

• 论 著 •

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

柴锡庆 温进坤 韩 梅 郭 庆

(河北医科大学基础医学研究所生物化学室, 石家庄 050017)

Apoptosis and Expression of Related Genes of Smooth Muscle Cells in Atherosclerotic Plaques

CHAI Xi-Qing, WEN Jin-Kun, HAN Mei and GUO Qing

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

ABSTRACT

Aim To study the apoptosis and the expressions of protooncogenes *bcl-2*, *P53* and *c-myc* of the smooth muscle cells (SMC) derived from rabbit atherosclerotic (As) plaques.

Methods Cell apoptosis was in situ detected with the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) and DNA agarose gel electrophoresis, respectively. Expressions of protooncogenes *bcl-2*, *c-myc* and *P53* were observed by Northern blotting.

Results It was found that a lot of SMC were positively stained with TUNEL in As plaque tissues. The DNA electrophoresis of the plaque tissues showed a ladder pattern. Northern hybridization showed that expressions of protooncogenes *bcl-2* and *P53* in the plaque tissues were markedly increased, compared with the normal tissues, but the expression of *c-myc* was decreased.

Conclusion Apoptosis of SMC existed in the As plaques. The expressions of protooncogenes *bcl-2*, *c-myc* and *P53* play an important role in regulating the apoptosis of SMC in the As plaques.

KEY WORDS Atherosclerosis; Apoptosis; Gene; Smooth muscle cell

摘要 为了揭示动脉粥样硬化发生发展过程中血管平滑肌细胞增殖与凋亡的关系及其调节机制, 采用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 染色法对家兔动脉粥样硬化斑块组织中平滑肌细胞的凋亡情况进行原位检测, 并对原癌基因 *bcl-2*、*c-myc* 和 *P53* 在斑块组织中的表达活性进行 Northern blot 分析。结果发现, 在动脉粥样硬化斑块组织中有许多 TUNEL 染色阳性的平滑肌细胞, 提示斑块组织中有平滑肌细胞凋亡发生; 其斑块组织的 DNA 电泳图谱呈梯形状, 符合细胞凋亡的特征性改变。Northern 印迹分析表明, 在动脉粥样硬化斑块组织中, 原癌基因 *bcl-2* 和 *P53* 的表达较正常组织增强, *c-myc* 表达减低。提示这些基因的表达对动脉粥样硬化斑块组织中的平滑肌细胞凋亡起着重要的调节作用。

关键词 动脉粥样硬化; 细胞凋亡; 基因; 平滑肌细胞

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块形成涉及脂类代谢障碍、血管内皮细胞损伤、巨噬细胞浸润、平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC) 增殖和血小板粘集等多种因素。其中血管平滑肌细胞异常增殖在 As 斑块形成过程中发挥重要作用^[1]。近年来, 人们在研究 SMC 异常增殖与 As 发生的关系时, 发现细胞死亡存在于 As 发生发展的各个阶段^[2,3], 因而推论 SMC 异常增殖是由于细胞死亡和增殖平衡失调的结果。但这一观点直到细胞凋亡 (apoptosis) 概念被提出并证实细胞凋亡是调节正常细胞数量的重要生理方式^[4]之后, 才引起人们的重视。本文制作实验性 As 家兔动物模型, 观察 As 斑块中 SMC 凋亡情况及其相关基因的表达活性, 以进一步揭示 As 发生发展过程中 SMC 增殖与凋亡的关系及其调节机制。

1 材料和方法

1.1 材料

胆固醇为广州医药站化学试剂公司进口分装;末端脱氧核糖核酸转移酶(terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT)和 dUTP 为 Sigma 公司产品; α -³²P-dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司;核酸探针随机引物标记试剂盒为 Promega 公司产品; α -actin 抗体与溶菌酶免疫组织化学试剂盒购自北京中山生物技术公司; bcl-2, c-myc 和 P53 探针为本室保存。其它试剂为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物模型 选用新西兰纯系雄性家兔, 体重 1.8~2.5 kg。分为对照组和实验组, 对照组喂基础饲料; 实验组在基础饲料中加 2% 胆固醇和 3% 精制猪油, 每天每只喂饲料 100~150 g, 连续喂养 60 天。

1.2.2 标本采集 用 3% 戊巴比妥钠按 30 mg/kg 体重静脉麻醉家兔, 打开胸腔, 取出主动脉弓和胸主动脉, 用冷生理盐水洗去血块后将所取主动脉纵向剖开, 取一部分斑块组织固定于 10% 中性福尔马林中, 用于光镜检查和细胞凋亡的原位检测。其余斑块组织去除内膜和外膜, 用于提取 RNA 和 DNA, 以便观察中膜 SMC 的基因表达情况和 DNA 变化。RNA 和 DNA 分别按异硫氰酸胍一步法^[1]和酚-氯仿法^[2]提取。

