

NO 诱导血管平滑肌细胞凋亡中 Ca^{2+} 的作用*

田雪梅¹, 马晓东²

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州 510275; 2. 第一军医大学中心实验室, 广东 广州 510515)

摘 要: 探讨了 NO 诱导血管平滑肌细胞凋亡与细胞内游离 Ca^{2+} 之间的关系. 通过粘附式细胞仪和 Ca^{2+} 荧光探针 Fluo-3/AM, 检测分析了 NO 在供体 SNAP 的作用下, 血管平滑肌细胞中游离 Ca^{2+} 浓度的变化; 又通过 SNAP 与维拉帕米、EGTA、肝素钠、普鲁卡因共同孵育的方法, 观测了 Ca^{2+} 浓度变化在细胞凋亡中的作用. 得出 SNAP 能使细胞中游离 Ca^{2+} 浓度升高, 而胞外 Ca^{2+} 内流在其中起主要作用; 并且阻断胞外 Ca^{2+} 内流能够抑制 SNAP 所诱导的血管平滑肌细胞的凋亡. 提示了胞内 Ca^{2+} 浓度升高可能是 SNAP 诱导血管平滑肌细胞凋亡的一条途径.

关键词: NO; 血管平滑肌细胞; Ca^{2+}

中图分类号: Q251; Q255 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2001) 01-0061-04

NO 是心血管系统中较活跃的小分子物质, 具有多种生物学效应. 如它能使血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 松弛而改变血管张力; 抑制 VSMC 向血管内膜迁移和增殖^[1]; 抑制 VSMC 生成肌蛋白及分泌胶原等细胞外基质^[2]. 新近研究还发现 NO 亦能诱导 VSMC 发生凋亡^[3]. 目前, VSMC 增殖和凋亡失衡被认为是导致动脉粥样硬化、再狭窄等病变的可能因素之一^[4]. 因此, NO 诱导 VSMC 凋亡的作用令人关注. 但 NO 诱导 VSMC 凋亡的机制原理尚不十分清楚. 已有的研究成果证明细胞内较高浓度的 Ca^{2+} 会使一些细胞发生凋亡, 且 Ca^{2+} 阻断剂可抑制 VSMC 凋亡. 此外, NO 对细胞内的 Ca^{2+} 也具有某种调节作用. 所以, 本实验在 SNAP 作用下, 对 VSMC 中游离 Ca^{2+} 浓度变化及 Ca^{2+} 在 SNAP 诱导 VSMC 凋亡中的作用进行了检测分析, 试图探析 NO 诱导 VSMC 凋亡与细胞中游离 Ca^{2+} 浓度变化之间可能存在的联系.

1 材料和方法

1.1 药品及试剂

EGTA(乙二醇双乙醚-N,N'-四乙酸)、SNAP(s-nitroso-N-acetylpenillamine, NO 供体)、维拉帕米均购自 Sigma 公司. 肝素钠、普鲁卡因为国产药剂. DME 培养基购自 Gibco 公司. 小牛血清是杭州四季青产品.

1.2 方 法

1.2.1 VSMC 培养 150 ~ 200 g SD 大鼠, 取胸主动脉, 贴块法培养动脉平滑肌细胞. 培养条件为含 $\varphi = 20\%$ 小牛血清的 DME 培养液, 37 °C, $\varphi = 5\%$ CO_2 . 单克隆肌动蛋白抗体的免疫组化方法鉴定所培养的细胞为平滑肌细胞. 第 5 ~ 8 代细胞用于实验.

1.2.2 样品处理及检测

(1) 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度变化的检测. 将细胞传至特制的 Petri 培养皿 (Meridian, 美国) 中, 待生长至 50% ~ 60% 汇合时, 换无血清条件培养液, 24 h 后, 去掉培养基, 无菌 D-Hanks 缓冲液洗 3 次, 加 40 μL 含 Fluo-3/AM 的无酚红无血清培养液. 避光于 CO_2 孵箱内孵育 40 min. D-Hanks 缓冲液洗 2 次, 加 500 μL 无酚红无血清培养液. 检测前 20 min 加入各种阻断剂或拮抗剂.

(2) 预处理. ①对照组: 无任何处理; ②维拉帕米组: 加入终浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 的维拉帕米, 阻断细胞膜上 Ca^{2+} 通道; ③EGTA 组: 加终浓度为 2 mmol/L 的 EGTA, 螯合胞外培养液中的 Ca^{2+} ; ④普鲁卡因-肝素钠组: 加终浓度 φ 为 1% 的普鲁卡因和 300 $\mu\text{g/mL}$ 肝素钠, 阻断胞内钙库中 Ca^{2+} 释放; ⑤维拉帕米-肝素钠-普鲁卡因组: 同上浓度 3 种药剂共同作用, 同时阻断胞外 Ca^{2+} 内流和胞内钙库中 Ca^{2+} 释放.

