

动脉粥样硬化大鼠血管组织内皮素转换酶 1 的表达

Expression of endothelin-converting enzyme-1 in vascular tissues of atherosclerotic rats

徐正平¹, 朱健华², 邹瑞秀¹, 孙云¹, 姚登福²

(1. 南京医科大学附属常州市第二人民医院心内科, 常州 213000; 2. 南通大学附属医院心内科, 南通 226001)

[摘要] **目的:**观察内皮素转换酶 1 (endothelin-converting enzyme-1, ECE-1)在动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)大鼠中的表达情况,探讨 AS 可能的内皮发生机制。**方法:**雄性 SD 大鼠,随机分为正常组和 AS 组($n=8$);AS 组大鼠以高脂饮食方法建立 AS 模型,正常组大鼠正常饮食。免疫组织化学法、RT-PCR 分别分析两组动脉组织中 ECE-1 蛋白及 mRNA 表达;提取动脉血管膜蛋白,以内皮素前体作为底物与一定量的组织膜蛋白进行酶解反应,放射免疫法测定酶解产物 ET-1 的含量,观察组织 ECE-1 的体外活性;放射免疫法比较两组大鼠血浆中 ET-1 的含量。**结果:**正常组大鼠的血管内皮细胞和中膜平滑肌细胞(SMC)中有 ECE-1 微弱表达(8.58 ± 0.92),阳性染色常位于细胞膜和胞质内;AS 组大鼠的血管内皮细胞和内膜 SMC 中 ECE-1 表达显著增高($19.12 \pm 0.37, P < 0.01$)。AS 组大鼠血管组织 ECE-1 mRNA 表达(2.04 ± 0.18)明显高于正常组($0.83 \pm 0.01, P < 0.01$);AS 组大鼠血管组织 ECE-1 体外活性高于正常组 [22.47 ± 1.49 vs (18.89 ± 1.55) pg/ml, $P < 0.05$];AS 组大鼠血浆 ET-1 值明显高于正常组(79.42 vs 32.25 pg/ml, $P < 0.01$)。**结论:**大鼠血管组织 ECE-1 异常表达可能通过提高血浆 ET-1 含量促进 AS 的发生发展。

[关键词] 内皮素转换酶 1;动脉硬化;内皮素 1

[中图分类号] R 543.5

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2006)04-0437-03

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的形成是一个缓慢而复杂的过程,其发病机制至今尚未完全阐明。损伤反应学说认为内皮结构和功能的完整性对于血管的内环境稳定很重要;内皮受损被认为是 AS 发生的最早标志之一,是导致中层平滑肌细胞(SMC)增殖和收缩的关键。内皮细胞可通过释放生长因子和血管活性物质等来影响 SMC 的增殖和收缩^[1],其中内皮素(endothelin, ET)是一种内源性常效和强效的血管收缩剂,能引起血管收缩、血小板聚集和 SMC 增殖,是动脉内皮受损的显著特征,与 AS 的发展转归有确定的关系。内皮素转换酶(endothelin-converting enzyme, ECE)是 ET 生物合成的关键酶,在体内 ET 生物活性调节上起着极为重要的作用。心血管系统 ECE 含量丰富,ECE 表达上调和相应肽含量增加可生成大量的 ET,导致一系列病理生理效应。

本研究通过建立 SD 大鼠 AS 模型,RT-PCR 观察 ECE-1 基因表达;免疫组织化学法观察动脉组织中 ECE-1 蛋白的表达;分析动脉膜蛋白,将组织 ECE-1 的活性表示为单位质量膜蛋白一定时间内转化 ET-1 的量;放射免疫法检测血浆 ET-1 变化水平;旨在探讨 ECE-ET 系统在 AS 中的可能作用。

1 材料和方法

1.1 动物分组和 AS 模型的制备 正常成年雄性 SD 大鼠 16 只,体质量 200 g(南通大学实验动物中心),胆固醇和胆酸钠(上海新兴化学试剂公司);随机分为正常对照组和 AS 组,每组 8 只;正常对照组喂基础饲料 100 g/(kg·d),AS 组喂高脂饲料(胆固醇 1.5% + 胆酸钠 0.5% + 丙基硫氧嘧啶

0.2% + 白糖 5% + 猪油 10%)和基础饲料 100 g/(kg·d)。1.2 标本采集 实验第 12 周,各组动物禁食过夜,在 1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔麻醉下,分离腹主动脉,在肾动脉分叉处下方,剪开腹主动脉,插入穿刺针,以注射器采集动脉血,用 3 000 r/min 立即离心 15 min,分离血浆,取 1 ml 用于检测 ET 含量;剪下主动脉,取胸主动脉下段约 1 cm 立即用 10%甲醛溶液固定,用于 H-E 染色及免疫组织化学检查,其他的置冰生理盐水中清洗,液氮中速冻后置 -80℃ 保存备用。

