

肿瘤坏死因子 α 和血管紧张素 Ang II 干预内皮细胞后细胞凋亡和诱导型一氧化氮合酶的表达

杨丽霞¹, 郭瑞威, 齐峰, 石燕昆, 王红

(成都军区昆明总医院心内科, 云南省昆明市 650032)

[关键词] 内科学; 肿瘤坏死因子 α 和血管紧张素 Ang II 引起诱导型一氧化氮合酶上调和细胞凋亡; 电泳迁移率分析检测; 肿瘤坏死因子 α ; 血管紧张素 Ang II ; 细胞凋亡; 诱导型一氧化氮合酶

[摘要] 目的 探讨肿瘤坏死因子 α 和血管紧张素 Ang II 在导致内皮细胞凋亡过程中诱导型一氧化氮合酶的表达变化及核因子 KB 的作用。方法 核因子 KB 抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐预处理和未预处理原代培养的脐静脉内皮细胞, 用肿瘤坏死因子 α 和血管紧张素 Ang II 分别进行干预, 逆转录聚合酶链反应检测诱导型一氧化氮合酶 mRNA 的表达, 免疫印迹法检测诱导型一氧化氮合酶和 I $\text{KB}\alpha$ 的蛋白表达, 电泳迁移率分析检测核因子 KB 的活性, TUNEL 法检测细胞凋亡。结果 在 10 $\mu\text{g/L}$ 肿瘤坏死因子 α 和 1 $\mu\text{mol/L}$ 血管紧张素 Ang II 的干预下, 核因子 KB 的活性显著增加 ($P < 0.05$), 诱导型一氧化氮合酶 mRNA 和蛋白的表达与对照组比较显著增加 ($P < 0.05$), 细胞凋亡发生显著增加 ($P < 0.05$); 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐抑制肿瘤坏死因子 α 和血管紧张素 Ang II 引起的细胞凋亡和诱导型一氧化氮合酶表达的增加。结论 在肿瘤坏死因子 α 和血管紧张素 Ang II 作用于内皮细胞时, 通过降解 I $\text{KB}\alpha$ 引起诱导型一氧化氮合酶的核转位, 后者可引起诱导型一氧化氮合酶表达上调和细胞凋亡。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Study on Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Cell Apoptosis treated by Tumor Necrosis Factor- α and Angiotensin Ang II

YANG Li-Xia, GUO Rui-Wei, QI Feng, SHI Yan-Kun, and WANG Hong

(Department of Cardiology, Kunming General Hospital of Chengdu Army, Kunming 650032, China)

[KEY WORDS] Tumor Necrosis Factor- α ; Angiotensin Ang II ; Cell Apoptosis; Inducible Nitric Oxide Synthase; Nuclear Factor KB ; Pyrroledithiocarbamate

[ABSTRACT] **Aim** To explore the cell apoptosis and inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in the cultured endothelial cells induced by tumor necrosis factor (TNF- α) and angiotensin Ang II (Ang Ang II). **Methods** The cultured endothelial cells were treated with TNF- α (10 $\mu\text{g/L}$) and Ang Ang II (1 $\mu\text{mol/L}$) in absence and presence of pyrroledithiocarbamate (PDTC); the mRNA of iNOS was measured by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), the protein of iNOS and I $\text{KB}\alpha$ were assessed by Western blotting, the activity of nuclear factor KB (NF- KB) was evaluated by electrophoretic mobility shift assay (EMSA), and the cell apoptosis was detected with TUNEL. **Results** The mRNA and protein of iNOS were significantly increased in the endothelial cells induced by TNF- α and Ang Ang II ($P < 0.05$) and PDTC could prevent this increase; at the same time, TNF- α and Ang Ang II could increase the apoptosis of cells ($P < 0.05$) and PDTC could prevent this increase. **Conclusion** TNF- α and Ang Ang II induced the up-regulation of iNOS and the cell apoptosis, and the NF- KB play a key role in this process.

