

血管紧张素 II 对心肌细胞内皮型 一氧化氮合酶基因表达的影响

詹昌德¹, 潘敬运²

(中山医科大学 1. 卫生部辅助循环重点实验室; 2. 生理学教研室, 广东 广州 510089)

摘要:【目的】观察血管紧张素 II 对心肌细胞内皮型一氧化氮合酶(eNOS)表达的影响。【方法】用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测新生大鼠心肌细胞 eNOS mRNA(以 GAPDH 为内标)水平。【结果】在培养新生大鼠心肌细胞和非心肌细胞中均能检测到 eNOS mRNA, 其中心肌细胞的表达高于非心肌细胞; 血管紧张素 II 作用 6、12 和 24 h, 心肌细胞 eNOS mRNA 水平明显减少。【结论】在大鼠心肌细胞和非心肌细胞皆有 eNOS 基因表达; 血管紧张素 II 可抑制心肌细胞 eNOS 基因的表达。

关键词: 血管紧张素 II / 药理学; 一氧化氮; 裂合酶类 / 药物作用; 心肌 / 药物作用; 基因表达调控

中图分类号: R331.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-257X(2000)02-0117-04

Effect of Angiotensin II on the Expression of Endothelial-type Nitric Oxide Synthase Gene in Cultured Cardiac Myocytes

ZHAN Chang-de¹, PAN Jing-yun²

(1. Key Laboratory of the Ministry of Health on Assisted Circulation;

2. Department of Physiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To observe the effect of angiotensin II on the expression of endothelial-type nitric oxide synthase gene in cultured cardiac myocytes. 【Method】The endothelial-type nitric oxide synthase (eNOS) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) specific primers were designed according to their cDNA sequences. The eNOS gene expression was assessed using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) standardized with GAPDH. 【Result】The eNOS mRNA in cultured neonatal rat cardiac myocytes and non-myocytes was detected; the eNOS mRNA levels in cardiac myocytes were higher than in non-myocytes; treatment with angiotensin II for 6, 12 and 24 h decreased significantly the eNOS mRNA levels in cardiac myocytes. 【Conclusion】eNOS gene is expressed in cultured neonatal rat cardiac myocytes and nonmyocytes. Angiotensin II can inhibit eNOS gene expression in a time-dependent manner in cultured cardiomyocytes.

Key words: angiotensin II / pharmacology; nitric oxide; lyases / drug effects; myocardium / drug effects; gene expression regulation

血管紧张素 II 有广泛的心血管作用。新生大鼠心肌细胞含有血管紧张素 II 受体, 包括 AT₁ 和 AT₂^[1]。大量的研究表明: NO 是一种新型的气体信使分子, 在心脏功能活动中起重要作用^[2]。生物组织中的 NO 是由 L-精氨酸和分子氧在一氧化氮

合酶(NOS)的催化下生成的。NOS 的异构体有 3 种: 神经元型(nNOS, NOS1)、诱导型(iNOS, NOS2)和内皮型(eNOS, NOS3)。我们应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术, 检测新生大鼠心肌细胞和非心肌细胞 eNOS 基因[以 3-磷酸甘油

收稿日期: 1999-07-29

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(960124)

作者简介: 詹昌德(1965-), 男, 湖北黄冈人, 博士, 讲师

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

醛脱氢酶(GAPDH)为内标]的表达和观察血管紧张素 II 对心肌细胞 eNOS 基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 新生大鼠心肌细胞培养

按 Simpson 等^[3]描述的方法培养心肌细胞。实验用 1~3 d 龄新生 SD 大鼠, 在无菌条件下取出心室, 剪成 1 mm³ 均匀碎块, 1 g/L 胰蛋白酶消化后, 离心收集细胞, 加入含 $\varphi = 10\%$ 胎牛血清的 M199 培养液, 接种于 25 mL 培养瓶中, 置 37 °C、 $\varphi = 5\%$ CO₂ 培养箱中单层贴壁培养。用 1 h 差速贴壁法分离心肌细胞和非心肌细胞, 细胞计数, 配成 1×10^6 /mL, 每瓶 3 mL。心肌细胞培养的最初两天, 培养液中加入 0.1 mmol/L 的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷抑制非心肌细胞生长。

1.2 总 RNA 的提取

收获 3×10^6 心肌细胞, 用 TRIzol 试剂盒(美国 Life Technologies 公司)提取细胞总 RNA。总 RNA 提取后, 用紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 重复测定 3 次, 计算样品总 RNA 浓度; $A_{260} : A_{280}$ 比值在 1.8~2.0 之间。

