

[文章编号] 1007-3949(2004)12-02-0155-04

• 实验研究 •

卡托普利晚期预处理对人内皮细胞缺氧复氧损伤时 内皮素 1 和一氧化氮合酶表达的影响

徐 慧, 郑 杨, 佟 倩

(吉林大学第一医院心内科, 吉林省长春市 130021)

[关键词] 生物化学; 卡托普利对人内皮细胞缺氧复氧损伤时内皮素 1 和一氧化氮合酶表达的影响; 半定量逆转录—聚合酶链反应; 内皮细胞; 缺氧复氧损伤; 一氧化氮合酶

[摘要] 观察缺氧复氧损伤时内皮细胞表达内皮素、一氧化氮合酶和一氧化氮的变化, 并探讨卡托普利晚期预处理对内皮细胞在缺氧复氧损伤时三者的影响及机制。选用体外培养的第 3 代人脐静脉内皮细胞, 设正常对照组、单纯缺氧组、缺氧复氧组、卡托普利预处理组、卡托普利+ 缓激肽 B₂ 受体阻断剂组、卡托普利+ 蛋白激酶 C 阻断剂组和卡托普利+ 核因子 KB 阻断剂组, 然后提取总 RNA, 运用半定量逆转录—聚合酶链反应检测内皮素、一氧化氮合酶的 mRNA 表达。并利用分光光度计检测总一氧化氮合酶和一氧化氮蛋白的表达。结果发现, 内皮素的灰度值在单纯缺氧组、缺氧复氧组均升高, 在卡托普利组降低, 而在三种阻断剂组均升高; 诱导型一氧化氮合酶和内皮型一氧化氮合酶灰度值的变化规律与内皮素相反, 其中诱导型一氧化氮合酶的变化较为轻微。与对照组相比, 单纯缺氧组和缺氧复氧组一氧化氮合酶和一氧化氮有不同程度的降低 ($P < 0.01$); 与单纯缺氧组和缺氧复氧组相比, 卡托普利组一氧化氮合酶和一氧化氮均明显升高 ($P < 0.01$); 与卡托普利组相比, 3 种阻断剂均可使一氧化氮合酶和一氧化氮的表达下降 ($P < 0.01$), 而与缺氧复氧组相比表达升高 ($P < 0.01$)。结果提示, 缺氧复氧可以使内皮细胞表达的内皮素增加, 一氧化氮合酶降低, 卡托普利对缺氧复氧损伤导致的诱导型一氧化氮合酶、内皮型一氧化氮合酶和内皮素之间的平衡失调具有保护作用, 此过程涉及缓激肽 B₂ 受体激活、蛋白激酶 C 途径和核因子的转录。但以上各途径仅是卡托普利发挥其延迟保护作用的一方面, 阻断其中某种方式后并不能使卡托普利的保护作用完全消失。

[中图分类号] Q5

[文献标识码] A

Effects of Catopril on Expressions of Endothelin-1 and Nitric Oxide Synthase against the Anoxia-Reoxygenation Injury to Endothelial Cells

XU Hui, ZHENG Yang, and TONG Qian

(Institute of Cardiovascular, the First Clinic Hospital of Jilin University, Changchun 130021, China)

[KEY WORDS] Endothelial Cell; Anoxia-Reoxygenation Injury; Nitric Oxide Synthase; Preconditioning; Endothelin

[ABSTRACT] **Aim** To observe the expressions of endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (NO) and nitric oxide synthase (NOS) in the anoxia-reoxygenation (H/R) injury on human umbilical vein endothelial cells (EC), and further research the molecular mechanism of catopril late effect on production of ET-1 and NO. **Methods** The third passage of cultured EC was randomly divided into 7 groups: control, anoxia, anoxia-reoxygenation, catopril, catopril+ bradykinin B₂ receptor inhibitor, catopril+ PKC inhibitor, catopril+ NF- κ B inhibitor. Total RNA was extracted. The expression of ET-1, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA were analyzed by semi-quantitative RT-PCR method. The protein level of total NOS and NO were analyzed too. **Results** ET-1 mRNA expression increased significantly in anoxia group and anoxia-reoxygenation group, decreased in catopril group, and increased in three inhibitor groups. While the mRNA expressions of iNOS and eNOS were contrary to that of ET-1, and the change of iNOS was slightly. The protein levels of total NOS and NO are lower in anoxia group and anoxia-reoxygenation group than in control group, higher in catopril group than in anoxia group or anoxia-reoxygenation group, and lower in three inhibitor groups than in catopril group, but higher than in anoxia-reoxygenation group. **Conclusion** Anoxia-reoxygenation injury can induce ET-1 expression increasing and NO expression decreasing. Catopril can protect the imbalance of ET-1 and NO. Bradykinin B₂ receptor, PKC activating and nucleus factor are partly involved in the protective effect.

