

细胞内游离钙在辛伐他汀诱导大鼠血管平滑肌细胞凋亡中的作用

程刚*, 马骥, 黄进宇, 单江

(浙江大学医学院附属第二医院心内科, 浙江 杭州 310009)

摘要: 目的 研究 3-羟-3-甲戊二酰辅酶 A (HMG-CoA) 还原酶抑制剂辛伐他汀诱导血管平滑肌细胞 (VSMC) 凋亡的机制。方法 以荧光染料 Fura-2/AM 负载后荧光分光光度计法检测细胞内游离钙浓度, 以 DNA 琼脂糖凝胶电泳、流式细胞仪 PI/膜联蛋白 (annexin)V 染色及半胱天冬酶-3 激活来检测细胞凋亡。结果 辛伐他汀 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 孵育 VSMC 后, 细胞内游离钙浓度显著升高, 6 h 时达对照的 3 倍以上 ($P < 0.01$), 维拉帕米 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与辛伐他汀 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 共同孵育 VSMC 6 h 后细胞内游离钙浓度为 $(144 \pm 34) \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$)。辛伐他汀可诱导细胞凋亡率增高、“DNA 梯状”样改变及半胱天冬酶-3 的激活, 这些变化均可被维拉帕米所逆转。结论辛伐他汀通过使细胞外钙大量内流而诱导 VSMC 凋亡。

关键词: 辛伐他汀; 肌, 平滑, 血管; 凋亡; 钙, 细胞内

中图分类号: R972.6

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2003)06-0412-05

如何有效地预防经皮冠状动脉腔内成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 后再狭窄, 已成为人们研究的热点。再狭窄发生的主要原因被认为是血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 过度增殖, 近年发现 PTCA 后早期 VSMC 相对凋亡不足, 增殖与凋亡平衡失调在再狭窄的发生过程中亦起了重要作用^[1]。因此调节 VSMC 增殖与凋亡之间的平衡将有助于治疗再狭窄的发生。最近研究表明, 3-羟-3-甲戊二酰辅酶 A (3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA) 还原

酶抑制剂除传统的降血脂的作用外, 还能调节炎症反应、细胞粘附、血栓形成、内皮功能及平滑肌增殖等一系列生理、病理过程, 如下调巨噬细胞表达 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6, 抑制白细胞与内皮细胞的粘附, 增加内皮细胞一氧化氮合酶 (NOS) 表达等; 作者发现辛伐他汀 (simvastatin) 能通过上调细胞周期调控基因 PTEN, P27 蛋白的表达而抑制 VSMC 的增殖^[2]。近期研究发现 HMG-CoA 还原酶抑制剂能够有效地诱导包括 VSMC 在内的多种细胞发生凋亡, 如 Knapp 等^[3]报道辛伐他汀可使人的 VSMA 对 Fas 配体及细胞因子诱导的凋亡更敏感; 作者也发现辛伐他汀能改变 VSMC 内 Bax/Bcl-2 的比值并激活半胱天冬酶-3 (caspase-3) 而诱导凋亡的发生^[4]。他汀类药物抑制增殖可能与抑制细胞周期使细胞停滞于 G₁/S 限制点有关, 但其诱导凋亡的具体机制仍不清楚。

1 材料与方法

1.1 试剂

胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 DMEM 培养基, 美国 Gibco 产品; 兔抗大鼠半胱天冬酶-3 多克隆抗体 (可识别 32 ku 非活性前体及 20 ku 活性亚单位) 为美国 Santa Cruz 产品; 平滑肌- α 肌动蛋白 (smooth muscle- α actin) 单克隆抗体, 北京中山生物技术有限公司; PI/膜联蛋白 (annexin)V 凋亡检测试剂盒, 澳大利亚 Bender Medsystem 产品; 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜, Boehringer Mannheim 产品; 增强化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 显色试剂盒, Santa Cruz 产品; 辛伐他汀原药由美国 Merck Sharp&Dohme 公司惠赠。

1.2 血管平滑肌细胞的体外培养及鉴定

组织贴块法培养 VSMC。无菌条件下分离 SD 大鼠的胸主动脉, 剪碎后加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液, 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂ 培养箱中静置培养。用光镜和免疫化学方法进行鉴定。实验用 4~6 代细胞。

