

实验性兔动脉粥样硬化发病过程中内源性一氧化碳及其合成酶基因表达的改变

喻 陆 何作云

第三军医大学新桥医院心内科, 重庆 400037)

主题词 一氧化碳; 血红素氧化酶; 动脉粥样硬化; 内皮; 细胞; 主动脉; 冠状动脉; 家兔

摘 要 为研究内源性一氧化碳及其合成酶血红素氧化酶-1 在动脉粥样硬化发病中的变化规律, 通过逆转录-聚合酶链反应、原位杂交、免疫组织化学染色和生物化学等多项指标观察血红素氧化酶-1 和内源性一氧化碳在动脉粥样硬化发病过程中的变化。结果发现, 血红素氧化酶-1 mRNA 主要分布于主动脉和冠状动脉内皮细胞, 在动脉粥样硬化的发展过程中其表达有逐渐增高的趋势, 且血红素氧化酶-1 蛋白的表达也有逐渐增高的趋势。血红素氧化酶-1 免疫组织化学染色显示, 主动脉和冠状动脉内皮细胞呈阳性, 主动脉壁血红素氧化酶-1 mRNA 的表达量及血红素氧化酶活性和内源性一氧化碳的浓度有逐渐增高的趋势。结果提示, 内源性一氧化碳及其合成酶在动脉粥样硬化的发病过程中可能具有重要的作用。

The Research on Endogenous Carbon Monoxide and Expression of Carbon Monoxide Synthase during Atherosclerosis

YU Lu and HE Zuo-Yun

(Department of Cardiology, the Third Military Medical College of the People Liberation Army, Congqing 400037, China)

MeSH Carbon Monoxide; Heme Oxygenase; Atherosclerosis; Endothelium; Cell; Aorta; Coronary Artery; Rabbits

ABSTRACT **Aim** To research the regularity of endogenous carbon monoxide and expression of carbon monoxide synthase (heme oxygenase-1) during atherosclerosis development in rabbits. **Methods** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR), in situ hybridization, immunohistochemistry stain, and some biochemical index marks were performed so as to research the regularity of endogenous carbon monoxide and expression of carbon monoxide synthase (heme oxygenase-1) during atherosclerosis development. **Results** The positive score of heme oxygenase-1 mRNA is distributed in endothelial cell of aorta and coronary artery, the express of heme oxygenase-1 mRNA on aorta and coronary artery increase in process of time during atherosclerosis development. the positive score of heme oxygenase-1 protein is distributed in endothelial cell of aorta and coronary artery, the express of heme oxygenase-1 portein on aorta and coronary artery raise in process of time during atherosclerosis development. Through RT-PCR method, the express of heme oxygenase-1 mRNA on aorta raise in process of time during atherosclerosis development was observed. The activity of heme oxygenase and the concentration of carbon monoxide increase in process of time during atherosclerosis development. **Conclusion** Endogenous carbon monoxide and carbon monoxide synthase may play an important role in atherosclerosis development.

近年来内源性一氧化碳及其合成酶血红素氧化酶-1 在机体内的作用引起人们的重视, 既往研究多局限于它的生物学毒性方面, 发现它很可能是一种新型的信使分子。内源性一氧化碳产生的限速酶和关键酶血红素氧化酶已被证实几乎分布所有的器官和组织, 显示机体产生内源性一氧化碳的部位相当广泛^[1], 且血红素氧化酶的其他产物还具有抗氧化作用。血红素氧化酶-1 和内源性一氧化碳在动脉粥样硬化发病机制中的作用目前尚不清楚。本文拟采用逆转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)、原位杂交、免疫组织化学染色和生物化学等多项指标, 从不同侧面研究内源性一氧化碳及血红素氧化酶-1 在动脉粥样硬化

发病中的变化, 为研究动脉粥样硬化的发病机制及防治探索一条新的途径。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备及分组

采用新西兰雄性大白兔 50 只, 平均 0.8 kg, 由本校动物所提供。随机分为五组: 对照组和四个实验组。每组 10 只, 分笼饲养, 定量给食。对照组食用基础饲料 (由本院动物室提供), 各实验组添加胆固醇粉 1 g/天/只, 傍晚给药, 分别于喂养的第 2、4、8 和 12 周将各实验组的兔颈动脉放血处死。

