

急性心肌梗死大鼠心脏一氧化氮合酶表达的改变

石姝梅¹, 陆东风², 蒋小峰³, 姚小军², 覃军⁴, 邓志刚²

(1. 顺德职业技术学院医学系, 广东省顺德市 528300; 2. 广州医学院附属第二医院;

3. 南京中医药大学附属第一医院; 4. 株洲市车辆厂职工医院)

[关键词] 分子生物学; 心肌梗死时一氧化氮合酶的表达; 逆转录聚合酶链反应; 急性心肌梗死; 内皮型一氧化氮合酶; 诱导型一氧化氮合酶; 大鼠

[摘要] 目的 通过建立大鼠心肌梗死模型, 观察急性心肌梗死对大鼠心脏内皮型一氧化氮合酶 mRNA 和诱导型一氧化氮合酶蛋白表达的影响。方法 48 只健康成年 SD 大鼠 (体重 200~250 g) 随机分为假手术组和缺血组, 取 1、2、8 和 24 h 四个不同时间点观察。采用开胸结扎冠状动脉左前降支建立心肌缺血模型, 逆转录聚合酶链反应检测大鼠心肌梗死后 1、2 及 24 h 三个时段缺血心肌内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达; 免疫组织化学染色检测冠状动脉结扎后 8 h 缺血心肌诱导型一氧化氮合酶蛋白的表达。结果 冠状动脉结扎后 2 h, 缺血组大鼠缺血心肌组织内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$), 并持续至结扎后 24 h; 结扎后 24 h 组内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达与结扎后 2 h 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。冠状动脉结扎后 8 h, 梗死区存活心肌组织细胞诱导型一氧化氮合酶蛋白大量表达, 而假手术组未见诱导型一氧化氮合酶蛋白表达。结论 正常大鼠心肌组织有内皮型一氧化氮合酶基因表达, 无诱导型一氧化氮合酶蛋白表达。在心肌梗死早期缺血心肌内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达减少。心肌急性缺血刺激早期诱导大鼠缺血心肌组织诱导型一氧化氮合酶蛋白大量表达。

[中图分类号] Q7

[文献标识码] A

The Abnormal Expression of Nitric Oxide Synthase After Myocardial Infarction in Rat Hearts

SHI Shu-Mei¹, LU Dong-Feng², JIANG Xiao-Feng, YAO Xiao-Jun, QIN Jun, and DENG Zhi-Gang

(1. Division of Medicine, Shunde Profession and Technique Institution, Shunde 528300; 2. Division of Cardiovascular Physician, Asia Pacific Heart Center, the Second Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College; China)

[KEY WORDS] Acute Myocardial Infarction; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Inducible Nitric Oxide Synthase; Rats; Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction; Immunohistochemistry

[ABSTRACT] **Aim** To observe the mRNA expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) at different time intervals after acute myocardial infarction in rat hearts and examine the effect of acute myocardial ischemic stimulation on the protein production of inducible nitric oxide synthase (iNOS) in rat hearts. **Methods** Forty-eight healthy Sprague-Dawley rats (200~250 g) were randomly divided into two groups: control group and ischemia group. Myocardial ischemia was induced by the left anterior descending coronary artery (LAD) ligation. Animals with LAD occlusion (ischemia group) were sacrificed at 1 h, 2 h, 8 h, and 24 h after operation. The eNOS gene expression in ischemic myocardium was assessed using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) standardized with β -actin; the iNOS protein in spare cardiomyocytes in the infarcted region after operational 8h was detected using immunohistochemical analysis. **Results** Ligating of LAD for 2 h decreased significantly the eNOS mRNA levels in ischemic myocardial tissue compared with that in controls ($P < 0.05$). The decent of eNOS mRNA level sustained for post-operational 24 h. There is no significant difference in expression level between ligating for 2 h group and ligating for 24 h group. iNOS protein was abundant in the 8 h infarcted heart in spared cardiomyocytes in the infarcted region. Staining of sham-operated rat hearts indicated the absence of iNOS protein. Significant difference in expression levels were observed between ischemia experiment groups and sham-operated control groups ($P < 0.01$). **Conclusion** The eNOS gene expressed in normal rat hearts, whereas there was no iNOS protein expression in normal rat hearts. The expression of eNOS mRNA in ischemic myocardium after myocardial infarction in rats decreased in the early time. Acute myocardial infarction induced iNOS protein levels expressing abundantly in the ischemic myocardium tissue in rats.

