

小干扰 RNA 沉默 MST1 基因减轻 TNF- α 诱导的 人脐静脉内皮细胞凋亡

阮激, 李锁北, 徐军美, 肖锋, 谭嵘

(中南大学湘雅二医院麻醉科, 中南大学麻醉研究所, 长沙 410011)

[摘要] **目的:** 探讨丝/苏氨酸蛋白激酶(mammalian sterile 20-like kinase 1, MST1)对肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)诱导的人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)凋亡的影响及作用机制。**方法:** 用不同浓度的 TNF- α (0~100 ng/mL)诱导内皮细胞凋亡, 24 h后通过 TUNEL 法观察内皮细胞凋亡率, Western 印迹分析 TNF- α 对 MST1 活性的影响; 随后将构建的 MST1 小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)在脂质体 Lipofectamine 2000 的介导下转染原代 HUVEC, 转染后 24 h 加入 TNF- α (10 ng/mL)诱导 HUVEC 凋亡, 24 h 后通过 Western 印迹确定 MST1 siRNA 的基因沉默效率; 通过 TUNEL 法观察 MST1 基因的敲除对 TNF- α 介导的内皮细胞凋亡的影响; 并进一步用 Western 印迹观察 MST1 基因敲除对 caspase-3 活性的影响。**结果:** TNF- α (10, 40, 100 ng/mL)能导致内皮细胞凋亡显著增多($P<0.001$), 并且呈剂量依赖性; 随着 TNF- α 浓度增加, MST1 的活化增多, MST1 激酶活性相应增加; MST1 siRNA 对内皮细胞中 MST1 基因表达的抑制呈剂量依赖性, 100 nmol/L MST1 siRNA 能特异性沉默内皮细胞中 MST1 基因的表达($P<0.05$); MST1 siRNA 能明显减少 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡($P<0.05$), 抑制 TNF- α 诱导的 MST1 裂解活化, 同时 caspase-3 的活性也相应减少。**结论:** MST1 siRNA 通过抑制 caspase-3 的级联放大效应减少 TNF- α 诱导的 HUVEC 凋亡。

[关键词] 肿瘤坏死因子- α ; 内皮细胞; 凋亡; MST1; caspase-3

DOI:10.3969/j.issn.1672-7347.2012.07.004

Silencing of MST1 expression by siRNA diminishes TNF- α -mediated human umbilical vein endothelial cell apoptosis

RUAN Wei, LI Suobei, XU Junmei, XIAO Feng, TAN Rong

(Department of Anesthesiology, Second Xiangya Hospital, Central South University; Anesthesiology Research Institute, Central South University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT

Objective: To elucidate the effects of mammalian sterile 20-like kinase 1 (MST1) gene on tumor necrosis factor (TNF)- α -mediated human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) apoptosis.

Methods: Cultured HUVECs were treated with either vehicle or TNF- α (1–100 ng/mL) for 24 hours. Cell apoptosis was measured by TUNEL staining, and MST1 activity was analyzed by Western blot. In order to knock down MST1 expression in HUVECs, cells were transfected with 100 nmol/L MST1 small interference RNA (siRNA) using Lipofectamine 2000 for 24 hours,

收稿日期 (Date of reception): 2012-01-13

作者简介 (Biography): 阮激, 博士, 助理研究员, 主要从事血管内皮细胞炎症、凋亡及器官保护方面的研究。

通信作者 (Corresponding author): 李锁北, Email: lisuobei@sina.com

基金项目 (Foundation items): 国家自然科学基金 (81100820); 湖南省科技厅科技计划项目 (2011FJ6031)。This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81100820) and the fund from the Department of Science and Technology of Hunan Province, P.R. China (2011FJ6031).

and the transfection efficiency was analyzed by Western blot. MST1 siRNA-transfected cells were treated with 10 ng/mL TNF- α for an additional 24 hours. Cell apoptosis was measured by TUNEL staining and caspase-3 activity was detected by Western blot.

