

## 谷胱甘肽-S 转移酶 A4-4 基因转染人血管平滑肌细胞及对改善硝酸甘油耐药性的作用

王连生<sup>1</sup>, 杨永珍<sup>2</sup>, 李 杰<sup>3</sup>, 杨志健<sup>1</sup>, 黄 峻<sup>1</sup>

(南京医科大学附属第一医院 1. 心内科, 3. 泌尿外科, 江苏省南京市 210029;

2. 美国 Texas 大学医学分部病理系, Galveston, TX, USA, 77555-0609)

[关键词] 病理学与病理生理学; 谷胱甘肽-S 转移酶; 硝酸甘油; 耐药性; 平滑肌细胞

[摘要] 目的 谷胱甘肽-S 转移酶是一类具有拮抗氧化应激损伤的酶, 谷胱甘肽-S 转移酶对于人血管平滑肌细胞的硝酸甘油耐药性是否具有改善作用尚无报道。本研究探讨谷胱甘肽-S 转移酶 A4-4 基因转染人胎主动脉平滑肌细胞, 观察谷胱甘肽-S 转移酶是否能够改善硝酸甘油耐药性。方法 建立稳定人谷胱甘肽-S 转移酶 A4-4 转染的人胎主动脉平滑肌细胞株, 进行 Western blot、免疫组织化学、MTT 细胞毒理学以及一氧化氮检测。结果 与野生型和空载体转染的人胎主动脉平滑肌细胞组相比, 过表达人谷胱甘肽-S 转移酶 A4-4 的人胎主动脉平滑肌细胞在硝酸甘油作用 24 h 后明显抵抗硝酸甘油造成的细胞损伤 ( $P < 0.05$ ); 经硝酸甘油耐药性方案诱导后, 人谷胱甘肽-S 转移酶 A4-4 转染的人胎主动脉平滑肌细胞组产生的一氧化氮含量高于其他两组 ( $P < 0.01$ )。结论 本研究发现经谷胱甘肽-S 转移酶 A4-4 基因转染的人血管平滑肌细胞可抵抗硝酸甘油作用所致的损伤, 并可能具有改善硝酸甘油耐药性的作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Possible Role of Glutathione S-Transferase A4-4 on the Development of Nitroglycerin Tolerance in Human Vascular Smooth Muscle Cells

WANG Lian-Sheng<sup>1</sup>, YANG Yong-Zhen<sup>2</sup>, Li Jie<sup>3</sup>, YANG Zhi-Jian<sup>1</sup>, and HUANG Jun<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, 3. Department of Urology, First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China; 2. Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, 77555-0609, USA)

[KEY WORDS] Glutathione S-Transferase; Nitroglycerin; Tolerance; Smooth Muscle Cell

[ABSTRACT] **Aim** Glutathione S-transferases (GST), enzymes with antioxidant activity, have been shown to play a protective role against oxidative stress for many cell types including human vascular smooth muscle cells, but their role in nitroglycerin (NTG) tolerance specifically has not been demonstrated. In this study, we tested the role of hGSTA4-4 transfection in conferring resistance to the development of tolerance on human fetal aortic smooth muscle cells (FASMC) treated with NTG. **Methods** A stable transfection of FASMC with cDNA of hGSTA4-4 was established. Western blot analysis, immunocytochemistry assay, MTT cytotoxicity assay and NO assay were used. **Results** FASMC overexpressing with the hGSTA4-4 were significantly more resistance to cytotoxic injury by NTG, assessed at 24 hours ( $P < 0.05$ ). NO release was higher in hGSTA4-transfected cells during NTG nontolerance and tolerance treatment compared with those in wild-type and vector-transfected FASMC ( $P < 0.01$ ).

**Conclusions** This study demonstrates that hGSTA4-4 can protect smooth muscle cells from the cytotoxicity of NTG and may have a role in smooth muscle cell tolerance to NTG.

