

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-01-0010-03

粘着斑激酶在一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡中的作用

杨长春, 温进坤, 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 肌, 平滑, 血管; 粘着斑激酶; 一氧化氮; 细胞凋亡

[摘要] 为研究一氧化氮对血管平滑肌细胞凋亡的影响及粘着斑激酶在一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡中的作用,应用脂多糖诱导血管平滑肌细胞合成内源性一氧化氮或加入可释放外源性一氧化氮的硝普钠,进行流式细胞术、DNA凝胶电泳及 Northern blot 和 Western blot 分析。结果发现,无论是血管平滑肌细胞合成和释放的内源性一氧化氮还是体外补充的外源性一氧化氮均可显著诱导血管平滑肌细胞凋亡,且其诱导血管平滑肌细胞凋亡的强度与培养基中的 NO₂ 含量呈正相关;证实在一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡的同时,伴随 Bcl-2 和粘着斑激酶基因表达活性的明显下降。提示粘着斑激酶可能参与一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡的信号转导过程,一氧化氮诱导血管平滑肌细胞凋亡可能与抑制 Bcl-2 和粘着斑激酶基因表达有关。

[中图分类号] R322.1

[文献标识码] A

Role of Focal Adhesion Kinase in Apoptosis of Rat Vascular Smooth Muscle Cells Induced by Nitric Oxide

YANG Chang-Chun, WEN Jir-Kun, and HAN Mei

(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

[MeSH] Muscle, Smooth, Vascular; Focal Adhesion Kinase; Nitric Oxide; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of nitric oxide (NO) on the apoptosis of cultured rat vascular smooth muscle cells (VSMC) and the role of focal adhesion kinase (FAK) in VSMC apoptosis induced by NO. **Methods** Flow cytometry, DNA gel electrophoresis, Northern blot and Western blot were used to determine the effect of different level of NO on VSMC apoptosis and to explore the relationship between VSMC apoptosis and expression activity of Bcl-2 and FAK genes. **Results** The results showed that both endogenous NO synthesized by VSMC and exogenous NO released by sodium nitroprusside (SNP) could significantly induce apoptosis of cultured rat VSMC and the apoptosis rate of VSMC was correlated with NO content in the medium.

It is demonstrated that the expression activity of Bcl-2 and FAK genes markedly decreased during apoptosis development of VSMC induced by NO. **Conclusions** It is suggested that FAK may be involved in signal conduction of VSMC apoptosis induced by NO, and VSMC apoptosis was related to down regulation of Bcl-2 and FAK expression.

粘着斑激酶 (focal adhesion kinase, FAK) 是一种非受体型酪氨酸激酶,广泛分布于血管细胞、血细胞、成纤维细胞和表皮细胞^[1]。近年,人们对 FAK 在血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 粘附、迁移、增殖和分化中的作用进行了一些研究^[2],但对其是否参与 VSMC 凋亡的调节过程尚未见报道,本文对此进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

SD 大鼠由河北省实验动物中心提供, M199 培养

基为 GIBCO 公司产品,诱导型一氧化氮合酶 (induced nitric oxide synthase) cDNA 探针为本实验室保存,核酸随机引物标记试剂盒由 Promega 公司提供, α -³²P-dCTP 为北京亚辉公司产品,鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体、兔抗鼠 FAK 多克隆抗体、羊抗兔 IgG-HRP 及 ECL 试剂盒购自中山生物技术公司,脂多糖和 SNP 为 Sigma 公司产品,其它试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 平滑肌细胞的培养及亚硝酸盐测定

取 5 周龄 SD 大鼠胸腹主动脉,按贴块法分离、培养 VSMC, 0.25% 胰蛋白酶消化传代,实验选用第 4~8 代细胞。当传代培养的 VSMC 生长达 80% 融合时,弃去培养基,细胞用 PBS 洗 3 次,换成含 6% 小牛血清的 M199 培养基,分别加入脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 至终浓度为 30 mg/L 或加入硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP) 至终浓度为 10 mmol/L,继续培养 10、20 和 30 h,分别于各时间点收集培养基和 VSMC 后用于下述实验。亚硝酸盐测定按文献[3]方法进