Results: MST1 activity was stimulated in a dose-dependent manner after TNF- α treatment (10, 40, 100 ng/mL) and reached the maximal effect at 100 ng/mL. MST1 activity also paralleled the onset of apoptosis as determined by TUNEL staining ($P < 0.001$). Transfection with MST1 siRNA markedly diminished MST1 gene expression in a dose-dependent manner. MST1 siRNA (100 nmol/L) significantly silenced MST1 gene ($P < 0.05$) and reduced TNF- α -induced endothelial cells apoptosis ($P < 0.05$) by way of inhibiting MST1 gene activation and, accordingly, suppressing caspase-3 activity.

Conclusion: Silencing of MST1 expression by siRNA diminishes TNF- α -mediated human umbilical vein endothelial cell apoptosis by inhibiting the cascade effect of caspase-3.

KEY WORDS

tumor necrosis factor- α ; endothelial cell; apoptosis; MST1; caspase-3

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)是全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)中所产生的最重要细胞因子之一,它所引起的血管内皮细胞凋亡导致循环功能失调并进一步加重器官功能障碍^[1-3]。丝/苏氨酸蛋白激酶(mammalian sterile 20-like kinase 1, MST1)是酵母 Ste20 的哺乳动物同源物^[4-5]。针对许多肿瘤细胞系的研究^[6-8]表明多种促凋亡刺激如十字孢碱、CD95/Fas、紫外线、血清饥饿以及抗肿瘤的药物治疗均可激活 MST1,引起下游信号分子活化,进一步导致细胞凋亡。以往的研究从多个角度集中探讨了 MST1 在肿瘤细胞中的生物学功能,但迄今为止有关其在内皮细胞中的功能研究报道甚少。为探讨 MST1 在血管内皮细胞凋亡过程中的可能作用,本研究采用 TNF- α 诱导人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)凋亡的细胞模型,通过转染小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)特异性沉默 MST1 的表达,观察 MST1 在内皮细胞凋亡中的影响及可能的作用机制,为进一步研究 MST1 在 SIRS 中的调控作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本研究经中南大学湘雅医学院伦理委员会批准,新生儿脐带采集在断脐后胎盘一端进行,由中南大学湘雅二医院产科提供。内皮细胞培养液(endothelial cell medium, ECM)购自美国 ScienCell 公司;重组人 TNF- α , Lipofectamine2000, TRIzol 和 Opti-MEM 低血清培养基购

自美国 Invitrogen 公司;总的及活化的 MST1 抗体,原形形式的 pro-caspase-3 及其活化裂解片段 cleaved caspase-3 抗体和 β -actin 抗体购自美国 CST 公司;TUNEL 荧光凋亡检测试剂盒购自美国 Roche 公司;MST1 siRNA 和荧光素酶(luciferase, luc)siRNA 根据人类基因库中人 MST1 基因(NM_006282.2)的 mRNA 序列设计,siRNA 序列: CAAGCGAAA UACAGUGAUATT,与 MST1 没有明显的同源性的阴性对照的 siRNA 序列: GCAUAGAGG ACAACUAAAUTT,均由广州锐博生物科技有限公司设计与合成。

1.2 细胞培养及模型制备

在无菌条件下,于健康产妇(剖宫产为佳)分娩后立即取新生胎儿脐带,按 Jaffe 等^[9]报道的改良方法分离培养 HUVEC。取第 2~5 代用于实验,当细胞生长至 60%~70% 融合时,加入不同浓度 TNF- α (0, 1, 10, 40 和 100 ng/mL)诱导内皮细胞凋亡,24 h 后分别观察细胞的凋亡和 MST1 的裂解活化。

