

一氧化氮对血管平滑肌细胞中 Bcl-2、Bax、P53 和 Fas 蛋白表达的影响

田雪梅 刘建康^① 李 进

(第一军医大学组织学与胚胎学教研室, 广州 510515)

The Effects of Nitric Oxide on Expression of Bcl-2, Bax, P53, and Fas Proteins in Vascular Smooth Muscle Cells

TIAN Xue-Mei^①, LIU Jian-Kang^② and LI Jin^①

(^① Department of Histology and Embryology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515. ^② Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

ABSTRACT

Aim To better understand the inhibition of growth and induction of apoptosis in smooth muscle cells (VSMC) by nitric oxide (NO) and the mechanism in these processes.

Methods Cultured rat VSMC at passage 5 to 8 were used for experiment. After reaching 60%~70% confluence, VSMCs were preincubated for 24 h (at least) with serum free Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM) to become quiescent before the experiments. Then SNAP (0.4 mol/L) was added to the medium. The cells were fixed with 3% paraformaldehyde after 8 h. Expression of Bcl-2, Bax, P53, and Fas in VSMC were examined by fluorescein immunocytochemistry methods through ACAS 570.

Results Expression of Bcl-2 was decreased by NO. But expression of Bax, P53, and Fas were increased by NO.

Conclusion Bcl-2, Bax, P53, and Fas may take part in the effects of NO on inhibition of growth and induction of apoptosis in VSMCs.

KEY WORDS Nitric oxide; Vascular smooth muscle cells; Bcl-2; Bax; P53; Fas

摘要 一氧化氮能抑制血管平滑肌细胞增殖和诱导其凋亡。为深入了解一氧化氮对血管平滑肌细胞的生物学效应及其作用机制。本实验应用 ACAS 570 共聚焦激光扫描显微镜系统,通过荧光免疫细胞化学方法,对一氧化氮作用下血管平滑肌细胞中凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、P53 及 Fas 的表达进行了定量检测。结果发现,一氧化氮能使血管平滑肌细胞中 Bcl-2 表达降低,而使 Bax、P53 和 Fas 表达升高。这些结果进一步证明了一氧化氮能诱导血管平滑肌细胞凋亡。同时,也说明 Bcl-2、Bax、P53 和 Fas 可能参与一氧化氮诱导的血管平滑肌细胞增殖抑制及凋亡发生。

关键词 一氧化氮; 血管平滑肌细胞; Bcl-2; Bax; P53; Fas

一氧化氮(nitric oxide, NO)是心血管系统中活跃的小分子物质。近年来,对它在心血管系统中的作用有了相当的认识。现已发现,它直接参与或介导多种生物学效应。其中 NO 对血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的作用尤为突出。一氧化氮不仅松弛 VSMC 而使血管扩张,它还能抑制动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和再狭窄等病理变化中 VSMC 向血管内膜移行、增殖及合成蛋白等活动^[1~3],并且还发现 NO 以时间剂量依赖的方式诱导 VSMC 凋亡^[4],这使得对 NO 抑制 VSMC 增殖和数量增加的功能又有了新的认识。但是,目前对 NO 诱导 VSMC 凋亡的机制尚不十分明确。Bcl-2、Bax、P53 和 Fas 都是与细胞凋亡相关的基因/蛋白。已有报道,As 和再狭窄组织中 P53 和 Fas 蛋白表达增多^[5,6]。本实验用荧光免疫细胞化学法。通过 ACAS570 共聚焦激光扫描显微镜系统,对 NO 作用下,培养的 VSMC 中 Bcl-2、Bax、P53 和 Fas 的表达进

① 广州医学院组织学与胚胎学教研室

行了定性和定量检测,旨在更深入了解 NO 抑制 VSMC 增殖和诱导凋亡的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料

Dubecco's modified Eagle's medium(DMEM)培养粉为 GIBCO 产品,小牛血清为杭州四季青出品,SNAP (S-nitroso-N-acetylpenicillamine) 为 Sigma 公司产品, α -actin、P53 单克隆抗体购自 DAKO 公司,Bcl-2、Fas、Bax 多克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品,异硫氢酸荧光素(fluorescein-iso-thiocyanate, FITC)标记的羊抗兔与羊抗鼠 IgG 为军事医学科学院出品。