[收稿日期] 2001-07-06 [修回日期] 2001-12-30

[基金项目] 国家自然科学基金(39970274)和河北省自然科学基金(301358)资助。

[作者简介] 杨长春,女,1963年出生,博士研究生。温进坤,男,1954年出生,教授,博士研究生导师,生物化学与分子生物学专业,从事心血管分子生物学研究,为本文通讯作者。

行。NO₂⁻ 浓度用 μmol/L 表示。

1.3 Northern blot 分析和 DNA 凝胶电泳

用异硫氰酸胍一步法^[4], 分别从对照组及用脂多糖或 SNP 处理不同时间的 VSMC 中提取总 RNA, 取 RNA 30 μg, 经 1% 琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳分离后转移至尼龙膜上, 80 °C 固定 2 h, 在甲酰胺杂交体系中与 α³²P-dCTP 标记的 iNOS cDNA 探针进行杂交, 按常规方法洗膜后, 于 -70 °C 放射自显影 72 h。DNA 抽提和断裂的凝胶电泳检测按文献[5]介绍的方法进行。

1.4 流式细胞术检测

按文献[6]方法收集用脂多糖或 SNP 处理不同时间的 VSMC, 固定于 70% 乙醇中, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡率及 Bcl-2 表达情况。

1.5 Western Blot 分析

用 RIPA 细胞裂解液(含 Tris-HCl 50 mmol/L pH 7.5, NaCl 150 mmol/L, EDTA 1 mmol/L 和 0.5% 脱氧胆酸钠)在冰浴中裂解被脂多糖或 SNP 处理不同时间的 VSMC, 离心取上清, 用 Lowry 法进行蛋白定量, 各取 100 μg 经 8% SDS-PAGE 后转移至硝酸纤维素膜上, 4 °C 下用 5% 脱脂奶粉和 1% 牛血清白蛋白封闭过夜, 依次与 FAK 抗体及羊抗兔 IgG-HRP 室温反应 2 h, 用 ECL 试剂盒对反应产物进行检测。

1.6 密度扫描分析

采用美国 Kodak 公司 ID 数码成像分析系统软件对 Northern 和 Western 印迹区带进行定量分析, 灰度值用积分光密度值表示。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 软件, 采用单因素方差分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 脂多糖和硝普钠对血管平滑肌细胞诱导型一氧化氮合酶基因表达及其合成的影响

从表 1(Table 1) 可见, 加入脂多糖或 SNP 刺激 10 h NO₂⁻ 含量分别比对照组增加 1.4 或 3.9 倍 ($P < 0.05$, $P < 0.001$); 加入脂多糖或 SNP 30 h 后, 其 NO₂⁻ 含量分别比对照组增加 2.09 倍和 5 倍 ($P < 0.001$)。

图 1(Figure 1) 显示, 未经脂多糖处理的 VSMC iNOS 基因表达活性低, 30 mg/L 脂多糖作用 VSMC 10 h, iNOS mRNA 杂交信号明显增强; 作用 30 h, iNOS 表达活性达峰值, 杂交信号强度比对照细胞增加 6 倍。脂多糖对 VSMC iNOS 基因表达无明显影响。

表 1. 脂多糖和硝普钠对血管平滑肌细胞一氧化氮合成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, μmol/L)。

Table 1. Influence of LPS and SNP on the NO content ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, μmol/L)。

Groups	0 h	10 h	20 h	30 h
LPS	5.76 ± 0.65	8.12 ± 0.89 ^a	10.20 ± 1.02 ^b	12.04 ± 1.16 ^b
SNP	5.85 ± 0.73	22.48 ± 1.19 ^b	26.60 ± 2.62 ^b	29.98 ± 2.47 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.001$, compared with 0 h.