1.3 TUNEL 法检测细胞凋亡

参照 TUNEL 荧光凋亡检测试剂盒使用说明,首先用 0.3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,加入配制好的生物素标记液(TdT 酶、生物素-dUTP),37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min,再加入链霉亲和素辣根过氧化物酶工作液,孵育 30 min,接着加入 FITC 标记的二抗,最后用 DAPI 复染。封片后于倒置荧光显微镜下观察。FITC 绿色荧光显示凋亡细胞,DAPI 染色显示总细胞数,每个标本取 5 个镜下视野进行凋亡细胞计数。凋亡率 = 凋亡细胞数 / 总细胞数 \times 100%。

1.4 siRNA 转染

转染前一天, 接种 5×10^7 /L 内皮细胞至 6 孔板中, 细胞达到 30%~50% 融合时进行转染。转染操作按 lipofectamine2000 试剂说明书进行。将不同浓度 MST1 siRNA(0, 10, 50, 100 和 200 nmol/L) 与 lipo 2000 混合静置 20 min 后分别加入 6 孔板, 在 Opti-MEM 低血清培养基中转染 6 h, 换成 ECM 完全培养基培养 48 h 后检测转染水平; 将 MST1 siRNA(100 nmol/L)-lipo 2000 混合物或 luc siRNA(100 nmol/L)-lipo 2000 混和物加入 6 孔板转染内皮细胞, 同时以等量 Opti-MEM 低血清培养基设置阴性对照孔, 24 h 后加入 TNF- α (10 ng/mL), 1 d 后收集细胞, 观察 MST1 siRNA 对 MST1 表达的抑制作用。另外将转染 MST1 siRNA(100 nmol/L) 和等量 Opti-MEM 低血清培养的内皮细胞分别加或不加 10 ng/mL TNF- α 刺激, 设置空白对照组 (Opti-MEM)、luc siRNA 转染组 (luc siRNA)、MST1 siRNA 转染组 (MST1 siRNA)、阴性对照组 (Opti-MEM + 10 ng/mL TNF- α)、luc siRNA 转染刺激组 (luc siRNA + 10 ng/mL TNF- α) 和 MST1 siRNA 转染刺激组 (MST1 siRNA + 10 ng/mL TNF- α) 6 组观察转染 MST1 siRNA 对 TNF- α 诱导内皮细胞凋亡的影响。

1.5 RT-qPCR 法检测 MST1 mRNA 的表达

用 TRIzol 提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计定量后取 2 μ g 反转录获得 cDNA。使用 SYBR Green 1 嵌合荧光法进行实时定量 PCR 扩增, 反应条件为预变性 95 $^{\circ}$ C, 15 s 后, 变性 95 $^{\circ}$ C, 5 s, 退火延伸 60 $^{\circ}$ C, 30 s, 共进行 45 个循环。MST1 引物序列: 上游 5'-GGGTCCAGTAGCCAAGAT-3', 下游 5'-GAGGCACCACATACCAATCA-3'; 内对照 β -actin 引物序列上游 5'-TGCGTGACATCAAAGAGAAGC-3', 下游 5'-CAGCACTGTGTTGGCATAGAG-3'。应用的仪器是 Roche 公司 LightCycler 荧光定量 PCR 仪, 引物内对照数据分析用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。

1.6 Western 印迹检测蛋白表达

将以上 6 组细胞经预冷的 PBS 漂洗 2 遍后, 加入 200 μ L 细胞裂解缓冲液 [50.0 mmol/L Tris pH=7.6, 150.0 mmol/L NaCl, 0.1% SDS, 1.0% NP-40, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail (Sigma, USA)], 刮取细胞, 4 $^{\circ}$ C 旋转裂解 30 min; 12000 g 离心 30 min, 收集上清液; 经 Bradford 法测定蛋白质浓度后, 取 50 μ g 总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 按常规方法转移至 PVDF 膜上, 加入 MST1 抗体 (1:1000 稀释)、pro-caspase-3 抗体 (1:1000 稀释) 或 cleaved caspase-3 抗体 (1:1000 稀释) 进行蛋白表达测定。用 Photoshop CS4 (Adobe 公司) 图像分