[收稿日期] 2004-06-16 [修回日期] 2005-01-20

[基金项目] 广东省卫生厅基金(A2003319)资助

[作者简介] 石姝梅, 医学硕士, 主治医师, 研究方向为冠心病的现代治疗, E-mail 为 meihe1028@hotmail.com。陆东风, 教授, 主任医师, 硕士研究生导师, 擅长冠心病介入治疗并长期从事冠心病基础理论与临床研究。

内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 和诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 作为心血管系统内 NO 生成的两种最重要的同功酶, 它们的活性、合成的变化直接影响到心血管疾病的转归。实验证明, 增加 eNOS 活性及表达可改善大鼠缺血后心肌功能并促进缺血

再灌注后冠状动脉内皮功能恢复^[1]。但研究显示缺血再灌注中一氧化氮生成对心肌功能有损害作用,选择性一氧化氮合酶抑制剂可缩小心肌梗死面积,改善缺血再灌注后大鼠的心功能^[2]。这些明显分歧的结果提示在不同的实验条件中一氧化氮的产生速率不同和不同类型的一氧化氮合酶发生的活性作用不同。研究发现,动脉粥样硬化血管壁的 NOS 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^[3]。因此,研究不同类型的一氧化氮合酶的生成和活性在心血管疾病中的变化必然有利于深入揭示疾病的发生发展机制。本实验主要研究 eNOS mRNA 在早期急性心肌梗死后大鼠心脏组织中的变化,并观察早期缺血刺激对 iNOS 蛋白表达的影响,深入探讨一氧化氮合成的这两种同功酶与急性心肌梗死之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

DH-150 型小动物人工呼吸机(浙江大学医疗仪器厂);RM-6200 型多道生理记录仪(上海医疗仪器厂);紫外分光光度计(Bekman DU 530);DNA 合成仪(Bekman 公司 480 型);凝胶成像系统(UVITECDBT-08)。TRIzol 试剂(Gibco 公司);特异性 eNOS 和 β -actin 引物(Takara Inc 合成);DL-2000 Marker(Takara Inc);SuperScript-one-step 试剂盒(Gibco 公司);兔抗鼠 iNOS 多克隆抗体(Chemicon 公司);ABC Kit(Vector laboratories Inc)。

1.2 动物及分组

健康成年 SD 大鼠 48 只,雌雄不拘,体重 200~250 g,由广州医学院动物实验中心提供。随机分为假手术组($n=24$)和心肌缺血组($n=24$),两组均取术后 1 h、2 h、8 h 和 24 h 四个不同时间点。心肌组织 RNA 提取在手术后 1 h、2 h 及 24 h 取材;心肌切片制作在手术后 8 h 取材。

1.3 冠状动脉结扎

参考文献[4]所述,实验动物用 10% 水合氯醛(2~3 mL/kg)麻醉,气管插管,连接小动物呼吸机,呼吸时比 1:2~3,通气频率 50~60 次/分,潮气量 7~10 mL。左胸第 ⑤ 肋间开胸,暴露心脏,剪开心包,在以无损伤缝针结扎左冠状动脉前降支中、下 1/3 处。采用标准肢体导联记录大鼠心电信号,经多导生理记录仪放大后标记,用示波器作连续心电监护,结扎后心电图上出现 ST 段抬高及心肌局部出现紫绀表示结扎成功。术后逐层缝合关闭胸腔。假手术组处理同前,但不结扎冠状动脉左前降支。各组

均于结扎后 1 h、2 h 及 24 h 脱臼法处死,立即留取梗死区域心肌组织,检测 eNOS mRNA 的表达。

1.4 逆转录聚合酶链反应检测内皮型一氧化氮合酶 mRNA

以冠状动脉结扎线为标志,留取 100 mg 梗死区心肌组织,用 Trizol 试剂提取总 RNA 后,以紫外分光光度计测定其浓度和纯度,样品总 RNA 浓度根据核酸稀释倍数计算;所用 RNA 纯度的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 均在 1.8~2.0 之间。

