· 论著 ·

bcl－2、bax 在 NHE－1 核酶基因转染所致缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡中的作用

陆俊羽 姚伟 钱桂生 杨晓静 陈维中 李淑平

【摘要】 目的 探讨 bcl－2、bax 表达在 Na^+/H^+ 交换器－1(NHE－1)抑制而诱导缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)凋亡中的作用。方法 将转染 NHE－1 特异性核酶基因大鼠的 PASMCs 置于缺氧条件下(O_2 的体积分数＜1%)培养，分别在缺氧 0、2、6、12、24 和 48 h 采用原位细胞凋亡检测法观察细胞凋亡情况，荧光指示剂 Fura－2/AM 测定法检测细胞内 Ca^{2+} 浓度([Ca^{2+}]i)变化，半定量逆转录-聚合酶链反应方法检测细胞内 bcl－2 mRNA 和 bax mRNA 表达变化，免疫组化法检测细胞内 Bcl－2 蛋白和 Bax 蛋白表达的变化。结果 转染 NHE－1 特异性核酶基因大鼠的 PASMCs 在缺氧培养时，其细胞凋亡率随缺氧时间的延长而逐渐升高，但是[Ca^{2+}]i 升高的幅度较小，从缺氧 6 h 起就显著低于同时间点的对照组和转染逆转录病毒真核表达载体空载体组(P 均＜0.01)，bcl－2 mRNA 及蛋白表达显著降低，bax mRNA 和蛋白表达显著增加(P 均＜0.01)。结论 NHE－1 抑制可能通过阻止 PASMCs 的[Ca^{2+}]i 增加，并引起 bcl－2 表达降低及 bax 表达增加而诱导和促进缺氧培养的 PASMCs 凋亡。

【关键词】 Na^+/H^+ 交换器－1； bcl－2； 凋亡； 平滑肌； 血管

中图分类号：Q255；Q344.13 文献标识码：A 文章编号：1003－0603(2004)07－0394－05

Role of bcl－2 and bax expression in apoptosis of hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells of rats induced by Na^+/H^+ exchanger isoform－1 inhibition in vitro

LU Jun－yu, YAO Wei, QIAN Gui－sheng, YANG Xiao－jing, CHEN Wei－zhong, LI Shu－ping. Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China

Corresponding author: QIAN Gui－sheng

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the role of bcl－2 and bax expression in apoptosis of hypoxic pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) of rats induced by Na^+/H^+ exchanger isoform－1 (NHE－1) inhibition in vitro. **Methods** Cultured rat PASMCs transfected with NHE－1 ribozyme gene (PRZ cell), cultured rat PASMCs transfected only with pLXSN vector (PX cell) and non－transfected rat PASMCs (PA cell) were obtained in our previous studies. The cells were cultured under low oxygen tension (＜1% O_2) for 0, 2, 6, 12, 24 and 48 hours respectively. Then cell apoptosis was examined with terminal deoxynucleotidyl transferase－mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). Intracellular Ca^{2+} ([Ca^{2+}]i) of cells was measured using fluorescence dye Fura－2/AM. The changes in mRNA expression of bcl－2 and bax in cells were assessed by semi quantitative reverse transcription－polymerase chain reaction (sqRT－PCR). The expression of Bcl－2 protein and Bax protein of cells was detected immunohistochemically. **Results** In contrast to normal PASMCs and cells transfected with pLXSN, the apoptosis rates in recombinant vectors transfected cells increased significantly and continuously. [Ca^{2+}]i values were also increased in these cells, but the increase extent was remarkably lower than in the normal PASMCs (all P＜0.01). The expression of bax mRNA and protein of cells transfected with recombinant vectors was increased significantly compared with cells of other two groups. Meanwhile, the expression of bcl－2 mRNA and protein of these cells were decreased significantly. **Conclusion** The NHE－1 specific hammerhead ribozymes induce apoptosis of PASMCs under low oxygen tension by inhibiting the increase in intracellular Ca^{2+} concentration, increasing bax expression and decreasing bcl－2 expression.

