

三氧化二砷诱导血管平滑肌细胞凋亡机制的研究

李 慧 张延斌 宋 豪 肖 菲 张卓奇 李东野

摘 要 **目的** 探讨三氧化二砷(As_2O_3)诱导血管平滑肌细胞(VSMCs)凋亡的机制,为其作为药物涂层支架的涂层药物提供理论依据。**方法** 用改良的植块贴壁法体外培养 SD 大鼠 VSMCs,应用 MTT 法、酶标仪法、流式细胞术等方法观察不同浓度 As_2O_3 诱导 VSMCs 凋亡时裂解液中线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)及半胱天冬蛋白酶-3(caspase-3)活性的变化。**结果** 适宜浓度 As_2O_3 诱导 VSMCs 凋亡时 $\Delta\Psi_m$ 明显下降,与对照组相比 $P < 0.05$;裂解液中 caspase-3 酶活性明显增高,与对照组相比, $P < 0.05$ 。**结论** 适宜浓度的 As_2O_3 可明显促进 VSMCs 凋亡,其可能机制是降低 $\Delta\Psi_m$ 和激活 caspase-3 酶。

关键词 血管平滑肌细胞(VSMCs) 三氧化二砷 凋亡 线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$) caspase-3 酶

Study on the Mechanisms of Arsenic Trioxide - induced Vascular Smooth Muscle Cells Apoptosis in vitro. Li Hui, Zhang Yanbin, Song Hao, Xiao Fei, Zhang Zhuoqi, Li Dongye. West China Second Hospital, Sichuan University, Sichuan 610041, China

Abstract Objective To discuss the mechanism of As_2O_3 - induced vascular smooth muscle cells (VSMCs) apoptosis and provide theoretical basis for the use of As_2O_3 in drug - eluting stents in future. **Methods** VSMCs of SD rats were cultured *in vitro* by modified tissue explants - attached method. NBT reduction test, enzyme - labeling instrument and flow cytometry (FCM) were applied to observe the alteration of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and activity of caspase - 3 when VSMCs apoptosis was induced by different dosage of As_2O_3 . **Results** The mitochondrial transmembrane potential obviously decreased and the caspase - 3 activity obviously increased when VSMCs apoptosis was induced by appropriate dosage of As_2O_3 ($P < 0.05$) as compared with control group. **Conclusion** As_2O_3 of appropriate dosage can obviously promote apoptosis of VSMCs and the mechanism may be decreasing mitochondrial transmembrane potential and activating caspase - 3.

Key words Vascular smooth muscle cells (VSMCs); Arsenic trioxide; Apoptosis; Mitochondrial transmembrane potential; Caspase - 3

As_2O_3 已经广泛地应用于成人及儿童白血病的治疗,而近年的研究发现 As_2O_3 对于 VSMCs 具有明确的抑制增生和促进凋亡作用,并已有动物实验证实 As_2O_3 做为支架的涂层药物可有效诱导兔 VSMCs 凋亡,从而有效抑制血管内膜增生,治疗经皮冠脉血运重建(PCI)术后再狭窄^[1~6]。关于 As_2O_3 诱导 VSMCs 凋亡的机制的报道较少,本文通过探讨 $\Delta\Psi_m$ 及 caspase - 3 在 As_2O_3 诱导 VSMCs 凋亡过程中的作用,为 As_2O_3 的应用提供进一步的理论依据。

材料与方法

1. 细胞培养及分组:雄性 SD 大鼠,6~8 周鼠龄,静脉麻醉后无菌状态下取出胸主动脉,植块贴壁法行 SD 大鼠胸主动脉 VSMCs 的原代、传代培养,鉴定采用第 2 代细胞行 SM α - actin 免疫组化检测^[7]。实验采用 5~6 代细胞,分成 4 组:对照组(10% FBS + DMEM 中不含 As_2O_3),低浓度 As_2O_3 组

(10% FBS + DMEM 中含 $1.0\mu\text{mol/L}$ As_2O_3),中浓度 As_2O_3 组($4.0\mu\text{mol/L}$),高浓度 As_2O_3 组($8.0\mu\text{mol/L}$)。以上各组继续培养 24h 后,用 0.125% 胰蛋白酶消化收集细胞。

