

[文章编号] 1007- 3949(2000) - 01- 0013- 04

• 实验研究 •

不同阶段兔主动脉粥样硬化斑块的一氧化氮合酶活性及其 mRNA 表达

李亚俊, 宋剑南, 牛晓红, 王宇辉, 王少君

(中国中医研究院基础理论研究所, 北京 100700)

[关键词] 动脉粥样硬化; 主动脉; 一氧化氮合酶; 基因表达; 原位杂交; 组织化学

[摘要] 为探讨一氧化氮合酶与动脉粥样硬化斑块形成过程的相互关系, 采用酶组织化学染色法和原位杂交法观察实验第 8 周、12 周和 16 周三个阶段的兔主动脉粥样硬化斑块一氧化氮合酶活性及其 16 周时的 mRNA 表达。结果显示, 实验 8 周时, 主动脉斑块内一氧化氮合酶活性呈现弱阳性、阳性和强阳性三种不同的表现形式, 并相应有不同的细胞分布方式; 实验 12 周时, 一氧化氮合酶活性在斑块中广泛分布, 且于中、内膜交界处更为明显; 实验 16 周时, 主动脉脂质斑块中一氧化氮合酶活性及其 mRNA 表达明显下降, 此阶段的大面积 mRNA 表达阴性主要与脂质坏死中心的大量形成有关。提示动脉粥样硬化血管壁的一氧化氮合酶活性和基因表达是一个不断变化的动态过程, 且因细胞类型和分布部位而异。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

Activity and mRNA Expression of Nitric Oxide Synthase in Different Phases of Atherosclerotic Plaques

LI Ya- Jun¹, SONG Jian- Nan², NIU Xiao- Hong², WANG Yu- Hui², and WANG Shao- Jun²(¹Institute of Clinical Medical Sciences, China - Japan Friendship Hospital, Beijing 100029; ²Institute of Basic Theory, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100700, China)**MeSH** Atherosclerosis; Aortas; Nitric Oxide Synthase; Gene Expression; In Situ Hybridization; Histochemistry

ABSTRACT **Aim** To study the changes in activity and mRNA expression of nitric oxide synthase (NOS) in different phases of atherosclerotic lesion. **Methods** 24 male New Zealand white rabbits were divided into normal control group(6 rabbits) and hypercholesterol group(18 rabbits). At the time of the 8th, 12th and 16th week, 6 rabbits of hypercholesterol group were sacrificed. Using NADPH- diaphorase histochemistry, we studied the activity of NOS. The NOS mRNA expression in aortas in the 16th week was also studied with in situ hybridization. **Results** In the 8th week, in cholesterol group, there were three different aspects of NADPH- d stains in plaques, which were doubtful positive, positive and strong positive. In the 12th week, there were extensive NADPH- d moderate positive stains in plaques, particularly at the border of intima and media. In the 16th week, the activity and mRNA expression of NOS in both intima and media decreased accompanying with the forming of necrosis core. **Conclusion** Changes in activity and expression of NOS in atherosclerotic lesion are dynamic with different locations of cells.

目前, 合成一氧化氮(nitric oxide, NO)的关键酶——一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)日益引起人们的关注, 它在动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)斑块中的活性及表达的报道还不一致。本研究观察了兔 As 病变发展不同阶段主动脉壁的 NOS 活性及表达变化, 旨在探讨 NO 与 As 斑块发展之间的

可能作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

雄性新西兰白兔 24 只(由中国药品生物制品鉴定所实验动物繁育场提供), 体重 2.0~ 2.5 kg。依体重和血脂水平, 分层随机法分为正常组(6 只)和实验组(18 只)。正常组仅给普通饲料, 按常规方法饲养; 实验组每日每只家兔给予 100 g 高脂饲料。于实验

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(项目编号 3937082)

[作者简介] 李亚俊, 女, 1973 年出生, 硕士研究生, 现在中日友好医院临床医学研究所(北京 100029)工作。宋剑南, 男, 研究员, 导师。

第8周、12周和16周时,实验组各处死6只动物;正常组动物均于16周时处死。各组动物取第二肋间动脉分支开口处胸主动脉0.5 cm,纵剖成两份:一份用4%多聚甲醛(pH 7.4)4℃固定2 h,冰冻切片;另一份用10%甲醛固定2天,常规石蜡包埋、切片,切片厚5 μm,0℃保存待测。

