文章编号:1000-5404(2011)07-0711-04

论著

腺病毒介导过表达 ANT1 基因诱导大鼠血管平滑肌细胞凋亡

李 燕,卢 巍,任 可,李 莹,宋耀明 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院心血管内科,全军心血管病研究所)

【摘要】 **目的** 利用腺病毒载体转染体外培养的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs),研究过表达腺嘌呤核苷酸转位酶1(adenine nucleotide translocase 1,ANT1)对大鼠 VSMCs 凋亡的影响。**方法** 用携带 ANT1 的腺病毒载体(Ad-ANT1)或空载体腺病毒载体(Ad-GFP)感染 VSMCs,采用激光共聚焦观察 Hoechst33258 染色后细胞凋亡情况,流式细胞术检测 Annexin V 标记细胞凋亡率。Western blot 检测 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达。**结果** 激光共聚焦观察转染 Ad-ANT1 后 48 h 细胞出现凋亡,且凋亡率[(13.40±1.14)%]与转染空载体对照组[(1.80±0.84)%]相比较差异有统计学意义($P<0.01$)。流式细胞术检测转染 Ad-ANT1 后 48 h 细胞凋亡率[(10.66±1.75)%]明显高于转染空载体组细胞[(3.13±0.37)%]($P<0.05$)。Western blot 结果显示转染 Ad-ANT1 后 Bax 蛋白表达明显高于转染空载体组,Bcl-2 蛋白表达2组比较无明显差异。**结论** 腺病毒介导过表达 ANT1 可诱导大鼠 VSMC 的凋亡,其机制可能通过上调 Bax 实现。

【关键词】 腺嘌呤核苷酸转位酶1;血管平滑肌细胞;凋亡
【中图法分类号】 R322.12;R329.28;R394.2 【文献标志码】 A

Adenovirus-mediated ANT1 gene induces apoptosis of vascular smooth rat muscle cells

Li Yan, Lu Wei, Ren Ke, Li Ying, Song Yaoming (Institute of Cardiovascular Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037, China)

【**Abstract**】 **Objective** To identify the effects of adenovirus mediated adenine nucleotide translocase 1 (ANT1) gene transfection on the apoptosis of rat vascular smooth muscle cells (VSMCs). **Methods** After adenovirus-mediated ANT1 (Ad-ANT1) or adenovirus (Ad-GFP) infected rat primarily cultured VSMCs, Hoechst 33258 staining for the VSMCs was observed by laser confocal microscopy for cell apoptosis. Flow cytometric analysis was used to detect the proportion of VSMCs apoptosis with Annexin V staining. The expressions of Bcl-2 and Bax were also detected by Western blot analysis. **Results** Laser confocal microscopy showed a progressive increase in the percentage of apoptotic VSMCs after Ad-ANT1 infection [(13.40±1.14)% in Ad-ANT1 group *vs* (1.80±0.84)% in Ad-GFP group, $P<0.01$]. Flow cytometric analysis indicated a significant increase in the percentage of apoptotic VSMCs after that Ad-ANT1 infection [(10.66±1.75)% in Ad-ANT1 group *vs* (3.13±0.37)% in Ad-GFP group, $P<0.05$]. The results of Western blotting indicated that the Bax expression was upregulated in VSMCs transfected with adenovirus-mediated ANT1 (Ad-ANT1) compared with cells of adenovirus-empty (Ad-GFP) group. Meanwhile, there is no significant difference in the Bcl-2 expression in two groups. **Conclusion** Overexpression of ANT1 gene may induce apoptosis of rat VSMCs through upregulating Bax expression.