2. MTT 法检测细胞活力:VSMCs 以 $2 \times 10^3/\text{ml}$ 密度接种于 96 孔板上,200 微升/孔,并设置平行对照。贴壁并使细胞基本同步于 G_0 期,作用 20h 后加入 MTT 试剂(5g/L ,20 微升/孔),继续培养 4h 至终点以 $150\mu\text{l}$ DMSO 与无水乙醇(体积比为 1:1)的混合液震荡 15min。以波长 570nm 测定各孔光密度(OD)值;每组实验重复 3 次。以 $OD_{\text{测定孔}} - OD_{\text{空白孔}}$ 表示每组的实际 OD 值。以正常对照组的细胞活力为 100%,各实验组的细胞活力 = $OD_{\text{实验组的实际值}} / OD_{\text{对照组的实际值}} \times 100\%$ 。

3. 流式细胞仪检测细胞凋亡:分组同前,收集 1×10^5 个细胞,PBS 洗涤,加入 $195\mu\text{l}$ Annexin V - FITC 结合液重悬细胞。再加入 $5\mu\text{mol}$ Annexin V - FITC 混匀,室温避光孵育 10min,1000r/min 离心 5min,弃上清,加入 $190\mu\text{l}$ Annexin V - FITC 结合液轻轻重悬细胞。加入 $10\mu\text{l}$ 碘化丙啶(propidium iodide,PI),轻轻混匀,冰浴避光放置,随即按照 Annexin V - FITC 细胞凋亡检测试剂盒提供的方法,检测暴露在细胞表面的磷脂酰丝氨酸(PS)。

4. 流式细胞仪检测线粒体跨膜电位的变化:分组同前,收

作者单位:610041 成都,四川大学华西第二医院(李慧、宋豪、肖菲);221000 徐州医学院附属医院内科(张延斌、张卓奇、李东野)

通讯作者:张延斌,电子信箱:zhangyanbin99@sina.com

集 1×10^5 个细胞,250r/min 离心 5min,PBS 洗涤 2 次后重悬于浓度为 $10\mu\text{g/ml}$ 罗丹明 123 染液中,细胞培养箱内孵育 30min,250r/min 离心 5min,PBS 洗涤细胞 2 次,加 PI 至终浓度为 $10\mu\text{g/ml}$,避光染色 5min。流式细胞仪检测激发波长 488~505nm,发射波长 530nm。

5. caspase-3 活性检测:分组同前,收集 1×10^6 个细胞,加入 $100\mu\text{l}$ 细胞裂解混匀,在冰上裂解 10min,4℃ 离心 12000r/min 离心 12min;取 $5\mu\text{l}$ 上清进行蛋白定量,于酶标仪测定样本在 595nm 波长下的吸光度值(OD595)。另 $45\mu\text{l}$ 加 $50\mu\text{l} \times 2$ 反应缓冲液及 $5\mu\text{l}$ caspase 反应底物,混匀,37℃ 孵育 1h,酶标仪测定吸光度值(OD405)。caspase 相对活性 = OD 405/OD 595。

6. 统计学处理:计数资料用 SPSS 13.0 统计软件处理,数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 q 检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),多个实验组与一个对照组比较采用最小显著差法(LSD)。以 $P < 0.05$ 表示在统计学上有显著性差异。

结 果

1. As₂O₃ 对 VSMCs 细胞活力的影响:As₂O₃ 作用

24h 后,实验组 VSMCs 的细胞活力与对照组相比明显降低($P < 0.05$),差异有统计学意义(表 1)。

表 1 As₂O₃对 VSMCs 细胞活力及凋亡百分率的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

As ₂ O ₃ (μmol/L)	细胞活力 (%)	凋亡百分率 (%)
0	100 ± 0	1.99 ± 0.17
1.0	85 ± 6.7▲	11.81 ± 1.15▲
4.0	55 ± 4.3▲	18.24 ± 1.42▲
8.0	34 ± 3.2▲	26.42 ± 1.82▲

▲与对照组相比, $P < 0.05$

2. 不同浓度 As₂O₃ 对 VSMCs 凋亡百分率的影响:在流式细胞仪双变量散点图上,右上象限为晚期凋亡或坏死细胞群,左下象限为存活细胞群,右下象限为早期凋亡细胞群,左上象限为误差细胞群。As₂O₃ 作用于 VSMCs 24h 后与对照组相比,细胞凋亡百分率随 As₂O₃ 浓度的增加而增加(图 1)。

