论著

文章编号:1000-5404(2009)15-1428-04

低氧肺动脉高压时血红素氧合酶基因表达状况的研究

王关嵩[1*],钱 频[1*],李 琦[1],李运成[1],程 序[2],周长喜[1],张志远[1],钱桂生[1] ([1]第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037;[2]重庆市垫江县中医院呼吸内科,重庆 408300)

摘 要:目的 探讨血红素氧合酶(heme oxygenase,HO)基因在低氧肺动脉高压大鼠肺动脉组织中的表达及一氧化碳(carbon monoxide,CO)对其的影响。**方法** 60只Wistar大鼠随机分为5组:常氧组;低氧肺动脉高压组;血晶素组;锡原卟啉组;低浓度CO组($n=12$)。采用紫外分光光度计、逆转录-聚合酶链反应、免疫组织化学染色和原位杂交进行检测。**结果** ①HO-1活性:低氧组、血晶素组、低浓度CO组肺动脉组织HO-1活性以胆红素生成量计算,均升高,其中血晶素组最高,与正常对照组比较,差异有显著性($P<0.01$)。②逆转录-聚合酶链反应:各组大鼠肺动脉HO-2 mRNA表达没有明显变化,均保持稳定。缺氧组、血晶素组、锡原卟啉组和低浓CO组HO-1 mRNA均明显高于正常对照组,以低浓度CO组升高最明显($P<0.01$)。血晶素组和低浓度CO组均显著高于缺氧组($P<0.01$),而锡原卟啉组低于缺氧组。③免疫组织化学染色:低氧组肺动脉内膜、中膜的HO-1表达均明显升高,血晶素组和低浓度CO组更高,锡原卟啉组和常氧组均有很微弱表达。④原位杂交:低氧组肺动脉3层均加深2~3级,低浓度CO组肺动脉外、中、内膜细胞质均明显加深4级。处理前后HO-2的染色变化不大。**结论** 低氧肺动脉高压时,肺动脉组织HO-1基因的表达升高,可能在肺动脉高压的发生和发展中起一定作用。

关键词: 血红素氧合酶;低氧;肺动脉高压;基因表达

中图法分类号: R345; R363.25; R543.2 **文献标识码:** A

Expression of heme oxygenase in pulmonary arteries of rats with hypoxic pulmonary hypertension

WANG Guan-song[1*], QIAN Pin[1*], LI Qi[1], LI Yun-cheng[1], CHENG Xu[2], ZHOU Chang-xi[1], ZHANG Zhi-yuan[1], QIAN Gui-sheng[1] ([1] Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Department of Respiratory Diseases, Traditional Chinese Medicine Hospital of Dianjiang County, Chongqing 408300, China)

Abstract: Objective To investigate the expression of heme oxygenase (HO) in pulmonary arteries of rats with hypoxic pulmonary hypertension (HPH). **Methods** A total of 60 rats were employed and equally divided into 5 groups ($n=12$ in each group), i. e. control (group Ⅰ), HPH (group Ⅱ), hemin (group Ⅲ), tin protoporphyrin (SnPP) (group Ⅳ), and low concentration CO group (group Ⅴ). Of them, the rats from middle 3 groups were treated with hypoxia under normal pressure for 7 h in every day except Sunday, consecutively for 3 weeks. Hemin and tin protoporphyrin (SnPP) were given half an hour before hypoxia while low concentration CO at 2 h after hypoxia. HO-1 activity of pulmonary arteries tissues was tested with ultraviolet spectrophotometry. The expression of HO was detected with reverse transcriptionpolymerase chain reaction (RT-PCR), immunohistochemical staining and in situ hybridization. **Results** ① The bilirubin production increased significantly in group [(396.28±69.62) pmol·mg^{-1}·h^{-1}], group [(668.56±189.29) pmol·mg^{-1}·h^{-1}], group [(267.38±88.59) pmol·mg^{-1}·h^{-1}]and group [(589.32±132.35) pmol·mg^{-1}·h^{-1}], as compared with those in group [(125.62±31.52) pmol·mg^{-1}·h^{-1}]. ② The levels of HO-1 mRNA expression of pulmonary arteries in group Ⅱ, group Ⅲ, group Ⅳ and group Ⅴ were significantly higher than those in group Ⅰ. The most significant HO-1 mRNA expression was found in group Ⅴ ($P<0.01$). The levels of HO-1 mRNA expression of pulmonary arteries in group Ⅲ and group Ⅴ were higher than those in group Ⅱ, but it was