【**Key words**】 adenine nucleotide translocase 1; vascular smooth muscle cells; apoptosis

Corresponding author: Song Yaoming, Tel: 86-23-68755196, E-mail: ymsong@mail.xqhospital.com.cn

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMCs)凋亡不足与异常增殖参与了众多心血管疾病的发生、发展过程,如动脉粥样硬化及血管损伤后再狭窄、高血压等[1-2]。因此有关血管平滑肌细胞凋亡的研究目前已经成为心血管疾病防治研究的热点。腺嘌呤核苷酸转位酶(adenine nucleotide translocase, ANT)是位于线粒体内膜上的转运蛋白,参与由线粒体经内膜到胞质转运氧化磷酸化过程中的 ATP 和 ADP,与细胞内的能量代谢密切相关。有研究发现 ANT 参与线粒体膜渗透性转换(mitochondrial permeability transi-

【通信作者】 宋耀明,电话:(023)68755196,E-mail:ymsong@mail.xqhospital.com.cn

tion, MPT),从而与细胞凋亡关系紧密[3],其作用与能量转运无关。ANT 有 4 种异构体,其中 ANT1 诱导凋亡作用最强[4],但 ANT1 在血管平滑肌细胞凋亡中的作用研究,国内外尚少见报道。本实验应用腺病毒介导 ANT1 在 VSMCs 中过表达,采用激光共聚焦及流式细胞术证实转染 Ad-ANT1 后能诱导 VSMCs 发生凋亡,并通过研究转染后细胞凋亡相关蛋白表达探讨 ANT1 作用机制。通过对 ANT1 在 VSMCs 凋亡中的作用研究有望发现血管损伤后再狭窄及动脉粥样硬化疾病防治中新的靶点。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

Sprague Dawley(SD)大鼠由第三军医大学实验动物中心提供。雄性,体质量约 120 g。DMEM 培养基和胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司,pShuttle-GFP-CMV 重组穿梭质粒、pAdxsi 重组腺病毒骨架质粒以及感受态细菌 DH5α 购自诺赛基因组研究中心有限公司,兔抗鼠 α-actin 抗体购自北京博奥森公司,FITC 标记的山羊抗兔二抗购自中杉金桥公司,抗 Bax 单克隆抗体、抗 Bcl-2 单克隆抗体和 HRP 标记的二抗购自 Santa Cruz Biotechnology 公司,Hoechst33258 购自碧云天公司,Annexin V 凋亡检测试剂盒购自南京凯基公司,其他试剂采用国产分析纯试剂。

1.2 VSMC 的培养和鉴定

组织块法培养 SD 大鼠血管平滑肌细胞,操作过程参考文献[5]:在无菌条件下取其胸主动脉段,移入超净工作台上,在盛有 PBS 液的培养皿上剥除动脉外膜,刮除内膜以去除内皮细胞。用眼科弯剪反复将其剪成 1 mm × 1 mm 左右大小,以 0.15 cm 左右的间距将组织块均匀分布于培养瓶底部。让瓶底朝上并向瓶内注入含 10% 胎牛血清 DMEM 培养液 3 ~ 4 ml,置于 37 ℃的 CO_2 孵箱中,4 ~ 6 h 后将培养瓶翻转,使组织块完全浸入培养液中继续孵育。待有细胞从组织块周围游出后换液,以后约 2 ~ 3 d 换液 1 次。1 周左右传代,4 ~ 10 代即可用于实验。

取 4 代细胞按 3×10^3/孔接种于 96 孔板,37 ℃的 CO_2 孵箱中培养,第 2 天取出固定用于鉴定:吸弃培养基,PBS 洗 3 次,3 min/次。4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗 3 次。0.3% Triton X-100 15 min,37 ℃水浴。PBS 洗 3 次,山羊血清封闭 30 min,37 ℃水浴。加入兔抗鼠 α-actin 抗体,4 ℃过夜。PBS 洗 3 次,加入二抗(FITC 标记)37 ℃ 水浴 60 min。PBS 洗 3 次,荧光显微镜下观察。PBS 作为阴性对照。

1.3 腺病毒载体的构建和感染及实验分组

采用 pAdxsi 载体系统构建携带 ANT1 基因的腺病毒载体,同时携带绿色荧光蛋白(GFP)报告基因,可通过荧光显微镜观察 GFP 表达监测目的基因导入与表达情况,同时扩增仅含有 GFP 基因的空载体腺病毒(Ad-GFP)作为病毒对照。最后经测序鉴定载体中目的基因序列正确。用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基培养细胞,感染病毒前用 0.5% FBS 的 DMEM 同步化细胞 24 h。病毒按感染复数 MOI 为 80 感染细胞,2 h 后吸弃培养基,换为 10% FBS 的 DMEM 培养基继续培养。实验分 3 组:空白对照组,Ad-GFP 转染组,Ad-ANT1 转染组。