内标使用大鼠 β -actin 寡聚核苷酸序列,上游 5'-TACAACCTCCITGCAGCTCC-3',下游 5'-GGATCTTCATGAGGTAGTCATTG-3',扩增长度为 650 bp;eNOS 寡聚核苷酸引物序列根据文献[5]设计,上游 5'-CCGGCTGCCACCTGATCCTA-3',下游 5'-AACATGTGTCCITGCTCGAGGCA-3',扩增长度为 340 bp。

取同一样品总 RNA 各 1 μ g,参照文献[6]方法分别用 50 pmol 特异性 eNOS 和 β -actin 引物,采用 SuperScript-one-step 试剂盒以一步法进行逆转录聚合酶链反应(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)。总反应体积为 50 μ L, cDNA 合成和预变性为 46 $^{\circ}$ C 30 min, 94 $^{\circ}$ C 2 min 进行 1 次循环;PCR 扩增为 94 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 57 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 1 min 循环 28 次后,72 $^{\circ}$ C 再延伸 6 min。

取 RT-PCR 产物 15 μ L,加 3 μ L 上样缓冲液,在含 5 mg/L 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶上电泳,80 v、50 min。凝胶成像系统拍摄实验结果,电泳条带用 URV 计算机图像分析软件扫描分析。测定特异性条带的灰度和面积,以各自的灰度与面积的乘积表示 cDNA 的量,再以同一 RT-PCR 反应体系中的 eNOS cDNA/ β -actin cDNA 量的比值表示 eNOS mRNA 的相对强度。

1.5 免疫组织化学染色检测诱导型一氧化氮合酶蛋白

动物于结扎后 8 h 脱臼处死,4% 多聚甲醛固定、脱水后行冰冻切片,染色前以正常马血清封闭切片,使用兔抗鼠多克隆 iNOS 第一抗体(稀释度 1:500),按 ABC 试剂盒说明进行, DAB 显色,苏木素复染核,乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。光学显微镜下观察,阳性结果为胞浆呈现棕黄色颗粒。阴性对照以 PBS 代替第一抗体。计数每张切片梗死区组织内随机 5 个高倍视野(400 倍)阳性颗粒数, iNOS 蛋白的表达以每 5 个高倍视野所见阳性颗粒数表示,取三张切片平均值作统计分析。

1.6 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素

方差分析(one way-ANOVA), 不同时段的两组间比较用 q 检验, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。所有资料均予 SPSS11.0 软件包处理。

2 结果

2.1 急性心肌梗死不同时间点一氧化氮合酶 mRNA 的表达

冠状动脉结扎后 1 h, 与假手术组相比, 缺血组大鼠梗死及梗死周围区域心肌组织 eNOS mRNA 表达无明显变化; 结扎 2 h 时缺血组大鼠梗死及梗死周围区域心肌组织 eNOS mRNA 表达下降 ($P < 0.05$), 并持续至结扎后 24 h; 结扎后 24 h 组 eNOS mRNA 表达与结扎后 2 h 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。见表 1 和图 1(Table 1 and Figure 1)。

表 1. 急性心肌梗死后不同时间大鼠心脏内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达

Table 1. The expression of eNOS mRNA in rat hearts at different time intervals after acute myocardial infarction

时间	假手术组	缺血组
1 h	0.549 ± 0.029	0.527 ± 0.025
2 h	0.522 ± 0.038	0.200 ± 0.036
24 h	0.476 ± 0.028	0.184 ± 0.031

2.2 心肌梗死后诱导型一氧化氮合酶蛋白的表达

大鼠冠状动脉结扎后 8 h, 梗死区及梗死周围区心肌细胞胞浆出现大量 iNOS 蛋白表达; 而假手术组大鼠心肌细胞胞浆则未见 iNOS 蛋白颗粒, 两组间差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2 和图 2(Table 2 and Figure 2)。

表 2. 急性心肌梗死大鼠心肌诱导型一氧化氮合酶蛋白表达

Table 2. The expression of iNOS protein in the ischemic myocardium tissue in rats with acute myocardial infarction ($n = 6$)