经各种处理的 VSMC 上机检测: 各培养皿置

* 收稿日期: 1999-12-16; 作者简介: 田雪梅 (1969 -), 女, 博士后, 讲师.

于570型粘附式细胞仪(ACAS 570)载物台上,以488 nm波长紫外光激发Fluo-3产生荧光.用ACAS 570动态程序对选定的细胞区域(含3~5个细胞)进行扫描成像.每隔20 s扫描1次,扫描60 s,待基线平稳后,加SNAP(终浓度1.0 mmol/L),进行动态观测,每皿扫描10~20 min.将图像输入计算机系统,荧光强度(F)-时间(t)曲线由图像分析软件获得.

1.2.3 Ca^{2+} 在SNAP诱导VSMC凋亡过程中作用的检测

(1) 细胞处理. 将传代细胞接种于盖玻片上(1×10^4 cells/mL),贴壁生长24 h,换成条件培养液再培养24~36 h,根据以上SNAP对VSMC中游离 Ca^{2+} 浓度变化的影响,设计10个组进行实验. ①对照组:不加任何处理;②SNAP组:加终浓度为0.5 mmol/L SNAP;③维拉帕米-SNAP组:加1 $\mu\text{mol/L}$ 维拉帕米和0.5 mmol/L SNAP;④EGTA-SNAP组:加2 mmol/L EGTA和0.5 mmol/L SNAP;⑤普鲁卡因-SNAP组:加 $\varphi = 0.1\%$ 普鲁卡因和0.5 mmol/L SNAP;⑥肝素钠-SNAP组:加300 $\mu\text{g/mL}$ 肝素钠和0.5 mmol/L SNAP;⑦维拉帕米组:加1 $\mu\text{mol/L}$ 维拉帕米;⑧EGTA组:加2 mmol/L EGTA;⑨普鲁卡因组:加 $\varphi = 0.1\%$ 普鲁卡因;⑩维拉帕米-肝素钠-普鲁卡因-SNAP组:同上3种药剂,加300 $\mu\text{g/mL}$ 肝素钠.各种试剂用DMEM培养液配制.每组设5个重复.倒置显微镜下观察细胞形态变化.培养8~10 h后(在其他实验中已经得出0.4或0.5~1.0 mmol/L,8~10 h为SNAP作用细胞爬片的最佳浓度与时长), $\varphi = 4\%$ 多聚甲醛固定细胞爬片,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

(2) 检测. 每组选1张爬片做TUNEL标记,鉴定凋亡细胞.其它爬片进行HE染色,每组选3~5张爬片,每张选3~5个视野,计数凋亡细胞的百分率.

2 结果

2.1 SNAP对VSMC中游离 Ca^{2+} 浓度的影响

VSMC在ACAS 570上观察,呈长梭形或不规则形,轮廓清晰,扫描图中细胞分布和外形与倒置显微镜下所见相符.经Fluo-3/AM标记后的细胞,中部荧光强度较高,周边部相对较弱,由于细胞状态不同,荧光强度有差别.

加入SNAP使VSMC中 Ca^{2+} 荧光强度上升,

在3 min 40 s内达到峰值,并维持较高水平,与加SNAP前相比,升高了约116.7% (图1a);经维拉帕米预处理后,再加入SNAP,胞内 Ca^{2+} 荧光强度升高变得不显著,在17 min 20 s内升高约5.8% (图1b);EGTA存在时,SNAP引起 Ca^{2+} 荧光强度升高不显著, Ca^{2+} 荧光强度呈现波动(图1c);普鲁卡因和肝素的存在,不明显影响SNAP的作用,SNAP仍能使细胞内 Ca^{2+} 荧光强度增强,在2 min 40 s内升高100%,并呈继续升高的趋势(图1d);维拉帕米、普鲁卡因、肝素钠同时存在时,加入SNAP,细胞内 Ca^{2+} 浓度的变化完全消失(图1e).

