

• 基础研究 •

脓毒症时各型一氧化氮合酶在大鼠心脏中的
表达及其可能机制

陈艳明, 陈 琪, 王士雯

【摘要】 目的 研究脓毒症时各型一氧化氮合酶(NOS)在心脏中的损伤作用及其机制。**方法** 成年雄性 Wistar 大鼠腹腔注射脂多糖(LPS)制备脓毒症模型。应用多导生理仪监测大鼠心功能变化;用分光光度计测定大鼠心肌组织 NOS 的活性;用 RT-PCR 和 Western blot 对大鼠心肌组织各型 NOS 的表达进行半定量分析。**结果** 给予 LPS 后 6 h 大鼠心肌收缩和舒张功能受损下降,心肌中 iNOS 的活性明显升高,eNOS 和 nNOS(合称 cNOS)活性减弱;RT-PCR 和 Western blot 结果显示,给予 LPS 后 cNOS 的表达减少,给予 LPS 后 iNOS 表达量明显增加。**结论** 脓毒症时,iNOS、nNOS 和 eNOS 的表达和活性发生改变;心肌细胞上 iNOS 表达及活性升高,这些变化可能在心功能降低中发挥作用。

【关键词】 一氧化氮合酶;脓毒症;心肌细胞**【中图分类号】** R59**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1671-5403(2010)-06-0533-04Expression pattern of nitric oxide synthases in heart of
septic rat and its mechanism

CHEN Yanming, CHEN Qi, WANG Shiwen

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To define the roles of three types of nitric oxide synthases (NOS) in heart injury of septic rat and its relevant mechanism. **Methods** Male Wistar rats received intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) to prepare septic rat models. Cardiac function was recorded on a computer with an analogic/digital transducer. The activities of NOS were analyzed by spectrophotometer. The expressions of three types of NOS in rat hearts were assessed by semi-quantitative RT-PCR and Western blot. **Results** At 6 hours after LPS injection, the cardiac systolic and diastolic function were impaired; the activities of inducible NOS (iNOS) were increased; the activities of constitutive NOS [(cNOS) endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS)] were decreased; RT-PCR and Western blot showed that expressions of including cNOS were markedly down-regulated, but iNOS expressions were increased significantly after LPS administration. **Conclusion** The expressions and activities of iNOS, nNOS, and eNOS change in case of sepsis. Increase in iNOS expression and activity in cardiomyocytes may contribute to the progression of heart failure after LPS injection.

【Key words】 nitric oxide synthase; sepsis; cardiomyocyte

脓毒症是严重创伤、感染及大手术等多种应激状态时的常见并发症,其发病率和死亡率居高不下,而心功能不全在脓毒症早期就可出现,并且与预后密切相关。脓毒症时心功能的降低是多种因素累加的结果,包括氧化磷酸化脱偶联,细胞产生高能磷酸盐的能力降低;心肌冬眠;循环抑制因子 TNF- α 激活心脏中一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS),产生大量 NO^[1]。但脓毒症时各型 NOS 表达及可能作用尚不明确。本研究拟对此进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料 成年雄性 Wistar 大鼠(250~350 g),由解放军总医院实验动物中心提供。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)购自美国 Sigma 公司。总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、PCR 试剂盒购自北京 Tianwei 公司。兔抗大鼠内皮型 NOS(eNOS)、兔抗大鼠神经元型 NOS(nNOS)、兔抗大鼠诱导型 NOS(iNOS)均购自武汉 Boster 公司。

1.2 脓毒症模型建立 30只大鼠,分别腹腔注射生理盐水和LPS(10 mg/kg)各0.2 ml,形成对照组和LPS组。给药6h后取组织备用。

1.3 血流动力学测定 脓毒症模型的建立同前。Wistar大鼠以乌拉坦(1 g/kg)经腹腔注射麻醉,仰卧位固定于手术台上。分离右侧颈总动脉,用充盈0.4%肝素盐水的PE₅₀管向心性插入动脉,连接多道生理记录仪检测心电和血压变化。稳定30 min后向前推进导管至左心室并固定导管,稳定10 min后记录左心室内血流动力学参数,包括心率(heart rate, HR)、等容收缩期左室内压力最大上升速率(+dp/dt_{max})、等容舒张期左室内压力最大下降速率(-dp/dt_{max})等的改变。

