

细胞色素 P450 花生四烯酸表氧化酶 BM₃F87V 上调内皮一氧化氮合酶基因的表达*

王红林 林立 陆再英 汪道文**

华中科技大学同济医学院附属同济医院心内科, 武汉 430030

摘要 血管内皮细胞富含细胞色素 P450 表氧化酶, 它代谢花生四烯酸产生内皮源性超极化因子, (EDHF, 即 EETs), 它与血管内皮细胞产生的一氧化氮(NO)之间的关系尚不清楚. 经转基因技术在原代培养的牛主动脉内皮细胞中产生内源性 EDHF, 并研究了 EDHF 对 NO 合成的关键酶——内皮 NO 合酶(eNOS)基因表达的调节作用. 将表氧化酶基因 CYP BM₃F87V 克隆于真核表达载体 pCB₆, 转染了经 3~4 代培养的牛主动脉内皮细胞, 产生高浓度的内源性 14, 15-EET. 采用 Western blot 和 Northern blot 分别从蛋白质水平和 RNA 水平判断内源性 14, 15-EET 对 eNOS 基因表达和转录的影响, 同时根据 [³H] L-精氨酸转变为 [³H] L-瓜氨酸的水平来判断其对 eNOS 活性的影响. 结果显示: 与转染 pCB₆ 的对照细胞相比, 转染的 pCB₆-BM₃F87V 在内皮细胞中过度表达后能显著上调 eNOS 的蛋白质表达和 eNOS 的 mRNA 水平, 明显增加了 eNOS 的活性. 因此, 转染表氧化酶 BM₃F87V 对 eNOS 基因有显著上调作用. 这提示细胞色素 P450 表氧化酶能够通过促进内皮细胞内 EDHF 的产生来调节 NO 生成, 进而改善内皮细胞功能, 这可能为治疗心血管疾病提供了一种新思路.

关键词 内皮源性超极化因子 14, 15-EET 内皮 NO 合酶 血管内皮细胞

血管内皮细胞可以合成分泌多种自体活性物质, 对血管张力和局部脏器的血流调节发挥重要的作用, 其中包括内皮源性舒张因子(EDRF)即一氧化氮(NO)和前列环素(PGI₂), 又以 NO 作用最为重要^[1]. NO 是由内皮细胞经内皮 NO 合酶代谢 L-精氨酸生成, 它除对血管张力和动脉血压的调节发挥重要作用外, 在抑制平滑肌细胞的迁移和增殖、防止血小板的粘附和聚集、防止血栓形成、抑制炎症反应等方面也具有非常重要的作用, 是维持血管稳态、保护内皮功能的重要因子^[1, 2].

除 NO 和 PGI₂ 外, 近年来发现内皮细胞还分泌另外一种扩血管因子, 它通过激活钙离子敏感的钾通道, 使平滑肌细胞处于超极化状态而扩张血管, 因此称之为内皮源性超极化因子(EDHF)^[3, 4]. EDHF 介导的内皮依赖性超极化扩管效应对 NO,

PGI₂ 介导的内皮依赖性血管舒张反应的补充或加强, 但在某些病理情况下以及某些微血管如冠脉微循环中则可能起着更为重要的作用. 研究认为内皮细胞通过细胞色素 P450 表氧化酶(CYP)途径代谢花生四烯酸产生的表氧化产物 EETs 就是 EDHF^[3~5].

EDHF 和 NO 都来源于内皮细胞, 都具有扩血管作用, 但作用机制完全不同. 因此, 阐明两者之间的关系引起了学者们广泛的研究兴趣. 曾有国外学者报道 NO 可以明显减少 EDHF 的释放^[6], 但 EDHF 对 NO 的影响则未见报道. 本研究采用分离培养的牛主动脉内皮细胞, 在培养第 4 代以前对其转染 P450 表氧化酶基因 P450 BM₃F87V 以选择性增加内源性 14, 15-EET, 通过检测内皮 NO 合酶(eNOS)在转录和蛋白质水平上的变化及酶活性的改