分 组	iNOS 蛋白
缺血组	39.86 ± 3.12 ^a
假手术组	0.00 ± 0.00

a: $P < 0.01$, 与假手术组比较。

3 讨论

心血管系统的 eNOS 主要分布于内皮细胞和心肌细胞, 由 eNOS 催化生成的 NO, 可舒张血管, 减少

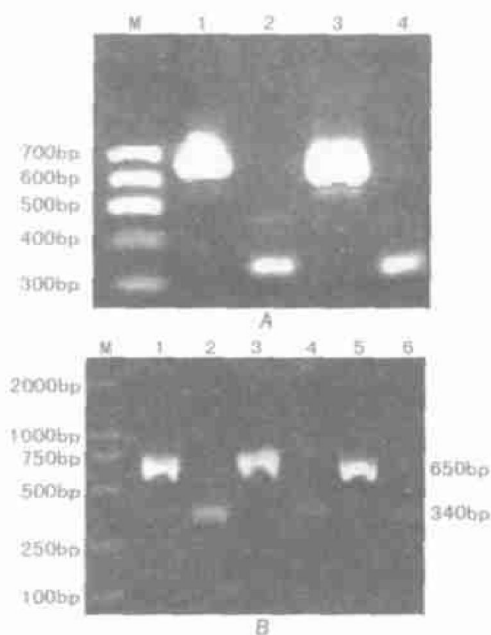


图 1. 冠状动脉结扎 1、2 和 24 h 心肌组织内皮型一氧化氮合酶 mRNA 的表达

M 为 DNA marker; 图 1A 中 1 和 3 为 β -actin cDNA (650 bp), 2 和 4 为内皮型一氧化氮合酶 cDNA (340 bp), 1 和 2 为假手术组, 3 和 4 为缺血 1 h 组; 图 1B 中 1、3 和 5 为 β -actin cDNA (650 bp), 2、4 和 6 为内皮型一氧化氮合酶 cDNA (340 bp), 1 和 2 为假手术组, 3 和 4 为缺血 2 h 组, 5 和 6 为缺血 24 h 组。

Figure 1. The eNOS mRNA expression in ischemic myocardial tissue on postoperative hour 1, 2 and 24

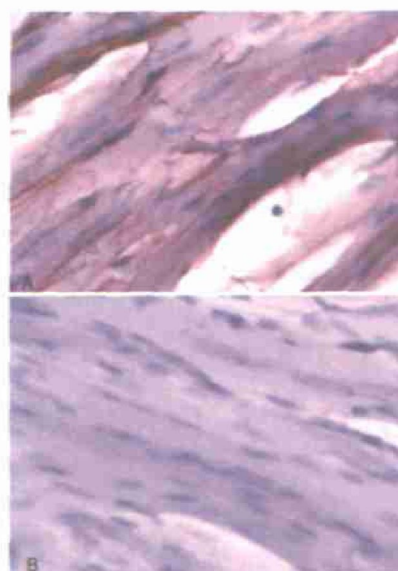


图 2. 大鼠心肌免疫组织化学染色后显微照片 A 为缺血组; B 为假手术组。

Figure 2. Micrographs of rat myocardium immunocytochemically with rabbit antimouse NOS antibody ($\times 400$)

心脏前后负荷而保护心肌;并直接增强心室肌的扩张效应,从而通过左心室 Frank-Starling 调节机制来保持心输出量,对生理和病理状态下的心脏泵血均有益^[1]。Drexler 等^[7]用 RT-PCR 技术测定心脏移植术患者晚期衰竭心脏左心室组织中 eNOS 的基因表达,与正常外伤后死亡的正常心脏相比,衰竭心脏中 eNOS mRNA 是减少的。结合急性心肌梗死后心脏的病理生理变化特点,有理由认为,由于受心肌梗死后心肌细胞和微血管内皮功能受损等因素影响,在心肌梗死早期缺血心脏即有 eNOS 基因表达减少。本研究发现,结扎 2 h 时缺血组大鼠梗死及梗死周围区域心肌组织 eNOS mRNA 表达下降,其表达降低一直持续至结扎后 24 h。有理由认为,纠正内源性一氧化氮合酶基因表达减少、使用增强 eNOS 的活性和合成的药物和生物制剂可有效治疗心肌缺血和心功能不全,有深入研究的价值。