1.4 NOS活性测定 按照南京生物建成技术公司生产的试剂盒说明书测定的结构型NOS(constitutive NOS, cNOS)及诱导型(inducible NOS, iNOS)。

1.5 各型NOS的表达

1.5.1 半定量RT-PCR Trizol试剂提取RNA 紫外分光光度计进行RNA定量。TIAN Script MMLV合成cDNA第一链,总反应体系25 μl,反应物用于PCR。利用DNAclub软件设计各型NOS和GAPDH的引物。nNOS:上游5'-GTCTTC-CACCAGGAGATG-3',下游5'-AAAGGCACAG-AAGTGGGGGTA-3',扩增长度618bp; eNOS^[1]:上游5'-TCCAGTAACACAGACAGTGCA-3',下游5'-CAGGAAGTAAGTGAGAGC-3',扩增长度693bp; iNOS:上游5'-GAGATCAATGCAGCTGTG-3',下游5'-AGAATGGAGATAGGACGT-3',扩增长度217bp; GAPDH:上游:5'-ATCACCATCTTCCAGGAGCG-3',下游:5'-TGACCTTGCCCACAGCCTTG-3',扩增长度443 bp。nNOS PCR反应条件为94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,35个循环;eNOS和iNOS PCR反应条件为95℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸1 min,34个循环数;GAPDH PCR反应条件为94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,25个循环数。取5 μl PCR产物进行琼脂糖电泳,应用凝胶成像系统各型NOS/GAPDH,进行半定量测定。

1.5.2 Western blot测定各型NOS蛋白的表达 心肌加入蛋白裂解液匀浆,取上清,紫外分光光度计测定蛋白浓度,其余上清液分装后置于-70℃保存。将样品100℃沸水中加热变性10 min,1000 g短暂离心后,进行蛋白质聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后,进行转膜,将转有蛋白的硝酸纤维素膜置于5%脱脂牛奶中室温下封闭1 h。剪切相应蛋白条带并分别加入兔抗大鼠nNOS、iNOS和eNOS多克隆抗体,4℃过夜。TBST洗膜3次,分别加入山羊抗兔碱性磷酸酶标记二抗(1:1000稀释),室温孵育1 h。TBST洗膜3次后用NBT/BCIP显色液显色。特异性条带的光密度值采用上海天能科技有限公司GIS像分析系统处理。

1.6 统计学处理 采用GraphPad Prism-4软件进行数据处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间差异比较采用组间 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脓毒症时大鼠心脏功能的变化 注射LPS 6 h后,大鼠平均动脉血压明显下降,心率增加($P < 0.05$);反映左心室收缩和舒张功能的指标($\pm dp/dt$)下降明显,分别较基础状态下降了20.9%和18.3%($P < 0.05$;表1)。

2.2 心肌组织NOS活性测定 基础条件下,成年大鼠心脏总NOS(total NOS)的活性为(0.45 ± 0.17)U/mg蛋白质,其中iNOS的活性较弱,cNOS(包括eNOS和nNOS)活性较高;给予LPS处理后,心脏总NOS活性未见明显变化,iNOS的活性明显升高,是基础状态的4倍($P < 0.01$),cNOS的活性较基础状态减少了27.5%($P < 0.05$;图1)。

2.3 心脏中各型NOS mRNA的表达 正常情况下,成年大鼠心脏中存在eNOS mRNA和nNOS mRNA的表达,其中eNOS mRNA的含量高于nNOS mRNA,正常成年大鼠心脏组织中未能检测到iNOS mRNA的表达;给予LPS 6 h后iNOS mRNA的含量明显上升,nNOS和eNOS mRNA的含量减少(表2,图2)。

表1 大鼠血流动力学的测定($n = 15, \bar{x} \pm s$)

组别	HR(次/min)	MAP(mmHg)	+dp/dt _{max} /(mmHg/s)	-dp/dt _{max} /(mmHg/s)
对照组	363 ± 24	125 ± 4	8200 ± 1440	-6000 ± 1230
脂多糖组	430 ± 15*	114 ± 5*	6400 ± 1320*	-4900 ± 850*

注:HR:心率;MAP:平均动脉压;与对照组比较,* $P < 0.05$

表 2 大鼠心肌组织中各型 NOS mRNA 的表达 (n=15, $\bar{x} \pm s$)

组别	NOS mRNA/GAPDH mRNA		
	eNOS	nNOS	iNOS
对照组	0.90±0.25	0.30±0.05	0.05±0.01
脂多糖组	0.70±0.16*	0.10±0.02**	0.40±0.02**

