

钠—氢交换在一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡中的作用

田雪梅 刘健康^① 李 进^②

(中山大学化学系, 广州 510275)

主题词 钠—氢交换器; 氢离子浓度; 细胞内液; 一氧化氮; 肌,平滑,血管; 凋亡; 大鼠

摘要 细胞内酸碱度的大小是影响细胞凋亡的重要因素之一,为探讨其在一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡过程中的作用,本文以亚硝酸乙酰青霉胺作为一氧化氮供体,通过粘附式细胞仪 ACAS570检测亚硝酸乙酰青霉胺作用时血管平滑肌细胞中酸碱度的动态变化,并借助钠—氢离子泵阻断剂氨氯吡啶观察钠—氢交换在亚硝酸乙酰青霉胺诱导血管平滑肌细胞凋亡中的作用。结果发现,一氧化氮能使血管平滑肌细胞内酸碱度降低,钠—氢通道阻断剂可以抑制一氧化氮引起的细胞内酸碱度的降低,且能减少一氧化氮作用下的细胞凋亡。结果提示,钠—氢通道变化所引起的细胞内酸碱度改变参与一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡。

Effect of Sodium-Hydrogen Antiporter on Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by SNAP

TIAN Xue-Mei, LIU Jian-Kang and LI Jin

(Department of Chemistry, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

MeSH Sodium-Hydrogen Antiporter; Hydrogen-Ion Concentration; Intracellular Fluid; Nitric Oxide; Muscle, Smooth, Vascular; Apoptosis; Rats

ABSTRACT **Aim** To investigate the possible effect of sodium hydrogen antiporter on apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide. **Methods** Rats' vascular smooth muscle cells were used for experiment at passage 5 to 8. After reaching confluence, cells were subcultured on glass cover slides for observing under microscope, and cells were also subcultured on special Petri culture plate to examine intracellular pH through ACAS570. S-Nitroso-N-acetylpenicillamine was used as nitric oxide donor in cell treatment. **Results** Intracellular pH in vascular smooth muscle cells was decreased by S-Nitroso-N-acetylpenicillamine, but this effect was inhibited by amiloride, an blocker of sodium hydrogen antiporter and amiloride could also inhibit the apoptosis in vascular smooth muscle cells induced by S-Nitroso-N-acetylpenicillamine. **Conclusion** sodium hydrogen antiporter may take part in the apoptosis in vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide donor S-Nitroso-N-acetylpenicillamine

一氧化氮(nitric oxide, NO)能增加钠—氢交换,激活 Na^+/K^+ -ATP酶。^[1]细胞内酸碱度的改变也参与调节细胞凋亡。本文对NO调节钠—氢交换的作用与NO诱导血管平滑肌细胞凋亡的关系进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

贴块法培养获得SD大鼠的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC);以亚硝酸乙酰青霉胺(S-Nitroso-N-acetylpenicillamine, SNAP)

作为NO供体,氨氯吡啶(amiloride)作为钠—氢离子泵的阻断剂(Sigma公司);用snafl-calcein-AM荧光探针标记(Molecular Probe)显示细胞内酸碱度的变化;TdT介导的dUTP粘性末端标记(TdT mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)试剂盒(Boehringer Mannheim)检测细胞凋亡;以粘附式细胞仪ACAS570(美国)检测细胞内酸碱度的变化。

1.2 血管平滑肌细胞内酸碱度变化的动态检测

将5~8代VSMC接种于特制的petri培养皿中,加入含20%小牛血清的DMEM完全培养基。待贴壁生长24h后,换为条件培养基(含0.5%血清的DMEM),继续培养24~48h,使细胞达静止状态。然后再去掉培养液,用无菌D-Hank's液清洗,加入10

^①广州医学院组织胚胎学教研室,广州 510182

^②第一军医大学组织胚胎学教研室,广州 510515

$\mu\text{mol/L}$ snaf1-calcein-AM 染液 $40\ \mu\text{L}$, 避光置 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 $30\ \text{min}$ 后, 用 Hepes 平衡盐溶液清洗, 再加入 $1.0\ \text{mL}$ Hepes 平衡盐溶液, 最后用粘附式细胞仪 ACAS570 进行检测。