1.2 血红素氧化酶-1 免疫组织化学染色

血红素氧化酶-1 单抗由新加坡国立大学龚屏博

士惠赠。参照文献 [2], 将主动脉环、心肌及其冠状动脉固定、脱水、石蜡包埋及切片, 厚度为 $6\ \mu\text{m}$ 。血红素氧化酶-1 抗体稀释度为 1:250, 其余步骤按常规方法进行。用 PBS 作为阴性对照。阳性为棕黄色。

1.3 血红素氧化酶-1 mRNA 的原位杂交研究

血红素氧化酶-1 cDNA pRHO1 质粒由日本 Toshisuke 教授惠赠。经过转化、扩增、抽提与纯化、酶切鉴定后, 用宝灵曼的地高辛标记检测试剂盒进行标记。分别采用冰冻切片和石蜡切片两种标本进行原位杂交 [3]。

1.3.1 冰冻切片标本原位杂交法 从液氮中取出主动脉环标本后, 用 24 孔培养板分装标记并作记号。固定, 冰冻切片, 厚度为 $30\ \mu\text{m}$, 再按常规步骤进行。按每切片 $10\ \mu\text{L}$, 各孔加入杂交液 $100\ \mu\text{L}$, 加盖, 于 45°C 恒温水浴 20 h。漂洗, 封闭, 显色, 脱水透明, 封片。镜下观察, 照相。杂交前用 $100\ \text{ng/L}$ RNase 37°C 1 h 预处理组织 (消化 mRNA) 切片及用未标记的 pRHO1 cDNA 探针作阴性对照。

1.3.2 石蜡切片标本原位杂交法 将心肌及其冠状动脉石蜡标本切片, 厚度为 $6\ \mu\text{m}$ 。按常规步骤进行后, 将标记的探针置于沸水中变性 10 min, -20°C 冰浴 3 min, 均匀滴加在组织切片上, 加硅化盖玻片, 100°C 变性 10 min, -20°C 水浴 5 min, 37°C 湿盒中 24~36 h。切片经过反复振洗, 酒精脱水, 封闭, 显色, 衬染, 脱水透明, 封片。杂交前用 $100\ \text{ng/L}$ RNase 37°C 1 h 预处理组织 (消化 mRNA) 切片和使用未标记的 pRHO1 cDNA 探针作阴性对照。

1.4 逆转录-聚合酶链反应测定主动脉血红素氧化酶-1 mRNA 表达

1.4.1 主动脉总 RNA 提取 采用硫氰酸胍一步法, 利用 Promega 提供的试剂进行提取主动脉总 RNA。提取的 RNA 用 Beckman 5010 型紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 同时测定 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值。用变性甲醛凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.4.2 逆转录-聚合酶链反应 采用随机引物法, 逆转录用聚合酶链反应试剂盒 (Boehringer Mannheim)。按说明书操作。

1.4.3 聚合酶链反应扩增血红素氧化酶-1 和 β -肌动蛋白特异性片段

扩增血红素氧化酶-1 cDNA 特异性片段的引物是根据 Toshisuke 发表的鼠血红素氧化酶-1 特异性引物的序列 [5] 确定的。上游引物为 $5'$ -GAATTCAGCATGCCCCAGGATGCT-3', 下游引物为 $5'$ -TCTAGACTAGCTGGATGTTGAGCAGGA-3'。在进行 RT-PCR 的同时扩增鼠 β -actin 用作内参照, 保证

每次实验的相对可比性, 扩增鼠 β -actin 特异性片段的上游引物为 $5'$ -GCGGGAAATCGTGCTACATT-3', 下游引物为 $5'$ -GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'。按常规方法进行 PCR, 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min。首轮循环 95°C 2 min, 最后 72°C 延伸 5 min, 共进行 30 次循环。然后进行 1% 琼脂糖电泳分析。