硝酸甘油(nitroglycerin, NTG)耐药性是临床上一个常见的重要难题, 有关 NTG 耐药性的形成机理迄今尚未完全阐明。最近 Fung<sup>[1]</sup> 提出“硫代硝酸盐氧

化假说”, 认为氧化应激产生的过氧化物增多是导致长期应用 NTG 后产生耐药性和内皮功能紊乱的主要原因。谷胱甘肽-S 转移酶(glutathione S-transferases, GST) 是一类具有抗氧化活性的酶, 可以拮抗氧化应激损伤而对人类许多细胞如血管平滑肌细胞(SMC)产生保护作用<sup>[2]</sup>。近年来也有研究发现体外培养的 SMC 中, GST 酶参与了 NTG 代谢且存在该酶的部分失活现象<sup>[3,4]</sup>。本课题组曾观察到 GSTA4-4 基因转染可以改善氧化应激对鼠内皮细胞的损伤<sup>[2]</sup>, 但 GST 是否对于人血管 SMC 的 NTG 耐药性具有改善作用尚无报道。因此, 本研究的目的是观察

[收稿日期] 2007-09-10 [修回日期] 2008-02-02

[作者简介] 江苏省“六大高峰人才”个人(06-B-043)及南京医科大学科技创新基金资助(CX2004016)

[作者简介] 王连生, 医学博士, 副教授, 副主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化和冠心病的基础与临床研究, 电话 025-83718836-6018, E-mail 为 dirlswang@njmu.edu.cn。杨永珍, 美国 UTMB 博士后, 研究方向为氧化应激与谷胱甘肽-S 转移酶在动脉粥样硬化中的作用。李杰, 留美博士后, 主治医师, 研究方向为谷胱甘肽-S 转移酶与氧化应激在前列腺癌中的作用。

经 GSTA4-4 基因转染的人胎主动脉平滑肌细胞 (fetal aortic smooth muscle cell, FASMC) 对 NTG 作用的影响, 尤其是对 NTG 耐药性的可能作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 人胎主动脉平滑肌细胞培养及 hGSTA4-4 转染

人胎儿主动脉血管平滑肌细胞 (FASMC) 株购自 American Type Culture Collection (ATCC)。DMEM 细胞培养液、青-链霉素溶液、HEPES、HBSS 和胎牛血清 (FCS) 购自美国 Gibco 公司。NTG (浓度为 22 mmol/L) 购自美国 Regent Laboratories。重组 hGSTA4-4 多克隆抗体由 Awasthi 教授实验室惠赠。MTT、DMSO、actin 抗体及其他化学试剂均购自 Sigma 公司。FASMC 用含 4.5 g/L 糖、4 mmol/L L-谷氨酰胺调节 3.7 g/L NaHCO<sub>3</sub> 至含 10% FBS 的 DMEM 培养液在 37℃ 下 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。Lipofectamine Plus (tm) reagent FLTR 细胞运用 p-target hGSTA4-4 基因或空载体进行转染。hGSTA4-4 基因或空载体转染后的 FL-TR 细胞在含 4 600 mg/L 的 G418 中稳定培养 2 周左右后, 继续在含临时添加 2 000 mg/L G418 的 DMEM 培养液中传代培养。

### 1.2 免疫组织化学分析

各组 FASMC 用含 4% 多聚甲醛的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 7.4) 在 40℃ 下固定 1 h, 随后用 0.1% Triton X-100 渗透 30 min, 最后用含 5% 普通羊血清的磷酸钠缓冲溶液室温下孵育 30 min。经过冲洗后, 一抗用鸡抗 hGSTA4-4 (稀释至 1:500, 由美国 Arkansas 大学 Zimniak 博士惠赠)。二抗用羊抗鸡 IgG (稀释至 1:400, 购自 Invitrogen 公司) 标记后在 Alexa fluor 594 波段下观察。

### 1.3 细胞毒理学分析

为了观察不同浓度的 NTG 对 FASMC 的毒性作用及 hGSTA4-4 基因的保护作用, 进行了 MTT 细胞毒理学分析。三组 FASMC (野生型、空载体转染及 hGSTA4-4 基因转染) 经不同浓度的 NTG (10<sup>-2</sup> mol/L 到 10<sup>-5</sup> mol/L) 作用 24 h, 得出各组 FASMC 的存活曲线和使细胞 50% 致死的 NTG 浓度 (LC<sub>50</sub>)。

### 1.4 硝酸甘油耐药性人胎主动脉平滑肌细胞模型的建立

根据文献 [5, 6] 建立了 FASMCNTG 耐药性模型: FASMC 先用较高浓度的 NTG (4.4 × 10<sup>-4</sup> mol/L) 作用 1 h, 冲洗后接着换用较低浓度的 NTG (NTG 1 × 10<sup>-5</sup> mol/L) 作用 10 min。将只用 1 × 10<sup>-5</sup> mol/L NTG 作用

