

hexarelin 对 ox-LDL 引起的大鼠脑微血管内皮损伤的保护作用

徐启华 丁帆 代中华 徐海飞 郝维 曹济民

摘要 **目的** 建立体外培养大鼠脑微血管内皮细胞 ox-LDL 损伤模型,探讨 hexarelin 对大鼠脑微血管内皮细胞的保护作用。**方法** 分离并培养大鼠脑微血管内皮细胞,分成正常对照组(control)、ox-LDL 组(ox-LDL)、hexarelin + ox-LDL 组(hex + ox-LDL)3 组。其中 ox-LDL 组在培养液中加入 ox-LDL 50mg/L; hex + ox-LDL 组加入 ox-LDL 50mg/L 和 0.1 μ mol/L hexarelin;正常对照组加入等量 PBS。各组细胞无血清培养 12h,MTT 法检测细胞存活率,TUNEL 法检测细胞凋亡情况,Western blot 法检测内皮细胞 eNOS 蛋白表达情况以及蛋白质硝基化情况。**结果** 50mg/L ox-LDL 作用 12h 可明显诱导内皮细胞凋亡,减少 eNOS 蛋白表达,促进蛋白质的硝基化。而用 0.1 μ mol/L hexarelin 和 50mg/L ox-LDL 共同孵育,可明显减少内皮细胞的凋亡,提高 eNOS 的表达水平,减少蛋白质的硝基化程度。**结论** hexarelin 能有效抑制由 ox-LDL 引起的脑微血管内皮细胞损伤,提示 hexarelin 对脑动脉粥样硬化可能有一定抑制作用。

关键词 生长素释放肽 氧化型低密度脂蛋白 内皮型一氧化氮合酶 蛋白质硝基化 脑血管

The Protective Effect of hexarelin on the ox-LDL Induced Endothelial Injury in Rat Cerebral Microvasculature. Xü Qihua, Ding Fan, Dai Zhonghua, Xu Haifei, Hao Wei, Cao Jimin. Department of Physiology and Pathophysiology, Institute of Basic Medical Sciences Chinese Academy of Medical Sciences, School of Basic Medicine Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract **Objective** To investigate the protective effects of hexarelin on ox-LDL induced endothelial injury in rat cerebral microvasculature. **Methods** The endothelial cells of rat cerebral microvasculature were isolated and cultured with serum-free culture medium for 12 hours at 37°C. The cultured endothelial cells were treated with either 50mg/L ox-LDL (ox-LDL group) or with 0.1 μ mol/L hexarelin and 50mg/L ox-LDL (hex + ox-LDL group). Control cells were treated with PBS (control group). Cell viability was assessed by MTT assay and apoptosis was evaluated by TUNEL. The expression levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and protein nitration in endothelial cells were measured by Western blot. **Results** Compared with the control cells, the apoptotic rate and protein nitration level increased, and the eNOS expression level decreased in the ox-LDL treated endothelial cells. In cells with hexarelin + ox-LDL treatment, however, the apoptotic rate and protein nitration significantly decreased and eNOS expression significantly increased compared with the ox-LDL treated cells. **Conclusion** Hexarelin effectively protected the ox-LDL induced endothelial injuries in rat cerebral microvasculature. These effects suggest that hexarelin may have a potential in treating cerebral atherosclerosis.

Key words Growth hormone releasing peptides; Oxidized low-density lipoprotein; Endothelial nitric oxide synthase; Protein nitration; Cerebral vasculature

生长素释放肽(growth hormone releasing peptides, GHRP)是一类人工合成的寡肽类生长素促泌素(growth hormone secretagogues, GHS),包括 GHRP-1、GHRP-2、GHRP-6 和 hexarelin 等^[1]。GHRP 通过激动 GHS 受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)而发挥生物学效应。我们近年来发现,GHRP 除了可直接刺激生长激素释放外,还对心