1.2 组织化学染色法检测一氧化氮合酶活性

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 - 硫辛酰胺脱氢

酶(NADPH - diaphorase, Nd) 为 Sigma 公司产品。取冰冻切片,加入反应液(1% NADPH, 0.1% NBT, 0.3% Triton X-100, pH 8.0), 37℃孵育1 h, PBS终止反应。设立阴性对照(反应液中不加NADPH)。显微镜下,胞浆无明显着色信号为弱阳性(±),胞浆蓝染为Nd阳性(+),呈深蓝色为中等阳性(++),接近蓝黑色为强阳性(+++)。

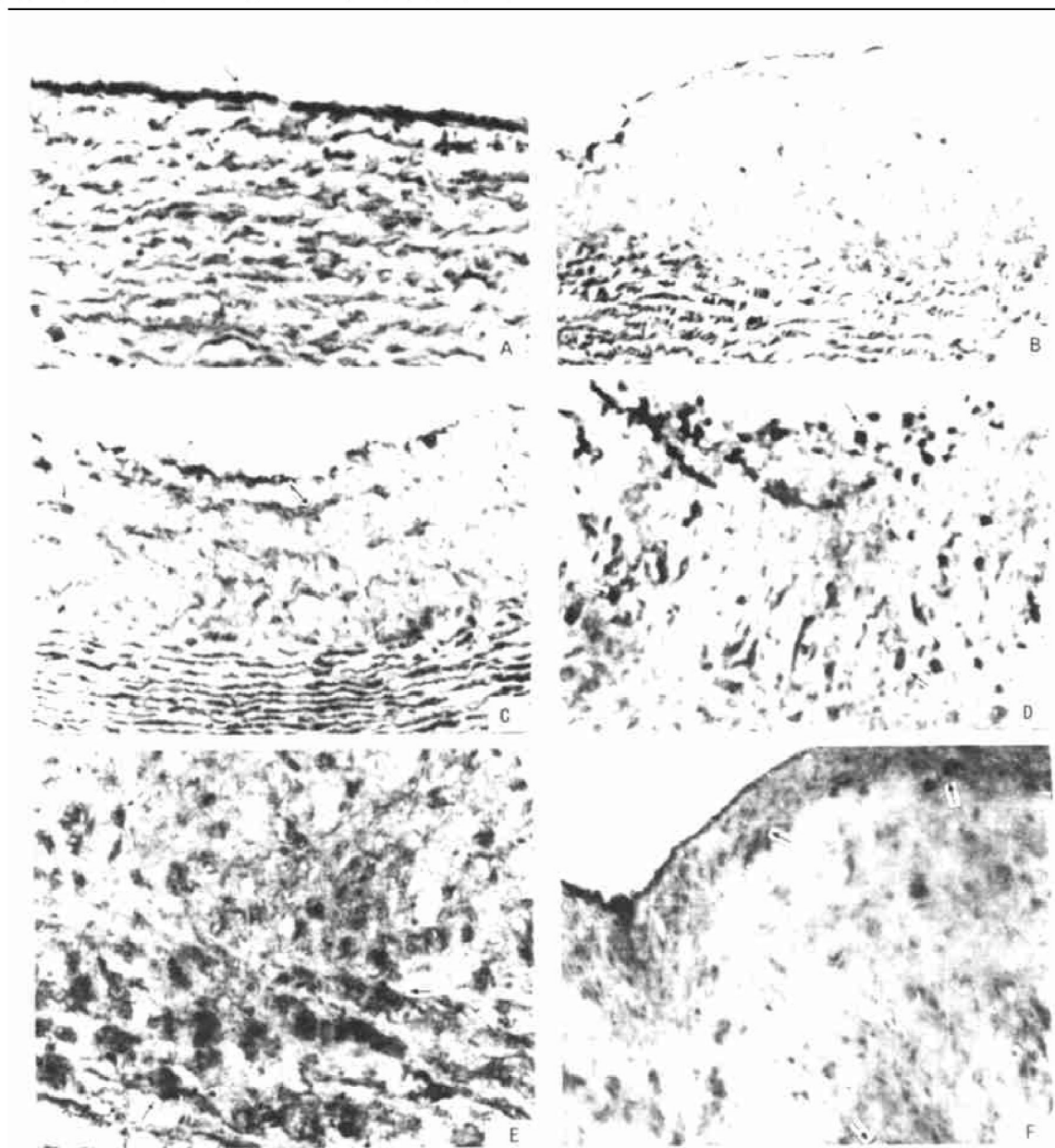


图1. 不同阶段兔主动脉粥样硬化斑块一氧化氮合酶活性(NADPH-d染色法)

Figure 1. Activity of NOS in aorta of experimental rabbits by NADPH-d stain. A: normal control ($\times 200$). B, C and D: plaques in the 8th week ($\times 100$), in this phase, NADPH-d stains showed three different aspects, which were doubtful positive stains (B), positive stains aligning in order (C) and a lot of strong positive stains (D). E: plaques in the 12th week ($\times 200$), extensive NADPH-d moderate positive stains in plaques, particularly at the border of intima and media. F: plaques in the 16th week ($\times 200$), positive stains were mainly around the necrotic cores of the plaque.

