

[文章编号] 1007-3949(2009)17-12-0993-04

• 实验研究 •

γ -干扰素和 CD40配体刺激下大鼠血管平滑肌细胞凋亡与钙调神经磷酸酶的相关性

施莹, 彭昱东, 鲍夏茜, 何美安, 程龙献

(华中科技大学附属协和医院心血管病研究所, 湖北省武汉市 430022)

[关键词] 血管平滑肌细胞; 细胞凋亡; 钙调神经磷酸酶; γ -干扰素; CD40配体

[摘要] 目的 观察在炎症因子 γ -干扰素和 CD40配体刺激下大鼠血管平滑肌细胞的凋亡及钙调神经磷酸酶活性和表达水平的变化, 进一步探讨血管平滑肌细胞凋亡的机制。方法 取 200~250 g 雄性清洁级 SD 大鼠, 分离胸主动脉进行血管平滑肌细胞培养并分别给予炎症因子 γ -干扰素、CD40配体和 γ -干扰素 + CD40配体共刺激及加入钙调神经磷酸酶阻断剂 FK506处理。采用 Western Blot 检测钙调神经磷酸酶表达水平; 定磷法检测钙调神经磷酸酶活性, 流式细胞仪检测细胞表面 CD40 表达及平滑肌细胞凋亡。结果 对照组可表达一定量的 CD40 用 γ -干扰素刺激细胞后, 细胞表面 CD40 荧光阳性细胞比率增高 ($18.5\% \pm 2\%$ 比 $44.2\% \pm 2.4\%$)。用 γ -干扰素、CD40 配体分别刺激血管平滑肌细胞, 钙调神经磷酸酶活性 [分别为 $6.48 \pm 1.09 \text{ mmolPi}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 和 $6.26 \pm 1.47 \text{ mmolPi}/(\text{g} \cdot \text{h})$] 及表达水平 (分别为 0.82 ± 0.24 和 0.73 ± 0.20) 均显著高于对照组 [分别为 $1.56 \pm 0.53 \text{ mmolPi}/(\text{g} \cdot \text{h})$ 和 $0.38 \pm 0.12, P < 0.01$], γ -干扰素与 CD40 配体共刺激下钙调神经磷酸酶活性 [$11.70 \pm 2.73 \text{ mmolPi}/(\text{g} \cdot \text{h})$] 及表达水平 (2.85 ± 0.61) 较其余各组显著增高 ($P < 0.01$), 平滑肌细胞凋亡水平显著高于其他刺激组。FK506 作用下钙调神经磷酸酶活性 [$2.74 \pm 0.30 \text{ mmolPi}/(\text{g} \cdot \text{h})$] 降低, 平滑肌细胞凋亡水平较刺激组显著减少 ($P < 0.01$)。钙调神经磷酸酶活性与凋亡水平呈显著正相关 ($P < 0.05$)。结论 炎症因子 γ -干扰素可促进血管平滑肌细胞表面 CD40 表达增加, 通过 CD40-CD40 配体信号通路活化钙调神经磷酸酶, 使血管平滑肌细胞的凋亡增加。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Relationship Between the Expression of Calcineurin and Rat Vascular Smooth Muscle Cells Apoptosis Stimulated by Interferon Gamma and CD40 Ligand

SHI Ying PENG Yu-Dong BAO Xia-Xi HE Mei-An and CHENG Long-Xian

(Institute of Cardiovascular Diseases Union Hospital Tongji Medical College Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022 China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cells Apoptosis Calcineurin Interferon Gamma CD40 Ligand

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the activity and expression of calcineurin (CaN) in the apoptosis of rat vascular smooth muscle cells (VSMC) under the stimulation of interferon gamma (IFN- γ) and CD40 ligand (CD40L), and the relationship between CaN and apoptosis of VSMC. **Methods** VSMC were obtained from SD rat and cultured in conditioned medium. Expression of CaN was measured by Western Blot and expression of CD40 and apoptosis of VSMC were examined by flow cytometry. **Results** The expression of CD40 in VSMC was clearly demonstrated. Activation of VSMC by IFN- γ resulted in significant increase of expression of CD40 in VSMC ($18.5\% \pm 2\%$ vs $44.2\% \pm 2.4\%$). VSMC of control group showed low CaN activity ($1.56 \pm 0.53 \text{ mmolPi}/(\text{g} \cdot \text{h})$), which was significantly enhanced by stimulation of IFN- γ , CD40L or combined stimulation of IFN- γ and CD40L respectively ($6.48 \pm 1.09 \text{ mmolPi}/(\text{g} \cdot \text{h})$, $6.26 \pm 1.47 \text{ mmolPi}/(\text{g} \cdot \text{h})$, $11.70 \pm 2.73 \text{ mmolPi}/(\text{g} \cdot \text{h})$, $P < 0.01$), and so was the apoptosis of VSMC ($P < 0.01$). The activity of CaN was significantly decreased after addition of FK506 ($2.74 \pm 0.30 \text{ mmolPi}/(\text{g} \cdot \text{h})$, $P < 0.01$). **Conclusion** The expression of CD40 was increased by the stimulation of IFN- γ . And combination of CD40-CD40L can increase the activity of CaN to induce the apoptosis of VSMC.