1.2.3 凋亡细胞的原位检测 采用 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记法^[3] (TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 对凋亡细胞进行原位检测, 方法

如下: ①用 10% 中性福尔马林固定标本, 常规石蜡包埋切片, 脱蜡入水; ②用 20 μ g/L 蛋白酶 K 溶液覆盖组织切片, 室温放置 15 min, 然后用双蒸水洗 4 次, 每次 2 min; ③用新鲜配制的 2% 过氧化氢水溶液覆盖切片, 室温放置 5 min, 以灭活内源性过氧化物酶, 双蒸水洗 2 次, 每次 3 min; ④切片浸入 TdT 缓冲液中 (30 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷, pH 7.2; 140 mmol/L 二甲胍钠, 1 mmol/L 氯化钴) 1 min 取出, 向 TdT 缓冲液中加入 TdT 和 dUTP 至终浓度为 0.3 mL 和 2 μ mol/L, 混匀后加于切片上, 每片 20 μ L, 置切片于湿盒中, 37°C 孵育 60 min; ⑤切片用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 洗 3 次, 每次 3 min; ⑥切片浸入 TB 液 (30 mmol/L NaCl, 30 mmol/L 枸橼酸钠) 中 15 min, 终止反应, 用双蒸水洗两次, 每次 5 min; ⑦用 2% 牛血清白蛋白覆盖切片, 室温放置 10 min, 双蒸水洗一次, 浸入磷酸盐缓冲液 5 min; ⑧用抗生物素蛋白链菌素-过氧化物酶溶液覆盖切片, 37°C 孵育 10 min, 用 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液洗 4 次, 每次 3 min; ⑨加新配制的 3/10000 过氧化氢-二氨基联苯胺 (0.5 g/L) 显色液, 反应 5~10 min, 双蒸水洗两次; ⑩常规封片, 镜检。

1.2.4 DNA 电泳 DNA 样品在 1.6% 琼脂糖凝胶、四溴乙烷缓冲液和电压 40 V 条件下电泳 2 h。电泳后在波长为 254 nm 的紫外灯下观察照相。

1.2.5 Northern 印迹分析 取从对照组和 As 斑块组织中提取的 RNA 10 μ g, 经 1% 琼脂糖-甲醛变性凝胶进行电泳, 转移到尼龙膜上, 按文献[8]方法与用随

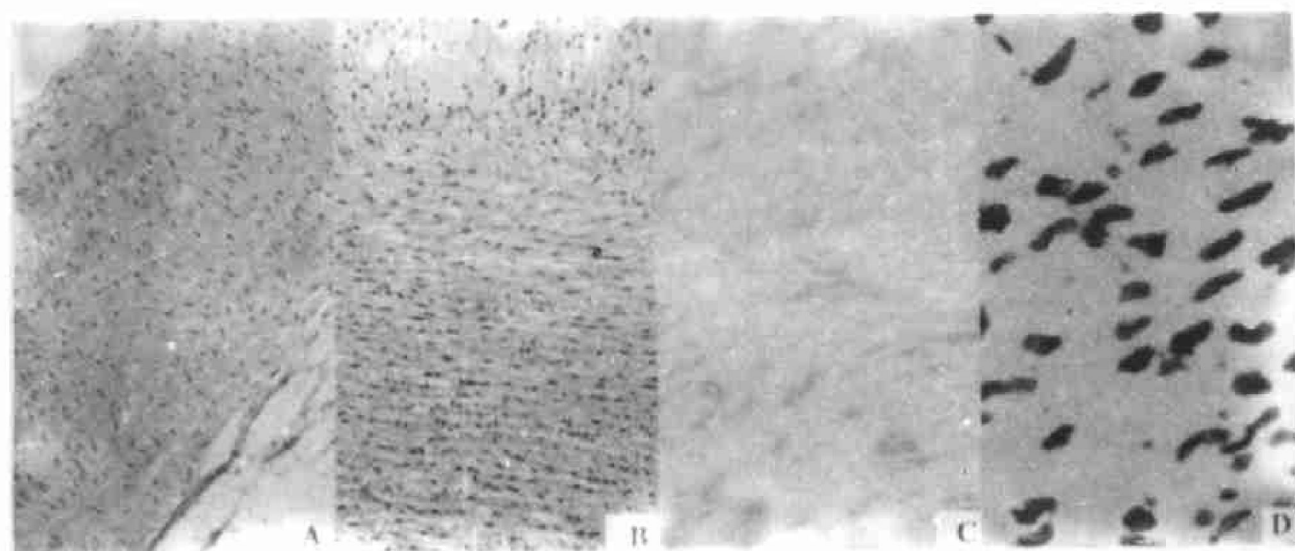


Figure 1. A. HE staining of normal rabbit aorta ($\times 20$). B. HE staining of As rabbit plaques ($\times 20$). C. TUNEL of normal rabbit aorta ($\times 40$). D. TUNEL of As rabbit plaques ($\times 40$).

