

脂多糖对大鼠不同组织中一氧化氮合成酶 基因表达的影响

曾丽苹 温进坤 魏素珍

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 石家庄 050017)

Effects of Lipopolysaccharide on the Expression of Nitric Oxide Synthetase Gene in Different Rat Tissues

ZENG Li-Ping, WEN Jin-Kun and WEI Su-Zhen
(Department of Biochemistry, Institute of Basic Medicine,
Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

ABSTRACT

Aim To investigate the effect of lipopolysaccharide (LPS) on the expression of inducible nitric oxide synthetase (iNOS) gene and kinetics of the expression of iNOS induction in rat heart, aorta and kidney tissues.

Methods iNOS mRNA expression was determined by Northern blot analysis and NOS activities were observed by NADPH-diaphorase staining.

Results The expression activities of iNOS gene in rat three tissues were undetectable before LPS treatment. iNOS mRNA in the heart, aorta and kidney began increased at 2 h after LPS treatment, and reached a peak at 6 h, then decreased gradually and returned to control levels at 24 h. NOS histochemical staining showed that there was some expression of constitutive nitric oxide synthetase (cNOS) in rat three tissues untreated by LPS. NOS activities in the three tissues rose obviously after LPS treatment and still remained the higher level till 24 h. This result suggested that iNOS is considerably steady in the tissues after it is synthesized.

Conclusion iNOS mRNA and activities are markedly induced by LPS in rat heart, aorta and kidney, and the kinetics of induction is similar in the three tissues.

KEY WORDS Nitric oxide synthetase; Gene expression; Lipopolysaccharide; Rat tissue

摘要 通过 Northern blot 和 NADPH-心肌黄酶染色显示一氧化氮合成酶活性的组织化学分析方法, 观察了脂多糖对大鼠心脏、主动脉和肾组织中诱导型一氧化氮合成酶基因表达的影响及诱导型一氧化氮合成酶被脂多糖诱导表达的动力学。结果表明, 未经脂多糖处理的大鼠诱导型一氧化氮合成酶基因在所检测的三种组织中表达活性很低, 脂多糖作用于大鼠 2 h, 心、肾和主动脉中的诱导型一氧化氮合成酶 mRNA 开始增加, 6 h 达到峰值, 此后, 逐渐下降, 24 h 回复到对照水平。一氧化氮合成酶组织化学染色显示, 对照大鼠的组织细胞内存在较低的组成型一氧化氮合成酶活性, 被脂多糖处理不同时间后, 三种组织中的一氧化氮合成酶活性均显著升高, 到 24 h 仍维持在较高水平, 提示诱导型一氧化氮合成酶被合成后, 在组织细胞内较为稳定。

关键词 一氧化氮合成酶; 基因表达; 脂多糖; 大鼠组织

一氧化氮合成酶(nitric oxide synthetase, NOS)催化 L-精氨酸和分子氧生成一氧化氮(nitric oxide, NO), 其活性高低决定了内源性 NO 的生成速度。已经证明, 真核细胞中编码 NOS 的基因有两种类型, 一种属组成型, 该基因在生理状态下具有一定的表达活性, 其表达产物催化产生的 NO 作为信使分子发挥多方面的生理作用; 另一种是诱导型, 该基因只有在炎症因子或内毒素作用下才进行表达, 其表达产物催化产生的 NO 在败血症休克、高血压及动脉粥样硬化发生过程中发挥重要作用^[1]。

为研究诱导型一氧化氮合成酶(inducible

NOS, iNOS)基因表达与心血管疾病发生之间的关系,我们观察了脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)对体外培养的血管平滑肌细胞和内皮细胞中iNOS基因表达的影响,探讨了脂多糖与炎症因子在诱导iNOS基因表达过程中的相互作用(另文发表)。在此基础上,本文检查脂多糖对大鼠不同组织中iNOS基因表达的影响及不同组织中iNOS基因诱导表达的动力学,以期某些临床危重和疑难病症的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠杆菌脂多糖(血清型 055:B5)和还原型辅酶Ⅰ(NADPH)为Sigma公司产品,iNOS cDNA 探针为本室保存, α - 32 P 脱氧胞苷三磷酸(dCTP)购自北京亚辉生物医学工程公司,核酸探针随机引物标记试剂盒为Promega公司产品。其它试剂为进口分装或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物及分组 取5周龄雌性Sprague-Dawley (SD)大鼠10只,体重180 g左右,随机分为对照、脂多糖处理2、6、12、24 h组。脂多糖按每kg体重1.0 mg腹腔内注射,给药达预定时间后,用3%戊巴比妥钠麻醉动物,分别取心脏、主动脉和肾脏提取RNA并进行组织化学染色。

