

[文章编号] 1007-3949(2010)18-05-0371-04

• 实验研究 •

毒死蜱下调内皮型一氧化氮合酶的表达降低了脑基底动脉内皮依赖性舒张功能

刘 锋¹, 周寿红², 梁江红¹

(1 南华大学附属第二医院神经内科, 湖南省衡阳市 421001; 2 南华大学医学院生理学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 毒死蜱; 基底动脉; 内皮细胞; 一氧化氮; 内皮型一氧化氮合酶

[摘要] 目的 探讨毒死蜱对血管舒张功能的影响及其可能的机制。方法 采用离体血管灌流方法, 观察不同浓度的毒死蜱预处理对新西兰兔脑基底动脉环对乙酰胆碱和硝普钠介导的舒张反应以及血管组织中一氧化氮含量的影响。同时, 观察不同浓度的毒死蜱预处理对培养的人脐静脉内皮细胞培养液中一氧化氮含量和内皮型一氧化氮合酶表达的影响。结果 毒死蜱 (0.001~0.1 mmol/L) 预处理 30 min 浓度依赖性地抑制乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张反应和降低了血管组中一氧化氮的含量, 而对硝普钠引起的非内皮依赖性舒张反应没有影响。阿托品预处理则不影响毒死蜱的作用。毒死蜱 (0.001~0.1 mmol/L) 预处理 30 min 浓度依赖性降低了培养液中一氧化氮的含量和内皮型一氧化氮合酶的表达。结论 毒死蜱能降低血管内皮依赖性舒张反应, 其机制可能与毒死蜱下调内皮型一氧化氮合酶的表达, 减少一氧化氮的生成, 损伤内皮细胞的功能有关。

[中图分类号] R994.6

[文献标识码] A

Chlorpyrifos Downregulates Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression and Decreases Endothelium Dependent Relaxation of Basilar Arteries

LU Feng¹, ZHOU ShouHong², and LIANG JiangHong¹

(1 Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China; 2 Department of Physiology, University of South China, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Chlorpyrifos, Basilar Artery, Endothelial Cell, Nitric Oxide, Endothelial Nitric Oxide Synthase

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of chlorpyrifos on relaxation function of artery and explore the potential mechanism. **Methods** Organ baths in basilar aortic rings of New Zealand rabbits were used to investigate the effect of different concentration chlorpyrifos on vascular relaxation function induced by acetylcholine (ACh) and sodium nitroprusside (SNP). The level of nitric oxide (NO) was measured in basilar artery and cultured human umbilical vein endothelial cells. The expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was detected by Real-time PCR and Western blot in cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Results** Endothelium dependent relaxation and NO content of rabbits basilar aortic rings were decreased in concentration-dependent manner by pre-treatment with chlorpyrifos (0.001 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.1 mmol/L) for 30 minutes. But chlorpyrifos had no effect on SNP-induced endothelium-independent relaxation of basilar aortic rings. Pre-treatment with atropine had no influence on the action of chlorpyrifos. The level of NO in culture medium and the expression of eNOS in HUVEC were decreased by pre-treatment with chlorpyrifos (0.001 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.1 mmol/L) for 30 minutes in concentration-dependent manner. **Conclusion** Chlorpyrifos decreases endothelium dependent relaxation of basilar aortic rings, which the mechanism may relate to down-regulating of eNOS and decrease of NO induced by chlorpyrifos.