诱导型一氧化氮合酶(iNOS)是胞浆分泌型酶蛋白,可表达于多种免疫活性细胞,如单核细胞、肥大细胞、中性粒细胞等;心血管系统中包括血管内皮、心内膜、心肌和血管平滑肌细胞均存在 iNOS^[8]。iNOS 在正常情况下量微或不出现,只有某些病理情况下才呈诱导性表达^[9]。本实验结果发现,急性心肌缺血大鼠心肌细胞胞浆中出现大量 iNOS 蛋白,但并未检测到假手术组大鼠心肌细胞有 iNOS 蛋白出现,与文献[1,3]报道一致。先前的研究发现心肌梗死后 4 h iNOS mRNA 表达开始升高,8 h 到达最高峰,24 h 回落^[10]。本实验在前期研究的基础上,于冠状动脉结扎后 8 h 取材,检测到急性心肌缺血后 8 h 大鼠心脏 iNOS 高表达,进一步从蛋白水平证实了急性心肌缺血性损伤诱导心肌细胞 iNOS 生成的作用。

目前对 iNOS 基因表达过度可造成心肌免疫性损伤是比较肯定的。Wei 等^[11]发现高表达的 iNOS 除直接损伤大分子 DNA 外,还诱导心肌细胞的凋亡,造成心功能损害。有人使用高度选择的 iNOS 抑

制剂 SMT 治疗冠状动脉结扎后急性心肌梗死大鼠,亦证实有针对地抑制 iNOS 表达可减少心肌细胞丧失,明显缩小心肌梗死面积^[2]。这可能成为将来治疗心脏疾病,包括心肌梗死的一种新策略。

[致谢] 加拿大安大略省伦敦心脏研究中心冯清平博士在动物模型制作上的宝贵指导。广州医学院分子中心实验室刘启才老师帮助设计逆转录聚合酶链反应引物。广州医学院附属第二医院神经科学研究所陈胜强副研究员在分子生物学实验中给予的帮助及其病理科全体医生在免疫组织化学中提供的帮助和指导!

[参考文献]

- [1] Wang QD, Morcos E, Wiklund P, et al. L-arginine enhances functional recovery and Ca^{2+} -dependent nitric oxide synthase activity after ischemia and reperfusion in the rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999, **29** (2): 291-296
- [2] Ding Wang, Xiao-Ping Yang, Yur-He Liu, Oscar A, Carretero, Margot C, et al. Reduction of myocardial infarct size by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *American Journal of Hypertension*, 1999, **12** (2): 175-181
- [3] 李亚俊, 宋剑南, 牛晓红, 王宇辉, 王少君. 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. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 13-16
- [4] Feng Q, Lu X, Jones DL, et al. Increased inducible nitric oxide synthase expression contributes to myocardial dysfunction and higher mortality post-myocardial infarction in mice. *Circulation*, 2001, **104**: 700-704
- [5] Nadaud S, Philippe M, Arnal JF, et al. Sustained increase in aortic endothelial nitric oxide synthase expression in vivo in a model of chronic high blood flow. *Cir Res*, 1996, **79**: 857-863
- [6] 詹昌德, 王庭槐, 潘敬运. 内皮型一氧化氮合酶基因在大鼠心肌细胞和非心肌细胞中的表达. *基础医学与临床*, 1999, **19** (6): 27-31
- [7] Drexler H, Kastler S, Strovel A, et al. Expression, activity and functional significance of endothelial and inducible nitric oxide synthase in the failing human heart. *J Am Cell Cardiol*, 1998, **32** (4): 955-963
- [8] 钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学. 上海: 上海医科大学出版社, 第二版, 1999; 28-30
- [9] 韩梅, 温进坤. 诱导型一氧化氮合酶基因的表达与调控. *中国动脉硬化杂志*, 1998, **6** (2): 166-168
- [10] 陆东风, 覃军. 诱导型一氧化氮合酶基因在心肌梗死大鼠中的表达. *广州医学院学报*, 2003, **31** (3): 55-57
- [11] Wei Song, Xiangru Lu, Feng Q. Tumor necrosis factor- α induces apoptosis via inducible nitric oxide synthase in neonatal mouse cardiomyocytes. *Cardiovascular Research*, 2000, **45**: 595-602

(此文编辑 文玉珊)