

## 大鼠主动脉内皮损伤后原生型一氧化氮合成酶和内皮素-1 基因表达的改变

陈颜芳 陈鲁原 林曙光

(广东省心血管病研究所, 广州 510100)

### Changes of Constitutive Nitric Oxide Synthetase Gene and Endothelin-1 Gene Expressions in Rats' Aortae after Endothelial Injury

CHEN Yan-Fang, CHEN Lu-Yuan and LIN Shu-Guang

(Guangdong Cardiovascular Institute, Guangzhou 510100, China)

#### ABSTRACT

**Aim** This study is to investigate the changes of constitutive nitric oxide synthetase (cNOS) gene and endothelin-1 (ET-1) gene expression after endothelial injury.

**Methods** Endothelial cells of rats' thoracic aortae were injured by Fogarty balloon catheter. Thoracic aortae tissues were under histological examination at 1, 5, 15 and 20 days after endothelial injury. The cNOS gene and ET-1 gene mRNA expressions in thoracic aortae tissues at different time stage were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) methods.

**Results** Histological examination showed smooth muscle cell (SMC) proliferation and intimal thickening in thoracic aortae at 5, 15 and 20 days after endothelial injury. Some sites of intima began to reendothelialize at 20 days. The ET-1 gene expression in thoracic aortae tissue increased significantly at 1 and 5 days, and still maintained at higher level at 15 and 20 days than control. To the opposite, the cNOS gene expression disappeared at 1 day, and was lower than control at 20 days.

**Conclusion** The results indicated that alterations of ET-1 gene and cNOS gene expression were associated with SMC proliferation in this endothelial injury model.

**KEY WORDS** Endothelial injury; Smooth muscle cell; Constitutive nitric oxide synthetase; Endothelin-1; Gene expression

**摘要** 采用 Fogarty 导管损伤大鼠胸主动脉段内皮细胞, 观察 1、5、15 和 20 天后胸主动脉组织形态学改变; 提取胸主动脉段组织 RNA 采用反转录-多聚酶链反应方法测定原生型一氧化氮合成酶基因和内皮素-1 基因 mRNA 的表达。结果表明, 胸主动脉段血管平滑肌细胞在内皮损伤后增殖, 内皮素-1 基因表达增加, 原生型一氧化氮合成酶基因表达减少, 提示原生型一氧化氮合成酶基因和内皮素-1 基因表达的改变可能在内皮损伤后的平滑肌细胞增殖中起重要作用。

**关键词** 内皮损伤; 平滑肌细胞; 原生型一氧化氮合成酶; 内皮素-1; 基因表达

已经知道, 球囊导管损伤血管内皮细胞可致平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)增殖和血管内膜增厚<sup>[1]</sup>, SMC 增殖在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)和血管成形术后再次狭窄(restenosis)中起重要作用, 而内皮素-1 在体外能刺激平滑肌细胞增殖<sup>[2]</sup>, 一氧化氮(nitric oxide, NO)能抑制平滑肌细胞的增殖<sup>[3]</sup>, 因此, 内皮素-1 和 NO 产生的异常可能在 As 和再狭窄形成过程中具有重要作用。本研究通过观察内皮损伤后主动脉 SMC 增殖和血管中原生型一氧化氮合成酶(constitutive nitric oxide synthetase, cNOS)基因与内皮素-1 基因表达的变化, 探讨这二种基因与 SMC 增殖的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型和取材

选择体重 250~300 g 的雄性 Wistar 大鼠,用 Fogarty 导管(购自东方进出口公司)自颈动脉进入,达横膈水平,在球囊内充以生理盐水,反复回拉 5 次以损伤胸主动脉段血管的内皮细胞。术后分别于 1、5、15 和 20 天处死 5 只大鼠,对照组为假手术后(不损伤血管内皮)同样处死 5 只大鼠。各组大鼠取出一小段胸主动脉作石蜡切片,HE 染色用于组织学检查,其余大部分胸主动脉组织置冰浴的磷酸盐缓冲液(PBS)中洗涤,剥去血管外膜后迅速放入液氮中保存,用于提取 RNA 作基因表达研究。

### 1.2 大鼠胸主动脉 RNA 提取

从液氮中取出胸主动脉标本,参照文献[4]报道的一步法提取组织 RNA。260/280 nm 光密度比值在 1.8~2.0 之间。

### 1.3 反转录

用 Promega 公司的反转录药盒。取 2  $\mu$ g 总 RNA 在 65°C 下变性 3 min,依次加入 10 $\times$ 缓冲液 2  $\mu$ l,25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 4  $\mu$ l,10 mmol/L dNTP 混合液 2  $\mu$ l,寡核苷酸引物 1  $\mu$ l,2.5 Mu/L RNA 酶抑制剂 1  $\mu$ l,15 Mu/L 反转录酶 0.6  $\mu$ l。反应总体积 20  $\mu$ l,于 42°C 保温 90 min。加入 50  $\mu$ l TE 液(10 mmol/L Tris·HCl,1 mmol/L EDTA,pH 8.0)于 70°C 加热 10 min 终止反应。