【**Key words**】 Na^+/H^+ exchanger isoform－1； bcl－2； apoptosis； smooth muscle； vascular

CLC number：Q255；Q344.13 **Document code**：A **Article ID**：1003－0603(2004)07－0394－05

基金项目：国家自然科学基金资助项目(39870352)

作者单位：400037 重庆，第三军医大学附属新桥医院全军呼吸研究所

通讯作者：钱桂生

作者简介：陆俊羽(1972－)，女(汉族)，云南省人，讲师，医学博士，主治医师，主要从事缺氧肺动脉高压方面的研究。

万方数据

Quinn 等[1]研究发现，存在于肺动脉平滑肌细胞(PASMCs)上的 Na^+/H^+ 交换器-1(NHE-1)可介导 1∶1 细胞外钠离子和细胞内氢离子交换，其活化所致的细胞内碱化在 PASMCs 增殖中起“容许性”作用。我们通过构建 NHE-1 特异性核酶基因逆转录病毒载体，转染入体外培养的大鼠 PASMCs 内表达，发现 NHE-1 抑制可诱导细胞内酸化而抑制 PASMCs 增殖，并促进其凋亡[2]。本研究拟观察转染了 NHE-1 特异性核酶基因的大鼠 PASMCs 在缺氧条件下的细胞内 Ca^{2+} 浓度($[Ca^{2+}]i$)、细胞凋亡率及 bcl-2、bax 的表达变化，探讨 NHE-1 抑制所致缺氧大鼠 PASMCs 凋亡的可能调控机制。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂：转染表达 NHE-1 特异性核酶基因的体外培养大鼠 PASMCs(PRZ 组)、转染逆转录病毒真核表达载体(pLXSN)空载体的大鼠 PASMCs(PX 组)和正常大鼠 PASMCs(正常对照组)为我们前期实验时所制备，并已经通过实验证实了转染表达的 NHE-1 特异性核酶能有效抑制大鼠 PASMCs 内 NHE-1 的表达[2]。荧光指示剂 Fura-2/AM 购自 Sigma 公司，RNA 提取试剂 Tripure、原位凋亡试剂盒购自 Roche 公司，鼠白血病病毒(MMLV)逆转录酶购自 Promega 公司，Tag 酶购自上海生工生物公司，Bcl-2、Bax 抗体及链霉亲和素-生物素复合体法(SABC)试剂盒购自博士德公司。

1.2 细胞的缺氧培养：细胞接种于 24 孔培养板内的玻片上，长成单层后换含体积分数为 0.4% 小牛血清的 DMEM 培养基，使其处于静止状态后，进行缺氧培养(体积分数为 5% 的 CO_2 和 95% N_2)。分别在缺氧 2、6、12、24 和 48 h 时取出细胞进行各指标检测。未缺氧细胞为对照。

1.3 原位细胞凋亡检测：按试剂盒说明书进行操作，结果在高倍光镜(×400)下观察，至少观察 5 个视野，计数 200 个细胞以上，计算阳性细胞百分率。

1.4 $[Ca^{2+}]i$ 测定：根据 Okada 等[3]方法，细胞漂洗后在含 Fura-2/AM(5 μmol/L)的磷酸盐缓冲液(PSS)中，37 ℃孵育 1 h，再次漂洗后在 LS-50B 型荧光分光光度计(PE 公司)上用双波长比例测量法检测，激发波长为 340 nm 和 380 nm，发射波长为 500 nm，根据公式 $[Ca^{2+}]i(nmol/L)=Kd\times[(R-Rmin)/(Rmax-R)]\times\beta$ 来计算钙离子浓度。公式中 Kd 为 Fura-2 对 Ca^{2+} 的解离常数，37 ℃时为 224 nmol/L；R 为各样本在 340 nm 和 380 nm 时的荧光强度比值；Rmin 为最小荧光比值，由加入高于 Ca^{2+} 浓度 2～3 倍的 EDTA 后测得；Rmax 为最大荧光比值，由加入终浓度为 0.1% 的 Triton-X100 后测得；β 为 380 nm 时 Fura-2 在零钙和饱和钙条件下的荧光强度比值。

1.5 半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 bcl-2 mRNA、bax mRNA 的表达：用 Tripure 提取细胞总 RNA 进行 RT-PCR，以 β-actin 为内参照或外参照。bcl-2 引物：上游：5′-GT GGG ATA CTG GAG ATG AAG ACT-3′；下游：5′-CAG CCA GGA GAA ATC AAA CAG-3′；产物 550 bp。bax 引物：上游：5′-CA GGC GAA TTG GAG ATG AAC-3′；下游：5′-GG TGA GTG AGG CAG TGA GGA-3′；产物 370 bp。β-actin 引物：上游：5′-CC AAG GCC AAC CGC GAG AAG ATG AC-3′；下游：5′-AG GGT ACA TGG TGG TGC CGC CAG AC-3′；产物 587 bp。