收稿日期: 2003-05-13 接受日期: 2003-08-20

作者简介: 程刚 (1974-), 男, 浙江省杭州市人, 医学博士, 讲师, 从事心血管病的临床和基础研究。

* 联系作者 E-mail: chenggang_9@hotmail.com Tel: (0571)87783552

1.3 游离钙浓度测定

VSMC用终浓度为 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fura-2/AM在 37°C 水浴中负载25 min,然后分别以细胞外钙浓度($[\text{Ca}^{2+}]_o$) $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的改良Hanks液和无外钙并加入 $1.0\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EGTA的Hanks液清洗细胞3次,以去除细胞外的Fura-2/AM。荧光激发波长分别为340 nm和380 nm测定心肌细胞内钙浓度($[\text{Ca}^{2+}]_i$)。心肌细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 计算公式为: $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (\text{Sb}_1/\text{Sb}_2) \{ (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \}^{51}$,其中 K_d 为Fura-2- Ca^{2+} 解离常数, R 为观察到两激发波长荧光比值(F_{340}/F_{380});在 37°C 下 K_d 为224; R_{\max} 为细胞内Fura-2被 Ca^{2+} 饱和时的两激发波长荧光比值,通过加入离子载体离子霉素(ionomycin) $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 测得; R_{\min} 为Fura-2完全游离,未与 Ca^{2+} 结合时两激发波长的荧光比值,通过加入EGTA $20\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 测得; Sb_1/Sb_2 为Fura-2在无 Ca^{2+} 及与 Ca^{2+} 结合达饱和状态下,在380 nm处荧光强度之比。细胞自身荧光在没有负载Fura-2/AM时测定,计算 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 前减去细胞自身荧光。

1.4 细胞DNA抽提及琼脂糖电泳

收集细胞并计数后,细胞裂解液($\text{NaCl}\ 100\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, Tris $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.0, EDTA $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.5%十二烷基硫酸钠(SDS),蛋白酶K $0.2\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, RNase $200\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 37°C 裂解细胞2 h,酚/氯仿抽提2次,离心($12\ 000\times g$ 离心5 min),取水相,无水乙醇沉淀过夜,以每孔 6×10^5 细胞的DNA量的上样量进行1.6%琼脂糖电泳,观察是否出现DNA“梯状”条带。

1.5 PI/膜联蛋白V染色

细胞接种于6孔板中,经上述处理24 h后用冷PBS洗2次,按试剂盒说明书进行PI/膜联蛋白V染

色,收集细胞,以流式细胞仪检测凋亡及死亡细胞数目。凋亡及死亡的细胞均表现膜磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)外翻以致膜联蛋白V染色阳性,而活细胞膜联蛋白V染色阴性,但细胞凋亡早期仍保持细胞膜的完整性,因此与活细胞一样,PI染料不能透过细胞膜而表现为PI染色阴性,而凋亡晚期及死亡细胞则为PI染色阳性。这样经PI/膜联蛋白V双染后即可区分不同的细胞:左下象限 PI^- ,膜联蛋白 V^- 为活细胞;右下象限 PI^- ,膜联蛋白 V^+ 为凋亡细胞,右上象限 PI^+ ,膜联蛋白 V^+ 为死亡细胞;左上象限 PI^+ ,膜联蛋白 V^- 为机械损伤的细胞。

1.6 Western印迹法分析

搜集细胞,冷PBS洗2次,加入预冷的细胞裂解液, 4°C 裂解细胞1 h,低温 $12\ 000\times g$ 离心10 min,取上清,采用Lowry法进行蛋白定量。取总蛋白 $30\ \mu\text{g}$, 100°C 煮沸3 min,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离蛋白。电泳结束后,将蛋白转印到PVDF膜。转膜结束后,用5% TBST封闭60 min,加入稀释好的半胱天冬酶-3一抗(1:400稀释)室温振荡3 h,HRP标记的羊抗兔IgG孵育1 h, $1\times$ TBST 40 mL洗6~8次 $\times 5\ \text{min}$ 。此后按ECL显色试剂盒说明书操作,曝光后X线片在Pharmacia激光光密度图像扫描系统进行光密度分析。

1.7 结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据处理采用SPSS 9.0行单因素方差分析。

2 结果

2.1 辛伐他汀对血管平滑肌细胞内的游离钙浓度及维拉帕米对其抑制作用的影响

图1A显示孵育0.5 h时对照组 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为(89 ± 25) $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$,并在1,3,6 h始终处于较低浓

