

家兔腹主动脉球囊导管损伤后血管平滑肌细胞凋亡和一氧化氮合成酶基因表达

陈颜芳 林曙光 余细勇 伍淑英 夏学峰^①

(广东省心血管病研究所, 广州 510100)

Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells and Inducible Nitric Oxide Synthetase Gene Expression in the Rabbit Aorta Injury Model

CHEN Yan-Fang, LIN Shu-Guang, YU Xi-Yong, WU Shu-Ying and XIA Xue-Feng^①

(Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510100.

① Neurology Science Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510180, China)

ABSTRACT

Aim This study was to investigate the aspect of smooth muscle cell (SMC) apoptosis and inducible nitric oxide synthetase (iNOS) gene expression in the early periods of rabbit aorta injury model.

Methods The endothelium of rabbit abdominal aorta was injured by a balloon angioplasty catheter, the presence of apoptotic SMC was demonstrated by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The expression of iNOS mRNA was evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) methods.

Results TUNEL analysis showed that the media SMC underwent apoptosis after injury. The index of apoptotic SMC was 6% at 0 hour. It was significantly increased to 15% at 8 hours, and reach a maximum (50%) at 24 hours, and maintained a high level at 3 days (32%) and 5 days (20%). No significant increment of apoptotic cells was observed in adventitia in the early periods of artery injury. The expression of iNOS gene mRNA in artery was significantly increased

after injury, and was parallel with cell apoptotic index.

Conclusion Vascular media SMC of rabbit abdominal aorta underwent apoptotic cell death in the early periods of injury caused by balloon catheter. The induction of apoptosis coincided with iNOS mRNA expression.

KEY WORDS Artery injury; Smooth muscle cell; Apoptosis; Nitric oxide synthetase; Gene expression

摘要 采用脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法,观察兔腹主动脉球囊导管损伤后0、8、24 h、3天和5天时血管中膜平滑肌细胞和外膜细胞凋亡的变化。提取血管组织RNA,采用反转录-多聚酶链反应测定一氧化氮合成酶基因表达。结果表明,血管损伤后8 h可见中膜平滑肌细胞凋亡增加,24 h达高峰,3天和5天仍维持在较高水平,外膜细胞凋亡无明显改变。而诱导型一氧化氮合成酶基因表达亦于8 h明显增加,在24 h达最高,与细胞凋亡存在平行关系。提示中膜平滑肌细胞凋亡是球囊导管损伤血管的一个早期反应,诱导型一氧化氮合成酶可能参与了此过程。

关键词 血管损伤; 平滑肌细胞; 细胞凋亡; 一氧化氮合成酶; 基因表达

细胞凋亡(apoptosis)是机体对抗细胞异常增殖的机制之一。近年来的研究表明动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和血管成形术后再狭窄(restenosis)血管部位的平滑肌细胞出现较多的凋亡^[1~3],其病理生理意义和调控机制尚不完全清楚。本文通过观察球囊导管损伤内皮细胞(endothelial cell, EC)后早期血管平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)凋亡和血管中诱导型一氧化氮合成酶(inducible ni-

①广州医学院神经科学研究所

tric oxide synthetase, iNOS) 基因表达, 探讨二者之间的可能关系。

1 材料与方法

1.1 动物模型和取材

采用体重 2.5~3.0 kg 的雄性新西兰纯种兔(购自中山医科大学实验动物中心)20 只, 以美国 Cordis 公司产球囊导管(球囊直径 3.0 mm, 长 2.0 cm)经右侧股动脉进入, 达横膈水平, 在球囊内充以生理盐水使球囊扩张, 回拉至髂总动脉处, 反复回拉 5 次充分损伤血管内皮。术后分别于 0、8、24 h 和第 3 天、第 5 天各处死 4 只兔。各组于左肾动脉分支上 1 cm 处取下长约 0.5 cm 腹主动脉环置中性福尔马林中固定, 作石蜡切片; 余腹主动脉全段取下后纵行切开, 生理盐水冲洗, 分离去除血管外膜后放入液氮中保存, 用于 RNA 提取。

1.2 细胞凋亡分析^[3]

