

• 临床研究 •

腹主动脉瘤血管平滑肌细胞凋亡和自噬研究

杜亚豪, 郑月宏, 田 翠, 李汇华

【摘要】 目的 探讨血管平滑肌细胞(SMC)凋亡和自噬与腹主动脉瘤(AAA)发病的关系。方法 采用原位末端 DNA 标记(TUNEL)技术观察 AAA 和正常人正常主动脉组织中 SMC 凋亡的情况,并用免疫组织化学分析其中 LC3 的蛋白表达。提取 AAA 和正常主动脉组织 RNA,采用 RT-PCR 方法检测其中与自噬相关的基因 Beclin1、Atg4b、Bnip3、Vps34 的表达。结果 AAA 组织中凋亡的 SMC 明显高于正常主动脉组织($P<0.05$); LC3 蛋白在 AAA 中的表达高于正常主动脉组织($P<0.05$); AAA 中 Beclin1、Atg4b、Bnip3、Vps34 表达水平明显高于正常主动脉组织($P<0.05$)。结论 SMC 凋亡和自噬在 AAA 的发病中起重要作用。

【关键词】 主动脉瘤,腹;细胞凋亡;自噬;肌,平滑,血管

【中图分类号】 R363.2

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2010)03-05

Apoptosis and autophagy of vascular smooth muscle cells of abdominal aortic aneurysm

DU Yahao, ZHENG Yuehong, TIAN Cui, et al

Institute of Basic Medicine, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship of apoptosis and autophagy of vascular smooth muscle cells (SMC) with the pathogenesis of abdominal aortic aneurysm (AAA). Methods *In situ* terminal transferase-mediated dUTP nick end-labeling(TUNEL) was used to detect the apoptosis of SMC of AAA and human normal aorta. The expression of LC3 was measured by immunohistochemistry. RNA extraction from the tissue of AAA and human normal aorta was performed. The mRNA levels of autophagy-related genes Beclin1, Atg4b, Bnip3, and Vps34 are tested by RT-PCR. Results The number of TUNEL-positive SMC in AAA was higher than that in normal aorta ($P<0.05$). The expression level of LC3 protein was significantly increased in AAA compared with that in normal aorta ($P<0.05$). The mRNA expression levels of Beclin1, Atg4b, Bnip3 and Vps34 were markedly up-regulated in AAA compared with that in normal aorta ($P<0.05$). Conclusion The apoptosis and autophagy of vascular SMC play an important role in the pathogenesis of AAA.

【Key words】 aortic aneurysm, abdominal; apoptosis; autophagy; muscle, smooth, vascular

腹主动脉瘤(abdominal aortic aneurysm, AAA)是一种以腹主动脉局限性扩张为主的血管疾病,多见于65岁以上老年人,病死率较高。AAA的发病机制尚未明确,普遍的观点认为是遗传、环境、血流动力学和免疫等多种因素共同作用的结果。目前认为其发病的主要机制是主动脉细胞外基质的降解和中膜平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)的减少。SMC是腹主动脉中膜的主要细胞,直接或间接地分泌弹力蛋白、胶原蛋白及其他基质蛋白,对于动脉弹力板层的构筑和修复起着十分重要的作用。细胞凋亡和自噬都是主动而有序的细胞自我消亡,SMC的凋亡和自噬与心血管系统生理病理重构密切相关。本研究通过检测AAA与正常人正常主动脉组织SMC的凋亡情况,以及在mRNA

和蛋白水平上检测其中的细胞自噬情况,探讨SMC的凋亡和自噬在AAA发病中的机制。

1 材料与方法

1.1 组织和试剂 10例AAA组织由北京协和医院血管外科医师术中获取后提供,6例正常人正常主动脉组织取自健康非正常死亡尸体(死亡时间 <10 min)。在无菌、无RNA酶条件下,于平肾动脉下方约4 cm处切取主动脉壁,迅速冻存在液氮中备用。Trizol购自美国Invitrogen公司,LC3抗体购自美国R&D公司。免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物公司,TUNEL试剂盒购自瑞士Roche公司,RT-PCR试剂盒购自Qiagen公司。其余均为国产分析纯试剂。

