文章编号:1000-5404(2007)11-1017-03

论著

不同浓度NO对缺氧心肌细胞损害的影响

张 铭,黄跃生,张 琼 (第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 利用外源性一氧化氮(nitric oxide,NO)供体S-亚硝基谷胱甘肽(S-nitrosoglutathione, GSNO)对比观察不同浓度NO对缺氧心肌细胞活力的影响。**方法** 培养4~6 d心肌细胞分为常氧组(N)、缺氧组(H)和缺氧+GSNO组(H+G);H+G组依照加入GSNO浓度的不同又分为3组:缺氧+GSNO 30 μmol/L组(H+G30)、缺氧+GSNO 200 μmol/L组(H+G200)、缺氧+GSNO 4 000 μmol/L组(H+G4000)。分别观察其对缺氧(1% O_2、5% CO_2和94% N_2) 4 h心肌细胞损害的影响。**结果** 缺氧引起培养心肌细胞上清LDH活性增加,细胞存活率(MTT法)降低,H+G30组和H+G4000组损伤加重,H+G200组损伤减轻。**结论** 一定浓度范围内的NO具有细胞保护效应。

关键词: 缺氧;NO;S-亚硝基谷胱甘肽;保护作用
中图法分类号: R322.11; R329.24; R364.4 **文献标识码:** A

Effect of nitric oxide on myocardial cell injury after hypoxia in rats

ZHANG Ming, HUANG Yue-sheng, ZHANG Qiong (State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To clarify the effect of NO on hypoxic myocardium in rats. Methods Myocardial cells from neonatal Wistar rats aged 1-2 days cultured for 4-6 days, then pretreated with GSNO (30, 200, 4 000 μmol/L) were exposed to normoxia (N) or hypoxia (H) (1% O_2, 5% CO_2 and 94% N_2) for 4 h. The NO content and LDH in the supernatant were detected. Results NO of 1.43, 7.2 and 70 μmol/L were detected respectively in the supernatant of hypoxic myocardial cells treated by GSNO (30, 200 and 4 000 μmol/L). Compared with normoxic group, LDH activity increased and myocardial cell activity decreased markedly in H+G30 and H+G4000 groups but less injury was observed in H+G200 group. Conclusion NO of certain concentration can markedly abate myocardial cell injury induced by hypoxia.

Key words: hypoxia; nitric oxide; S-nitrosoglutathione; myocardial function

作为一种重要的生物信使分子和效应分子,一氧化氮(nitric oxide, NO)广泛参与了维持体内多个系统的病理生理功能。由于其可快速弥散通过细胞膜,并将细胞产生的信息迅速传递到它周围的细胞或其内部,产生相应的生物学效应,因此,在现代生物学领域中NO已经越来越多地成为生物活性调控的重要靶目标[1,2]。目前在许多NO有关的细胞实验研究中多采用外源性NO供体[3]。NO供体是一类可自主释放NO,具有不同性质、结构的化合物。本实验选用外源性NO供体S-亚硝基谷胱甘肽(S-nitrosoglutathione, GSNO)为心肌细胞提供稳定的不同浓度的NO,对比观察对缺氧培养条件下心肌细胞活力的影响,旨在明确不同浓度NO对缺氧心肌细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 实验器材与试剂

1.1.1 实验动物 新生Wistar大鼠由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂 DMEM/F12培养基和胎牛血清:购自Hycolne公司;小牛血清购自天津Biochem;Brdu和GSNO购自Sigma。

1.1.3 检测有关的试剂 乳酸脱氢酶(LDH)、考马斯亮蓝蛋白浓度测定试剂盒:购自南京建成生物制品有限公司;NO检测试剂盒:购自Promega公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验模型 心肌细胞培养:新生1~2 d Wistar大鼠心肌胰酶消化法消化收集后用含Brdu的DMEM/F12培养基稀

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30430680),国家杰出青年科学基金(30125040)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (30430680) and the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30125040)

作者简介:张 铭(1964-),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事心肌缺血缺氧性损害方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68754200,E-mail:zxy410@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2006-12-11;修回日期:2007-03-10

释后分装在不同的目的培养皿中,37 ℃,5% CO_2 孵箱培养;次日用 DMEM/Fl2(含 10% 胎牛血清)培养基换液,以后 1 ~ 2 d细胞换液 1 次。心肌细胞培养至 4 ~ 6 d 进行各项实验。