1.2 方法

1.2.1 血管平滑肌细胞培养与鉴定 贴块法培养血管平滑肌细胞。无菌条件下分离 SD 大鼠的胸主动脉,去除内外膜。将中膜平滑肌组织块剪碎,加入适量含 20% 小牛血清的 DMEM 培养液,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中静置培养。7 天左右有平滑肌细胞从组织四周爬出,待细胞达融合,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代。实验用第 5~8 代细胞。

倒置显微镜下观察细胞生长状态。用抗肌动蛋白 α -actin 的单克隆抗体通过免疫化学方法鉴定平滑肌细胞的特异性肌动蛋白。

1.2.2 SNAP 对血管平滑肌细胞的作用 血管平滑肌细胞(VSMC)以 4×10^7 个/L 密度传至 96 孔板中,培养 24 h。换无血清培养基(含 1% 小牛血清白蛋白)再培养 24 h 后,分别加入终浓度为 0.4 mmol/L SNAP,并设不加 SNAP 的对照;8 h 后吸出培养基。pH 7.4 的 PBS 洗 2 次,3% 多聚甲醛固定细胞 15 min, PBS 洗 3 次,晾干。4℃ 冰箱保存待测。

已固定的样品按常规免疫组织化学方法进行处理,每种抗体 3 孔细胞。于室温下 PBS 洗 1 次。加 20 μ L 抗体稀释液,于 37℃ 孵育 20 min,吸去抗体稀释液,每孔加 10 μ L 一抗,同时设阴性对照;37℃ 孵育 1 h, PBS 洗 15 min,分别加 FITC 标记的二抗,避光于 37℃,孵育 30 min; PBS 洗 3 次;加 20 μ L PBS 于孔中,随后进

行检测。

1.2.3 抗原表达检测 用带电脑的 ACAS570 共聚焦激光扫描显微镜系统检测抗原表达。每个孔选 8~10 个不同的细胞区进行扫描,扫描细胞总数 150 个以上。激发光波长为 488 nm。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞鉴定

倒置显微镜下,细胞生长呈典型的“谷与峰”特征; α -actin 单克隆抗体免疫细胞化学显示 95% 为阳性 VSMC。

2.2 SNAP 对血管平滑肌细胞中 Bcl-2、Bax、P53 及 Fas 蛋白表达的影响

经 ACAS570 计算机图像处理系统得出,对照组和 SNAP 作用组细胞的抗原表达平均荧光强度值见附表(Table)。与对照组相比,SNAP 作用后 Bcl-2、Bax、P53 及 Fas 表达均有变化,差异有显著性意义。

Table. Effect of SNAP on Bcl-2, P53, and Fas protein expression in VSMC ($\bar{x} \pm s$).

Groups	Bcl-2	Bax	P53	Fas
Control	1062 $\pm$ 59	446 $\pm$ 42	490 $\pm$ 60	732 $\pm$ 26
SNAP	753 $\pm$ 83 ^a	705 $\pm$ 90 ^a	911 $\pm$ 62 ^b	945 $\pm$ 92 ^b

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, compared with control group.

图像分析给出 SNAP 作用组与对照组平均荧光强度比较的直观曲线图(横坐标为平均荧光强度,纵坐标为细胞数目)。与无 SNAP 作用的对照组比较,SNAP 作用使 VSMC 中 Bcl-2 表达降低如图 1(Figure 1);而从图 2、3 和 4 (Figure 2, Figure 3, and Figure 4)中可见, Bax、P53 及 Fas 的表达情况则相反。