一氧化氮是内皮细胞分泌的一个重要的炎性因子^[1], 它在心血管系统有着重要的生物学活性, 合成一氧化氮的酶分为诱导型、内皮型和神经型, 前两种在心血管系统中有着重要的作用。在生理和病理状态下体内分泌一氧化氮的量也有着明显的变化, 这个量的变化取决于合成一氧化氮的酶的种类及其激活程度。在心血管病理生理过程中, 心肌细胞大

量产生肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α), 同时血管紧张素 Ang II (angiotensin, Ang Ang II) 作为肾素-血管紧张素系统的主要活性肽也在体内大量合成, 这两种炎性因子加重心血管系统炎性反应, 并能直接引起细胞凋亡, 本实验旨在探讨 TNF- α 和 Ang Ang II 干预内皮细胞后细胞凋亡和诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的表达及核因子 KB (nuclear factor- KB , NF- KB) 在一过程中的作用。

[收稿日期] 2006-03-27 [修回日期] 2006-10-08

[基金项目] 云南省科委(2001C0070M)资助项目

[作者简介] 杨丽霞, 博士研究生, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为冠心病的发病机制, E-mail 为 grw771210@163.com。郭瑞威, 博士研究生, 主治医师, 研究方向为心力衰竭发病学中炎性因子的变化。齐峰, 副主任医师, 研究方向为冠心病的介入治疗。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (pyrroledithiocarbamate)

mate, PDTC)、TNF- α 和 Ang Ⅱ(Sigma 公司); DMEM (Gibco 公司), 胎牛血清(Hyclone 公司); 一步法逆转录聚合酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒(Takara 公司); 兔抗人 iNOS 单克隆抗体、兔抗人 IkB α 单克隆抗体(Santa Cruz 公司); 电泳迁移率分析(electrophoretic mobility shift assay, EMSA) 试剂盒(Promega 公司); TUNEL 凋亡试剂盒(中衫公司)。

1.2 人脐静脉内皮细胞的培养与鉴定

参照 Madan 等^[2] 方法分离人脐静脉内皮细胞, 加入 DMEM 培养基, 于 5% CO₂、37℃ 条件下培养。原代培养的内皮细胞 80% 以上汇合时按 10⁸/L 传代。取第 2~4 代细胞用于实验。

1.3 逆转录聚合酶链反应检测诱导型一氧化氮合酶 mRNA 的表达

提取总 RNA, 并测定其浓度和纯度。iNOS 引物序列上游 5'-CGG TGC TGT ATT TCC TTA CGA GGC GAA GAA GG-3', 下游 5'-GGT GCT GCT TGT TAG GAG GTC AAG TAA AGG GC-3', 扩增片段 260 bp, 退火温度为 61℃; 内参照 β -actin 寡核苷酸引物序列上游 5'-AAG GAT TCC TAT GTG GGC-3', 下游 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC-3', 扩增片段 502 bp, 退火温度为 50℃; 所有引物均由大连宝生生物工程公司合成。反应取同一样品总 RNA 2 μ g, 按试剂盒说明进行, 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统拍摄。

1.4 免疫印迹法检测诱导型一氧化氮合酶和 IkB α 的含量

参考文献[3] 提取蛋白, 经考马斯亮兰蛋白定量后点样, 60 μ g/孔, 行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 待电泳完毕电转移至硝酸纤维素滤膜。5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 一抗分别为 1:400 兔抗 iNOS 单克隆抗体和 1:400 兔抗 IkB α 单克隆抗体, 4℃ 过夜。二抗为 1:800 HRP 酶标的羊抗兔 IgG, 室温 1 h, 漂洗后 DAB 显色。

1.5 电泳迁移率分析检测核因子 κ B 的活性

收集细胞用 400 μ L buffer A (10 mmol/L HEPES pH 7.9, 10 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF) 重悬细胞, 冰浴 15 min 后加入 25 μ L 10% NP-40 溶液, 剧烈振荡裂解细胞, 离心后沉淀重悬于 50 μ L 冰 buffer B (20 mmol/L HEPES pH 7.9, 400 mmol/L KCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, 25% 甘油), 剧烈振荡 15 min。离心后上清即为核蛋白。以考马斯亮蓝法检测提取液蛋白浓度核因子 κ B 双链寡核苷酸探针为(5'-AGT TGA GGG GAC TTT

CCC AGG C-3', 5'-GCC TGG GAA AGT CCC CTC AAC T-3'), 按试剂盒说明在 T4 寡核苷酸激酶的催化下, 5' 端标记 [γ -³²P]ATP 并纯化。结合反应产物上样至 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 2~3 h, 将胶及 X 光片置盒内, -80℃ 曝光 24~48 h, 进行放射自显影。