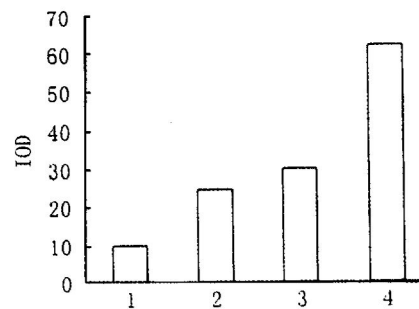


图 1. 脂多糖对血管平滑肌细胞诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响。

Figure 1. Northern blot analysis for iNOS mRNA in VSMC treated by LPS. 1: Control; 2: LPS 10 h; 3: LPS 20 h; 4: LPS 30 h.

2.2 外源性一氧化氮和内源性一氧化氮对血管平滑肌细胞凋亡的影响

NO 可诱导 VSMC 凋亡, 随着脂多糖和 SNP 作用时间延长, 细胞凋亡率逐渐升高, 30 mg/L 脂多糖作用 10、20 和 30 h 时, 其凋亡率分别为 5.2%、6.4% 和 7.8%, 而对照组凋亡率仅为 2.4%; 10 mmol/L SNP 作用 10、20 和 30 h, 其凋亡率分别为 6.5%、9.3% 和 15.7%, 差异均有显著性 ($P < 0.05$)。图 2(Figure 2) 显示凝胶电泳谱型呈凋亡特征性梯状区带。



图 2. DNA 凝胶电泳。

Figure 2. DNA gel electrophoresis. 1: LPS 30 h; 2: SNP 30 h; 3: Control.

2.3 一氧化氮致血管平滑肌细胞凋亡与粘着斑激酶和 Bcl-2 表达之间的关系

如图 3 (Figure 3) 所示, 未经 LPS 或 SNP 处理的 VSMC FAK 含量最高, 随着作用时间延长 FAK 含量逐渐降低, 在被脂多糖 (30 mg/L) 和 SNP (10 mmol/L) 处理 30 h 后, 其 FAK 含量分别比对照细胞降低了 50% 和 87%, 比处理 10 h 时分别降低了 33% 和 80%。

图 4 (Figure 4) 显示, VSMC 被 LPS 或 SNP 处理 10 h 后, Bcl-2 的免疫荧光指数开始下降, 至 30 h 达到最低, 分别较对照细胞降低了 25% 和 39% ($P < 0.05$)。

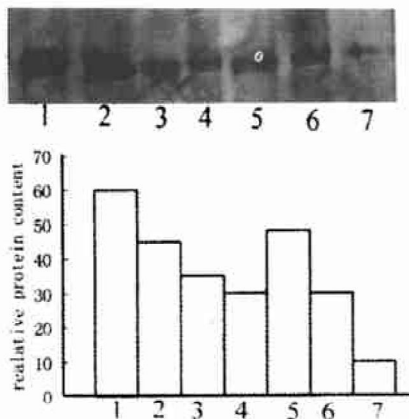


图 3. 脂多糖或硝普钠对粘着斑激酶表达影响的 Western blot 分析结果。

Figure 3. Western blot analysis for FAK in VSMC treated by LPS and SNP. A: Western blot analysis; B: Densitometric scanning.

1: Control; 2: LPS 10 h; 3: LPS 20 h; 4: LPS 30 h; 5: SNP 10 h; 6: SNP 20 h; 7: SNP 30 h.

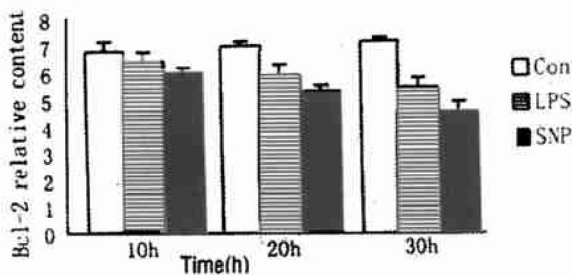


图 4. 脂多糖或硝普钠对 Bcl-2 表达的影响。

Figure 4. Influence of LPS and SNP on Bcl-2 expression.