析系统对蛋白条带进行分析, 蛋白质的相对含量以目的蛋白与 β -actin 条带光密度值的比值表示。

1.7 统计学处理

运用 SPSS 13.0 统计软件包进行统计学分析, 每组实验重复 5 次, 结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用 *t* 检验及单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TNF- α 诱导内皮细胞凋亡

TUNEL 荧光染色的结果表明, 虽然低浓度 (1 ng/mL) 的 TNF- α 对内皮细胞凋亡无明显影响, 但是高浓度的 TNF- α (10, 40, 100 ng/mL) 能导致内皮细胞凋亡显著增多 ($P < 0.001$), 并且呈剂量依赖性 (图 1A)。

2.2 TNF- α 促使内皮细胞 MST1 活性增加

Western 印迹结果显示: 10 ng/mL TNF- α 就能使内皮细胞 MST1 裂解活化, 表现为 36 kD 的 MST1 活化蛋白激酶结构片段表达增加, 同时伴随着 63 kD 的总 MST1 表达减少, 在 TNF- α 剂量为 100 ng/mL 时变化趋势达到高峰。这种 MST1 的活化呈现出 TNF- α 剂量依赖性, 并伴随内皮细胞凋亡的增多 (图 1B)。

2.3 MST1 siRNA 抑制内皮细胞 MST1 的表达

MST1 siRNA 对内皮细胞中总 MST1 表达的抑制呈剂量依赖性, 50 nmol/L 以上浓度对内皮细胞 MST1 表达有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 100 nmol/L 时达峰值 ($P < 0.001$, 图 2A)。

与空白对照组 (Opti-MEM) 相比, 100 nmol/L MST1 siRNA 能特异性地沉默内皮细胞中总 MST1 的表达 ($P < 0.05$), 而 luc siRNA 则对 MST1 的表达没有影响 (图 2B, 2C)。

2.4 MST1 沉默对 TNF- α 诱导的内皮细胞的凋亡的影响

TUNEL 荧光染色的结果表明: 转染 MST1 siRNA 的内皮细胞用 TNF- α (10 ng/mL) 处理 24 h 后, 与阴性对照组 (Opti-MEM + 10 ng/mL TNF- α) 相比, MST1 基因的沉默能明显减少 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡 ($P < 0.05$), 说明 MST1 siRNA 干扰效果确切; 与空白对照组 (Opti-MEM) 相比, MST1 siRNA 转染刺激组 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡仍明显增加 ($P < 0.05$), 这表明 MST1 基因的沉默部分阻止 TNF- α 诱导内皮细胞凋亡的作用 (图 3)。

2.5 MST1 siRNA 对 MST1 活性及 caspase-3 活性的影响

Western 印迹结果显示: MST1 siRNA 显著抑制 TNF- α 诱导的 MST1 裂解活化, 表现为 36 kD 的 MST1 活化蛋白激酶结构片段表达明显减少; 同时伴

随有 caspase-3 的活性减低, 表现为活化形式的 cleaved caspase-3 表达减少, 原形形式的 pro-caspase-3 表达增多。这些结果提示在 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡中, MST1 的裂解活化具有至关重要的作用, 并且可能通过参与 caspase-3 的激活而起作用(图 4)。