1.3 引物

eNOS 寡核苷酸引物是根据 Nadaud 等^[4]的序列合成: 上游 5'-AAC ATG TGT CCT TGC TCG AGG CA-3'、下游 5'-TTC CGG CGT CCA CCT GAT CCT AA-3', 用这对引物可扩增出 340 bp 的 eNOS cDNA 片段; GAPDH 寡核苷酸引物是根据 Fort 等^[5]报告的大鼠组织 GAPDH cDNA 序列设计合成的: 上游 5'-CAT CAC CAT CTT CCA GGA GCG-3'、下游 5'-TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG-3', 这对引物可扩增出 443 bp 的 GAPDH cDNA 片段。所有引物均由上海生工生物工程公司合成。

1.4 逆转录聚合酶链式反应

取同一样品总 RNA 2 μ g, 分成两等份, 分别用 50 pmol 特异性的 eNOS 和 GAPDH 引物, 采用 SuperScript 一步法 RT-PCR 试剂盒(美国 Life Technologies 公司)进行逆转录聚合酶链式反应, 总反应体积为 50 μ L。RT-PCR 的反应条件为: ① cDNA 合成和预变性: 46 °C 30 min、94 °C 2 min 进行 1 次循环; ② PCR 扩增: 94 °C 30 s、60 °C 30 s、72 °C 1 min 进行 28 次循环; ③ 最后延伸: 72 °C 6 min 进行

1 次循环, 共 30 次循环。

1.5 RT-PCR 产物的检测和分析

取 RT-PCR 产物 10 μ L, 加 2 μ L 上样缓冲液, 在含 0.5 g/L 溴化乙锭的 15 g/L 琼脂糖凝胶上电泳, 80 V 45 min, 用 GDS 凝胶成像系统拍摄打印实验结果, 条带用计算机图象分析系统扫描定量。

2 结果

2.1 新生大鼠心肌细胞和非心肌细胞 eNOS 基因的表达

提取培养 2 d 新生大鼠心肌细胞和非心肌细胞总 RNA, 用 RT-PCR 均检测出 eNOS cDNA 和 GAPDH cDNA 片段, 这些片段与设计相符。其中心肌细胞 eNOS mRNA 的含量高于非心肌细胞(图 1)。

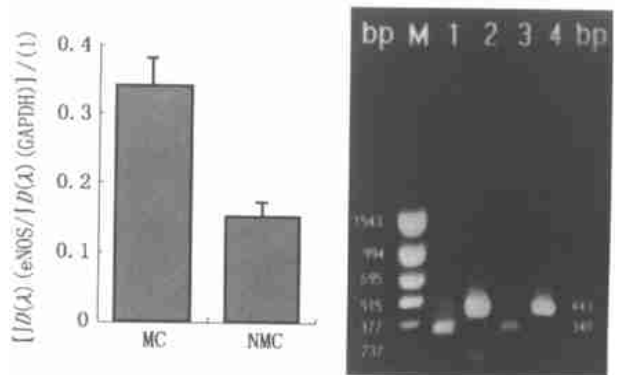


图 1 eNOS 基因在大鼠心肌细胞中的表达

Fig. 1 The eNOS gene expression in the rat cardiac myocytes

MC: cardiac myocyte; NMC: non-myocyte. [$\int D(\lambda)(eNOS) / \int D(\lambda)(GAPDH) / (1)$]: the ratio of the integrated optical density of eNOS to that of GAPDH. * $P < 0.05$ vs MC; $n = 3$, $\bar{x} \pm s_x$; M: DNA marker; Lanes 1 and 2 from MC; 3 and 4 from NMC; Lanes 1 and 3, eNOS cDNA (340 bp); Lanes 2 and 4, GAPDH cDNA (443 bp)

2.2 血管紧张素 II 对心肌细胞 eNOS 基因表达的影响

实验分对照组和血管紧张素 II 组 (10^{-6} mol/L)。两组细胞在无血清培养基中分别培养 6、12 和 24 h 后, 用 RT-PCR 检测心肌细胞 eNOS 和 GAPDH mRNA 水平。结果显示: 与对照组比较, 血管紧张素 II 作用 6、12 和 24 h, 心肌细胞 eNOS mRNA 水平显著减少, 且呈时间依赖性(图 2)。