缺氧心肌细胞培养模型的制备:将常氧培养 4 ~ 6 d 的心肌细胞置于密闭缺氧罐中通以 1% O_2、5% CO_2 和 94% N_2 的混合气体 5 L/min × 5 min,夹闭 5 min,再次通气,如此反复 3 次后夹闭。将密闭缺氧罐放置于 37 ℃,5% CO_2 孵箱内培养到指定时间点备用。观察缺氧后 4 h 的各项检测指标的变化。

1.2.2 实验分组 分为常氧组(N)、缺氧组(H)和缺氧 + GSNO 组(H + G);H + G 组依照加入 GSNO 浓度的不同又分为 3 组:缺氧 + GSNO 30 μmol/L 组(H + G30)、缺氧 + GSNO 200 μmol/L组(H + G200)、缺氧 + GSNO 4000 μmol/L 组(H + G4000)。

1.2.3 观测指标及方法 心肌细胞培养上清 NO 浓度的测定:Griess 法测定。

培养液中乳酸脱氢酶活性测定:生化法测定。

LDH 活力 =(测定管 - 测定空白管/标准管 - 标准空白管)× 0.380 ÷ 样品取样量(ml) ÷ 蛋白浓度(g/ml)

心肌细胞成活率检测:采用 MTT 法,波长为 490 nm。

1.3 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 不同浓度 NO 供体 GSNO 与心肌细胞共孵育时 NO 浓度变化

2.1.1 GSNO 与心肌细胞共培养常氧 2 h 所释放 NO 的浓度变化 随着 GSNO 浓度的增加,培养上清内的亚硝酸盐含量逐渐增加,其变化规律符合线性方程:$y = 0.017\ 9x + 2.167\ 6$($r^2 = 0.995\ 7$)(图 1)。

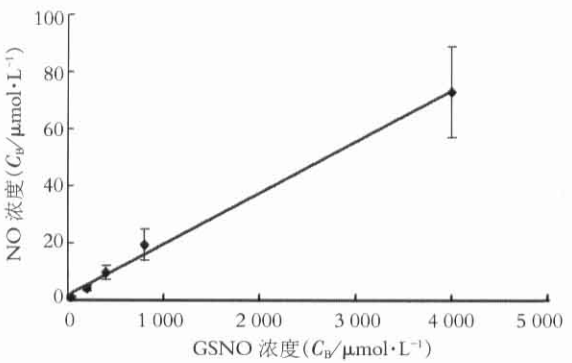


图 1 不同浓度 GSNO 释放 NO 浓度变化

2.1.2 GSNO 作用于心肌细胞后释放 NO 浓度的变化 选用浓度为 30、200、4 000 μmol/L 的 GSNO 与心肌细胞共孵育 24 h,选择 0、0.5、2、4、6、12、24 h 时间点,测定 NO 相对释放浓度,观察其变化规律。3 组生成 NO 的化学反应均大约于 1 h 达到反应平衡;H + G30 组产生 NO 仅能维持稳定浓度 4 h 左右;H + G200 组能维持产生较稳定浓度 NO 约 6 h;H + G4000 组能维持产生较稳定浓度 NO 约 6 h,其后 NO 浓度急速下降。依据 GSNO 释放 NO 的特点选出有效实验观察时间点为 2 ~ 4 h。在该时间范围内 H + G30 组 NO 浓度变化为 1.43 μmol/L,H + G200 组 NO 浓度变化为 7.2 μmol/L,H + G4000 组 NO 浓度变化为 70 μmol/L,分别处于低、中、高 3 个浓度阶段(表 1)。

表 1 3 种浓度 GSNO 作用于心肌细胞后释放 NO 浓度的变化 (μmol/L)

时间(t/h)	GSNO 浓度(μmol/L)		
	30	200	4 000
0	1.1 ± 0.2	7.3 ± 0.8	78 ± 15
0.5	1.85 ± 0.15	8.8 ± 0.75	81 ± 12[b]
2	1.65 ± 0.23	7.8 ± 0.58	75 ± 11[a]
4	1.43 ± 0.18	7.2 ± 0.68	70 ± 9
6	0.35 ± 0.14[b]	6.7 ± 0.66	62 ± 5
12	0	2.1 ± 0.55[b]	35 ± 6[b]
24	0	1.0 ± 0.1[b]	11 ± 5[b]

