

(1996-10-02 收到, 1996-11-30 修回)

低氧对大脑皮层微血管内皮细胞诱导型 一氧化氮合成酶表达的影响

吕 敏 顾正中

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

Effects of Hypoxia on Expression of Inducible Nitric Oxide Synthetase in Endothelial Cells of Cerebral Cortical Microvessel in Rats

LU Min and GU Zheng-Zhong

(Shanghai Institute of Physiology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

ABSTRACT Present study observed the direct effects of hypoxia on expression of inducible nitric oxide synthetase (iNOS) in endothelial cells (CMEC) which isolated from rats' cerebral cortical microvessels, using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique. Hypoxic mixed gases were over the cultural endothelial cells in different time with BNA-310N₂-O₂-CO₂ incubator (TABAI ESPEC Co). The experimental results showed that serious hypoxia, the partial pressure of O₂ is 6.7 kPa in cultural medium, can induce the expression of iNOS gene in CMEC after 24 hours, reoxygenation cannot entire eliminate the effect. The moderate hypoxia, the partial pressure of O₂ is 10.7 kPa, cannot induce the expression of iNOS gene. These results suggested that hypoxia could be an inducer of production of iNOS in CMEC and NO may play an important role in regulation of cerebral microcirculation under hypoxia.

KEY WORDS Hypoxia; Cerebral cortical microvessel; Endothelial cell; Inducible nitric oxide synthetase; Gene expression

摘要 本研究采用反转录多聚酶链反应技术观察了低氧对培养的大鼠大脑皮层微血管内皮细胞中诱导型

一氧化氮合成酶基因表达的影响。发现经 3% O₂ (培养液中氧分压为 6.7 kPa) 作用 24 小时后, 能够明显诱导内皮细胞中该型合成酶基因的表达, 且在复氧 12 小时后, 仍不能消除上述作用; 而 11% O₂ (培养液中氧分压为 10.7 kPa) 作用相同时间, 则不能诱导该酶的表达。结果表明, 较严重的低氧条件可以直接诱导一氧化氮合成酶的表达, 提示 NO 在低氧下大脑皮层微循环的调节中可能起重要作用。

关键词 低氧; 大脑皮层微血管; 内皮细胞; 诱导型一氧化氮合成酶; 基因表达

大量的研究已证实, 低氧(或缺氧)可以引起脑血管扩张^[1], 其作用机制是多方面的。在众多的扩血管因子中, 一氧化氮(nitric oxide, NO)的作用是不容忽视的。在血管内, NO 主要来自于内皮细胞, 作为舒张因子参与血管舒张反应。由于 NO 是一个半衰期非常短的化合物(半衰期仅数秒), 直接分析有一定困难。因此, 以往较多的研究是以特异性催化 NO 产生的酶—NO 合成酶(nitric oxide synthetase, NOS)的变化来反映 NO 的情况。本研究组曾以离体大脑基底动脉为标本, 采用 NOS 抑制剂 L-NNA 进行了研究, 发现 NO 不仅在常氧下参与维持正常血管张力, 而且还参与低氧下脑血管的舒张反应^[2]。但是, 这些结果是从间接的研究中获得的。现已知, NOS 是一组同功酶, 其中的诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS)在受到外界刺激时可大量诱导产生, 并发挥其强大作用。关于这点在炎症反应中得以证实, 并发现此时 NO 有一定的细胞毒性作用^[3]。低氧作为一种常见的非生理性因素它是否会诱导大脑皮层微血管内皮细胞产生 iNOS, 目前尚未见报道。

本研究是在以往 NOS 参与低氧下离体脑血管张力调节的工作基础上,用基因表达的方法研究低氧能否诱导培养的大脑皮层微血管内皮细胞产生 iNOS,为 NO 是否参与低氧下脑血管调节作用提供直接证据。

1 材料和方法

以反转录-多聚酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术观察低氧处理后的大脑皮层微血管内皮细胞中 iNOS 基因的表达情况。实验材料选用培养的大脑皮层微血管内皮细胞。