1.2.2 Northern blot 分析 取对照和脂多糖处理

不同时间的大鼠心脏、主动脉和肾脏按异硫氰酸胍-酚-氯仿一步法^[2]提取总RNA。取RNA 20 μ g,经1%琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳后,转移到尼龙膜上。用 α - 32 P-dCTP 标记的iNOS cDNA 作为探针,按Sambrook等^[3]方法进行杂交,放射自显影(国产X光片,加增感屏,-70℃)。

1.2.3 一氧化氮合成酶组织化学染色 按文献[4]方法稍作改进。取对照和脂多糖处理不同时间的大鼠心脏、主动脉和肾组织块,用八聚体结合蛋白(OCT)包埋后冷冻切片,切片厚15 μ m,空气干燥后放入NADPH 1 g/L, NBT 0.5 g/L 和 0.3% TritonX-100 混合液中,置湿盒暗处37℃条件下孵育1 h,用PBS洗3次,然后用4%多聚甲醛固定5 min,伊红复染,脱水,透明,封片。

2 结果

2.1 脂多糖对诱导型一氧化氮合成酶基因表达的影响

图1(Figure 1)是被脂多糖处理不同时间的大鼠心脏、主动脉和肾组织中的RNA与iNOS cDNA 进行杂交的结果。由图1(Figure 1)可见,在未经脂多糖处理的动物,三种组织中均未检出明显的杂交信号;脂多糖作用于大鼠6 h,心脏、主动脉和肾脏中iNOS基因的表达活性均达到最大,在三种组织中,以主动脉中的表达活性最强,心脏次之,肾脏较弱。

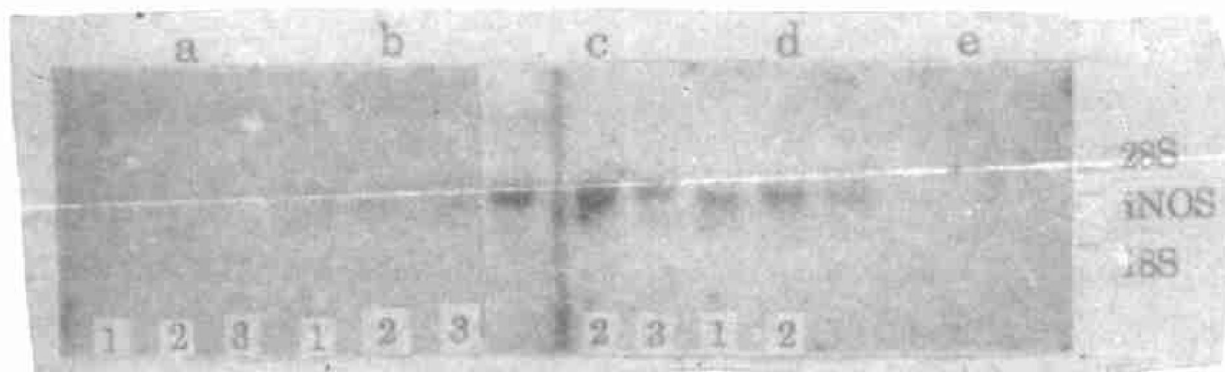


Figure 1. Northern blot for iNOS mRNA. a: control, b: 2 h, c: 6 h, d: 12 h, e: 24 h; 1: heart, 2: aorta, 3: kidney.