由于 β-actin 和 bax 的退火温度均为 58 ℃，故 β-actin 作为内参照与 bax 同管进行 PCR；bcl-2 退火温度为 54 ℃，故 β-actin 作为外参照与 bcl-2 分管进行 PCR。产物进行电泳，紫外灯下观察并照相。照片扫描后，测定各条带积分吸光度(A)值(以灰度表示)。以 bcl-2 或 bax 和 β-actin 产物条带的积分吸光度值之比($A_{bcl-2\ or\ bax}/A_{\beta-actin}$)反映 bcl-2 mRNA 和 bax mRNA 的表达程度。

1.6 Bcl-2、Bax 的免疫组化染色：按 SABC 试剂盒说明书进行，3,3′-二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色。胞浆或核膜中棕黄色颗粒为阳性，不加一抗为阴性对照。用 Tiger 图像分析系统进行分析，随机选取 5 个视野，以其平均积分吸光度值(average integra optical densit, AIOD)作为 Bcl-2 和 Bax 的相对含量。

1.7 统计学处理：所有数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，并进行 Fisher 显著性检验，结果用 t 检验。

2 结 果

2.1 原位细胞凋亡率的变化(表 1)：缺氧条件下，正常对照组和 PX 组细胞凋亡率在各时间点间无显著差异(P 均>0.05)；PRZ 组细胞凋亡率均在缺氧 6 h 时开始升高，并随缺氧时间延长而逐渐升高。

2.2 $[Ca^{2+}]i$ 变化(表 2)：缺氧时，对照组和 PX 组 $[Ca^{2+}]i$ 2 h 即升高，并呈现持续上升的趋势，至 24 h 达高峰，48 h 略下降，但仍显著高于未缺氧时(P 均<0.01)；PRZ 组 $[Ca^{2+}]i$ 亦显著升高，12 h 达高峰，但升高幅度较小，缺氧 6 h 后均显著低于同时

万方数据

间点正常对照组和 PX 组(P 均<0.01)。

2.3 bcl-2 mRNA 和 bax mRNA 的表达变化(表 3,表 4):电泳照片扫描后,测定各条带积分吸光度值,内参照β-actin及外参照 β-actin 各值无显著差异(P 均>0.05),故 bcl-2 用 β-actin 作为外参照结果可信。同时间点未转染的 PASMCs 与 PX 组细胞之间 bcl-2、bax PCR 产物条带积分吸光度值之比均无显著差异(P 均>0.05);而 PRZ 组细胞 bcl-2的 PCR 产物条带积分吸光度之比均显著低于同时间点正常对照组细胞(P 均<0.01),bax 的 PCR 产物条带积分吸光度值之比均显著高于同时间点正常对照组细胞(P 均<0.01)。

2.4 Bcl-2、Bax 蛋白免疫组化染色结果:DAB 染色后,正常对照、PX、PRZ 细胞核膜及胞浆内均可见棕黄色阳性颗粒(图 1)。图像分析显示(表 5,表 6),在同时间点正常对照、PX细胞中Bcl-2蛋白以及

表 1 NHE-1 核酶基因转染对缺氧 PASMCs 原位细胞凋亡率的影响($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Table 1 Changes of apoptosis rates of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x}\pm s$, $n=5$) %

组别	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
正常对照组	5.29±0.88	4.87±0.87	5.28±0.91	5.54±0.84	6.12±1.06	6.50±0.63
PX 组	6.05±1.12*	4.89±0.92*	5.15±0.71*	5.39±0.63*	5.86±0.72*	6.51±0.65*
PRZ 组	32.06±3.06**	32.26±2.99**	41.61±5.56**#	53.21±5.27**#	55.49±5.33**#	66.04±5.34**#

注:与同时间点正常对照组比较:*$P>0.05$,**$P<0.01$;与同组未缺氧时比较:#$P<0.01$

表 2 NHE-1 核酶基因转染对缺氧 PASMCs 〔Ca^{2+}〕i 变化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 2 Changes of 〔Ca^{2+}〕i of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x}\pm s$, $n=10$) nmol/L