注: eNOS: 内皮型一氧化氮合酶; nNOS: 神经元型一氧化氮合酶; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

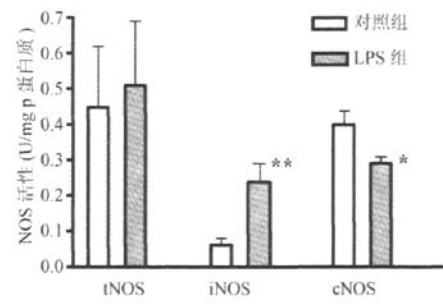


图 1 大鼠心肌组织中总 NOS、iNOS 和 eNOS 活性的变化
总 NOS: 总一氧化氮合酶; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶; eNOS: 结构型一氧化氮合酶; n=15。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

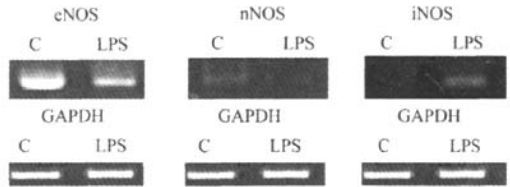


图 2 心脏中各型 NOS mRNA 的表达
eNOS: 内皮型一氧化氮合酶; nNOS: 神经元型一氧化氮合酶; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶

2.4 心脏各型 NOS 的蛋白表达 在正常情况下, 心肌组织存在 cNOS(含 nNOS 和 eNOS)的蛋白表达, 但 nNOS 的蛋白表达量远远少于 eNOS 的表达量。给予大鼠 LPS 6 h 后, nNOS 和 eNOS 的蛋白表达量下降 ($P < 0.05$)。正常情况下, 心肌组织可见极少量 iNOS 的表达, 给予 LPS 6 h 后, iNOS 的表达量明显增加 ($P < 0.01$; 表 3, 图 3)。

表 3 大鼠心肌组织中各型 NOS 蛋白表达 (n=15, $\bar{x} \pm s$)

组别	eNOS/ β -actin	nNOS/ β -actin	iNOS/ β -actin
对照组	0.85±0.25	0.25±0.05	0.05±0.01
脂多糖组	0.65±0.20*	0.10±0.02**	0.60±0.10**

注: eNOS: 内皮型一氧化氮合酶; nNOS: 神经元型一氧化氮合酶; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

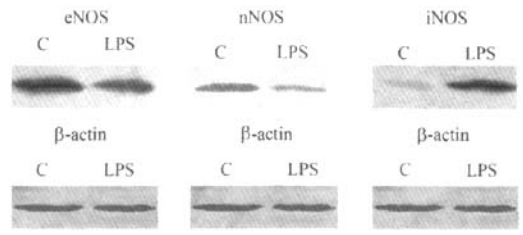


图 3 心脏各型 NOS 的蛋白表达
eNOS: 内皮型一氧化氮合酶; nNOS: 神经元型一氧化氮合酶; iNOS: 诱导型一氧化氮合酶

3 讨论

本研究证实脓毒症时心血管功能受损, 如心室收缩、舒张功能下降、血压下降。内毒素注入体内后可产生明显的心血管抑制作用, 而体外实验缺乏相应的抑制作用, 提示内毒素通过产生内源性物质介导该损伤作用^[2]。

NOS 分为 3 种亚型: nNOS, iNOS 和 eNOS; 其中 eNOS 和 nNOS 又统称 cNOS, 是许多正常组织中基本存在的一种酶, 它为 Ca^{2+} /钙调素依赖型, 合成及释放 NO 量少, 且 cNOS 合成的 NO 寿命极短。iNOS 为非 Ca^{2+} 依赖型, 它能够持续大量释放 NO。给予 LPS 后 iNOS 的活性较基础状态增加 4 倍, cNOS 的活性较弱, iNOS 活性增加是产生和释放大 NO 的主要原因。

与 NOS 活性变化一致, 给予 LPS 6 h 后, 大鼠心肌组织 iNOS 表达明显增多 ($P < 0.01$); eNOS 和 nNOS 的表达均明显减弱。敲除 iNOS 基因和应用 iNOS 阻断剂后, 可恢复心血管系统对儿茶酚胺的敏感性^[3]; 但是应用 NOS 阻断剂 SMT、L-Nil 和 546C88 反而增加脓毒症的死亡率^[4], 提示脓毒症时不仅 iNOS 在器官损伤中发挥作用, cNOS 也可能发挥一定作用。