10 min 作为 FASMC 非 NTG 耐药性模型。分别进行空白对照 (不用 NTG)、NTG 耐药性和非耐药性三种 FASMC 模型研究。

### 1.5 一氧化氮含量测定

亚硝酸盐聚集是 NO 合成的一个较敏感指标, 其可运用 NO (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) 试剂盒 (购自 Stressgen) 在细胞培养液中进行测定。根据 NTG 耐药性方案, 三组 FASMC 分别经对照 (DMEM 培养液作用 1 h)、NTG 非耐药及 NTG 耐药条件下取细胞培养液, 运用定量比色法进行亚硝酸盐含量测定。亚硝酸盐浓度计算单位以亚硝酸钠标准溶液吸光度表示 (μmol/10<sup>5</sup> 细胞数)。

### 1.6 统计学分析

用 SPSS 11.5 软件进行统计分析, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用 ANOVA 检验或成组 *t* 检验, 组内前后比较采用配对 *t* 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人胎主动脉平滑肌细胞过表达谷胱甘肽 S-转移酶 A4-4

通过 Western blot 分析可检测到 FASMC 经 hGSTA4-4 基因转染后可过表达 hGSTA4-4 (分子量为 25 kDa), 而野生型与空载体转染型 FASMC 中不能检测到 hGSTA4-4 的表达 (图 1)。免疫组织化学分析结果显示, FASMC 经 hGSTA4-4 基因转染后可 hGSTA4-4 阳性率达 61.5% ± 2.9%, 而野生细胞型与空载体转染细胞型 hGSTA4-4 的阳性表达率分别为 10.1% ± 2.2% 和 10.7% ± 3.1% (图 2)。

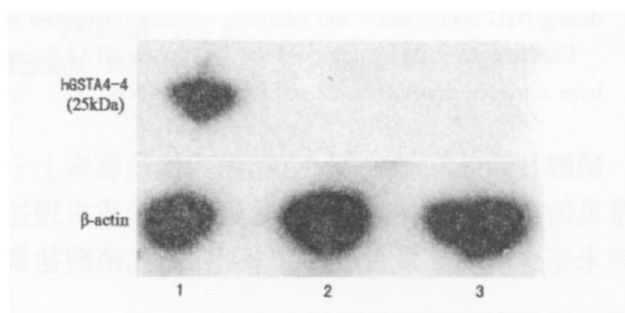


图 1. Western blot 分析结果 1 为 hGSTA4-4 转染细胞型, 2 为野生细胞型, 3 为空载体转染细胞型。

### 2.2 谷胱甘肽-S 转移酶 A4-4 基因转染的细胞毒性

硝酸甘油 (NTG) 作用 24 h 后, 与野生型及空载体转染型相比, hGSTA4-4 基因转染的 FASMC 更能抵抗高浓度 NTG 对 FASMC 的损伤, hGSTA4-4 基因

转染的 FASMC 的  $LC_{50}$  明显高于其他两组( $P < 0.05$ , 图 3)。

### 2.3 人胎主动脉平滑肌细胞一氧化氮含量的变化

在 NTG 非耐药情况下,野生型、空载体转染型及 hGSTA4-4 基因转染细胞型均出现 NO 释放量明显增加。在 NTG 耐药情况下,野生型与空载体转染型 FASMC 产生的 NO 含量明显降低( $P < 0.01$ ),可是 hGSTA4-4 转染 FASMC 产生的 NO 含量仍然较高(与 NTG 非耐药情况下相比 NO 含量变化不大)。而且在 NTG 耐药情况下,与野生型与空载体转染型 FASMC 相比, hGSTA4-4 基因转染过的 FASMC NO 含量显著较高( $P < 0.01$ ; 见表 1)。