组别	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
正常对照组	95.94± 6.39	141.56±17.65#	458.26±80.78#	521.24±89.59#	637.54±90.26#	514.84±66.26#
PX 组	98.08± 7.37*	139.73±16.45*#	461.60±95.30*#	506.34±98.35*#	651.36±91.48*#	519.03±62.29*#
PRZ 组	198.08±16.59**	259.12±23.09**#	319.38±47.77**#	356.17±91.71**#	312.16±68.65**#	323.69±62.91**#

注:与同时间点正常对照组比较:*$P>0.05$,**$P<0.01$;与同组未缺氧时比较:#$P<0.01$

表 3 NHE-1 核酶基因转染对缺氧 PASMCs 内 bcl-2 mRNA 表达变化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Changes of bcl-2 mRNA expression of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
正常对照组	0.39±0.05	0.34±0.07#	0.40±0.09#	0.42±0.10#	0.45±0.16#	0.43±0.06#
PX 组	0.32±0.03*	0.35±0.08*#	0.36±0.09*#	0.38±0.11*#	0.43±0.12*#	0.39±0.14*#
PRZ 组	0.15±0.02**	0.14±0.08**#	0.16±0.06**#	0.16±0.09**#	0.14±0.07**#	0.12±0.05**#

注:与同时间点正常对照组比较:*$P>0.05$,**$P<0.01$;与同组未缺氧时比较:#$P>0.05$

表 4 NHE-1 核酶基因转染对缺氧 PASMCs 内 bax mRNA 表达变化的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 4 Changes of bax mRNA expression of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
正常对照组	0.17±0.02	0.18±0.05#	0.16±0.04#	0.20±0.05#	0.25±0.06#	0.22±0.03#
PX 组	0.23±0.06*	0.21±0.07*#	0.18±0.04*#	0.19±0.03*#	0.22±0.09*#	0.20±0.05*#
PRZ 组	0.59±0.08**	0.56±0.06**#	0.52±0.04**#	0.48±0.07**#	0.50±0.03**#	0.57±0.09**#

注:与同时间点正常对照组比较:*$P>0.05$,**$P<0.01$;与同组未缺氧时比较:#$P>0.05$

表 5 NHE-1 核酶基因转染后细胞 Bcl-2 蛋白表达水平变化($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Changes of Bcl-2 protein expression of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
正常对照组	2.21±0.18	2.25±0.24#	2.29±0.10#	2.45±0.18##	2.41±0.12##	2.46±0.27##
PX 组	2.09±0.30*	2.19±0.24*#	2.16±0.17*#	2.39±0.25*#	2.38±0.12*#	2.40±0.33*#
PRZ 组	1.45±0.20**	1.47±0.28**#	1.46±0.21**#	1.43±0.13**#	1.42±0.19**#	1.38±0.19**#

