

间断性人工重力对模拟失重大鼠颈总动脉平滑肌细胞凋亡的影响*

蔡越 於进文 白云刚 刘 焕 王忠超 暴军香 马 进[△]

(第四军医大学航空航天医学教育部重点实验室, 航空航天生理学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 研究 3 周模拟失重大鼠颈总动脉平滑肌细胞凋亡的变化及间断性人工重力对其的影响。方法 以尾部悬吊大鼠(SUS)模拟失重, 同期每天悬吊 23h、站立 1h(STD)模拟间断性人工重力的对抗效果, 用 M30 染色及 Tunel 染色方法观察 3 周 SUS 组、同步对照(CON)组及 STD 组颈总动脉平滑肌细胞早期和中晚期的凋亡情况, 并用免疫组织化学方法及 Western blot 印迹方法观察各组大鼠颈总动脉组织 Caspase-3 的蛋白表达变化。结果: 与 CON 组比较, SUS 组大鼠颈总动脉平滑肌细胞 M30 染色阳性细胞明显减少, STD 组 M30 染色阳性细胞较 CON 组及 SUS 组显著增加, SUS 组 Tunel 染色阳性细胞较 CON 组及 STD 组显著减少, STD 组 Tunel 染色阳性细胞较 CON 组及 SUS 组显著增加, SUS 组 Caspase-3 的表达较 CON 组显著降低 ($P < 0.05$), STD 组 Caspase-3 的表达较 CON 组及 SUS 组显著增高 ($P < 0.01$)。结论: 模拟失重可引起大鼠颈总动脉平滑肌细胞凋亡减少, 每日 1 h 的 -Gx 对抗使颈总动脉的凋亡增加。Caspase-3 可能在调控模拟失重所致血管组织平滑肌细胞的凋亡中发挥作用。

关键词: 微重力 颈总动脉 血管平滑肌细胞 凋亡 大鼠

中图分类号: Q95-3, R852.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273 (2012) 10-1820-04

Effects of Intermittent Artificial Gravity on Apoptosis of Common Carotid Smooth Muscle Cells in Simulated Microgravity Rats*

CAI Yue, YU Jin-wen, BAI Yun-gang, LIU Huan, WANG Zhong-chao, BAO Jun-xiang, MA Jin[△]

(Department of Aerospace Physiology, School of Aerospace Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects of 3 weeks simulated microgravity and intermittent artificial gravity on apoptosis of common carotid smooth muscle cells (CCSMCs) in rats. **Methods:** Tail-suspension rats (SUS) were used to simulate the effects of microgravity, and homochronous countermeasure standing (STD, daily 1 h of -Gx gravitation) was used to simulate the effects of intermittent artificial gravity (IAG). The apoptosis of CCSMCs was assessed by the basis of M30 CytoDEATH Fluorescein (M30) and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (Tunel) staining. The protein expression of Caspase-3 in common carotid was demonstrated by Immunohistochemistry and Western blot. **Results:** After 3-week simulated microgravity and intermittent artificial gravity, compared with CON, M30 and TUNEL positive CCSMCs in SUS rats decreased significantly, while M30 and TUNEL positive CCSMCs increased significantly in STD; Compared with SUS, M30 and TUNEL positive CCSMCs in STD rats increased significantly. Compared with CON and STD, the expressions of Caspase-3 decreased significantly ($P < 0.01$ respectively) in SUS, and compared with CON and SUS, the expression of Caspase-3 increased significantly ($P < 0.01$ respectively) in STD. **Conclusions:** The decrease of apoptosis CCSMCs can be induced by simulated microgravity, while intermittent artificial gravity can cause the increase of apoptosis CCSMCs. These findings further suggest that the expression of Caspase-3 may mediate the alteration in apoptosis of CCSMCs induced by microgravity or intermittent artificial gravity (IAG).