血管损伤具有直接的保护作用。例如,GHRP 可治疗大鼠心力衰竭,抑制大鼠动脉粥样硬化^[2,3]。但 GHRP 是否对脑血管(特别是脑微血管)损伤也有保护作用,目前罕见报道。脑卒中是脑血管病的重要并发症,寻找能改善脑血管损伤的药物因此受到医学界的重视。本工作以 ox-LDL 诱发的大鼠脑微血管内皮细胞损伤为模型,探讨 hexarelin 对脑微血管内皮细胞损伤的保护作用及其可能机制。

近年来的基础研究表明,一氧化氮合酶(nitric oxidase, NOS)以 L-精氨酸和分子氧为底物催化 L-精氨酸生成一氧化氮(NO),而 NO 可以调节血管张力,抑制平滑肌细胞增生,还可抑制血小板黏附和

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30670863);国家“863”项目资助课题(2008AA02Z425)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生理学和病理生理学系

通讯作者:曹济民,电子信箱:caojimin@126.com

聚集^[4]。内皮型一氧化氮合酶(eNOS)活性降低及NO生成减少可导致内皮舒张功能障碍,因而是动脉粥样硬化形成的重要环节。尽管影响NO生物活性的因素较多,但愈来愈多的研究表明,氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)是导致动脉粥样硬化的重要因素之一,它对eNOS活性的影响是目前人们关注的热点^[5]。此外,许多研究证实,人动脉粥样硬化组织中存在蛋白质硝基化。临床研究证明,体内蛋白质硝基化水平的升高,可以作为动脉粥样硬化危险性的独立指标。动脉粥样硬化的不同时期,在巨噬细胞丰富的损伤部位,都可检测到诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达和蛋白质酪氨酸的硝基化。另外,在复合增生细胞斑块、无细胞纤维斑块和内膜斑块中均发现有硝基酪氨酸的存在^[6]。

本研究以大鼠脑微血管内皮细胞为实验材料,通过检测ox-LDL和hexarelin作用于大鼠脑微血管内皮细胞12h后细胞的凋亡、eNOS表达和蛋白质硝基化情况,探讨hexarelin对ox-LDL引发的大鼠脑微血管内皮细胞损伤的保护作用。

材料与方法

1. 实验材料:Ⅱ型胶原酶和M199、DMEM培养基购于美国Gibco公司,胎牛血清购于美国Hyclone公司,内皮细胞生长支持物购于美国BD Biosciences公司,兔抗Ⅷ因子抗体购于北京博奥森生物技术有限公司,兔抗eNOS抗体、兔抗硝基酪氨酸(nitro-tyrosine)抗体购于美国Cell Signaling公司,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗购于北京中杉金桥技术有限公司。

2. 大鼠大脑皮质微血管内皮细胞的分离、培养及鉴定:出生10天左右SD乳鼠20只,断头后无菌条件下剥离软脑膜及肉眼可见的大血管,去除大脑白质和小脑,收集大脑皮质,剪碎,匀浆,经180目、90目滤网过滤,收集滤网上的微血管段,加入0.1%Ⅱ胶原酶(Sigma公司)37℃振荡消化30min,制成细胞悬液,接种于明胶包被的培养瓶中,2h后吸出上层1/3的细胞悬液,加入相应的新鲜含内皮生长因子的DMEM培养液,继续培养,48h换液1次。倒置显微镜观察细胞呈铺路石状排列,经Ⅷ因子相关抗原免疫细胞化学检测证实为血管内皮细胞,取3~6代细胞用于实验。

3. 实验分组:收集20只大鼠大脑皮质微血管内皮细胞进行体外培养,根据不同处理将细胞分成3组:正常对照组(control)、ox-LDL组(ox-LDL)、hexarelin+ox-LDL组(ox-LDL+hex)。ox-LDL组加入ox-LDL 50mg/L,ox-LDL+hex组加入ox-LDL 50mg/L和0.1μmol/L hexarelin,正常对照组加入等量PBS,各组无血清培养12h,收集细胞进行各项检测。