将细胞分为两组: 第一组为氨氯吡啶组, 检测前 $10\sim 20\ \text{min}$ 加入氨氯吡啶, 终浓度为 $0.3\ \text{mmol/L}$ ^[2]; 第二组为对照组, 以 Hepes 平衡盐溶液代替染液, 操作过程与氨氯吡啶组相同。每组 3 个培养皿, 将各培养皿置于 ACAS 570 载物台上, 以 $488\ \text{nm}$ 紫外光激发细胞发出荧光, 并选定适宜的参数及视野, 用 ACAS 570 动态程序进行扫描成像, 每隔 $20\ \text{s}$ 扫描一次, 测定基础荧光强度后, 加入 SNAP, 终浓度为 $1\ \text{mmol/L}$ ^[3], 作动态观测, 共扫描 $10\sim 15\ \text{min}$ 。通过 ACAS570 计算机图像分析软件获得荧光强度—时间曲线。

1.3 钠—氢交换在血管平滑肌细胞凋亡中的作用

将细胞接种于盖玻片上, 贴壁生长 $24\ \text{h}$, 再在条件培养液中继续培养 $24\sim 48\ \text{h}$, 然后分为四组: ①正常对照组; ②SNAP 组, 加 SNAP, 终浓度 $0.5\ \text{mmol/L}$ ^[3]; ③SNAP+氨氯吡啶组, 加 $0.5\ \text{mmol/L}$ SNAP 和 amilorid, 终浓度为 $0.3\ \text{mmol/L}$; ④氨氯吡啶组: 加氨氯吡啶。各组细胞继续培养 $8\sim 10\ \text{h}$ 后, 取出细胞爬片, 用 3% 多聚甲醛固定。用 TUNEL 试剂盒鉴定凋亡细胞, 用 HE 染色进行细胞计数。

2 结果

2.1 细胞内酸碱度的动态变化

测定基础荧光强度(基值)后, 在对照组细胞中加入 $1.0\ \text{mmol/L}$ SNAP, VSMC 内酸碱度与基值比较下降 25.8% (图1, Figure 1); 当氨氯吡啶存在时, 再加 SNAP, 则 VSMC 内酸碱度与基值比较, 却升高了 26.7% (图2, Figure 2)。说明氨氯吡啶可拮抗 SNAP 降低 VSMC 内酸碱度的作用。

2.2 钠—氢交换在血管平滑肌细胞凋亡中的作用

从图3(Figure 3)可见, SNAP 能诱发 VSMC 凋亡; 加入氨氯吡啶后, SNAP 诱导的凋亡细胞数减少, 作用效果接近对照组。而当单独使用氨氯吡啶处理, 却不引起 VSMC 凋亡。

3 讨论

各种刺激均能引起钠—氢交换器活化, 随后细胞内酸碱度的改变, 则可以激活多种细胞的功能^[5]。此外, 细胞内酸碱度改变也参与了调节细胞凋亡的过程。细胞胞质的酸化能启动细胞凋亡^[6,7], 细胞质

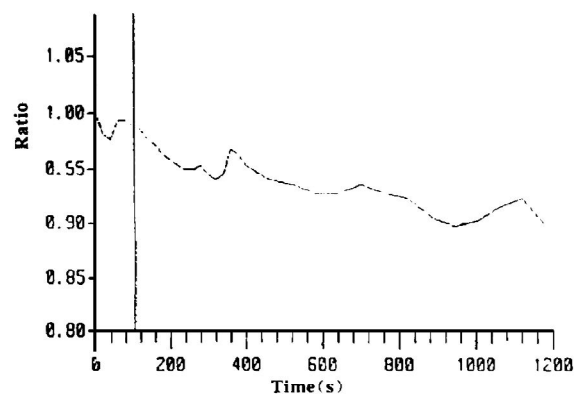


图1. 亚硝酸乙酰青霉胺作用下的血管平滑肌细胞中酸碱度的变化

Figure 1. Change of PH in VSMC induced by SNAP.

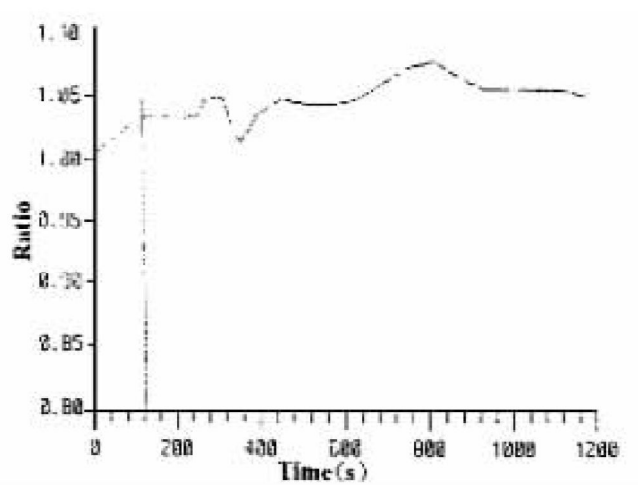


图2. 氨氯吡啶存在时亚硝酸乙酰青霉胺作用下的血管平滑肌细胞内酸碱度的变化。

Figure 2. Change of PH in VSMC induced by SNAP at the present of amiloride.

