

[文章编号] 1007-3949(2005)13-04-0425-04

• 实验研究 •

过氧化氢酶过度表达对血管平滑肌细胞凋亡的影响

孙跃玲¹, 涂远超², 王家宁³, 黄永章³, 黄从新⁴

(鄖阳医学院 1. 附属太和医院心血管内科, 3. 附属人民医院临床医学研究所, 湖北省十堰市 442000;

2. 湖北省新华医院, 湖北省武汉市 430015; 4. 武汉大学人民医院, 湖北省武汉市 430060)

[关键词] 病理学与病理生理学; 过氧化氢酶过度表达促进血管平滑肌细胞凋亡; 流式细胞术; 过氧化氢酶; 基因; 血管平滑肌细胞; 凋亡

[摘要] 目的 探讨腺病毒载体介导的过氧化氢酶基因转染对体外培养的人血管平滑肌细胞凋亡的影响。方法 用含过氧化氢酶基因的重组腺病毒转染人血管平滑肌细胞, 采用 Western blot 方法检测血管平滑肌细胞过氧化氢酶的表达, 应用流式细胞术、TUNEL 法等方法检测血管平滑肌细胞的凋亡。结果 含过氧化氢酶基因的重组腺病毒转染后血管平滑肌细胞过氧化氢酶表达明显增多; 流式细胞术显示含过氧化氢酶基因的重组腺病毒组与对照组比较凋亡率明显增加 ($P < 0.01$)。经 TUNEL 分析显示, 含过氧化氢酶基因的重组腺病毒组凋亡细胞明显多于对照组, 两者之间有显著性差异 ($P < 0.001$)。结论 腺病毒载体介导的过氧化氢酶基因转染导致过氧化氢酶过度表达, 促进人血管平滑肌细胞的凋亡, 这可能是防治经皮腔内冠状动脉血管成形术后再狭窄的一种新方法。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Overexpression of Catalase on Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells

SUN Yue-Ling¹, TU Yuan-Chao², WANG Jia-Ning³, HUANG Yong-Zhang³, and HUANG Cong-Xin⁴

(1. Department of Cardiology, Taiher Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000; 2. Hubei Province Xinhua Hospital, Wuhan 430015; 3. Institute of Clinical Medicine, Renmin Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442000; 4. Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[KEY WORDS] Catalase; Gene; Vascular smooth muscle cells; Apoptosis; Recombinant Adenovirus; Overexpression

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of infection with adenoviral vector containing cDNA for human catalase on apoptosis of cultured human vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Human VSMC were infected with catalase-contained recombinant adenovirus (AdCat) in vitro. Catalase protein was detected by Western blot analysis. The VSMC apoptosis was determined by flow cytometry and TUNEL assay. **Results** The expression of catalase in VSMC infected with AdCat was significantly higher than that in uninfected VSMC. The number of TUNEL-labeled nuclei in AdCat-infected cells was greater than that in AdLacZ-infected or noninfected cells. The percentage of apoptosis cells in VSMC infected with AdCat was higher than that in control group ($P < 0.001$). **Conclusion** These findings indicate that overexpression of Catalase promoted apoptosis in VSMC. It could be a new target to prevent the restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty.

再狭窄是影响经皮腔内冠状动脉血管成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 远期疗效的主要障碍。目前尚无有效治疗办法。近年研究发现 PTCA 术后血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 内活性氧产生增加^[1,2]。活性氧 (主要是 H_2O_2 、 O_2^-) 可直接刺激 VSMC 增殖^[3]; 另外各种细胞因子、生长因子如血管紧张素 ②、白细胞介素 1、血小板源生长因子等利用活性氧作为第二信使, 活化信号, 转导级联反应, 间接促进 VSMC 增殖^[4,5], 造成球囊扩张部位的血管管腔狭