1.3 原位杂交法测定一氧化氮合酶 mRNA 表达

一氧化氮合酶 cRNA 探针长 660 bp, 由北京医科

大学病理系提供,方法见文献[1]。杂交结果经苏木素复染。显微镜下,胞浆呈棕黄色显色的为 NOS mRNA 原位杂交阳性细胞。根据一个视野($\times 100$)下阳性反应颗粒占血管壁面积的比例定为:未见或偶见阳性颗粒为阴性或弱阳性(±),阳性颗粒少于 1/3 为阳性(+),阳性颗粒少于 2/3 为中等阳性(++),阳性颗粒在 2/3 以上为强阳性(+++)。

2 结果

2.1 组织化学染色结果

从图 1 (Figure 1) 可见,各组血管壁中膜层均深染。主动脉内皮细胞的 NADPH-d(Nd) 染色正常组呈强阳性(图 1A),实验组普遍弱于正常组。斑块中的 Nd 染色,实验 8 周时可见三种不同的表现形式:2 例未见明显的 Nd 阳性反应(图 1B);2 例可见平行于

管壁呈层状分布的蓝色 Nd 阳性反应(图 1C),根据 Van Gieson 染色,我们认为该阳性反应位于平滑肌细胞;2 例可见 Nd 染色呈强阳性,分布不规则(图 1D)。实验 12 周时,在斑块中可见广泛分布的 Nd 中等阳性或强阳性反应;中、内膜交界处细胞近似梭形,其 Nd 反应程度略强于斑块内的细胞(图 1E)。实验 16 周时的 Nd 染色主要分布在坏死中心周围,呈中等阳性(图 1F)。阴性对照无显色。

2.2 一氧化氮合酶 mRNA 原位杂交

一氧化氮合酶 mRNA 原位杂交经苏木素复染后结果(图 2, Figure 2) 显示:主动脉内膜层正常组内皮细胞 NOS 杂交信号突出于内皮表面,呈深棕色(图 2A);而实验组 NOS mRNA 表达主要分布在脂质坏死中心周围,呈棕色,坏死中心无 NOS mRNA 表达(图 2B)。阴性对照无杂交信号。