1.6 TUNEL 检测凋亡细胞

制备细胞爬片, 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 冲洗, 0.3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶 30 min, 0.1% Triton X-100 于 4℃ 渗透 2 min, PBS 冲洗后加 TUNEL 反应混合液 50 μ L, 37℃、60 min 后 PBS 冲洗, 转化剂 POD 50 μ L, 37℃、45 min, PBS 冲洗后 DAN 显色, 光镜下分析结果, 每个片子取 3 个视野, 计算凋亡细胞数占总细胞数的百分比为凋亡指数。

1.7 统计学分析

所得结果用医学图像分析系统测定其灰度值, 用 SPSS11.0 对数据进行处理, 多组间进行单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 人脐静脉内皮细胞的鉴定

相差显微镜下, 大部分细胞贴壁, 早期细胞呈小多角形、球形, 呈团状, 逐渐生长成梭形, 于 4~7 天胞体呈多角形, 相互嵌合, 为单层铺路石状排列(图 1), 荧光抗体法表明胞浆内有 α II 因子相关抗原。

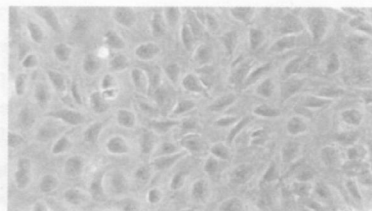


图 1. 培养的人脐静脉内皮细胞 ($\times 200$)

2.2 诱导型一氧化氮合酶 mRNA 和蛋白的表达

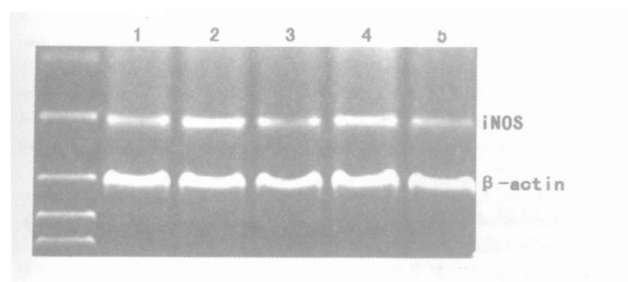
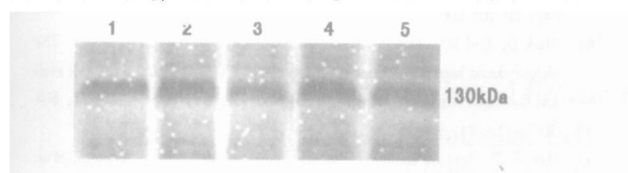
TNF- α 和 Ang Ⅱ干预后, iNOS mRNA 和蛋白的表达增加, 与对照组比较有显著差异 ($P < 0.05$); 核因子 κ B 抑制剂 PDTC 预处理后, iNOS mRNA 和蛋白的表达被抑制(表 1、图 2 和 3)。

2.3 核因子 κ B 活性和 IkB α 蛋白的表达

TNF- α 和 Ang Ⅱ干预后, IkB α 蛋白与对照组相比明显下降, 核因子 κ B 活性与对照组相比明显增强 (P 均 < 0.05)。PDTC 预处理后能恢复 IkB α 蛋白的表达和降低核因子 κ B 活性(表 2、图 4 和 5)。

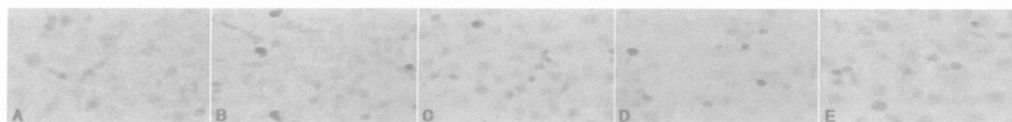
表 1. 诱导型一氧化氮合酶 mRNA 和蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	mRNA	蛋白
对照组	0.43 ± 0.02	6.70 ± 0.32
TNF- α	0.72 ± 0.05 ^a	8.13 ± 0.82 ^a
TNF- α + PDTC	0.34 ± 0.03	6.82 ± 0.46
Ang Ⅱ	0.81 ± 0.05 ^a	9.43 ± 0.93 ^a
Ang Ⅱ+ PDTC	0.42 ± 0.04	6.54 ± 0.72