1.5 血红素氧化酶活性测定

参照文献 [4], 将血管匀浆于 5 倍体积的缓冲液中, 离心, 将细胞沉淀悬浮于缓冲液中。并反复冻溶 3 次。离心后将 $400\ \mu\text{L}$ 的上清加入反应混合液中, 然后在 37°C 下避光反应 1 h。根据被提炼的胆红素在 464 nm 和 530 nm 处的吸光度不同而被推算出胆红素的消退系数为 $40\ \text{mmol}/(\text{L}\cdot\text{cm})$ 。血红素氧化酶活性单位为 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。蛋白定量采用考马斯亮蓝法。

1.6 内源性一氧化碳含量测定方法

参照文献 [5], 取 3~5 mm 主动脉血管环, 每个样本加入 pH 7.4 $0.01\ \text{mol/L}$ 磷酸盐缓冲液 2 mL 后进行匀浆。取匀浆液 $0.2\ \text{mL}$, 空白管加双蒸水 $0.2\ \text{mL}$ 。每管加入 2 mL 血红蛋白溶液混匀。每管加入 $0.1\ \text{mL}$ 连二亚硫酸钠溶液混匀后静置 10 min。以空白管为对照, 721A 型分光光度计测 OD_{541} 和 OD_{555} 。

2 结果

2.1 血红素氧化酶-1 免疫组织化学染色的变化

血红素氧化酶-1 在对照组主动脉内皮细胞内呈扭曲线条状阳性反应, 在平滑肌细胞内呈阴性反应。它在实验第 2、4、8 周组主动脉内皮细胞内分别呈较强阳性、强阳性和强阳性反应带, 在实验第 12 周组中血管内膜及内膜下有强阳性反应带, 管壁内平滑肌有灶片状强阳性 (图 1, Figure 1), 阴性对照组中主动脉内皮细胞呈阴性反应。

血红素氧化酶-1 在对照组冠状动脉内皮细胞内呈弱阳性反应。在实验第 2 周组冠状动脉内皮细胞内呈局灶性弱阳性反应, 心肌间质毛细血管内皮内及心肌细胞索周膜阳性。在实验第 4 周组冠状动脉内皮细胞内呈弱阳性反应, 冠状动脉分支内皮细胞内呈阳性或弱阳性反应。部分心肌细胞呈片状阳性反应。在实验第 8 周组冠状动脉内皮细胞内呈阳性反应, 心内膜内皮细胞内呈阳性。心肌内小血管及毛细血管内皮细胞内、心肌细胞索周膜阳性反应。在实验第 12 周组冠状动脉内皮细胞内呈强阳性 (图 2, Figure 2)。心肌内膜内皮细胞内呈强阳性反应。阴性对照组冠状动脉内皮细胞呈阴性。

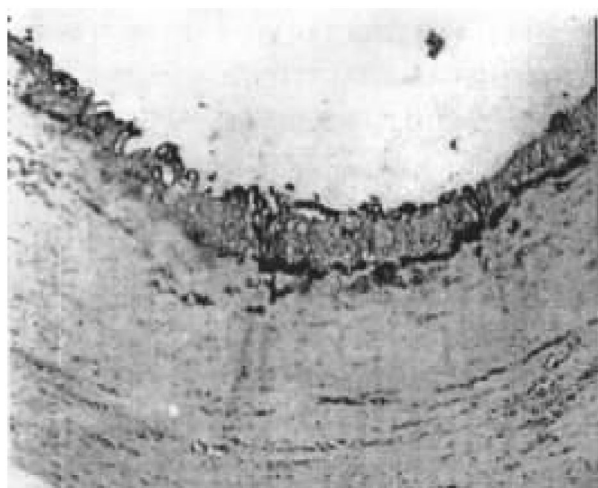


图 1. 主动脉内皮细胞血红素氧化酶-1 免疫组织化学染色 ($\times 100$)

Figure 1. Immunohistochemical staining of HO-1 in the endothelial cell of aorta. Intensive positivity

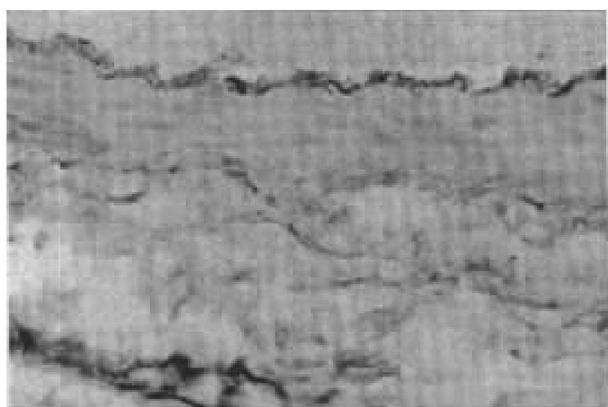


图 2. 冠状动脉内皮细胞血红素氧化酶-1 免疫组织化学染色 ($\times 200$)

