文章编号:1000-5404(2005)08-0745-04

论著

去氧皮质酮醋酸盐高血压大鼠模型中GTPCH-1和GFRP表达和活性的变化及其意义

王颖莹[1],张 伟[2],府伟灵[1],张 雪[1] (第三军医大学:[1]西南医院检验科,[2]军事预防医学院劳动卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 检测DOCA盐高血压大鼠模型主动脉上,Ⅰ型GTP环化水解酶及其反馈调节蛋白的合成及活性改变,并探讨其对四氢生物喋呤/内皮一氧化氮合成酶(BH_4/eNOS)系统生成一氧化氮过程的影响。**方法** 以DOCA盐高血压大鼠模型主动脉组织为标本,以Griess试剂测定亚硝酸盐浓度的方法检测NO的水平;采用Western blot检测eNOS蛋白表达水平;应用高效液相色谱法(HPLC)测定BH_4水平和GTPCH-1活性;并通过RT-PCR检测GFRP和GTPCH-1的mRNA表达水平。**结果** 与对照大鼠相比较,在DOCA盐高血压大鼠的主动脉上,NO水平明显下降,eNOS蛋白表达水平和BH_4水平明显降低,GTPCH-1活性及mRNA表达水平显著下降,而GFRP的mRNA表达水平明显增高。**结论** GTPCH-1的合成减少、活性降低,及其活性负调节蛋白GFRP表达增加,可能对DOCA盐高血压大鼠主动脉血管BH_4合成减少、eNOS活性下降及NO水平降低起关键作用。而该机制可能是导致高血压患者动脉血管功能损伤的一个重要原因。

关键词: GTPCH-1;GFRP;BH_4;eNOS;NO;DOCA盐高血压大鼠模型

中图法分类号: R-332, R544.1, Q599 **文献标识码:** A

GTPCH-1 and GFRP mRNA expression levels and activities variation in DOCA-salt hypertension rat

WANG Ying-ying[1], ZHANG Wei[2], FU Wei-ling[1], ZHANG Xue[1] ([1]Department of Clinic Diagnostic Laboratory, Southwest Hospital, [2]Department of Occupational Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine GTPCH-1 and GFRP mRNA expression levels and activity variation in DOCA-salt hypertension rats and to investigate the relationship to the reduction of NO synthesis. **Methods** With the aorta samples from DOCA-salt hypertension rats, the NO levels were examined by nitrite detecting with Griess reagents, endothelial NO synthase (eNOS) protein expression by Western blotting, BH_4 levels and GTPCH-1 activities by HPLC and mRNA levels of GFRP and GTPCH-1 by RT-PCR. **Results** Comparing with sham rats, NO levels and eNOS protein were significantly reduced in aorta of DOCA-salt hypertension rats, while the BH_4 level was markedly decreased. GTPCH-1 activities and mRNA expression levels declined significantly, whereas GFRP mRNA levels were markedly increased. **Conclusion** The decrease in GTPCH-1 expression levels and activities, and the abnormally increased GFRP level directly diminish the synthesis of BH_4, then indirectly down-regulate the activities of eNOS, finally impair NO levels in aorta of DOCA-salt hypertension rat model. This mechanism may play an important role in the development of vessel dysfunction in hypertension patients.

Key words: GTPCH-1; GFRP; BH_4; eNOS; NO; DOCA-salt hypertension rat

愈来愈多的研究资料表明,高血压患者动脉血管壁一氧化氮(NO)浓度的降低是导致内皮依赖性血管功能损伤[1]的重要原因,其具体机制尚未完全明了。

血管壁内皮性一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)的活性下降与NO浓度的降低有

作者简介:王颖莹(1973-),女,北京市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事糖尿病和高血压疾病的发病机制方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754429

通讯作者:府伟灵,电话:(023)68754429

收稿日期:2005-01-05;修回日期:2005-03-07

直接联系。影响eNOS活性的因素很多[2,3]，近年来研究表明，eNOS的辅酶四氢生物喋呤(BH_4)的水平高低与eNOS的活性有着直接的关系，正常水平的BH_4维持着eNOS催化L-精氨酸转化为L-瓜氨酸并释放NO的过程；而BH_4水平下降将导致eNOS活性下降，从而减少NO的产生[4]。