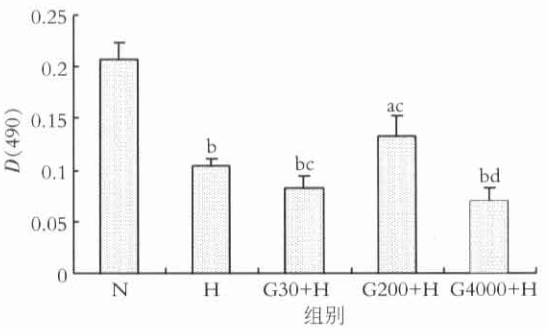
a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与 0 h 比较

2.2 不同浓度 NO 对缺氧心肌细胞培养上清 LDH 活性的影响

与常氧培养心肌细胞[(1 562 ± 598) U/g]相比,缺氧 4 h 心肌细胞培养上清的 LDH 活力明显增加[(4 355 ± 445) U/g,$P < 0.01$];H + G30 组培养上清的 LDH 活力[(6 960 ± 625) U/g]较常氧组和缺氧组均明显增加($P < 0.01$);H + G200 组培养上清的 LDH 活力[(3 568 ± 251) U/g]较常氧组明显增加($P < 0.05$),但较缺氧组减少($P < 0.05$);H + G4000 组 LDH 活力[(11 150 ± 1 154) U/g]与常氧及缺氧组比较增加非常显著($P < 0.01$)。

2.3 不同浓度 NO 对缺氧 4 h 心肌细胞活性的影响

与常氧培养心肌细胞相比,缺氧心肌细胞活力明显下降($P < 0.01$);H + G30 组细胞活力较常氧组明显下降($P < 0.01$)、但较缺氧组有所减低($P < 0.05$);H + G200 细胞活力较常氧组有所下降($P < 0.05$),但较缺氧组细胞活力增加($P < 0.05$);H + G4000 组细胞活力与常氧及缺氧组比较有非常显著的降低($P < 0.01$)(图 2)。



a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与常氧组比较;c:$P < 0.05$,d:$P < 0.01$,与缺氧组比较

图 2 缺氧 4 h MTT 法测得心肌细胞活性变化

3　讨论

正常生理状态下机体可产生适当水平的 NO 参与调节内环境的稳定；当环境因素发生变化时，如许多慢性疾病（高血压、动脉粥样硬化等）可造成血管内皮细胞损伤，使生理条件下的 NO 合成产生减少，机体内环境稳定性发生改变，从而导致疾病的发生；而在创伤、应激、炎症等条件下体内形成的 NO 水平呈指数级增加。由于 NO 活跃的性质和高度的弥散性，使其接受电子生成的氮源性自由基显著增加，可引起蛋白质、核酸等所含巯基发生硝化反应，并引起脂质过氧化反应，从而产生破坏作用。因此，在现代生物学领域中 NO 浓度已经成为生物活性调控的重要靶目标[4-6]。