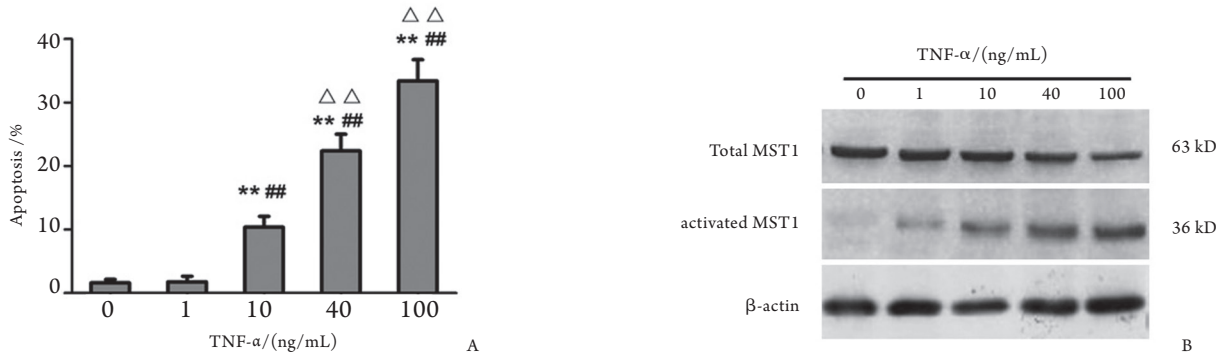


图 1 TNF- α 诱导内皮细胞凋亡(A)及刺激 MST1 裂解活化增多(B)。与 0 ng/mL 组比较, ** P <0.001; 与 1 ng/mL 组比较, $\Delta\Delta$ P <0.001; 与 10 ng/mL 组比较, $\Delta\Delta$ P <0.001。

Figure 1 Effects of TNF- α on human endothelial cell apoptosis (A) and cleavage of MST1 (B). ** P <0.001 vs 0 ng/mL group; $\Delta\Delta$ P <0.001 vs 1 ng/mL group; $\Delta\Delta$ P <0.001 vs 10 ng/mL group.