基金项目: 国家自然科学基金(30770928);重庆市自然科学基金(2007BB5072);第三军医大学科研创新基金(2006HG04)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30770928), the Natural Science Foundation of Chongqing (2007BB5072), and the Innovation Foundation for Scientific Research of Third Military Medical University (2006HG04)

作者简介: 王关嵩,男,河南省平顶山市人,博士,研究员,主要从事肺损伤与肺血管重建的防治方面的研究,发表论文20余篇,电话:(023)68755644,E-mail:wanggs2003@gmail.com

*:同等贡献者

通信作者: 钱桂生,电话:(023)68755603,E-mail:qiangs@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2008-11-06;**修回日期:** 2009-01-04

lower in group Ⅳ than that in group Ⅱ. ③ The strong positive granules of HO-1 were observed in pulmonary arteries intima and media in group Ⅱ, group Ⅲ and group Ⅳ, while group Ⅲ and group Ⅳ involved more positive granules of HO-1 as compared with those in group Ⅱ. ④ The staining was deepened in three layers of the pulmonary arteries in group Ⅱ, while the staining was deepened more in group Ⅲ and group Ⅳ. No significant change was found in staining of HO-2 in different groups. **Conclusion** CO can up-regulate the expression of HO-1, and this may play important roles in the genesis and development of pulmonary hypertension.

Key words: heme oxygenase; hypoxia; pulmonary hypertension; gene expression

低氧性肺动脉高压作为慢性阻塞性肺病的病理生理学基础,一直是国内外学者研究的重点之一。近年来,血红蛋白氧合酶(heme oxygenase, HO)和一氧化碳(carbon monoxide, CO)在缺氧性肺动脉高压中的作用受到重视[1-3]。HO-1 可在缺氧、应激、发热等状态下表达。HO 作为内源性一氧化碳(CO)合成的限速酶和关键酶,可将血红素分解成 CO、胆红素和铁。而 CO 是一类新的血管舒张因子, 与 NO 的性质类似,我们通过建立常压缺氧肺动脉高压大鼠模型,分别用低浓度 CO、锡原卟啉(HO-1 抑制剂)、血晶素(HO-1 诱导剂)抑制和诱导肺动脉组织中 HO-1 的表达,探讨 HO-CO 系统在缺氧性肺动脉高压中的作用。

1　材料与方法

1.1　动物模型复制及处理

实验选择健康成年雄性 Wistar 大鼠 60 只,体质量(200 ± 25)g(第三军医大学实验动物中心),随机分为 5 组,每组 12 只。正常对照组:放在室温下依常规方法饲养。低氧肺动脉高压组:依我所方法建立常压低氧仓,保持 O_2 浓度为(10.0 ± 0.5)%,每天 7 h,每周 6 d,周日休息,持续 3 周。血晶素组:每日低氧前 0.5 h 时注入 1 次血晶素 100 μmol/kg; 锡原卟啉组:每日低氧前 0.5 h 时注入 1 次锡原卟啉 100 μmol/kg;低浓度 CO 组:每日低氧 2 h 后通入 1 次调制好的 50 ppm 的 CO 15 min。

1.2　HO 活性测定

根据 HO-1 降解血红素生成胆红素和 CO 原理,测定样品反应物中胆红素生成量代表 HO-1 活性。取肺动脉组织,用 0.1 mol KH_2PO_4 冷缓冲液(pH = 7.4)充分漂洗。加 4 倍容积的同种缓冲液,匀浆后低温(4 ℃)、高速离心 15 min(15 000 r/min),去除脂层,收集上清液。 -70 ℃保存的组织匀浆上清液 20 μl,加入 2 mmol 正铁血红素 40 μl,4.5 mmol NADPH 40 μl,0.1 mol KH_2PO_4(pH = 7.4)1.8 ml,置 37 ℃暗处 10 min,之后将反应物棕色小瓶置于冰上以终止反应。以不含 NADPH 的样品作空白对照,样品与空白均做双份,在分光光度计上用 464 nm 和 530 nm 双波长测定胆红素生成量(胆红素摩尔吸光系数为 40 nm/cm)。