[收稿日期] 2003-06-16 [修回日期] 2004-03-01

[基金项目] 吉林省科技发展计划(吉发合字 990581-1)资助

[作者简介] 徐慧, 硕士研究生。郑杨, 医学博士, 教授, 硕士研究生导师, 本文通讯作者。佟倩, 主治医师, 博士研究生, 研究方向为高血压和冠心病的治疗。

内皮素 1 (endothelin, ET-1) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是由血管内皮细胞 (endothelial cell, EC) 合成的一对重要的活性因子, 二者相互拮抗, 共同参与血管张力和血液流量的调节。研究证实, 缺血预

处理(ischemic preconditioning, IPC)可以调动机体内源性保护机制,从而减轻缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion injury, I/R)。已知与IPC有关的物质如腺苷、乙酰胆碱、缓激肽等均可促进一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)诱导NO合成并降低内皮素1的表达。已有研究表明NO、内皮素1可能参与了IPC过程,然而二者在IPC中的作用至今仍未明了。近年发现血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)类药物具有抗I/R损伤作用。本研究旨在从细胞水平上观察缺氧复氧损伤(hypoxia/reoxygenation injury, H/R)诱导的人脐静脉内皮细胞NOS、NO和内皮素1的变化,并观察应用卡托普利晚期预处理后三者的变化及卡托普利的保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

人脐静脉内皮细胞株 ECV304(中科院上海细胞库),IMDM培养基(Sigma Chemical Co. USA),卡托普利纯品(中美上海施贵宝公司馈赠),缓激肽B₂受体阻断剂(HOE140),蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)阻断剂(chelerythrine)、NOS阻断剂(L-NAME)和核因子KB(nuclear factor- κ B, NF- κ B)阻断剂(PDTC)(Sigma, USA), Trizol (Sigma, USA),引物(TakaRa),逆转录-聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(鼎国公司),NOS和NO检测试剂盒(南京建成生物工程公司)。

1.2 细胞培养和缺氧复氧模型

取ECV304细胞培养于IMDM培养基中,置5%CO₂、37℃、饱和湿度培养箱中培养,倒置显微镜下观察呈单层铺路石状镶嵌排列,传代培养备用。将生长成单层的第3代ECV304细胞用缺氧液换液(Na₂HPO₄ 0.9 mmol/L, NaHCO₃ 6.0 mmol/L, CaCl₂ 1.8 mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, 乳酸钠 40 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, NaCl 98.5 mmol/L, KCl 10.0 mmol/L), 100%氮气、37℃培养2 h后,再以复氧液全量换液(Na₂HPO₄ 0.9 mmol/L, NaHCO₃ 20.0 mmol/L, CaCl₂ 1.8 mmol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, 葡萄糖 55 mmol/L, HEPES 10 mmol/L, NaCl 129.5 mmol/L, KCl 5.0 mmol/L),并恢复5%CO₂气体环境正常培养。建立缺氧复氧模型。

1.3 实验分组

实验随机分7组: 对照组:细胞置IMDM培养基中于5%CO₂、37℃、饱和湿度培养箱中培养;④单

纯缺氧组:细胞于缺氧液、100%氮气、37℃条件下培养2 h;⑤缺氧复氧组:细胞于上述缺氧条件下缺氧2 h后,全量换以复氧液,并恢复5%CO₂气体环境培养2 h; 卡托普利预处理组:卡托普利(10⁻² mol/L)预处理24 h后,对EC行缺氧2 h复氧2 h; 卡托普利+缓激肽B₂受体阻断剂(浓度为10⁻⁵)组; 卡托普利+PKC阻断剂(浓度为10⁻⁶)组。⑧卡托普利+NF- κ B阻断剂(浓度为10⁻⁵)组。5~7组卡托普利终浓度为10⁻² mol/L,与阻断剂共同孵育EC,24 h后行缺氧2 h复氧2 h。

1.4 总RNA的提取

弃去培养基,PBS液冲洗2遍,按1×10⁶细胞加入1 mL Trizol液混匀,15℃~30℃孵育5 min后,加入0.2 mL氯仿混匀,12 000 g低温离心15 min后取水相,加入0.5 mL异丙醇,15℃~30℃孵育5 min,12 000 g低温离心10 min,弃上清,沉淀物即RNA。所提取RNA分别经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳和紫外分光比色确定完整性和纯度后,即可用于实验。

