

卡托普利晚期预处理保护人内皮细胞缺氧复氧损伤的作用机制

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] 病理学与病理生理学; 内皮细胞; 缺氧复氧损伤; 卡托普利; 晚期预处理

[摘 要] 为探讨缺氧复氧对内皮细胞的损伤及卡托普利预处理的延迟保护作用及机制。建立人脐静脉内皮细胞缺氧复氧损伤模型, 观察不同的缺氧和复氧时间对内皮细胞的损伤作用。并将细胞分为卡托普利预处理组, 以及应用缓激肽 β_2 受体阻断剂、蛋白激酶 C 阻断剂、一氧化氮合酶阻断剂和核因子 κB 阻断剂, 分别与卡托普利共同孵育细胞, 再对内皮细胞行缺氧复氧损伤, 观察细胞形态和死亡率的变化, 并利用分光光度计检测细胞培养基中丙二醛、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶浓度。结果单纯缺氧组和缺氧复氧组均可见细胞变圆、收缩、脱落; 细胞死亡率均较正常培养组增加; 丙二醛浓度增高, 而超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶含量均有不同程度的降低, 与正常培养组相比具有显著意义, 并且随着缺氧和复氧时间的延长, 上述变化愈明显。卡托普利晚期预处理后, 细胞形态基本保持正常, 上述多项检测指标与缺氧复氧组相比具有显著意义, 并且在本实验所给定的浓度中 ($10^{-2} \sim 10^{-4}$ mol/L), 此种保护作用随卡托普利剂量的增加而逐渐增强。但给予上面 4 种阻断剂后, 卡托普利的预处理保护作用均部分消失, 与卡托普利预处理组相比具有显著意义, 与缺氧复氧组相比也具有显著意义。结论 缺氧复氧可导致细胞死亡率增加、脂质过氧化反应增强和抗氧化能力减弱, 并且此种变化具有时间依赖性。卡托普利晚期预处理可以减轻内皮细胞缺氧复氧损伤, 此保护作用具有剂量依赖性。这一过程涉及缓激肽 β_2 受体、蛋白激酶 C 途径、一氧化氮和核因子的转录等多种因素的参与。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

A Study on the Protective Mechanism of Catopril Against the Anoxia-Reoxygenation Injury to Endothelial Cells

XU Hui, ZHENG Yang, and TONG Qian

(Department of Cardiovascular Medicine, The First Clinic Hospital of Jilin University)

[KEY WORDS] Endothelial Cell; Anoxia-Reoxygenation Injury; Catopril; Preconditioning

[ABSTRACT] **Aim** To explore the mechanism of anoxia-reoxygenation injury (H/R) and the late protective effect of catopril on endothelial cells (EC). **Methods** To establish anoxia-reoxygenation model on human umbilical veins endothelial cell line ECV304, and observe the injury degree of anoxia and reoxygenation at the different time. Then these ECs were randomly divided into 5 groups: catopril, catopril + bradykinin β_2 receptor inhibitor, catopril + PKC inhibitor, catopril + NOS inhibitor, catopril + NF- κB inhibitor, and observe the cell morphologic changes, mortality and the activities of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX). **Results** After treatment with anoxia and anoxia-reoxygenation, the ECs' morphologic changes were observed. The mortality increased and MDA concentration became higher, the concentration of SOD and GSH-PX became lower ($P < 0.01$). Meanwhile, the changes became more obviously with the time extending. The late preconditioning with catopril, the cell morphologic, MDA, SOD and GSH-PX keep normal. The protective effect became strengthen along with the catopril concentration increasing. However, culturing with above four inhibitors, the protective effect was partly diminished. **Conclusion** Anoxia and anoxia-reperfusion induce lipid peroxidation and the weakening of antioxidant ability in a time-dependent manner. The late preconditioning with catopril can weaken anoxia-reperfusion injury in a concentration-dependent manner. Bradykinin β_2 receptor, PKC activating, nitric oxide and nucleus factor are all involved in the protective effect.

