

[文章编号] 1007-3949(2008)16-11-0853-04

• 实验研究 •

佛波酯通过抑制蛋白激酶 B 活性诱导血管平滑肌细胞凋亡

范永娜¹, 谢平¹, 张华¹, 郭树彬², 李汇华¹

(中国医学科学院 1 基础医学研究所 北京协和医学院基础学院, 北京市 100005; 2 北京协和医院急诊科, 北京市 100730)

[关键词] 病理学与病理生理学; 血管平滑肌细胞; 凋亡; 佛波酯; 蛋白激酶 B; 蛋白激酶 C

[摘要] **目的** 探讨佛波酯对血管平滑肌细胞凋亡的影响及可能的作用机制。**方法** 用佛波酯处理体外培养的大鼠动脉平滑肌细胞 A1Q 原位缺口末端标记法检测佛波酯对平滑肌细胞凋亡的影响; 用免疫印迹法检测蛋白激酶 B 及其下游底物的总蛋白和磷酸化水平。**结果** 佛波酯可诱导平滑肌细胞的凋亡。过度表达持续活性的蛋白激酶 B 明显抑制佛波酯诱导的细胞凋亡; 相反, 显性负性蛋白激酶 B 加重佛波酯的促凋亡作用。进一步研究发现, 佛波酯可降低蛋白激酶 B 的磷酸化水平, 并随着剂量的增高或时间的延长而逐步降低, 同时佛波酯也能抑制蛋白激酶 B 下游的靶蛋白如叉头转录因子 3a 和糖原合成酶激酶 3β 磷酸化水平。最后发现蛋白激酶 C 抑制剂可阻断佛波酯降低蛋白激酶 B 磷酸化水平的作用, 但丝裂原活化蛋白激酶抑制剂无此作用。**结论** 佛波酯通过蛋白激酶 C 信号途径抑制蛋白激酶 B 激酶活性而诱导平滑肌细胞凋亡。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cells Induced by 12-O-Tetradecanoyl Phorbol 13-Acetate is Dependent on the Inactivation of Protein Kinase B

FAN Yong-Na¹, XIE Ping¹, ZHANG Hua¹, GUO Shu-Bin², and LI Hui-Hua¹

(1 Department of Pathology, National Laboratory of Medical Molecular Biology, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Tsinghua University, Beijing 100005; 2 Department of Acute Medicine, Peking Union Medical Hospital, Beijing 100730, China)

[KEY WORDS] Vascular Smooth Muscle Cell; Apoptosis; 12-O-Tetradecanoyl Phorbol 13-Acetate; Protein Kinase B; Protein Kinase C

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA) on the apoptosis of vascular smooth muscle cells and the mechanisms underlying it. **Methods** The smooth muscle cells (SMC) A10 were passed down to logarithmic phase, then were incubated with TPA in different concentrations and at different time points. The apoptotic cells were detected by TUNEL assay. The protein levels of protein kinase B (Akt) and its downstream targets such as Foxo3a, GSK3β were analyzed by Western blot. **Results** TPA has a marked effect on apoptosis in SMC through inhibition of Akt activation. Moreover, TPA-induced inactivation of Akt was accompanied with the amount of time or dose that SMC was exposed to. Furthermore, protein kinase C (PKC) signaling pathway was involved in the inactivation of Akt in response to TPA treatment. **Conclusions** TPA induces apoptosis of SMC through inactivation of Akt, which is mediated by PKC signaling.

在动脉粥样硬化的形成过程中, 不仅存在血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 异常增殖, 同时还伴随着细胞的凋亡。研究发现, 许多重要的信号途径如磷脂酰肌醇 3 激酶 / 蛋白激酶 B (phosphoinositide-3-kinase/protein kinase B, PI3K/Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein

kinase, MAPK) 等参与调节平滑肌细胞的增殖和凋亡^[1]。其中, PI3K/Akt 信号途径在平滑肌细胞的存活中起关键作用。研究表明 Akt 激活可磷酸化并调节许多参与细胞凋亡的蛋白如叉头转录因子 (forkhead transcription factors, Foxos)、促凋亡蛋白 Bad 等, 从而促进细胞的存活^[2]; 同时 Akt 本身的活性也受到许多因素的调节, 如胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)^[3,4]、致癌化学物质如佛波酯 (12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate, TPA)^[5] 等。已报道, 佛波酯可通过激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 信号途径引起 Akt 失活, 导致多种癌细胞的凋亡^[3,6]。但是在动脉平滑肌细胞中佛波酯的致凋亡作用和分子机制尚未见报道。