2001-08-15 收稿, 2001-12-30 收修改稿

* 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39870307)

** 联系人, E-mail: dwwang@tjh.tjmu.edu.cn

变来判断 EDHF 对 eNOS 基因的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

人 eNOS 全长 cDNA 由美国 Harvard 大学 Liao 博士赠送。细胞培养试剂, 如 DMEM 培养基、胎牛血清(FBS)、胰蛋白酶(Trypsin)等均购自 GIBCO 公司; [³H] L-arginine 购自美国 NEN 公司; 苯甲基磺酰氟(PMSF), leupeptin, aprotinin, dithiothreitol (DTT), N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), 钙调蛋白(camodulin), NADPH, L-arginine, HEPES, Tween-20, 牛血清白蛋白(BSA), Dowex 50WX-8 树脂, 17-ODYA(17-octadecynoic acid)和其他生化试剂及抗人Ⅷ因子-相关抗原(von Willebrand 因子)抗体购自 Sigma 公司; 抗 eNOS 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶偶联羊抗兔 IgG 抗体购自 Jackson 公司; Western 杂交显影用增强的化学发光试剂购自美国 PIERCE 公司; 核酸杂交液购自 Intergen 公司; 蛋白杂交膜(PVDF 膜)和尼龙膜购自德国 Schleicher and Schuell 公司; 探针标记试剂盒购自美国 Stratagene 公司; [^{α-32}P] CTP (3000Ci⁻¹/mmol)购自北京亚辉同位素公司; 细胞转染试剂采用德国 QIAGEN 公司的 Superfect 脂质体。

1.2 牛主动脉内皮细胞的分离和培养

从屠宰厂取刚处死小牛主动脉, 用 0.25% 胰蛋白酶灌注消化法^[7]分离收集内皮细胞, 在 DME 培养基(含 5 mmol/L 谷氨酰胺、10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 mg/L 链霉素)中于 37℃, 5% CO₂ 条件下培养, 细胞达汇合后用 0.05% Trypsin 和 0.02% EDTA 消化传代。在显微镜下观察细胞形态并进行免疫荧光染色(抗 von Willebrand 因子抗体)鉴定内皮细胞的纯度, 证明为 95% 以上。所有实验均用 4 代以内细胞进行。

1.3 表达质粒的构建

CYP BM₃F87V cDNA 由美国 Vanderbilt 大学 Capdevila 教授馈赠。将 3.4 kb 的 BM₃F87V Kpn I/Xba I 片段克隆至真核表达载体 pCB₆ 构成 pCB₆-BM₃F87V。以 pCB₆ 作为对照, 分别大量扩增(Wizard Plus Maxipreps 试剂盒, Promega), 以备作细胞转染用。

1.4 细胞转染和瞬时表达

转染前一天, 将内皮细胞传代至 6 孔培养板(每孔约 3 × 10⁶ 个细胞), 次日细胞长至 60% 以上汇合时, 用 Superfect 脂质体按商品说明要求分别转染 pCB₆-BM₃F87V 及 pCB₆, 继续培养 48 h, 分别按实验要求收获细胞进行 Western blot, Northern blot 和 eNOS 活性分析。