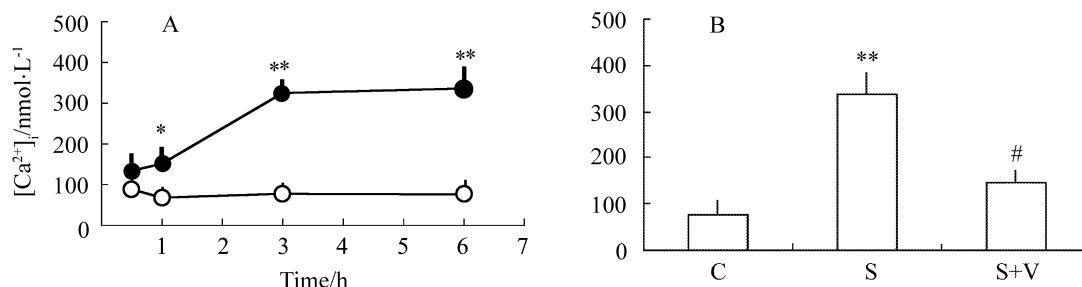


Fig 1. Increase of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle cells (VSMC) in response to simvastatin and its inhibition by verapamil. (A) Effect of simvastatin on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in VSMC at 0.5, 1, 3 and 6 h. (○) control; (●) simvastatin. (B) Verapamil ($80\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) inhibited the increase of free calcium concentration induced by simvastatin at 6 h. C: control; S: simvastatin; V: verapamil. $\bar{x}\pm s$, $n=5$. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with control; # $P<0.05$, compared with simvastatin.

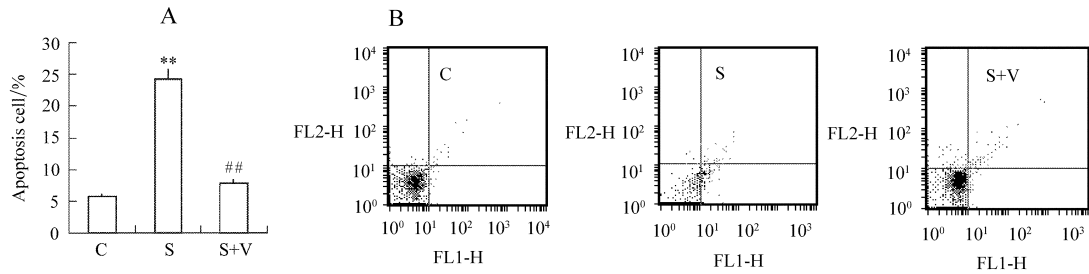


Fig 2. Simvastatin-induced apoptosis and its inhibition by verapamil. C: control; S: simvastatin; V: verapamil. (A) Apoptosis rate of VSMC was measured by flow cytometry with annexin V and propidium iodide double staining. $\bar{x} \pm s$, $n = 4$. ** $P < 0.01$, compared with control; ## $P < 0.01$, compared with simvastatin. (B) A representative of four separate experiments.

度,而辛伐他汀 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 刺激 1 h 后 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 显著高于对照组,刺激 6 h 后达 $(336 \pm 52) \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,为对照组 3 倍以上,维拉帕米 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 能显著抑制辛伐他汀刺激引起的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,维拉帕米与辛伐他汀共同孵育细胞 6 h 后 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 $(144 \pm 34) \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 辛伐他汀及维拉帕米对血管平滑肌细胞凋亡的影响

图 2A 显示,辛伐他汀 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 孵育 24 h 后,VSMC 的凋亡率由对照的 $(5.7 \pm 0.7) \%$ 升至 $(24.2 \pm 1.7) \%$,维拉帕米 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与辛伐他汀 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共同孵育细胞 24 h 后,凋亡率则降至 $(7.9 \pm 0.6) \%$ 。在 DNA 琼脂糖电泳实验中,辛伐他汀 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 孵育细胞 24 h 可见明显的“DNA 状”样改变,这种改变可被维拉帕米 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 有效抑制(图 3)。

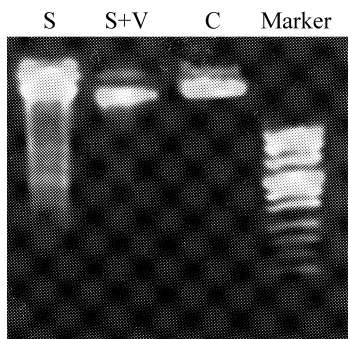


Fig 3. Simvastatin(S)-induced DNA laddering and its inhibition by verapamil(V). C: control. VSMC were exposed to $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ simvastatin for 24 h. See Fig 1 for treatment.