1.3　肺动脉组织 HO mRNA 的检测

采用逆转录多聚酶链式反应(RT-PCR),引物参照文献[4]自行设计。HO-1 的上游引物为 5′-AGCATGTCCCAGGATTTG-3′,下游引物 5′-GCTCAATGTTGAGCACA-3′,扩增目的片段为 615 bp。HO-2 上游引物 5′-GAATTCGGGACCAAGGAAGCACAT-3′,下游引物 5′-TCTAGACTATGTAGTACCAGGCCAAGA-3′,扩增目的片段长度为 828 bp。阳性对照为 HPRT,上游引物 5′-GCTGGTGAAAAGGACCTCTCG-3,下游引物 5′-GCAGATGGCCACAGGACTAGA-3,扩增目的片段长度为 258 bp。95 ℃ 4 min 后加入 Taq DNA 聚合酶而后 94 ℃ 50 s,63 ℃ 50 s,72 ℃ 1 min 35 个循环末次延伸时间 72 ℃ 10 min。最后用 10 μl PCR 产物进行电泳,摄像。存入计算机,并用复旦四星的 SX-IMAGE 图像分析系统进行光密度扫描。结果以 HO/次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)的积分吸光度比值表示。

1.4　免疫组织化学检测

染色采用同种组织冰冻切片,用过氧化氢孵育 5 min 后,加 10 % 山羊血清置室温 10 min 后,滴加一抗(1∶2 000 兔多克隆抗 HO-1、HO-2、stress gene)。4 ℃过夜。生物素标记的二抗(1∶200 羊抗兔 IgG,武汉博士德公司) 37 ℃孵育,30 min 后用 3,32 二氨基苯联胺(DAB)显色,复染后封片。细胞质呈现颗粒为阳性细胞,对蛋白表达水平进行定量分析,结果表示为 1 ~ 4 级。

1.5　原位杂交

参照文献[5]方法,所需试剂和器械均经 DEPC 水处理。取实验组及对照组动物肺动脉组织,基本过程如下:切片在 0.1 mol/L PBS(pH 7.2,下同)中漂洗 5 min × 3,再 2 × SSC 漂洗 10 min;蛋白酶 K(20 μg/ml, Merck 产品)消化,37 ℃孵育 5 min;0.1 mol/L 甘氨酸/0.1 mol/L PBS 漂洗 5 min;4% 多聚甲醛漂洗 5 min;0.1 mol/L PBS 漂洗 5 min × 3,再 2 × SSC 漂洗 10 min;预杂交后置 42 ℃水浴中 2 h;在每张片子上加 20 μl 地高辛标记探针杂交液,用 DEPC 水处理的膜覆盖,于湿盒中 42 ℃孵育 20 h;取出切片,去膜,4 × SSC 及 PBS 充分漂洗;滴加 Anti-Dig-Ap 抗体;NBT/BCIP 室温避光显色 4 ~ 6 h;0.05 mol/L PBS 充分漂洗,中止显色反应;中性树胶封片。原位杂交染色结果的判定,以细胞质内出现明确的紫蓝色细颗粒为阳性染色。

1.6　统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　HO 活性的变化

低氧组、血晶素组、低浓度 CO 组肺动脉组织 HO-1 活性以胆红素生成量计算,均升高,其中血晶素组最高,与正常对照组比较,差异有显著性($P < 0.01$)。低氧组和锡原卟啉组比常氧组升高,但明显低于血晶素组和低浓度 CO 组。锡原卟啉组虽较低氧组明显下降($P < 0.01$),但仍高于正常对照组($P < 0.05$)。

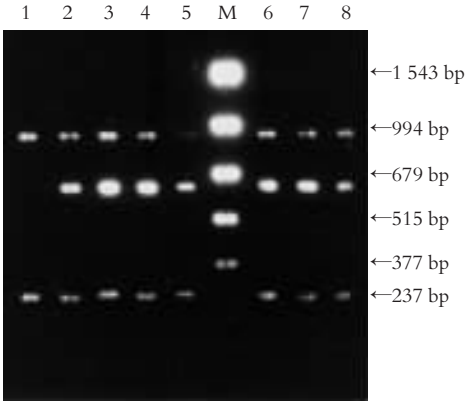
2.2 RT-PCR 检测结果

RT-PCR 检测肺动脉组织 HO mRNA 的表达情况，结果显示各组大鼠 HO-2 mRNA 表达没有明显变化，均保持稳定。低氧组、血晶素组、锡原卟啉组和低浓度 CO 组肺动脉组织内 HO-1 mRNA 均明显升高，以低浓度 CO 组为最高，比常氧组高 9 倍（$P<0.01$），锡原卟啉组也高 5 倍。但血晶素组和低浓度 CO 组均显著高于低氧组（$P<0.01$）。锡原卟啉组比低氧组还低（图 1）。低浓度 CO 组和血晶素组的肺动脉 HO-1 mRNA 表达均显著升高（$P<0.01$）。而低氧组肺动脉 HO-1 mRNA 表达又比常氧组高，锡原卟啉组低于低氧组（均为 $P<0.01$）。表 1。