1.4.1 eNOS 活性分析 按 Ramasamy 等介绍的方法^[7]根据 [³H] L-精氨酸转变为 [³H] L-瓜氨酸的量来测定 eNOS 的活性。转染后 48 h 于冰浴下用预冷 PBS 缓冲液洗涤待分析细胞后, 每孔加入 200 μL 匀浆缓冲液(20 mmol/L HEPES, 0.2 mol/L 蔗糖, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, 2 mg/L leupeptin, 2 mg/L aprotinin 和 1 mmol/L PMSF), 刮下细胞并转入离心管中, 用超声破碎机破碎。平行对照组在匀浆前加入 NOS 抑制剂 N^G-monomethyl-L-arginine 1 mmol/L, 室温下放置 15 min。细胞裂解液在 4℃ 离心 2 min 去除细胞碎片, 取 10 μL 上清用 Bradford 方法检测蛋白质浓度, 在剩余上清液加入含以下成分的缓冲液: 20 μmol/L L-arginine, 10 mg/L Camodulin, 3 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L NAPDH, 10 μCi [³H] L-arginine, 37℃ 温育 30 min 后加入 500 μL 冰冷终止缓冲液(20 mmol/L HEPES, 2 mmol/L EDTA)。将总反应液转移至含 2 mL Dowex 50WX-8 树脂(预先用 NaOH 处理成为 Na⁺ 形式)的层析柱中, 并用 2 mL 去离子水洗脱。回收含 [³H] L-citrulline 的洗脱液, 用液体闪烁计数器(中国核工业部, FJ-2107G)检测其放射性, 将所得的实验组 cpm 值减去对照组(加入 N^G-monomethyl-L-arginine 组)相应值算出净放射性, 即代表 [³H] L-citrulline 的量, 也即产生 NO 的量。eNOS 活性则由每毫克蛋白质每分钟产生的 [³H] L-citrulline 的量(cpm 数)来表示。

1.4.2 Western blot 细胞转染后 48 h, 在冰浴下用预冷 PBS 洗涤 1 次, 加入细胞裂解液(50 mmol/L Tris-Cl, pH8.0, 150 mmol/L NaCl, 0.02% NaN₃, 0.1% SDS, 1 mg/L Aprotinin, 1% NP-40, 0.05% 去氧胆酸钠, 100 mg/L PMSF), 20 min 后刮下的细胞转至微量离心管中, 4℃ 离心 2 min 以去除细胞

1) 1 Ci = 3.7 × 10¹⁰ Bq

碎片. 用 Bradford 方法检测裂解液中蛋白质浓度. 加入等量蛋白质电泳分离, 然后经电转移转至 PVDF 膜后, 室温下用含 5% 脱脂奶粉的 TBS-T (10 mmol/L Tris-Cl, 100 mmol/L NaCl, pH7.5, 0.1% Tween20) 并加入兔抗人 eNOS 多克隆抗体 (1:500 稀释) 4℃ 作用过夜, 洗膜 4 次后加入辣根过氧化物酶 (HRPO) 偶联羊抗兔 IgG 抗体 (1:8000 稀释), 按说明书要求加入 ECL 试剂, 室温下放置 2~4 min 后曝光.

1.4.3 Northern blot 细胞转染后 48 h, 用 TRIZOL 核酸提取试剂提取总 RNA, 10 μg RNA 经 1.2% 甲醛-琼脂糖凝胶电泳进行分离后, 转至尼龙膜上, 并与 [α -³²P] dCTP 标记的人 eNOS cDNA 和看家基因 GAPDH cDNA 探针于 45℃ 杂交过夜. 杂交膜用 2×SSC/0.1% SDS 和 1×SSC/0.1% SDS 在室温下各洗 2 次, 然后用 0.1×SSC/0.1% SDS 在 42℃ 洗 2 次, 每

次 15 min. 最后 -80℃ 曝光 2 h~5 d.

1.5 结果分析

所有实验均重复 3 次以上, Northern 和 Western 杂交的条带密度采用 Gene Tools 软件进行分析.

2 结果

2.1 BM₃F87V 转染对 eNOS mRNA 表达的影响

以往的工作已经证实, pCB₆-BM₃F87V 能在哺乳动物细胞中产生相应的氧化还原酶并能有效代谢花生四烯酸生成 14, 15-EET^[8]. 将 pCB₆-BM₃F87V 转染牛主动脉内皮细胞, 对照组转染空载体 pCB₆, 转染后 48 h 后经 BM₃F87V 转染的内皮细胞中的 eNOS mRNA 水平较对照组 (pCB₆ 转染细胞) 显著增高 (图 1), 表明内源性 EDHF 能显著增加内皮细胞中 eNOS 基因的转录.