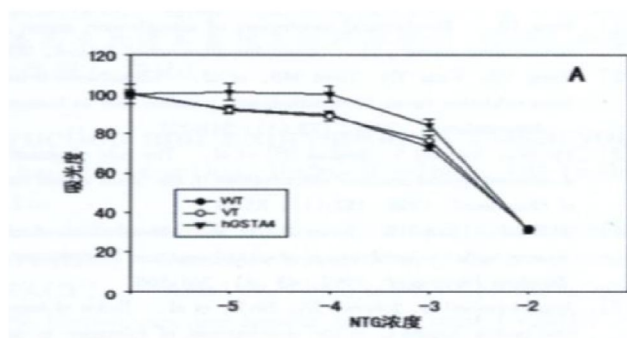


图 3. MTT 细胞毒理学分析 A 显示不同浓度 NTG 作用 24 h 后,在 570 nm 波段测得的 WT、VT 或 hGSTA4-4 基因转染的 FASMCMTT 结果, B 为  $LC_{50}$ 。WT 为野生细胞型, VT 为空载体转染细胞型, hGSTA4 为 hGSTA4-4 转染细胞型。

表 1. hGSTA4 转染对 NTG 耐药性诱导的 NO 含量影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $\mu\text{mol}/10^5$  细胞数)

分 组	对照	NTG 非耐药时	NTG 耐药时
WT	$0.188 \pm 0.002$	$0.46 \pm 0.026$	$0.180 \pm 0.002^b$
VT	$0.187 \pm 0.002$	$0.46 \pm 0.025$	$0.178 \pm 0.002^b$
hGSTA4	$0.191 \pm 0.003$	$0.53 \pm 0.030$	$0.45 \pm 0.028^a$

a 为  $P < 0.01$ , 与 WT 或 VT 组比较, b 为  $P < 0.01$ , 与 NTG 非耐药时比较。WT 为野生细胞型, VT 为空载体转染细胞型, hGSTA4 为 hGSTA4-4 转染细胞型。

## 3 讨论

有机硝酸酯类药物如 NTG 是心血管领域中应用较广泛的药物,虽然治疗心绞痛急性发作有效,但连续应用 24~72 h 或频繁给药极易产生耐药性,临床上表现为抗心肌缺血效应和血液动力学效应迅速减弱或完全消失<sup>[7]</sup>,这种 NTG 耐药性尤好发于 2 型糖尿病、吸烟及缺血性心脏病等情况。尽管 NTG 的作用机制及其耐药性发生机理尚不完全清楚,谷胱甘肽-S 转移酶(GST)及其同工酶为人体组织中的主要的抗氧化酶类,国内针对 GST 基因多态性和吸烟

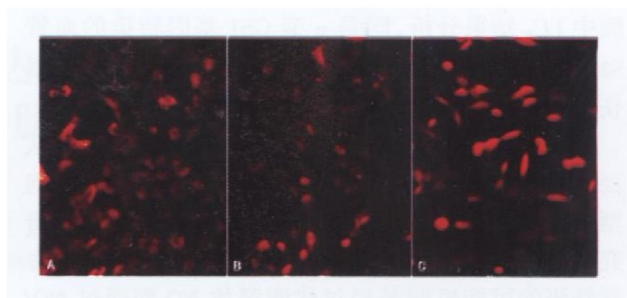
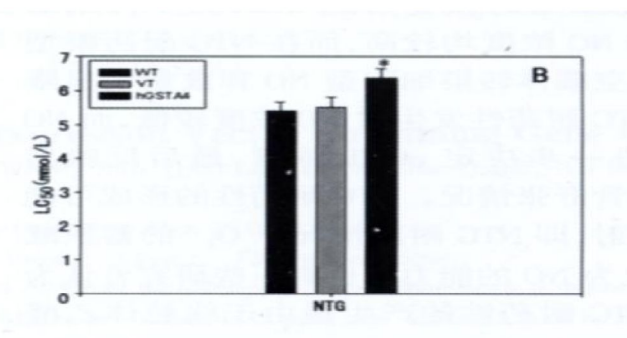


图 2. hGSTA4-4 在 FASMC 中的表达 A 为野生细胞型, B 为空载体转染细胞型, C 为 hGSTA4-4 转染细胞型。



与癌症易感性关系等方面作了一些研究<sup>[8]</sup>。根据 GST 的不同特性,主要分为  $\alpha$ 、 $\mu$ 、 $\pi$ 、 $\theta$  四型,不同组织中它们的分布各不相同,其中在血管中  $\alpha$  型 GST 含量较高。近年来有研究发现体外培养的血管 SMC 中, GST 参与了 NTG 代谢且存在该酶的部分失活现象<sup>[3,4]</sup>。目前已经证明  $\alpha$  型 GST 基因转染可以通过改善氧化应激而对许多细胞如血管内皮细胞产生保护作用<sup>[2,9]</sup>,因此认为 GST 及其同工酶的血管抗氧化功能可能主要通过  $\alpha$  型 GST 发挥作用<sup>[2]</sup>。