1.4 激光共聚焦成像技术

按细胞数 5×10^4/孔在 24 孔板中接种细胞爬片,置于 37 ℃ CO_2 培养箱中孵育 24 h,用 Ad-ANT1 和 Ad-GFP 以感染复数 MOI 为 80 感染细胞,2 h 后更换培养基。48 h 后取出吸弃培养基,PBS 清洗 3 次,加 4% 多聚甲醛 300 μl/孔,固定 15 min,PBS 清洗 3 次,避光加入 Hoechst3328 300 μl/孔,染色 10 min,抗荧光淬灭封片剂封片,在激光共聚焦显微镜下观察。随机挑选 5 个视野计数凋亡细胞的比例。

1.5 Annexin V 检测细胞凋亡

细胞培养在 50 ml 培养瓶中,待细胞融合至 70% ~ 80% 时加入 Ad-ANT1 和 Ad-GFP 以 MOI 为 80 感染细胞,2 h 后更换培养基。48 h 后用 0.25% 的胰酶(不含 EDTA)消化细胞,1 000 r/min 离心 5 min,PBS 清洗 2 次,依据试剂盒说明书操作加入试剂,然后用流式细胞仪上机检测。

1.6 Western blot 检测凋亡相关因子 Bax 和 Bcl-2

实验分组同 1.3,于病毒感染后 48 h 收集细胞,裂解各组细胞提取总蛋白,测定蛋白浓度,取 100 μg 蛋白/孔进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转膜,用 50 g/L 脱脂奶粉封闭 1 h 后用 1∶500 (体积比)稀释的一抗(抗 Bcl-2 或抗 Bax 的单克隆抗体)进行杂交,4 ℃过夜,相应二抗采用 1∶3 000 (体积比)稀释,用化学发光法进行显色反应。用凝胶成像分析系统分析免疫印迹杂交带光密度值。

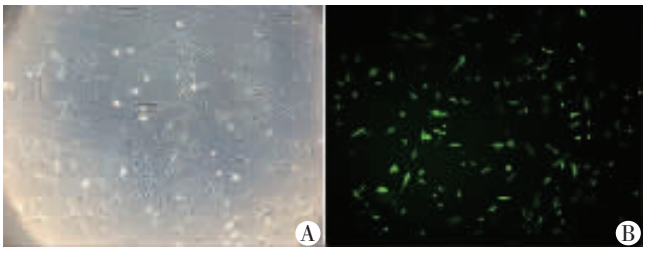
1.7 统计学分析

采用 SPSS 11.5 软件对资料进行分析,多组均数比较采用单因素方差分析。方差齐时,两两间比较采用 LSD 法,方差不齐时,两两比较采用 Tamhaneps T 法。所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 VSMC 鉴定结果

光镜下显示正常 VSMC 细胞形态多样,常表现为长梭形、菱形或星形等,细胞核圆形、居中(图 1A)。荧光显微镜显示绿色荧光的为鉴定正确的血管平滑肌细胞(FITC 显示为绿色荧光),鉴定阳性率 >95%(图 1B)。