Figure 2. Immunohistochemical staining of HO-1 in the endothelial cell of coronary artery. Intensive positivity

2.2 血红素氧化酶-1 mRNA 的表达

正常情况下主动脉和冠状动脉血红素氧化酶-1 mRNA 表达较少,但在实验第 2、4、6、8、12 周组内皮细胞血红素氧化酶-1 mRNA 的表达逐渐增强 (图 3, Figure 3)。阴性对照组中主动脉和冠状动脉内皮细胞呈阴性反应。

2.3 血红素氧化酶-1 mRNA 表达量的变化

在实验第 2 周组血红素氧化酶-1 mRNA 的表达就开始增加,随着动脉粥样硬化的逐渐进展,血红素氧化酶-1 mRNA 的表达逐渐增加,在实验第 12 周组血红素氧化酶-1 mRNA 的表达仍较高。 β -actin 的表达在各时相点之间表达量无明显变化 (图 4, Figure 4)。

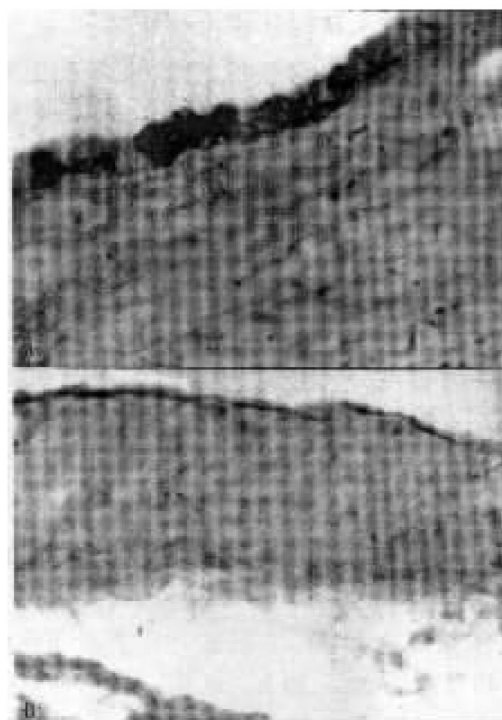


图 3. 主动脉和冠状动脉内皮细胞血红素氧化酶-1 原位杂交 ($\times 100$)

Figure 3. In situ hybridization of HO-1 in the endothelial cell of aorta and coronary artery. Intensive positivity. A: the endothelial cell of aorta; B: the endothelial cell of coronary artery

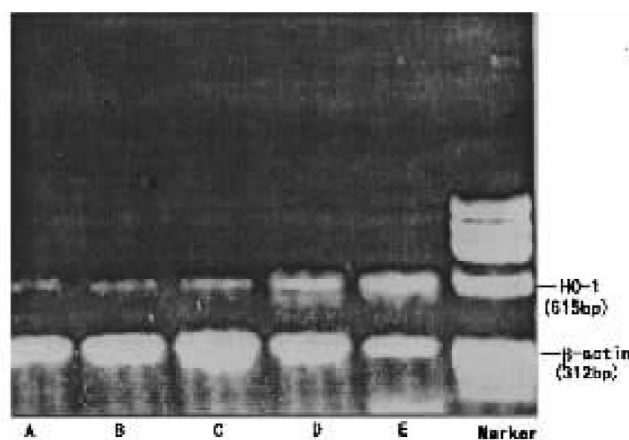


图 4. 主动脉血红素氧化酶-1 mRNA RT-PCR 产物的电泳图谱

Figure 4. The electrophoretic pattern of RT-PCR of HO-1 mRNA in the endothelial cell of aorta. A: control group; B: second week group; C: fourth week group; D: eighth week group; E: twentieth week group; Marker: $\Phi \times 174$ /Hae III