注:与同时间点正常对照组比较:*$P>0.05$,**$P<0.01$;与同组未缺氧时比较:#$P>0.05$,##$P<0.05$

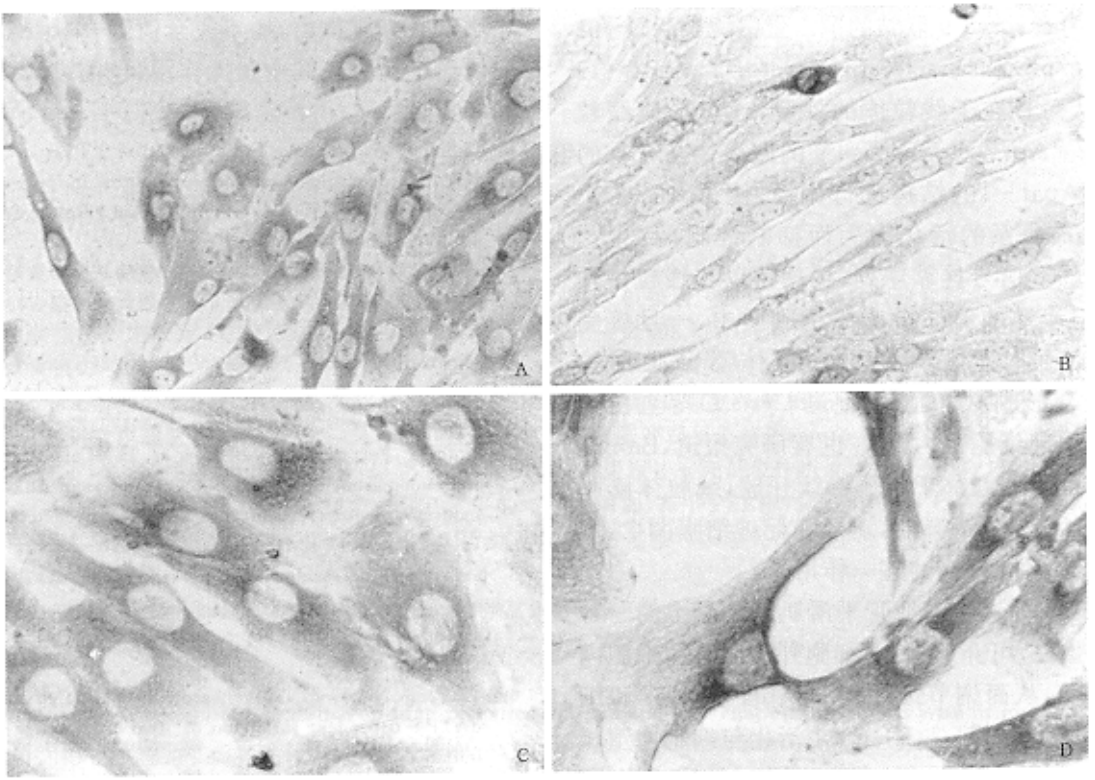
表 6 NHE-1 核酶基因转染后细胞 Bax 蛋白表达水平变化($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Changes of Bax protein expression of cells transfected with NHE-1 ribozyme gene in hypoxia($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	未缺氧	缺氧 2 h	缺氧 6 h	缺氧 12 h	缺氧 24 h	缺氧 48 h
正常对照组	2.98±0.13	3.09±0.10#	3.03±0.13#	3.15±0.18#	3.09±0.21#	3.07±0.29#
PX 组	3.02±0.51*	3.12±0.45*#	3.04±0.20*#	3.12±0.21*#	3.32±0.38*#	3.06±0.36*#
PRZ 组	4.33±0.33**	4.83±0.94**#	4.86±0.44**#	5.26±0.69**#	5.35±0.76**#	5.12±0.50**#

万方数据

注:与同时间点正常对照组比较:*$P>0.05$,**$P<0.01$;与同组未缺氧时比较:#$P>0.05$



注：A：未转染 PASMCs 内 Bcl－2 蛋白的表达（DAB 染色，×200，常氧）；B：PRZ 细胞内 Bcl－2 蛋白的表达（DAB 染色，×200，常氧）C：未转染 PASMCs 内 Bax 蛋白的表达（DAB 染色，×400，常氧）；D：PRZ 细胞内 Bax 蛋白的表达（DAB 染色，×400，常氧）

图 1 NHE－1 核酶基因转染对 PASMCs 内 Bcl－2、Bax 蛋白表达的影响

Figure 1 Expression of Bcl－2 and Bax protein in PASMCs transfected with NHE－1 ribozyme gene

Bax 蛋白阳性染色平均积分吸光度值无显著差异（P 均＞0.05）；而 PRZ 细胞 Bcl－2 蛋白阳性染色的平均积分吸光度值显著低于正常对照和 PX 细胞（P 均＜0.01）；Bax 蛋白阳性染色平均积分吸光度值显著高于正常对照和 PX 细胞（P 均＜0.01）。

3 讨 论

细胞凋亡（apoptosis）是一种由基因控制的细胞自主性死亡方式，它对消除机体内老化细胞或具有潜在性异常生长的细胞，以及维持多细胞机体的完整性和自身稳态具有重要作用。细胞凋亡也是调节血管壁平滑肌细胞数量的重要方式，正常情况下，血管壁发生的较低的增殖水平可被同时发生的相应的自发凋亡水平所平衡，以保持血管壁细胞数的相对稳定。缺氧时，PASMCs 由收缩型向合成型转化，并从中膜迁移至内膜且大量增殖，造成细胞增殖、凋亡失衡，而使肺动脉中膜增厚和非肌性血管肌化，导致血管内腔变窄，血流阻力增加，在低氧肺动脉高压形成中起关键性作用。