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比。图 2. 诱导型一氧化氮合酶 mRNA 的表达 1 为对照, 2 为肿瘤坏死因子 α , 3 为肿瘤坏死因子 α + 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐, 4 为血管紧张素 Ⅱ, 5 为血管紧张素 Ⅱ+ 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐。图 3. 诱导型一氧化氮合酶蛋白的表达 1 为对照, 2 为肿瘤坏死因子 α , 3 为肿瘤坏死因子 α + 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐, 4 为血管紧张素 Ⅱ, 5 为血管紧张素 Ⅱ+ 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐。

2.4 内皮细胞凋亡的发生

TNF- α 和 Ang Ⅱ干预后, 内皮细胞凋亡指数显著增加($P < 0.05$), PDTC 预处理能抑制细胞的凋亡(表 3 和图 6)。

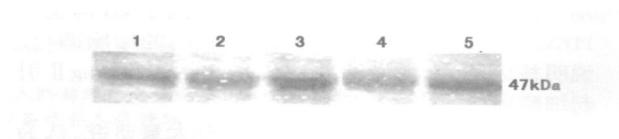
图 6. TUNEL 检测内皮细胞凋亡 ($\times 200$)

3 讨论

血管内皮细胞作为心血管系统的第一道屏障, 它的完整性和内分泌功能对于心血管系统显得尤为重要。在疾病状态下体内大量炎性因子表达上调,

表 2. 核因子 κB 活性和 I $\kappa B\alpha$ 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	NF- κB 活性	I $\kappa B\alpha$
对照组	31.36 ± 6.92	2.32 ± 0.32
TNF- α	50.83 ± 7.68 ^a	0.95 ± 0.15 ^a
TNF- α + PDTC	32.37 ± 6.85	3.02 ± 0.12
Ang Ⅱ	64.18 ± 8.90 ^a	0.85 ± 0.12 ^a
Ang Ⅱ+ PDTC	39.59 ± 4.62	2.98 ± 0.50

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比。图 4. I $\kappa B\alpha$ 蛋白的表达 1 为对照, 2 为肿瘤坏死因子 α , 3 为肿瘤坏死因子 α + 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐, 4 为血管紧张素 Ⅱ, 5 为血管紧张素 Ⅱ+ 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐。图 5. 核因子 κB 的活性变化 1 为对照, 2 为肿瘤坏死因子 α , 3 为肿瘤坏死因子 α + 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐, 4 为血管紧张素 Ⅱ, 5 为血管紧张素 Ⅱ+ 吡咯烷二硫代氨基甲酸盐。表 3. 内皮细胞凋亡指数在各组间的差异 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

分 组	凋亡指数
对照组	0.02 ± 0.00
TNF- α	0.32 ± 0.04 ^a
TNF- α + PDTC	0.07 ± 0.01
Ang Ⅱ	0.24 ± 0.03 ^a
Ang Ⅱ+ PDTC	0.05 ± 0.00

a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比。

TNF- α 和 Ang Ⅱ大量生成, 这些炎性因子可以干扰内皮细胞正常的内分泌功能, 也可以直接引起内皮细胞凋亡, 最终促进动脉粥样硬化的发生^[4], 因此如何在疾病状态下阻断炎性因子的作用对动脉粥样硬化

的防治有着重要的意义。

核因子 κB 作为一个重要的核因子,大量的炎症因子可以激活细胞内核因子 κB 通路,同样 $\text{TNF-}\alpha$ 和 Ang II 也可以通过降解胞浆内 $\text{I}\kappa\text{B}$ 蛋白,引起核因子 κB 的核移位导致一系列的生物学效应^[5,6],在体外培养的内皮细胞中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 Ang II 对核因子 κB 激活的最终通路是降解 $\text{I}\kappa\text{B}$ 蛋白中的 α 亚型。核因子 κB 的核移位在不同种类的细胞中有着不同的作用^[11],我们实验发现在内皮细胞中核因子 κB 抑制剂 PDTC 可以抑制住 $\text{TNF-}\alpha$ 和 Ang II 引起的细胞凋亡,说明核因子 κB 的激活并移位是 $\text{TNF-}\alpha$ 和 Ang II 引起细胞凋亡中的一个重要环节。