本研究中,将 hGSTA4-4 基因成功转染 FASMC 后, FASMC 表达出较高的 GST 酶活性。野生型或空载体转染的 FASMC 胞质中 GSTA4-4 阳性率较低,而 hGSTA4-4 基因成功转染的 FASMC 胞质中 GSTA4-4 阳性率较高。高浓度 NTG 可造成 FASMC 的损伤,而过表达 GSTA4-4 的 FASMC 显示出对 NTG 造成的毒性损伤的抵抗作用,即  $\alpha$  型 GST(GSTA4-4)基因转染具有保护 FASMC 免于受 NTG 的毒性损伤作用。本课题组既往研究显示  $\alpha$  型 GST 基因转染可通过减少氧化应激而对许多细胞产生重要的保护作用<sup>[12]</sup>。本研究结果发现 GSTA4-4 基因转染可产生防御机制

保护长期运用 NTG 对 FASMC 的损伤。根据 MTT 检测中  $LC_{50}$  结果分析, 同是  $\alpha$  型 GST 基因转染的血管 SMC 较内皮细胞更能抵抗高浓度 NTG 造成的损伤<sup>[2,6]</sup>。

本研究成功建立了 FASMCNTG 耐药性模型, 从而为在野生、空载体转染及 hGSTA4-4 转染三种细胞型中进行 NTG 耐药性和非耐药性体外细胞模型研究建立了基础。在细胞水平, 目前认为 NTG 引起血管舒张的可能机制是经过代谢释放 NO 而通过 NO/cGMP 信号通路发生作用的<sup>[10]</sup>, 由于 NTG 转化为具有血管活性作用的 NO 浓度降低是形成 NTG 耐药性的主要机制<sup>[6]</sup>。本研究发现, NTG 作用下非耐药时三种 FASMC 型及耐药模型时经 hGSTA4-4 转染的 FASMC 释放的 NO 浓度均较高, 而在 NTG 耐药模型下的野生型及空载体转染细胞型 NO 释放量明显降低。证实了 NTG 耐药性发生时 NO 浓度较低, 而 NO 的浓度高低进一步决定 cGMP 浓度, 最后反映出 NTG 诱导的血管舒张情况。NTG 耐药性的形成可能为一种生物反射, 即 NTG 耐药情况下  $O_2^-$  的蓄积减弱了 NTG 转化为 NO 的能力。也有一些研究者认为在体情况下 NTG 耐药性的产生是由于线粒体乙醛脱氢酶失活等遗传原因导致 NTG 代谢障碍从而释放 NO 浓度较低<sup>[11]</sup>。本研究未作与线粒体乙醛脱氢酶失活相关方面的检测, 本研究结果显示 GSTA4-4 基因转染的 FASMC 可能具有改善人血管 SMC 的 NTG 耐药性作用。

氧化应激可通过诱导血管内皮细胞凋亡形成动脉粥样硬化<sup>[12]</sup>。NTG 可产生多种氧化还原相关的 NO 形式, 其中包括过氧化物阴离子 ( $ONOO^-$ )<sup>[12]</sup>。临床上长期 NTG 治疗可导致血管内皮细胞中过氧化物蓄积。我们以往的研究发现高浓度 NTG 作用时间较长可导致  $ONOO^-$  蓄积从而诱导鼠内皮细胞凋亡, 而 GSTA4-4 基因转染内皮细胞后可抑制  $ONOO^-$  的形成<sup>[6]</sup>。Miller 等<sup>[13]</sup>认为由于氧化应激增加不仅导致内皮细胞中  $O_2^-$  水平升高, 而且在整个动脉粥样硬化血管壁中 SMC 也存在  $O_2^-$  水平的升高。涂永生等<sup>[14]</sup>研究发现活性氧分子过氧化氢可刺激血管 VSMC 的增殖, 而普罗布考是具有强抗氧化活性的降脂药, 其可抑制  $H_2O_2$  刺激大鼠 SMC 增殖。盛林等<sup>[15]</sup>也报道过普罗布考可抑制血管 SMC 的增殖并探讨了作用机制。我们推测 NTG 耐药情况下也可能导致 SMC 氧化应激增加, 而 GST 同样具有很强的抗氧化活性, 因此 GSTA4-4 基因转染 FASMC 可减