Key words: Simulated microgravity; Carotid; Smooth muscle cells; Apoptosis; Rat

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R852.22 Document code: A

Article ID: 1673-6273(2012)10-1820-04

前言

失重所致的立位耐力不良严重影响航天员飞行安全及效率, 但目前对其发生机理仍不完全清楚, 相应对抗措施亦不能完全有效阻止其发生。已有的研究工作提示, 立位耐力不良发生机理可能涉及多重机制, 如全身血容量减少, 前庭功能变化, 心血管系统结构与功能改变等^[1]。近年来的相关研究工作表明, 全身动脉系统结构和功能的区域性重建可能在其中发挥重

要作用^[2,3]。模拟失重研究发现在上半身或者前半身, 动脉中膜增厚, 发生肥厚性变化, 呈高反应性; 在下半身或者后半身, 动脉则发生萎缩性变化, 呈低反应性^[4,5], 而给予间断性人工重力 (intermittent artificial gravity) 对抗可以部分对抗上述改变^[6,7]。以往的工作表明, 在失重或模拟失重状态下, 动脉系统的区域性重建可能同细胞凋亡相关, 但目前尚缺乏直接证据。本研究采用国际通用尾部悬吊方法模拟失重的主要影响, 利用 M30 染色、Tunel 染色、免疫组化及 western blot 等方法观察颈总动脉

* 基金项目 国家自然科学基金项目(30871218)

作者简介 蔡越, 硕士生 E-mail: caiyueclear1981@163.com

[△]通讯作者 马进, 教授, 主要从事心血管生理学研究 Email: jin-ma@fmmu.edu.cn

(收稿日期 2012-01-10 接受日期 2012-01-31)

血管平滑肌细胞凋亡状况及可能的凋亡信号途径,以确定凋亡发生状况及间断性人工重力对其的影响。

1 材料与方法

1.1 模拟失重大鼠模型

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 27 只,由第四军医大学实验动物中心提供,在专用动物室内适应性饲养 1 周后,按体重配对照原则随机分为对照组(CON)、模拟失重组(SUS)和站立对抗组(STD),每组 9 只。SUS 组采用本实验室改进的尾部悬吊方法建立模拟失重动物模型^[89],动物在模拟失重期间,始终保持 -30° 头低位及后肢悬吊不负重的状态。STD 组每日模拟失重 23h,每天下午 4:30~5:30 恢复正常站立体位 1 h,让大鼠所受重力矢量为由背向胸(-Gx),模拟间断性人工重力的影响^[67]。CON 组在同一环境单笼饲养。期间全部大鼠自由饮食与饮水,室温保持在(23±2)℃,动物房保持 12 h 光照与 12 h 黑暗的循环交替,动物饲养与实验整个过程均遵照第四军医大学有关实验动物的规定进行。模拟失重 3w 后,取大鼠颈总动脉,颈总动脉以颈内、颈外动脉分支处为标志点向近心端剪取,在体视显微镜下去除血管周围结缔组织后,剪取部分动脉用于 M30、Tunel 检测,而余下部分用于 Western blot 检测。实验中称取大鼠后肢右侧比目鱼肌湿重,以观察模拟失重及对抗措施的效应。

1.2 抗体和试剂

M30 CytoDEATH* Fluorescein (Cat.No.12156857001, Roche Applied Science),In Situ Cell Death Detection Kit,POD (Cat.No.11684817910 Roche Applied Science), Rabbit polyclonal to Caspase-3(no.ab4982 ;Abcam), BCA 蛋白分析试剂盒(Pierce Chemical Company ,USA),Chemiluminescent HRP Substrate (Cat.No.WBKLS0100, MILLIPORE),M-PER Mammalian Protein Extraction Reagent (Prod # 78503,Thermo),免疫组化染色试剂盒 SP-0023 (北京博奥森生物技术有限公司),其余试剂均为国产纯试剂。

1.3 组织凋亡的 M30 及 TUNEL 法检测

颈总动脉置于 4%的多聚甲醛固定 24 h。标本按横切片要求制成蜡块,室温保存,需要时切片。切片常规脱蜡脱水,然后分别严格按试剂盒的说明书进行操作。每组大鼠 9 只,随机选

取 6 只,取其血管连续切片 3μm/张,25 张,每隔 5 张取一张,各组共 6×5 张,分别做 M30 染色和 Tunel 染色。分别在每张切片上的 M30 染色和 Tunel 染色阳性区域随机取 10 个高倍视野计数染色阳性细胞,计算 M30 染色和 Tunel 染色阳性细胞数。分别设不加 M30 和 Tunel 反应混合物的阴性对照和加 DNase I 预处理的 Tunel 染色阳性对照。