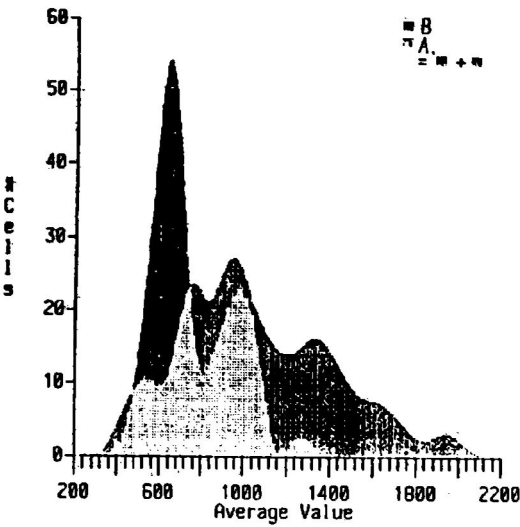


Figure 1. Comparative atlas of fluorescent intensity of Bcl-2 expression in VSMC exposed to normal condition and 0.4 mmol/L SNAP. A: VSMC exposed to normal condition; B: VSMC exposed to 0.4 mmol/L SNAP.

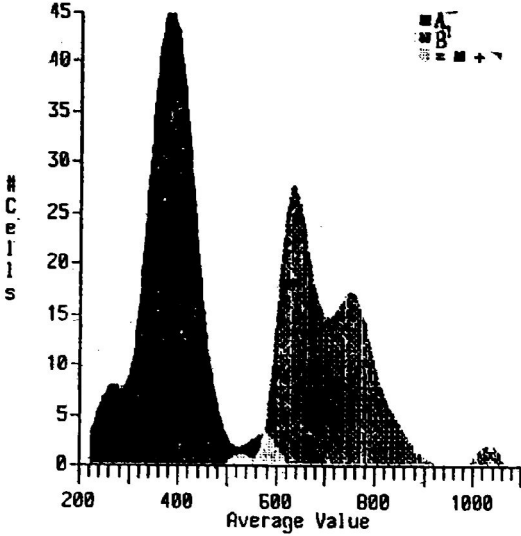


Figure 2. Comparative atlas of fluorescent intensity of Bax expression in VSMC exposed to normal condition and 0.4 mmol/L SNAP. A: VSMC exposed to normal condition; B: VSMC exposed to 0.4 mmol/L SNAP.

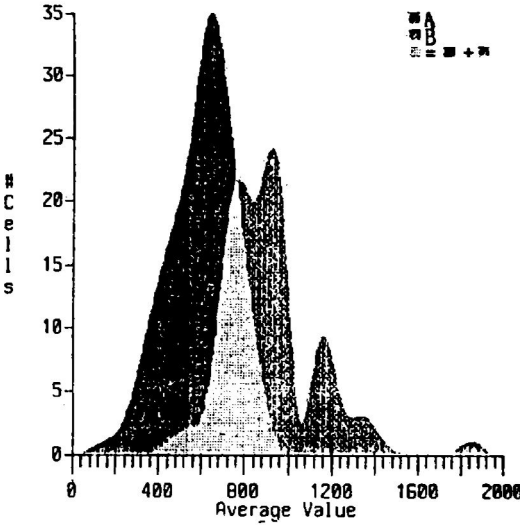


Figure 3. Comparative atlas of fluorescent intensity of P53 expression in VSMC exposed to normal condition and 0.4 mmol/L SNAP. A: VSMC exposed to normal condition; B: VSMC exposed to 0.4 mmol/L SNAP.

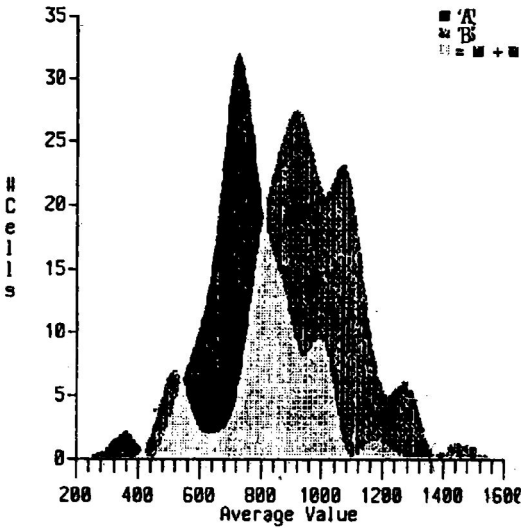


Figure 4. Comparative atlas of fluorescent intensity of Fas expression in VSMC exposed to normal condition and 0.4 mmol/L SNAP. A: VSMC exposed to normal condition; B: VSMC exposed to 0.4 mmol/L SNAP.