1.3 免疫组织化学法测定大鼠动脉组织 ECE-1 表达 SD 大鼠动脉组织标本,制成蜡块后,5 μm 厚连续切片;动脉组织经中性缓冲甲醛溶液固定 12 h,常规石蜡包埋切片,0.125%胰蛋白酶 37℃ 消化 20 min 行抗原修复,加一抗兔抗大鼠 ECE-1 抗体(1:100),4℃ 孵育过夜,后加入辣根过氧化物酶标记的第二抗体,再利用二氨基联苯胺进行显色,苏木精复染后封片观察(所有试剂均来自武汉博士德公司)。

定性分析:由两个专业病理医师进行双盲阅片,每张切片随机选取 10 个视野($\times 500$),以细胞膜及胞质黄染为阳性;按染色的强度的不同分为 5 级:无着色(-),淡黄色(±),棕黄色(+),深棕黄色(++),棕褐色(+++)。定量分析:每组标本随机选 10 张切片,每张切片选择 10 个高倍视野($\times 500$),计算每个高倍视野中的阳性细胞数,取其平均值。

1.4 RT-PCR 测定 ECE-1 mRNA 的表达 (1)RNA 提取及定量:异硫氰双胍-酚氯仿一步法提取总 RNA,紫外分光

[作者简介] 徐正平,硕士,主治医师。

E-mail: xzhengp@yahoo.com.cn

光度计定量,纯度 D_{260}/D_{280} 均在 1.8 以上。(2)逆转录:采用 RT 试剂盒(上海生工生物工程技术有限公司),总反应体积为 20 μl ,反应体系包括:0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ RNA 4 μl ,5 \times buffer 4 μl ,10 mmol/ml dNTP 2 μl ,0.2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Radomer 1 μl ,20 U/ μl Rase 1 μl ,1 μl AMV,7 μl DEPC 水;42 $^{\circ}\text{C}$,55 min;95 $^{\circ}\text{C}$,5 min。反应结束后 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存或置于冰上进行后续实验。(3) PCR 扩增:目的基因序列参照文献^[2],内参根据 GenBank 登录的大鼠 GAPDH 基因的全长 cDNA 序列,通过 Primer3 软件设计,并经 GenBank BLAST 进行同源性检索后,由上海生工生物工程技术有限公司合成部合成。ECE-1 基因引物序列:上游 5'-CGT AGC GAT AGT CTT AGC AC-3';下游 5'-GTG CCA CAC CAA AAC TAC AG-3',扩增长度 529 bp;内参基因 GAPDH 引物序列:上游 5'-GAA CAG GCT CTT AGC ACA GC-3',下游 5'-CAC TGC CAC TCA GAA GAC TG-3',扩增长度 834 bp。经浓度梯度和循环梯度优化扩增条件后,在 50 μl PCR 反应体系中,加入 2 μl cDNA、5 μl 10 \times buffer、10 mmol/ml dNTP 5 μl 、25 mmol/ml MgCl_2 2.5 μl 、10 pmol/L ECE-1 上下游引物各 2 μl 、2 U/ μl Taq 酶 0.5 μl 、29 μl DEPC 水。反应程序:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ \times 3 min,退火 58 $^{\circ}\text{C}$ \times 1 min,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 3 min 后,再变性 94 $^{\circ}\text{C}$ \times 15 s,退火 58 $^{\circ}\text{C}$ \times 20 s,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 1 min,6 次循环后加入 10 pmol/L 内参上下游引物各 1 μl 扩增致 33 个循环;循环结束后,延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ \times 5 min。(4)PCR 产物检测:取 10 μl PCR 产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,放射自显影,凝胶激光光密度扫描仪(型号 LKB2400GELSCANXL 型)扫描 X 光片上的条带,以 ECE-1 条带积分光密度值与 GAPDH 条带积分光密度值的比值表示 ECE-1 mRNA 表达水平。

1.5 两组大鼠动脉血管膜组织 ECE-1 体外活性的测定 以 ET 前体(Sigma 公司)作为底物与一定量血管膜组织在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下进行酶解反应 1 h,放免法测定其酶解产物 ET-1 的量,用单位质量膜蛋白一定时间内转化 ET-1 的量表示组织 ECE-1 的体外酶活性。