目前在许多有关 NO 的细胞实验研究中多采用外源性 NO 供体[3]。本实验选用的 NO 供体 GSNO 为 S-亚硝基谷胱甘肽（S-nitrosoglutathione，GSNO），属于亚硝基硫醇类（nitrosothiols）化合物，在体内可被迅速分解释放出 NO，进而发挥生物学效应。本研究结果显示，高、低浓度的 NO 均可引起缺氧心肌细胞的 LDH 活力较常氧组、缺氧组明显增加，心肌细胞活力明显降低，其中尤以高浓度组更为明显，提示该两种浓度的 NO 加重了缺氧心肌细胞的损害。对低浓度和高浓度 NO 引起心肌细胞损伤的机制，近年来进行了大量的研究，但尚不完全清楚。根据已有的研究，NO 介导的生物效应主要取决于局部 NO 的浓度和其周围的环境条件如氧化还原能力。有研究证实，低浓度的 NO 可与 O_2 竞争抑制呼吸链复合物Ⅳ，从而调节细胞内呼吸，使细胞内的氧浓度增加，但对线粒体呼吸链氧的有效利用及能量产生都具有损害作用。我们推测可能是由于细胞内氧浓度的无效增加削弱了细胞的自我保护效应机制，使细胞对缺氧的反应性减弱，进而加重了细胞的损害。也有学者认为可能是通过与金属转运酶中的金属离子结合从而影响其活性，并抑制 DNA 的合成；而高浓度 NO 引起心肌细胞损害的机制与低浓度 NO 不同，高浓度的 NO 易于发生自主氧化反应以形成 NO_2，再与 NO 反应生成 N_2O_3，进而迅速降解为亚硝酸盐和亚硝基离子，而后者可引起电子传递成分的亚硝酰基化及 DNA 脱氨基化[7]。因此高浓度 NO 的损害作用可能包括：①高浓度 NO 长时间以非 cGMP 依赖的方式作用于巯基引起与能量代谢或抗氧化有关的酶失活；②通过形成过氧化亚硝酸盐（$ONOO^-$）与铁-硫基团中的铁发生配位结合，产生无活性的[3Fe-4S]簇从而抑制酶活性；③通过产生的 $ONOO^-$ 使超氧化物歧化酶（SOD）的氨酸硝基化，从而易化缺血后细胞溃变，使高剂量的 SOD 丧失保护作用；④直接损伤 DNA 等[8]。本研究结果显示，中浓度 NO（5～10 μmol/L）组培养上清的 LDH 活力较常氧组有所增加，但增加的幅度不大；但较缺氧组有明显的降低；中浓度 NO 细胞活性较正常条件下细胞的活性稍有下降，但较缺氧组有明显的改善，表明该浓度范围内的 NO 对心肌细胞具有一定的保护效应。这一结果与上述低浓度及高浓度 NO 的作用截然相反，可能中浓度 NO 在作用机制上存在差异。有报道也证实低浓度及高浓度 NO 的作用存在差异。NO 对细胞的保护效应机制目前尚未阐明，可能与缺氧诱导因子-1α（HIF-1α）介导的细胞内源性保护机制的加强有关。NO 可能通过线粒体呼吸链途径或信号转导途径使 HIF-1α 蛋白稳定性加强，进而加强了细胞的内源性保护效应。有研究表明 NO 可以诱导正常细胞内 HIF-1α 的蛋白稳定性增加，可能有利于缺氧条件下细胞的保护效应，然而这方面的研究目前尚处于初级阶段。在缺氧应急条件下，内源性保护物质如腺苷、缓激肽、前列腺素等具有细胞保护效应，其作用机制可能是通过与膜受体结合，经 NO 传递信号从而发挥细胞保护效应的[9]。因而我们推测在一定的浓度范围内 NO 可能具有直接的细胞保护效应，并通过实验观察得到证实。目前类似报道尚不多见，缺乏对其相关机制的探讨，有待进一步研究。

参考文献：

[1] Chang W L, Chung C H, Wu Y C, *et al*. The vascular and cardioprotective effects of liriodenine in ischemia-reperfusion injury *via* NO-dependent pathway[J]. Nitric Oxide, 2004, 11(4): 307－315.

[2] 乔伟丽，王　琳，张建福，等. Bcl-2 和 Bax 参与内源性一氧化氮对大鼠胃黏膜缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 徐州医学院学报，2006，26(5)：377－381.

[3] 傅建学. 心肌保护的研究进展[J]. 青海医药杂志，2004，34(12)：60－62.

[4] Sandau K B, Fandrey J, Brune B. Accumulation of HIF-1alpha under the influence of nitric oxide[J]. Blood, 2001, 97(4): 1009－1015.

[5] Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(5－6): 993－998.

[6] Bell E L, Emerling B M, Chandel N S. Mitochondrial regulation of oxygen sensing[J]. Mitochondrion, 2005, 5(5): 322－332.

[7] Sumbayev V V, Budde A, Zhou J, *et al*. HIF-1 alpha protein as a target for S-nitrosation[J]. FEBS Letters, 2003, 535(1－3): 106－112.

[8] Carreras M C, Franco M C, Peralta J G, *et al*. Nitric oxide, complex I, and the modulation of mitochondrial reactive species in biology and disease[J]. Mol Aspects Med, 2004, 25(1－2): 125－139.

[9] Murphy M P. Does interplay between nitric oxide and mitochondria affect hypoxia-inducible transcription factor-1 activity? [J]. Biochem J, 2003, 376(Pt 2): e5－e6.

（编辑　栾　嘉）