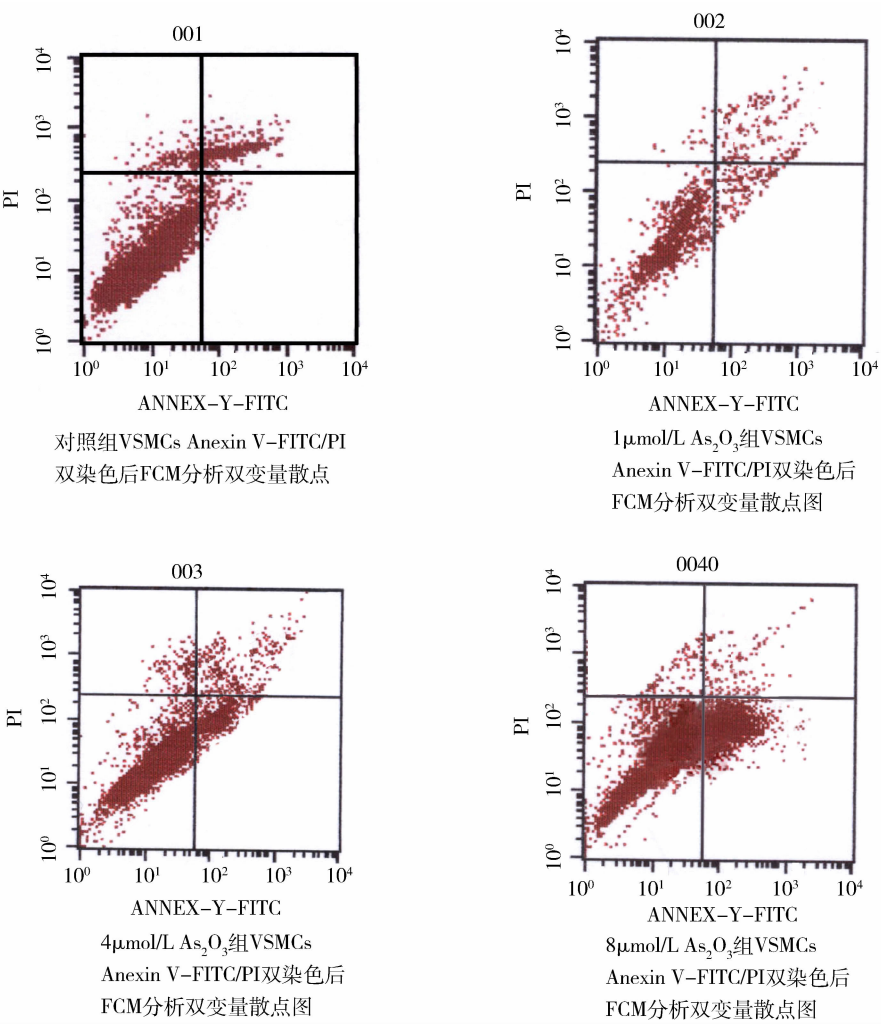


图 1 As₂O₃ 对 VSMCs 凋亡的影响

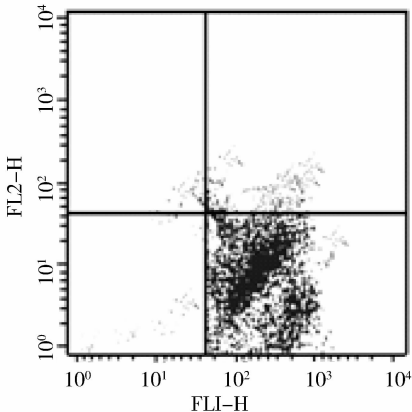
3. As_2O_3 诱导凋亡时对线粒体跨膜电位的影响: 细胞经过 Rh123/PI 双染色。在双变量散点图上, 右下象限为完整细胞膜和稳态 $\Delta\Psi_m$ 的活细胞 ($\text{Rh123}^+ \text{PI}^-$); 左下象限为细胞膜完整但 $\Delta\Psi_m$ 下降的早期凋亡细胞 ($\text{Rh123}^- \text{PI}^-$); 左上象为少量细胞膜受损与 $\Delta\Psi_m$ 下降的晚期凋亡及坏死细胞 ($\text{Rh123}^- \text{PI}^+$); 右上象限极少量的细胞可能为正常细胞与细胞膜的完整性遭到破坏的细胞发生黏附的误差细胞群 ($\text{Rh123}^+ \text{PI}^+$), 但其所占比例极少, 并不影响对结果的分析。表 2、图 2 显示, 作用于 VSMCs

24h 后, 各组中 As_2O_3 都可以明显增高 $\Delta\Psi_m$ 下降的细胞群 ($\text{Rh123}^- \text{PI}^-$) 百分率 ($P < 0.05$), 3 个实验组间两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