4. MTT法检测细胞存活率:将培养的内皮细胞种于96孔板,每孔细胞数为 1×10^4 个,每组设10个复孔。各组药物刺

激12h后,每孔加入MTT溶液(5mg/ml)20μl,37℃继续孵育4h,终止培养,小心吸弃孔内上清培养液。每孔加入150μl DMSO,振荡10min,使结晶物完全溶解。选择490nm波长,用酶标仪检测各孔光吸收值。

5. TUNEL染色鉴定心肌细胞凋亡:将内皮细胞种于24孔板上,每孔细胞数为 5×10^4 个,每组设4个复孔,分别用各组药物刺激12h后,用PBS洗3次。用4%的多聚甲醛室温固定30~60min,PBS洗片。用封闭液(3% H₂O₂-甲醇)封片,室温处理10min。蒸馏水洗涤3次,加通透液处理30min,冰上孵育2min,PBS洗样片,吸干周围水分。标本片加0.01mol/L TBS 1:200新鲜稀释Proteinase K 37℃消化10~60s。每样片加入TUNEL反应液20微升/片。放入黑暗的湿盒中,37℃孵育120min。PBS洗3次,然后加入50~100μl DAB室温孵育10min。PBS洗3次,用苏木精染色5min。常规脱水透明,封片。每组选取3张爬片,每张爬片随机任选10个视野,统计棕色核(TUNEL阳性)细胞占细胞总数百分比。

6. Western blot检测内皮细胞eNOS表达及蛋白质酪氨酸硝基化情况:将内皮细胞种于培养瓶中,上述药物刺激12h后,内皮细胞总蛋白按常规方法提取,按Bradford法测量蛋白浓度。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至硝酸纤维素膜上,丽春红染色后观察转移效果。用封闭液37℃封闭1h,加入兔抗eNOS一抗,室温标记3h。TBS-T洗膜4次,然后再用辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗,室温标记2TBS-T洗膜4次,显色,以β-actin为内参照。

7. 统计学处理:各组数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间数据比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。应用SAS软件包进行统计学处理。

结 果

1. 大鼠脑微血管内皮细胞形态观察及Ⅷ因子鉴定结果:Ⅷ因子间接免疫荧光检查显示,原代及传代培养的内皮细胞质中有黄绿色的荧光着色,胞核呈黑绿色,整个细胞轮廓清楚(图1)。作为对照的内皮细胞偶见绿色斑点散发荧光,未见细胞轮廓。

2. hexarelin对内皮细胞存活率的影响:与正常对照组相比,ox-LDL组细胞死亡率明显增加($P < 0.01$)。而用ox-LDL和hexarelin共孵育可明显抑制ox-LDL诱导的细胞死亡($P < 0.05$)(图2A),说明hexarelin可明显提高ox-LDL作用下的内皮细胞存活率。

3. hexarelin对内皮细胞凋亡的抑制作用:TUNEL染色发现,用无血清培养基培养内皮细胞12h可引起约3.5%的细胞凋亡(核被染为棕色的细胞为TUNEL阳性细胞)。当用50mg/L ox-LDL孵育12h,凋亡的内皮细胞数增至15.8%。而用hexarelin(0.1mol/L)和ox-LDL(50mg/L)共同作用12h,TUNEL阳性的细胞明显降至约9.5%(图2B、图3)。