[收稿日期] 2008-08-05 [修回日期] 2008-10-06

[基金项目] 国家自然科学基金 (30570721, 30670860, 20060023051 和 2006CB503800)

[作者简介] 范永娜, 硕士, 主要研究方向为心肌梗大和动脉粥样硬化的发病机制及防治, E-mail 为 ynfan2006@yahoo.com.cn。谢平, 博士, 主治医师, 主要研究方向为临床病理诊断及动脉粥样硬化发病机制的研究, E-mail 为 xieping76@hotmail.com。李汇华, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为心肌梗大和动脉粥样硬化的发病机制及防治, E-mail 为 hhl1995@yahoo.com。

1 材料与方法

1.1 主要材料

细胞株 A10 购自美国 ATCC; 佛波酯和 DAPI 购自 Sigma 公司; PKC 抑制剂 GF109203X 和 MAPK 抑制剂 U0126 购自罗氏公司; 抗体 Akt 磷酸化 Akt (Ser473)、兔抗 GAPDH 和山羊抗兔的二抗均购自 Cell Signaling 公司; 胎牛血清 (FBS, Hyclone)、胰蛋白酶和高糖 DMEM 培养基购自 Gibco 6 孔及 24 孔培养板购自 Corning 转染试剂 Lipofectamine 2000 和 OptiMEM 均购自 Invitrogen, BCA 蛋白质分析试剂盒 (美国 Pierce 公司); 质粒 Active-Akt 和 Dn-Akt 由北京协和医学院基础学院张宏冰教授惠赠。

1.2 细胞培养和转染

大鼠动脉平滑肌细胞 A10 用 10% FBS 的 DMEM 培养基、37°C、5% CO₂、饱和湿度条件下静置培养至对数生长期, 然后用 0.25% 胰蛋白酶消化, 调整浓度至 10⁸ /L 按需接种在 6 孔板或 24 孔板中。转染前 1 天换用不含抗生素、含有 10% FBS 培养基, 待细胞生长至密度为 70% ~ 80% 时进行转染。6 孔板中分为空载体组、Active-Akt 组和 Dn-Akt 组, 用 OptiMEM 将质粒 2.5 μg, Lipofectamine 2000 6 μL 分别稀释至 250 μL, 混匀后室温放置 5 min, 然后将二者混合均匀, 室温放置 20 min 后加入培养孔中。每组复孔转染, 按上述比例批量制作转染混合物后进行转染, 转染后 6 h 换用完全培养基, 24 h 后进行后续实验。在加佛波酯 (200 μg/L) 处理不同时间点 (0、5、15、30 和 60 min) 的部分实验中, 细胞用抑制剂 GF109203X 和 U0126 预处理 30 min。

1.3 原位缺口末端标记实验

在多聚右旋赖氨酸包被的 24 孔板中, 接种平滑肌细胞至密度 1.1 × 10⁵ 个 /L, 用不同浓度的佛波酯 (0、50、100、200 和 400 μg/L) 处理 4 h, 转染质粒空载体、Active-Akt 和 Dn-Akt 的 24 孔板的实验组转染 24 h, 按预定时间刺激后, 然后两板均按照罗氏公司 DNA 断裂的原位末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling TUNEL) 试剂盒说明检测细胞凋亡情况, 荧光显微镜 (Leica) 照相观察。每高倍视野 (200 ×) 下, 分别计数细胞总数和凋亡细胞数, 细胞凋亡率 = 凋亡细胞数 / 细胞总数 × 100%。每个实验组作 3~5 个复孔。

1.4 蛋白印迹

细胞转染 24 h 后, 按预定实验方案进行佛波酯处理, 然后用 PBS 液洗两遍, 用含有 50 mmol/L

Tris 150 mmol/L 氯化钠、1% NP-40 和蛋白酶抑制剂及 PMSF (Sigma 公司) 的细胞裂解液冰上充分裂解 30 min, 细胞铲刮下转移到 1.5 mL 离心管中, 4°C 12 000 r/min 离心 15 min, 用 BCA 蛋白质分析试剂盒测定蛋白质浓度。取 50~100 μg 蛋白上清加入 5 倍加样缓冲液至 1 倍, 100°C 变性 6 min, 然后用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 蛋白电转移至硝酸纤维素膜后, 一抗 4°C 孵育过夜, TBS 洗两遍每次 5 min, 然后用辣根过氧化物酶标记的二抗继续室温孵育 1 h, TBS 洗两遍每次 10 min, 用底物化学发光法在 Alpha Fluorchem SP 仪器上 (Alpha Innotech) 拍摄并作分析。