表 1 肺动脉组织 HO mRNA 的表达（IOD）和 HO 活性测定（$n=12$，pmol·mg^{-1}·h^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

组别	HO-1 mRNA	HO-2 mRNA	胆红素生成量
正常对照组	0.16±0.06	0.59±0.12	125.62±31.52
低氧肺动脉高压组	0.90±0.28[a]	0.56±0.19	396.28±69.62[a]
血晶素组	1.48±0.36[b]	0.62±0.23	668.56±189.29[b]
锡原卟啉组	0.62±0.13[a]	0.68±0.34	267.38±88.59[b]
低浓度 CO 组	1.52±0.41[b]	0.56±0.22	589.32±132.35[b]

a：$P<0.01$，与正常对照组比较；b $P<0.01$，与低氧肺动脉高压组比较

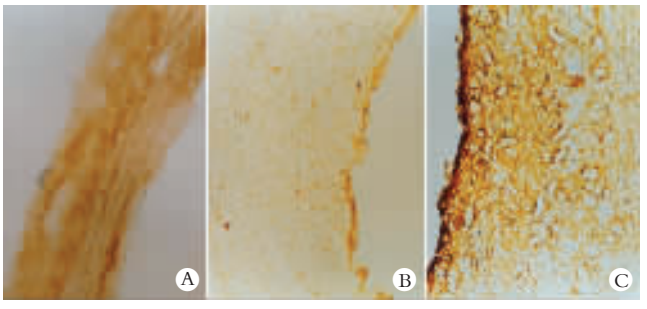


1：常氧组 HO-1 mRNA；2：低氧肺动脉高压组 HO-1 mRNA；3：血晶素组 HO-1 mRNA；4：锡原卟啉组 HO-1 mRNA；5：低浓度 CO 组 HO-1 mRNA；M：DNA 标准；6：常氧组 HO-2 mRNA；7：低氧肺动脉高压组 HO-2 mRNA；8：锡原卟啉组 HO-2 mRNA

图 1 RT-PCR 检测肺动脉 HO-1 mRNA，HO-2 mRNA 的表达

2.3 肺动脉免疫组织化学染色结果

低氧组肺动脉内膜、中膜的 HO-1 表达均明显升高，血晶素组和低浓度 CO 组更高，锡原卟啉组和常氧组均有很微弱表达见（图 2、表 2）。HO-2 各组染色，可见内膜有弱表达。