缺氧复氧损伤 (hypoxia-reoxygenating injury, H/R) 可以导致内皮细胞 (endothelial cells, EC) 结构改变

和功能失调, 使脂质过氧化反应增加及产生大量的自由基。多年研究均证实, 缺氧预处理可以调动机体内源性保护机制从而减轻 H/R 损伤, 不仅能够保护心肌细胞, 而且能够保护 EC。临床和实验研究证明, 血管紧张素转化酶抑制剂 (angiotensin-converting enzyme inhibitor, ACEI) 类药物具有保护心脏和血管

[收稿日期] 2003-06-16 [修回日期] 2004-05-14

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目 (吉发合字 990581-1) 资助

[作者简介] 徐慧, 硕士研究生。郑杨, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 本文通讯作者, 联系电话 0431-5612342。

免受 H/R 损伤的作用,其保护作用相当于缺氧预处理^[1-3]。但目前多数的研究还限于 ACEI 类药物对心肌细胞的保护和心功能的改善方面,而对于 EC 保护性研究甚少,尤其是延迟保护作用及机制的研究目前国内尚未见相关报道。本实验旨在从细胞水平研究 H/R 对 EC 的损伤作用,探讨 ACEI 类药物卡托普利对 EC 缺氧复氧损伤的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

人脐静脉内皮细胞株 ECV304 由中国科学院上海细胞库提供,IMDM 培养基、缓激肽 $\beta 2$ 受体阻断剂 (HOE140)、蛋白激酶 C 阻断剂 (chelerythrine)、一氧化氮合酶阻断剂 (L-NAME) 和核因子 κB 阻断剂 (PDTC) 均购于 Sigma 公司,丙二醛检测试剂盒、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 检测试剂盒购于南京建成生物工程公司,卡托普利纯品由中美上海施贵宝公司馈赠,二氧化碳孵箱 (RKI) 为日本产品,可见分光光度计 (Bachman DU-640) 为美国产品。

1.2 细胞培养方法

取 ECV304 细胞培养于 IMDM 培养基中,置 5% CO_2 、37℃、饱和湿度培养箱中培养,倒置显微镜下观察细胞呈单层铺路石状镶嵌排列,传代培养备用。取培养至第 3 代的 ECV304 细胞用缺氧液换液 (Na_2HPO_4 0.9 mmol/L; $NaHCO_3$ 6.0 mmol/L; $CaCl_2$ 1.8 mmol/L; $MgSO_4$ 1.2 mmol/L; 乳酸钠 40 mmol/L; HEPES 10 mmol/L; NaCl 98.5 mmol/L; KCl 10.0 mmol/L pH 6.8), 100% 氮气、37℃ 培养不同时间后,再以复氧液 (Na_2HPO_4 0.9 mmol/L; $NaHCO_3$ 20.0 mmol/L; $CaCl_2$ 1.8 mmol/L; $MgSO_4$ 1.2 mmol/L; 葡萄糖 55 mmol/L; HEPES 10 mmol/L; NaCl 129.5 mmol/L; KCl 5.0 mmol/L, pH 7.4) 全量换液,并恢复 5% CO_2 气体环境正常培养,建立缺氧复氧模型。

1.3 实验分组及各组的处理

实验随机分为 (1) 对照组 (C); (2) 单纯缺氧组 (H) 为缺氧条件下分别培养 30 min、1 h、2 h、3 h 和 4 h; (3) 缺氧复氧组 (H/R) 为细胞于缺氧条件下培养 2 h 后,恢复气体环境分别培养 30 min、1 h、2 h、3 h 和 4 h; (4) 卡托普利预处理组 (CAP) 为卡托普利以蒸馏水溶解稀释后加入细胞培养基中,调节终浓度分别为 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} mol/L 培养 24 h 后,对 EC 行缺氧 2 h 复氧 2 h (H2/R2) 培养方案; (5) 卡托普利 + HOE140

