

内皮素和一氧化氮合成酶在 家兔动脉粥样硬化斑块中的表达

宋良文 张秉钧* 赵静波* 吕崇山* 王泰龄* 汤健

(北京医科大学心血管基础研究所 北京 100083)

Expression of Endothelin and Nitric Oxide Synthetase in Rabbit's Atherosclerotic Plaques

SONG Liang-Wen ZHANG Bing-Jun/
ZHAO Jing-Bo' LU Chong-Shan'
WANG Tai-Ling' TANG Jian

(Institute of cardiovascular Basic Research, Beijing Medical University, Beijing 100083 China. 'Department of Pathology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

ABSTRACT Present test observed the synthesis and expression of endothelin (ET) and nitric oxide synthetase (NOS) in rabbit's atherosclerotic plaque (AP) on polypeptide and gene transfer.

Histochemistry and immunohistochemistry shown that in proliferating vascular smooth muscle cell (VSMC) within AP, synthesis of ET was increased while that of NOS was significantly decreased; Meanwhile, in situ hybridization also shown that the transfer of ET mRNA was great increased while that of NOS mRNA was great decreased within 5 cases and only within 1 case, a little of NOS mRNA was expressed and the range was limited.

So we believed that in aortic VSMC, un-balance of between ET and NOS may be involved in the occurrence and development of AP.

KEY WORDS Atherosclerosis; Gene expression; Endothelin; Nitric oxide synthetase

摘要 用免疫组织化学和原位杂交等方法观察了内皮素和一氧化氮合成酶在家兔动脉粥样硬化斑块中的合成和表达。结果是,在动脉粥样硬化斑块内增生的平滑肌细胞和巨噬细胞中,内皮素合成较正

常者增多,而一氧化氮合成酶的合成却明显减少;内皮素 mRNA 转录显著增加,而一氧化氮合成酶 mRNA 转录明显减少或消失。提示在动脉血管平滑肌细胞中,二者的平衡失调可能参与了动脉粥样硬化的发生和发展过程。

关键词 动脉粥样硬化; 内皮素; 一氧化氮合成酶; 基因表达

现有研究表明,内皮素在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的发生发展过程中可能起重要作用^[1]。实验发现,增生活跃的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)内有大量内皮素合成,原位杂交证明其中有内皮素 mRNA 的过多表达^[2]。有报道,在 VSMC 增生过程中与内皮素有拮抗作用的一氧化氮(nitric oxide, NO)和一氧化氮合成酶(nitric oxide synthetase, NOS)的含量有改变^[3],说明二者也可能在 As 的发病过程中起作用。本文通过组织化学、免疫组织化学和原位杂交等方法,观察了内皮素和 NOS 在 As 斑块中的表达,这对于进一步阐明 As 的发病机制具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

日本大耳白兔 12 只,平均体重 2.14 kg,分为对照组(n=6)和 As 组(n=6),后者每日喂饲胆固醇 1 g,其它饲料相同。实验前和实验开始后每月测血清胆固醇一次。3 个月处死动物,分离胸主动脉和颈总动脉,4%多聚甲醛固定 24 h,低温石蜡包埋切片,片厚 5 μm,用于免疫组织化学和原位杂交试验;同时从胸主动脉切取 1 cm 长的血管条按同样方法固定后冰冻切片,厚 20 μm,用于 NOS 组织化学染色。

1.2 方法

* 北京中日友好医院病理科, 100029

1.2.1 内皮素免疫组织化学 内皮素多克隆抗体购自 Sigma CO, 1:1 000 稀释, 以羊抗兔抗体 (1:200) 和 ABC 试剂盒 (1:1:100) 增强反应信号, DAB 显色。以人肺动脉高血压为阳性对照, 以内皮素 (1:1 000) 与内皮素抗体结合法 (2 h, 37℃) 为阴性对照。

1.2.2 NOS 组织化学显色 按文献 [4] 方法, 将冰冻切片在 0.1 mol·L⁻¹ PBS 中漂洗 3 次, 每次 10 min, 放入 NADPH (1 g·L⁻¹), NBT (0.25 mg), Triton X-100 (0.3%) 混合液中 37℃ 条件下孵育 60 min, 装片、脱水、透明、封片。阴性对照片先用 L-NNA (100 μmol in Tris-HCl, pH 8.0, 37℃) 反应 1 h, 再转入上述孵育液中。阳性对照用大鼠脑皮层切片。