多种基因产物参与细胞凋亡过程，人们通过深入研究提出细胞凋亡主要有两条信号转导通路：细胞凋亡的线粒体依赖性途径和死亡受体途径。在线粒体依赖性途径中，$[Ca^{2+}]i$ 在细胞质、细胞核及细胞钙库线粒体和内质网之间动态平衡的破坏和重新分布直接参与细胞凋亡信号的调控，而 Bcl－2 家族蛋白在细胞凋亡过程的胞内 Ca^{2+} 调节及随后的一系列生理效应中发挥特殊作用[4]。

当死亡信号传递到细胞线粒体，位于线粒体内、外膜之间称为 PT 孔的巨大渗透性通道开放，线粒体跨膜电位下降，线粒体大量释放 Ca^{2+} 与 caspase 激活蛋白——细胞色素 C（Cyt－C）和凋亡诱导因子（apoptosis－inducing factor，AIF），Cyt－C 和 AIF 可进一步激活下游的 caspases，启动细胞凋亡蛋白酶级联反应，导致细胞凋亡[5,6]。而 PT 孔开放为钙调节性，并可形成正反馈扩大过程。此外，胞浆中 Ca^{2+} 浓度持续升高，可激活 Ca^{2+} 依赖性核酸内切酶、转谷氨酰酶、钙蛋白酶等多种酶，最终导致凋亡细胞结构的改变[7]。

Bcl－2 位于线粒体外膜中，其高表达可提高线粒体的跨膜电位和线粒体 Ca^{2+} 载量，抑制线粒体内 Ca^{2+} 泄漏[8]；并且阻止 Cyt－C 等促凋亡因子的释

放[9]，从而抵抗细胞凋亡。有研究发现，Bcl－2 还可直接与胞浆中 caspase 9 联结的凋亡蛋白酶激活因子 1 (apoptotic protease activating factor 1, Apaf－1) 相结合，从而存在于线粒体的外膜，通过形成线粒体－Bcl－2－Apaf－1－caspase 9 的四聚体复合物的形式而对 Apaf－1 的结构进行调控，使 Apaf－1 失去对 caspase 酶系的活化能力而抑制细胞凋亡[10]。Bax 含有 C 端信号挂靠序列，按理可以与线粒体外膜结合，但半数的 Bax 分布于细胞质中，一旦接受细胞凋亡信号时才诱导性插入线粒体膜[11]，在线粒体外膜聚合形成离子通道，促进 Cyt－C 等蛋白分子释放以引起细胞凋亡[12]。也有研究报道，Bax 高表达可以促进线粒体 PT 孔持续开放，线粒体膨胀和去极化，Cyt－C 等释放，诱导和促进细胞凋亡，而且 Ca^{2+} 可以促进 Bax 的这一作用。

NHE－1 是存在于血管平滑肌细胞膜上的一种管家基因蛋白，可介导 1∶1 细胞外钠离子和细胞内氢离子交换，从而调节细胞内 H^+、pH 值、Na^+ 和细胞容积。大量研究证实 NHE－1 活化与细胞增殖相关。我们已往的研究发现 NHE－1 抑制可抑制大鼠 PASMCs 增殖[13]。目前发现，NHE－1 抑制与细胞凋亡也有着密切的联系。Lang 等[14]认为，CD95 诱导细胞凋亡时伴有 NHE－1 的抑制、Cl^- 通道的激活等。Rich 等[15]研究发现，用 NHE－1 特异性抑制剂 HMA 处理白血病细胞后，引起细胞内 pH 值降低的同时，诱导细胞凋亡。Thangaraju 等[16]亦发现，抑制 NHE－1 可诱导人乳腺癌细胞凋亡。