采用脱氧核苷酸转移介导的酶缺口末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL), 将 Digoxigenin-11-dUTP 原位标记断裂 DNA 的 3-OH 端, 再用碱性磷酸酶联接的 Dig 抗体作用后, 经 NBT/BCIP 显色可使凋亡细胞着色。简要步骤为石蜡切片经二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化, 蛋白酶 K (20 mg/L) 处理, 50 μ l TdT 在 37℃ 下作用 1 h, 中止和冲洗后用 Anti-Dig-Ap 作用 30 min, 再以 NBT/BCTP 显色 1~2 h, 中性红复染。凋亡试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司生产。

在光学显微镜下对凋亡细胞 (TUNEL 阳性细胞) 进行计数, 分别计数血管中膜和外膜细胞凋亡指数

(apoptotic index)。每张切片计数 200 个细胞以上, 每个标本观察 4 张切片, 取平均值。细胞凋亡指数 = $\frac{\text{凋亡细胞数}}{\text{计数细胞总数}} \times 100\%$ 。

1.3 组织 RNA 提取

从液氮中取出标本, 按一步法^[4]提取组织 RNA。测 260/280 nm 光密度值在 1.8~2.0 之间。

1.4 反转录

用 Promega 公司的反转录药盒。取 2 μ g 总 RNA 在 65℃ 下变性 3 min, 依次加入 10 \times 缓冲液 2 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ l, 10 mmol/L dNTP 混合液 2 μ l, 引物 1 μ l, 2.5 mu/L RNA 酶抑制剂 1 μ l, 15 mu/L 反转录酶 0.6 μ l。总反应体积 20 μ l, 在 42℃ 保温 90 min。加入 50 μ l TE 液 (10 mmol/L Tris · HCl, 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 于 70℃ 加热 10 min 终止反应。

1.5 多聚酶链反应

本实验所用基因引物序列见表 1 (Table 1)^[5]。多聚酶链反应总体积为 50 μ l。含 0.5 μ Ci (α -³²P-dCTP (北京福瑞公司)、2.5 u Taq DNA 聚合酶, 200 μ mol/L dNTP 和 50 pmol/L 引物。基因扩增条件均为 92℃ 1 min → 55℃ 1 min → 72℃ 1 min, 共 22 个循环。首次循环先在 94℃ 变性 10 min, 最后一次循环在 72℃ 延伸 10 min。反应完毕取产物 1% 琼脂糖凝胶电泳 (1 \times TAE), 在紫外光下切下 PCR 特异性条带, 用液体闪烁计数器测定放射性活度。

1.6 统计学分析

所有数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 差异的显著性比较采用方差分析 *t* 检验。

Table 1. Sequences of oligonucleotides used as primers for RT-PCR.

Templates	Primers	Sequences	Products (bp)
iNOS	sense	5'-TCACGCTTGGGTCTTGTTCACT-3'	450
	antisense	5'-TTGTCTCTGGGTCTCTGGTCA-3'	
β -actin	sense	5'-CACCCGCCACCAAGTTCGCCA-3'	554
	antisense	5'-CAGGTCCCGGCCAGCCAGGT-3'	