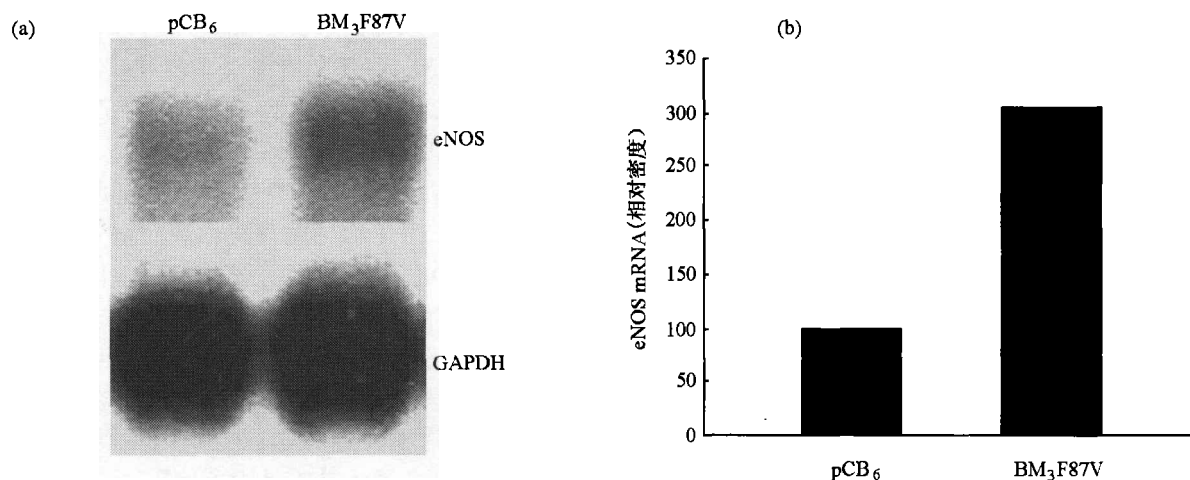


图 1 BM₃F87V 转染对 eNOS mRNA 转录水平的影响

(a) Northern blot 结果, 显示 BM₃F87V 转染后 eNOS mRNA 转录水平增高, 以 GAPDH 作为参照;

(b) 密度扫描分析结果 (用 GAPDH 进行标化)

2.2 BM₃F87V 转染对 eNOS 蛋白表达的影响

经 pCB₆-BM₃F87V 转染的牛主动脉内皮细胞, 48 h 后提取细胞裂解液进行 Western blot 分析, 显示 BM₃F87V 转染的内皮细胞中 eNOS 蛋白表达水平显著增高 (图 2). 为进一步证明这一效应与 BM₃F87V 的关系, 我们在细胞转染后 24 h 加入细胞色素 P450 酶的抑制剂 17-ODYA (100 μmol/L), 继续培养 24 h 后收获细胞并进行 Western blot 分析. 结果显示, 17-ODYA 使 eNOS 表达上调的效应被抑

制 (图 2), 证明 eNOS 蛋白表达上调的效应是 BM₃F87V 基因表达的结果.

2.3 BM₃F87V 转染对 eNOS 活性的影响

利用 [³H] L-arginine 能够转变为 [³H] L-citrulline 的原理测定了 NO 合酶的活性. 结果显示转染 BM₃F87V 的内皮细胞中 eNOS 酶活性显著高于对照组, 产生的 [³H] 瓜氨酸量前者为 (25.85 ± 3.89) pmol·min⁻¹·mg⁻¹, 后者为 (7.84 ± 2.48) pmol·min⁻¹·mg⁻¹.