### 1.4 多聚酶链反应

本实验所用引物序列有两种:①内皮素-1 基因的上游引物为 5'-AACCATGGATTATTTGCTCATG-3',下游引物为 5'-AGTGTTGACCCAAATGATGTC-3',由该对引物可扩增出 230 bp 的 DNA 片段;②cNOS 基因:上游引物为 5'-GGTGAATCCAT-ACCAGCCTGATCCATGGAACAC-3',下游引物为 5'-TACTCG-AAACGCCAGTCCTTCTTC-TTCGAATGG-3',以该对引物可扩增出 661 bp 的 DNA 片段。

多聚酶链反应(PCR)总体积为 50  $\mu$ l。含 0.5  $\mu$ Ci [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP(北京福瑞公司),1 $\times$ 缓冲液,2.5 u Taq DNA 聚合酶,200  $\mu$ mol/L dNTP 和 50  $\mu$ mol/L 引物。内皮素-1 基因 PCR 所需的变性、退火及延伸温度分别为 92°C 1 min $\rightarrow$ 50°C 50 s $\rightarrow$ 72°C 1 min,共进行 25 个循环。cNOS 基因 PCR 条件为 94°C 1 min $\rightarrow$ 55°C 1 min $\rightarrow$ 72°C 1 min,25 个循环。首次循环先在 94°C 变性 10

min,最后一次循环在 72°C 延伸 10 min。反应完毕取 10  $\mu$ l 产物行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下照像,转膜后作 X 光片放射自显影。

### 1.5 数据处理

放射自显影光密度扫描光密度值以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较为方差分析 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 形态学观察

正常大鼠主动脉壁分三层:内膜、中膜及外膜。内皮拉伤后一天,可见内皮细胞完全剥脱,弹性纤维暴露,并可见附壁血栓;5 天时可见平滑肌穿越内弹力板,形成平滑肌细胞增殖灶;15 天时可见内膜明显增厚,有大量平滑肌细胞增殖;20 天时有新生内皮覆盖血管内面,增生内膜趋于稳定(Figure 1)。

### 2.2 内皮素-1 和原生型一氧化氮合成酶基因表达

鼠胸主动脉总 RNA 经反转录成 cDNA 后,取 1  $\mu$ g cDNA 行特异性引物 PCR 扩增。取 10  $\mu$ l PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,得到 230 bp(内皮素-1 基因扩增片段)和 661 bp(cNOS 基因扩增片段)的条带,与实验设计相符。内皮素-1 基因在内皮损伤后 1 天和 5 天即明显表达,在 15 天和 20 天时表达水平仍高于正常水平(Figure 2);而 cNOS 基因在内皮损伤后 1 天和 5 天表达消失,15 天和 20 天时出现表达,但明显低于对照组(Figure 3)。放射自显影光密度扫描结果如 Table 1。

Table 1. Changes of ET-1 gene and cNOS gene mRNA expression in rats' thoracic aortae after endothelial injury ( $\bar{x}\pm s$ , optical density).

Group	n	ET-1	cNOS
control	4	10 $\pm$ 4	90 $\pm$ 12
one day	4	180 $\pm$ 26 <sup>a</sup>	0
5 days	4	140 $\pm$ 20 <sup>b</sup>	0
15 days	4	60 $\pm$ 13 <sup>c</sup>	25 $\pm$ 7 <sup>a</sup>
20 days	4	38 $\pm$ 10 <sup>c</sup>	31 $\pm$ 9 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.01$ , compared with control group; b:  $P < 0.01$ , compared with one day group; c:  $P < 0.01$ , compared with 5 days group.

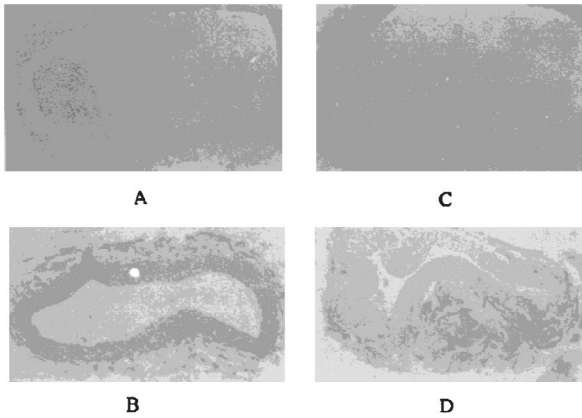


Figure 1. Photomicrographs of rats' thoracic aortae at different time stages after endothelial injury (refer to the article, HE stain  $10\times$ ). (A) one day after endothelial injury, (B) 5 days after endothelial injury, (C) 15 days after endothelial injury, (D) 20 days after endothelial injury.