1.1 细胞的培养

参考 Duan CG^[1]和 Paterson M^[2]的方法并加以适当改进。

取新生大鼠,打开颅骨,取出大脑皮层。D-Hanks 液清洗两次,匀浆后分别用 149 μm 和 74 μm 孔径的尼龙网过滤,刮下 74 μm 孔径的网上的微血管,用胶原酶消化约 30 min,离心弃上清,用含 15% 小牛血清的 MEM 培养液吹打,并移至 50 ml 培养瓶中,静置培养 5~7 天换液,以后每 2~3 天换液一次,待细胞融合后,用 0.1% 胰蛋白酶消化传代,一般 5~7 天传一代,实验用第五代之内的细胞。D-Hank's 液(g/L): NaCl 8.0, KCl 0.4, Na_2HPO_4 12H₂O 0.133, KH_2PO_4 0.06, NaHCO_3 0.35。

1.2 低氧条件

采用日本 TABAI ESPEC 公司生产的 BNP-310N₂-O₂-CO₂ 培养箱对细胞施加低氧,实验用两种低氧气体: 3%O₂-5%CO₂-92%N₂ 和 11%O₂-5%CO₂-84%N₂; 培养液中最终氧分压分别为 6.67 kPa 和 10.67 kPa。对细胞的低氧作用时间分别为 8、16 和 24 h 及复氧 12 h。每一低氧条件用培养细胞四瓶,每一样本以相同的量进行内参照基因(GAPDH)和 iNOS 基因的扩增。

1.3 反转录-多聚酶链反应(RT-PCR)

1.3.1 引物的准备 分别验证并合成两对引物^[3,4]: GAPDH 和 iNOS,前者为内参照,引物长度为 20 个碱基对,扩增产物预计长度为 309 bp,后者引物长度为 21 个碱基对,扩增产物预计长度为 576 bp。

1.3.2 细胞内总 RNA 的提取 经低氧处理后的细胞,立即用 Trizol 法(GiBco 公司产品)提取细胞内总 RNA,RNA 的含量和纯度经紫外分光光度计比色和电泳确定。

1.3.3 RT-PCR 条件 总 RNA 分别作逆转录反应

和 PCR(反转录试剂盒购自 promega 公司, Taq 酶和 dNTP 等 PCR 试剂购自华美公司)。PCR 共进行 31 次循环,反应条件为变性 94℃ 1 min→退火 60℃ 1 min→延伸 72℃ 2.5 min,扩增后的产物用 2% Agarose 作电泳分析。

2 结果

2.1 3%O₂ 对内皮细胞中诱导型一氧化氮合成酶基因表达的影响

3% O₂ 处理不同时间后的大脑皮层微血管内皮细胞,提取总 RNA 后,经 RT-PCR 扩增基因,电泳结果显示内参照基因(GAPDH)为阳性,电泳图上的第 1、3、5、7、9 孔有明显的阳性条带; iNOS 基因在经低氧作用 24 h 左右,有明显表达,电泳图的第 8 孔有一阳性条带; 24 h 低氧处理后复氧 12 h,仍显示阳性结果,在第 10 孔有一弱的阳性条带。而低氧作用 8 h 和 16 h 的样本,未见有 iNOS 基因的表达,电泳图的第 4、6 孔为阴性结果(Figure 1)。上述结果提示,3%O₂(重度低氧)24 h,能够明显诱导大脑皮层微血管内皮细胞 iNOS 基因的表达,且经一定时间复氧后,仍不能完全消除低氧的作用。

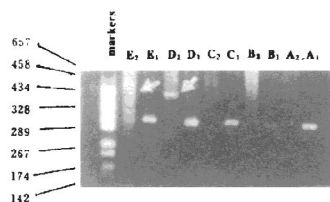


Figure 1. Effect of 3%CO₂ on expression of iNOS gene in CMEC. A₁, control group. B, C, D, experiment group (under hypoxia with 8, 16, 24 hours respectively). E, experiment group (reoxxygenation 12 hours after hypoxia 24 hours). 1, GAPDH; 2, iNOS.