鸟苷三磷酸水解酶(GTP cyclohydrolase-1，GTPCH-1)是BH_4生物合成的限速酶，其活性降低会引起BH_4的生成障碍[5,6]。而GTPCH-1反馈调节蛋白(GTPCH-1 feedback regulatory protein，GFRP)是GTPCH-1活性的重要负调节因子，当它与GTPCH-1结合时可以抑制GTPCH-1的活性。BH_4水平的升高可以促使GFRP与GTPCH-1的结合，最终抑制GTPCH-1催化产生BH_4[7]。但在高血压模型中，以上几方面调节因素的变化趋势与相互关系尚不清楚。

去氧皮质酮醋酸盐(deoxycorticosterone acetate，DOCA盐)高血压大鼠模型[8,9]属于低肾素高血压动物模型，是用于研究血管功能损伤最常用的模型之一。本研究采用DOCA盐高血压大鼠模型对血管内壁GTPCH-1、GFRP、BH_4的生物合成变化趋势，及其与eNOS活性之间的相互关系进行初步研究。

1 材料与方法

1.1 构建实验动物模型

DOCA盐高血压大鼠模型的制作[9]：取体质量250～275 g的正常Spraque-Dawly大鼠15只(购于Charles River Laboratories)，摘除左侧肾，并将200 mg/kg DOCA与硅胶制成的橡皮介质放置在大鼠两侧肩胛骨之间的皮下。在饲养过程中，DOCA大鼠的饮用水含有1.0% NaCl和0.2% KCl。同时取15只SD大鼠设立为对照组(Sham组)，Sham大鼠只摘除左侧肾，但并不使用DOCA盐和高盐饮水。手术4周后通过测量大鼠尾动脉来检测血压情况，血压高于150 mmHg，并持续稳定即为高血压模型。实验时，取1～2 cm长的DOCA和Sham大鼠的主动脉，在显微镜下分离血管组织、脂肪组织和结缔组织备用。

1.2 检测DOCA模型主动脉NO水平

NO半衰期很短，但其代谢产物亚硝酸盐非常稳定，因此可以使用Griess试剂测量亚硝酸盐的浓度，来检测动脉组织中NO的水平。检测过程简述如下：将大鼠主动脉血管剪切成小段，放入EMEM培养液中，于37 ℃、5% CO_2孵箱中孵育24 h，吸取EMEM培养液，加入等体积的试剂混匀，于室温中静置15 min后，使用分光光度计540 nm波段测量EMEM培养液中亚硝酸盐的浓度。并且称量皮肤标本的质量，用其对亚硝酸盐浓度进行标准化。

1.3 Western blot检测eNOS蛋白水平

将大鼠主动脉血管放入预冷匀浆液[0.5 mol/L Tris HCl (pH 6.8)，10% SDS，10% glycerol]中，同时加入蛋白酶抑制剂进行研磨；然后于4 ℃，11 000×g离心10 min，上清即为所需标本；使用Lowry法测量其总蛋白浓度。然后将标本用7.5% SDS-聚丙烯酰胺胶电泳；电转印到PVDF膜上。将膜放入封闭液(0.1% TBST配制的5% 脱脂牛奶)中室温封闭2 h。再将膜放入一抗液(抗eNOS，1∶2 500稀释)中，室温结合2 h；以0.1% TBST漂洗3次，每次10 min。将膜放入IgG-辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶2 000稀释)液中，室温结合30 min；以0.1% TBST漂洗3次，每次10 min。与Supersignal化学发光底物结合1～2 min，于暗室中曝光于X线片，使用KODAK显影机显影。结果使用图像分析仪进行定量分析。

1.4 HPLC测量BH_4水平、GTPCH-1活性

1.4.1 测量BH_4水平 取大鼠主动脉血管剪切成小段并称重，取大约50 mg组织放入300 μl预冷的提取液[50 mmol/L Tris HCl (pH 7.4)，1 mmol/L DTT，1 mmol/L EDTA]中进行研磨；离心收集上清并测定蛋白含量；然后加入等体积比的1.5 mol/L $HClO_4$和2 mol/L H_3PO_4析出蛋白，离心弃去蛋白，取上清；先在酸性条件下氧化：加10 μl 1%碘液(2% KI配制)混匀，避光置于室温60 min，取部分标本待测；然后于碱性条件下氧化：加入10 μl NaOH，再加入10 μl 1%碘液混匀，避光置于室温60 min；加入20 μl H_3PO_4酸化标本，离心收集上清。分别对酸性条件下氧化和碱性条件下氧化的标本进行测定。酸性条件下氧化的标本检测出总生物喋呤包括BH_4、BH_2(二氢生物喋呤)和B(氧化型生物喋呤)；在碱性条件下氧化的标本可以检测出BH_2和B；将BH_2和B从总生物喋呤中除去，就是BH_4含量。