引物标记的 *bcl-2*、*c-myc* 和 *P53* 探针分别进行杂交。

2 结果

2.1 光镜检查

动脉粥样硬化动物模型的主动脉切片经 HE 染色后,可见内膜增厚,有明显脂肪沉积,有单核细胞浸润和泡沫细胞形成,中膜 SMC 增殖明显,动脉壁变厚,说明 As 模型复制成功(图 1A 和 B, Figure 1A and B)。

α -actin 标记(效价 1:50)和溶菌酶免疫组织化学染色,可见内膜中有许多大单核细胞和空泡变性的巨噬细胞,中膜为明显增殖的平滑肌细胞。

2.2 凋亡细胞的原位检查

动脉粥样硬化斑块组织切片经 TUNEL 染色,可见动脉壁中膜有散在的 SMC 胞核内出现棕褐色颗粒,以中膜内侧较多见。此为 TUNEL 染色阳性的凋亡细胞,在内膜中亦可见有少数 TUNEL 染色阳性的凋亡巨噬细胞。对照组的动脉切片仅见 SMC 形态,细胞核内未出现 TUNEL 染色阳性颗粒,表明 As 斑块中有 SMC 凋亡发生(图 1C 和 D, Figure 1C and D)。

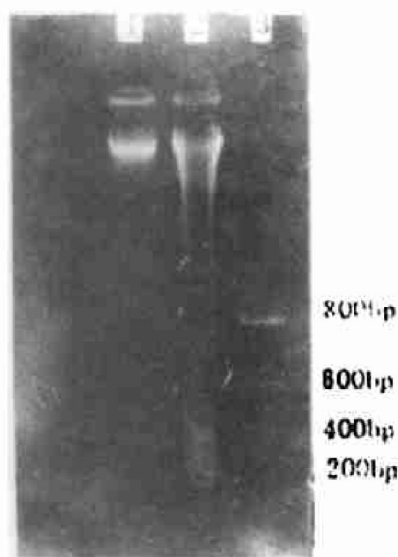


Figure 2. DNA electrophoresis. 1: normal rabbit aorta; 2: As rabbit plaques tissue; 3: Marker.

2.3 DNA 电泳分析

图 2(Figure 2)显示,从 As 斑块区中膜提

取的 DNA 经电泳后呈明显的降解状态,在 200、400 和 800 bp 附近出现了 3~4 条区带,即所谓梯状图谱;正常 DNA 无降解,电泳图形呈现一条整齐的区域带。

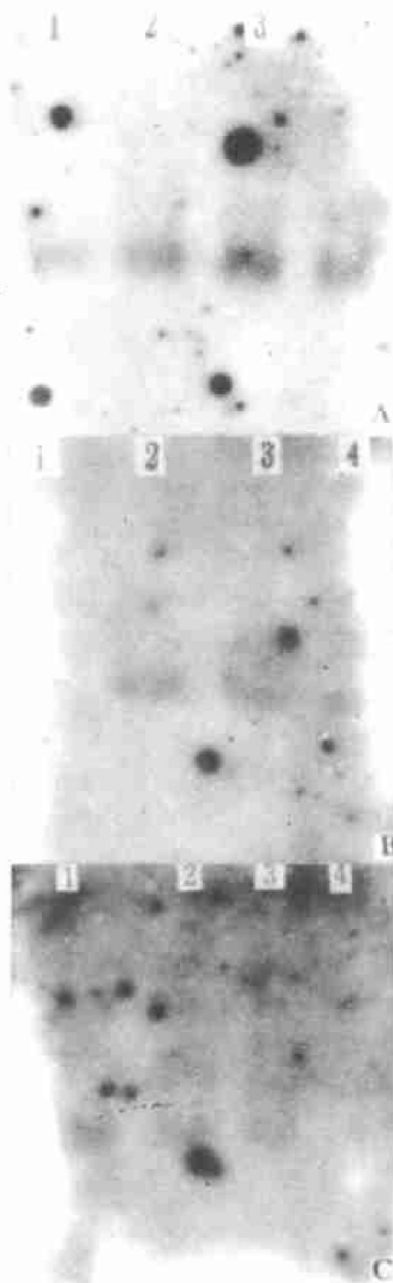


Figure 3. Northern hybridization panels A, B and C show results hybridized with *bcl-2*, *P53* and *c-myc* probes, respectively. 1: Normal rabbit aorta; 2~4: As rabbit plaque tissue.