1.4 Caspase-3 的检测

1.4.1 免疫组化染色 严格按照 SP-0023 免疫组化试剂盒说明书操作,具体步骤如下:脱蜡、水化、微波热抗原修复、滴加% H₂O₂ 封闭;滴加一抗 50 μl,4℃过夜、滴加 IgG 二抗 40-50μl;DAB 显色;脱水、透明、中性树脂封片,镜检;用无免疫源性血清代替一抗作为阴性对照,以确定该免疫染色的特异性。

1.4.2 Western blot 观察蛋白的表达 将颈总动脉置裂解液中,4℃下匀浆,离心(12000rpm) 10min,取上清,使用 BCA 蛋白分析试剂盒测定样品的总蛋白浓度。采用 invitrogen 4-12 % SDS-PAGE 预制胶电泳分离蛋白,每泳道上样量 20μg。电泳后使用 invitrogen 转移电泳槽将蛋白转移至 PVDF 膜(Amersham, Germany),经 5 % 脱脂奶粉室温下封闭 60min 后,滴加 1:500 大鼠抗兔的 Caspase-3 抗体的一抗,在 4℃摇床孵育过夜。洗膜后滴加 1:10000 羊抗兔的辣根过氧化物酶标记二抗,室温下孵育 60min,随后使用 ECL 液发光显影。

1.5 图像分析及数据统计

采用美国 NIH 的 Image 软件对图像进行分析处理,选择目标条带,测定条带净光密度,各组实验数据均以 mean±SEM 形式表示,使用 SPSS 统计软件,对数据进行方差分析,P<0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验期间动物一般状况良好,在整个实验过程中,各组大鼠体重均持续增长。大鼠体重及比目鱼肌湿重见表 1,对照组体重略高于悬吊组和站立组,但无明显差异。比目鱼肌湿重三组间差异显著,悬吊组较对照组减少了约 45.1%,站立对抗组较对照组减少约 15.5%,表明 3w 悬吊组大鼠出现了显著的模拟失重效应,同期间断性人工重力有一定对抗效果。

表 1 三组大鼠体重和比目鱼肌湿重的变化情况(mean±SEM)

Table 1 Changes of body weight and wet weight of left soleus of rats in the three groups (mean±SEM)

Group	n	Body weight (g)		Wet weight of soleus	
		Initial	Final	Absolute (mg)	Relative(mg/g BW)
CON	9	281.0±6.4	410.3±0.4	162.2±2.9	0.40±0.01
SUS	9	281.6±6.3	398.0±0.9	89.6±2.2 * #	0.23±0.01* #
STD	9	279.3±6.1	400.3±0.6	136.8±5.1#	0.34±0.01#

注 #P<0.01,与对照组比较;*P<0.01,与站立对抗组比较。

2.2 M30 检测结果

M30 染色结果显示 M30 是对细胞骨架蛋白 18 (CK18) 的特异性染色,M30 阳性表达部位在胞浆,胞浆内出现棕黄色或棕褐色。与对照组 M30 染色阳性细胞数相比,悬吊组 M30 染色阳性细胞数明显减少,而站立对抗组 M30 染色阳性细胞数

较悬吊组与对照组均明显增加(图 1)。

2.3 TUNEL 检测结果

Tunel 染色结果显示:在光学显微镜下,Tunel 染色阳性血管平滑肌细胞核呈棕黄色或褐色,核形态不规则,大小不一致,可见明显的浓缩颗粒,并且多集中在血管中膜的内外两侧。

与对照组 TUNEL 染色阳性细胞数相比,悬吊组 TUNEL 染色阳性细胞数明显减少,而站立对抗组 TUNEL 染色阳性细胞数较悬吊组与对照组均明显增加(图 2)。