有机磷酸酯 (organophosphorous ester, OP) 类杀虫剂在全球广泛使用, 除了用作农业杀虫剂外, 也用于环境的灭虫、灭蚊等。OP 类杀虫剂中毒一个基本的原理是抑制胆碱酯酶, 导致乙酰胆碱的堆积, 然而 OP 类杀虫剂的非胆碱酯酶途径的作用也越来越受

到人们的关注^[1,2]。有文献报道长期与 OP 类杀虫剂接触与心血管疾病的发生密切相关^[3,4]。研究发现长期在温室里喷洒农药的花工以及长期用农药浸泡羊毛的牧民增加了患心血管疾病的风险^[5]。参加过海湾战争的士兵, 因在海湾战争期间长时间接触 OP 类杀虫剂, 出现了伴有心血管和神经系统损伤的海湾战争综合征^[6]。OP 类杀虫剂敌百虫在没有引起明显临床中毒症状的情况下加速了高脂诱导的动脉粥样硬化的形成^[7]。OP 类杀虫剂能影响血管的舒缩功能改变外周血管对血流的阻力, 而这种

[收稿日期] 2009-12-18

[修回日期] 2010-02-12

[作者简介] 刘锋, 硕士, 副教授, 研究方向为神经内科学, E-mail 为 liu661017@163.com。周寿红, 博士, 讲师, E-mail 为 zhoushouhong@126.com。

作用是非胆碱脂酶依赖的^[8,9]。然而 OP 类杀虫剂对脑血管舒张功能和脑血流有何影响还未见文献报道。毒死蜱 (chlorpyrifos CPF), 又名乐斯本, 是一种高效广谱、中等毒性的有机磷酸酯类农药。本研究拟观察毒死蜱对新西兰兔脑基底动脉舒张功能的影响以及与一氧化氮的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

毒死蜱 (chlorpyrifos CPF) 分析纯为美国陶氏益农公司产品, 毒死蜱溶解于 DMSO 中。RPM 11640 培养基 (美国 GIBCO 公司), 胎小牛血清 (杭州四季青生物)。兔抗人内皮型一氧化氮合酶单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (Santa Cruz 公司)。NO 检测试剂盒购自南京建成生物工程公司。BL420F 生物信号采集处理系统 (成都泰盟); 雄性新西兰兔 (南华大学动物部提供)。实时定量 PCR 系统 (美国 AB 公司)。304-人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cell HUVEC) 株 (中南大学细胞中心提供)。

1.2 离体动脉环实验设计与分组

实验分为以下各组: 对照组和不同浓度毒死蜱 (0.0001、0.001、0.01 mmol/L 和 0.1 mmol/L) 组。阿托品预处理 30 min 使用在一些实验中。各浓度的 CPF 与血管环的孵育时间均为 30 min, 孵育后分别检测乙酰胆碱 (acetylcholine ACh) 介导的内皮依赖性舒张反应 (endothelium dependent relaxation, EDR) 和硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP) 介导的非内皮依赖性舒张反应 (non-endothelium dependent relaxation, NEDR)。

1.3 离体动脉环的制备和血管张力的测定

参考文献 [10] 的方法, 新西兰兔通过快速击打头部将其击晕后, 迅速打开颅腔, 剥取基底动脉, 放入预冷的 KH 液中, 清除周围结缔组织, 取长约 3 mm 的血管环, 固定于加有 KH 液的恒温 (37℃) 浴槽中, 持续通入含 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体。通过 BL420F 生物信息采集处理系统记录血管张力的变化。1.0 g 前负荷下平衡 1 h, 每 15 分钟换液一次。稳定后用 100 mmol/L 的 KCl 预刺激, 以激发最大收缩, 检查血管活性。1 μmol/L 的新福林 (L-phenylephrine PE) 预收缩后, 用 10 μmol/L 的 ACh 舒张胸主动脉以检查血管内皮的完整性。各组新西兰兔脑基底动脉环分别进行 ACh 和 SNP 介导的舒张反应测定。动脉舒张反应以血管舒张张力占 PE (10⁻⁶

mol/L) 预收缩时引起的最大收缩张力的百分比表示。计算最大舒张百分率 (Emax)。

1.4 人脐静脉内皮细胞的培养与分组

304-HUVEC 用含 10% 胎牛血清的 RPM 11640 培养液培养, 待细胞长至 80% ~ 90% 融合度时, 更换培养液, 加入溶解有 CPF 的 DMSO, 使 CPF 的终浓度为 (0.0001、0.001、0.01 mmol/L 和 0.1 mmol/L), 孵育时间均为 30 min。收集细胞培养液检测 NO₂⁻ 的浓度, 以此代表 NO 的含量, 收集细胞用于内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 表达的检测。