1.6 两组大鼠血浆 ET-1 含量的测定 放免法测定两组大鼠血浆 ET-1 含量,试剂盒购自北京北方生物技术研究所。

1.7 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 Stata 7.0 统计分析软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 大鼠动脉组织 H-E 染色观察 正常对照组可见管腔圆形,内膜、中膜和外膜分界清楚,管腔面由单层内皮细胞覆盖,细胞完整,中膜主要见梭形平滑肌细胞;外膜较薄,为疏松结缔组织(图 1A)。AS 组光镜下观察可见到大量泡沫细胞,呈空泡状,管壁内皮细胞脱落,内膜增厚,斑块表面纤维帽薄,突出的斑块内含有坏死物质,平滑肌细胞减少,纤维组织增生伴片状或点状钙化,中膜明显萎缩,呈较典型的成熟动脉粥样硬化斑块(图 1B)。

2.2 大鼠动脉组织 ECE-1 免疫组化结果

2.2.1 定性观察 ECE-1 免疫组化显示正常对照组为(±~+),主要在内皮细胞和中膜 SMC 中微弱表达,位于细胞膜和胞质内(图 2A);AS 组定性为(卅),在内皮细胞和内膜 SMC 中表达增高,尤其在斑块和炎症细胞中表达显著(图 2B)。

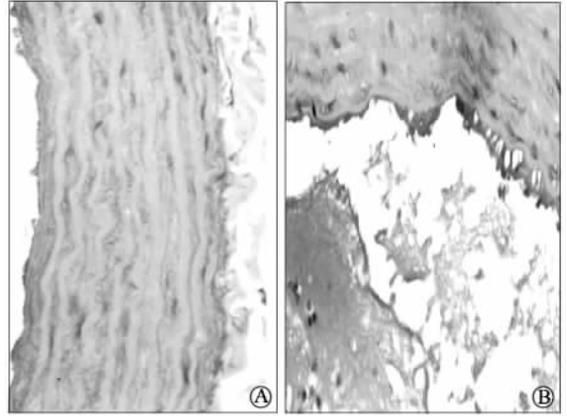


图 1 两组大鼠动脉组织的病理形态学比较 ($\times 250$)

A: 正常对照组; B: AS 组

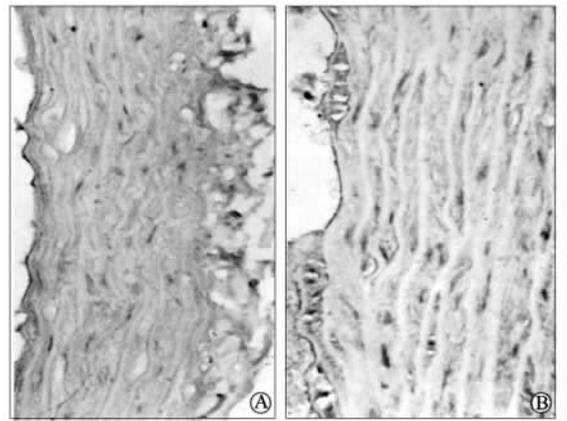


图 2 ECE-1 免疫组化表达 ($\times 500$)

A: 正常对照组; B: AS 组

2.2.2 免疫组化 ECE-1 阳性细胞计数分析 动脉粥样硬化组 ECE-1 阳性细胞明显增加:AS 组(19.12 \pm 0.37),正常组(8.58 \pm 0.92),两组间差异显著($P<0.01$),表明 AS 组大鼠动脉 ECE-1 阳性细胞计数增加。

2.3 动脉组织 ECE-1mRNA 的表达分析 AS 组 ECE-1 mRNA 表达水平(2.04 \pm 0.18)明显高于正常组(0.83 \pm 0.01, $P<0.01$)。

2.4 两组大鼠动脉组织 ECE-1 酶体外活性的比较 AS 组大鼠 ECE-1 酶体外活性为(22.47 \pm 1.49) pg/ml,正常组为(18.89 \pm 1.55) pg/ml,组间差异显著($P<0.05$),表明 AS 组大鼠 ECE-1 酶体外活性明显增加。

2.5 两组大鼠血浆 ET-1 测定 AS 组血浆 ET-1 水平(79.42 \pm 4.22) pg/ml 较正常组(32.25 \pm 4.71) pg/ml 明显