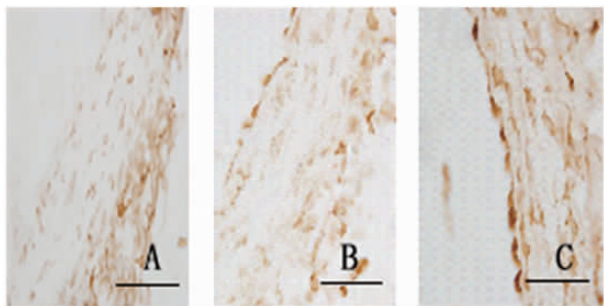


图 1 三组大鼠颈总动脉 M30 染色图 A 对照组 B 悬吊组 C 站立对抗组

Figure 1 M30 staining map of the common carotids in three groups rats A : control group B : Tail-suspension group C : standing countermeasure group($\times 1000$, scar bar = $25\mu\text{m}$)

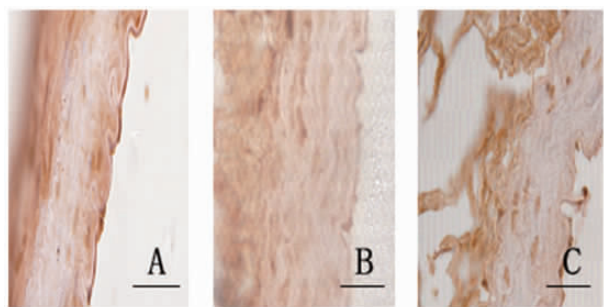


图 2 三组大鼠颈总动脉 TUNEL 染色图 A 对照组 B 悬吊组 C 站立对抗组

Figure 2 TUNEL staining map of the common carotids in three groups rats A : control group B : Tail-suspension group C : standing countermeasure group($\times 1000$, scar bar = $25\mu\text{m}$)

2.4 Caspase-3 的表达

2.4.1 免疫组织化学结果 图 3 为代表性的显微照片,其显示了颈总动脉管壁组织的 Caspase-3 蛋白的免疫组织化学定位。图中可见,Caspase-3 阳性表达部位在胞浆,阳性反应部位呈棕黄色或棕褐色。主要分布在血管中膜内外侧的区域。SUS 组大鼠颈总动脉管壁中膜中被检测到的 Caspase-3 免疫反应阳性比 STD 及 CON 组弱,STD 大鼠颈总动脉和股动脉管壁中膜中被检测到的 Caspase-3 免疫反应阳性最强,存在显著差异(图 3)。

2.4.2 蛋白免疫印迹分析 图 4 显示 Caspase-3 蛋白条带。作为内参照的 β -actin 分别在三组大鼠颈总动脉血管泳道内测得的净光密度相似,说明各泳道内蛋白上样量相当。Caspase-3 蛋白条带的净光密度通过与 β -actin 相比进行归一化,从所得的比值可见,模拟失重后,与 CON 组 (0.319 ± 0.024) 相比,SUS 组颈总动脉 Caspase-3 (0.209 ± 0.016) 蛋白表达明显减少,STD 组 Caspase-3 (0.430 ± 0.010) 表达明显增加 (* $P < 0.05$),STD 组 Caspase-3 表达较 SUS 组显著增加(图 4)。

3 讨论

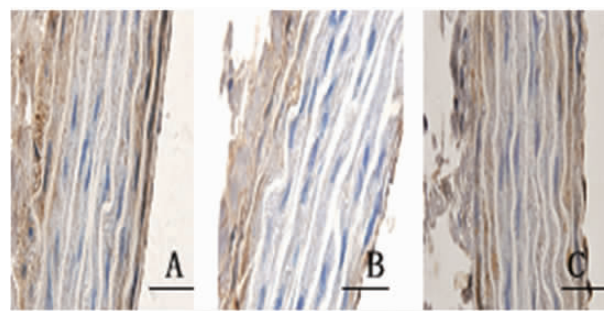


图 3 三组大鼠颈总动脉 Caspase-3 免疫组化染色图 A 对照组 B 悬吊组 C 站立对抗组

Figure 3 Caspase-3 Immunohistochemistry map of the common carotids in three groups rats A : control group B : Tail-suspension group C : standing countermeasure group($\times 1000$, scar bar = $25\mu\text{m}$)