作者单位:100730北京市,中国医学科学院基础医学研究所(杜亚豪、田翠、李汇华);100730北京市,北京协和医院血管外科(郑月宏)

通讯作者:李汇华, Tel:010-65296494, E-mail:hhli1935@yahoo. cn

1.2 组织凋亡染色 AAA 和正常主动脉组织固定、包埋,制作石蜡切片,厚度 4 μm,进行组织凋亡染色,操作程序严格按照 TUNEL 试剂盒说明书进行,DAB 显色,阳性细胞为细胞核中有棕色颗粒,呈散在分布。400 倍光学显微镜下随机计数 6 个视野,共约 2000 个细胞,计算每个视野阳性细胞的百分数后进行统计学分析。

1.3 免疫组织化学检测 LC3 蛋白的表达 免疫组化试剂盒为中杉金桥 PV-9000 二步法检测试剂,严格按照说明书操作,一抗用兔抗人 LC3 抗体,工作浓度为 1 : 1000;DAB 显色,苏木素复染。显微镜下观察棕黄色染色为阳性,用计算机彩色图像分析系统分析每张切片上中膜免疫组化染色阳性细胞的染色强度(平均积分吸光度值)。

1.4 RT-PCR 法半定量检测 Beclin1、Atg4b、Bnip3、Vps34 基因表达 严格按照按照 Trizol 说明书提取 AAA 和正常主动脉组织总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。逆转录过程按 RT-PCR 试剂盒说明书操作,PCR 扩增循环参数 Beclin1 为 94℃ 3 min,95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s,共 32 个循环,72℃ 终延伸 10 min;Atg4b、Bnip3、Vps34 为 94℃ 3 min,95℃ 1 min,58℃ 1 min,72℃ 1 min,共 30 个循环,72℃ 终延伸 10 min;GADPH 为 94℃ 3 min,95℃ 1 min,59℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环,72℃ 终延伸 10 min,共 28 个循环,引物序列见表 1,由上海生工生物技术有限公司合成。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像系统拍照,以目的基因与内参对照的积分吸光度比值表示 mRNA 相对表达量。

表 1 Beclin1、Atg4b、Bnip3、Vps34 及 GAPDH 引物核苷酸序列

引物名称	序列	产物长度
Beclin1	上游 5'-CAAGATCCTGGACCGTGTC-3'	191bp
	下游 5'-TGGCACTTTCTGTGGACATCA-3'	
Atg4b	上游 5'-AGAGCCCGTTTGGATACT-3'	283bp
	下游 5'-GTGATGAAATGCGTTGAG-3'	
Bnip3	上游 5'-ATGGGATTTGGTCAAGTCG-3'	233bp
	下游 5'-AAGGTGCTGGTGGAGGTT-3'	
Vps34	上游 5'-GGACCTTCTGACCAACGAT-3'	308bp
	下游 5'-GCAACAGCATAACGCC-3'	
GAPDH	上游 5'-GTGCCGCTGGAGAAACCT-3'	228bp
	下游 5'-TTGCTGTAGCCGTATTCATGTGCATA-3'	

1.5 统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 *t* 检验作差异分析, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 TUNEL 染色及凋亡细胞计数 TUNEL 染色结果显示,AAA 组织中中层组织中几乎所有的 SMC 显示出 TUNEL 染色阳性;而正常主动脉中 TUNEL 阳性细胞很少(图 1)。统计结果显示,AAA 组织中凋亡的 SMC 比例为(76.2 ± 9.0)%,明显比正常主动脉组织的(6.9 ± 1.3)%高,差异有显著统计学意义($P < 0.05$,表 2)。