我们在实验中发现，转染 NHE－1 特异性核酶基因后，大鼠 PASMCs 内 NHE－1 mRNA 表达量及 pHi 显著降低，细胞凋亡率显著增加，说明抑制 NHE－1 可以通过细胞内酸化，诱导 PASMCs 凋亡[2]。并且转染了 NHE－1 特异性核酶基因的细胞在缺氧条件下，其细胞凋亡率随缺氧时间的延长而逐渐升高，但 $[Ca^{2+}]i$ 升高幅度较小，从缺氧 6 h 起就显著低于同时间点的对照组和 PX 组，其 bcl－2 mRNA 及蛋白表达显著低于对照组，bax mRNA 和蛋白表达显著高于对照组，说明 NHE－1 抑制可能通过阻止缺氧培养的 PASMCs 的 $[Ca^{2+}]i$ 增加，并引起 bcl－2 表达降低及 bax 表达增加而诱导缺氧 PASMCs 凋亡。这一研究为通过抑制 NHE－1、诱导 PASMCs 凋亡从而治疗缺氧肺动脉高压肺血管重构提供了一定的实验依据，也为将来应用 NHE－1 抑制剂治疗这一疾病提供了一定的间接依据。但是 NHE－1 抑制后通过什么样的信号转导通路完成信号传递，引起 $[Ca^{2+}]i$ 增加、bcl－2 表达降低、bax 表达增加及细胞凋亡，还不完全清楚；细胞凋亡的死亡受体途径是否在其中发挥作用，也需进一步研究。

万方数据

参考文献：

1 Quinn D A, Dahlberg C G, Bonventre J P, *et al*. The role of Na^+/H^+ exchange and growth factors in pulmonary artery smooth muscle cell proliferation[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996, 14: 139－145.

2 陆俊羽，姚伟，钱桂生，等. NHE－1 核酶基因转染对大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23：1282－1284.

3 Okada K, Ishikawa S, Saito T. Effect of vasopressin on Na^+ kinetics in cultured rat vascular smooth muscle cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1990, 173: 224－230.

4 Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, *et al*. The Ca^{2+} concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide－induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl－2 action[J]. EMBO J, 2001, 20: 2690－2701.

5 Granville D J, Cassidy B A, Ruehlmann D O, *et al*. Mitochondrial release of apoptosis－inducing factor and cytochrome C during smooth muscle cell apoptosis [J]. Am J Pathol, 2001, 159: 305－311.

6 Li Peng, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al*. Cytochrome C and dATP－dependent formation of Apaf－1/caspase－9 complex initiates an apoptotic protease cascade[J]. Cell, 1997, 91: 479－489.

7 Oshimi Y, Miyazaki S. Fas antigen－mediated DNA fragmentation and apoptotic morphologic changes are regulated by elevated cytosolic Ca^{2+} level[J]. J Immunol, 1995, 154: 599－609.

8 Humlova Z. Protooncogene bcl－2 in process of apoptosis[J]. Sb Lek, 2002, 103: 419－425.

9 Yang Jie, Liu Xuesong, Bhala K, *et al*. Prevention of apoptosis by Bcl－2: cytochrome C from mitochondria blocked[J]. Science, 1997, 275: 1129－1132.

10 Semenkova L, Dudich E, Dudich I, *et al*. Alpha－fetoprotein positively regulates cytochrome C－mediated caspase activation and apoptosome complex formation[J]. Eur J Biochem, 2003, 270: 4388－4399.

11 Reed J C, Jurgensmeier J M, Matsuyama S. Bcl－2 family proteins and mitochondria [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1366: 127－137.

12 Scorrano L, Oakes S A, Opferman J T, *et al*. Bax and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca^{2+}: a control point for apoptosis[J]. Science, 2003, 300: 135－139.

13 姚伟，陆俊羽，钱桂生，等. Na^+/H^+ 交换器－1 反义 RNA 对大鼠肺动脉平滑肌细胞增殖的影响[J]. 中国危重病急救医学，2002，14：518－521.

14 Lang F, Ritter M, Gamper N, *et al*. Cell volume in the regulation of cell proliferation and apoptotic cell death [J]. Cell Physiol Biochem, 2000, 10: 417－428.

15 Rich I N, Worthington－White D, Garden O A, *et al*. Apoptosis of leukemic cells accompanies reduction in intracellular pH after targeted inhibition of the Na^+/H^+ exchanger[J]. Blood, 2000, 95: 1427－1434.

16 Thangaraju M, Sharma K, Liu Danni, *et al*. Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP－1 in apoptosis[J]. Cancer Res, 1999, 59: 1649－1654.

（收稿日期：2003－12－12 修回日期：2004－01－10）

（本文编辑：李银平）