窄。因此抑制 VSMC 的异常增殖, 并诱导其凋亡是防治再狭窄的重要手段。作为活性氧的重要组成部分的过氧化氢 (H_2O_2) 在 VSMC 增殖中起主导作用。已知过氧化氢酶是 H_2O_2 清除剂。本实验通过腺病毒载体介导的过氧化氢酶基因转染人 VSMC, 观察对 VSMC 凋亡的影响, 为 PTCA 术后再狭窄的防治寻求新的途径。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

DMEM 培养基、新生小牛血清购自 GIBCO-BRL 公司; 胰蛋白酶购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 兔抗人过氧化氢酶抗体购自 CALBIOCHEM 公司; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术有限公司; Protein DectorTM TMB Western

[收稿日期] 2004-08-25 [修回日期] 2005-05-15

[基金项目] 湖北省科技厅科技攻关项目 (2001AA307B07)

[作者简介] 孙跃玲, 硕士, 副主任医师, 研究方向为介入心脏病学, E-mail 为 sunyulin2002@163.com。涂远超, 硕士, 主任医师, 教授, 研究方向为介入心脏病学。王家宁, 博士, 副主任医师, 副教授, 研究方向为心血管疾病的分子生物学。

Blot 试剂盒购自美国 KPL 公司; TUNEL (AP) 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。含 β -半乳糖苷酶基因的重组腺病毒 (β -galactosidase-contained recombinant adenovirus, AdLacZ) 由郧阳医学院临床医学研究所惠赠。紫外分光光度计 CE 2041 (AUVIUD 英国); 流式细胞仪 Epics XL (BECKMAN COULTER 美国)。

1.2 含过氧化氢酶基因的重组腺病毒的制备

用分子克隆及细菌内同源重组技术, 构建、制备含过氧化氢酶基因的重组腺病毒 (catalase-contained recombinant adenovirus, AdCat)^[6]。病毒滴度为 4.12×10^{15} OPU/L。

1.3 血管平滑肌细胞的分离培养

原代细胞取自 20 周引产胚胎主动脉中层, 采用组织贴块法培养, 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基作培养基, 37℃、5% CO₂ 孵箱培养。实验用细胞为第 4 代。培养的 VSMC 经形态学和抗 α -actin 免疫组织化学鉴定, 胞浆内有黄褐色着染, 提示为 VSMC。

1.4 实验分组

取生长良好的 VSMC, 经胰蛋白酶消化后, 以 3×10^8 /L 接种于 6 孔培养板 (TUNEL 分析时孔内预先放入无菌盖玻片), 每孔 3 mL, 常规培养 24 h 后进行分组。实验分三组: AdCat 组将 AdCat 原液用无血清 DMEM 培养基稀释成 100 感染复数 (multiplicity of infection, MOI) (病毒颗粒/VSMC 细胞数) 的腺病毒感染 VSMC; ④AdLacZ 组将 AdLacZ 原液用无血清 DMEM 培养基稀释成 100 MOI 的腺病毒感染 VSMC; ④空白对照组用无血清 DMEM 培养 VSMC。每组设 3 复孔。37℃、5% CO₂ 孵箱培养 4 h。4 h 后吸出病毒液和 DMEM 液, 换含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基继续培养 44 h。

1.5 蛋白印迹法检测过氧化氢酶的表达

转染病毒 48 h 后胰蛋白酶消化, 收集细胞, PBS 洗 2 次, 离心去上清。用 PBS 0.5 mL 重悬细胞, 加入 0.5 mL 加样缓冲液 [50 mmol/L Tris-Cl (pH8.0)、25 mmol/L DTT、2% SDS、0.1% 溴酚蓝和 10% 甘油] 混匀, 100℃沸水浴 5 min。10 000 r/min 离心 5 min, 保留上清。用 1 g/L 牛血清白蛋白作标准蛋白质, 通过考马斯亮蓝染色, 在紫外分光光度计上测 280 nm 处吸光度值, 绘制蛋白质浓度标准曲线, 再分别测定各组蛋白浓度。各组样品各取 20 μ g, 经 8% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转膜到硝酸纤维素膜 (NC 膜) 上, 按照试剂盒说明, 加兔抗人过氧化氢酶抗体 (稀释度 1:1 000) 室温下孵育 1 h。洗膜后加入辣根过

氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体 (稀释度 1:1 000) 室温下孵育 1 h。洗膜后滴加 TMB 显色底物, 室温下显色 10~15 min, 用水漂洗 NC 膜 2 min 终止反应。

1.6 细胞凋亡率的检测

用胰蛋白酶消化收集各组细胞, 预冷 PBS 清洗, 70% 乙醇 4℃固定 24 h。PBS 洗 2 遍, 加入 20 μ L RNaseA (100 mg/L), 37℃水浴 30 min。再加入 800 μ L 碘化丙啶 (PI) 染色液 (含 50 mg/L PI 和 0.1% Triton 100) 混匀, 4℃避光 30 min。应用流式细胞仪检测, 结果通过计算机处理分析各参数, 得出细胞凋亡百分率。

1.7 TUNEL 检测

将培养板内培养基吸出, PBS 洗 2 次。4% 多聚甲醛、0.01 mol/L PBS (pH7.0~pH7.6) 室温下固定 60 min。然后按照试剂盒说明书进行操作。

1.8 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。用 SPSS10.0 软件进行统计学处理, 方法为单因素方差分析及 Tukey's HSD 检验。P<0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 含过氧化氢酶基因的重组腺病毒对血管平滑肌细胞过氧化氢酶蛋白表达的影响

Western blot 结果显示 AdLacZ 组和空白对照组检测出微弱的蛋白质条带, 而转染目的基因的 AdCat 组出现的蛋白质显色明显增强 (图 1, Figure 1)。

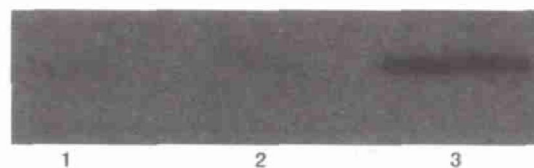


图 1. 平滑肌细胞中过氧化氢酶的 Western blot 分析 1 为空白对照组, 2 为 AdLacZ 组, 3 为 AdCat 组。

Figure 1. Western blot analysis of catalase in VSMC

2.2 各组细胞的凋亡率

流式细胞仪检测结果表明, AdCat 组的 DNA 直方图可见到明显的亚二倍体峰 (sub-G₁ 峰), 见图 2 (Figure 2)。AdCat 组凋亡率为 $22.4\% \pm 1.0\%$, 空白对照组和 AdLacZ 组凋亡率分别为 $3.2\% \pm 0.6\%$ 和 $3.7\% \pm 0.5\%$, AdCat 组与空白对照组、AdLacZ 组比较凋亡率明显增加 ($P<0.01$)。AdLacZ 组与空白对照组比较无明显差异。