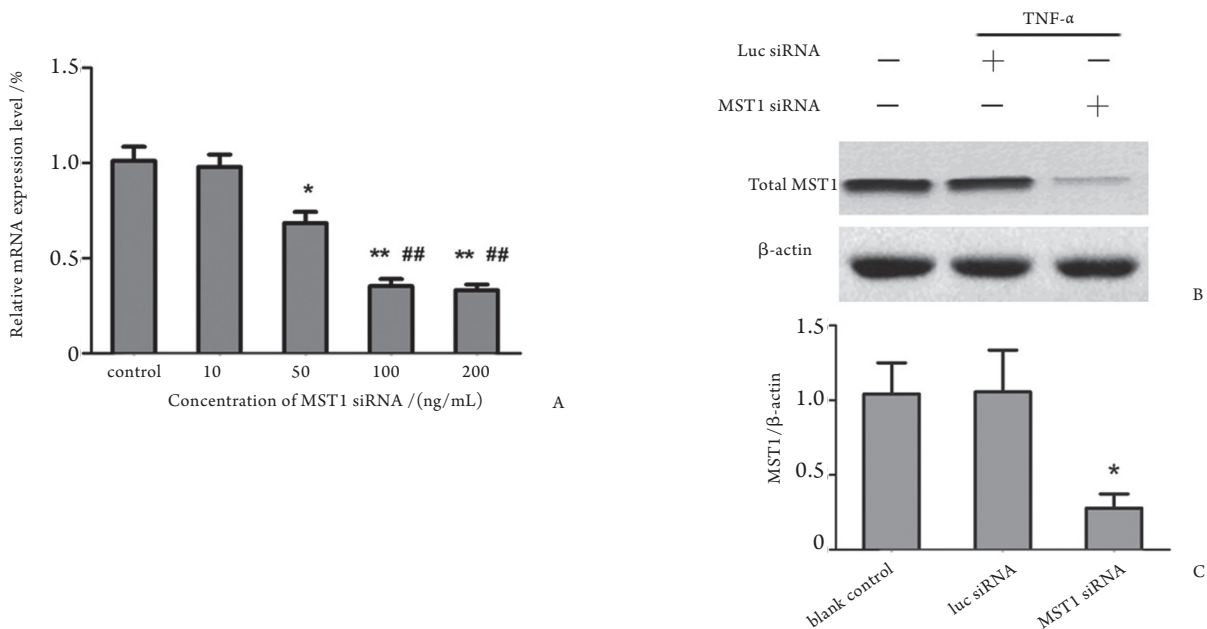


图 2 MST1 siRNA 抑制内皮细胞总 MST1 的表达。A: MST1 siRNA 对内皮细胞中总 MST1 表达抑制的量效关系($\bar{x}\pm s$)。与 control 组比较, * P <0.01, ** P <0.001; 与 50 nmol/L 组比较, $\Delta\Delta$ P <0.001; B: Western 印迹检测总 MST1 蛋白表达; C: Western 印迹结果直方图分析。与空白对照组比较, * P <0.05。

Figure 2 Silencing of basal expression of MST1 in endothelial cells. A: Dose-effect relationship of siRNA and MST1 mRNA ($\bar{x}\pm s$). * P <0.01, ** P <0.001 vs control group; $\Delta\Delta$ P <0.001 vs 50 nmol/L group; B: Levels of MST1 and β -actin were determined by Western blot; C: Intensity of each band of the Western blot was determined by Photoshop CS, the MST1/ β -actin ratio in untreated endothelial cells was set as 1. * P <0.05 vs blank control group.

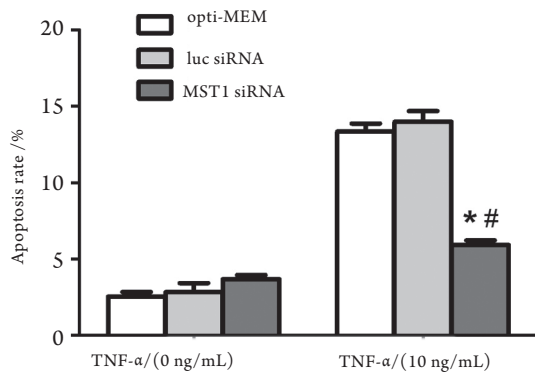


图3 MST1 siRNA 抑制 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡。与阴性对照组 (Opti-MEM + 10 ng/mL TNF- α) 比较, ^{*} $P < 0.05$; 与空白对照组 (Opti-MEM) 比较, [#] $P < 0.05$ 。

Figure 3 Silencing of siRNA diminished TNF- α -mediated endothelial cell apoptosis. ^{*} $P < 0.05$ vs group of Opti-MEM + TNF- α (10 ng/mL); [#] $P < 0.05$ vs group of Opti-MEM.

3 讨论

内皮细胞的损伤在 SIRS 的发展与转归中扮演着重要的角色。多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 患者血中 TNF- α , IL-6 等炎性因子水平增加, 血管内皮细胞功能受损, TNF- α 在血管内皮损伤中起关键作用^[10]。而脓毒症以及脓毒症休克患者血中循环内皮细胞 (circulating endothelial cells, CEC) 数量明显增加, CEC 数量增加与炎症引起的血管内皮损伤有直接关系且与 MODS 病人生存率呈负相关^[11-12]。Matsuda 等^[3]的研究结果显示: 在 SIRS 中, 低氧、低灌注、炎性介质等均能导致内皮细胞的凋亡或坏死, 使血管变形受损甚至形成血栓, 微循环的功能失调将进一步加重器官衰竭。以上的研究结果均表明 TNF- α 介导的内皮细胞的凋亡是 SIRS 不可逆地走向多器官功能衰竭过程中最关键的病理生理基础之一^[13]。但内皮细胞凋亡的分子机制并不完全清楚。本研究结果表明: MST1 参与了 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡。

MST1 基因是酵母 Ste20 的哺乳动物同源物, 它编码一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。大量研究^[6-8,14-15]证实: 在许多细胞系 (bstAB, HPB-ALL, Jurkat 和 HL-60) 中, 多种促凋亡因素和细胞应激事件, 包括紫外线辐射, TNF- α , 血清饥饿, 抗 FAS 单克隆抗体以及抗肿瘤药物等都能活化 MST1; 同时由于 MST1 在从果蝇到哺乳动物体内普遍表达并具有高度的保守性, 说明 MST1 可能是众多凋亡信号通路的共同组分。本研究发现, TNF- α 能诱导内皮细胞 MST1 活