3 讨论

本研究的结果表明, eNOS 基因在大鼠心肌细

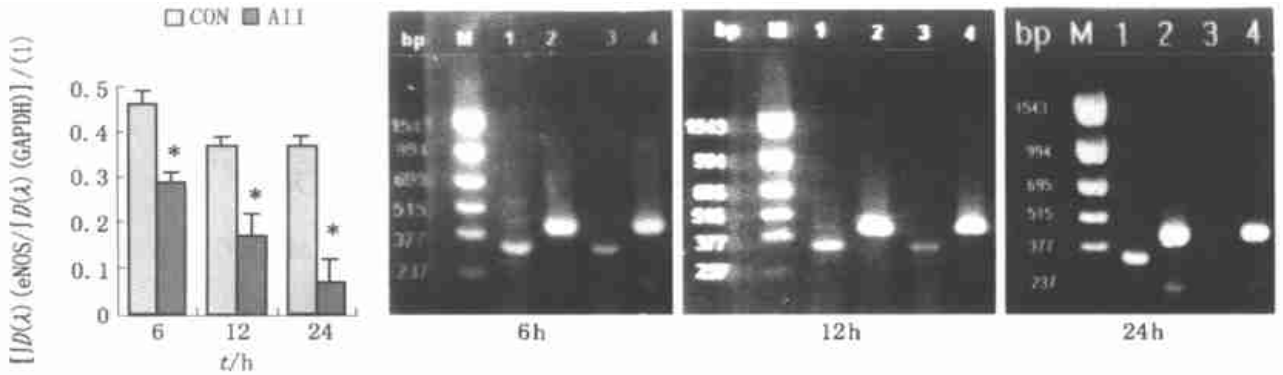


图2 血管紧张素II对心肌细胞eNOS基因表达的影响

Fig. 2 Effect of angiotensin II on the eNOS gene expression in cardiomyocytes

CON: control; A II: angiotensin II. $[\int D(\lambda)(eNOS) / \int D(\lambda)(GAPDH)] / (1)$: the ratio of the integrated optical density of eNOS to that of GAPDH. * $P < 0.05$ vs CON, $n = 3$, $\bar{x} \pm s_x$; M: DNA marker; Lanes 1 and 3, eNOS cDNA (340 bp); Lanes 2 and 4, GAPDH cDNA (443 bp); Lanes 1 and 2 from CON; Lanes 3 and 4 from A II

胞和非心肌细胞皆有表达;血管紧张素II可抑制心肌细胞eNOS基因的表达。

最近, Ishiwata等^[6]用RT-PCR技术在成年大鼠心脏组织检测到eNOS基因的表达;但原位杂交只发现eNOS mRNA定位在血管内皮细胞的胞浆中。我们利用RT-PCR方法所具有的极高灵敏性,在心肌细胞和非心肌细胞检测出eNOS基因的表达,并以看家基因GAPDH作内标进行相对定量,发现eNOS基因在心肌细胞的表达水平要高于非心肌细胞。

血管紧张素II在体内具有广泛的生物学活性,除参与正常血管张力、维持水盐平衡调节外,由局部肾素-血管紧张素系统产生的血管紧张素II还参与了细胞生长的调节,并在某些心血管疾病如高血压、心肌肥厚、充血性心衰、缺血性心肌病及肾功能不全等发生发展过程中起重要作用。血管紧张素II与心肌细胞膜上的G蛋白偶联受体结合,启动胞内信号转导通路而产生效应,但其机制十分复杂,目前尚未完全阐明。Sadoshima等^[7]报道,蛋白激酶C(PKC)在血管紧张素II诱导心肌细胞原癌基因表达的效应中起关键作用。

一氧化氮(NO)亦具有广泛的心血管作用:它使血管舒张,外周阻力降低,心肌收缩力下降,维持内皮细胞完整和抑制血小板粘着聚集及抑制血管紧张素II诱导的平滑肌细胞分裂增殖^[2]。因此,血管紧张素II和一氧化氮在体内可能存在着复杂的相互作用。

有报道指出,eNOS基因表达受PKC调节:在血管内皮细胞,PKC活性受抑制时,eNOS基因表

达增加;PKC活性增强时,eNOS基因表达减少^[8]。转录因子AP-1识别一个具有顺式元件功能的特异性DNA序列,介导PKC激活诱导的转录反应;在人^[9]和牛^[10]eNOS基因的启动子区含有与AP-1结合的部位,从理论上讲,eNOS mRNA的表达亦可受PKC的调节。因此,我们认为,血管紧张素II可能通过激活PKC,抑制心肌细胞eNOS基因表达。