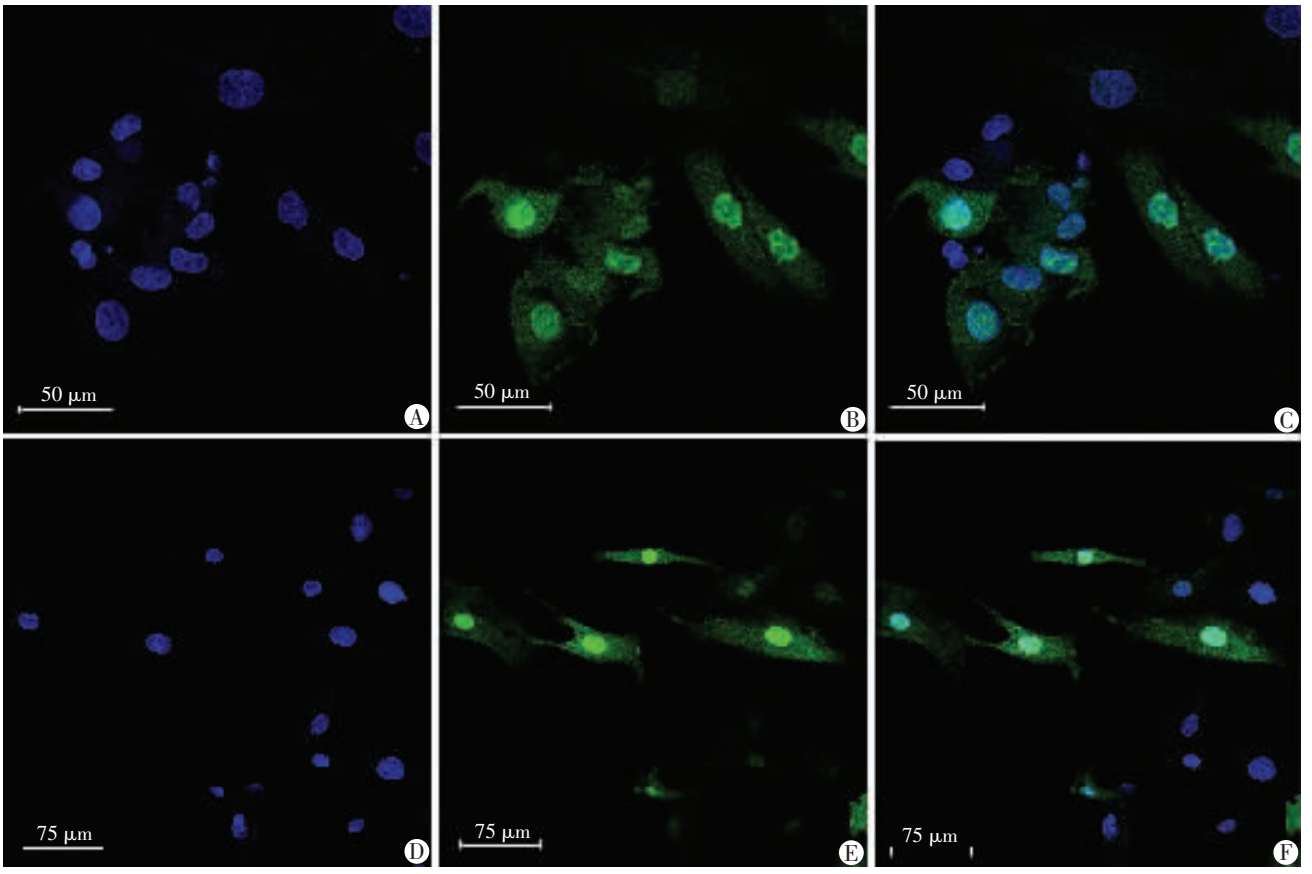


A:光镜观察;B:荧光显微镜观察

图 1 VSMC 培养及鉴定结果(×100)

2.2 激光共聚焦检测结果

Hoechst3328 是一种细胞核染料,荧光显微镜下观察被染色细胞核成蓝色。正常细胞的细胞核显示均一蓝色荧光,转染 Ad-ANT1 组细胞出现一定的凋亡率,细胞核形态不规则,呈现凋亡细胞核特征性改变:核固缩,荧光染色浓集或者核碎裂(图 2)。



A、D：Hoechst 33258 标记；B、E：GFP 标记；C、F：Hoechst 33258 + GFP 标记（融合图像）；A ~ C：Ad-ANT1 转染组；D ~ F：Ad-GFP 转染组

图 2　Hoechst 33258 染色观察转染后各组 VSMC 凋亡　（激光共聚焦显微镜）

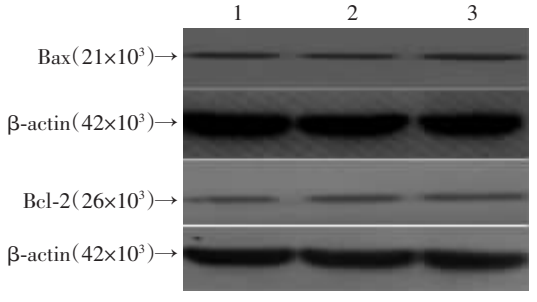
转染 48 h 后，各组凋亡细胞阳性率 Ad-ANT1 组（13.40 ± 1.14）% 明显高于 Ad-GFP 组（1.80 ± 0.84）%（$P < 0.01$），与空白对照组（1.00 ± 0.70）% 相比也有明显差异（$P < 0.01$）。