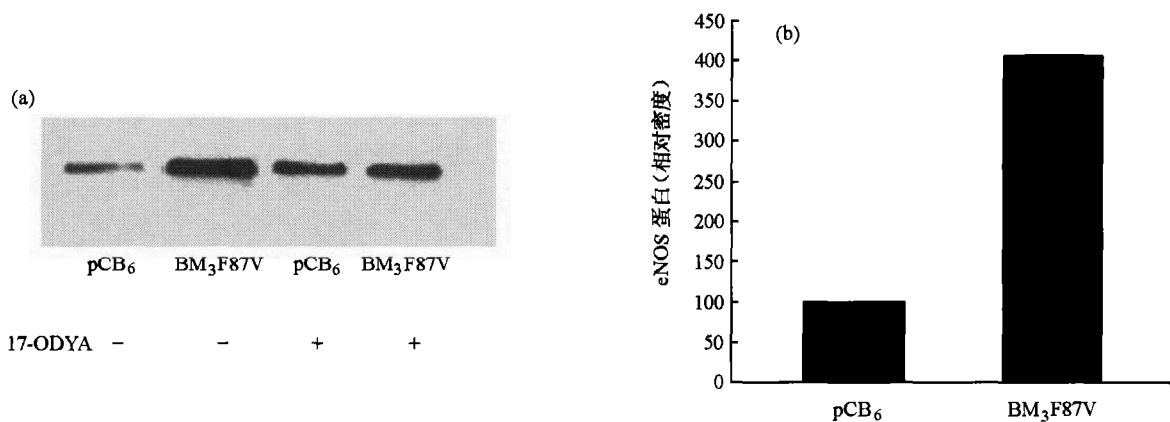


图2 BM₃F87V 转染对 eNOS 蛋白表达水平的影响

(a) Western blot 结果; (b) 密度扫描结果

3 讨论

近年来人们发现内皮细胞可以分泌一种不同于 NO 和 PGI₂ 的第 3 类内皮源性扩血管因子, 即 EDHF. 这种因子通过激活钙离子敏感的钾通道, 使内皮下的平滑肌细胞发生超极化反应而产生内皮依赖的扩血管效应. 除具有上述内皮依赖的超极化扩管效应外, 它还刺激肾脏表皮细胞的增殖, 在表皮生长因子(EGF)诱导的肾脏表皮细胞的增殖反应过程中作为细胞内的第二信使分子^[9]. 最近 Node 等^[10]发现将另一种细胞色素 P450 表氧化酶(CYP2J2)转染内皮细胞能抑制细胞因子诱导的内皮细胞粘附分子的表达, 能抑制白细胞粘附至内皮细胞的表面, 从而具有抗炎作用.

内皮源性舒张因子即 NO 是由内皮细胞分泌的一种十分重要的血管扩张物质, 对全身血管稳态的维持和全身血压的调节起着重要作用. 此外, NO 也具有抑制平滑肌细胞增殖、抑制白细胞粘附、抑制细胞凋亡和抗炎等效应, 是防止血栓形成和抗动脉粥样硬化, 维持正常内皮功能的一种重要物质^[1,2]. 由于 NO 和 EDHF 都是由内皮细胞分泌的扩血管因子, 在其他方面也有一些相近似的重要作用, 因此, 研究探讨两者之间的相互作用或关系有着较大价值和意义.

CYP BM₃F87V 是巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 细胞色素 P 450BM₃ 在其第 87 位的苯丙氨酸被缬氨酸取代形成的突变体, 已证实其能有效代谢花生四烯酸并选择性地产生单一产物 14S, 15R-EET^[8]. 我们通过在外培养的内皮细胞中转染 CYP BM₃F87V 基因, 选择性增加内源性 14S,

15R-EET 的产生来研究这种特定的 EDHF 对 eNOS 的影响. 结果在蛋白质水平和 RNA 水平都证实 14S, 15R-EET 可以增加 eNOS 的表达, 并能增加 eNOS 的酶活性, 因此对 eNOS 基因表达具有上调作用. 在加用细胞色素 P450 酶抑制剂 17-ODYA 而抑制 14S, 15R-EET 的产生后, 则对 eNOS 的上调作用被抑制, 进一步证实了经 BM₃F87V 产生的 14S, 15R-EET 上调 eNOS 的作用.