(浓度为 10^{-5} mol/L) 组 (CAP + H1); (6) 卡托普利 + 蛋白激酶 C 阻断剂 (浓度为 10^{-6} mol/L) 组 (CAP + H2); (7) 卡托普利 + L-NAME (浓度为 10^{-5} mol/L) 组 (CAP + H3); (8) 卡托普利 + PDTC (浓度为 10^{-5} mol/L) 组 (CAP + H4)。以上各组细胞均为培养至第 3 代 EC 细胞,细胞数为 1×10^6 /瓶,第 (5) ~ (8) 组四种阻断剂分别以蒸馏水溶解稀释,于卡托普利前 30 min 加入,调节终浓度至各组给定的浓度,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 H2/R2 方案。

1.4 细胞形态学观察

在倒置显微镜下观察 ECV304 活细胞形态,并对细胞行台盼蓝染色,细胞计数检测死亡率。取待测的细胞悬液 0.1 mL 加 D-Hanks 0.8 mL 及 0.3% 台盼蓝 0.1 mL (死细胞着色),混合后滴入血细胞计数盘内,按白细胞计数法,于低倍镜下计数 4 角的大格内的活细胞数 (透明未着色者),然后按下式计数:细胞浓度 (细胞数 k/L) = (4 个大格内的活细胞数/4) $\times 10^4 \times$ 稀释倍数 (10),细胞存活率 = 活细胞数 / (活细胞数 + 死细胞数) $\times 100\%$ 。

1.5 培养基中丙二醛、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶含量测定

收集不同时间段的培养上清,按 1 mL/份分装, -70℃ 冻存备用。利用分光光度计,按试剂盒说明书对丙二醛、SOD 和 GSH-PX 进行测定。丙二醛测试原理是,脂过氧化物降解产物中的丙二醛可与硫代巴比妥酸 (TBA) 缩合,形成红色产物,在 532 nm 处有最大吸收峰。SOD 测定原理是超氧化物歧化酶 (SOD) 能清除超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot -}$), 保护细胞免受损伤。通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot -}$), 后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色,用可见分光光度计测其吸光度。当被测样品中含 SOD 时,则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光度值低于对照管的吸光度值,通过公式计算可求出被测样品中的 SOD 活力。GSH-PX 测定原理是, GSH-PX 可以促进过氧化氢 (H_2O_2) 与 GSH 反应生成 H_2O 及氧化型谷胱甘肽 (CSSG), GSH-PX 的活力可用其酶促反应的速度来表示,测定此酶促反应中还原型谷胱甘肽的消耗,则可求出酶的活力。GSH-PX 的活力以催化 GSH 的反应速度来表示,由于这二个底物在没有酶的条件下,也能进行氧化还原反应 (称非酶促反应), 所以最后计算此酶活力时必须扣除非酶促反应所引起的 GSH 减少部分。

1.6 统计学处理

各种数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据间差异的显著性采用 t 检验,多个样本均数比较及两两比较采用 ANOVA,统计学分析应用 SPSS 软件包。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 内皮细胞 ECV304 形态特征