2.3　Annexin V 检测细胞凋亡结果

病毒感染细胞 48 h 后，流式细胞术检测显示早期凋亡细胞的阳性率 Ad-ANT1 组（10.66 ± 1.75）% 明显高于 Ad-GFP 对照组（3.13 ± 0.37）% 及空白对照组（2.52 ± 0.49）%（$P < 0.05$）。

2.4　Western blot 检测 Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达

Western blot 检测 Bcl-2 蛋白的表达在各组细胞中无明显差异，Ad-ANT1 转染组与 Ad-GFP 转染组及空白对照组相比，Bax 表达明显升高（图 3）。



1：空白对照组；2：Ad-GFP 转染组；3：Ad-ANT1 转染组

图 3　Western blot 检测各组细胞中 Bax 和 Bcl-2 的表达

3　讨论

ANT 的基因序列在种系进化中高度保守，Shen 等[6]研究发现与哺乳动物 ANT 同源的线粒体膜蛋白 WAN1 是秀丽线虫细胞凋亡的核心机制之一。由于秀丽线虫是了解细胞凋亡极好的模型，故 ANT 被认为可能是细胞凋亡的关键基因。ANT 有 4 种异构体，在不同组织细胞中的表达是不同的。ANT1 主要在骨骼肌和心肌细胞的线粒体内膜上表达[7]。ANT1 和 ANT3 与诱导细胞凋亡有关，ANT2 和 ANT4 与细胞凋亡抑制有关，而其中 ANT1 诱导凋亡作用最强。Baines 等[8]研究发现通过腺病毒载体在大鼠心肌细胞中过表达 ANT1，引起大鼠心肌细胞的凋亡。Jang 等[9]研究表明过表达 ANT1 可引起肿瘤细胞凋亡，在体外实验中可缩小肿瘤体积。而关于 ANT1 在血管平滑肌细胞凋亡中的作用研究国内外尚少见报道。

血管平滑肌细胞（vascular smooth muscle cells，VSMC）密度增加是血管形成术后再狭窄公认的特点，而 VSMC 凋亡不足导致内膜细胞构成增加是再狭窄发

生的一种发病机制。冠状动脉内支架植入术(PCI)及经皮腔内冠状动脉形成术(PTCA)后,最主要的并发症是术后6个月内30%～50%发生再狭窄,表现为VSMC的增殖和迁移及新生内膜的增厚。有研究表明用转基因技术增加VSMC凋亡可防治再狭窄[10]。因此抑制细胞增殖和促进细胞凋亡是防治动脉粥样硬化和血管损伤后再狭窄的重要手段,针对VSMC凋亡方面的研究成为治疗再狭窄的热点领域。

本实验利用腺病毒介导转基因技术,在体外培养的VSMCs中过表达ANT1,首次证实了ANT1能够诱导VSMCs发生凋亡。激光共聚焦显示转染Ad-ANT1的VSMCs许多细胞显示凋亡形态,凋亡细胞计数与对照组转染Ad-GFP细胞及空白对照组相比有明显差异。细胞凋亡的早期细胞膜表面磷脂酰丝氨酸(PS)从膜内转移到膜外,发生凋亡时细胞膜上这种磷脂分布不对称性被破坏而使PS暴露在细胞膜表面。Annexin V与PS有高度亲和性,通过流式细胞仪检测Annexin V和7-AAD双染可作为凋亡检测的有力手段。本实验流式细胞术结果显示Ad-ANT1转染组细胞凋亡率与Ad-GFP组相比有明显差异,由此证实腺病毒介导的过表达ANT1可以引起VSMCs的凋亡。

ANT与线粒体膜渗透性转运孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)相关联,但具体的作用机制仍有争议。可能是ANT作为MPTP的构成成分之一或者通过与其主要成分相互作用,引起线粒体膜渗透性改变,从而诱导细胞的凋亡[11-13]。最近的研究发现ANT1诱导凋亡的作用与MPTP不直接相关,而是通过上调凋亡调节蛋白Bax实现[8]。