1.5 逆转录-聚合酶链反应

人脐静脉内皮细胞内皮素1、内皮型NOS(endothelial NOS, eNOS)及诱导型NOS(inducible NOS, iNOS)引物的设计遵循PCR引物设计原则,根据Genbank上查找的基因序列,使用DNA club primer design软件设计如下:内皮素1:正链:5'-CGTTGCTCCT-GCTCCTCCTTGATGG-3',负链:5'-AAGTCCCAGC-CAGCATGGAGAGCG-3',扩增产物大小为543 bp; eNOS:正链:5'-TTCTAATCGTAACTGTGGCC-3',负链:5'-GCATGAGCGTATGCCAGCC-3',扩增产物大小为377 bp; iNOS:正链:5'-CGTCAGTCAAGCCTTCACGC-3',负链:5'-TCACGCGGTATCGCCTGACC-3',扩增产物大小为380 bp; GAPDH:正链:5'-CTCTCTGCTC-CTCCTGTTCCGACAG-3',负链:5'-GTGGAATCATATTG-GAACATGTAG-3',扩增产物大小为210 bp。逆转录反应系统的组成:RNA 2 μ g(4 μ L), oligoIT 1.0 μ g(1.5 μ L)。70℃反应5 min,冰水中冷却5 min。5×逆转录缓冲液5.0 μ L, dNTP 2.5 μ L(10 mmol/L), RNA抑制剂1.0 μ L(40 Mu/L), AMV 1.0 μ L(10 Mu/L), DEPC水10.0 μ L,总体积25.0 μ L。42℃反应60 min。95℃灭活逆转录酶5 min。PCR系统的组成:cDNA 10.0 μ L, 10×PCR缓冲液5.0 μ L, dNTP 4.0 μ L(10 mmol/L),上下游引物各2 μ L(20 pmol/L), Taq DNA聚合酶0.5 μ L,双脱氧水22.5 μ L,总体积50 μ L。上层加25 μ L液体石蜡,瞬时离心。每个反应体系内加两对引物,分别对待测mRNA和GAPDH mRNA的cDNA片段进行扩增。循环参数为:94℃变

性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环。循环结束后 72 °C 延伸 7 min。

1.6 产物分析

取 20 μ L PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 100 mV。待溴酚蓝电泳至下游 2/3 处时, 取出凝胶, 于紫外灯下观察, 以凝胶成像分析仪分析各 DNA 条带灰度值, 并进行拍照。各个反应体系以 GAPDH mRNA 的 RT-PCR 产物为内参照, 计算待测 mRNA 的 RT-PCR 产物与它的灰度比值, 作为待测 mRNA 的表达值。

1.7 培养基中一氧化氮合酶和一氧化氮含量测定

收集各组培养上清, 按 1 mL/份分装, -70 °C 冻存备用。利用分光光度计按试剂盒说明书对 NOS 和 NO 进行检测。

1.8 统计学处理

各种计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组数据间显著性检验采用 *t* 检验, 多个样本均数比较及两两比较采用 ANOVA 分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 细胞总 RNA 提取

表 1. 各基因 mRNA 的差异表达

Table 1. Different expression of respective genes mRNA ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	内皮素 1	内皮型一氧化氮合酶	诱导型一氧化氮合酶
对照组	0.76 $\pm$ 0.14	1.29 $\pm$ 0.43	0.35 $\pm$ 0.04
缺氧组	1.32 $\pm$ 0.96 ^a	0.65 $\pm$ 0.12 ^a	0.24 $\pm$ 0.12 ^a
缺氧再灌注组	1.49 $\pm$ 0.85 ^a	0.51 $\pm$ 0.08 ^a	0.22 $\pm$ 0.12 ^a
卡托普利预处理组	0.83 $\pm$ 0.16 ^b	1.14 $\pm$ 0.87 ^b	0.33 $\pm$ 0.01 ^b
卡托普利+ 缓激肽 B ₂ 受体阻断剂组	1.07 $\pm$ 0.54 ^{bc}	0.83 $\pm$ 0.11 ^{bc}	0.3 $\pm$ 0.05 ^{bc}
卡托普利+ PKC 阻断剂组	1.12 $\pm$ 0.47 ^{bc}	0.87 $\pm$ 0.14 ^{bc}	0.3 $\pm$ 0.02 ^{bc}
卡托普利+ NF- κ B 阻断剂组	1.17 $\pm$ 0.84 ^{bc}	0.91 $\pm$ 0.04 ^{bc}	0.29 $\pm$ 0.09 ^{bc}