A：常氧组；B：低氧组；C：低浓度 CO 组

图 2 肺动脉 HO-1 免疫组织化学染色结果（SABC×400）

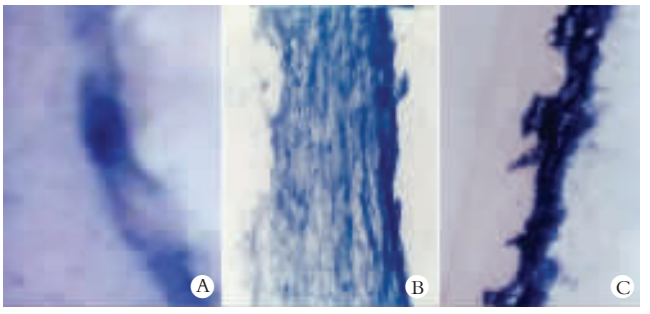
表 2 低浓度 CO 和低氧处理后 HO-1 免疫组化结果

组别	肺动脉
正常对照组	0～+
低氧肺动脉高压组	++
血晶素组	++++
锡原卟啉组	+
低浓度 CO 组	+++～++++

0：阳性；+：弱阳性；++：中等阳性；+++：强阳性；++++：显著阳性

2.4 原位杂交的表达情况

低浓度 CO 组肺动脉外、中、内膜细胞质均明显加深 4 级。低氧组肺动脉 3 层均加深 2～3 级。处理前后 HO-2 的染色变化不大。见图 3。



A：常氧组；B：低浓度 CO 组；C：低氧组

图 3 肺动脉 HO-1 mRNA 的表达（ISH×400）

3 讨论

3.1 低浓度 CO 和低氧处理大鼠后肺动脉 HO 活性和蛋白质表达变化

HO 包括 HO-1、HO-2、HO-3 3 种同工酶，HO-3 仅在大鼠脑组织显示，和 HO-2 一样属于组成性酶，诱导因素不能诱导其表达升高；而 HO-1 是 HO 的诱导酶[6]，在低氧等多种因素作用下，在多种组织的表达会升高。本研究证实，低氧可诱导 HO-1 的蛋白表达增加，活性增加。血晶素作为 HO-1 的特异性激动剂可以进一步诱导 HO-1 蛋白合成，使 HO-1 活性增加，低氧的症状有所改善。但是作为 HO-1 阻断剂的锡原卟啉加入后，低氧症状加重，HO-1 蛋白合成减少、HO-1 活性降低。免疫组化结果显示低浓度 CO 组和血晶素组 HO-1 蛋白量明显增加。说明，低浓度 CO 和血晶素组作用后，低氧症状改善，部分是由于 HO-1 的表达。

3.2 低浓度 CO 和低氧处理大鼠后肺动脉 HO mRNA 的表达状况

本研究结果提示，各组大鼠肺动脉 HO-2 的mRNA 表达无明显差异。说明在核酸水平上，HO-2 不被诱导，可能是蛋白质表达不受诱导因素变化的原因。与常氧组比较，低氧组 HO-1 mRNA 水平升高，血晶素组和低浓度 CO 组的 HO-1 mRNA 明显升高。也说明核酸水平上 HO-1 mRNA 的变化可能调节 HO-1 蛋白质的表达。低氧作为刺激因素作用于大鼠后，发生的变化是复杂的，一方面肺动脉压和右心室压升高，另一方面 HO-1 mRNA 和蛋白质表达增加。低氧同时加入血

晶素,HO-1 mRNA 和蛋白质表达更高,多出部分,可用于调节肺组织的 HO-CO cGMP 及 HO-NO cGMP 系统,使低氧的代偿极限增加,从而使病变减轻。低浓度 CO 的作用更加明显,因为其对 HO-CO-cGMP 及 HO-NO-cGMP 系统的调节更直接,有利于维持其在一个协调的水平,从而阻止低氧的损害。而锡原卟啉由于是 HO-1 降解的阻断剂,可使 HO-CO 系统处于不利的状态,加重低氧的损害。

既往的研究显示 HO 降解血红素时形成产物精氨酸和赖氨酸,可急剧降低血压 35 mmHg,HO 的抑制剂锌次卟啉 2.4 二已二醇能够阻断上述作用。精氨酸还能够降低去氧皮质醇和苯肾上腺素诱导的高血压,提示血红素的抑制作用可能扩展到其他多种高血压模型。但是精氨酸和赖氨酸都不能降低人的血压,对于正常正常大鼠的血压没有影响,胆绿素也不能降低自发高血压大鼠的血压和苯肾上腺素引起的高血压[7]。Johnson 等[8]证实低氧在 HO-1 基因敲除大鼠中诱导严重的右室扩张和梗死。剔除 HO-1 基因的大鼠,低氧 5 ~ 7 周后,野生性和剔除者右心室系统血压都升高。野生型心室重有所增加,但 HO-1 缺乏的大鼠心室重增加更多,伴有右室膨大。7 周后仅 HO-1 缺乏者右室壁栓塞伴梗死,无左室梗死发生,并出现脂质过氧化反应和脂质损害。说明心肌缺乏 HO-1 时有不良反应可导致肺动脉高压。CO 及 HO 抑制剂能使正常和高血压大鼠平均动脉压明显降低,提示内源性 CO 在体内有抗高血压效应[9]。我们的结果证明,外源性 CO 进而通过调节内源性 CO 拮抗肺动脉高压。