增加,两组之间相比有显著差异($P < 0.01$)。

3 讨论

本研究发现 ECE-1 mRNA 在正常 SD 大鼠动脉组织中微量表达,在 AS 大鼠中的表达明显增高,ECE-1 酶活性明显增加,免疫组织化学显示正常 SD 大鼠动脉组织中 ECE-1 在内皮细胞及中膜 SMC 细胞膜和胞质中有微量的表达,而在 AS 动脉组织 ECE-1 在内皮细胞及内膜 SMC 表达增高,尤其在斑块和炎症细胞中表达显著,与有关文献报道^[3]基本一致。AS 组大鼠 ECE-1 在内皮细胞及内膜 SMC 表达增高,主要是因为 SMC 至少有二种表现形,一种为有收缩性,另一种为有合成性。有收缩性的表现形细胞能对 ET 等血管调节物质起反应,而合成性表现形细胞表达几种调节分子,对于生长因子起反应,并表达相应受体,合成细胞外基质。在 AS 发展过程中,由于受血管张力的影响以及内皮损伤后释放的细胞因子作用下,ECE-1 表达上调及其酶的活性升高导致局部 ET-1 分泌增多,刺激 SMC 纤维化并向内膜移行增生。收缩性表现形转化为合成性表现形,增长并合成胶原,使病变成为纤维斑块。

内皮能调节血管的正常收缩和舒张,这是通过其自身分泌、释放的多种血管活性物质来实现的。其中最重要的是 ET。本实验对 AS 组和正常对照组血浆 ET-1 含量进行了比较,AS 组血浆 ET-1 水平显著高于对照组,两组间血浆 ET-1 水平差异非常显著,提示 ET 参与 AS 的发病过程。有研究^[4]发现,动脉粥样硬化时,血浆 ET 含量增高与血管内皮细胞损伤和 ET 释放增加有关,当 ET 增高到一定程度时,引起动脉痉挛,进一步损害内皮细胞,从而促进 AS 的形成。同时,ET 还具有较强的生长因子样活性,可促进 SMC 增殖,在 AS 的发生发展中起重要作用。实验显示将 10^{-7} mol/L ET 加入 SMC 的培养液中,4 d 后可使细胞数增加 2 倍,DNA 合成增加 7 倍。ET 促 SMC 增殖作用与生长因子关系密切,联合应用 ET 和生长因子时,其效应比分别作用之和高出 1 倍以上,提示 ET 可加强并协同生长因子使 SMC 增殖。实验证明,血小板衍生生长因子(PDGF)、Ang II、转化生长因子(TGF)以及 ET 本身均可促进 ET 基因的表达,协同促进 ET 的合成和分泌,促 SMC 增殖,故 ET 也是一种很强大的促 SMC 增殖剂,且与脂质过氧化物和 PDGF 等相互

影响,构成 AS 发病的重要因素^[5,6]。因此高浓度 ET 还通过刺激 SMC 增殖的作用而加重 AS 的发展。

本研究结果表明 ECE-1 存在于正常动脉组织中,发生 AS 后 ECE-1 mRNA 和 ECE-1 蛋白高表达;ECE-1 表达上调所导致的血 ET-1 含量明显升高可能促进了 AS 的发展,为临床开发新的抗动脉粥样硬化药物如内皮素转化酶抑制剂和内皮素受体拮抗剂提供理论依据^[7,8]。

[参考文献]

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 362: 801-809.
- [2] Wang X, Douglas SA, Loudon C, et al. Expression of endothelin-1, endothelin-3, endothelin-converting enzyme-1 and endothelin-A and endothelin-B receptor mRNA after angioplasty induced neointimal formation in the rat[J]. *Circ Res*, 1996, 78: 322-328.
- [3] Hai E, Ikura Y, Naruko T, et al. Alterations of endothelin-converting enzyme expression in early and advanced stages of human coronary atherosclerosis[J]. *Int J Mol Med*, 2004, 13: 649-654.
- [4] Naruse M, Kawana M, Hifumi S, et al. Plasma immunoreactive endothelin, but not thrombomodulin, is increased in patients with essential hypertension and ischemic heart disease [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991, 17 (Suppl 7): S471-S474.
- [5] Fakhouri F, Placier S, Ardaillou R, et al. Angiotensin II activates collagen type I gene in the renal cortex and aorta of transgenic mice through interaction with endothelin and TGF- β [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12: 2701-2710.
- [6] Damon DH. VSM growth is stimulated in sympathetic neuron/VSM cocultures: role of TGF- β 2 and endothelin [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278: 404-411.
- [7] Ihling C, Bohrmann B, Schaefer HE, et al. Endothelin-1 and endothelin converting enzyme-1 in human atherosclerosis-novel targets for pharmacotherapy in atherosclerosis [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2004, 2: 249-258.
- [8] Jeng AY. Utility of endothelin-converting enzyme inhibitors for the treatment of cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2003, 4: 1076-1081.

[收稿日期] 2005-09-20

[修回日期] 2006-03-01

[本文编辑] 贾泽军