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.05$, 与缺氧复氧组比较; c: $P < 0.01$, 与卡托普利预处理组比较。

2.2 培养基中一氧化氮和一氧化氮合酶含量

与对照组相比, 单纯缺氧组和缺氧复氧组一氧化氮合酶和一氧化氮均出现不同程度降低 ($P < 0.01$); 与单纯缺氧组和缺氧复氧组相比, 卡托普利预处理组一氧化氮合酶和一氧化氮均明显升高 ($P < 0.01$); 与卡托普利预处理组相比, 3 种阻断剂均可使一氧化氮合酶和一氧化氮的表达下降 ($P < 0.01$); 而与缺氧复氧组相比, 3 种阻断剂使一氧化氮合酶和一氧化氮的表达升高 ($P < 0.01$; 表 2, Table 2)。

RNA 样品经变性琼脂糖凝胶电泳后, 紫外灯下观察可见 18 s、28 s 两条清晰的条带, 表明 RNA 样品保持完好, 未被分解 (图 1, Figure 1)。紫外分光比色测定显示, 所有 RNA 样品在 260 nm、280 nm 处的 A 值之比均在 1.8~2.0 之间, 表明纯度符合要求。

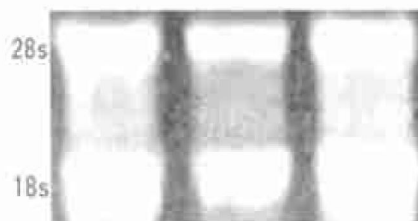


图 1. RNA 样品变性琼脂糖凝胶电泳

Figure 1. Denaturalization gelose gel electrophoresis of RNA samples

2.2 逆转录—聚合酶链反应结果

与对照组相比, 内皮素 1 的灰度值在单纯缺氧组和缺氧复氧组均升高 ($P < 0.01$); 与单纯缺氧组和缺氧复氧组相比, 在卡托普利预处理组降低 ($P < 0.01$); 与卡托普利预处理组相比, 在三种阻断剂组均升高 ($P < 0.01$); iNOS 和 eNOS 灰度值的变化规律与内皮素 1 相反 ($P < 0.01$; 表 1, Table 1)。

3 讨论

目前多数学者认为再灌注损伤的发生与一氧化氮减少和内皮素增加有关, 但也有研究表明, 给予一氧化氮合酶抑制剂 L-NNA^[1] 和 L-NAME^[2] 等减少一氧化氮合成并未加重损伤, 甚至改善了心脏功能。在本实验中, 缺氧和缺氧复氧时均出现一氧化氮含量在 mRNA 和蛋白质水平的降低以及内皮素 1 在 mRNA 水平的增加。此结果与我们既往实验所证明的缺氧复氧可以导致 EC 损伤相平衡, 证明内皮素增加和一氧化氮降低介导了 EC 的缺氧复氧损伤。

表 2. 培养基中一氧化氮和一氧化氮合酶蛋白质含量

Table 2. Protein levels of total NOS and NO variety in culture media ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	NO ($\mu\text{mol/L}$)	NOS ($\mu\text{g/L}$)
对照组	17.5 $\pm$ 1.4	18.3 $\pm$ 1.6
缺氧组	9.1 $\pm$ 0.7 ^a	9.9 $\pm$ 0.9 ^a
缺氧再灌注组	8.1 $\pm$ 0.7 ^a	8.5 $\pm$ 0.9 ^a
卡托普利预处理组	16.2 $\pm$ 1.3 ^b	17.1 $\pm$ 1.4 ^b
卡托普利+ 缓激肽 B ₂ 受体阻断剂组	12.5 $\pm$ 1.0 ^{bc}	12.7 $\pm$ 1.1 ^{bc}
卡托普利+ PKC 阻断剂组	10.4 $\pm$ 0.8 ^{bc}	12.0 $\pm$ 0.9 ^{bc}
卡托普利+ NF- κ B 阻断剂组	11.3 $\pm$ 0.8 ^{bc}	11.6 $\pm$ 0.9 ^{bc}

a: $P < 0.01$, 与对照组比较; b: $P < 0.01$, 与缺氧复氧组比较; c: $P < 0.01$, 与卡托普利预处理组比较。

通过 RT-PCR 反应可见 iNOS、eNOS 的 mRNA 水平在缺氧和缺氧复氧后均出现了不同程度的减少, 且总一氧化氮合酶蛋白质水平也存在相应的降低。因此认为, 缺氧和缺氧复氧损伤时一氧化氮合成和释放均减少, 可能与一氧化氮合酶含量和活性下降或与一氧化氮合酶基因表达降低有关。