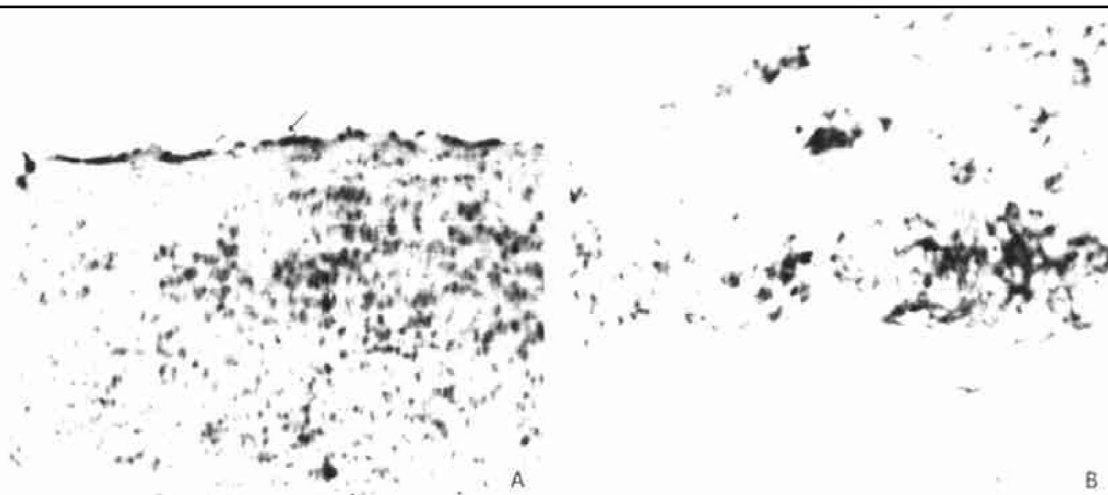


图 2. 兔主动脉一氧化氮合酶 mRNA 表达 (原位杂交法 $\times 100$)

Figure 2. Expression of NOS mRNA in aorta of experimental rabbits by in situ hybridization ($\times 100$). A: normal control. Endothelial cells showed strong positive signals. B: plaques in the 16th week. Positive signals were around the necrotic cores of the plaque.

3 讨论

一氧化氮合酶分为结构型 NOS (constitutive NOS, cNOS) 和诱导型 NOS (inducible NOS, iNOS)。前者在生理条件下存在,释放基础量的 NO, 后者的合成释放受诸多因素的影响。血管内皮细胞合成的 NOS (endothelial NOS, eNOS) 属于 cNOS, 而平滑肌细胞、巨噬细胞等被诱导合成的 NOS 主要为 iNOS。由于内源性一氧化氮(NO)作用的双向性,以及 NOS 异构体的多样性,使其在 As 斑块的发生发展中所处的角色变得复杂起来。有关 NOS 在 As 斑块中的活性及表达尚有不同的报道。Minor 等^[2]和王宏伟等^[3]分别观察到 As 斑块中 NO 释放增加和 NOS 活性升

高;而宋良文等^[4]则得到了相反的结果。为了弄清 NO 与 As 斑块发展间的关系,我们观察了高脂动物模型 8~16 周期间主动脉斑块中 NOS 活性的变化及 16 周时的 NOS mRNA 表达情况,并推测了其可能机制。

结果显示,实验 8 周时,实验组内皮细胞 NOS 活性下降;脂质斑块中可见弱阳性、阳性和强阳性三种不同的 NOS 活性反应,与之相应的细胞分布规律也不尽相同。已知在 iNOS 启动子区存在剪应力反应元件^[5],在 iNOS 非编码区存在 NF- κ B 结合位点^[6]。平滑肌细胞和巨噬细胞均可被诱导合成 iNOS。Yan 等^[7]观察到,在内皮损伤一天后,于中膜的靠近内膜处首先表达 iNOS 蛋白和 iNOS mRNA,此后

于新生内膜中持续表达 iNOS, 由 iNOS 产生的 NO 具有恢复血流、抑制血小板粘附的作用。由于白细胞的粘附和浸润在此时非常有限, 所以早期 iNOS 的激活不可能是由炎症细胞激活所产生的细胞因子触发的^[8]。由此我们推测, 同一时期出现截然不同的结果, 可能与实验动物间具有个体差异, 血管内皮细胞受脂质过氧化损伤的程度不同有关。脂质过氧化损伤内皮, 一方面导致内皮细胞的 NO 分泌减少; 另一方面, 靠近内膜的平滑肌细胞发生表型改变, 并增殖、迁移入内皮下层, 在血流剪应力及前炎症因子的作用下, 大量转录 iNOS^[1]。故在此阶段, 平滑肌细胞等细胞可能通过反应性地释放 NO 来弥补 NO 的减少。其机制可能为: 在 As 病变初期, 脂质浸润内膜, 但尚既无明显的平滑肌细胞增殖、迁移, 又无足够的炎症细胞激活细胞因子时, 脂斑内的 NOS 组化染色为弱阳性结果; 随着内皮的损伤, 平滑肌细胞易于感受血流剪应力的影响, 从而激活了 NOS 基因启动子附近的剪应力反应元件表达 iNOS, 是属于非细胞因子依赖的途径; 而在单核巨噬系统浸入内膜后, 则将通过炎症因子激活的途径, 激活 iNOS 基因非编码区的 NF- κ B 结合位点, 诱导平滑肌细胞、单核细胞和淋巴细胞大量表达 iNOS。