2.4 Northern 印迹分析

从对照组血管和斑块中膜平滑肌细胞中提

取的 RNA 与 *bcl-2*、*c-myc* 和 *P53* 探针杂交后, 出现深浅不同的杂交带, 从杂交信号的强度可知, 斑块组织中 *bcl-2* 和 *P53* 表达明显增强, *c-myc* 表达比对照组减弱(图 3, Figure 3)。

3 讨论

有研究报道, 在动脉粥样硬化的发生过程中不仅存在 SMC 异常增殖, 同时还伴随着 SMC 的死亡^[2], 因而近年来关于 As 斑块中 SMC 死亡形式的研究倍受青睐。1995 年 Bennett 等^[9]从 As 斑块组织中分离出 SMC, 在体外培养条件下对其死亡特点及影响因素进行研究, 发现来自斑块中的 SMC 在死亡影响因素、死亡率及死亡形式方面与正常组织来源的 SMC 截然不同, 证实其死亡是以凋亡的形式发生。但在在体条件下, 斑块组织中的 SMC 凋亡情况及相关基因表达活性国内目前尚未见文献报道。本实验制备实验性 As 动物模型, 采用 TUNEL 染色法对斑块组织 SMC 凋亡情况进行原位检测。结果发现, As 斑块组织中膜有散在的 TUNEL 染色阳性的凋亡 SMC 存在。以内侧较多见, 这可能与部分平滑肌细胞接到凋亡信号后向外迁移有关, 其机理尚不清楚^[10]。来自斑块组织 SMC 的 DNA 经电泳呈现梯状图谱, 提示细胞染色体 DNA 发生断裂, 与凋亡细胞的原位检测结果一致。由此可见, 在 As 发生发展过程中 SMC 异常增殖的同时, 也不断通过自杀机制而凋亡。

细胞凋亡是调节动脉壁细胞数量的重要方式^[10], 已经证明, 这种细胞死亡形式受凋亡与凋亡抑制基因的调节。As 发生发展过程中 SMC 分裂增加, 其凋亡速度是否加快是值得研究的问题。本文对凋亡调节基因表达活性的研究结果提示, 在 As 斑块组织 SMC 中, 诱导细胞凋亡的 *c-myc* 表达活性降低, 同时凋亡抑制基因 *bcl-2* 表达显著增加, 促进凋亡的野生型 *P53* 基因表达轻度上调。我们推测, *P53* 基因表达增加的幅度可能不足以代偿 *c-myc* 的作用, 也不可能有效抑制 *bcl-2* 的活性。因此, 过度增

殖的 SMC 不能自动死去而使其增殖与凋亡平衡失调, 结果造成动脉壁变厚和 As 斑块形成。关于 *c-myc*、*bcl-2* 和 *P53* 在调节 SMC 凋亡方面的相关关系尚待进一步研究。

参考文献

- 1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362**: 801~809.
- 2 Thomas WA, Reiner JM, Florentin FA, et al. Population dynamics of arterial smooth muscle cells: V. Cell proliferation and cell death during initial 3 months in atherosclerotic lesions induced in swine by hypercholesterolemic diet and intimal trauma. *Exp Mol Pathol*, 1976, **24**: 360~374.
- 3 Thomas WA, Kim D, Lee K, et al. Population dynamics of arterial cells during atherogenesis: X. Mitogenic and cytotoxic effects of a hyperlipidaemic (HL) diet on cells in advanced lesions in the abdominal aortas of swine fed an HL diet for 270~354 days. *Exp Mol Pathol*, 1983, **39**: 257~270.
- 4 Wyllie AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev*, 1992, **11**: 95~103.
- 5 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**(1): 156~159.
- 6 Facchinetti A, Tessarollo M, Mazzocchi R, et al. An improved method for the detection of DNA fragmentation. *J Immunol Methods*, 1991, **136**: 125~131.
- 7 Geng YJ, Libby P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: Colocalization with interleukin-1 β -converting enzyme. *Am J Pathol*, 1995, **147**: 251~266.
- 8 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. In: *A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 9 Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, 1995, **95**: 266~274.
- 10 Aesim C, David W, Courtman B, et al. Apoptosis (programmed cell death) in arteries of the neonatal lamb. *Circ Res*, 1995, **76**: 168~175.

(1997-04-14 收到, 1997-09-26 修回)