在缺氧复氧过程中, 一氧化氮生成的减少直接或间接参与了缺氧复氧对 EC 的损伤, 使其抗氧化和抗中性粒细胞聚集的能力减弱。McQuillen 等^[3]在缺氧条件下培养人脐静脉 EC 时发现, 缺氧可以直接作用于 EC, 使其合成释放一氧化氮减少, 本研究结果与之相符。本实验还发现, 缺氧和缺氧复氧损伤时内皮素 1 合成明显增加。内皮素 1 使血管强烈收缩, 组织血液供应明显减低, 形成“无血流”现象, 且内皮素 1 还可以导致细胞内钙离子超载, 能量代谢失调等一系列不利作用。由此可见, 缺氧复氧损伤可以引起一氧化氮和内皮素 1 之间的平衡失调, 进而导致细胞损伤。

目前认为预处理存在有两个不连续的时相变化: 早期或经典阶段(数分钟内出现, 持续约 2 h); 晚期或第二窗口保护作用(预适应后 24 h 重复保护, 持续约 72 h)。晚期预处理因其出现较晚, 持续时间长, 而具有更重要的临床意义。为了进一步探讨 ACEI 类药物与 EC 在缺氧复氧损伤中一氧化氮合酶、一氧化氮、内皮素 1 的变化关系, 我们用卡托普利对细胞进行晚期预处理, 发现卡托普利可以产生类似 IPC 的保护效应, 使一氧化氮合酶和一氧化氮

表达上调, 而内皮素 1 减少, 从而减弱细胞损伤^[4]。证明卡托普利具有延迟保护 EC 抗缺氧复氧损伤导致的一氧化氮与内皮素之间的平衡失调作用。

目前 ACEI 类药物抗缺氧复氧损伤机制的研究主要集中于早期预处理, 可能涉及清除氧自由基, 同时保护抗氧化酶系统, 以及抑制参与缺血再灌注损伤的内源性活性物质的合成和释放^[5]。但晚期预处理保护 EC 抗缺氧复氧损伤的研究甚少。我们进一步的实验证明了卡托普利可以通过激活缓激肽 B₂、受体、PKC 途径以及核因子的转录过程来延迟保护 EC 在缺氧复氧损伤中一氧化氮合酶、一氧化氮、内皮素 1 的不利变化。但同时我们也证实了以上各途径仅是卡托普利发挥其延迟保护作用的一方面, 阻断其中某种方式后并不能使卡托普利的保护作用完全消失。

综上所述, 我们认为缺氧复氧可以导致 EC 表达的内皮素 1 增加而一氧化氮合酶、一氧化氮降低, 卡托普利对缺氧复氧损伤导致的一氧化氮和内皮素 1 之间的平衡失调具有保护作用, 缓激肽 B₂ 受体、PKC 途径激活、一氧化氮合酶活性增强, 一氧化氮合成以及核因子的转录, 在卡托普利延迟保护 EC 缺氧复氧损伤时一氧化氮/ET 表达失衡中发挥着正面效应, 但他们究竟是一条途径中的不同环节还是几条不同途径分别发挥作用, 目前还不明确, 但也从另一个侧面证实了卡托普利延迟保护作用是多方面效应, 其中仍有其他的因素发挥效应, 尚有待于我们的进一步研究。

[参考文献]

- [1] Pabla R, Curtis MJ. Effect of endogenous nitric oxide on cardiac systolic and diastolic function during ischemia and reperfusion in the rat isolated perfused heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1996, **28** (10): 2111-121
- [2] Woditsch I, Schorok. Prostacyclin rather than endogenous nitric oxide is a tissue protective factor in myocardial ischemia. *Am J Physiol*, 1992, **263** (5pt2): H1390-396
- [3] McQuillen LP, Leang GK, Marsden PA. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcription and posttranscriptional mechanisms. *Am J Physiol*, 1994, **267** (5): H1921-933
- [4] 董晓雁, 张桂清, 方向明, 郑民安, 胡继军, 林桂珍, 等. 卡托普利对动脉粥样硬化家兔内皮素和血管紧张素 II 的影响及其与原癌基因 c-myc 和 c-fos 的相关关系. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (3): 217-220
- [5] Scholkens BA, Linz W, Martorana PA. Experimental cardiovascular benefits of angiotensin converting enzyme inhibitors: beyond blood pressure reduction. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991, **8** (Suppl): 26-29

(此文编辑 文玉珊)