2.3 辛伐他汀及维拉帕米对半胱天冬酶-3 激活的影响

图 4A 显示在辛伐他汀及对照组的 4 个时间点中,均可见半胱天冬酶-3 的 32 ku 酶原形式,而只有在加入辛伐他汀 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 孵育 12 h 后才能检测到半胱天冬酶-3 的 20 ku 活性亚基,直到 48 h 仍能检测到,而对照组及辛伐他汀孵育 2 h 均未见 20 ku 的条带。辛伐他汀 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 孵育细胞 24 h 可清楚见到 20 ku 的条带,维拉帕米 $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与辛伐他汀 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 共同孵育细胞 24 h 后,则不能检测到半胱天冬酶-3 的 20 ku 活性亚基,说明维拉帕米能有效抑制辛伐他汀诱导的半胱天冬酶-3 激活(图 4B)。

3 讨论

凋亡是一个动态的可调节的过程,是受一系列胞内信号及凋亡相关基因调控的。本实验进一步发现 HMG-CoA 还原酶抑制剂辛伐他汀诱导 VSMC 凋亡可能与其过升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 有关,钙通道拮抗剂维拉帕米能有效抑制辛伐他汀诱导的细胞 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高,同时维拉帕米也使辛伐他汀诱导的细胞凋亡率显著下降。

钙离子为细胞内重要的第二信使,广泛参与细胞生命活动的调节,如细胞粘附、聚集,细胞内一些激酶的激活,基因的表达及细胞的增殖与凋亡。近年来研究发现细胞内钙稳态的失调既能诱导细胞凋亡又能抑制细胞凋亡的发生。Gogvadze 等^[6]发现 Bax 使细胞色素 C 释放并诱导凋亡与其破坏了细胞内钙稳态有关,另有研究表明^[7]Bcl-2抑制凋亡可能

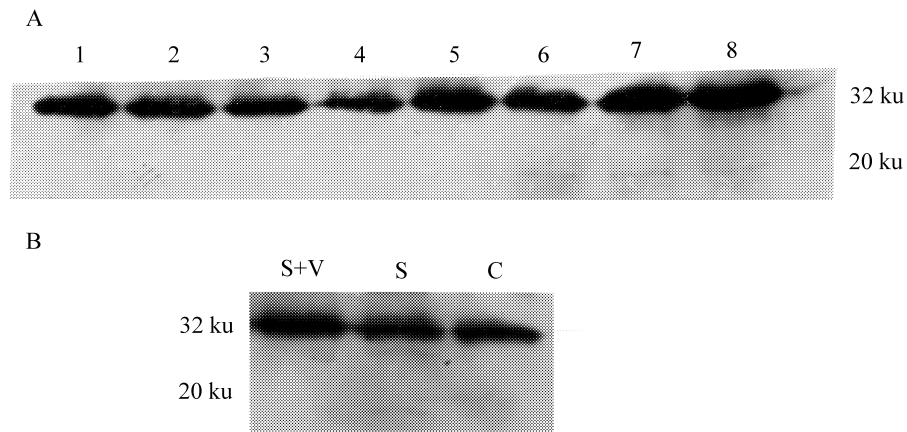


Fig 4. Simvastatin induced caspase-3 activation in VSMC and its inhibition by verapamil. (A) Western blot analysis showed that both control and simvastatin treated groups revealed a 32-ku band (inactive form) but cleaved (active) form of caspase-3, the 20-ku band, could only be detected after 12 h incubated with $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ simvastatin. Lanes 1–4: samples of control for 2, 12, 24, 48 h, lanes 5–8: samples of simvastatin treated for 2, 12, 24, 48 h. (B) $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ verapamil added simultaneously with simvastatin for 24 h inhibited the cleavage of caspase-3. Those Western blot are representative of three independently performed experiments.