1.5 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验作差异分析, *P* < 0.05 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 佛波酯诱导平滑肌细胞凋亡与蛋白激酶 B 活性有关

用不同剂量的佛波酯 (50~400 μg/L) 处理 A10 细胞 4 h 后, 发现与对照组相比, 各剂量佛波酯均可促进细胞凋亡, 并随着剂量的增加细胞的凋亡率增高 (表 1)。为进一步明确佛波酯致凋亡作用是否与 Akt 活性有关, 我们分别转染了空载体、Active-Akt 和 Dn-Akt 质粒, 然后用佛波酯刺激 4 h, 发现与转染空载体组相比, 转染质粒 Akt 组的 Akt 总蛋白水平明显增高; Akt 磷酸化水平 Active-Akt 组显著增高, 而 Dn-Akt 组则明显降低 (图 1A)。同时, 细胞的凋亡情况与 Akt 磷酸化水平的变化相一致, 转染 Dn-Akt 组的细胞凋亡百分数是空载体组的 3~5 倍, 而转染 Active-Akt 组则明显降低 (*P* < 0.05, 图 1B 和图 1C)。提示佛波酯通过抑制 Akt 活性而引起细胞凋亡。

表 1 各组平滑肌细胞凋亡程度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

佛波酯浓度	SMC 凋亡率
0 (对照组)	5.13% ± 1.05%
50 μg/L	7.24% ± 1.51% ^a
100 μg/L	13.05% ± 2.12% ^b
200 μg/L	16.98% ± 2.80% ^b
400 μg/L	19.01% ± 3.10% ^b