1.2.3 原位杂交 按文献 [5] 方法进行, cDNA 探针用补骨脂素-光敏生物素经紫外光照射法标记, 内皮素探针为 203 bp, NOS 探针为 500 bp, 探针浓度为 2 mg·L⁻¹, 42℃ 条件下杂交 18~24 h, NBT-BCIP 显色。

2 结果

2.1 血清胆固醇

饲胆固醇 1 个月, As 组家兔血清胆固醇由实验前的 0.489 g·L⁻¹ 升至 9.903 g·L⁻¹, 第二和第三个月在此水平上略有升降, 但无显著性差异。与正常对照组比较, 自第一个月起, As 组家兔血清胆固醇改变有高度显著性意义 ($P<0.01$, Fig 1)。

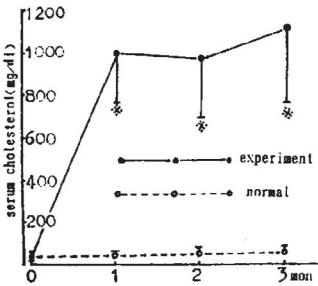


Fig 1. Rabbit's serum cholesterol alteration. *: comparison with correspondent month, $P<0.01$.

2.2 HE 染色和 Masson 特染

HE 染色的切片中可见 As 组家兔的主动脉内膜有斑块形成, 表层和深层有大量泡沫细胞形成, 底层有较多的梭形细胞自中膜向内膜增生和移行。Masson 染色证明为红染的 VSMC 增生。

2.3 内皮素免疫组织化学

正常对照组家兔的阳性免疫反应颗粒主要见于内皮细胞, 呈棕黄色, 位于核周的胞浆内。内膜层有少数散在的 VSMC, 亦呈阳性反应。在 As 组家兔的斑块内增生的 VSMC 和泡沫细胞多呈阳性反应, 在斑块下方, 中膜 VSMC 中也能见到阳性细胞, 6 只家兔均如此。肺动脉高压血管呈强阳性反应, 经抗原吸收的切片呈阴性反应 (Fig 2)。

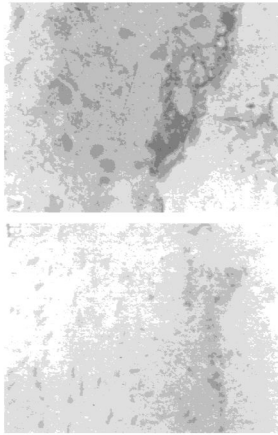


Fig 2. Immunohistochemistry on endothelium. A: proliferating VSMC within atherosclerotic plaque (AP) shown positive result (surface and bottom), $\times 1000$. B: negative control shown negative result in plaque $\times 100$.

2.4 NOS 组织化学

正常对照组家兔的动脉内膜和中膜呈深紫蓝色, 外膜不着色, As 组家兔动脉斑块内增生的 VSMC 和泡沫细胞中 NOS 组织化学

呈弱阳性反应, 表现为颜色变浅。大鼠脑皮
层切片呈深蓝色。L-NNA 阻断的切片为阴

性或弱阳性反应 (Fig 3)。

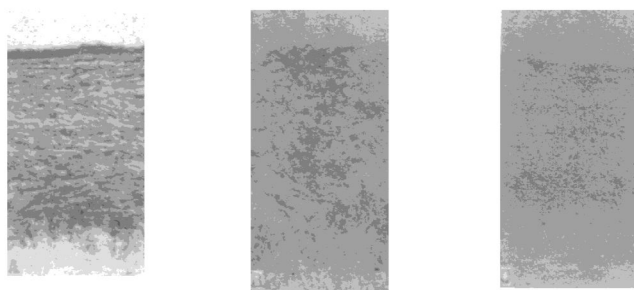


Fig 3. Histochemistry on NOS.

A: in normal aorta, NOS shown strong positive in VSMC, but adventitia shown negative ($\times 200$). B: proliferation VSMC within AP shown weak positive (up 2/3) ($\times 200$). C: normal aorta, added L-NNA before NADPH and NBT, VSMC shown negative result ($\times 400$)

2.5 原位杂交

2.5.1 内皮素原位杂交 正常对照组家兔仅在动脉内皮细胞胞浆中发现紫蓝色颗粒

状阳性结果。As 组家兔的斑块中增生的 VSMC 胞浆内呈阳性; 以质粒 PBR322 代替探针的阴性对照片呈阴性结果 (Fig 4)。

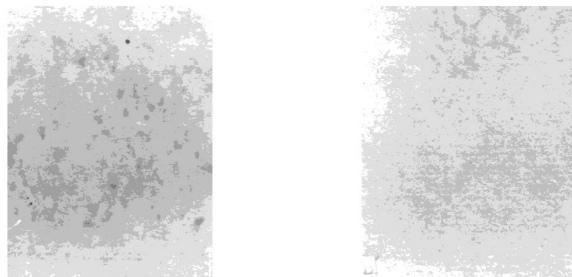


Fig 4. In situ hybridization on endothelium.