1.4.2 检测GTPCH-1活性 GTPCH水解GTP的反应产物在碱性磷酸酶的作用下可以生成稳定的Neopterin，因此可以在组织匀浆中加入GTP及碱性磷酸酶，最后通过测定Neopterin的水平来反应GTPCH的活性。检测过程简述如下：取大鼠主动脉血管剪切成小段并称重，取大约50 mg组织放入300 μl预冷的提取液中进行研磨。取30 μl匀浆液，加入反应底物(5 μl 0.5 mol/L Tris HCl，5 μl 10 mmol/L DTT，5 μl 10 mg/ml BSA，5 μl 10 mmol/L GTP)，于37 ℃温育2 h，加入5 μl 1 mol/L HCl和5 μl碘液(1% iodine in 2% KI)混匀，避光置于室温20 min。然后加入10 μl 2 mol/L Tris或8 μl 1 mol/L NaOH，混匀并离心。最后加入10 U碱性磷酸酶于37 ℃温育30 min，加入50 μl 1 mol/L H_3PO_4灭活酶，再离心取上清，注射到HPLC仪的Spherisorb ODS-1 column内进行测定。

1.5 RT-PCR检测GTPCH-1和GFRP mRNA水平

检测过程简述如下：分离大鼠主动脉血管，以SV Total RNA Isolation System试剂盒(Promega)提取总RNA；依照Mu-MoLV逆转录酶(Invitrogen)的试剂说明书进行逆转录反应，得到第1链cDNA；然后以*Taq* DNA聚合酶(Promega)进行PCR反应；所需引物序列如下，GTPCH-1正义引物：5′-AGCGCTTGGTAGCACCT-TAG-3′，

反义引物：5′-ACCTCGCATGACCATACACA -3′；GFRP 正义引物：5′-GAGACGAGTCCTGGGAAACA-3′；反义引物：5′-CAAGGTTCCTGAGGCTGTTC-3′。94 ℃变性 4 min；反应 30 个循环，反应条件：94 ℃变性 15 s，57 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 15 s；72 ℃延伸 5 min。PCR 产物以 1.5%的凝胶电泳分离，在凝胶成像仪下扫描结果。

1.6　统计学处理

数据处理采用 Prism 软件进行，各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，各组间比较采用非配对 t 检验，方差分析。

2　结果

2.1　DOCA 高血压大鼠主动脉 NO 的水平

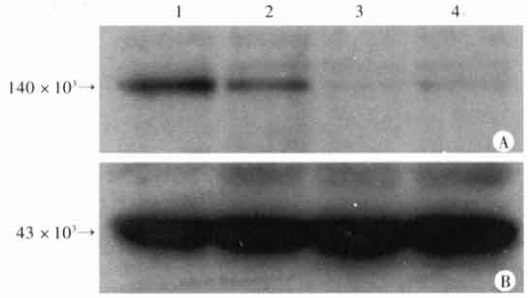
检测显示，Sham 组大鼠主动脉上亚硝酸盐的浓度为 (70.4 ± 3.9) pmol/mg (n = 5)，而 DOCA 盐大鼠主动脉上亚硝酸盐的浓度为(25.8 ± 5.6) pmol/mg (n = 6)。统计学分析结果表明，两者有显著意义差别(P < 0.05)，因此，与 Sham 组相比较，DOCA 盐大鼠主动脉上 NO 水平显著降低(P < 0.05)。

2.2　DOCA 高血压大鼠主动脉 eNOS 蛋白表达水平

Western blot 检测结果表明，DOCA 盐高血压大鼠模型主动脉的 eNOS 蛋白表达水平较 Sham 对照组大鼠明显下降(P < 0.05)，见图 1。

2.3　DOCA 盐高血压大鼠主动脉 BH_4 水平和 GTPCH-1 活性

HPLC 检测显示，Sham 组大鼠主动脉上 BH_4 的浓度为(1.34 ± 0.42) pmol/g (n = 5)，而 DOCA 盐大鼠主动脉上 BH_4 的浓度为(0.35 ± 0.09) pmol/g (n = 6)。统计学分析，DOCA 盐大鼠主动脉上 BH_4 浓度显著降低(P < 0.05)。



A: eNOS; B: actin; 1,2: eNOS and actin of Sham group; 3,4: eNOS and actin of DOCA group