a 为 *P* < 0.05, b 为 *P* < 0.01, 与对照组比较。

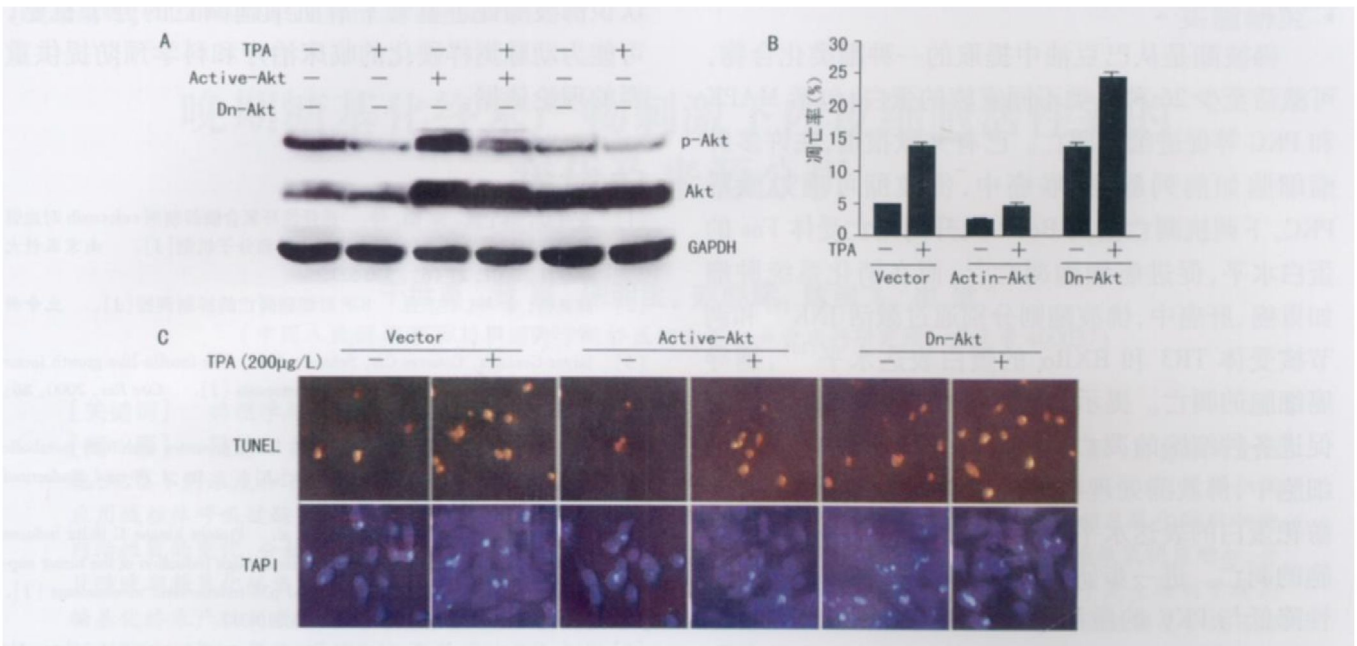


图 1 佛波酯对平滑肌细胞凋亡的影响及其与蛋白激酶 B 活性的关系

2.2 佛波酯降低蛋白激酶 B 的磷酸化水平而抑制其活性

为了明确佛波酯对 Akt 活性的影响, 我们检测了不同剂量佛波酯处理后 (图 2A) 及 200 μg/L 佛波酯处理不同时间 (图 2B) 平滑肌细胞内源性 Akt 的磷酸化水平, 发现佛波酯可明显抑制 Akt 的磷酸化水平, 并随着剂量的增高或时间的延长而抑制作用增强, 但不影响 Akt 总蛋白的水平。另外, 佛波酯处理后也明显降低了 Akt 下游靶蛋白如糖原合成酶激酶 3β (glycogen synthase kinase3β, GSK3β) 和 Foxos3a 的磷酸化水平 (图 2C)。提示佛波酯可抑制细胞内源性 Akt 的活性及下游蛋白的表达水平。

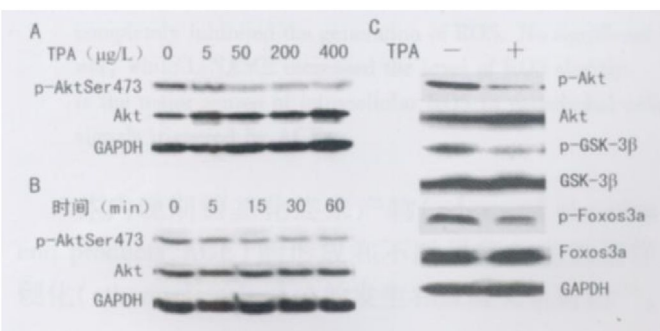


图 2 佛波酯对平滑肌细胞内源性蛋白激酶 B 及下游蛋白的蛋白水平和磷酸化水平的影响

2.3 蛋白激酶 C 信号途径介导佛波酯诱导的蛋白激酶 B 失活

为进一步明确佛波酯抑制 Akt 活性的分子机

制, 分别用不同浓度的 PKC 抑制剂 GF109203X 和 MAPK 抑制剂 U0126 预处理平滑肌细胞 30 min, 然后用佛波酯处理 30 min。结果发现, GF109203 可完全抑制佛波酯引起的 Akt 磷酸化水平下降, 并随着剂量的增加而升高; 但是 U0126 则无明显的抑制作用 (图 3)。提示佛波酯通过 PKC 信号途径抑制 Akt 磷酸化水平。

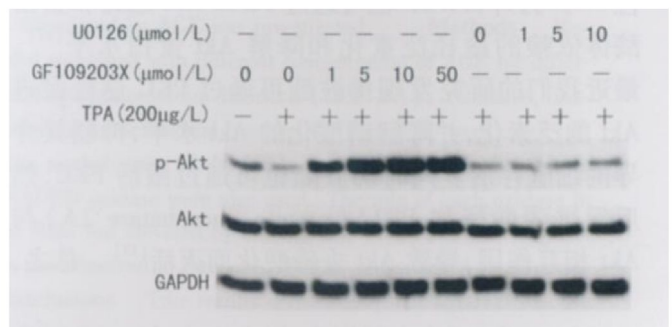


图 3 GF109203X 和 U0126 对佛波酯诱导的磷酸化蛋白激酶 B 蛋白水平降低的影响

3 讨论

血管平滑肌细胞的增殖与凋亡对维持动脉血管的正常功能起重要作用。如果致血管损伤因素使平滑肌细胞过度增殖, 将导致动脉粥样硬化斑块、高血压和血管扩张后再狭窄的形成。许多研究表明 Akt 是参与调节多种细胞增殖和凋亡平衡的关键激酶, 可通过磷酸化抑制细胞凋亡相关蛋白如 Foxos, Bad 和胱天蛋白酶 9 等的表达和活性, 而抑制细胞凋

亡^[7]。

佛波酯是从巴豆油中提取的一种酯类化合物,可激活至少 26 种人类不同家族的蛋白,包括 MAPK 和 PKC 等促进细胞凋亡。已有文献报道,在许多肿瘤细胞如前列腺癌、喉癌中,佛波酯可通过激活 PKC,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 及升高死亡受体 Fas 的蛋白水平,促进癌细胞凋亡^[8];而在消化系统肿瘤如胃癌、肝癌中,佛波酯则分别通过激活 JNK^[9]和调节核受体 TR3 和 RXR α 的蛋白表达水平^[10],诱导癌细胞的凋亡。提示佛波酯可通过不同的分子机制促进各种细胞的凋亡。本研究发现,在血管平滑肌细胞中,佛波酯处理后通过抑制 Akt 的活性及其下游靶蛋白的表达水平和转录活性,而促进平滑肌细胞的凋亡。进一步研究发现,佛波酯引起的 Akt 活性降低与 PKC 的激活有关。这些结果证明在血管平滑肌细胞中,佛波酯可通过 PKC 信号途径引起 Akt 的快速灭活而导致细胞凋亡。

