria: a primary site for BcL2 regulation of apoptosis[J]. Science, 1997, 275(5 303): 1 132—1 135.

[2] Susin S A, Zamzami N, Castedo M, *et al*. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease[J]. J Exp Med, 1996, 184(4): 1 331.

[3] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis[J]. Science, 1998, 281(5 381): 1 309—1 317.

[4] 李建明, 蔡 黔, 周 红, 等. 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体的损伤作用[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(2): 142—145.

[5] Janssen Y M, Driscoll K E, Timblin C R, *et al*. Modulation of mitochondrial gene expression in pulmonary epithelial cells exposed to oxidants[J]. Environ Health Perspect, 1998, 106(Suppl 5): 1 191—1 193.

[6] Ballinger S W, Patterson C, Yan C N, *et al*. Hydrogen peroxide and peroxynitrite induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells[J]. Circ Res, 2000, 86(9): 960—965.

(编辑 陈聪连)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2002)03-0270-01

大咯血患者选择性支气管动脉栓塞术后护理体会

Nursing for patients with massive hemoptysis after selective bronchial artery embolization

赵玛丽, 李长贵 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所, 重庆 400037)

大咯血是呼吸内科常见急症。近年来,对于药物治疗无效的大咯血患者,主张应用选择性支气管动脉栓塞治疗,有报告其疗效可达 68%~93.5%[1],但该方法是一种有创性治疗方法,文献报告可引起截瘫、发热、胸痛等并发症。我科 1996 年 1 月至 1999 年 6 月应用选择性支气管动脉栓塞治疗大咯血 10 例,现将本组病例护理体会报告如下。

1 临床资料

病例对象为经内科药物治疗无效的大咯血患者 10 例,其中男性 8 例,女性 2 例,平均年龄 53±9.27 岁(39~66 岁),原发疾病主要为支气管扩张(4 例,痊愈 3 例,好转 1 例)、肺结核(2 例,均痊愈)、肺脓肿(1 例,死亡)及原发性支气管肺癌,鳞癌(3 例,好转 1 例,死亡 2 例)。

2 护理体会

本组 10 例患者在支气管动脉栓塞术后的护理,我们主要注意以下几方面。

2.1 观察穿刺部位有无出血

本组 10 例患者,均经右侧股动脉穿刺插入导管行支气管动脉栓塞,拔除导管后穿刺部位用绷带加压包扎,右下肢制动 24 h。术后 4 h 内,我们每 30 min 巡视患者一次,然后每 1~2h 观察一次,观察包扎绷带局部是否渗血,10 例患者均未发现术后活动性出血。

2.2 观察下肢活动情况

术后 24 h 应特别注意观察下肢活动情况,右下肢制动时则观察脚趾活动情况,以及时发现是否有异位栓塞,因部分脊髓动脉与支气管动脉共干,误栓脊髓动脉后可引起下肢截瘫,虽然发生率不高,却是支气管动脉栓塞术后的较严重并发症[2],本组病人均无此并发症。

2.3 观察足背动脉搏动

所有病例术后均观察足背动脉搏动,并比较两侧动脉搏动强度,如有栓塞剂返流引起下肢动脉栓塞可及时发现,本组病例术后未发现下肢动脉搏动异常。

2.4 注意术后是否继续咯血

10 例患者支气管动脉栓塞术后,8 例咯血停止,咯出血液由鲜红变成暗红,然后逐渐停止。2 例术后仍有咯血,但咯血量明显减少。本组病例中有 3 例咯血曾一度停止,但再次发生咯血,经抢救无效死亡,其中 1 例咯血发生在术后第 10 天。在大咯血前无少量咯血而突然发生大咯血,3 例中有 2 例为原发性支气管鳞癌伴空洞患者,1 例为肺脓肿患者。提示临床应特别注意术后再次发生大咯血之可能,尤其是支气管鳞癌伴空洞或肺脓肿者易出现此种情况。对此类患者护理时应特别注意。

2.5 观察生命体征

如同其他手术一样,大咯血患者支气管动脉栓塞后也应注意观察体温、脉搏、呼吸及血压等生命体征变化。文献报告患者术后可出现发热,但本组病例术后无一例出现发热。

关键词: 大咯血; 支气管动脉栓塞术; 护理
中图法分类号: R473.5 文献标识码: B

参考文献:

[1] 郭季寅, 程 钢. 肺结核大咯血支气管动脉造影术及支气管动脉栓塞术疗效分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1992, 15(2): 77—78.

[2] 孙 红, 蔡幼铨. 动脉栓塞治疗大咯血有哪些并发症, 如何预防[A]. 见俞森洋, 蔡柏蔷, 主编. 呼吸内科主治医生 410 问[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 406—407.

(编辑 谢义霞)

作者简介: 赵玛丽(1966—), 女, 四川省垫江县人, 主管护师。电话: (023) 68774603

收稿日期: 2001-06-05; 修回日期: 2001-08-17

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net