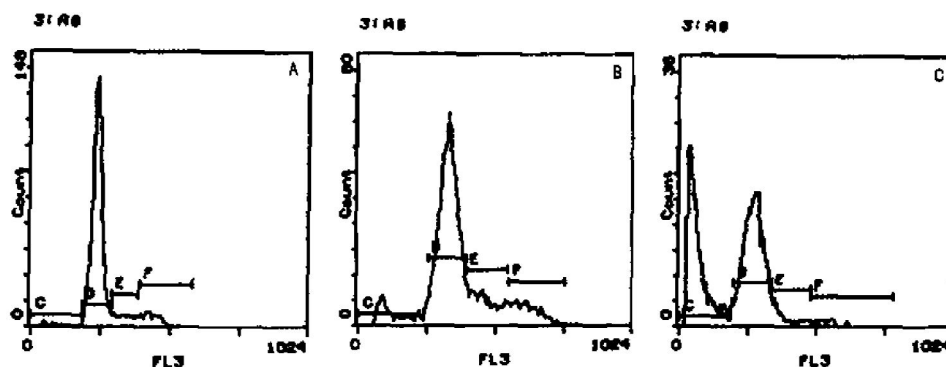


图 2. 流式细胞仪分析细胞 DNA A 为空白对照组, B 为 AdLacZ 组, C 为 AdCat 组。

Figure 2. DNA analysis by flow cytometry

2.3 血管平滑肌细胞凋亡的 TUNEL 检测

经 TUNEL 染色后三组染色图比较, AdLacZ 组和空白对照组凋亡细胞少, 非凋亡细胞核无色, 核相对较大, 形态大小比较一致; 而 AdCat 组凋亡细胞明显多于 AdLacZ 组, 凋亡细胞核呈紫蓝色, 核形态不规

整, 大小不一致(图 3, Figure 3)。在 10 个不同视野下进行细胞计数, 测得 AdLacZ 组和空白对照组凋亡率分别为 $2.60\% \pm 1.82\%$ 和 $2.40\% \pm 1.52\%$, 两者之间无明显差异。而 AdCat 组凋亡率为 $15.20\% \pm 3.27\%$, 与 AdLacZ 组比较差异明显 ($P < 0.001$)。



图 3. 三组 TUNEL 染色 ($\times 200$) A 为空白对照组, B 为 AdLacZ 组, C 为 AdCat 组。

Figure 3. The TUNEL assay in the three groups

3 讨论

经皮腔内冠状动脉成形术 PTCA 术后 3~6 个月再狭窄发生率高达 30%~50%, 从而使其应用受到很大限制。但近年发现活性氧在 PTCA 术后再狭窄的发生发展中起了重要作用。PTCA 术后活性氧增加, 活性氧可以促进 VSMC 增殖。因此减少活性氧的产生, 进而抑制 VSMC 的异常增殖, 并诱导其凋亡可能是防治再狭窄的一种手段。已知过氧化氢酶是 H_2O_2 清除剂。

基因治疗开始用于肿瘤、心血管疾病的治疗试验, 基因转移方法是基因治疗的基础和关键。腺病毒载体作为基因治疗的运载系统近年来发展较快。重组腺病毒因其具有体外转染效率高, 感染细胞范围广, 可感染静止期和分裂期细胞, 同时又不整合到

宿主细胞基因组中, 因此常用于多种疾病的基因治疗。目前有关腺病毒载体介导的过氧化氢酶基因转染对 VSMC 增殖与凋亡的影响国内外少见报导。

本实验观察了 AdCat 转染 VSMC 后过氧化氢酶的表达及对 VSMC 凋亡的影响。结果发现, 经 Western blot 分析, AdLacZ 组和空白对照组检测出微弱的条带, 而 AdCat 组出现的条带明显增强, 说明 AdCat 转染后过氧化氢酶在 VSMC 内过度表达。本实验采用两种方法证实了 AdCat 具有促进 VSMC 凋亡的作用。流式细胞术分析显示 AdCat 组的 DNA 直方图可见到明显的亚二倍体峰 (sub-G1 峰), AdCat 组与 AdLacZ 组、空白对照组比较凋亡率明显增加 ($P < 0.01$)。经 TUNEL 染色后, AdCat 组凋亡细胞明显多于对照组 ($P < 0.001$)。

本实验从细胞水平证明了 AdCat 具有促进 VSMC 凋亡的作用。分析其作用主要是通过过氧化氢酶在 VSMC 内过度表达,进而大量清除 H_2O_2 产生的。因为活性氧作为细胞需氧代谢的正常产物,具有一些重要的生物活性。如许多蛋白质的功能在很大程度上依赖它们的氧化还原状态。包括生长因子受体、蛋白激酶、蛋白磷酸酶、G 蛋白受体及许多重要的转录因子。活性氧充当对外界刺激反应的细胞内第二信使,活化信号,转导级联反应,刺激细胞增殖^[7,8]。因此细胞的生长受活性氧的调节。推测由于 H_2O_2 减少,使细胞的氧化还原状态改变,对外界刺激反应的细胞内第二信使量减少,不能有效的活化信号,进而触发了细胞凋亡机制。但 AdCat 引起细胞凋亡的信号转导级联系统,以及通过何种凋亡基因对 VSMC 凋亡发生影响还有待进一步研究。