1.5 血管组织中和细胞培养液中 NO 含量的测定

NO 化学性质活泼, 在体内代谢很快转为 NO₂⁻ 和 NO₃⁻。在镉盐与酸性条件下, NO₃⁻ 转变为 NO₂⁻, NO₂⁻ 与 Griess 试剂产生颜色反应, 通过显色深浅测定 NO₂⁻ 浓度近似代表 NO 水平的高低。取长约 4 cm 的血管环, 按上述实验分组, 每组 6 个血管环 (分别来自 6 只新西兰兔), 与不同浓度的 CPF 孵育 30 min 后取出血管环, 滤纸上吸干水份, 称重, 用电动玻璃匀浆器制成 10% 组织匀浆, 匀浆离心 (3 kr/min, 10 min) 后, 取上清液, 保存于 -20℃ 冰箱。取不同处理组的血管匀浆的上清液和细胞培养液 100 μL, 按试剂盒说明分别检测 NO₂⁻ 的浓度, 以此代表 NO 的含量。

1.6 实时定量 PCR 检测 eNOS 的 mRNA 表达水平

按 Trizol 试剂盒说明书提取收集培养的 HUVEC 的总 RNA。以提取的总 RNA 为模板, 按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录反应, 合成 cDNA 第一链, -20℃ 保存。选取 cDNA 样品进行 10 倍梯度稀释, 分别进行 Real-time PCR 反应, 反应体系 25 μL, 含 Hot Star Taq Master Mix (2 ×) 12.5 μL, PCR 上下游引物及探针 (10 μmol/L) 各 0.3 μL, cDNA 4 μL, 灭菌去离子水补足 25 μL。PCR 扩增程序为: 95℃ 10 min 激活 Hot Star Taq DNA 合成酶, 扩增循环 94℃ 40 s, 60℃ 70 s 共 50 个循环。引物和探针序列由上海生物工程有限公司合成, eNOS 引物: 上游: 5'-AGCCAGTGTGTATCGAG-3', 下游: 5'-ACGTCCATCGACTTGATGA-3'; ABCA1 探针: 5'-FAM-CACGCACTGAGGTATAGTGG-TAMRA-3'; β-actin 引物: 上游: 5'-CGTACATCATGCACGACCG-3', 下游: 5'-CAGCCTGTCAGCAATGCTAG-3'; β-actin 探针: 5'-FAM-AGGATCTACAGTCCAGTCGT-TAMRA-3'^[11]。

1.7 免疫蛋白印迹检测 eNOS 蛋白表达

收集的细胞加入细胞裂解液中裂解后, 4℃, 12

kr/min 离心 10 min, 吸出上清液, 用 BAC 法进行蛋白定量。同样提取细胞的总蛋白。取 50 μ g 蛋白质样本加入 2 \times SDS 凝胶加样缓冲液中, 煮沸使蛋白质变性。用 6% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离, 60~100 mA 1 h 将蛋白质用半干转膜仪转移至 PVDF 膜上, 丽春红染色观察转移效果, 并确定蛋白质分子质量标准位置。5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后, 加入 1:150 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 5~10 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育 4~8 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 5~10 min。然后用蛋白质印迹荧光检测试剂盒显示于 X 光片, 显影、定影后用凝胶图像分析系统对胶片扫描, 进行半定量分析^[12]。

1.8 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析及 *t* 检验, 用 SPSS 14.0 统计软件完成, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毒死蜱对乙酰胆碱介导的新西兰兔脑基底动脉环舒张反应的影响