冠状动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块纤

维帽中的胶原成分主要由血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 合成, 若 VSMC 过度凋亡, 则胶原合成减少, 斑块的稳定性下降, 易导致急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 发生^[1]。有研究表明, 作为受 γ -干扰素 (IFN- γ) 和 CD40 配体 (CD40L) 调节的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶、钙调神经磷酸酶 (calcineurin, CaN) 对多种细胞如心

[收稿日期] 2009-09-11 [修回日期] 2009-11-10

[作者简介] 施莹, 博士, 研究方向为冠心病发病机制及其防治策略, Email 为 sy99403373@hotmail.com。彭昱东, 博士, 研究方向为冠心病发病机制及其防治策略, Email 为 an-penicillin@163.com。通讯作者程龙献, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病发病机制及其防治策略, Email 为 chenglongxiansy@163.com。

肌、神经细胞、淋巴细胞等存在着促进凋亡和增殖的双重作用^[2]。同时, CaN 信号通路在 VSMC 增殖及功能维持中起重要作用^[3], 但 CaN 是否也可介导 VSMC 的凋亡, 尚有待研究。本实验观察了在 IFN- γ 和 CD40L 这两种促 As 炎症因子刺激下, VSMC 的凋亡及 CaN 活性和表达水平的变化, 进一步探讨炎症因子作用下 VSMC 凋亡的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂

200~250 g 雄性清洁级 SD 大鼠 (本校动物实验中心提供)。IFN- γ 和 CD40L (PEPROTECH 公司), 抗大鼠 CaN 抗体和抗大鼠 CD40 多克隆抗体 (博士德公司), FK506 (ALEXIS 公司), BCA 蛋白浓度测试试剂盒 (Thermo 公司), Annexin V /PI 细胞凋亡试剂盒 (AnGene 公司), CaN 活性检测试剂盒 (南京建成公司)。

1.2 实验分组

细胞铺满后用 0.25% 胰蛋白酶消化, 将细胞以 10^5 个/孔接种于 6 孔培养板。实验分 5 组: 对照组, 单纯 DMEM 培养基培养; ④ IFN- γ 组, DMEM 培养基中加入 IFN- γ (20 μ g/L); ④ CD40L 组, DMEM 培养基中加入 CD40L (100 μ g/L); 共刺激组, DMEM 培养基中同时加入 IFN- γ 及 CD40L (剂量同前); FK506 组, DMEM 培养基中加入 CaN 特异性拮抗剂 FK506 (10 μ g/L) 孵育 1 h 后, 再向培养基中同时加入 IFN- γ 及 CD40L (剂量同前)。培养 24 h 后, 对照组及 IFN- γ 组检测 CD40 的表达, 上述各组均收集细胞检测 CaN 的活性及 24 h VSMC 凋亡水平, 提取蛋白检测 CaN 的表达水平。

1.3 大鼠血管平滑肌细胞的分离、培养和鉴定

取 SD 大鼠胸主动脉按文献贴壁培养, 用 SABC 法对动脉平滑肌细胞进行肌动蛋白免疫组织化学染色, DAB 显色进行鉴定。经证实培养细胞为大鼠 VSMC 后, 传代培养至 5~6 代进行实验。

1.4 流式细胞仪检测血管平滑肌细胞表面 CD40 表达

对照组及 IFN- γ 组收集细胞后, 加入 PBS 吹打, 离心, 弃上清, 加入 500 μ L PBS 重悬, 再加入 2 μ L 兔抗鼠 CD40 室温下孵育 20 min, 离心, 弃上清, 加入 PBS 吹打, 离心, 反复 2 次, 弃上清, 加入含 1% 的 BSA 的 PBS 500 μ L, 孵育 20 min, 加入相应二抗 10 μ L, 孵育 20 min, 离心, 弃上清, 加入 PBS 吹打, 离心两次, 取 100 μ L 上流式细胞仪检测 CD40 表达。