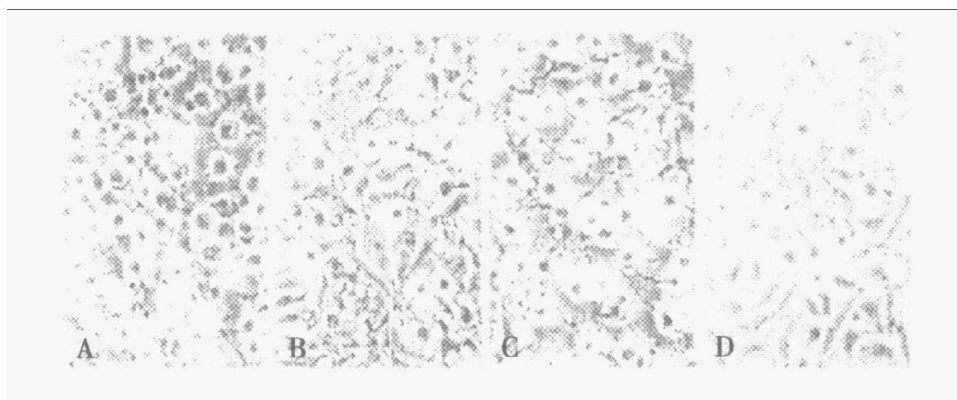


图 1. 内皮细胞 ECV304 形态学改变 A 为单纯缺氧组和缺氧复氧组, B 为卡托普利组, C 为 CAP 和阻断剂共同培养组, D 为正常组。

Figure 1. ECV304 morphology variety

2.2 内皮细胞 ECV304 死亡率的变化

实验各组在实验前细胞存活率在 $89.7\% \pm 5.7\%$ 之间,组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组相比,单纯缺氧组细胞死亡率增加,缺氧复氧组死亡率增加更为明显,卡托普利组细胞死亡率基本保持在正常水平, CAP + H1 组、CAP + H2 组、CAP + H3 组、CAP + H4 组与缺氧复氧组相比死亡率降低,与对照组和卡托普利组相比死亡率增加。差异有统计学意义(表 1, Table 1)

2.3 内皮细胞 ECV304 培养基中丙二醛、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶含量

2.3.1 缺氧不同时间的影响 与对照组相比,单纯缺氧组可见培养基中丙二醛增加,而 SOD 和 GSH-PX 含量出现不同程度的降低,差异有统计学意义(表 2, Table 2)。并且随着单纯缺氧时间延长,上述变化愈明显。

2.3.2 缺氧 2 h 后不同复氧时间的影响 与对照组相比,缺氧 2 h 后不同复氧时间组均可见培养基中丙二醛增加,而 SOD 和 GSH-PX 含量出现不同程度的降低,差异有统计学意义(表 3, Table 3)。并且随着复氧时间延长,上述变化愈明显。

对照组 ECV304 细胞呈单层铺路石状生长,细胞间连接紧密。H 和缺氧复氧组均可见大部分细胞变圆收缩,细胞间隙明显增宽,部分细胞脱落。卡托普利组大部分细胞成片贴壁生长,但细胞间隙仍较宽。卡托普利和 4 种阻断剂共同培养的各组细胞形态与缺氧复氧组相似,大部分细胞变圆收缩,细胞间隙增宽,并可见部分细胞脱落(图 1, Figure 1)

表 1. 细胞死亡率变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Endothelial cells motality

| 分 组 | 死亡率 |
|----------|-----------------------|
| 对照组 | $10.3\% \pm 0.8\%$ |
| 缺氧 2 h | $37.9\% \pm 1.9\%d$ |
| 复氧 2 h | $52.3\% \pm 2.0\%de$ |
| 卡托普利 | $13.3\% \pm 1.2\%bfh$ |
| CAP + H1 | $28.7\% \pm 1.1\%ceg$ |
| CAP + H2 | $21.6\% \pm 1.2\%ceg$ |
| CAP + H3 | $25.5\% \pm 1.2\%ceg$ |
| CAP + H4 | $26.1\% \pm 1.4\%ceg$ |

a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, d: $P < 0.001$, 与对照组比较; e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$, 与缺氧 2 h 比较; g: $P < 0.01$, h: $P < 0.001$, 与复氧 2 h 比较。

2.3.3 不同浓度卡托普利的影响 与对照组相比, CAP 浓度为 10^{-2} mol/L 时,丙二醛、SOD 和 GSH-PX 变化无差异,而当 CAP 浓度为 10^{-3} 或 10^{-4} mol/L 时,丙二醛增加,而 SOD 和 GSH-PX 降低。与 H/R 相比,卡托普利组丙二醛下降,而 SOD 和 GSH-PX 含量出现不同程度的增高,差异有统计学意义(表 4, Table 4)。且此变化与卡托普利的浓度具有相关性,随