表 2 正常主动脉和 AAA 组织 TUNEL 染色阳性细胞的比例

组织	n	SMC 凋亡率(%)
正常主动脉	6	6.9 ± 1.3
AAA	10	76.2 ± 9.0*

注:AAA:腹主动脉瘤,SMC:平滑肌细胞。与正常主动脉相比,* $P < 0.05$

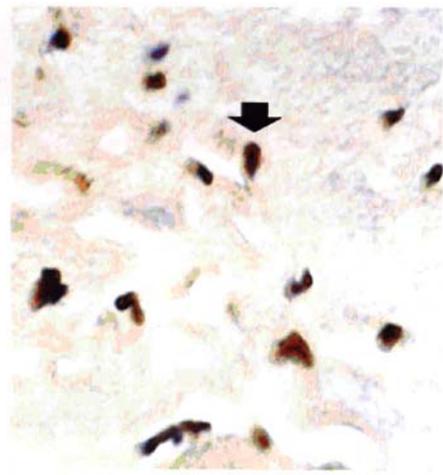
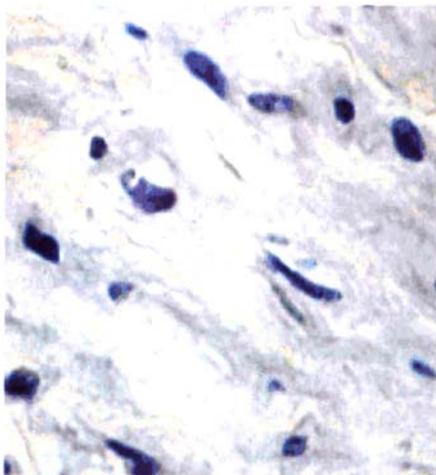


图 1 正常主动脉组织(A)和 AAA 组织(B)平滑肌细胞(黑箭头)(TUNEL 染色,×400)

2.2 免疫组织化学 在 AAA 组织中 LC3 的表达明显高于正常主动脉组织。AAA 组织的阳性表达主要集中于中膜,在中膜染色呈深棕色,内膜和外膜也有一些阳性染色;而在正常主动脉组织中,内膜有较浅阳性染色,中膜和外膜几乎未见阳性染色(图 2)。AAA 组织中膜细胞阳性染色明显比正常主动脉组织高($P < 0.05$,表 3)。

表 3 正常主动脉和 AAA 组织中膜 LC3 的表达

组织	n	LC3
正常主动脉	6	0.068±0.010
AAA	10	0.472±0.074*

注:AAA:腹主动脉瘤。与正常主动脉相比,* $P < 0.05$

2.3 RT-PCR RT-PCR 结果可以看出,自噬相关基因在 AAA 组织中的含量明显高于正常主动脉组织(图 3)。Beclin1、Atg4b、Bnip3、Vps34 在正常主动脉组织中含量很少,而在 AAA 组织中含量较高,差异有显著性($P < 0.05$,表 4)。