A: proliferative VSMC in AP shown positive, $\times 400$. B: negative control of AP shown negative result, $\times 400$.

2.5.2 NOS 原位杂交 正常对照组家兔有 5 例呈阴性或弱阳性, 只有一例在增生的 VSMC 底部区域呈阳性反应, 且范围较局限 (Fig 5)。可见内皮细胞、内膜和中膜 VSMC 呈阳性, 紫蓝色颗粒分布于胞浆中。由于颗粒密集, 常使整个细胞呈蓝色。在 As 组家兔的斑块中,

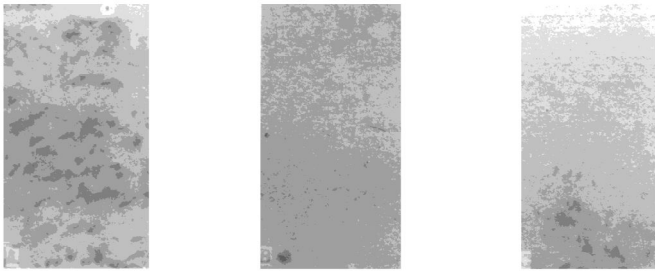


Fig 5. In situ hybridization on NOS. A: normal aortic VSMC shown significant positive, X400. B: AP shown negative result, X200. C: AP shown negative result (up 1/3) but VSMC in middle-layer shown positive, X400.

3 讨论

本室曾观察到, 自发性高血压大鼠不同组织中 NOS 基因表达明显低于 WK 大鼠, 提示 NOS 减少或 NO 生成不足与高血压发病有关^[4]; 内皮素可通过作用于 VSMC 上的内皮素 A 型受体促进细胞增生和抑制 NOS mRNA 的表达, 也可通过抑制 VSMC 上内皮素 A 型受体后, 作用于 B 型受体而抑制细胞增生并促进 NOS mRNA 的表达^[7]。

在人的 As 斑块中, 增生的 VSMC 内有内皮素的高表达^[1]。我们用球囊剥脱大鼠胸主动脉内皮所致内膜 VSMC 增生模型发现, 在增生的 VSMC 中亦有大量的内皮素表达^[2]。将外源性内皮素 (10^{-7} mol) 加入培养的大鼠和家兔 VSMC 中均可明显促进细胞增生。上述结果提示, As 斑块中 VSMC 增生与内皮素的高表达和 NOS 的低表达有关。

本文观察到, 当内皮素表达升高时, NOS 表达降低或消失, 推测二者可能在基因表达水平上具有相互抑制作用^[7]。内皮素具有持续收缩血管、促 VSMC 增生作用^[8,9], 而 NOS 合成的 NO 则具有舒张血管和抑制 VSMC

增生的作用^[10,11]。由此可见, NOS 的表达降低在 As 发生中可能有同样重要的作用。

现已明确, 高脂血症在 As 形成中有重要作用, 但它通过什么途径达到促进 VSMC 增生的作用仍不十分清楚。有报道认为, 高脂血清中 LDL 可被浸入动脉内膜的单核/巨噬细胞吞噬并氧化, 氧化型 LDL 既能明显促进 VSMC 增生^[12]; 又能促进内皮素基因的高表达和内皮素多肽的合成^[1], 而内皮素已被认为是一种作用较强的细胞生长因子^[13]。同时, 氧化型 LDL 还可能抑制 NOS 基因的表达和 NO 的活性。因此, 内皮素和 NOS 的失衡在 As 发生和发展中可能起一定的作用。

4 参考文献

- 1 Lerman A, Edwards BS, Hallett JW et al. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *N Engl J Med*, 1991, 325: 997~1001.
- 2 宋良文, 张秉钧, 赵新荣 et al. 动脉粥样硬化斑块中几种基因的表达. 北京医科大学学报, 1994, 26 (增刊): 36~39.
- 3 Gang UK, Hassid A. NO-generating vasodilators and B-bromo-cyclic guanosin monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth

- muscle cells. *Clin Invest*, 1989, 83 (5): 1774
- 4 Nichols K, Krantis A, Stains W et al. Histochemical localization of nitric oxide-synthesizing neurons and vascular sites in the guinea-pig intestine. *Neuroscience*, 1992, 51 (4): 791~799.
- 5 Negro F, Tomita U, Caverio PG et al. Detection of HBV DNA by in situ hybridization using a biotin-labeled probe. *J Med Virol*, 1985, 15: 373~376.
- 6 李倩虹, 张晨辉, 张灵芝 et al. 一氧化氮合成酶 mRNA 在中枢和外周组织中的表达和分布. 北京医科大学学报, 1994, 26 (增刊): 1~4.
- 7 李倩虹, 田青, 官长宁 et al. ET 和 IL-1 对 VSMC 中 NOS 基因表达的调控及其生物学意义. 北京医科大学学报, 1994, 26 (增刊): 9~14.
- 8 Boulanger CM, Tanner FC, Bea ML et al. Oxidized low density lipoproteins induce mRNA expression and release of endothelin from human and porcine endothelium. *Circ Res*, 1992, 70 (6): 1191~1197.
- 9 Resink TJ, Scott-Burden T, Boulanger C et al. Inducible endothelin mRNA expression and peptide secretion in cultured human vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 168: 1303~1310.
- 10 Henderson AH. Endothelium in control. *Br Heart J*, 1991, 65: 116
- 11 Prince RG, Gunson DE. Rising interest in nitric oxide synthetase. *TIBS* 18, 1993, 2: 35
- 12 Yla-Herttuala S, Palinski W, Rosenfeld ME et al. Evidence for the presence of oxidatively modified low-density lipoprotein in atherosclerotic lesions of rabbit and man. *J Clin Invest*, 1989, 84: 1086~1095.
- 13 Dubin D, Pratt RE, Cooke JP et al. Endothelin, a potent vasoconstrictor, is a vascular smooth muscle mitogen. *J Vasc Med Biol*, 1989, 1: 13~16.

(上接第 17 页) function laboratory. (Heart lung, 1993; 22: 523-33) (后二部分本文有删节)

例一可见, 论文的基本内容已精确地在这 8 项结构式摘要中得到体现, 一般读者只要看摘要, 就能理解全文。然而, 这种结构式摘要项目多, 字数增加,

篇幅加大, 使推广应用受到限制。近年来, 随着研究的深入, 结构式摘要的项目也在逐渐变革, 形成两种发展趋势: 一是在原 8 个项目的基础上, 根据论文的种类、结构和内容, 去掉一部分项目 (附表)^[1]。

附表 Heart Lung 1993 年第 22 卷第 6 期采用的结构式摘要

Page 523	Page 472	Page 490	Page 494	Page 509	Page 534	Page 542
objective	同 P523	同 P523	Purpose	同 P523	同 P523	同 P523
design	同 P523	同 P523	methods	同 P523	同 P523	同 P523
setting	同 P523	同 P523	---	---	同 P523	同 P523
subjects	同 P523	sample	sample	同 P523	sample	同 P523
outcome measure	---	同 P523	同 P523	同 P523	instrument	同 P523
intervention	---	---	---	---	---	---
results	同 P523	同 P523	同 P523	同 P523	同 P523	同 P523
conclusion	同 P523	同 P523	同 P523	同 P523	同 P523	同 P523
8	6	7	5	6	7	7

第二是简化项目, 将 8 项改为 4 项, 与论文的 4 项内容相对应。它们是: Objective (或 Background and Purpose, 或 Aim, 或 Purpose), Methods, Results, Conclusions. 现在, 采用结构式摘要的期刊中绝大多数用 4 项层次。值得注意的是, 不管是 8 项还是 4 项层次, 开头都没有 abstract 这个词。

2 结构式摘要引入本刊的应用范围和写作要求

2.1 ABSTRACT 本刊按照国家标准要求论著都写 ABSTRACT, 其格式是 4 项层次结构式, 如例二^[5]。

Do Anger and Aggression Affect Carotid

Atherosclerosis?