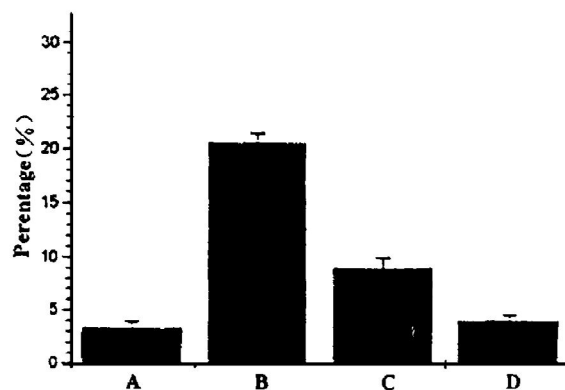


图3. 氨氯吡啶对亚硝酸乙酰青霉胺诱导血管平滑肌细胞凋亡的影响

Figure3. Percentage of apoptotic VSMC induced by SNAP at the present of amiloride. A: control group; B: SNAP treated group; C: SNAP+amiloride treated group; D: amiloride treated group.

的碱化也与细胞凋亡有关^[8,9], 这可能与细胞类型及刺激物的不同有关。

细胞内酸碱度的调节有三种途径:钠—氢离子泵、 $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ 共转移和 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换。 NO 能增加钠—氢交换,使 $\text{Na}^+-\text{H}^+-\text{ATP}$ 酶激活^[10]、细胞外钙与细胞内 H^+ 的交换增加,最终导致细胞质酸化;相反,钠—氢离子泵阻断剂能使细胞内酸碱度下调。本文发现,SNAP 能使 VSMC 细胞质酸化,细胞内酸碱度降低。当氨氯吡啶存在时钠—氢离子泵被阻断,细胞内酸碱度升高。细胞培养中,amilorde 能阻止 SNAP 诱导 VSMC 凋亡。SNAP 在水溶液中能释放出 NO ,并且也有生成氧自由基的可能,但实验已证明在这种孵育状态下,SNAP 几乎不产生氧自由基^[3]。因此,SNAP 的作用可视为它所释放的 NO 的作用,而不受氧自由基的影响。并且,较高浓度的 SNAP 也不会导致细胞损伤^[3]。实验结果提示,增加钠—氢交换使细胞酸化是 NO 诱导细胞凋亡的方式之一。而细胞内酸碱度对细胞凋亡的调节较为特别,它直接影响核酸内切酶的活性而调节凋亡的发生。

参考文献

- Gupta S, Mcarthur C, Crady C, et al. Stimulation of vascular $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol*, 1994, **266**: H2146—151
- Nishio E, Fukushima K, Shiozaki M, et al. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP independent mechanism. *Biol Biophys Res Com*, 1996, **221**: 163—168
- Ignarro LJ, Lippton H, Edward JC, et al. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: Evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981, **218**: 739—749
- Fukuo K, Hata S, Suhara T, et al. Nitric oxide induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension*, 1996, **27**: 823—826
- Mc Conkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, et al. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocyte through an elevation of cytotoxic Ca^{2+} concentration. *Arch Biochem Biophys*, 1989, **269**: 365—370
- Gottlieb RA, Nordberg J, Skowronski E, et al. Apoptosis induced in Jurkat cells by several agents is preceded by intercellular acidification. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1996, **93**(2): 654—658
- Rebollo A, Gomcz J, Aragon AM, et al. Apoptosis induced by IL-2 withdrawal is associated with an intracellular acidification. *Exp Cell Res*, 1995, **218**: 581—585
- Tsao N, Lei HY. Activation of the Na^+/H^+ antiporter, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter, or $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger in spontaneous thymocyte apoptosis. *J Immunol*, 1996, **157**: 1107—1116
- Zhu WH, Loh TT. Effects of Na^+/H^+ antiport and intracellular pH in the regulation of HL-60 cell apoptosis. *Biochimica Biophysica Acta*, 1995, **1269**: 122—128
- Mc Conkey DJ, Nicotera P, Hartzell P, et al. Glucocorticoids activate a suicide process in thymocyte through an elevation of cytotoxic Ca^{2+} concentration. *Arch Biochem Biophys*, 1989, **269**: 365—370

(此文1998—09—04 收到, 1999—01—25修回)

(此文编辑 文玉珊)