与其调节细胞内钙进入内质网有关。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的改变通常有两条途径既细胞外钙内流及细胞内钙储库如内质网释放钙, 作者的研究发现辛伐他汀主要通过前一条途径来升高 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 因为细胞膜上的钙通道拮抗剂维拉帕米能显著的抑制辛伐他汀诱导的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 升高并进一步抑制了辛伐他汀诱导的VSMC凋亡及半胱天冬酶-3的激活。

细胞内有一系列钙离子依赖的激酶与细胞的凋亡密切相关, 如钙结合中性蛋白酶(calpain)^[8]、核酸内切酶^[9]、钙及钙调素依赖的蛋白激酶^[10]等均作为钙离子的下游信号参与了细胞凋亡过程的调节, 因此辛伐他汀是否激活了钙离子依赖的某个激酶进而诱导了VSMC凋亡的发生值得进一步研究。

4 参考文献:

- [1] Pollman MJ, Hall JL, Gibbons GH. Determinants of vascular smooth muscle cell apoptosis after balloon angioplasty injury. Influence of redox state and cell phenotype[J]. *Circ Res*, 1999, **84**(1):113–121.
- [2] Shan J, Cheng G, Fu GS, Weng SX. Simvastatin inhibit proliferation in vascular smooth muscle cells in association with induction of PTEN and p27[J]. *Chin J Cardiol* (中华心血管病杂志), 2002, **30**(10):622–625.
- [3] Knapp AC, Huang J, Starling G, Kiener PA. Inhibitors of HMG-CoA reductase sensitize human smooth muscle cells to Fas-ligand and cytokine-induced cell death[J]. *Atherosclerosis*, 2000, **152**(1):217–227.
- [4] Cheng G, Shan J, Ma J, Shi YP. Simvastatin induced apoptosis and its effect on apoptosis-related gene expression in rat vascular smooth muscle cell[J]. *J Zhejiang Univ (Medical Sci)* (浙江大学学报·医学版), 2002, **31**(1):11–14.
- [5] Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties [J]. *J Biol Chem*, 1985, **260**(6):3440–3450.
- [6] Gogvadze V, Robertson JD, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome C release occurs via Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent mechanisms that are regulated by Bax [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**(22):19066–19071.
- [7] Lam M, DUBYAK G, Chen L, Nunez G, Miesfeld RL, Distelhorst CW. Evidence that Bcl-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic reticulum-associated Ca^{2+} fluxes[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**(14):6569–6573.
- [8] Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis[J]. *J Cell Biol*, 2000, **150**(4):887–894.
- [9] Ojcius DM, Zychlinsky A, Zheng LM, Young JD. Ionophore-induced apoptosis: role of DNA fragmentation and calcium fluxes[J]. *Exp Cell Res*, 1991, **197**(1):43–49.
- [10] Yano S, Tokumites H, Soderling TR. Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway [J]. *Nature*, 1998, **396**(6711):584–587.

Effect of intracellular free calcium on simvastatin induced vascular smooth muscle cells apoptosis in rats

CHENG Gang, MA Ji, HUANG Jin-Yu, SHAN Jiang

(Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Medical School, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

Abstract: **AIM** To investigate the mechanisms involved in simvastatin induced apoptosis in vascular smooth muscle cells (VSMC). **METHODS** Cultured VSMC was treated with simvastatin. Intracellular free calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) was measured by fluorescent Ca^{2+} -sensitive probe fura-2 acetoxyethyl ester (Fura-2/AM), apoptotic changes were distinguished by annexin V binding, DNA fragment and caspase-3 activation. **RESULTS** When incubated with $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ simvastatin, $[Ca^{2+}]_i$ in VSMC increased with time and reached to $(336 \pm 52) \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ at 6 h, more than 3-fold of control ($P < 0.01$, $n = 5$). Verapamil ($80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), a membrane voltage-dependent Ca^{2+} channel blocker, inhibited the increase of free calcium concentration induced by

simvastatin from $(336 \pm 52) \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ to $(144 \pm 34) \text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.01$). Caspase-3 also activated by simvastatin after 12 h. Verapamil could efficiently inhibit simvastatin induced caspase-3 activation. Furthermore, $80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ verapamil could decrease simvastatin induced apoptosis rate from $(24.2 \pm 1.7)\%$ to $(7.9 \pm 0.6)\%$ ($P < 0.01$) and also prevented simvastatin induced DNA laddering. **CONCLUSION** Simvastatin could increase $[Ca^{2+}]_i$ mainly through calcium influx from extracellular solution and then induces apoptosis.

Key words: simvastatin; muscle, smooth, vascular; apoptosis; calcium, cytosolic

(本文编辑 石 涛)