2.2 11% O₂ 对大脑皮层微血管内皮细胞中诱导型一氧化氮合成酶基因表达的影响

11% O₂ 处理不同时间后的大脑皮层微血管内皮细胞,经 RT-PCR 扩增基因后,电泳结

果显示内参照基因均为阳性条带(Figure 2 中的第1、3、6、9孔),而*iNOS*基因均为阴性(第2、4、5、10孔),即无基因的表达(Figure 2),该结果提示,11% O_2 (中度低氧)不能诱导大鼠皮层微血管内皮细胞产生*iNOS*。

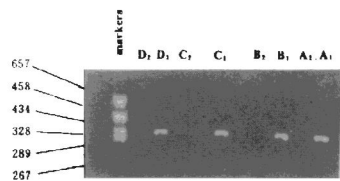


Figure 2. Effect of 11% O_2 on expression of *iNOS* gene in CMEX. A₁: control group; B₁, C₁: experiment group (under hypoxia with 16, 24 hours respectively); D₁: experiment group (reoxxygenation 12 hours after hypoxia 24 hours). 1, GAPDH; 2, *iNOS*.

3 讨论

Lee 等^[1]等早在八十年代就发现 NO 参与离体脑动脉的扩张反应。随后有大量的研究结果支持 NO 的扩血管作用。与此同时也存在相反的结果,其中主要的原因是实验方法的不同及结果的间接性。由于 NO 是一半衰期非常短的化合物,直接测定有一定的困难,因此,大部分的工作是以其特异性的合成酶为研究对象,通过应用该酶的激动剂和抑制剂所产生的效应来推测 NO 的作用,但难以排除药物本身对血管的直接作用。最近的研究发现, NOS 是一组同功酶,其中的诱导型 NOS 已愈来愈受到人们的重视。由于诱导型酶有别于固有型酶,它必须在外有外界刺激情况下才能大量产生并发挥作用,该型酶基因组成与固有型也有很大不同(同源性仅 50%),若在基因水平来研究其表达情况,将为研究 NO 的作用提供最直接的证据,且此结果不会受其他因素的混淆。目前在炎症反应及整体动物缺血一再灌注等方面已作了许多*iNOS*的研究。

不少研究结果已表明,低氧可以引起脑血管扩张,NO 可能参与其中作用,但低氧是否直接诱导脑血管 NOS 的产生,至今未见报道。本研究结果为此提供了直接的证据,证明在重度低氧情况下,作用 24 小时后,确实可以诱导大鼠皮层微血管内皮细胞*iNOS*基因的表达。本实验结果还显示,经复氧处理 12 小时后,*iNOS*表达明显减弱,这一结果可以证明低氧 24 小时后*iNOS*的表达不是由于污染或炎症所引起的,否则*iNOS*表达应加强而不是减弱。

在导致*iNOS*基因表达的时间长短上,低氧有别于炎症反应和缺血一再灌注,后者可在较短时间内刺激*iNOS*的表达(4 小时左右),我们认为低氧与炎症虽然同属于非生理性刺激,但前者的刺激毕竟没有后者那么强烈,因此需要较长的时间及较严重的低氧才能诱导 NOS 产生。而在整体动物的缺血一再灌注实验中,参与的因素比离体的更为复杂,且亦存在一定的炎症反应,所以引起 NOS 表达的时间也较短。

本研究结果支持我们研究组以往在离体基底动脉上所观察到的 NO 参与低氧脑血管扩张的研究结果。同时还表明,低氧下 NO 不仅参与大的脑血管调节,而且在大脑微血管上也有 NO 的产生。由此可见,NO 在低氧脑血管调节中起着重要作用。

微血管是最紧靠神经元的血管,内皮细胞产生的 NO 极易扩散进入神经元内。已知 NO 是一种神经递质参与神经信号的传递^[5]。而过量的 NO 对原有神经信号传递的干扰及细胞毒性作用是不容低估的。无疑,本实验结果对进一步研究大鼠皮层微循环与神经功能的关系将具有重要意义。