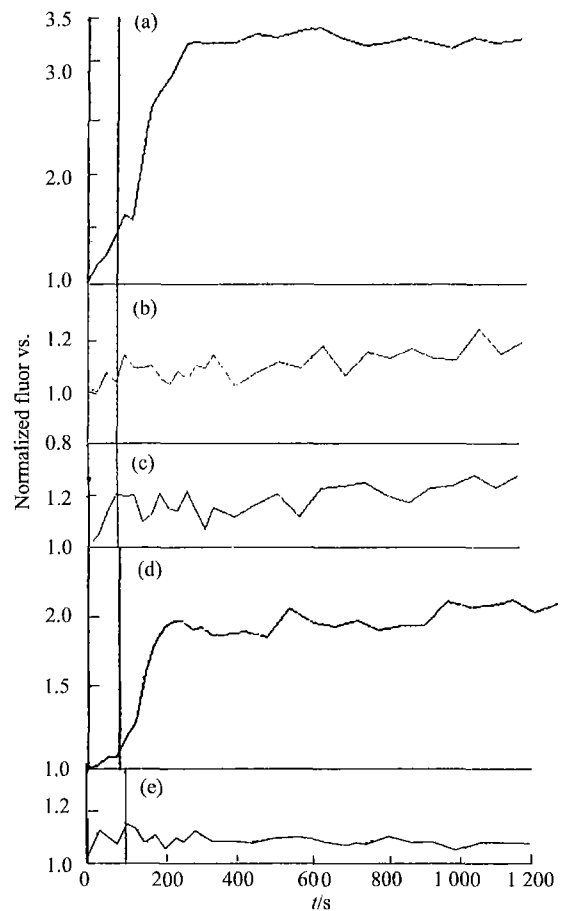


图1 SNAP对VSMC中 Ca^{2+} 的浓度的变化

Fig.1 Changes of Ca^{2+} density in VSMC treated with SNAP

(a) 对照组; (b) 维拉帕米组; (c) EGTA组;
(d) 普鲁卡因和肝素钠组;
(e) 维拉帕米-普鲁卡因-肝素钠组

2.2 Ca^{2+} 在 SNAP 诱导 VSMC 凋亡中的作用

倒置显微镜观察, 实验处理过程中, 在 1 h 后即可见一些细胞与周围的细胞脱离、变圆, 随时间延长形态发生变化的细胞增多. TUNEL 结果也表明大多数细胞死亡以凋亡为主. 细胞爬片 HE 染色后, 计数结果 (图 2) 和 TUNEL 标记染色均显示: ① SNAP 处理组细胞凋亡较未处理组多; ② 维拉帕米或 EGTA 存在, 能使 SNAP 诱导的细胞凋亡被抑制, 而维拉帕米和 EGTA 均不引起 VSMC 凋亡; ③ 普鲁卡因-SNAP 组, 细胞凋亡率较高, 且普鲁卡因本身也引起细胞凋亡; ④ 维拉帕米、肝素钠、普鲁卡因、SNAP 同时存在时, 细胞几乎全部死亡.

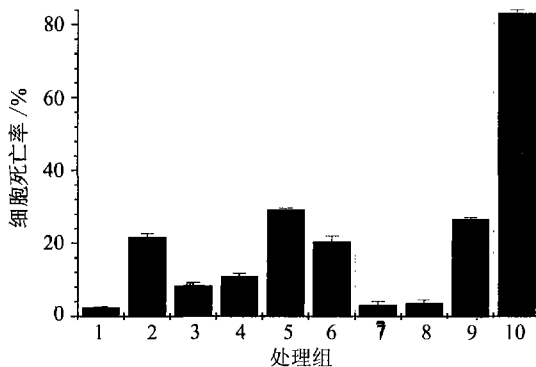


图2 维拉帕米、EGTA、肝素钠、普鲁卡因对 SNAP 诱导凋亡 VSMC 的影响

Fig.2 Influence of verapamil, EGTA, sodium heparin and procaine on apoptosis of VSMC induced by SNAP

- 1 对照组; 2 SNAP 组; 3 维拉帕米-SNAP 组;
4 EGTA-SNAP 组; 5 普鲁卡因-SNAP 组;
6 肝素钠-SNAP 组; 7 维拉帕米组;
8 EGTA 组; 9 普鲁卡因组;
10 维拉帕米-肝素钠-普鲁卡因-SNAP 组

3 讨论

细胞内游离 Ca^{2+} 主要贮存于内质网/肌浆网和线粒体中, 细胞内 Ca^{2+} 浓度变化是由 Ca^{2+} 跨细胞膜转运和细胞内钙库摄取、释放 Ca^{2+} 等过程动态平衡的结果^[5]. 钙从钙库中释放出来是由跨膜的钙库受体通道蛋白介导的. 最主要的受体通道蛋白有 2 种, 即 Ryanodin 受体和 IP_3 受体, 普鲁卡因和肝素则分别是这 2 种受体的特异性拮抗剂, 能阻断依赖 Ryanodin 受体系统和 IP_3 受体系统的钙库中 Ca^{2+} 的释放^[6]. 而维拉帕米则可

以阻断细胞膜上 Ca^{2+} 通道, 2 mmol/L EGTA 则能基本整合细胞外溶液中的 Ca^{2+} ^[7].

