

# 蛋白 - 酪氨酸激酶在大鼠血管平滑肌细胞诱导型一氧化氮合酶基因表达中的作用

尹小龙<sup>①</sup>

吕俊升

浙江大学医学院附属第二医院心内科, 杭州 310006)

主题词 蛋白 - 酪氨酸激酶; 肌, 平滑, 血管; 一氧化氮合酶, 诱导型; 基因表达; 白细胞介素 - 1 $\beta$ ; 大鼠

摘要 为了解蛋白 - 酪氨酸激酶及蛋白激酶 C 在血管平滑肌细胞诱导型一氧化氮合酶基因表达中的作用, 应用蛋白 - 酪氨酸激酶抑制剂抑制细胞蛋白 - 酪氨酸激酶活性及应用伏波脂耗竭细胞蛋白激酶 C。结果发现蛋白 - 酪氨酸激酶抑制剂显著抑制了白细胞介素 - 1 $\beta$  诱导的血管平滑肌细胞诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达 ( $0.830 \pm 0.189$  对  $0.519 \pm 0.180$ ,  $P < 0.05$ ) 和一氧化氮的释放 (培养基亚硝酸盐浓度为  $8.94 \pm 0.86 \mu\text{mol/L}$  对  $2.83 \pm 0.47 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.01$ )。而耗竭细胞蛋白激酶 C 不影响其诱导型一氧化氮合酶基因表达和一氧化氮合成, 表明白细胞介素 - 1 $\beta$  诱导的大鼠血管平滑肌细胞诱导型一氧化氮合酶基因表达信号转导为蛋白 - 酪氨酸激酶依赖性的而非蛋白激酶 C 依赖性的转导。

## The Effect of Protein - Tyrosine Kinases on Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Vascular Smooth Muscle Cells of Rats

YIN Xiao - Long and LU Jun - Sheng

*Department of Cardiovascular Disease, the Second Affiliated Hospital, Zhejiang University, Hangzhou 310006, China*

MeSH Protein - Tyrosine Kinase; Muscle, Smooth, Vascular; Nitric Oxide Synthase, Inducible; Gene Expression; Interleukin - 1 $\beta$ ; Rats

**ABSTRACT** **Aim** To observe the effect of protein - tyrosine kinases (PTKs) and protein kinase C (PKC) on expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene in vascular smooth muscle cells (VSMC). **Methods** Cultured aortic VSMC of normal SD rat were used to investigate iNOS mRNA expression which was analysed by semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT - PCR). According to the principle of Griess reaction, nitrite was determined from the supernatant of cultured VSMC to estimate the nitric oxide (NO) release. **Results** Protein - tyrosine kinases inhibitor can significantly inhibit VSMC iNOS mRNA expression ( $0.830 \pm 0.189$  vs  $0.519 \pm 0.180$ ,  $P < 0.05$ ) and nitrite accumulation in medium ( $8.94 \pm 0.86 \mu\text{mol/L}$  vs  $2.83 \pm 0.47 \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.01$ ) induced by interleukin 1 $\beta$  (IL - 1 $\beta$ ). Depleted PKC had no effects on VSMC iNOS mRNA expression ( $0.83 \pm 0.189$  vs  $0.815 \pm 0.174$ ,  $P > 0.05$ ) and nitrite accumulation in medium ( $8.94 \pm 0.86 \mu\text{mol/L}$  vs  $8.36 \pm 0.56 \mu\text{mol/L}$ ,  $P > 0.05$ ). **Conclusion** Signal transduction of VSMC iNOS gene expression induced by IL - 1 $\beta$  is PTKs dependent and PKC independent.

诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 基因表达在某些心血管疾病病理过程中有重要意义。不同类型的细胞 iNOS 基因表达调控机理也有差异。蛋白 - 酪氨酸激酶 (protein - tyrosine kinases, PTKs) 是十分重要的信号转导分子, 最近有报道 PTKs 抑制剂可抑制巨噬细胞<sup>[1]</sup>、肾系膜细胞<sup>[2]</sup>等细胞的 iNOS 基因的表达。激活蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 可下调肾系膜细胞 iNOS 基因表达<sup>[3]</sup>但不影响心肌细胞 iNOS 基因表达<sup>[4]</sup>。本文通过抑制 PTKs 及耗竭 PKC 的方法, 观察 PTKs 及 PKC 在血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) iNOS 基因表达调控中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

白细胞介素 - 1 $\beta$  (interleukin - 1 $\beta$ , IL - 1 $\beta$ )、Genistein 和 Trizol 为 Gibco 公司产品; 二丁酸伏波脂 (PDBU) 为 Sigma 公司产品; 逆转录试剂为 Promega 公司产品。

### 1.2 细胞培养

体重 200 ~ 250 g SD 大鼠取主动脉段, 除去内、外膜, 以贴块法进行 VSMC 原代培养, 经抗平滑肌细胞  $\alpha$ -actin 单克隆抗体免疫组化染色鉴定。传 4 ~ 6 代细胞进行实验。

### 1.3 实验分组

将同代单层铺满 100 mL 玻璃培养瓶底的 VSMC (约  $5 \times 10^6$  个细胞) 分为四组: ① 对照组; ② IL - 1 $\beta$

① 现在浙江大学医学院附属第一医院心科, 杭州 310003

组, VSMC 内加  $5 \times 10^4$  u/L IL-1 $\beta$  刺激 24 h; ③Genistein 组, 先用 PTKs 抑制剂 Genistein 100 nmol/L 预处理 VSMC 30 min 后同 IL-1 $\beta$  组处理; ④PDBU 组, 先用 200 nmol/L PDBU 预处理 VSMC 24 h 后同 IL-1 $\beta$  组处理。

#### 1.4 细胞总 RNA 提取

每瓶细胞加入 2 mL Trizol 试剂, 提取步骤按 Trizol 试剂产品说明书, 每瓶细胞提取总 RNA 约 35  $\mu$ g, 其 A260/A280 值在 1.68 ~ 1.80 之间, RNA 电泳检查无 RNA 降解。

#### 1.5 反转录聚合酶链反应

半定量反转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 方法根据参考文献 [5] 稍加修改。

1.5.1 逆转录 3.6  $\mu$ g 细胞总 RNA 加 dNTP 及 1u 的随机引物, 70 $^{\circ}$ C 5 min, 置冰上 5 min, 加入 AVM 逆转录酶 10 u, 42 $^{\circ}$ C 1 h。煮沸 5 min 灭活逆转录酶。

1.5.2 聚合酶链反应 iNOS 引物参照 Balligand 等 [6] 所设计的引物序列, 正义链: 5'-GAGATCAATGCAGCTGTG-3'; 反义链: 5'-AGAATGGAGATAGGACGT-3', 扩增片段长度 217 bp, 以  $\beta$ -actin 为内参照, 引物由杨兵勋博士惠赠, 扩增片段长度 310 bp。共进行三十二轮循环 PCR 扩增, 第一个循环: 94 $^{\circ}$ C 10 min, 57 $^{\circ}$ C 2 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min。第二至三十二个循环: 94 $^{\circ}$ C 1 min, 57 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 2 min。PCR 产物经 3% 琼脂糖电泳分离后进行光密度扫描分析 (Gel-Doc 1000 型成像系统及 Molecular Analyst 分析软件, Bio-RAD 公司), 结果以 iNOS cDNA 光密度/ $\beta$ -actin cDNA 光密度值 (OD iNOS/OD  $\beta$ -actin) 表示。

#### 1.6 一氧化氮释放测定

$1 \times 10^8$ /L VSMC 于无酚红 DMEM 培养基 (含 0.4 mmol/L 精氨酸) 培养, 经处理后取培养基 1 mL, 加入 0.2% 对氨基苯磺酸 0.9 mL, 0.2% 萘乙二胺 0.1 mL, 置室温 30 min, 分光光度计于 540 nm 波长下测定 OD 值。根据亚硝酸标准品测定所得的回归方程估算培养基中的亚硝酸盐浓度 [7]。

#### 1.7 统计分析

处理间的比较用方差分析, 实验数据采用均数  $\pm$  标准差表示。

## 2 结果

2.1 蛋白-酪氨酸激酶及蛋白激酶 C 对白细胞介素-1 $\beta$  诱导血管平滑肌细胞诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的影响