3.3　低浓度 CO 和低氧影响组织表达 HO-1 的机制

低浓度 CO 和血晶素在调节 HO-CO 系统中的作用机制可能包括以下几个方面:①我们的研究发现,整体水平上,CO 可以抑制 PASMC 的 Ca^{2+} 通道和 Ca^{2+} 浓度。CO 可以调节血流量和血液流变性进而抑制血管紧张性和血小板聚集[10]。Prabhakar[11]研究发现 CO 可以抑制颈动脉体的感觉活性,改变其球细胞 Ca^{2+} 通道和 Ca^{2+} 浓度, CO 通过 cGMP 、cAMP 第二信使系统介导,影响 NO-cGMP 信息传递,抑制 HPV 的发生、发展[12]。从不同的侧面验证了我们的结论。②CO 影响内膜功能,包括在 CO 作用下血管内皮细胞产生 $ONOO^-$、NO 等含氮物质,还竞争生物体内的结合位点而进行氧化应激反应,使 NO 的稳态水平上升。升高内皮 cGMP 含量,降低有丝分裂剂、内皮素-1、血小板源因子和血管内皮生长因子的表达,抑制这些因子对 PASMC 的促增殖作用[13,14]。我们曾测量过血管平滑肌和内皮组织中 NO 的表达量,发现 CO 作用后大鼠血管平滑肌和内皮组织的硝酸盐和亚硝酸盐含量明显上升,与上述研究者的结论一致。③我们以往研究发现,CO 可直接作用血管平滑肌细胞促进 cGMP 表达[15],与 Liu 等[16]认为 CO 激活可溶性鸟苷酸环化酶调节 cGMP 的结论一致。此外还存在其他机制,如刺激各种类型 K^+ 通道,包括 K^+-Ca^{2+} 通道的开闭;抑制细胞色素 P-450 依赖的单氧酶系统。

参考文献:

[1] 王关嵩,钱桂生,杨晓静,等. 一氧化碳对大鼠血管平滑肌细胞低氧性增殖反应的作用[J]. 中国病理生理杂志,2000,16(2):117 - 119.

[2] Wang G S, Qian G S, Zhou D S, *et al*. JAK-STAT signaling pathway in pulmonary arterial smooth muscle cells is activated by hypoxia[J]. Cell Biol Int, 2005, 29(7): 598 - 603.

[3] Wang G, Qian P, Jackson F R, *et al*. Sequential activation of JAKs, STATs and xanthine dehydrogenase/oxidase by hypoxia in lung microvascular endothelial cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(3): 461 - 470.

[4] Shibahara S, Han F, Li B, *et al*. Hypoxia and heme oxygenases: oxygen sensing and regulation of expression [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(12): 2209 - 2225.

[5] 郑晓飞. RNA 实验技术手册[M]. 北京:科学出版社, 2004: 151 - 157.

[6] Maines M D, Gibbs P E. 30 some years of heme oxygenase: from a "molecular wrecking ball" to a "mesmerizing" trigger of cellular events [J]. Biochem Biophys Res Commun,2005, 338(1):568 - 577.

[7] Yet S F, Perrella M A, Layne M D, *et al*. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice [J]. J Clin Invest, 1999, 103(8): R23 - R29.

[8] Johnson R A, Johnson F K. Heme oxygenase-derived endogenous carbon monoxide impairs flow-induced dilation in resistance vessels[J]. Shock, 2008, 29(4): 526 - 530.

[9] Ou H S, Yang J, Dong L W, *et al*. Role of endogenous carbon monoxide in hypertension pathogenesis of rats[J]. Sheng Li Xue Bao, 1998, 50(6): 643 - 648.

[10] Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 5): 1142 - 1146.

[11] Prabhakar N R. NO and CO as second messengers in oxygen sensing in the carotid body[J]. Respir Physiol, 1999, 115(2): 161 - 168.

[12] Durante W, Johnson F K, Johnson R A. Role of carbon monoxide in cardiovascular function [J]. J Cell Mol Med, 2006, 10(3): 672 - 686.

[13] Thom S R, Xu Y A, Ischiropoulos H. Vascular endothelial cells generate peroxynitrite in response to carbon monoxide exposure [J]. Chem Res Toxicol, 1997, 10(9): 1023 - 1031.

[14] Morita T, Imai T, Yamaguchi T, *et al*. Induction of heme oxygenase-1 in monocytes suppresses angiotensin II-elicited chemotactic activity through inhibition of CCR2: role of bilirubin and carbon monoxide generated by the enzyme[J]. Antioxid Redox Signal, 2003, 5(4): 439 - 447.

[15] 王关嵩,钱桂生,杨晓静,等. 低浓度一氧化碳对大鼠肺动脉平滑肌细胞的作用机制[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2000, 23(5): 317 - 318.

[16] Liu Y, Christou H, Morita T, *et al*. Carbon monoxide and nitric oxide suppress the hypoxic induction of vascular endothelial growth factor gene via the 5′ enhancer[J]. J Biol Chem, 1998, 273(24): 15257 - 15262.

(编辑　王　红)