SNAP 能提供 NO, NO 为一种新型的信使分子, 它既可作为信使分子, 又可作为效应分子^[8]. SNAP 作用下 VSMC 中游离 $c(\text{Ca}^{2+})$ 的变化, 可能是 NO 作为信使分子作用的一方面. SNAP 作用下, VSMC 中游离 $c(\text{Ca}^{2+})$ 升高, 当存在维拉帕米、EGTA 时, SNAP 诱导 $c(\text{Ca}^{2+})$ 升高的作用能被很大程度地阻断. 而普鲁卡因和肝素钠共同作用不能够改变 SNAP 作用下 $c(\text{Ca}^{2+})$ 升高. 表明胞外 Ca^{2+} 内流是 SNAP 诱导 VSMC 中 $c(\text{Ca}^{2+})$ 升高的主要来源. 这也符合 VSMC 的结构特点: VSMC 的肌浆网不发达, 无横管系统, 线粒体较少, 而内质网和线粒体是细胞内的主要钙库^[5]. 因此, VSMC 胞浆 Ca^{2+} 水平升高主要是依赖细胞外 Ca^{2+} 内流. 维拉帕米和肝素钠预处理的结果显示, SNAP 似乎也刺激胞内钙库中 Ca^{2+} 释放, 且主要是 Ryanodin 系统依赖钙库. 从 Ca^{2+} 荧光强度变化曲线可以看出 $c(\text{Ca}^{2+})$ 变化也呈现钙振荡的形式 (胞浆游离 $c(\text{Ca}^{2+})$ 的一种周期性起伏波动的运动形式)^[6], 符合 Ca^{2+} 的运动特征. 但是, 本实验的结果只能反映 $c(\text{Ca}^{2+})$ 变化的趋势, 而不能说明其准确变化. 对此还需要做进一步的实验验证.

许多因素诱导细胞凋亡都与胞内 $c(\text{Ca}^{2+})$ 升高有关, SNAP 刺激细胞内游离 $c(\text{Ca}^{2+})$ 变化是否与 SNAP 诱导 VSMC 凋亡有关. SNAP 在溶解状态下分解释放 NO, 并且以 NO_3^- 和 NO_2^- 为其最终分解产物^[8], 它们对上述各种钙阻断剂作用的发挥不会形成影响. 因此, 本研究采用了阻断剂与 SNAP 共同孵育 VSMC 的方式进行了进一步的实验. 结果证明阻断胞外 Ca^{2+} 内流, 能抑制胞内 $c(\text{Ca}^{2+})$ 升高, 并且能够有效地阻止 SNAP 诱导 VSMC 凋亡. 从而说明, 胞外 Ca^{2+} 内流导致 VSMC 胞浆中较多的游离 Ca^{2+} 是 SNAP 诱导 VSMC 凋亡的途径之一. 而当完全阻断细胞内、外 Ca^{2+} 来源时, 细胞凋亡未减少, 反而大量死亡, 可能因为此时胞浆内 Ca^{2+} 的动态平衡被破坏, 细胞不能维持正常的生理活动, 最终引起大量死亡. 实验发现普鲁卡因能诱导 VSMC 凋亡, 其中机理尚待查明. 可能因为胞内钙库也参与了调节 VSMC 凋亡的过程, 而且主要是维持细胞的存活.

- [4] FUKUO K, HATA S, SUHARA T. Nitric oxide induces upregulation of fas and apoptosis in vascular smooth muscle [J]. Hypertension, 1996, 27(2): 823 - 826.
- [5] 崔婕, 薛绍白. 胞内钙的稳定调节[J]. 细胞生物学杂志, 1995, 17(3): 97 - 102.
- [6] 林曙光, 郑光华, 段小贝. 细胞信号传导系统—基础医学与临床[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1996. 76 - 81.
- [7] OSHIMI Y, MIYAZKI S. Fas antigen-mediated DNA fragmentation and apoptotic changes are regulated by elevated cytosolic Ca^{2+} level [J]. J Immunol, 1995, 154: 599 - 609.
- [8] MONCADA S, PALMER R M J, HIGGS E A. Nitric oxide: physiology and pharmacology [J]. Pharmacol Rev, 1991, 43: 109 - 142.

(上接第 60 页)

Keywords: Chinese traditional medicines; ICP-AES; dry-ashing