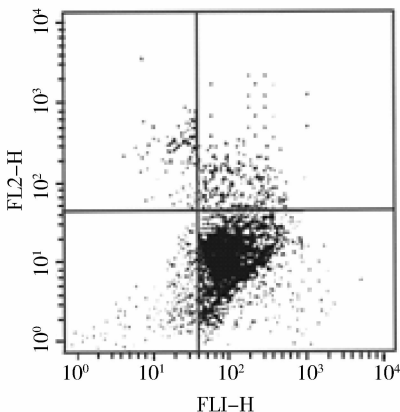
表 2 As_2O_3 诱导 VSMCs 凋亡时 $\Delta\Psi_m$ 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

As_2O_3 ($\mu\text{mol/L}$)	FITC ⁺ PI ⁻ VSMCs 百分数 (%)
0	2.53 ± 0.125
1.0	$4.30 \pm 0.036^\Delta$
4.0	$8.63 \pm 0.035^\Delta$
8.0	$13.50 \pm 0.065^\Delta$

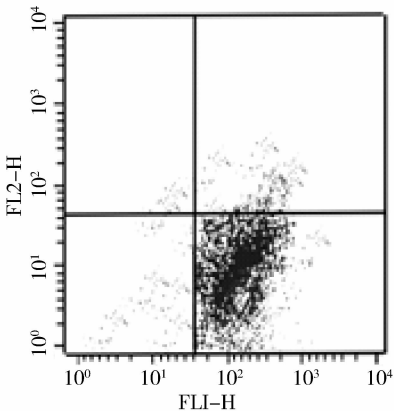
$^\Delta$ 与对照组相比, $P < 0.05$



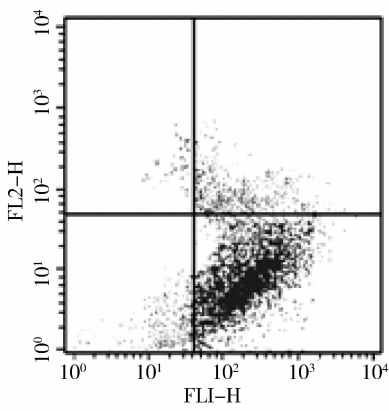
对照组 VSMCs Rh123/PI 双染色后 FCM 分析双变量散点图



1 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组 VSMCs Rh123/PI 双染色后 FCM 分析双变量散点图



4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组 VSMCs Rh123/PI 双染色后 FCM 分析双变量散点图



8 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组 VSMCs Rh123/PI 双染色后 FCM 分析双变量散点图

图 2 As_2O_3 对 VSMCs $\Delta\Psi_m$ 的影响 (FLI-H: Rhodamine 123, FL2-H: PI)

4. As_2O_3 诱导 VSMCs 凋亡时对 caspase-3 活性的影响: $\Delta\Psi_m$ 丧失, 继而造成线粒体外膜通透性改变和细胞色素 C (Cty-c) 释放, 被认为是线粒体途径激活 caspase-3 的上游事件。表 3 显示: VSMCs 经不同浓度 As_2O_3 培养 24h 后, 细胞内 caspase-3 随 As_2O_3 浓度增加其活性逐渐增强, 呈剂量依赖性。对

表 3 As_2O_3 诱导 VSMCs 的凋亡时 caspase-3 的相对活性的变化

As_2O_3 ($\mu\text{mol/L}$)	caspase-3 活性
0	0.35 ± 0.01
1.0	$0.44 \pm 0.02^\Delta$
4.0	$0.53 \pm 0.03^\Delta$
8.0	$0.66 \pm 0.05^\Delta$

$^\Delta$ 与对照组相比, $P < 0.05$

照组与各实验组比较差异极显著 ($P < 0.01$), 各实验组组间两两比较差异均极显著 ($P < 0.01$)。

讨 论

在药物洗脱支架时代, 支架内再狭窄的发生率较前明显减低。目前国内、外药物支架常用的有 3 大类涂层药物: 抗炎 (如可的松)、抗血栓形成 (如肝素) 和抗增生药物, 已经上市的药物包括雷帕霉素 (sirolimus, rapamycin)、紫杉醇 (paclitaxel, taxol) 等都属于抗增生类药物, 它们都在动物实验中显示了令人满意的抑制平滑肌细胞增生、迁移、促进凋亡的效应, 从而有效抑制由支架和球囊损伤导致的血管内膜增生达到治疗再狭窄的目的。