2 结果

2.1 血管内皮损伤后血管壁细胞凋亡的变化

在光学显微镜下观察到球囊导管损伤血管

后内皮细胞完全剥脱, 可见弹性纤维暴露, 血管结构由中膜与外膜组成。从附图 (Figure) 可见镜下凋亡细胞的细胞核呈深蓝色, 均匀致密, 散

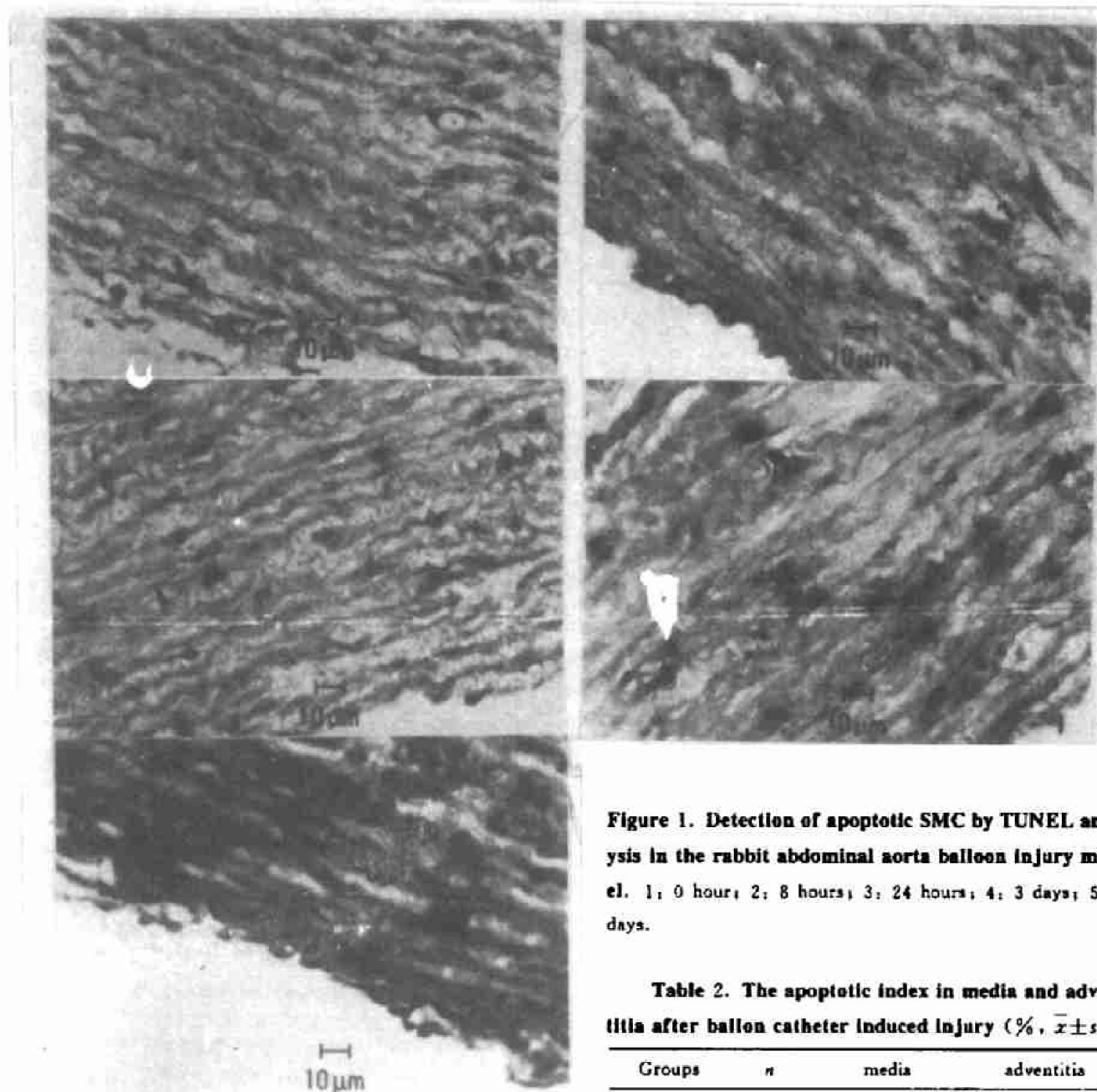


Figure 1. Detection of apoptotic SMC by TUNEL analysis in the rabbit abdominal aorta balloon injury model. 1: 0 hour; 2: 8 hours; 3: 24 hours; 4: 3 days; 5: 5 days.

Table 2. The apoptotic index in media and adventitia after balloon catheter induced injury (% , $\bar{x} \pm s$).

Groups	n	media	adventitia
0 hour	4	6 \pm 3	5 \pm 2
8 hours	4	15 \pm 6 ^a	9 \pm 5
24 hours	4	50 \pm 18 ^{ab}	10 \pm 6
3 days	4	32 \pm 12 ^a	12 \pm 8
5 days	4	20 \pm 9 ^{ac}	9 \pm 6

a: $P < 0.01$, compared with 0 hour; b: $P < 0.01$, compared with 8 hours; c: $P < 0.05$, compared with 24 hours.

在分布。而表2(Table 2)结果表明在损伤后0 h 血管中膜 SMC 凋亡指数为 6% \pm 3%，外膜细胞凋亡指数为 5% \pm 2%，无显著性差异($P > 0.05$)。而在 8 h 时中膜 SMC 凋亡指数显著增加达 15% \pm 6%；在 24 h 达高峰，为 50% \pm 18%；3 天和 5 天时分别为 32% \pm 12%和 20% \pm 9%。外膜凋亡指数在各时间点无明显差异。

2.2 血管内皮损伤后血管壁细胞一氧化氮合成酶基因的表达

由于目前尚无兔血管平滑肌细胞 iNOS 克隆序列，而 iNOS 基因^[6]在种属间存在一定的保守性，某些部位同源性可达 80%以上，故采用人 iNOS 基因引物进行扩增，结果能扩增出