3 讨论

近年发现, 血管内皮和 VSMC 合成和释放的内源性及体外补充的外源性一氧化氮均可通过抑制 VSMC 增殖及向内膜下迁移而减轻高血压及血管成形术后的血管重构^[7]。细胞凋亡是调节细胞群体数量的一种重要方式, 一氧化氮抑制血管重构的作用是否与诱导过度增殖的 VSMC 凋亡有关目前尚没有

明确的定论^[8]。本文证实, 用 LPS 处理 VSMC 10 h, iNOS 基因表达活性开始升高, 在 30 h 时, iNOS 基因表达活性比对照组细胞增加 6 倍, 伴随着 iNOS 基因表达活性的增强, 细胞培养基中的 NO₂ 含量相应增加; SNP 虽不影响 iNOS 基因表达, 但向培养基中加入 10 mmol/L 的 SNP 后, 其释放出的 NO₂ 含量远远高于 30 mg/L 的 LPS 诱导合成的 NO₂ 含量。流式细胞分析结果显示, LPS 或 SNP 诱导 VSMC 凋亡的强度与其诱导产生或释放的 NO₂ 含量呈正相关, 提示两者均是通过一氧化氮行使其对细胞凋亡的诱导作用, LPS 诱导细胞凋亡与 iNOS 基因表达活性升高和内源性一氧化氮生成增多有关, 而 SNP 是通过直接释放外源性一氧化氮来诱导细胞凋亡^[9]。已经证明, Bcl-2 是细胞凋亡抑制基因^[10], FAK 位于细胞内多条信号转导途径的交汇点, 参与整合素介导的细胞粘附、迁移和增殖的调节过程。本文发现, 在一氧化氮诱导 VSMC 凋亡的同时伴有 Bcl-2 和 FAK 基因表达的下调, 这不仅说明一氧化氮诱导 VSMC 凋亡与下调 Bcl-2 和 FAK 基因表达有关, 而且提示 FAK 可能参与一氧化氮诱导 VSMC 凋亡的信号传导过程, 为一氧化氮诱导 VSMC 凋亡作用机制的复杂网络中增添了新的内容。关于 Bcl-2 与 FAK 基因表达下调之间是否存在内在联系尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Guan JL, Chen HC. Signal transduction in cell-matrix interactions. *Int Rev Cytol*, 1996, **168** (1): 81-121
- [2] Prescott MF, Webb RL, Reidy MA. Angiotensin converting enzyme inhibitor versus antagonist II, AT1 receptor antagonist. Effects on smooth muscle cell migration and proliferation after balloon catheter injury. *Am J Pathol*, 1991, **139**: 1291-296
- [3] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, Nitrite, and [15N] Nitrate in Biological Fluids. *Anal Biochem*, 1982, **126**: 131-138
- [4] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156-159
- [5] Facchinetti A, Tassarollo M, Mazzocchi R, et al. An improved method for the detection of DNA fragmentation. *J Immunol Methods*, 1991, **136**: 125-131
- [6] 左连富主编. 流式细胞术样品制备技术. 北京: 华夏出版社, 1991; 14-19
- [7] Rudic RD, Shesely EG, Maeda N, et al. Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest*, 1998, **101** (4): 731-736
- [8] Holm AM, Andersen CB, Haunso S, et al. Effects of L-arginine on vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis after balloon injury. *Scand Cardiovasc J*, 2000, **34** (1): 28-32
- [9] Zhao ZH, Francis CE, Welch G, et al. Reduced glutathione prevents nitric oxide-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **135** (2): 143-152
- [10] 柴锡庆, 温进坤, 韩梅, 等. 动脉粥样硬化斑块中平滑肌细胞凋亡及凋亡相关基因的表达. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5**(4): 238-286

(此文编辑 朱雯霞)