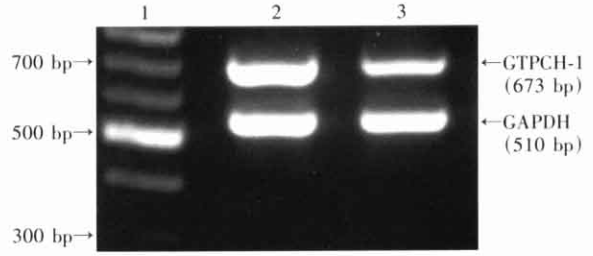
图 1　DOCA 盐高血压大鼠主动脉 eNOS 蛋白表达水平

Fig 1　eNOS expression levels in aorta of DOCA-salt hypertension rat

同时，使用 HPLC 检测 Neopterin 的浓度来反映 GTPCH-1 的活性。实验表明，Sham 组大鼠主动脉上 Neopterin 的浓度为 (0.40 ± 0.03) pmol/g (n = 5)，而 DOCA 盐大鼠主动脉上 BH_4 的浓度为(0.22 ± 0.02) pmol/g (n = 6)。统计学分析，DOCA 盐大鼠主动脉上 Neopterin 浓度显著降低(P < 0.05)，因此，与 Sham 组相比较，DOCA 盐大鼠主动脉上 GTPCH-1 的活性显著降低。

2.4　DOCA 盐高血压大鼠主动脉 GFRP 和 GTPCH-1 mRNA 水平

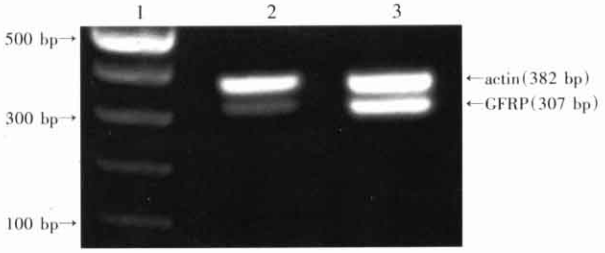
RT-PCR 检测结果表明，DOCA 盐高血压大鼠主动脉的 GTPCH-1 mRNA 水平明显降低(P < 0.05)，而 GFRP mRNA 水平显著升高(P < 0.05)，见图 2、3。



1: Marker; 2: Sham group; 3: DOCA group

图 2　DOCA 盐高血压大鼠主动脉 GTPCH-1 mRNA 水平

Fig 2　GTPCH-1 mRNA levels in aorta of DOCA-salt hypertension rat



1: Marker; 2: Sham group; 3: DOCA group

图 3　DOCA 盐高血压大鼠主动脉 GFRP mRNA 水平

Fig 3　GFRP mRNA levels in aorta of DOCA-salt hypertension rat

3　讨论

血管内皮 NO 合成减少及内皮功能障碍，是目前公认的引起血管功能损伤的重要原因之一[10,11]。在生理情况下，血管内皮细胞中 eNOS 在还原型辅酶 Ⅱ (NADPH)、氧分子、四氢生物蝶呤(BH_4)等因子辅助下，不断催化 L-arginine 产生小剂量的 L-cituline 和 NO[11]。NO 激活细胞内鸟苷酸环化酶，使胞内环磷酸鸟苷 (cGMP) 增加；而 cGMP 作为细胞第二信使介导多种生物效应，如血管舒张、调节局部血流、抑制血小板的黏附、集聚和血栓形成，抑制单核细胞和白细胞黏附到血管内皮，抑制血管平滑肌细胞增殖等。因此，NO 减少将导致血管舒张功能紊乱，是发生血管功能病变甚至动脉粥样硬化的重要原因。引起 NO 水平下降的一个主要原因是 eNOS 蛋白水平和活性降低[12]。在本研究中，我们发现 DOCA 盐高血压大鼠模型主动脉血管上 eNOS 蛋白水平显著下降，NO 水平也明显降

低。因此,我们推测 eNOS 蛋白水平下降是导致 DOCA 盐高血压大鼠主动脉血管内皮 NO 浓度下降的主要原因之一。

与此同时,对 eNOS 辅酶 BH_4 的检测结果也证实了 DOCA 盐高血压大鼠主动脉血管上 BH_4 水平明显下降。有报道认为[13,14],BH_4 水平降低将导致 eNOS 的功能异常,出现脱耦联现象,致使 NO 和超氧阴离子的生成失衡。也有报道认为,BH_4 是 NOS 活性的限速因子,它的降低可以影响 NOS 活性,使其产生 NO 的能力下降。因此,我们根据实验结果认为,DOCA 盐高血压大鼠主动脉血管 BH_4 水平下降是导致 eNOS 活性降低,以及 NO 产生减少的重要原因之一。