参考文献:

- [1] Sechi L A, Griffin C A, Grady E F, *et al.* Characterization of angiotensin II receptor subtypes in rat heart [J]. *Circ Res*, 1992, 71(6): 1482.
- [2] Loscalzo J, Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system [J]. *Prog in Cardiovas Dis*, 1995, 38(2): 87.
- [3] Simpson P, McGrath A, Savion S. Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines [J]. *Circ Res*, 1982, 51(6): 787.
- [4] Nadaud S, Philippe M, Arnal J F, *et al.* Sustained increase in aortic endothelial nitric oxide synthase expression *in vivo* in a model of chronic high blood flow [J]. *Circ Res*, 1996, 79(4): 875.
- [5] Fort P, Marty L, Piechaczyk M, *et al.* Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase multigenic family [J]. *Nucleic Acids Res*, 1985, 13(5): 1431.
- [6] Ishiwata T, Guo F, Naito Z, *et al.* Differential Distribution of eNOS and iNOS mRNA in rat heart after endotoxin

(下转第129页)

参考文献:

- [1] Vanden Bruggen P, Traversari C, Chomez P, *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on human melanoma [J]. *Science*, 1991 (254): 1643.
- [2] Boon T, Brichard V G, Vabdeb Eynde B. Tumor rejection antigens and specific immunotherapy of cancer [J]. *Medi Sci*, 1995(11): 1279.
- [3] Schultz T E, Juretic A, Dellabona P, *et al.* MAGE-1 gene product is a cytoplasmic protein [J]. *Int J Cancer*, 1994(59): 435.
- [4] Marchand M, ven-Baeren-N, Weynants P, *et al.* Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1 [J]. *Int J Cancer*, 1999, 80(2): 219.
- [5] Toso J F, Oei C, Oshidari F, *et al.* MAGE-1-specific precursor cytotoxic T-lymphocytes from a patient with breast cancer: characterization and antigen-specific activation [J]. *Cancer Res*, 1996, 56(1): 16.
- [6] Kanaoka S, Yamasaki S, Okino T, *et al.* Induction of human leukocyte antigen HLA-A2-restricted and MAGE-3-gene-derived peptide-specific cytolytic T lymphocytes using cultured dendritic cells from an HLA-A2 esophageal cancer patient [J]. *J Surg Oncol*, 1999, 71 (1): 16.
- [7] Reynolds S R, Oratz R, Shapiro R L, *et al.* Stimulation of CD8+ T cell responses to MAGE-3 and Melan A/MART-1 by immunization to a polyvalent melanoma vaccine [J]. *Int J Cancer*, 1997, 72(6): 972.
- [8] Bueler H, Mulligan R C. Induction of antigen-specific tumor immunity by genetic and cellular vaccines against MAGE2: enhanced tumor protection by coexpression of granulocyte-macrophage colony stimulating factor and B7-1 [J]. *Mol Med*, 1996, 2(5): 545.
- [9] Li J, Yang Y, Fujie T, *et al.* Expression of BAGE, GAGE, and MAGE genes in human gastric carcinoma [J]. *Clinic Cancer Res*, 1996, 2(9): 1619.
- [10] Takaki T, Hiraki A, Uenaka A, *et al.* Variable expression on lung cancer cell line of HLA-A2-binding MAGE-3 peptide recognized by cytotoxic T lymphocytes [J]. *Int J Oncol*, 1998, 12(5): 1103.

(编辑 黄小延)

(上接第 119 页)

- administration [J]. *Jpn Heart J*, 1997, 38(3): 445.
- [7] Sadoshima J, Izumo S. Signal transduction pathways of angiotensin II-induced c-fos gene expression myocytes *in vitro*: Roles of phospholipid-derived second messengers [J]. *Circ Res*, 1993, 73(3): 424.
- [8] Ohara Y, Sayegh HS, Yamin J J, *et al.* Regulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase by protein kinase C [J]. *Hypertension*, 1995, 25(3): 415.
- [9] Marsden P A, Heng H H, Scherer S W, *et al.* Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(23): 17478.
- [10] Venema R C, Nishida K, Alexander R W, *et al.* Organization of the bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1994, 1218 (3): 413.

(编辑 张敏瑞)