1.5 钙调神经磷酸酶活性检测

收集细胞后, 加入 50~100 μ L PBS 重悬, 冰上超声裂解细胞 (600 Hz 5 s $\times$ 30 次), 以钙调素作激活剂, 对硝基磷酸酚 (pnitrophenyl phosphate, PNPP) 为底物, 用定磷法进行 CaN 活性测定。操作按试剂盒说明进行。

1.6 Western Blot 检测钙调神经磷酸酶表达水平

蛋白裂解液裂解细胞, BCA 试剂测定蛋白浓度, 常规电泳、转膜和封闭后, 分别加入抗大鼠 CaN 抗体 (1: 100) 和 β -actin 抗体 (1: 200), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 加入相应二抗 (1: 2000), 室温孵育 2 h, 洗膜后暗室胶片曝光显影, 结果用 Quality One 分析。

1.7 血管平滑肌细胞凋亡率检测

用 Annexin V /PI 法检测血管平滑肌细胞凋亡率, 操作按试剂盒检测说明进行。

1.8 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 根据方差齐性检验结果, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 SNK 检验。相关分析用 Pearson 简单相关系数分析。所有数据均用 SPSS13.0 统计软件处理, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血管平滑肌细胞表面 CD40 的表达

对照组 VSMC 可表达一定量的 CD40 (18.5% $\pm$ 0.2%), IFN- γ 组细胞表面 CD40 的表达上调 (44.2% $\pm$ 2.4%), IFN- γ 组细胞表面荧光阳性细胞比率显著高于对照组 ($P < 0.05$ 图 1)。

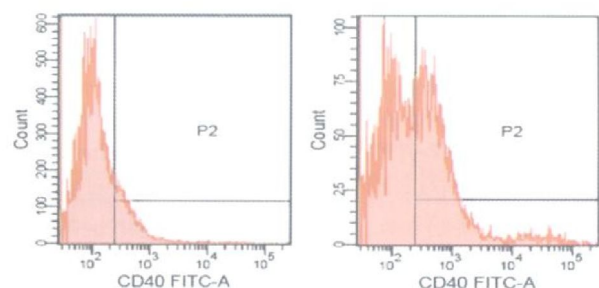


图 1 血管平滑肌细胞表面 CD40 表达

2.2 钙调神经磷酸酶活性

对照组 VSMC 有一定量的 CaN 活化; IFN- γ 组、CD40L 组 CaN 活性均有显著增高, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。共刺激组 CaN 活性显著高于 IFN- γ 或 CD40L 单独刺激组 ($P < 0.05$), FK506 组 CaN 活性较其余各刺激组显著降低 (表 1)。

2 3 钙调神经磷酸酶的蛋白表达水平

对照组 VSMC 可表达较低水平的 CaN, IFN- γ 、CD40L 分别刺激下 CaN 的表达水平升高, IFN- γ 和 CD40L 共刺激组 CaN 的表达水平较其他各组显著增高, FK506 组 CaN 表达水平与共刺激组差异无显著性 (表 1 和图 2)。