前面提到, EETs 具有扩张血管作用, 但多数研究都认为 EDHF 介导的内皮依赖性超极化效应可能只是对 NO 依赖的血管舒张反应的一种补充或加强, 在正常生理情况下和对多数正常血管而言, NO 对血管张力的调节作用是最主要的调节机制^[3,4]. 但是在某些疾病如高胆固醇血症、高血压、糖尿病、动脉粥样硬化等, 由于内皮功能受损使 NO 合成减少或 NO 通路受限, 此时 NO 的扩管反应被减弱. 有研究发现, 生理浓度的 NO 可以减弱 EDHF 的释放及 EDHF 介导的超极化扩管反应, 在病理情况下, 内皮功能受损使 NO 合成和释放减少, 对 EDHF 的抑制作用也降低, 这使 EDHF 得以发挥其超极化扩管效应, 维持相对正常的内皮舒张功能^[6]. 而我们的研究发现, EDHF 对 eNOS 的表达具上调效应, 可增加 NO 的产生. 因此我们认为, 病理情况下, 机体除通过 EDHF 介导的超极化扩管反应来减轻内皮舒张功能的受损外, 还可通过增加 EETs 的产生^[11,12]使 NO 合成和释放增多, 进一步减轻内皮舒张功能的障碍. 前面提到, NO 除扩管作用外, 还有抑制平滑肌细胞增殖、抑制白细胞粘附、抑制细胞凋亡和抗炎等效应^[2], NO 是抗动脉粥样硬化的重要因子, 因此 EETs 对 eNOS 的

上调作用也就具有更重要的意义,通过增加 NO 的合成可减轻病理情况下内皮细胞功能障碍.

从上所述,NO 和 EDHF 的生物学效应有些相似之处.因此,EDHF 的这些效应是否与其对 eNOS 的上调作用有关,EDHF 是作为信号转导的中间介质,还是直接的效应因子,还有待于进一步研究.

总之,我们的研究结果为认识血管内皮细胞功能的调节及其相关的基因提供了新的理论依据.众所周知,在心血管及其相关疾病中,血管内皮功能失调而致 NO 生成减少,内皮素、粘附分子等物质生成增多是核心环节.本研究结果提示通过药物调节内皮表氧化酶能够进一步调节 NO 生成以及内皮细胞功能,从而为心血管疾病的治疗提供一个新思路.

参 考 文 献

- 1 Vallance P, et al. Effect of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*, 1989, 21: 997
- 2 Cannon R O. Role of nitric oxide in cardiovascular disease: Focus on the endothelium. *Clin Chem*, 1998, 44(8 Pt 2): 1809
- 3 Cohen R A, et al. Endothelium-dependent hyperpolarization, beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation*, 1995, 92: 3337
- 4 Quilley J, et al. Hyperpolarizing factors. *Biochem Pharmacol*, 1997, 54: 1059
- 5 Harder D R, et al. Role of cytochrome P450 Moncada S enzymes and metabolites of arachidonic acid in the control of vascular tone. *J Vasc Res*, 1995, 32: 79
- 6 Bauersachs J, et al. Nitric oxide attenuate the release of endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circulation*, 1996, 94: 3341
- 7 Ramasamy S, et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase gene expression by oxidized linoleic acid. *J Lipid Res*, 1998, 39: 268
- 8 Graham-Lorence S, et al. An active site substitution, F87V, converts cytochrome P450 BM-3 into a regio- and stereoselective (14S, 15R)-arachidonic acid epoxygenase. *J Biol Chem*, 1997, 272(2): 1127
- 9 Chen J K, et al. Transfection of an active cytochrome P450 arachidonic acid epoxygenase indicates that 14, 15-epoxyeicosatrienoic acid functions as an intracellular second messenger in response to epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 1999, 274: 4764
- 10 Node K, et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*, 1999, 285: 1276
- 11 Pfister S I, et al. Enhanced synthesis of epoxyeicosatrienoic acids by cholesterol-fed rabbit aorta. *Am J Physiol*, 1991, 261: H843
- 12 Rosolowsky M, et al. Synthesis of lipoxigenase and epoxygenase products of arachidonic acid by normal and stenosed canine coronary arteries. *Circ Res*, 1990, 66: 608