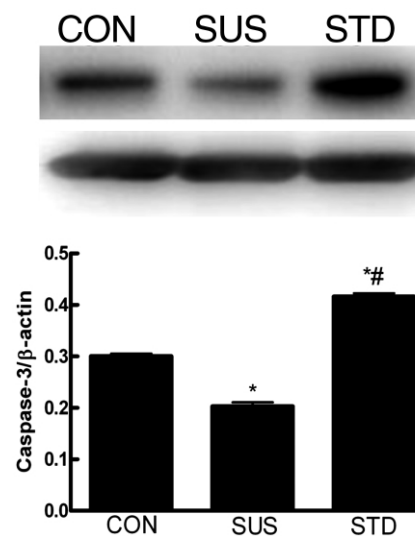


图 4 三组大鼠颈总动脉 Western-blotting 检测 Caspase-3 在蛋白水平的表达。* $P < 0.05$, 与对照组比较;# $P < 0.01$, 与悬吊组比较

Figure 4 Western blotting was used to detect relative expression of Caspase-3 in protein level in three groups rats' common carotids. * $P < 0.05$, Compared with either CON; # $P < 0.01$, Compared with either SUS

本实验通过 M30 染色、TUNEL 染色、免疫组化及 western blot 蛋白分析等方法,观察了模拟失重 3w 大鼠颈总动脉平滑肌细胞凋亡的变化及间断性人工重力对抗对其的影响,结果表明:1) SUS 大鼠颈总动脉平滑肌细胞 M30 染色及 TUNEL 染色阳性细胞较 CON 及 STD 明显减少,STD 大鼠颈总动脉平滑肌细胞 M30 染色及 TUNEL 染色阳性细胞较 CON 及 SUS 显著增加;2) SUS 大鼠颈总动脉组织 Caspase-3 ($P < 0.05$) 的表达较 CON 显著降低,STD 大鼠颈总动脉组织 Caspase-3 ($P < 0.01$) 的表达较 CON 及 SUS 显著增高。

本课题组前期研究发现在模拟失重以及间断性人工重力对抗下,动脉血管均发生了差异性重建^[67],但血管平滑肌细胞的凋亡是否在其中发挥重要作用,以及具体的机制皆不清楚。凋亡是细胞程序性死亡 (programmed cell death, PCD) 的一种,是一个自主性有序死亡过程。在失重或模拟失重状态下,对骨组织丢失及甲状腺功能低下等问题的研究发现细胞凋亡在其中发挥重要作用^[10,11]。本实验中 M30 染色针对细胞骨架蛋白 18

(CK18),是细胞早期凋亡的特征之一,M30 染色增多,说明有凋亡发生的早期现象,Tunel 染色是对细胞凋亡中晚期检测的常用方法之一,Tunel 染色增多说明细胞发生不可逆性的凋亡或坏死改变。结合本实验结果,可以认为在模拟失重环境下,悬吊组大鼠的颈总动脉平滑肌细胞凋亡减少,站立对抗组大鼠的颈总动脉平滑肌细胞凋亡增多。

有文献报道,动脉平滑肌细胞膜钾离子通道的功能变化和局部肾素-血管紧张素系统中血管紧张素及其受体的变化均可导致平滑肌细胞凋亡状态发生改变,并在动脉重建中发挥重要作用^[12,13],实验室前期的工作亦证实,模拟失重导致动脉平滑肌细胞钾离子通道功能,以及局部肾素-血管紧张素系统发生区域性变化^[14,15]。在本实验中,组织细胞凋亡的主要诱发因素,包括活性氧诱发的氧化应激、一氧化氮(nitric oxide)和机械应力等均不同程度的存在^[16,17,18]。综合以上所述,提示细胞凋亡在模拟失重下动脉血管差异性重建中可能发挥重要作用,而间断性人工重力对抗可能致其发生剧烈重建,且可能影响血管平滑肌组织增殖。

活化 Caspase-3 表达上调被认为是组织细胞发生凋亡的标志物之一^[19],本研究结果显示悬吊组大鼠颈总动脉组织平滑肌活化 Caspase-3 表达减少,而站立对抗组大鼠颈总动脉组织平滑肌活化 Caspase-3 表达增多。提示我们在模拟失重和间断性人工重力对抗下动脉血管平滑肌细胞凋亡是在一些列诱发因素作用下,最终通过激活下游活化的 Caspase-3 介导的信号途径导致细胞凋亡^[20]。由于本工作仅对凋亡的部分相关蛋白及蛋白酶进行检测,不排除还有其他的,比如非 Caspase-3 蛋白酶(calpain,cathepsin 等)依赖的凋亡途径可能参与模拟失重大鼠动脉平滑肌细胞的凋亡调节。全面具体的凋亡调节机制,尚待进一步工作研究。