轻 NTG 耐药所致的氧化应激损伤。

综上所述, 本研究显示经 GSTA4-4 基因转染的 FASMC 后可高表达 GST 酶活性, 可保护 FASMC 抵抗 NTG 引起的细胞损伤。本研究不能证明人 GSTA4-4 涉及 NTG 生物转换过程中的酶代谢作用, 而只表明 GSTA4-4 酶可能提高了 NTG 转化为 NO 的作用。GSTA4-4 基因转染可能对人血管 SMC 的 NTG 耐药性具有改善作用。

[致 谢] 本研究部分研究结果是作者作为访问学者在美国时完成, 在此特向帮助过我的 UTMB 同事们表示衷心的感谢, 尤其感谢 Paul J. Boor 教授的大力帮助!

#### [参考文献]

- [1] Fung HL. Biochemical mechanism of nitroglycerin action and tolerance: is this old mystery solved [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, **44**: 67-85.
- [2] Yang YZ, Yang YS, Trent MB, et al. Glutathione S-transferase A4-4 modulates oxidative stress in endothelium: possible role in human atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2004, **173** (3): 211-221.
- [3] He NG, Awasthi S, Singhal SS, et al. The role of glutathione S-transferases as a defense against reactive electrophiles in the blood vessel wall [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, **152** (1): 83-89.
- [4] Hill KE, Hunt RW, Jones R, et al. Metabolism of nitroglycerin by smooth muscle cells. Involvement of glutathione and glutathione S-transferase [J]. *Biochem Pharmacol*, 1992, **43** (3): 561-566.
- [5] bou-Mohamed G, Johnson JA, Jin L, et al. Roles of superoxide, peroxynitrite, and protein kinase C in the development of tolerance to nitroglycerin [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, **308** (1): 289-299.
- [6] Wang LS, Yang YZ, Dwivedi S, et al. Manipulating glutathione S-transferases may prevent the development of tolerance to nitroglycerin [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2006, **6** (2): 131-44.
- [7] Munzel T, Daiber A, Mulsch A. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance [J]. *Circ Res*, 2005, **97** (7): 618-628.
- [8] 吴茜, 陈金霞, 陈晚先, 等. 谷胱甘肽 S-转移酶 T1 基因多态、吸烟与大肠腺癌的关联[J]. 咸宁学院学报(医学版), 2005, **19** (3): 171-173.
- [9] Hayek T, Stephens JW, Hubbard CS, et al. A common variant in the glutathione S-transferase gene is associated with elevated markers of inflammation and lipid peroxidation in subjects with diabetes mellitus [J]. *Atherosclerosis*, 2006, **184** (2): 404-412.
- [10] Schulz E, Tsimingias N, Rinze R, et al. Functional and biochemical analysis of endothelial (dys) function and NO/cGMP signaling in human blood vessels with and without nitroglycerin pretreatment [J]. *Circulation*, 2002, **105** (10): 1170-1175.
- [11] Chen ZQ, Stamler JS. Bioactivation of nitroglycerin by the mitochondrial aldehyde dehydrogenase [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2006, **16** (8): 259-265.
- [12] Lee WI, Fung HL. Mechanism-based partial inactivation of glutathione S-transferases by nitroglycerin: tyrosine nitration vs. sulfhydryl oxidation [J]. *Nitric Oxide*, 2003, **8** (2): 103-110.
- [13] Miller FJ, Guterman DD, Rios CD, et al. Superoxide production in vascular smooth muscle contributes to oxidative stress and impaired relaxation in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 1998, **82** (12): 1298-305.
- [14] 涂永生, 严鹏科, 朱炳阳, 等. 普罗布考抑制过氧化氢刺激大鼠动脉平滑肌细胞增殖的机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, **15** (9): 678-682.
- [15] 盛林, 马承恩, 郝玉林, 等. 普罗布考抑制大鼠血管平滑肌细胞周期素 D1 蛋白表达和 G1<sup>→</sup>S 转换[J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, **13** (6): 676-680.

(此文编辑 陈临溪)