2.4 主动脉血红素氧化酶活性的变化

从表 1 (Table 1)可见,随着动脉粥样硬化的发展血红素氧化酶的活性也逐渐增高,并且每一时相点与前一时相点的血红素氧化酶活性相比呈非常显著性增加 ($P < 0.01$)。

表 1. 主动脉血红素氧化酶活性的变化 [$\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$], $\bar{x} \pm s$, $n = 7$]

Table 1. The change of activity of heme oxygenase of aorta

Groups	Activity
Control	0.214 ± 0.008
Second Week	0.487 ± 0.013^a
Fourth Week	0.789 ± 0.009^a
Eighth Week	0.922 ± 0.006^a
Twelfth Week	1.304 ± 0.012^a

a: $P < 0.01$, compared with the front temporal stage

2.5 主动脉内源性一氧化碳含量的变化

从表 2 (Table 2) 可见, 随着动脉粥样硬化的发展内源性一氧化碳的浓度也逐渐增高, 并且每一时相点与前一相点的内源性一氧化碳的浓度相比呈非常显著性增加 ($P < 0.01$)。

表 2. 主动脉内源性一氧化碳含量的变化 (ng/g)

Table 2. The change of concentration of endogenous carbon monoxide

Groups	Concentration
Control	0.133 ± 0.018
Second Week	0.270 ± 0.017^a
Fourth Week	0.324 ± 0.014^a
Eighth Week	0.537 ± 0.027^a
Twelfth Week	0.750 ± 0.027^a

a: $P < 0.01$, compared with the front temporal stage

3 讨论

根据一氧化碳能使血管平滑肌松弛, 并且能激活鸟苷酸环化酶, 推测一氧化碳在血管紧张度调节中发挥着重要作用^[6]。一氧化碳是在细胞内由血红素氧化酶催化血红素形成胆绿素和铁离子的过程中产生的, 目前研究发现胆绿素及其产物胆红素具有抗氧化作用。血红素氧化酶分为诱生型 (血红素氧化酶-1) 和结构型 (血红素氧化酶-2), 都是内源性一氧化碳合成的限速酶。由于血红素氧化酶-2 不被诱生, 因此它主要在机体生理状态下发挥作用。而血红素氧化酶-1 不仅在机体生理状态下发挥作用, 更主要在机体的其他非正常状态下或应急状态下发挥作用。不同的研究者已经用不同的方法证实血管壁上存在着血红素氧化酶。但在大动脉上血红素氧化酶-1 和血红素氧化酶-2 的基因及蛋白分布状态国外有不同的研究结果。目前国外有两种观点: 一种认为血红素氧化酶-1 分布在动脉内皮细胞, 血红素氧化酶-2 分布在平滑肌细胞^[7]; 另一种认为血红素氧化酶-1 分布在动脉平滑肌细胞, 血红素氧化酶-2 分布在动脉内皮细胞^[8,9]。Morita 等^[10]研究发现内皮

细胞和平滑肌细胞暴露于低氧环境下血红素氧化酶-1 mRNA 的转录反应不同, 低氧增加血红素氧化酶-1 mRNA 在平滑肌细胞中的水平, 而降低血红素氧化酶-1 mRNA 在内皮细胞的水平, 并认为血红素氧化酶-1 mRNA 在内皮细胞和平滑肌细胞的不同表达可能是因为动脉壁在抵抗外界影响中起不同的作用及不同动物血管内皮细胞及平滑肌细胞表达量不同有关。本文通过免疫组织化学染色和原位杂交研究发现, 血红素氧化酶-1 主要存在血管内皮细胞层, 仅在动脉粥样硬化的晚期血红素氧化酶-1 蛋白在血管平滑肌细胞出现明显阳性反应。并且发现随着动脉壁内皮和内皮下及冠状动脉内皮动脉粥样硬化病变逐渐加重, 血红素氧化酶-1 mRNA 及其蛋白的表达进行性增强。1998 年 5 月 Wang 等^[11]应用原位杂交方法在人和动物中研究了血红素氧化酶-1 在动脉粥样硬化损伤部位的分布状态, 也发现血红素氧化酶-1 mRNA 主要分布于内皮细胞层和损伤部位增厚内膜的泡沫细胞/巨噬细胞。这与本研究一致。这种同一物质的表达位点不同或程度不同是否与不同的实验动物类型及疾病过程有关, 还须进一步探讨。