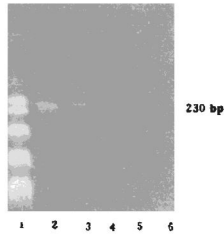


Figure 2. Changes of endothelin-1 gene expression in rats' thoracic aortae at different time stages after endothelial injury. 1. DNA molecule mark; 2; one day after endothelial injury; 3; 5 days after endothelial injury; 4; 15 days after endothelial injury; 5; 20 days after endothelial injury; 6; control.

### 3 讨论

球囊导管损伤血管内皮细胞是研究动脉粥样硬化和血管成形后再狭窄的常用病理模型。本研究复制了大鼠胸主动脉内皮损伤致平滑肌细胞增殖和内膜增厚模型,采用内皮素-1基因和 cNOS 基因特异性引物,通过 PCR 方法

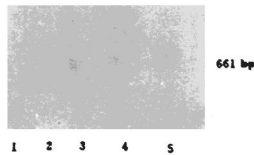


Figure 3. Changes of constitutive nitric oxide synthase gene expression in rats' thoracic aortae at different time stages after endothelial injury. 1; one day after endothelial injury; 2; 5 days after endothelial injury; 3; 15 days after endothelial injury; 4; 20 days after endothelial injury; 5; control.

观察了内皮损伤不同时间内皮素-1 基因和 cNOS 基因 mRNA 表达的改变。结果表明对照组基础状态下(血管内皮存在),血管中内皮素-1 基因和 cNOS 基因表达存在,此结果与内皮细胞基础状态下合成和分泌内皮素-1 和 NO 来维持血管正常舒缩功能的理论相符合。在内皮损伤第 1 天和第 5 天,血管中内皮素-1 表达明显增加,血管平滑肌细胞开始增殖,内膜增

厚。由于此时血管内皮被剥脱(见病理检查结果),因此内皮素-1不可能来自内皮,而可能来源于平滑肌细胞,这点得到了最近 Resink 等<sup>[6]</sup>报道的增殖活跃的血管平滑肌细胞有大量的内皮素合成这一结果的支持。球囊损伤内皮第一天至第5天 cNOS 表达为 0,这与内皮细胞被剥脱有关;在第15天和20天时可检测到 cNOS 的 mRNA 表达,但表达量明显低于正常基础状态,该结果与第20天时病理学检查发现有内皮细胞覆盖血管相一致。我们认为,这些内皮细胞可能是由分支血管和未被拉伤的血管两端的内皮细胞生长爬行而来。

近年来的研究表明,内皮素-1在体外能刺激血管平滑肌细胞的增殖,而 NO 供体则抑制血管平滑肌细胞增殖,因此本实验结果提示了内皮素-1基因和 cNOS 基因表达的改变可能是内皮损伤后平滑肌细胞增殖和血管内膜增厚的重要机制之一。

#### 参考文献

- 1 Miano JM, Tota RR, Vlasic N, et al. Early protooncogene expression in rat aortic smooth muscle cells following endothelial removal. *Am J Pathol*, 1990, **137**: 761~763.
- 2 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.
- 3 Gang UC, Hassid A. NO-generating vasodilators and B-romo-cyclic guanosin monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *Clin Invest*, 1989, **83**(5): 1 774~776.
- 4 Chomczynski P. Single-step method of RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156~158.
- 5 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**: 1 303~310.

(1996-07-07 收到, 1996-09-05 修回)

## 名词术语的汉英对照及缩写

乙酰化低密度脂蛋白	acetylyzed low density lipoprotein, aLDL
乙酰氨基葡萄糖	acetylglucosamine, aGA
乙酰磷酸酶	acetylphosphatase, AP
乙酰半胱氨酸	acetylcysteine, AC
乙酰胆碱酯酶	acetylcholine esterase, AChE
伴刀豆蛋白 A	concanavalin A, CoA
非条件培养基	unconditioned medium, uCM
单核细胞条件培养基	monocyte-conditioned medium, MC-CM
云芝多糖	polysaccharide krestin, PSK
肌钙蛋白 T	troponin T, TnT
重组组织型纤溶酶原激活剂	recombinant tissue type plasminogen activator, rt-PA
冠状动脉造影	coronary angiography, CAG
稳定性心绞痛	stable angina pectoris, sAP
mRNA 编辑蛋白	mRNA editing protein, REP
mRNA 编辑酶催化多肽-1	mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-1, REECP-1
不稳定性心绞痛	unstable angina pectoris, uAP
转化生长因子	transforming growth factor, TGF
糖蛋白受体拮抗剂	glycoprotein receptor antagonist, GPRA
人脐静脉内皮细胞	human umbilical vein endothelial cell, hUVEC

(胡必利编写)