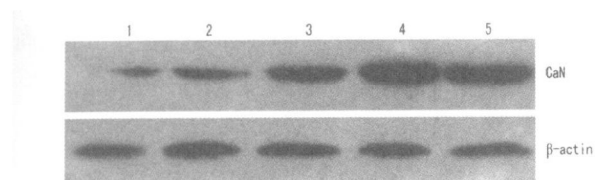


图 2 平滑肌细胞钙调神经磷酸酶蛋白表达水平 1 为对照组, 2 为 CD40L 组, 3 为 IFN- γ 组, 4 为共刺激组, 5 为 FK506 组。

2 4 血管平滑肌细胞凋亡率

对照组 24 h 可见少量 VSMC 凋亡, IFN- γ 、

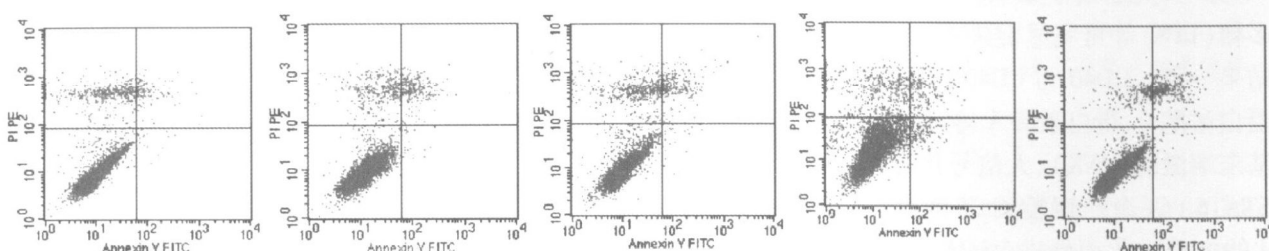


图 3 各组血管平滑肌细胞凋亡流式图 从左到右分别为对照组、IFN- γ 组、CD40L 组、共刺激组和 FK506 组。

2 5 钙调神经磷酸酶活性与血管平滑肌细胞凋亡率的相关性

CaN 活性与 VSMC 凋亡率呈正相关关系 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 钙调神经磷酸酶活性与血管平滑肌细胞凋亡率相关系数

分 组	相关系数
对照组	0.84
CD40L 组	0.89
IFN- γ 组	0.96
共刺激组	0.95
FK506 组	0.91

3 讨论

ACS 共同的病理基础是斑块不稳定, 而不稳定性斑块与大的脂质核心和薄的纤维帽有关。在 As

CD40L 刺激下 VSMC 凋亡水平增高, 共刺激组 VSMC 凋亡水平较单独刺激组和对照组显著增高, FK506 组 VSMC 凋亡水平较刺激组显著降低, 与对照组差异无显著性 (表 1 和图 3)。

表 1 不同刺激条件下钙调神经磷酸酶表达水平、活性及血管平滑肌细胞凋亡水平

分 组	n	CaN 活性 [mmolPi/(g h)]	CaN 表达	VSMC 凋亡率
对照组	10	1.56 $\pm$ 0.53	0.38 $\pm$ 0.12	1.58% $\pm$ 0.35%
CD40L 组	10	6.26 $\pm$ 1.47 ^a	0.73 $\pm$ 0.20 ^a	3.86% $\pm$ 0.56% ^a
IFN- γ 组	10	6.48 $\pm$ 1.09 ^a	0.82 $\pm$ 0.24 ^a	4.28% $\pm$ 0.78% ^a
共刺激组	10	11.70 $\pm$ 2.73 ^{abc}	2.85 $\pm$ 0.61 ^{abc}	6.90% $\pm$ 1.09% ^{abc}
FK506 组	10	2.74 $\pm$ 0.30 ^{abcd}	2.81 $\pm$ 0.61 ^{abc}	1.92% $\pm$ 0.30% ^{bed}

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$ 与 CD40L 组比较; c 为 $P < 0.01$ 与 IFN- γ 组比较; d 为 $P < 0.01$ 与共刺激组比较。

病变晚期, 由于斑块局部 VSMC 过度凋亡, 胶原合成减少, 造成了纤维帽不稳定。同时大量研究表明, IFN- γ 、CD40L 等炎症因子参与了 ACS 全身及局部的免疫炎症反应机制, 与斑块的不稳定相关^[4,5]。

钙调神经磷酸酶属丝氨酸-苏氨酸蛋白磷酸酶家族成员 (又称蛋白磷酸酶 2B, PP2B), 是迄今所知的唯一一种受 Ca^{2+} 钙调素 (calmodulin) 调节的丝氨酸-苏氨酸蛋白磷酸酶, 在细胞信号传递过程中直接受 Ca^{2+} 去磷酸化调节^[6]。研究表明 CaN 介导的信号通路在心血管的形态发生中起重要作用, 并可能通过活化 T 细胞核因子 (NF-AT)、Janus 激酶/信号转导和转录激活因子 (JAK-STAT) 等信号转导通路参与心肌细胞肥大、凋亡及 VSMC 增殖和内皮细胞功能的调节^[7]。CaN 在心肌细胞、淋巴细胞等多种细胞中对凋亡都起到了双向调节作用^[2]。有研究表明, CaN 可通过去磷酸化作用调节 Ca^{2+} 通道的关闭, 影响胞内 Ca^{2+} 浓度, 参与 VSMC 增殖等功能活动的调控^[3]。但 CaN 是否通过调控 VSMC 凋亡从而影响斑块的不稳定性, 仍有待研究。本研究旨在