2.2 诱导型一氧化氮合成酶基因被脂多糖诱导表达的动力学

从被脂多糖处理不同时间的大鼠组织中提

取RNA,与iNOS探针杂交后所呈现的信号经光密度扫描表明,心脏、主动脉和肾组织的iNOS mRNA 均在脂多糖处理后2 h 开始增加,6

h 达到高峰,此后逐渐下降,24 h 回复到对照水平(图 2, Figure 2)。在所检测的三种组织中, iNOS 基因被脂多糖诱导表达的动力学曲线是类似的。

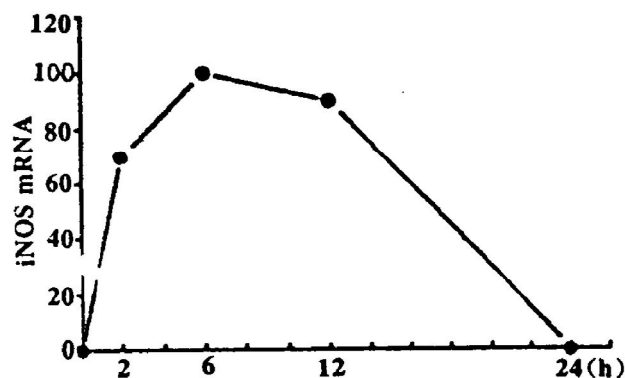


Figure 2. The kinetic curve of the expression of iNOS gene in heart, aorta and kidney.

2.3 一氧化氮合成酶基因组织化学染色

根据还原型辅酶 I—心肌黄酶染色可作为含 NOS 细胞的特异性标志这一性质,我们用还原型辅酶 I—心肌黄酶染色法对脂多糖处理 6、12、24 h 的组织进行染色,结果表明,在未经脂多糖处理的大鼠心脏、主动脉和肾组织中,只有少数细胞呈现阳性反应,即胞浆被染成浅蓝色;脂多糖处理后 6 h,三种组织的显色反应均呈强阳性,甚至整个组织均被染成深紫蓝色;12 h 呈现阳性反应的细胞减少,24 h 仍有部分细胞呈阳性反应,但明显低于对照组织的染色水平,从三种组织的组织化学染色深浅可见,心脏和肾脏组织中的 NOS 活性略高于主动脉(图 3, Figure 3)。

还原型辅酶 I 心肌黄酶染色颗粒在不同组织中的分布特点如下,心肌纤维上的颗粒呈较均匀分布;主动脉染色颗粒主在分布在内膜中的内皮细胞和中膜层的平滑肌细胞;在肾组织中染色颗粒主要分布在肾小管,肾小球着色较浅(图 3, Figure 3)。

3 讨论

近年的研究表明,脂多糖可使大鼠体内 NO

合成明显增加^[5]。临床资料提示,内毒素休克病人体内 NO 水平显著升高^[6]。然而,关于内毒素对活体动物不同组织中 NOS 基因表达的影响及其诱导 iNOS 基因表达的动力学尚不甚明了。本研究通过 RNA 印迹分析和还原型辅酶 I—心肌黄酶染色显示 NOS 活性的组织化学分析方法,观察了脂多糖对大鼠心脏、主动脉和肾组织中 iNOS 基因表达的影响。实验发现,在未经脂多糖处理的大鼠心脏、主动脉和肾组织中,只在少量细胞内存在 NOS 活性,基于从这些组织中提取的 RNA 与 iNOS 探针反应后不出现明显的杂交信号,可以断定其 NOS 活性是组成型 NOS(cNOS)基因进行表达的结果。脂多糖作用于大鼠 2 h 后,在所检测的三种组织中 iNOS 基因的表达开始增加,6 h 其转录及翻译均达到高峰。以往的实验证明,脂多糖可诱导体外培养的血管平滑肌细胞及内皮细胞表达 iNOS,本实验不但用活体动物进一步证实了以前的结论,而且发现在肾脏和心脏中存在的 iNOS 基因也可被脂多糖显著诱导,在脂多糖作用于动物 24 h 后,三种组织中 iNOS mRNA 均回复到对照水平。NOS 组织化学染色显示,三种组织中的 NOS 活性到 24 h 仍能维持在较高水平,提示 iNOS 被合成后,在组织细胞内较为稳定。关于 iNOS 基因被脂多糖诱导表达的 mRNA 为何在主动脉最多,而通过组织化学显色的 NOS 活性在心脏和肾组织中相对较强的原因可能与 cNOS 基因在这两种组织中的表达活性高于主动脉有关。本文为临床用 NOS 抑制剂治疗内毒素休克等提供了实验依据。

参考文献

- 1 Prince RG, Gunson DE. Rising interest in nitric oxide synthetase. *TIBS*, 1993, 18(2): 35~36.
- 2 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156~159.
- 3 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed, Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- 4 Nichols K, Krantis A, Stains W, et al. Histochemical