3 讨论

动脉粥样硬化和血管成形术后再狭窄的发病机理十分复杂。以血管平滑肌细胞异常增殖为主的细胞数量过度增加引起血管壁增厚是共同特征,也是防治 As 和再狭窄的重要方面。血管壁细胞数量由增殖和凋亡共同决定,两者达到平衡,细胞数量恒定。As 时细胞增殖和凋亡失去平衡,造成了细胞数目异常增多。血管壁损伤后 SMC 增殖和凋亡都增加,但前者比后者发生得早^[7~9],因而细胞数目增多,血管壁加厚。细胞增殖和凋亡受基因调控^[10~13]。bcl-2、bax、P53 及 fas 都是和细胞凋亡相关的基因。bcl-2 抑制凋亡; bax 为 bcl-2 家族成员,但其作用与 bcl-2 相反; P53 是凋亡的诱导基因; fas 则通过与表达 Fas 受体的细胞或与 Fas 抗体相互作用介导细胞凋亡。以往的研究已证明 As 中的细胞凋亡涉及 bcl-2、P53 和 fas^[6,7,13]。但对 bax 在其中的作用所见文献不多。本实验的结果也验证了以往成果。

SNAP 是一种高效力、低毒性 NO 供体,在溶液中可释放出 NO。实验证明 0.1~0.5 mmol/L SNAP 能诱导 VSMC 凋亡。本实验也发现 0.4 mmol/L SNAP 作用 1 h 后, VSMC 即呈现出凋亡的形态特征。SNAP 作用下 VSMC 中 Fas 表达上调也说明 SNAP 诱导凋亡。Bennett 等^[6,7,13]指出 VSMC 凋亡通过 P53 依赖和非依赖的途径。本实验则证明 NO 诱导 VSMC 凋亡通过增加 P53 表达上调,而且,在凋亡过程中 Bax 蛋白表达也增多。SNAP 使 VSMC 中 Bcl-2 表达变弱。在实验中,还发现 SNAP 剂量和作用时间不同对蛋白表达没有显著影响(结果未列出)。这可能是因为 SNAP 在溶解状态下不稳定,半衰期较短引起的。

总之,NO 诱导 VSMC 凋亡,该过程与 Bcl-2 表达降低, Bax、P53 及 Fas 表达升高关系密切。但其机理还需进一步研究。

参考文献

- 1 Sarkar R, Meinberg EG, Stanley JC, et al. Nitric oxide reversibly inhibits the migration of cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1996, **78**: 225~230.
- 2 Cornwell TL, Arnold E, Boerth NJ, et al. Inhibition of smooth muscle cells growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol*, 1994, **267**: 1 405~413.
- 3 Kolpakov V, Gordon D, Kulik TJ. Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 1995, **76**: 305~309.
- 4 Nishio E, Fukushima K, Shiozaki M, et al. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **221**: 163~168.
- 5 Speir E, Modali R, Huang ES, et al. Potential role of human cytomegalovirus and P53 interaction in coronary restenosis. *Science*, 1994, **265**: 391~394.
- 6 Cai WJ, Devaux D, Schaper W, et al. The role of Fas/Apo 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 1997, **131**: 177~186.
- 7 Reikhter MD, Jordon D. Active proliferation of different cell types, including lymphocytes, in human atherosclerotic plaques. *Am J Pathol*, 1995, **147**: 668~677.
- 8 Han DKM, Haudenschild CC, Hong MK, et al. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol*, 1995, **147**: 267~277.
- 9 Isner JM, Kearney M, Bortman S, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*, 1995, **95**: 2 266~274.
- 10 Fanidi A, Harrington EA, Evan GI. Cooperative interaction between c-Myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature*, 1992, **359**: 554~555.
- 11 Bissonnette IP, Echeverri F, Mabbonbi A, et al. Apoptotic cells death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature*, 1992, **359**: 552~554.
- 12 Nagata S, Golstern P. The fas death factor. *Science*, 1995, **267**: 1 449~455.
- 13 Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by P53-dependent and-independent pathways. *Circ Res*, 1995, **77**: 266~273.

(1998-01-23 收到)