探讨炎症因子作用下 CaN 与 VSMC 凋亡是否存在相关性。

本研究结果发现,普通培养下 VSMC 可表达较低水平的 CaN,细胞表面 CD40 表达少,24 h 后可见少量 VSMC 凋亡;IFN- γ 刺激后,CD40 表达增加,CaN 的活性及表达水平增高,VSMC 凋亡水平有所增高;IFN- γ 和 CD40L 共刺激后,CaN 的活性及表达水平显著增高,VSMC 凋亡水平明显高于其余各刺激组;加入 CaN 特异性拮抗剂 FK506 后,CaN 的活性明显下降,同时 VSMC 凋亡水平较 IFN- γ 组、CD40L 组以及共刺激组显著降低。FK506 是 CaN 活性特异性拮抗剂,对 CaN 蛋白转录和翻译水平并无显著影响,与本研究结果一致,提示 VSMC 凋亡与 CaN 活性相关。

CD40 与 CD40L 作用可造成 As 斑块不稳定,CD40L 及其受体 CD40 在人 As 斑块平滑肌细胞原位共同表达,静息状态下细胞膜相对低水平表达 CD40 分子,炎症因子如 IFN- γ 、肿瘤坏死因子 α 和脂多糖 (LPS) 等可明显促进 CD40 表达^[8,9],与本研究结果一致。CD40 与 CD40L 结合后可能进一步活化蛋白激酶 C、蛋白激酶 A 等,通过核因子 κ B、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)、人信号导体及转录激活子 6 (STAT6) 等途径调控 CaN 活性^[9]。CaN 可通过 Bad 的去磷酸化而促进 VSMC 凋亡,造成斑块不稳定。活化的 CaN 还可使胞浆内的 NF-AT 去磷酸化,暴露出 NF-AT 上的核定位信号,使 NF-AT 转位入核,上调白细胞介素 2 (IL-2)、IL-4 及 CD40L 等基因的表达,从而造成上述炎症反应的恶性循环^[7]。我们推测,IFN- γ 刺激下 CD40 表达增加,CD40-CD40L

结合后可通过核因子 κ B、JNK、STAT6 等信号通路影响 CaN 的表达及活性,并可正反馈促进 CD40 与 CD40L 的作用,影响斑块局部的炎症反应和 VSMC 的凋亡水平,从而决定了斑块的不稳定性。因此,本实验提示 IFN- γ 可促进 VSMC 表面 CD40 表达增加,通过 CD40-CD40L 信号通路活化 CaN,使 VSMC 的凋亡增加。但 CaN 如何具体调控 VSMC 的凋亡,并同时发挥其调节 VSMC 增殖和凋亡作用的机制尚有待我们进一步研究。

[参考文献]

- [1] Hansson GK. Inflammation atherosclerosis and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005 **352** (2): 1685-1695
- [2] Tombal B, Weeraratna AT, Demeade SR, et al. Thapsigargin induces a calmodulin/calcineurin dependent apoptotic cascade responsible for the death of prostatic cancer cells [J]. *Prostate*, 2000 **43** (4): 303-317
- [3] 李映红, 欧阳静萍, 魏劲波. 钙调神经磷酸酶在心血管系统中的作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003 **11** (5): 477-480
- [4] Antonino B, Luigi B, Giovanna L, et al. Widespread coronary inflammation in unstable angina [J]. *N Engl J Med*, 2002 **347** (1): 5-12
- [5] WalAC, BeckerAE, LoosCM, et al. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology [J]. *Circulation*, 1994 **89** (1): 36-44
- [6] Danilo G. Calcineurin: not just a simple protein phosphatase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997 **235** (2): 271-275
- [7] Valerie B, Abbott KL, Wang XF, et al. The cyclosporine A-sensitive nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are expressed in vascular smooth muscle cells. Differential localization of NFAT isoforms and induction of NFAT mediated transcription by phospholipase C-coupled cell surface receptors [J]. *Biol Chem*, 1998 **273** (31): 19664-19671
- [8] Uwe Schlenker, Peter L. CD40 signaling and plaque instability [J]. *Circ Res*, 2001 **89** (12): 1092-1103
- [9] 李永旺. CD40-CD40L 在动脉粥样硬化及急性冠状动脉综合征的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2004 **25** (6): 473-476

(此文编辑 许雪梅)