与对照组相比, CPF (0.001、0.01 和 0.1 mmol/L) 处理组浓度依赖性地降低了 ACh 诱导的 EDR 反应 ($P < 0.05$), 表现为浓度-舒张效应曲线右下移。M 受体阻断剂阿托品没有影响 CPF (0.1 mmol/L) 的作用。CPF (0.0001 mmol/L) 组与正常对照组比较差异没有显著性 (图 1)。与对照组相比, CPF (0.001、0.01、0.1 mmol/L) 处理显著降低了 ACh 诱导的最大舒张反应 (E_{\max}) ($P < 0.05$, 表 1)。M 受体阻断剂阿托品没有影响 CPF (0.1 mmol/L) 对最大舒张反应的影响。CPF (0.001 mmol/L) 组与正常对照组比较, 最大舒张反应差异没有显著性。

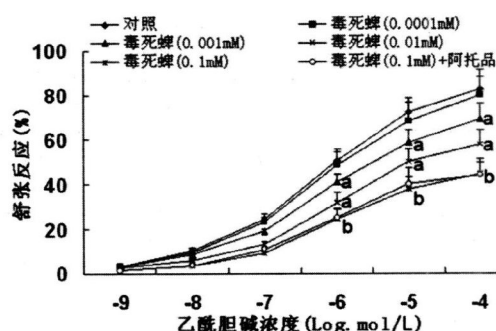


图 1 毒死蜱对乙酰胆碱介导的新西兰兔脑基底动脉环舒张反应的影响以及阿托品的影响 a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

表 1 毒死蜱对乙酰胆碱和硝普钠介导的新西兰兔脑基底动脉环最大舒张反应的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	乙酰胆碱介导	硝普钠介导
对照组	82.74% \pm 8.44%	87.21% \pm 14.31%
毒死蜱 (0.0001 mmol/L) 组	79.94% \pm 8.04%	86.84% \pm 10.19%
毒死蜱 (0.001 mmol/L) 组	69.12% \pm 7.34% ^a	88.16% \pm 11.33%
毒死蜱 (0.01 mmol/L) 组	57.84% \pm 6.17% ^a	86.03% \pm 12.41%
毒死蜱 (0.1 mmol/L) 组	44.39% \pm 5.17% ^b	86.42% \pm 11.63%
毒死蜱 (0.1 mmol/L) + 阿托品组	44.27% \pm 6.94%	85.41% \pm 11.64%

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.2 毒死蜱对硝普钠介导的新西兰兔脑基底动脉环舒张反应的影响

离体血管环分别与含不同浓度的 CPF 孵育 30 min 后, 分别检测 SNP 引起的非内皮依赖性舒张反应, 各组基底动脉环对 SNP 介导的舒张反应和最大舒张反应差异均没有显著性 (图 2 和表 1)。