特异性的 iNOS 基因片断(450 bp)。从表 3 (Table 3)可见球囊导管损伤内皮后 0 h 血管中 iNOS 的 mRNA 表达水平极低,在 8 h 后明显增加,24 小时达高峰,3 天和 5 天后仍维持在较高水平,而 β -actin 的 mRNA 表达水平各时间点无显著性变化。

Table 3. The expression of inducible nitric oxide synthetase (iNOS) mRNA in rabbit abdominal aorta after balloon catheter induced injury ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	iNOS (cpm)	β -actin (cpm)
0 hour	4	60 \pm 49	1 630 \pm 158
8 hours	4	925 \pm 108 ^a	1 518 \pm 144
24 hours	4	1 520 \pm 212 ^{ab}	1 703 \pm 169
3 days	4	1 380 \pm 163 ^a	1 690 \pm 201
5 days	4	1 118 \pm 147 ^{ac}	1 580 \pm 180

a: $P < 0.01$, compared with 0 hour; b: $P < 0.01$, compared with 8 hours; c: $P < 0.05$, compared with 24 hours.

3 讨论

细胞凋亡又称为程序性细胞死亡(programmed cell death),是细胞受基因程序控制的非坏死性死亡。近年来多个实验研究报道了动脉粥样硬化斑块和血管成形术后再狭窄血管中 SMC 存在着凋亡现象,认为 SMC 凋亡在 As 形成、斑块稳定性以及血管的重构(remodeling)过程中发挥重要作用^[2,3]。在球囊损伤血管内皮的动物模型上,Bochaton-Piallat 等^[7]发现大鼠主动脉内皮细胞剥脱后 7~30 天血管新生内膜 SMC 出现凋亡,而中膜 SMC 凋亡甚少,认为内膜 SMC 凋亡在影响内膜增厚中有重要作用,然而对球囊损伤早期血管 SMC 凋亡情况未作观察。

我们采用 TUNEL 方法观察了球囊导管损伤兔腹主动脉后早期(0 h~5 天)血管中膜和外膜细胞凋亡的变化,结果显示损伤后 8 h 即可见中膜 SMC 凋亡增加,24 h 达 50%左右,3 天和 5 天时仍维持在较高水平;而血管外膜细胞无显著性的凋亡改变,提示中膜 SMC 凋

亡是球囊损伤后血管的早期反应之一。

与细胞凋亡有关的基因很多,已知的基因包括原癌基因 *c-myc* 和 *bcl-2*,抗癌基因 P53、ICE、Fas 和 NOS 等^[8]。对于 SMC 凋亡的调控机制目前了解不多。最近 Fukuo 等^[9]在培养的 SMC 上观察到一氧化氮(nitric oxide, NO)在体外能诱导 Fas 的表达而引起 SMC 凋亡。我们采用 RT-PCR 方法检测了血管球囊损伤后早期血管中 iNOS 基因的表达,结果表明损伤 0 h 血管中 iNOS 几乎无表达,而在 8 h 时明显增加,24 h 达高峰,其表达水平与 SMC 凋亡指数相平行。因而提示 iNOS 参与球囊损伤诱导血管中膜 SMC 早期凋亡调控机制。

参考文献

- Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1995, 95: 2 266~274.
- Isner JM, Kearneyr, M, Bortman S, et al. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*. 1995, 91: 2 703~711.
- Geng JY, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma; colocalization with interleukin-1 β converting enzyme. *Am J Pathol*, 1995, 147: 251~266.
- Chomoczyski P. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanatephenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162: 156~158.
- Reiling N, Ulmer AJ, Duchrow M, et al. Nitric oxide synthetase; mRNA expression of different isoforms in human monocytes/macrophages. *Eur J Immunol*, 1994, 24: 1 941~944.
- 钟慈声, 孙安阳(主编). 一氧化氮的生物学. 上海: 上海医科大学出版社, 1997; 27~39.
- Bochata PM, Gabbiani F, Fedard M, et al. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol*, 1995, 146: 1 059~065.
- Schwartz SM, Bennett MR. Death by any other name. *Am J Pathol*. 1995, 147: 229~234.
- Fukuo K, Hata S, Sulhara T, et al. Nitric Oxide induces upregulation of Fas and apoptosis vascular smooth muscle. *Hypertension*. 1996, 27: 823~826.

(1997-06-14 收到)