卡托普利浓度增加此种变化愈明显。

表 2. 单纯缺氧组内皮细胞 ECV304 培养基中丙二醛、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶含量($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The contents of MDA, SOD and GSH-PX in culture media in different hypoxia groups

| 分 组 | 丙二醛 (nmol/L) | SOD (kU/L) | GSH-PX (活力单位) |
|-----------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 1.95 ± 0.02 | 20.2 ± 1.5 | 124.5 ± 3.3 |
| 缺氧 30 min | 2.84 ± 0.21 ^c | 18.6 ± 1.4 ^b | 110.5 ± 2.9 ^c |
| 缺氧 1 h | 4.11 ± 0.37 ^c | 15.7 ± 1.2 ^c | 98.8 ± 3.4 ^c |
| 缺氧 2 h | 6.70 ± 0.54 ^c | 14.5 ± 1.3 ^c | 73.1 ± 2.3 ^c |
| 缺氧 3 h | 10.4 ± 0.6 ^d | 14.4 ± 1.1 ^c | 48.4 ± 2.5 ^d |
| 缺氧 4 h | 12.5 ± 1.0 ^d | 13.2 ± 1.0 ^c | 37.0 ± 2.1 ^d |

b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$, d: $P < 0.001$, 与对照组比较。

表 3. 缺氧 2 h 后不同复氧时间培养基中丙二醛、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的含量($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The contents of MDA, SOD and GSH-PX in culture media in different reoxygenation groups

| 分 组 | 丙二醛 (nmol/L) | SOD (kU/L) | GSH-PX (活力单位) |
|-----------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| 对照组 | 1.95 ± 0.02 | 20.2 ± 1.5 | 124.5 ± 3.3 |
| 复氧 30 min | 2.97 ± 0.17 ^c | 10.4 ± 1.0 ^c | 108.3 ± 2.9 ^c |
| 复氧 1 h | 4.41 ± 0.46 ^c | 9.2 ± 0.9 ^c | 82.2 ± 2.4 ^c |
| 复氧 2 h | 6.84 ± 0.75 ^c | 8.2 ± 0.9 ^c | 61.2 ± 2.1 ^c |
| 复氧 3 h | 11.3 ± 0.8 ^d | 7.8 ± 0.8 ^c | 40.4 ± 1.8 ^d |
| 复氧 4 h | 13.4 ± 1.0 ^d | 7.6 ± 0.8 ^c | 35.5 ± 1.7 ^d |

c: $P < 0.01$, d: $P < 0.001$, 与对照组比较。

表 4. 不同浓度卡托普利处理后 H2/R2 培养基丙二醛、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的含量($\bar{x} \pm s$)

table 4. The contents of MDA, SOD and GSH-PX in H2/R2 culture media after the different catopril delay preconditioning

| 分 组 | 丙二醛 (nmol/L) | SOD (kU/L) | GSH-PX (活力单位) |
|------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 1.95 ± 0.02 | 20.2 ± 1.5 | 124.5 ± 3.3 |
| H2/R2 组 | 6.84 ± 0.75 | 8.2 ± 0.9 | 61.2 ± 2.1 |
| CAP(10^{-4} mol/L) | 5.91 ± 0.42 ^{ac} | 13.9 ± 1.4 ^{ac} | 72.3 ± 2.4 ^c |
| eCAP(10^{-3} mol/L) | 4.22 ± 0.29 ^{ac} | 14.1 ± 1.5 ^{ac} | 84.1 ± 2.3 ^{ac} |
| CAP(10^{-2} mol/L) | 2.94 ± 1.51 ^{ad} | 18.3 ± 1.2 ^{ad} | 119.5 ± 3.1 ^{ad} |

a: $P > 0.05$, c: $P < 0.01$, 与对照组比较; e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$, 与 H2/R2 组比较。

2.3.4 卡托普利与阻断剂共同作用的影响 应用四种阻断剂后, 与对照组相比, 丙二醛增加, 而

SOD 和 GSH-PX 含量减低。与卡托普利组相比, 丙二醛增加, 而 SOD 和 GSH-PX 含量减低; 而与缺氧复氧组相比, 丙二醛含量降低及 SOD、GSH-PX 含量的升高, 差异有统计学意义(表 5, Table 5)。

表 5. 卡托普利与不同阻断剂孵育时培养基中丙二醛、超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的含量($\bar{x} \pm s$)