生理条件下, eNOS 催化产生的 NO 可以透过细胞膜进入血管腔, 发挥抑制白细胞附壁、聚集的作用。脓毒症时, 心肌血管内白细胞附壁能力增强、黏附分子表达增多、自由基生成增加和血小板聚集、附壁增多^[5]; 脓毒症时心肌细胞上过表达 eNOS 可防止心功能降低^[6]。本研究表明, 脓毒症大鼠模型 eNOS 表达减少, 提示其可能在心功能受损中发挥作用。nNOS 首次发现时的组织细胞定位在神经元细胞上。且发现它在心脏的交感神经、副交感神经和心肌细胞上也有表达。基础条件下其表达量较 eNOS 少, 并且给予 LPS 处理后, 心肌细胞 nNOS 的表达量进一步减少。关于 nNOS 在心脏中的作用目前研究较少。基础条件下, nNOS 产

生的 NO 在心肌细胞对胆碱能和肾上腺能信号转导的调节和肌浆网 Ca^{2+} 转运中发挥重要作用^[7]。基础条件下 nNOS 主要在心肌细胞的胞浆和胞膜上表达,脓毒症时心肌细胞上 nNOS 的表达减少,提示 nNOS 产生 NO 减少也可能参与心肌细胞功能障碍。另外在对心脏功能调整过程中,各型 NOS 间存在相互调节^[8],在同一疾病不同时间发挥着不同作用;这是一个庞大复杂的体系,因此在脓毒症时各型 NOS 的作用值得进一步研究。

【参考文献】

- [1] Fernandes CJ Jr, Akamine N, Knobel E. Myocardial depression in sepsis[J]. Shock, 2008, 36(Suppl): 14-17.
- [2] Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors[J]. Endotoxin Res, 2005, 11(1): 5-11.
- [3] Barth E, Radermacher P, Thiemermann C, *et al.* Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic murine model of septic shock[J]. Crit Care Med, 2006, 34(2): 307-313.
- [4] Lee CC, Lin NT, Hsu YH, *et al.* Inducible nitric oxide synthase inhibition potentiates multiple organ dysfunction induced by endotoxin in conscious rats [J]. Cardiovasc Pharmacol, 2005, 45(5): 396-403.
- [5] David EJ, David RN, Brian WG. Leukocyte and endothelial cell interactions in sepsis: relevance of the protein C pathway[J]. Crit Care Med, 2004, 32(Suppl): S280-S286.
- [6] Ichinose F, Buys ES, Neilan TG, *et al.* Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 prevents myocardial dysfunction in murine models of septic shock[J]. Circ Res, 2007, 100(1): 130-139.
- [7] Wang H, Kohr MJ, Traynham CJ, *et al.* Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 296(6): C1566-1575.
- [8] Casadei B. The emerging role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of myocardial function[J]. Exp Physiol, 2006, 91(6): 943-955.

(收稿日期:2009-05-30;修回日期:2010-07-23)

• 消 息 •

《心血管病防治知识》杂志约稿

《心血管病防治知识》(半月刊)是由国家新闻出版总署批准,中华人民共和国卫生部、中国科学技术协会、中华医学会心血管病学会、卫生部心血管病防治研究中心指导,广东科学技术协会主管主办的国家一级专业性学术刊物。

《心血管病防治知识》创刊于 2002 年,2010 年 7 月 5 日经广东省新闻出版局批准为半月刊,每月出版两期,上半月为科普,下半月为专业学术,本刊以广大心脑血管疾病的预防与临床工作者为主要读者对象,报道最新专业领域资讯及临床领先的科研成果和经验,以及对临床有指导作用且与临床紧密结合的基础理论研究。本刊国际刊号:ISSN1672-3015,国内刊号:CN44-1581/R,邮发代号:46-192,定价:8 元,月刊。全国各大邮局均可订阅。

办刊宗旨:贯彻党和国家的卫生工作方针政策,贯彻理论与实践、普及与提高相结合的方针,反映我国疾病预防及临床与科研工作的重大进展,促进国内外的学术交流。

本刊栏目为论著、临床观察/研究、综述与进展、专题报告、理论探讨、经验交流、病例讨论、临床护理等栏目的稿件,欢迎投稿。

投稿邮箱:北京市北京大学 100871-009 信箱

邮编:100871

投稿邮箱:xxgbfz@163.com

咨询电话:010-52580688

网址: <http://www.hao910.com/xxgfbz>