经腔内冠状动脉成形 PTCA 术后再狭窄的基础就是 VSMC 的过度增殖。而 AdCat 转染 VSMC 后促进 VSMC 凋亡,可以达到对血管重构的预防和治疗作用。因此,用过氧化氢酶基因转染 VSMC 的基因治疗方法可能是防治 PTCA 术后再狭窄的一种新

的途径。

[参考文献]

- [1] Lassague B, Sorescu D, Szecs K, Yin QQ, Aker M, Zhang Y, et al. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells: nox1 mediates Angiotensin I^{II} induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Circ Res*, 2001, **88** (9): 888-894
- [2] Shi Y, Niculescu R, Wang D, Patel S, Darenpeck KL, Zalewski A. Increased NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species in coronary arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (5): 739-745
- [3] Rao GN, Berk B. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cells growth and proto-oncogene expression. *Circ Res*, 1992, **70** (3): 593-599
- [4] Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, et al. Novel role of NADH/NADPH oxidase-derived hydrogen peroxide in angiotensin I^{II} induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1998, **32** (3): 488-495
- [5] Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK. Angiotensin I^{II} stimulation of NAD(P)H oxidase activity: Upstream Mediators. *Circ Res*, 2002, **91** (5): 406-413
- [6] 孙跃玲,涂远超,王家宁,黄永章,黄从新. 细菌内同源重组构建和制备含过氧化氢酶基因的重组腺病毒. *中国动脉硬化杂志*, 2004, **51** (3): 296-300
- [7] Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Lung Cell Mol Physiol*, 2000, **279** (6): L1 005-L028
- [8] Dalton TP, Shertzer HC, Puga A. Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999, **39**: 67-101

(此文编辑 文玉珊)

主编絮语 每当一期杂志定版时,责任编辑都要跟我说,这期有多少篇文章需要补白。每到此时,我就心烦:这些篇末空白,小则可载二三百字,大者则有三分之二页。空之太可惜,要补上,每期都要十几篇字数不同的小文章,到哪儿去找?以往,我总是找些编辑部规定、消息之类,可每期都刊载这些,尤其是编辑部规定,莫说是读者,连我自己看了都感到烦。前幾天,责任编辑又找来了,我左找右找,找了几篇,还不够,在回家的路上,突发奇想,何不利用这些篇末文尾,载些与我刊有关的科普文章,让那些看不懂我刊专业文章的读者也能从中受益,这不正是我刊的办刊宗旨之一吗。于是,就有了下面这个栏目。关于栏目名称,我想了好几个,譬如“科普之角”、“动脉硬化性疾病防治之窗”等等,但总感到不合适,因为那些栏目名称下刊载的都应该都是大文章,不象现在这个栏目,只要有一个题目,写它几十个百来个字就可刊载。

•你知道吗•

[文章编号] 1007-3949(2005)13-04-0428-01

黑木耳是血管“清道夫”

黑木耳是一种药食两用的菌类植物,含有丰富的蛋白质、铁、钙、维生素、粗纤维,其中蛋白质含量和肉类相当,铁比肉类高 10 倍,钙是肉类的 20 倍,维生素 B2 是蔬菜的 10 倍以上,黑木耳还含有多种有益氨基酸和微量元素。医学研究证明:黑木耳具有益气强身、滋肾养胃、活血等功能,它能抗凝血和血栓形成、降低血脂和血液粘度、软化血管、使血流通畅、减少心血管病的发生。黑木耳还有较强的吸附作用,经常食用有利于体内产生的垃圾及时排出体外。黑木耳对胆结石、肾结石也有较好的化解功能,因为它所含的植物碱具有促进消化道和泌尿道腺体分泌的作用,协同这些分泌物化解结石,使结石排出体外。

(胡必利编写)