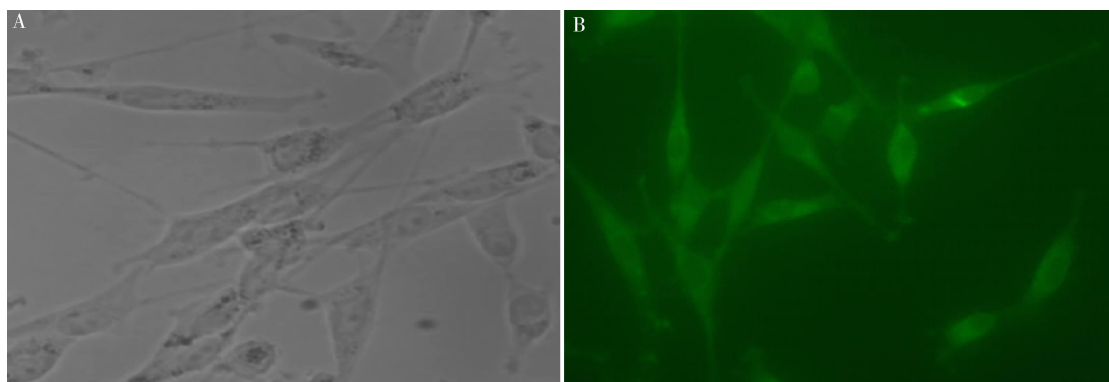


图1 内皮细胞的光镜下形态(A)和Ⅷ因子免疫荧光染色(B)