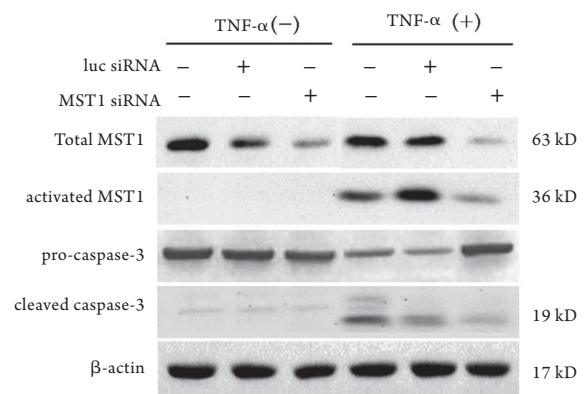


图4 MST1 siRNA 对 MST1 活性及 caspase-3 活性的影响。
Figure 4 Silencing of MST1 expression by siRNA reduced MST1 cleavage and caspase-3 activity.

化, 并伴随 MST1 激酶活性相应增加和内皮细胞凋亡的增多。而 MST1 基因敲除能明显减少 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡, 进一步表明 MST1 活化参与了内皮细胞凋亡的调控。但是 MST1 siRNA 并不能完全抑制由 TNF- α 介导的促凋亡效应, 这提示在 TNF- α 诱导内皮细胞凋亡的分子机制中还存在着不依赖于 MST1 的凋亡通路。

MST1 能通过多条信号通路参与细胞凋亡的调控。在外源信号分子刺激下, MST1 发生自磷酸化 (Thr83) 并被 caspase-3 裂解, 产生具有高度催化活性的相对分子量为 34~36 kD 片段; 活化的 MST1 片段随即进入细胞核, 磷酸化或裂解下游靶分子, 行使生物学功能^[16]。本研究证实: 在内皮细胞中, MST1 基因沉默能显著减少 TNF- α 诱导的 caspase-3 的裂解活化。这表明 MST1 不仅能被 caspase-3 裂解活化, 并且能与 caspase-3 形成一个正反馈回路 (a positive feedback loop), 对细胞的凋亡进行放大。Graves 等^[17]的研究也证实 MST1 不仅是 caspase-3 的下游底物, 外源性过表达的 MST1 作为上游信号因子, 还能够活化 caspase-3, 进而促进自我磷酸化, 使凋亡信号迅速放大。Lee 等^[18]的研究也发现, 在稳定转染 MST1 的 HeLa 细胞中, 由于 caspase-3 的加速激活使得细胞对死亡受体介导的凋亡更敏感。这些研究结果均提示在 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡中, MST1 的裂解活化具有至关重要的作用, 并且可能通过参与 caspase-3 的级联放大效应而起作用。然而 MST1 活化 caspase-3 的具体机制仍不清楚。有研究证实, 哺乳动物细胞中过表达 MST1 能够激活 caspase-3 和 JNK, 而 JNK 磷酸化

的抑制物能抑制 MST1 对 caspase-3 的裂解活化^[19], 提示 MST1 可能通过 JNK 通路实现对 caspase-3 的裂解活化。

综上所述, 本研究证实了 MST1 参与 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡的调控, 并提示 MST1-caspase-3 正反馈回路在 MST1 调控凋亡的机制中具有重要作用。因此, 继续对 MST1 在 TNF- α 诱导的内皮细胞凋亡调控机制中的深入研究, 将有望为防治 SIRS 找到新的靶点和方向。