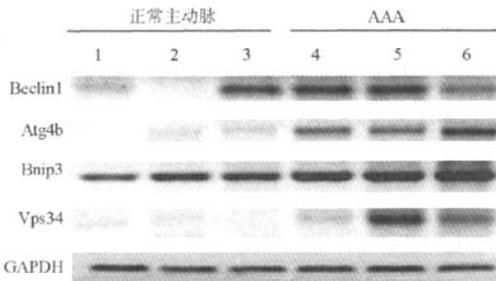


图 3 Beclin1、Atg4b、Bnip3、Vps34 在正常主动脉和 AAA 组织中的表达

3 讨论

AAA 具体发病原因至今未明,动脉中膜 SMC 密度降低是 AAA 主要病理特征之一。SMC 丢失以及导致的细胞外基质合成减少使得腹主动脉结构严重受损,这是 AAA 形成中不可忽视的原因。Cailhier 等^[1]通过抑制胱天蛋白酶(caspase-3)抑制组织蛋白酶(cathepsin L)的释放和细胞外基质的降解,证明了 AAA 的发病与细胞凋亡有一定的关系。Rowe 等^[2]观察动脉瘤组织和正常主动脉组织,发现动脉瘤组织中的 SMC 密度低于正常主动脉组织。郭付有等^[3]RT-PCR 法检测了颅内动脉瘤、AAA 及正常主动脉中 caspase-3 的表达情况,发现 AAA 中的 caspase-3 含量明显高于正常主动脉,这些结果说明中膜 SMC 凋亡与 AAA 形成有关。目前 SMC 凋亡发生的启动因素及发生过程中确切的机制尚未清楚。笔者利用 TUNEL 染色可以看到,在 AAA 组织的中膜 SMC 上,阳性染色的细胞占了大多数,而正常主动脉组织中凋亡的细胞比例很小。进一步证明动脉 SMC 的凋亡导致中膜 SMC 密度降低,从而诱导 AAA 发病。

自噬是凋亡之外的程序性细胞死亡方式,在进化过程中高度保守。细胞自噬参与了绝大多数长半衰期蛋白质的降解^[4]。近年来越来越多的研究提示相同诱导因素在不同细胞中可分别诱发自噬或凋亡。Terman 等^[5]通过研究发现心肌细胞自噬在心肌病中发挥一定作用。最新研究发现^[6],在动脉粥样硬化中存在着血管 SMC 自噬,并且 SMC 自噬受到肿瘤坏死因子- α 和胰岛素样生长因子-1 的调节。LC3 是哺乳动物细胞中酵母 Atg8 基因的同源

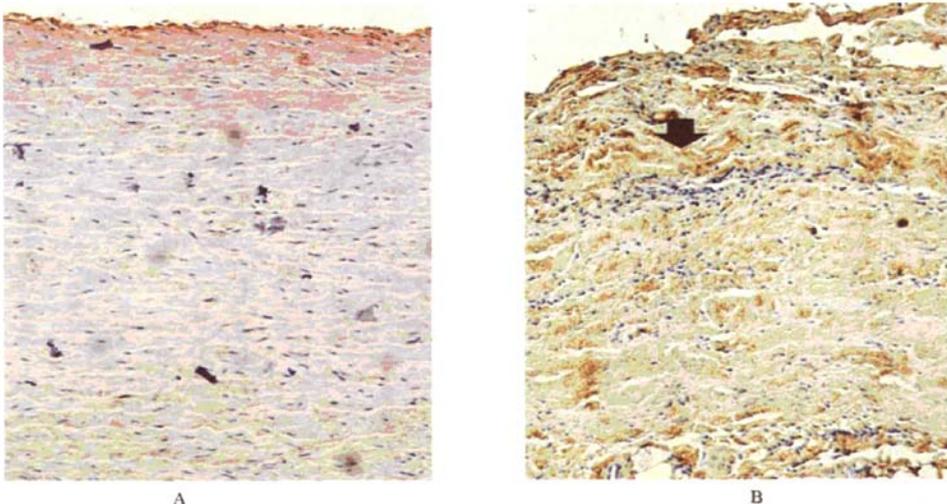


图 2 正常主动脉组织(A)和 AAA 组织(B,黑箭头)LC3 免疫组化染色(×100)

表4 Beclin1、Atg4b、Bnip3、Vps34在正常主动脉和AAA组织中相对表达量

组织	n	Beclin1(%)	Atg4b(%)	Bnip3(%)	Vps34(%)
正常主动脉	6	4.0±0.8	6.5±1.1	15.4±1.0	2.6±0.3
AAA	10	54.8±1.2*	61.1±2.7*	63.2±3.6*	44.2±1.7*

注:AAA:腹主动脉瘤。与正常主动脉组织相比,* $P<0.05$

物,定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,是细胞自噬泡膜的通用标志物,LC3修饰过程对自噬泡的形成必不可少^[7]。本研究通过免疫组化发现LC3在AAA组织中膜SMC中呈阳性表达。说明AAA中存在着SMC自噬,导致中膜SMC的减少。