对一氧化氮的生物学作用已有大量研究,认为正常浓度的一氧化氮在体内对心血管系统有保护作用,包括抑制细胞的凋亡和维持血管活性等。但当一氧化氮大量产生时,高浓度的一氧化氮就会加重炎症反应,对机体产生损伤。 Hayashi 等^[7]用能表达 iNOS 的质粒转染研究发现由 iNOS 产生大量一氧化氮会加重局部的炎症反应。也有研究表明在角膜内皮细胞中一氧化氮介导着前炎症介质引起的凋亡,并核因子 κB 在其中有着重要的作用^[8]。同时在 iNOS 表达的启动区有核因子 κB 的结合位点^[9]。因此我们在对内皮细胞的研究中也把 iNOS 作为核因子 κB 的下游分子,表明 $\text{TNF-}\alpha$ 和 Ang II 可以引起 iNOS 表达的增强,核因子 κB 抑制剂 PDTC 可以抑制住这种激活作用,说明核因子 κB 在这个过程中有着重要的作用。细胞中 iNOS 的高表达会产生大量的一氧化氮,同时 $\text{TNF-}\alpha$ 和 Ang II 都可以引起细胞内自由基的大量生成。在我们的前期研究中发现细胞中一氧化氮可以和氧自由基结合生成过氧化亚硝酸盐,后者能直接引起聚 ADP 合酶 的激活,从而引起内皮细胞凋亡。

由此可以看出,核因子 κB 的激活是炎症因子导致内皮细胞损伤的一个重要环节, iNOS 作为核因子 κB 一个下游分子在这个过程中可能也有着重要的作用。但因为核因子 κB 在不同种类的细胞中的不同生物学效应,因此探索在内皮细胞中炎症因子激活核因子 κB 通路也是十分重要的,目前尚无定论,有待进一步阐明。

[参考文献]

- [1] Park CS, Lim H, Han KJ, Baek SH, Sohn HO, Lee DW, et al. Inhibition of nitric oxide generation by 23, 24-dihydrocucurbitacin D in mouse peritoneal macrophages[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, **309** (2): 705-710
- [2] Madan B, Singh I, Kumar A, Prasad AK, Raj HG, Pamar VS, et al. Xanthones as inhibitors of microsomal lipid peroxidation and $\text{TNF-}\alpha$ induced ICAM-1 expression on human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) [J]. *Bioorg Med Chem*, 2002, **10** (11): 3 431-436
- [3] Cuschieri J, Gourlay D, Garcia I, Jelacic S, Maier RV. Endotoxin induced endothelial cell proinflammatory phenotypic differentiation requires stress fiber polymerization[J]. *Shock*, 2003, **19** (5): 433-439
- [4] 江 渝, 刘 红, 彭家和, 叶治家, 何凤田, 董燕麟. 培养的人动脉平滑肌细胞诱导高密度脂蛋白氧化修饰[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (1): 17-19
- [5] Chen Y, Arrigo AP, Currie RW. Heat shock treatment suppresses angiotensin II-induced activation of $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pathway and heart inflammation: a role for IKK depletion by heat shock[J]? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, **287** (3): H1 104-114
- [6] Black D, Bird MA, Hayden M, Schrum LW, Lange P, Samson C, et al. $\text{TNF-}\alpha$ induced hepatocyte apoptosis is associated with alterations of the cell cycle and decreased stem loop binding protein[J]. *Surgery*, 2004, **135** (6): 619-628
- [7] Hayashi T, Sumi D, Juliet PA, Matsui-Hirai H, Asai-Tanaka Y, Kano H, et al. Gene transfer of endothelial NO synthase but not eNOS plus inducible NOS, regressed atherosclerosis in rabbits[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, **61** (2): 339-351
- [8] Sagoo P, Chan G, Larkin DF, George AJ. Inflammatory cytokines induce apoptosis of corneal endothelium through nitric oxide[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004, **45** (11): 3 964-973
- [9] Takeuchi K, Watanabe H, Tran QK, Ozeki M, Sumi D, Hayashi T, et al. Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cell calcium signaling, prostaglandin I_2 production and nitric oxide synthase expression[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, **62** (1): 194-201

(此文编辑 文玉珊)