参考文献

- Gando S. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and endothelial cell injury [J]. *Nippon Rinsho*, 2004,62(12): 2244-2250.
- Hattori Y, Takano K, Teramae H, et al. Insights into sepsis therapeutic design based on the apoptotic death pathway[J]. *J Pharmacol Sci*, 2010,114(4): 354-365.
- Matsuda N, Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction[J]. *J Smooth Muscle Res*, 2007,43(4): 117-137.
- Taylor LK, Wang HC, Erikson RL. Newly identified stress-responsive protein kinases, Krs-1 and Krs-2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996,93(19): 10099-10104.
- Schinkmann K, Blenis J. Cloning and characterization of a human STE20-like protein kinase with unusual cofactor requirements[J]. *J Biol Chem*, 1997,272(45): 28695-28703.
- Shen L, Au WY, Guo T, et al. Proteasome inhibitor bortezomib-induced apoptosis in natural killer (NK)-cell leukemia and lymphoma: an in vitro and in vivo preclinical evaluation[J]. *Blood*, 2007,110(1): 469-470.
- Teraishi F, Guo W, Zhang L, et al. Activation of sterile20-like kinase 1 in proteasome inhibitor bortezomib-induced apoptosis in oncogenic K-ras-transformed cells[J]. *Cancer Res*, 2006,66(12): 6072-6079.
- Cheung WL, Ajiro K, Samejima K, et al. Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase[J]. *Cell*, 2003,113(4): 507-517.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria[J]. *J Clin Invest*, 1973,52(11): 2745-2756.
- 王静, 乔万海. 多器官功能障碍综合征患者血管内皮损伤与炎症相关因子的研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2006,18(2): 82-84. WANG Jing, QIAO Wanhai. Study on vascular endothelial injuries and inflammation related cytokines in patients with multiple organ dysfunction syndrome[J]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2006,18(2): 82-84.
- Mutunga M, Fulton B, Bullock R, et al. Circulating endothelial cells in patients with septic shock[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001,163(1): 195-200.
- 李旭, 马晓春. 脓毒症内皮细胞损伤和凝血功能障碍相关的生物标志物[J]. *中国危重病急救医学*, 2011,23(2): 117-121. LI Xu, MA Xiaochun. Biomarkers of endothelial cell injury and coagulopathy in sepsis[J]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2011,23(2): 117-121.
- 章志丹, 马晓春. 脓毒症血管内皮细胞损伤与微循环功能障碍[J]. *中国危重病急救医学*, 2011,23(2): 125-128. ZHANG Zhidan, MA Xiaochun. Injury of vascular endothelial cell and microcirculation disturbance in sepsis[J]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2011,23(2): 125-128.
- Graves JD, Draves KE, Gotoh Y, et al. Both phosphorylation and caspase-mediated cleavage contribute to regulation of the Ste20-like protein kinase Mst1 during CD95/Fas-induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2001,276(18): 14909-14915.
- Lu ML, Sato M, Cao B, et al. UV irradiation-induced apoptosis leads to activation of a 36-kDa myelin basic protein kinase in HL-60 cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996,93(17): 8977-8982.
- Ling P, Lu TJ, Yuan CJ, et al. Biosignaling of mammalian Ste20-related kinases[J]. *Cell Signal*, 2008,20(7): 1237-1247.
- Graves JD, Gotoh Y, Draves KE, et al. Caspase-mediated activation and induction of apoptosis by the mammalian Ste20-like kinase Mst1[J]. *EMBO J*, 1998,17(8): 2224-2234.
- Lee KK, Ohyama T, Yajima N, et al. MST, a physiological caspase substrate, highly sensitizes apoptosis both upstream and downstream of caspase activation[J]. *J Biol Chem*, 2001,276(22): 19276-19285.
- Ura S, Masuyama N, Graves JD, et al. MST1-JNK promotes apoptosis via caspase-dependent and independent pathways[J]. *Genes Cells*, 2001,6(6): 519-530.

(本文编辑 郭征)