从 RT-PCR 结果观察到随着动脉粥样硬化的发展在实验第 2、4、8、12 周组血红素氧化酶-1 mRNA 的表达强度逐渐增高。这与原位杂交所观察到的结果是一致的。并且血红素氧化酶-1 蛋白表达也呈逐渐增强的趋势。从血红素氧化酶-1 的功能研究也证实了这种趋势, 我们观察发现随着动脉粥样硬化的发展血红素氧化酶-1 的活性逐渐增高, 内源性一氧化碳的浓度也逐渐增强。国外一些研究者在其他疾病的生理和病理过程中也观察到血红素氧化酶-1 在疾病的不同时期其基因和功能会有所改变。1996 年 Bauer 等^[12]发现在鼠肝的出血和恢复过程中血红素氧化酶-1 mRNA 明显增多, 并且血红素氧化酶所产生的一氧化碳在维持肝灌注方面发挥较大的作用。Voigt 等^[13]在采用甘油制备急性肾衰模型时, 加入肾毒血清可诱导血红素氧化酶-1 mRNA 表达增加, 并且这种增加与肾功能及结构损伤的减轻有直接的关系。有研究者观察到, 肾脏与心脏的压力蛋白基因表达调节有关。在肾脏缺血再灌注过程中, 心脏及降主动脉上的血红素氧化酶-1 mRNA 表达增高, 一氧化碳产生增多。因此一氧化碳及血红素氧化酶在心脏及血管的病理生理过程中也发挥着积极的作用。目前关于内源性一氧化碳在机体中的作用机制尚不清楚, 尤其是在动脉粥样硬化发病过程中内源性一氧化碳如何发挥作用尚不得而知。对此我们正在进一步的研究, 并已经取得一定的成果。

参考文献

- 1 Barina M. Carbon monoxide: Killer to brain messengers in one step. *Science*, 1993, **259**: 309
- 2 蔡文琴. 免疫细胞化学染色、核酸分子原位杂交. 见: 蔡文琴, 王泊云, 主编. 实用免疫细胞化学及核酸分子原位杂交技术. 四川: 四川科技出版社, 1994; 105
- 3 Morita T, Perrella MA, Lee Mu-En, et al. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 1 475 - 479
- 4 Gyorgy B, Harry SJ, Jozsef B, et al. Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*, 1992, **267**: 18 148 - 152
- 5 Singh MP, Sharan M, Selvakumar S. A mathematical model for the computation of carboxy haemoglobin in human blood as a function of exposure time. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1991, **334**: 135 - 147
- 6 Verma A, Hirsch DJ, Glau, CE, et al. Carbon monoxide: a putative neural messenger. *Science*, 1993, **259**: 381 - 384
- 7 Raju VS, Mains MD. Renal ischemia/reperfusion up-regulates heme oxygenase-1 (HSP32) expression and increases cGMP in rat heart. *The Journal of Pharmacology and Experiment Therapeutics*, 1996, **277**: 1 812 - 814
- 8 Toshisuke M, Mark A, Perrella ME. Smooth muscle cell derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 1 475 - 479
- 9 Randa Z, Sean R, Caine JD. Heme oxygenase-2: endothelial and necronal localization and role in endothelium dependent relaxation. *Proc Natl Sci USA*, 1996, **93**: 795 - 798
- 10 Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell express of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 2 676 - 682
- 11 Wang LJ, Lee TS, Pai RC, et al. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1998, **152** (3): 711 - 720
- 12 Bauer M, Pannen BH, Bareu I. Evidence for a functional link between stress response and vascular control in hepatic portal circulation. *Am J Physical*, 1996, **271**: G929 - 935
- 13 Vogt BA, Shanlay TP, Groatt A. Glomerular inflammation induce resistance to tubular injury in the rat. A novel form of acquired, heme oxygenase dependant resistance to renal injury. *J Clin Invest*, 1996, **98** (9): 2 139 - 145

此文 1998 - 09 - 07 收到, 1999 - 04 - 18 修回)

此文编辑 文玉珊)