细胞凋亡存在多条信号转导通路,其中"线粒体途径"是最重要的途径,Bcl-2家族蛋白是该途径的关键调节蛋白。按其在细胞凋亡中作用不同可分为抗凋亡的Bcl-2亚族(包括Bcl-2、Bcl-xL和Bcl-1等)和促凋亡的Bax家族(包括Bax、Bak、Bid和Bad等),其中Bcl-2和Bax是其中最重要的成员[14]。在凋亡刺激因素作用下,以无活性形式存在于胞质中的Bax蛋白会发生构型变化,向线粒体转移,并与Bcl-2形成异源二聚体,使Bcl-2的活性受到抑制,导致线粒体膜上通透性转运孔不可逆开放,启动并维持细胞凋亡的"线粒体途径"。本实验结果发现,过表达ANT1能上调Bax蛋白表达,使Bax/Bcl-2比例升高,可能促使Bax从胞浆向线粒体转移,导致线粒体跨膜电位下降,从而诱导细胞凋亡的发生。

因此,过表达ANT1基因可以有效诱导体外培养VSMC的凋亡,其作用机制可能通过上调Bax实现,故ANT1作为平滑肌细胞凋亡的关键基因,为治疗损伤性血管疾病拓展了新思路,为防治动脉粥样硬化以及血管损伤后再狭窄等心血管常见疾病的基因治疗提供了新靶点。

参考文献:

[1] Clarck M, Bennett M. The emerging role of vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis and plaque stability [J]. Am J Nephrol, 2006, 26(6): 531-535.

[2] Littlewood T D, Bennett M R. Apoptotic cell death in atherosclerosis [J]. Curr Opin Lipidol, 2003, 14(5): 469-475.

[3] Bauer M K, Schubert A, Rocks O, *et al*. Adenine nucleotide translocase-1, a component of the permeability transition pore, can dominantly induce apoptosis[J]. J Cell Biol, 1999, 147(7): 1493-1502.

[4] Zamora M, Granell M, Mampel T, *et al*. Adenine nucleotide translocase 3 (ANT3) overexpression induces apoptosis in cultured cells [J]. FEBS Lett, 2004, 563(1/3): 155-160.

[5] 刘幸平, 刘清, 郑燕珊, 等. 大鼠血管平滑肌细胞的培养与鉴定[J]. 汕头大学医学院学报, 2008, 21(3): 137-139.

[6] Shen Q, Qin F, Gao Z, *et al*. Adenine nucleotide translocator cooperates with core cell death machinery to promote apoptosis in Caenorhabditis elegans [J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(14): 3881-3893.

[7] Dolce A, Scarcia P, Iacopetta D, *et al*. A fourth ADP/ATP carrier isoform in man, identification, bacterial expression, functional characterization and tissue distribution[J]. FEBS Lett, 2005, 579(3): 633-637.

[8] Baines C P, Molkentin J D. Adenine nucleotide translocase-1 induces cardiomyocyte death through upregulation of the pro-apoptotic protein Bax[J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(6): 969-977.

[9] Jang J Y, Choi Y, Jeon Y K, *et al*. Over-expression of adenine nucleotide translocase 1 (ANT1) induces apoptosis and tumor regression *in vivo*[J]. BMC Cancer, 2008, 8: 160.

[10] Bochaton-Piallat M L, Gabbiani F, Redard M, *et al*. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening[J]. Am J Pathol, 1995, 146(5): 1059-1064.

[11] Belzacq A S, Vieira H L, Kroemer G, *et al*. The adenine nucleotide translocator in apoptosis[J]. Biochimie, 2002, 84(2/3): 167-176.

[12] Halestrap A P. What is the mitochondrial permeability transition pore? [J]. J Mol Cell Cardiol, 2009, 46(6): 821-831.

[13] Zhivotovsky B, Galluzzi L, Kepp O, *et al*. Adenine nucleotide translocase: a component of the phylogenetically conserved cell death machinery[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(11): 1419-1425.

[14] Liston P, Fong W G, Korneluk R G. The inhibitors of apoptosis: there is more to life than Bcl2 [J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8568-8580.

(收稿:2010-11-18 修回:2011-01-04)

(编辑 王 红)