在血管平滑肌细胞中,Akt 可被许多生长因子如 IGF-1、血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor PDGF) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 等激活,而在平滑肌细胞的增殖、迁移、存活和凋亡中起重要作用。但是有关负性调节 Akt 活性的分子机制仍不完全清楚。已有人报道 TNF- α 可促进 Akt 的泛素化,通过胱天蛋白酶和蛋白酶体途径降解 Akt 蛋白水平,抑制其激酶活性^[11]。另外,PDGF 也可通过 PI3K/Akt 通路和蛋白酶体依赖的途径泛素化和降解 Akt 蛋白水平^[12]。最近我们的研究发现佛波酯可通过 PKC 途径促进 Akt 的泛素化,并降解磷酸化的 Akt 水平,抑制其介导的细胞存活。同时佛波酯也可通过激活 PKC,然后促进磷酸酶如 PP2A (protein phosphatase 2A) 与 Akt 相互作用,导致 Akt 去磷酸化而灭活^[13]。总之,

认识佛波酯促进血管平滑肌细胞凋亡的分子机制,可能为动脉粥样硬化的临床治疗和科学预防提供重要的理论依据。

[参考文献]

- [1] 姜可心,刘宁波,彭韬,等. 选择性环氧合酶抑制剂 celecoxib 对血管平滑肌细胞的增殖抑制、凋亡诱导作用和分子机制 [J]. 南京医科大学学报, 2007, 27 (6): 530-533
- [2] 薛亚梅,李坤,吕杰强. IGF 对细胞凋亡的抑制调控 [J]. 生命科学, 2007, 19 (1): 70-71
- [3] Bayes-Genis A, Conover CA, Schwartz RS. The insulin-like growth factor axis: a review of atherosclerosis and restenosis [J]. *Circ Res* 2000; 86: 125-130
- [4] Hall JL, Gibbons GH, Chatham JC. IGF-I promotes a shift in metabolic flux in vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; 283 (3): E465-471
- [5] Ryer EJ, Sakakibara K, Wang C, et al. Protein kinase C delta induces apoptosis of vascular smooth muscle cells through induction of the tumor suppressor p53 by both p38-dependent and p38-independent mechanisms [J]. *J Biol Chem*, 2005; 280 (42): 35 310-317
- [6] Li L, Sampat K, Hu N, et al. Protein kinase C negatively regulates Akt activity and modifies UVC-induced apoptosis in mouse keratinocytes [J]. *J Biol Chem*, 2006; 281 (6): 3 237-243
- [7] Franke TF, Kaplan DR, Cantley LC. PI3K: downstream action blocks apoptosis [J]. *Cell* 1997; 88 (4): 435-437
- [8] 龙彬,董明敏,吕明栓,等. TPA 诱发 Hep-2 细胞株凋亡的研究 [J]. 耳鼻咽喉头颈外科, 2000; 7 (1): 53-56
- [9] Chen Y, Wu Q. Activation of JNK by TPA promotes apoptosis via PKC pathway in gastric cancer cells [J]. *World J Gastroenterol* 2002; 8 (6): 1 014-018
- [10] 谢莲,曾锦章,杨汀,等. TPA 诱导肝癌细胞 SMMC7721 凋亡及与 RXR α 和 TR3 的关系 [J]. 云南大学学报, 2006; 28 (3): 271-276
- [11] Medina EA, Afari RR, Ravid T, et al. Tumor necrosis factor- α decreases Akt protein levels in 3T3-L1 adipocytes via the caspase-dependent ubiquitination of Akt [J]. *Endocrinology*, 2005; 146 (6): 2 726-735
- [12] Adachi M, Katsumura KR, Fujii K, et al. Proteasome-dependent decrease in Akt by growth factors in vascular smooth muscle cells [J]. *FEBS Lett* 2003; 554 (1-2): 77-80
- [13] Fan Y, Xie P, Zhang H, et al. Proteasome-dependent inactivation of Akt is essential for 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells [J]. *Apoptosis* 2008. Epub ahead of print

(此文编辑 许雪梅)