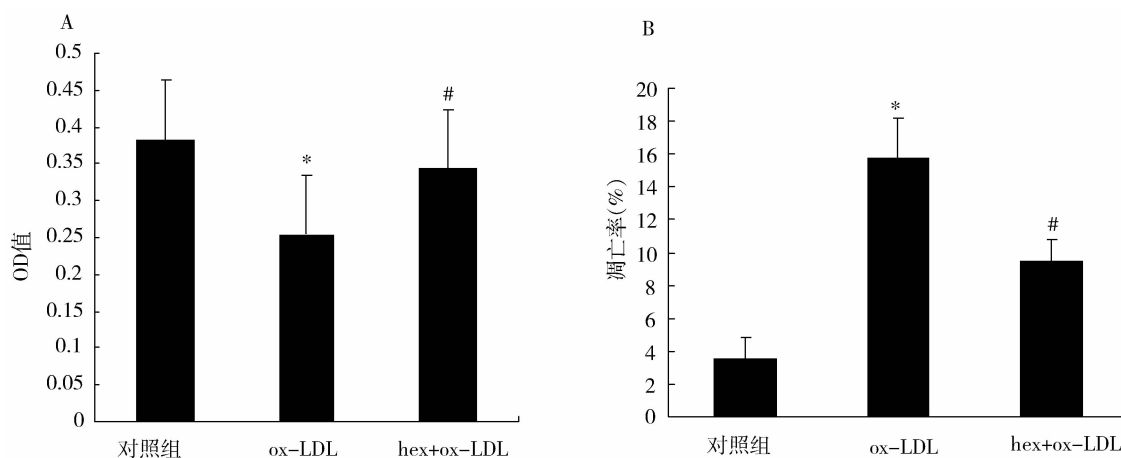


图2 MTT法检测细胞存活率和TUNEL法检测细胞凋亡

A. MTT法检测细胞存活率($n=10$); B. TUNEL法检测细胞凋亡($n=4$)

*与正常组比较, $P<0.01$; #与ox-LDL比较, $P<0.05$

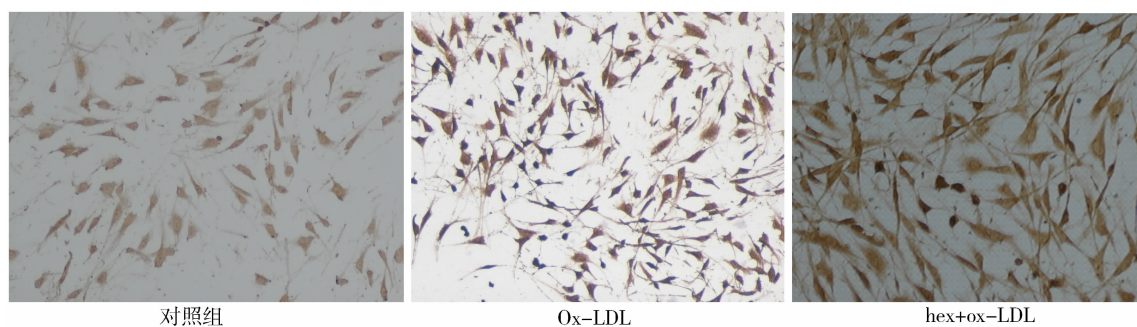


图3 TUNEL法检测各组心肌细胞凋亡

凋亡细胞核染为深棕色, 细胞体积减小

4. hexarelin 增强内皮细胞 eNOS 蛋白表达水平: 与正常组相比, ox-LDL 组 eNOS 在内皮细胞的表达明显减少。而 hexarelin 可抑制 ox-LDL 作用, 使 eNOS 表达量增加(图4A)。

5. hexarelin 抑制内皮细胞蛋白质酪氨酸硝基化水平: 如图4B所示, ox-LDL 能明显增加内皮细胞蛋白质的硝基化程度, 而 hexarelin 能降低蛋白质的硝基化程度。

讨 论

我们在前一阶段的工作已经证明, hexarelin 可抑制大鼠由高脂饲料诱发的动脉粥样硬化^[3]。但 hexarelin 对脑血管是否具有保护作用, 目前未见报道。本研究发现, hexarelin 可抑制 ox-LDL 对大鼠大脑皮质微血管内皮的损伤作用, 包括促进 eNOS 表达、降低内皮细胞蛋白质的硝基化水平、促进内皮细胞存活和抑制凋亡。这些结果提示 hexarelin 具有保

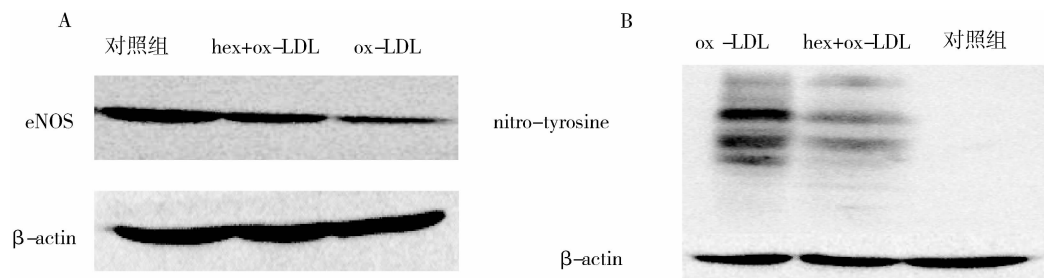


图 4 内皮细胞 eNOS 表达及蛋白质硝基化情况

护脑血管内皮的作用,由此推测,hexarelin 可能具有抑制脑血管损伤的作用,有一定临床潜在应用价值。

ox-LDL 是引起血管内皮损伤的一个重要内源性因子。LDL 被氧化修饰后,理化性质发生了一系列的改变,生成大量的脂质过氧化物,卵磷脂转化为溶血卵磷脂,同时内皮细胞膜上的 LDL 受体识别点发生改变,产生 ox-LDL 的自身结合位点^[7]。Liao 等的研究表明,ox-LDL 可明显降低内皮细胞 eNOS 的活性及其基因的表达,从而减少内皮源性 NO 的产生。Ohara 等的研究表明,ox-LDL 能使体内氧自由基生成增加从而影响 eNOS 的活性。本研究采用 ox-LDL 建立内皮损伤模型,符合体内内皮损伤的一般过程。

eNOS 信号通路在内皮细胞的功能发挥中起关键性作用。在生理情况下,eNOS 催化合成 NO 从而发挥诸多生理功能。但在病理状态下 eNOS 发生功能障碍,其产物更多为超氧阴离子(O_2^-),可消耗 NO 生成氧化能力更强的过氧基阴离子($ONOO^-$)而导致组织结构和功能损伤,同时还可氧化 eNOS 活性中心的“锌指结构”而加重 eNOS 功能障碍,形成恶性循环^[8]。有文献报道^[9],高脂、高糖喂养大鼠和自发性高血压大鼠主动脉 eNOS 表达降低。本研究发现,hexarelin 可促进脑血管内皮 eNOS 的表达,说明 hexarelin 可通过调节 eNOS 信号通路而发挥其内皮保护作用。