近年来对 BH_4 的限速酶 GTPCH-1 以及 GTPCH-1 的反馈调节蛋白 GFRP 也有一些报道[5-7]。GTPCH-1 是 BH_4 生物合成的限速酶,它的活性高低对 BH_4 水平的高低起了主要作用;但 GTPCH-1 同时也受 BH_4 水平的反馈调节,调节的关键就在于 GFRP;GFRP 是 GTPCH-1 的反馈负调节蛋白,在正常生理情况下,BH_4 的水平升高将会诱导 GFRP 与 GTPCH-1 的结合,这一复合物的形成使 CTPCH-1 的活性降低,从而减少 BH_4 的合成。本研究对 GTPCH-1 及 GFRP 在 DOCA 盐高血压大鼠主动脉血管中的表达变化进行了检测。通过实验,我们发现在 DOCA 盐高血压大鼠模型的主动脉血管中,GTPCH-1 的活性和 mRNA 水平都明显下降。故我们推测 GTPCH-1 活性和 mRNA 水平的下降对 BH_4 的降低有直接的关系,并间接导致了 NO 水平的下降。同时实验也显示,DOCA 盐高血压大鼠模型主动脉上 GFRP mRNA 水平明显上升,说明 GTPCH-1 负调节因素增强,可能因此引起 GTPCH-1 活性降低,BH_4 合成减少,并最终导致 NO 水平下降,促进血管功能损伤的发生。

综上所述,我们推测 GFRP 和 GTPCH-1 的异常变化很有可能是引起高血压血管内皮依赖性损伤的一个非常关键的环节。

参考文献:

[1] Palmer R M, Ferrige A G, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor[J]. Nature, 1987, 327(6122): 524-526.

[2] Griffith O W, Stuehr D J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism[J]. Ann Rev Physiol, 1995, 57: 707-736.

[3] Guzik T J, Korbut R, Adamek Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation[J]. J Physiol Pharmacol, 2003, 54(4): 469-487.

[4] Shinozaki K, Nishio Y, Okamura T, *et al*. Oral administration of tetrahydrobiopterin prevents endothelial dysfunction and vascular oxidative stress in the aortas of insulin-resistant rats[J]. Circ Res, 2000, 87(7): 566-573.

[5] Cai S, Alp N J, McDonald D, *et al*. GTP cyclohydrolase I gene transfer augments intracellular tetrahydrobiopterin in human endothelial cells: effects on nitric oxide synthase activity, protein levels and dimerisation[J]. Cardiovasc Res, 2002, 55(4): 838-849.

[6] Gesierich A, Niroomand F, Tiefenbacher C P. Role of human GTP cyclohydrolase 1 and its regulatory protein in tetrahydrobiopterin metabolism[J]. Basic Res Cardiol, 2003, 989(2): 69-75.

[7] Werner E R, Bahrami S, Heller R, *et al*. Bacterial lipopolysaccharide down-regulates expression of GTP cyclohydrolase Ⅰ feedback regulatory protein[J]. J Biol Chem, 2002, 227(12): 10129-10133.

[8] Li L, Crockett E, Wang D H, *et al*. Gene transfer of endothelial NO synthase and manganese superoxide dismutase on arterial vascular cell adhesion molecule-1 expression and superoxide production in deoxycorticosterone acetate-salt hypertension[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(2): 249-255.

[9] White R M, Rivera C O, Davison C B. Differential contribution of endothelial function to vascular reactivity in conduit and resistance arteries from deoxycorticosterone-salt hypertensive rats[J]. Hypertension, 1996, 27(6): 1245-1253.

[10] Knowles R G, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals[J]. Biochem J, 1994, 298(Pt 2): 249-258.

[11] Cosentino F, Katusic Z S. Tetrahydrobiopterin and dysfunction of endothelial nitric oxide synthase in coronary arteries[J]. Circulation, 1995, 91(1): 139-144.

[13] Yamashiro S, Kuniyoshi Y, Arakaki K, *et al*. The effect of insufficiency of tetrahydrobiopterin on endothelial function and vasoactivity[J]. Jpn J Thorac Cardiovasc Surg, 2002, 50(11): 472-477.

[14] Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, *et al*. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers: evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase[J]. Circ Res, 2000, 86(2): E36-E41.

(编辑 薛国文)