虽然本研究结果已显示低氧可以诱导大鼠皮层微血管内皮细胞*iNOS*的表达。但是,低氧是通过怎样的细胞内机制产生效应的,还将需要作进一步研究。

致谢 第二军医大学药学院芮耀诚教授在细胞培养方面给予指导。

参考文献

- 1 顾正中, 钟凯声, 吕敏. 低氧低二氧化碳对大鼠脑血流的调节作用. 生理学报, 1994, 46(3): 272~280.
- 2 顾正中, 梅小君, 钟凯声, 等. 一氧化氮参与低氧脑血管张力调节. 生理学报, 1996, 48(3): 222~226.
- 3 胡敏, 姚伟星. 一氧化氮的病理及生理作用. 国外医学分子生物学分册, 1995, 17(2): 58~62.
- 4 Duan CG, Xiu RJ. Cultivation of endothelial cells from rat brain microvessels. Chin Med J, 1988, 101(9): 649~653.
- 5 Patcarson M, Haudenschils CC. Microvascular endothelium and pericytes: high yield, low passage cultures. In Vitro, 1986, 22: 344~350.
- 6 Terada Y. Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthetase and soluble guanylate cyclase messenger RNAs in microdissected rat nephron segments. J Clin Invest, 1992, 90: 659~665.
- 7 Morrissey JJ, McCracken R, Kaneto H, et al. Location of an inducible nitric oxide synthetase mRNA in the normal kidney. Kidney Int, 1994, 46: 998~1 005.
- 8 Lee TJF. Direct evidence against acetylcholine as the dilator transmitter in the cat cerebral artery. Eur J Pharmacol, 1980, 68: 393~394.
- 9 Snyder SH. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters. Science, 1992, 257: 494~496.

(1996-12-12 收到)

· 会 讯 ·

第十一届国际动脉粥样硬化化学学术报告会

日前获悉,由国际动脉粥样硬化学会主持召开的第十一届国际动脉粥样硬化化学学术报告会将于1997年10月5日~9日在法国巴黎举行。国际动脉粥样硬化学会主持的学术报告会议每三年举行一次,这是第一次在法国举行。1997年的学术报告会主要涉及下列主题:

- 动脉壁生物学;
- 动脉血栓形成;
- 遗传和地域流行病学;
- 动脉粥样硬化和它的危险因素的预防;
- 脂蛋白紊乱的分子生物学;
- 动脉粥样硬化和血脂异常的遗传;
- 胰岛素抵抗、糖尿病和动脉粥样硬化;
- 动脉粥样硬化损伤、发展和消退的评价;
- 年龄和动脉粥样硬化;
- 营养和局部缺血性疾病;
- 影响脂代谢的药物和动脉粥样硬化。

在正式会议前后,还将举行6个卫星会议,这6个卫星会议的主题、时间和地点是:

①胆固醇逆转运,1997年10月2~4日, Lille;

②致动脉粥样硬化的低密度脂蛋白:生理病理学 and 治疗方法, 1997年10月2~4日, Abbaye of Royaumont;

③动脉血栓形成中的止血变异:预报与预

防, 1997年10月2~4日, Marseille;

④平滑肌细胞增殖与分化, 1997年10月2~4日, Bordeaux;

⑤脂蛋白代谢、肥胖和动脉粥样硬化, 1997年10月3~4日, Saint-Malo;

⑥糖尿病和动脉粥样硬化, 1997年10月10~11日, Lyon。

联系地址:

①组委会(Local Organizing Committee)

Pr B. Jacotot

Service Medecine V

Hopital Henri Mondor 94010

Creteil-Cedex, France

Tel: 33. (0)1. 49. 81. 35. 86

Fax: 33. (0)1. 48. 99. 11. 67

E-mail: 100306.3000 @ compuserve.com

②会议秘书处(Conference Secretariat)

Agency ORMES;

17 Place de la Resistance 92445

Issy-les-Moulineaux, France

Tel: 33. (0)1. 46. 48. 46. 48

Fax: 33. (0)1. 46. 45. 59. 38

E-mail: ormlisa @ easynet. fr

(胡必利 提供)