蛋白质硝基化在细胞损伤中发挥重要作用。机体在遭受有害刺激时,体内自由基包括过氧化亚硝酸阴离子($ONOO^-$)、过氧化氢、羟自由基、NO 等大量增加,使体内氧化能力超过抗氧化能力,引起生物膜脂质过氧化、细胞内蛋白质硝基化及酶变性、DNA 损害,最后导致细胞死亡、凋亡和疾病的发生。在这些活性分子中, $ONOO^-$ 既是一种强氧化剂又是一种强硝化剂,性质很活泼,能够迅速与周围物质发生反应,是引起蛋白质酪氨酸硝基化的主要因素^[6]。我们发现,hexarelin 可抑制由 ox-LDL 引起的内皮细胞蛋白

质硝基化作用,说明 hexarelin 的保护内皮作用可通过干扰蛋白质硝基化途径实现。

综上所述,hexarelin 可通过增强内皮细胞 eNOS 的表达以及抑制内皮细胞蛋白质硝基化而发挥对内皮的保护作用。由于 ox-LDL 在动脉粥样硬化发生、发展中起重要作用,我们有理由推测,hexarelin 具有抑制脑动脉粥样硬化的作用,但这一潜在作用需要进一步研究证实。此外,eNOS 表达降低和蛋白质硝基化增强是内皮细胞对许多伤害性刺激的普遍反应,因此我们认为,hexarelin 可能具有“广谱”的保护脑血管作用,值得进一步研究。

参考文献

- 1 Casanueva FF, Dieguez C. Growth Hormone Secretagogues: Physiological Role and Clinical Utility. *Trends Endocrinol Metab*, 1999, 10: 30-38
- 2 Zaugg M, Xu W, Lucchinetti E, et al. Circulation. Beta-adrenergic receptor subtypes differentially affect apoptosis in adult rat ventricular myocytes. *Circulation*, 2000, 102: 344-350
- 3 Pang J, Xu Q, Xu X, et al. Hexarelin suppresses high lipid diet and vitamin D₃-induced atherosclerosis in the rat. *Peptides*, 2010, 31(4): 630-638
- 4 崔斌. 内皮型一氧化氮合酶对内皮祖细胞生物学功能的影响. *国际心血管病杂志*, 2007, 34(4): 232-234
- 5 Smalley DM, Li JH, Italiano ML, et al. Native low density lipoprotein increases endothelial cell adhesiveness by inducing ICAM-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1996, 16(4): 585-590
- 6 李早, 高中洪. 心血管疾病中的蛋白质硝基化. *生命的化学*, 2006, 26(3): 247-250
- 7 张泉三, 董果雄, 张社华. OX-LDL 和生理浓度抗坏血酸对人脐静脉内皮细胞 eNOS 活性的影响. *青岛大学医学院学报*, 2007, 43(2): 112-115
- 8 Rosalia RR, Maria DH, Maria D, et al. Pomace Olive Oil Improves Endothelial Function in Spontaneously Hypertensive Rats by Increasing Endothelial Nitric Oxide Synthase Expression. *Am J Hypertens*, 2007, 20: 728-734
- 9 Leec C, Chen PR, Lin SK, et al. Sesamin induces nitric oxide and decreases endothelin-1 production in HUVECs: possible implications for its antihypertensive effect. *J Hypertens*, 2004, 22: 2329-2338

(收稿: 2010-04-08)

(修回: 2010-05-12)