参考文献(References)

- [1] Convertino VA. Mechanisms of microgravity induced orthostatic intolerance: implications for effective countermeasures [J]. J Gravit Physiol, 2002,9(2): 1-13
- [2] Convertino VA, Cooke WH. Evaluation of cardiovascular risks of spaceflight does not support the NASA bioastronautics critical path roadmap[J]. Aviat Space Environ Med, 2005, 76(9): 869-876
- [3] Delp MD. Arterial adaptations in microgravity contribute to orthostatic tolerance[J]. J Appl Physiol, 2007, 102(3): 836
- [4] Zhang LF, Yu ZB, Ma J. Peripheral effector mechanism hypothesis of postflight cardiovascular dysfunction [J]. Aviat Space Environ Med, 2001,72(6): 567-575
- [5] Zhang LF. Invited review: vascular adaptation to microgravity: what have we learned? [J]. J Appl Physiol, 2001, 91(6): 2415-2430
- [6] Sun B, Zhang LF, Ma J. Daily short-period gravitation can prevent functional and structural changes in arteries of simulated microgravity rats[J]. J Appl Physiol, 2004, 97: 1022-1031
- [7] Lin LJ, Gao F, Ma J. Contrasting effects of simulated microgravity with and without daily gravitation on structure and -Gx function of cerebral and mesenteric small arteries in rats [J]. J Appl Physiol, 2009, 107: 1710-1721
- [8] Morey-Holton ER, Globus RK. Hindlimb unloading rodent model: technical aspects[J]. J Appl Physiol, 2002, 92(4): 1367-1377
- [9] Chen Jie, Ma Jin, Ding ZP, et al. A modified tail-suspension model for simulating long-term weightlessness [J]. Chin J Space Sci, 1993, 13 (2): 159- 162
- [10] Aguirre J I, Plotkin L I, Stewart SA, et al. Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss [J]. J Bone Miner Res, 2006, 21(4): 605-615
- [11] Kossmehl P, Shakibaei M, Cogoli A. Weightlessness induced apoptosis in normal thyroid cells and papillary thyroid carcinoma cells via extrinsic and intrinsic pathways [J]. Endocrinology, 2003, 144 (9): 4172-4179
- [12] Stefanie Krick, Oleksandr Platoshyn, and X.-J. Yuan. Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2001, 280: C970-C979
- [13] Burg ED, Remillard CV, Yuan JX. Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications [J]. Br J Pharmacol, 2008, 153(1): S99-S111
- [14] Xie MJ, Zhang LF, Ma J. Functional alterations in cerebrovascular K⁺ and Ca²⁺ channels are comparable between simulated microgravity rat and SHR [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005, 289 (3): H1265-H1276
- [15] Fu ZJ, Xie MJ, Ma J. Differential activation of potassium channels in cerebral and hindquarter arteries of rats during simulated microgravity [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 287 (4): H1505-515
- [16] Ma J, Kahwaji C I, Purdy RE. Effects of simulated microgravity on arterial nitric oxide synthase and nitrate and nitrite content [J]. J of Appl Physiol, 2003, 94(1): 83-92
- [17] Sandberg EM, Sayeski PP. Jak-2 tyrosine mediates oxidative stress-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 2004, 279(33): 34 547-34 552
- [18] Shaw A, Xu Q. Biomechanical stress-induced signaling in smooth muscle cell: an update[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2003, 1(1): 41-58
- [19] McLaughlin B, Hartnett KA, Erhard JA, et al. Caspase-3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning[J]. PNAS, 2003, 100 (2): 715-720
- [20] Lu W, Lee HK, Xiang C, Finniss S, Brodie C. The phosphorylation of tyrosine 332 is necessary for the caspase 3-dependent cleavage of PKC delta and the regulation of cell apoptosis [J]. Cell Signal, 2007, 19: 2165-2173