参与酵母自噬的相关基因Atg6在哺乳动物则称为Beclin 1。有研究指出,Beclin 1^{-/-}小鼠细胞自噬缺陷,凋亡正常,说明Beclin 1是自噬的调控基因^[8]。Atg4b在自噬过程中起着较为重要的作用,Yoshimura等^[9]用RNA干扰技术证明,Atg4b与LC3密切相关。Bnip3属于BH3-only亚家族,是HIF的下游应答基因之一。Bnip3可促进线粒体自噬^[10]。研究发现,在转染了Bnip3的细胞中很早就出现了等离子膜通透孔、线粒体损害、过多的细胞质空泡和线粒体自噬现象^[11]。Bnip3在缺氧和营养缺乏时促进细胞自噬的能力会有所增强^[12]。最新研究发现,转录因子FoxO3引起了骨骼肌细胞的自噬过程。FoxO3控制着与自噬相关的Bnip3和LC3基因转录,而Bnip3能调节FoxO3在自噬过程中所起的作用^[13]。自噬小泡在形成过程中有3型PI₃K复合体参与,这一复合体包括Vps34, Beclin 1和紫外线抵抗相关肿瘤抑制基因^[14]。Ambral可以通过与Beclin 1作用从而激活Vps34来刺激自噬过程。为此,本研究通过RT-PCR发现,Beclin1、Atg4b、Bnip3、Vps34等自噬相关基因在AAA组织中表达水平高于正常主动脉组织,从而证实SMC自噬参与AAA发病过程。

另外,应认识到以下两个问题:(1)AAA病理过程中SMC凋亡和自噬都导致SMC减少,因此对它们的比较研究可能比单一因素的研究更有意义。(2)应用AAA动物模型利于对主动脉SMC形态功能进行动态观测,从而进一步研究AAA发病的原因。

综上所述,本研究发现AAA的发病与SMC凋亡、自噬有密切关系。对于SMC凋亡和自噬这两种细胞死亡方式的研究能为AAA发病提供理论依据。因此,应用药物或基因治疗的手段抑制SMC凋亡和自噬,并阻断相关基因的表达,将是早期AAA治疗中值得深入研究的方案。

【参考文献】

- [1] Cailhier JF, Sirois I, Laplante P, *et al.* Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(40): 27220-27229.
- [2] Rowe VL, Stevens SL, Reddick TT, *et al.* Vascular smooth muscle cell apoptosis in aneurysmal, occlusive, and normal human aortas[J]. *J Vasc Surg*, 2000, 31(3): 567-576.
- [3] Guo F, Li Z, Song L, *et al.* Increased apoptosis and cysteinyl aspartate specific protease-3 gene expression in human intracranial aneurysm[J]. *J Clin Neurosci*, 2007, 14(6): 550-555.
- [4] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation[J]. *Science*, 2000, 290(5497): 1717-1721.
- [5] Terman A, Brunk UT. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 68(3): 355-365.
- [6] Jia G, Cheng G, Gangahar DM, *et al.* Insulin-like growth factor-1 and TNF-alpha regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells[J]. *Immunol Cell Biol*, 2006, 84(5): 448-454.
- [7] Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2503-2518.
- [8] Yue Z, Jin S, Yang C, *et al.* Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 15077-15082.
- [9] Yoshimura K, Shibata M, Koike M, *et al.* Effects of RNA interference of Atg4B on the limited proteolysis of LC3 in PC12 cells and expression of Atg4B in various rat tissues[J]. *Autophagy*, 2006, 2(3): 200-208.
- [10] Zhang H, Bosch Marce M, Shimoda LA, *et al.* Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(16): 10892-10903.
- [11] Cleven AH, Wouters BG, Schutte B, *et al.* Poorer outcome in stromal HIF-2 alpha- and CA9-positive colorectal adenocarcinomas is associated with wild-type TP53 but not with BNIP3 promoter hypermethy-

lation or apoptosis[J]. Br J Cancer, 2008, 99(5): 727-733.

[12] Tracy K, Dibling BC, Spike BT, *et al.* BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(17): 6229-6242.

[13] Mammucari C, Milan G, Romanello V, *et al.* FoxO3

controls autophagy in skeletal muscle *in vivo*[J]. Cell Metab, 2007, 6(6): 458-471.