Yoshitaro Matsumoto, Osamu U'gama, Souichiro Shimizu, et al

Background and Purpose: Although a number of metabolic and psychosocial factors have been identified as coronary risk factors, no studies have evaluated the relation between personality and cerebrovascular disease. The purpose of the present study was to elucidate the relation between the characteristics of anger or aggression and the severity of carotid atherosclerosis on the basis of the findings of B-mode ultrasonography. (下转第 25 页)

(上接第 22 页)

Methods: The Cornell Medical Index was used to measure anger in 34 patients with signs of atherosclerosis or at least one of four recognized risk factors for atherosclerosis (hypertension, hypercholesterolemia, diabetes mellitus, and cigarette

smoking). The Rosenzweig Picture Frustration Study and Yatabe-Guilford Personality Test were used to evaluate aggression. High-resolution B-mode ultrasonography was performed, and the severity of carotid atherosclerosis was determined

(下转第 29 页)

(上接第 25 页)

by plaque score. The occurrence of risk factors for carotid atherosclerosis was compared among the patients.

Results; The correlation of plaque score with one item that endorses anger was $r = .65$ ($P < .01$) and with "extrapersistent" in aggression was $r = .50$ ($P < .01$). Multivariate analysis identified significant correlations between plaque score and age, hypercholesterolemia, and anger.

Conclusions; Our results suggest that anger and, perhaps, aggression may be risk factors for cerebrovascular disease. (Stroke 1993; 24: 983-986)

与例二不同,本刊以 ABSTRACT 开头,而 Background and Purpose 这个项目名称不出现,只用 Methods, Results 和 Conclusions (参见《中国动脉硬化杂志》投稿须知 2.8.2)。

若论著系临床资料分析,可参照例三的格式来写 ABSTRACT^⑥。

Unilateral Amnesic Stroke

Six New Cases and a Review of the Literature

Brian R. Ott, MD, Jeffrey L. Saver, MD

Background and Purpose: Although persistent amnesia due to bilateral limbic system infarction is well described, reports of amnesic syndromes due to unilateral stroke have appeared infrequently and unsystematically. We report six new cases and review previously published reports to expand and consolidate knowledge regarding amnesic stroke.

Case Descriptions; Six patients developed acute amnesia associated with unilateral stroke. Brain computed tomography or magnetic resonance imaging revealed lesions in limbic structures, which accounted for the memory deficit.

Conclusions; Persistent as well as transient amnesia may be the sole or primary manifestation of unilateral hemispheric stroke. The vascular mechanisms of amnesic stroke are diverse.

(后两部分本文有删节)

撰写时,同样要用 ABSTRACT 来代替例三中的 Background and Purpose, ABSTRACT 顶格排。

2.2 论著摘要 本刊只发表中文论著摘要,要求在 1500 字以内。写作格式除参照 ABSTRACT⁴ 项结构式以外,还要求能独立成文,即“①文题,②作者,③单位,④研究目的或背景,⑤材料方法或对象,

(下转第 32 页)

(上接第 29 页)

⑥结果, ⑦讨论或结论; 写作时, ⑤、⑥和⑦项要求写出作为标题。

2.3 结构式摘要在本刊的编排 按照本刊的编排规范, ABSTRACT 连同英文文题、作者、单位及 KEY WORDS 排在中文单位和中文摘要之间; 而且, ABSTRACT 这个词用 5 号黑体、Methods、Results 和 Conclusions 这三个词用小 5 号黑体顶格排, 后空 2 字母距接排内容。黑体醒目, 字号不同以示区别。

参考文献

1 Ad Hoc Working Group for Critical Appraisal of the Medical Literature. A proposal for more informative

abstracts clinical articles. *Ann Intern Med*, 1987, 106 (4): 598~604.

- 2 潘伯荣, 黄良田, 刘雪立. 科技论文采用结构式摘要的调查. *中国科技期刊研究*, 1994, 5 (1): 43~46.
- 3 Finkelstein SM, Lindgren B, Prasad B et al. Reliability and validity of spirometry measurements in a paperless home monitoring diary program for lung transplantation. *Heart Lung*, 1993, 22 (6): 523.
- 4 *Heart lung*, 1993, 22 (6): 523, 472, 490, 494, 509, 534, 542.
- 5 Yoshitaro M, Osamu U, Souichiro S et al. Do anger and aggression affect carotid atherosclerosis? *Stroke*, 1993, 24 (7): 983.
- 6 Ott BR, Saver JL. Unilateral amnesic stroke. Six new cases and a review of the literature. *Stroke*, 1993, 24 (7): 1033.