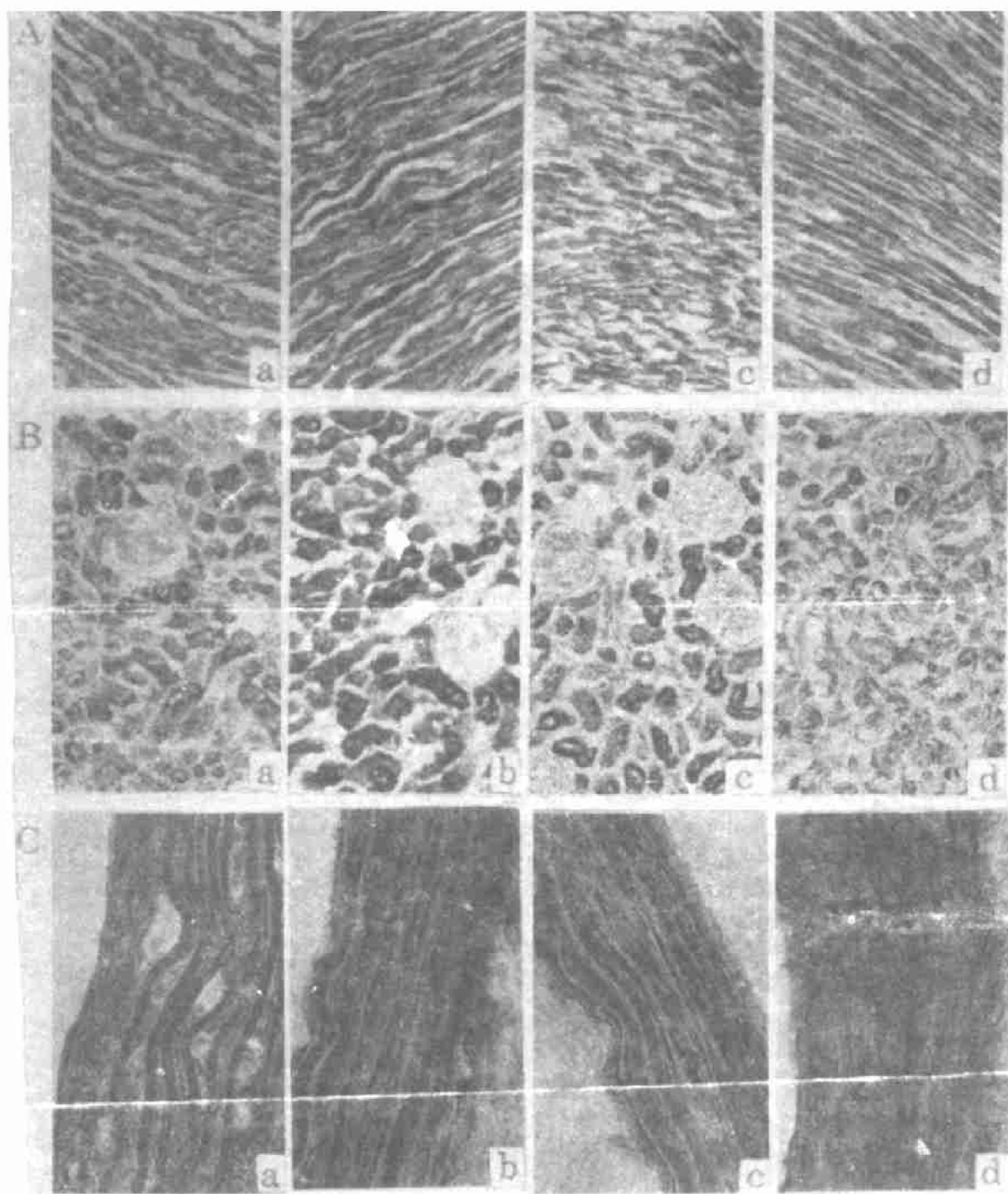


Figure 3. NOS histochemical staining. A: Heart, B: Kidney, C: Aorta. a: control, b: 6 h, c: 12 h, d: 24 h.

localization of nitric oxide-synthetizing neurons and vascular sites in the guinea-pig intestine. *Neuroscience*, 1992, 51(4): 791~799.

- 5 Colasanti M, Persichini T, Menegazzi M, et al. Induction of nitric oxide synthetase mRNA expression. *J Biol Chem*,

1995, 270(45): 26 731.

- 6 Wringht CE, Rees DD, Moncada S. Protective and pathologic roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc Res*, 1992, 26: 48.

(1997-03-17 收到, 1997-06-08 修回)