[14] 张志才, 邵增务. 自噬分子机制的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(1): 177-179.

(收稿日期:2010-02-01;修回日期:2010-05-05)

(上接第 216 页)

间内相继出现心力衰竭、肺水肿及肾功能不全,当行急诊 PCI 开通梗死相关血管后,部分缺血心肌得到有效灌注,心功能改善,射血分数增加,使各个脏器的血流量明显增加,逆转了 MODS 继续发展,减少了肝脏、脑及血液系统出现的器官衰竭。而药物治疗组的血管开通率明显低于 PCI 组,心肌供血不能恢复,各个脏器继续处于低灌注状态,MODS 继续发展引起更多器官损害。老年患者 PCI 组脑和血液系统功能不全的发生比率低于药物治疗组,而胃肠功能不全的比率高于药物治疗组,提示老年人在接受急诊 PCI 时给予口服阿司匹林和氯吡格雷对胃肠黏膜损伤较重,易诱发消化道黏膜糜烂、出血,在治疗中给予胃黏膜保护剂(如奥美拉唑)可减少胃肠出血的发生。老年人多伴有高血压及脑动脉硬化,在药物溶栓过程中发生脑卒中的比率较高,明显高于 PCI 组,脑卒中的发生又加重了 MODS。

PCI 组的总死亡率明显低于药物治疗组(9.9% vs 36.1%; $P < 0.01$),两组的病死率均随着功能不全器官数目的增多而增高,在老年患者中发生比率类似,提示 PCI 组经积极的血运重建治疗,血管开通率的增加,缺血心肌的恢复,避免更多器官缺血时间的延长,减少器官损伤,逆转了 MODS。

在 AMI 合并 MODS 患者中,尤其是老年患者,治疗的关键在于充分认识其危险因素,早期防治潜在的 MODS。本资料显示,AMI 后出现心力衰竭和呼吸衰竭在 MODS 中占首位,与文献报道一致^[5],且来势凶猛,可见心脏是早期应救治的重点器官。在常规药物治疗的基础上行急诊 PCI 治疗是可行的治疗方法。但急诊 PCI 前一定详细问清有无胃肠疾病,尤其是出血病史;术中应用 IABP 支持,既提高心肌血流灌注,又可增加心脏排血能力;术后

在给予常规药物治疗的基础上添加胃肠黏膜保护剂;老年人机体抵抗力下降,注意预防感染,做好饮食及大小便的护理及定时翻身叩背等。

总之,AMI 合并 MODS 患者风险大,病死率高,但积极有效地行 PCI 治疗,仍可获得较好的临床疗效。临床医师应根据患者的病情,评估风险和获益的比率,采取最佳的治疗方案,收到良好的临床疗效。

【参考文献】

- [1] 王士雯,王今达,陈可冀,等.老年多器官功能不全综合征(MODSE)诊断标准(试行草案,2003)[J].中国危重病急救医学,2004,16(1):1.
- [2] Smith SC Jr, Dove JT, Jacobs AK, *et al.* ACC/AHA Guidelines for percutaneous coronary intervention (revision of the 1993 PTCA guidelines)-executive summary: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines (Committee to revise the 1993 guidelines for percutaneous transluminal coronary angioplasty) endorsed by the Society for Cardiac Angiography and Interventions [J]. Circulation, 2001, 103(24): 3019-3041.
- [3] 胡桃红,卢才义,梁璐,等.老年多脏器功能衰竭死亡相关因素分析[J].中华老年多器官疾病杂志,2006,5(3):196-198.
- [4] Marshall JC. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome [J]. Crit Care Med, 2001, 29(7 Suppl): S99-S106.
- [5] Nierman DM, Schechter CB, Cannon LM, *et al.* Outcome prediction model for very elderly critically ill patients[J]. Crit Care Med, 2001, 29(10): 1853-1859.

(收稿日期:2009-02-11;修回日期:2009-03-12)