Table 5. The contents of MDA, SOD and GSH-PX in H2/R2 culture media after the catopril and different inhibitor corpo-rate culture

| 分 组 | 丙二醛 (nmol/L) | SOD (kU/L) | GSH-PX (活力单位) |
|----------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 1.95 ± 0.02 | 20.2 ± 1.5 | 124.5 ± 3.3 |
| H2/R2 组 | 6.84 ± 0.75 ^c | 8.2 ± 0.9 ^c | 61.2 ± 2.1 ^c |
| 卡托普利 | 2.94 ± 1.51 ^{ad} | 18.3 ± 1.2 ^{ad} | 109.5 ± 3.1 ^{ad} |
| CAP + H1 | 5.23 ± 0.47 ^{cej} | 11.1 ± 0.9 ^{cej} | 82.3 ± 2.6 ^{cej} |
| CAP + H2 | 4.59 ± 0.53 ^{cfj} | 9.4 ± 0.8 ^{cfj} | 73.7 ± 2.3 ^{cfj} |
| CAP + H3 | 5.04 ± 0.55 ^{cej} | 10.5 ± 0.9 ^{cej} | 76.3 ± 2.4 ^{cej} |
| CAP + H4 | 5.10 ± 0.61 ^{cej} | 10.8 ± 1.0 ^{cej} | 78.9 ± 2.6 ^{cej} |

a: $P > 0.05$, c: $P < 0.01$, 与对照组比较; e: $P < 0.05$, f: $P < 0.01$, 与 H2/R2 组比较; j: $P < 0.01$, 与卡托普利组比较。

3 讨论

以往研究证明, 缺氧复氧损伤后的 EC 可引起血管痉挛, 血栓和粥样斑块的形成和破裂, 并加剧脏器实质细胞的损伤^[4]。本实验结果发现, 缺氧和缺氧复氧均可以引起 EC 损伤, 并且复氧后损伤更为加剧。随着单纯缺氧及缺氧后复氧时间的延长, EC 逐渐收缩脱落, 细胞的死亡率也逐渐增加, 丙二醛的含量逐渐升高而 SOD、GSH-PX 含量逐渐减低, 这一结果与董建文等^[5]的实验研究相一致。但本实验同时发现, EC 结构和功能损伤程度与缺氧和缺氧后复氧时间具有显著的依赖性, 此点目前国内尚未见相关报道。

单纯缺氧和 H/R 可以使细胞膜的通透性增高, EC 不仅通过增强脂质过氧化反应产生了大量的氧自由基, 而且抗氧化酶的活性降低, 导致 EC 清除氧自由基的能力减弱。在本实验中 GSH-PX 活性和 SOD 活性均降低, 而二者均可以通过清除超氧阴离子, 抑制其它毒性物质的产生来增加 EC 的抗氧化损伤能力, 在 H/R 损伤中起保护作用。

预处理存在有二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。本实验卡托普利晚期预处理的结果证明,卡托普利对单纯缺氧和 H/R 引起的损伤,均具有明显的延迟保护效应,且此作用与卡托普利的浓度具有相关性,在一定的范围内随浓度增加保护作用增强。证明卡托普利具有延迟保护作用,较大剂量卡托普利能够发挥更好的保护效应,具有明显的剂量依赖性。

目前 ACEI 类药物抗 H/R 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(OF_R),同时保护抗氧化酶系统,以及抑制参与 H/R 损伤的内源性活性物质的合成和释放。但晚期预处理保护 EC 抗 H/R 损伤方面的研究,目前国内尚未见相关报道。