随着对凋亡机制研究的进一步深入, 线粒体在凋亡中的作用越来越受重视。线粒体膜通透性转运孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 是细胞凋亡的调节物, 可能作为细胞死亡的“开关”, 一旦打开, $\Delta\Psi_m$ 下降, 细胞不可逆地进行凋亡^[8,9]。对 As_2O_3 的效应谱进行研究, 也发现 $\Delta\Psi_m$ 下降是几乎所有砷剂引起的各种类型细胞凋亡的共同途径^[10]。研究表明在 As_2O_3 诱导细胞凋亡过程中, $\Delta\Psi_m$ 下降的表现早于细胞凋亡的形态学改变, 是细胞凋亡的特异性标志^[11]。砷剂作用最敏感的细胞器是线粒体。本实验发现, As_2O_3 能够诱导 VSMCs 线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的降低与其诱导细胞凋亡效应明显相关, 研究发现细胞 $\Delta\Psi_m$ 下降后, 线粒体释放凋亡活性物质细胞色素 C (Cyt C) 进入胞质, CytC 可激活 caspase 级联反应最终导致细胞凋亡。caspase-3 是 caspase 级联反应中重要的效应酶, 负责对凋亡途径最后执行阶段的全部

或部分关键性蛋白的酶切。在本实验中, 研究发现 As_2O_3 诱导血管平滑肌细胞凋亡的同时可检测到 caspase-3 酶活性增高, 表明 As_2O_3 诱导血管平滑肌细胞凋亡可能与正调节 caspase-3 活性相关。

参考文献

- 何丽雅, 赖冬波, 佟莉贞. 儿童急性非淋巴细胞性白血病 89 例临床分析. 医学研究杂志, 2009, 38(5): 84-86
- 赵朴. 三氧化二砷治疗慢性粒细胞白血病临床研究. 医学研究杂志, 2008, 37(12): 54-56
- 喻智勇, 王曙光, 秦红军, 等. 三氧化二砷诱导血管内皮细胞凋亡和抑制血管生成的实验研究. 武警医学, 2004, 15(1): 22-24
- 杨巍, 葛均波, 刘红玲, 等. 三氧化二砷洗脱支架防治兔血管损伤后再狭窄的实验研究. 中华心血管病杂志, 2006, 34(9): 14-18
- 陈鹏, 王建华, 胡美玉. 三氧化二砷诱导大鼠动脉平滑肌细胞凋亡的实验研究. 中国临床医学, 2006, 13(2): 296-297
- Yang W, Ge J, Liu H, *et al.* Arsenic trioxide eluting stent reduces neointima formation in a rabbit iliac artery injury model. Cardiovasc Res, 2006, 72(3): 483-493
- 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养[M]. 西安: 世界图书出版社, 1999: 68-73
- Nakagawa Y, Akao Y, Morikawa H, *et al.* Arsenic trioxide-induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines. Life Sci, 2002, 70(19): 2253-2269
- 邢茂, 张恩娟, 叶鑫. 三氧化二砷诱导肿瘤细胞凋亡途径的研究. 中国药理学通报, 2002, 18(1): 87-90
- Chen GQ, Zhu J, Shi XG, *et al.* In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR α /PML proteins. Blood, 1996, 88(3): 1052-1061
- 蔡循, 陈国强, 陈竺, 等. 三氧化二砷治疗肿瘤的机制研究. 肿瘤, 2001, 21(2): 142-144

(收稿: 2010-04-19)

人类 β -防御素-1 基因多态性与慢性阻塞性肺疾病关系的研究

孙丽蓉 张 敏 李冬梅 刘 柱 李水霞 高 扬 张建玲

摘 要 目的 探讨人类 β -防御素-1 (hBD-1) 基因多态性与慢性阻塞性肺病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 之间的关系。**方法** 采用病例对照研究和聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 技术, 检测 COPD 患者 hBD-1 基因型频率分布。**结果** COPD 组 C、G 等位基因频数分别是 85.25% 和 14.75%, 对照组 C、G 等位基因频数分别是 73.33% 和 26.67%, C 等位基因在 COPD 组的频数明显高于健康对照组 ($\chi^2 = 5.237, P < 0.05$, OR: 2.101, 95% CI: 1.104 ~ 3.998)。**结论** hBD-1 基因 668C/G 位点基因多态性与中国北方汉族人群 COPD 易感性有相关性, C 等位基因可能是 COPD 的高