实验 12 周时, 随着脂斑浸润加深, 内皮细胞受损加重, NOS 活性在主动脉斑块中分布广泛, 且中、内膜交界处的 NOS 活性略强。其原因可能是, 此阶段 As 斑块内, 无论是巨噬细胞还是增生的平滑肌细胞都参与了 iNOS 蛋白的合成。与 eNOS 相比, iNOS 产生 NO 的持续时间长且量大^[9]。

实验 16 周时, 实验组主动脉的脂质斑块中 NOS 活性及其 mRNA 表达明显下降。苏木素复染结果表明, 此阶段实验组增生内膜层的大面积 NOS mRNA 表达阴性主要与脂质坏死中心的大量形成有关。我们认为, 与实验 8 周时的“弱阳性”结果相比, 两者有质的区别: 前者是由于细胞内的 NOS 活性太弱, 以致于所采用的方法不足以将它检测出来; 而后者是由于细胞的死亡所致。As 斑块中的平滑肌细胞成分的减少使斑块变得不稳定, 并促进裂隙和碎裂^[10], 从而导致冠心病急性事件发作。故抗脂质过氧化、保护血管内皮, 以延缓、阻止 As 的发展进程, 使 NO 维持在生理水平, 发挥其舒张血管、抑制内皮

细胞粘附和抑制平滑肌细胞增殖的作用, 具有重要意义。

由上述可见, 在 As 的发生发展过程中, 内皮细胞 NOS 活性下降, 而脂斑内细胞的 NOS 活性经历了由弱渐强, 最后伴随着坏死中心的形成而消失的过程。这个演变过程, 在 As 斑块早期可能与 NOS 基因上的剪应力反应元件、NF- κ B 结合位点被激活有关; 在进展期则可能是细胞损伤加重的结果, 此机制有待进一步证实。如何使 iNOS 不过度合成, 使 NO 维持在生理水平, 值得进一步研究。

参考文献

- [1] 李亚俊, 宋剑南, 周霞菁, 等. 脂泰胶囊对实验性动脉粥样硬化家兔内皮素及一氧化氮合酶基因表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 1999, 7(1): 4-8
- [2] Minor RJ, Myers PR, Harrison DG, et al. Diet-induced atherosclerosis increase the release of nitrogen oxides from rabbit aorta [J]. *J Clin Invest*, 1990, 86: 2 109-116
- [3] 王宏伟, 赵华月, 茹立强. 家兔动脉粥样硬化斑块中一氧化氮合成酶活性的研究[J]. 中华病理学杂志, 1997, 26(6): 364
- [4] 宋良文, 张秉钧, 赵静波, 等. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 1994, 2(1): 18-22
- [5] Nuvokawa Y, Ishida V, Tanaka S, et al. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with cardiovascular homeostasis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 200: 802-807
- [6] Xie QW, Whisnant R, Nathan C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon γ and bacterial lipopolysaccharide[J]. *J Exp Med*, 1993, 177: 1 779-784
- [7] Yan Z, Yokota T, Zhang W, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase inhibits platelet adhesion and restores blood flow in the injured artery[J]. *Circ Res*, 1996, 79: 38-44
- [8] Yan Z, Hansson GK. Overexpression of inducible nitric oxide synthase by neointimal smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 1997, 82: 21-29
- [9] Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells [J]. *ASEB J*, 1992, 6: 3 051-064
- [10] Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability[J]. *Am J Pathol*, 1996, 149: 367-380

(此文 1999-08-22 收到, 2000-01-23 修回)

(此文编辑 朱雯霞)