本实验在对卡托普利晚期预处理的研究中,应用四种剂后,可以使卡托普利的保护效应部分消失。我们分析 ACEI 发挥抗 H/R 损伤的 EC 延迟保护作用可能涉及以下几个方面,抑制 ACEI 活性,减少缓激肽降解进而增加内源性缓激肽水平, Fujita 等^[6]也通过实验说明了 ACEI 可能通过上调缓激肽水平从而使 NOS 活性增加,提高 NO 的释放,从而达到保护 EC 作用。既往有很多实验均表明蛋白激酶 C 的激活和转位是预处理细胞保护信号转导的共同环节^[1],此作用的发挥目前认为与蛋白激酶 C 激酶使蛋白或离子通道磷酸化相关。本实验中阻断了蛋白激酶 C 途径后,卡托普利的延迟保护作用部分消失也证明了其保护细胞免受缺氧复氧损伤激活了蛋白激酶 C 途径。有实验证明^[7]NOS 在 H/R 损伤中发挥的作用是多方面的,可能涉及细胞间黏附分子的参与,而不仅限于对 NO 合成的调节作用。因而卡托普利也可能是通过激活 NOS 进而介导多种途径达到保护 EC 的作用。而目前认为 NO 抗 H/R 损伤的机制主要与其抗氧化使 EC 免受自由基损伤,维持 EC 完整性和抗中性粒细胞聚集有关。核因子 κ B 是将信息从胞浆传导至胞核引起相应基因表达的重要转录因子。Natanjan 等^[8]的实验证实了在人皮肤微血管内皮细胞 H/R 损伤中核因子 κ B 介导了随后的中性粒细胞的黏附反应。亦有实验^[9]进一步证实

核因子 κ B 可以通过激活蛋白激酶 C 和酪氨酸激酶途径而引起 E 选择素的表达和中性粒细胞的聚集。而 Kapattc 等^[10]则证明了 NO 与核因子 κ B 之间的相关性。

综上,我们认为单纯缺氧和缺氧复氧均可以导致 EC 损伤,具有时间依赖性。卡托普利对 EC 缺氧复氧损伤有延迟保护效应,且具有剂量依赖性。其中缓激肽 β 2 受体,蛋白激酶 C 途径的激活, NOS 活化以及核因子的转录,在卡托普利晚期保护内皮细胞抗 H/R 损伤中均发挥着正面效应。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因素多方面效应,其中仍有其它因素发挥效应,尚有待于我们的进一步研究。

[参考文献]

- [1] Jin ZQ, Chen X, Liu YX, Han PD. Ranipril-induced delayed myocardial protection against free radical injury involves bradykinin B2 receptor-NO pathway and protein synthesis. *Br J Pharmacol*, 1998, **125** (7): 556-562
- [2] 董晓雁, 张杜清, 方向明, 郑民安, 胡继军, 林桂珍, 等. 长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
- [3] 温红梅, 曾进胜, 关永源, 贺华. 实验性高血压所致的基底动脉结构改变及血管紧张素转化酶抑制剂的影. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (5): 392-395
- [4] Lawson CS, Downey JM. Preconditioning: state of the art myocardial protection. *Cardiovasc Res*, 1993, **27** (3): 542-550
- [5] 董建文, 时安云. 超氧化物歧化酶对内皮细胞缺氧复氧损伤的防护作用. *生理学报*, 1997, **49** (6): 644-648
- [6] Fujita N, Marabe H, Yoshida N, Patel DJ, Parell HJ. Inhibition of angiotensin-converting enzyme protects endothelial cell against hypoxia/reoxygenation injury. *Biofactors*, 2001, **11** (4): 257-266
- [7] Burns JA, Stahl GL, Svoboda KK, Sargal A, Ishir S. Hyperbaric oxygen downregulates ICAM-1 expression induced by hypoxia and hypoglycemia; the role of NOS. *Am J Physiol*, 2000, **278** (2): C292-302
- [8] Natanjan R, Fisher BJ, Jones DG. Reoxygenation microvascular endothelium exhibits temporal dissociation of NF- κ B and AP-1 activation. *Free Radic Biol Med*, 2002, **32** (10): 1 033-045
- [9] Kokura S, Rhoads CA, Wolf RE, De Cavanagh EM, Fraga CG, Fender L, et al. NF- κ B signaling in posthypoxic endothelial cells: relevance to E-selectin expression and neutrophil adhesion. *J Vasc Res*, 2001, **38** (1): 47-58
- [10] Kapatt C, Weber C, Wolf DA, Fan C, Yang J, Engelhard JF, et al. Nitric oxide attenuates reoxygenation-induced ICAM-1 expression in coronary microvascular endothelium; role of NF- κ B. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, **29** (10): 2 599-609

(此文编辑 胡必利)