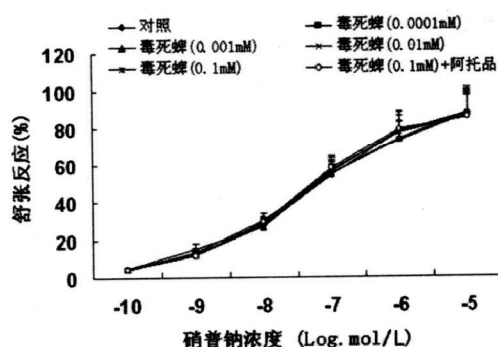


图 2 毒死蜱对硝普钠介导的新西兰兔脑基底动脉环舒张反应的影响

2.3 毒死蜱对血管组织和人脐静脉内皮细胞培养液中一氧化氮含量的影响

取制备好的上清液, 按照试剂盒说明检测上清中 NO_2^- 的浓度, 以此代表 NO 的含量。CPF (0.001、0.01、0.1 mmol/L) 浓度依赖性地降低了基底动脉组织和内皮细胞培养液中 NO 的含量 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 毒死蜱对新西兰兔脑基底动脉和人脐静脉内皮细胞中一氧化氮含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	脑基底动脉 ($\mu\text{mol/g}$)	细胞培养液 ($\mu\text{mol/L}$)
对照组	7.03 \pm 0.94	22.64 \pm 5.37
毒死蜱 (0.0001 mmol/L) 组	6.87 \pm 0.81	21.49 \pm 3.84
毒死蜱 (0.001 mmol/L) 组	5.02 \pm 0.69 ^a	15.15 \pm 3.24 ^a
毒死蜱 (0.01 mmol/L) 组	3.55 \pm 0.52 ^a	7.94 \pm 1.31 ^a
毒死蜱 (0.1 mmol/L) 组	1.23 \pm 0.21 ^b	2.65 \pm 0.54 ^b

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.4 毒死蜱对培养的人脐静脉内皮细胞中 eNOS mRNA 和蛋白表达的影响

与对照组相比,不同浓度 CPF 处理 HUVEC 后, HUVEC 中 eNOS 的 mRNA 和蛋白表达均显著降低,且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$, 图 3 和表 3)。

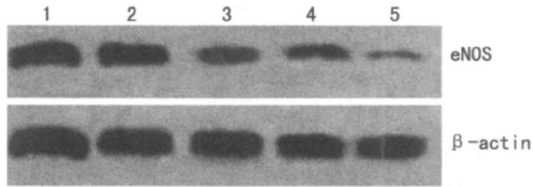


图 3 毒死蜱对培养的人脐静脉内皮细胞中 eNOS 蛋白表达的影响 1 为对照组, 2~5 分别为 0.0001~0.1 mmol/L 毒死蜱组。

表 3 毒死蜱对培养的人脐静脉内皮细胞中 eNOS mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	eNOS mRNA	eNOS 蛋白
对照组	0.65 ± 0.08	0.54 ± 0.07
毒死蜱 (0.0001 mmol/L) 组	0.63 ± 0.07	0.55 ± 0.09
毒死蜱 (0.001 mmol/L) 组	0.45 ± 0.04 ^a	0.41 ± 0.05 ^a
毒死蜱 (0.01 mmol/L) 组	0.31 ± 0.04 ^a	0.28 ± 0.02 ^a
毒死蜱 (0.1 mmol/L) 组	0.16 ± 0.02 ^b	0.14 ± 0.03 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

3 讨论

本实验发现有机磷酸酯类杀虫剂毒死蜱浓度依赖性地降低乙酰胆碱介导的血管内皮依赖性舒张反应,但对硝普钠引起的非内皮依赖性舒张反应没有明显的影响。阿托品不能对抗毒死蜱对血管内皮依赖性舒张反应的抑制作用,说明毒死蜱对血管环内皮依赖性舒张反应的抑制作用不是通过 M 受体的途径。我们检测了血管组织中 NO_2^- 的浓度,以此代表血管组织中 NO 的含量,实验发现 CPF 降低了血管组织中的 NO 含量。说明毒死蜱对血管内皮依赖性舒张反应的抑制作用可能是通过减少 NO 产生实现的。然而关于毒死蜱对 NO 生成的影响有一些矛盾的结果, Saulsbury 等^[13] 研究发现毒死蜱能增加少突胶质细胞中 NO 的产生导致氧化应激,而 NOS 的抑制剂能部分的拮抗毒死蜱的作用,这些矛盾的结果可能与组织细胞特异性有关,详细的机制还有待进一步的研究。

内皮细胞中 NO 是以 L-精氨酸为底 NOS 的作用下产生的。内皮细胞中 NOS 主要有两种类型,分别是内皮型和诱导型,其中内皮型在内皮细胞 NO 的产生中起重要作用^[14,15]。本实验结果显示,毒死

蜱浓度依赖性地降低了内皮细胞培养液中 NO 的水平,同时也浓度依赖性地降低 eNOS 的表达。这些结果表明毒死蜱抑制血管内皮依赖性舒张反应可能是通过下调 eNOS 的表达,减少 NO 的产生而实现的。但其详细的机制仍有待进一步的研究。

本实验结果提示有机磷酸酯类接触可降低脑血管内皮依赖性舒张功能,从而影响脑血流量,该结果为人们进一步认识和防治慢性有机磷酸酯类杀虫剂中毒性脑血管病提供了新的思路。总之,有机磷酸酯类杀虫剂毒死蜱能下调 eNOS 的表达,减少 NO 的产生,进而降低脑血管内皮依赖性舒张反应。

【参考文献】

- [1] Ray DE, Richards PG. The potential for toxic effects of chronic low-dose exposure to organophosphates [J]. *Toxicology Letters*, 2001, **120** (1): 343-351.
- [2] Jintana S, Snung K, Krongtong T, et al. Cholinesterase activity, pesticide exposure and health impact in a population exposed to organophosphates [J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2009, **82** (7): 833-842.
- [3] Costa LG, Cole TB, Furlong CE. Paraoxonase (PON1): from toxicology to cardiovascular medicine [J]. *Acta Biomol*, 2005, **76** (2): 50-57.
- [4] Hinbergen TM, Tits LJ, Roest M, et al. The story of PON1: how an organophosphate-hydrolysing enzyme is becoming a player in cardiovascular medicine [J]. *Neurol J Med*, 2006, **64** (2): 34-38.
- [5] Hernandez AF, Mackness R, Rodrigo L, et al. Paraoxonase activity and genetic polymorphisms in greenhouse workers with long term pesticide exposure [J]. *Hum Exp Toxicology*, 2003, **22** (11): 565-574.
- [6] Hotoft M, Mackness L, Nikolaou V. Paraoxonase in Persian Gulf war veterans [J]. *J Occup Environ Med*, 2003, **45** (7): 668-675.
- [7] 熊小明,周寿红,胡敏,等. 敌百虫加重高脂饮食致兔动脉粥样硬化作用与降低对氧磷酶活性有关 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, **17** (3): 172-176.
- [8] Kassa J, Fusek J. Effects of panpal pretreatment and antidotal treatment (H16 plus benactyzine) on respiratory and circulatory function in soman-poisoned rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 1997, **16** (10): 27-35.
- [9] 李鹏,刘立英,周寿红,等. 对氧磷对血管内皮细胞的损伤作用及机制探讨 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, **15** (9): 666-670.
- [10] 卢青,柯庆. 甲基莲心碱对离体豚鼠基底动脉收缩的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (4): 322-324.
- [11] Hao XR, Cao DL, Hu YW, et al. IFN- γ down-regulates ABCA1 expression by inhibiting LXR- α in a JAK/STAT signaling pathway-dependent manner [J]. *Atherosclerosis*, 2009, **203** (2): 417-428.
- [12] Hu YW, Ma X, Li XX, et al. Eicosapentaenoic acid reduces ABCA1 serine phosphorylation and impairs ABCA1-dependent cholesterol efflux through cyclic AMP/protein kinase A signaling pathway in THP-1 macrophage-derived foam cells [J]. *Atherosclerosis*, 2009, **204** (2): 35-43.
- [13] Saulsbury MD, Heyliger SO, Wang K, et al. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells [J]. *Toxicology*, 2009, **259** (1-2): 1-9.
- [14] Gobeil FJ, Zhu T, Brault S, et al. Nitric oxide signaling via nuclearized endothelial nitric oxide synthase modulates expression of the immediate early genes NOS and mPGES-1 [J]. *J Biol Chem*, 2006, **281** (23): 16 058-067.
- [15] Fulton D, Babbitt R, Zoelner S, et al. Targeting of endothelial nitric oxide synthase to the cytoplasmic face of the Golgi complex or plasma membrane regulates Akt versus calcium-dependent mechanisms for nitric oxide release [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (29): 30 349-357.

(此文编辑 李小玲)