血管平滑肌细胞基础状态下不表达 iNOS mRNA

NA, IL-1 $\beta$  呈剂量依赖性地诱导 iNOS mRNA 表达 (图 1, Figure 1)。Genistein 可显著抑制 IL-1 $\beta$  诱导的 VSMC iNOS mRNA 表达, 而 PDBU 不影响 IL-1 $\beta$  诱导的 VSMC iNOS mRNA 表达 (表 1, Table 1)。

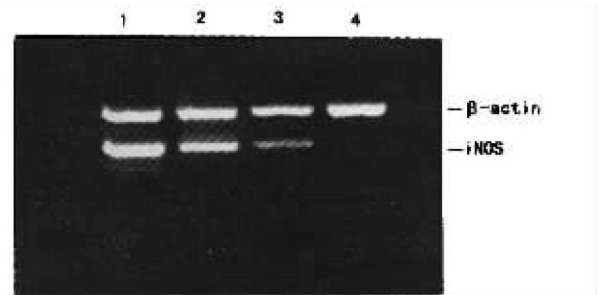


图 1. 白细胞介素-1 $\beta$  诱导血管平滑肌细胞诱导型一氧化氮合酶 mRNA 表达的量-效关系

Figure 1. The dose-effect relation of concentration of IL-1 $\beta$  and expression of VSMC iNOS mRNA. 1: IL-1 $\beta$   $40 \times 10^4$  u/L, 2: IL-1 $\beta$   $5 \times 10^4$  u/L, 3: IL-1 $\beta$   $2 \times 10^4$  u/L, 4: Control

表 1. Genistein 及 PDBU 对 IL-1 $\beta$  诱导血管平滑肌细胞 iNOS mRNA 表达的影响

Table 1. The effect of Genistein and PDBU on the expression of iNOS mRNA induced by IL-1 $\beta$  in VSMC ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	n	OD iNOS/OD $\beta$ -actin
IL-1 $\beta$	4	0.830 $\pm$ 0.19
Genistein	4	0.519 $\pm$ 0.18 <sup>a</sup>
PDBU	4	0.815 $\pm$ 0.17

IL-1 $\beta$  group:  $5 \times 10^4$  u/L; Genistein group: 100 nmol/L + IL-1 $\beta$   $5 \times 10^4$  u/L; PDBU group: 200 nmol/L + IL-1 $\beta$   $5 \times 10^4$  u/L. a:  $P < 0.05$ , compared with IL-1 $\beta$  group

2.2 蛋白-酪氨酸激酶及蛋白激酶 C 对白细胞介素-1 $\beta$  诱导血管平滑肌细胞一氧化氮释放的影响

白细胞介素-1 $\beta$  诱导 VSMC 培养基中亚硝酸盐浓度显著增加, Genistein 可显著抑制 IL-1 $\beta$  诱导的 VSMC 培养基中亚硝酸盐浓度增加, 而 PDBU 对 IL-1 $\beta$  诱导的 VSMC 培养基中亚硝酸盐浓度增加无影响 (表 2, Table 2)。

## 3 讨论

白细胞介素-1 $\beta$  是已知最强烈的 iNOS 基因表达诱导剂。PTKs 抑制剂 Genistein 显著抑制了白细胞介素-1 $\beta$  诱导的血管平滑肌细胞 iNOS mRNA 表达及 NO 合成、释放, 表明 PTKs 在 iNOS 基因表达的影响。Genistein 及 PDBU 对 IL-1 $\beta$  诱导血管平滑肌细胞培养基中亚硝酸盐浓度的影响

**Table 2. The effect of Genistein and PDBU on the nitrite concentration ( $\mu\text{mol/L}$ ) in medium ( $\bar{x} \pm s$ )**

Groups	n	Concentration of nitrite
Control	4	1.46 $\pm$ 0.31
IL - 1 $\beta$	4	8.94 $\pm$ 0.86 <sup>b</sup>
Genistein	4	2.83 $\pm$ 0.47 <sup>ad</sup>
PDBU	4	8.36 $\pm$ 0.56 <sup>bce</sup>

IL - 1 $\beta$  group:  $5 \times 10^4 \text{ u/L}$ ; Genistein group:  $100 \text{ nmol/L} + \text{IL} - 1\beta \ 5 \times 10^4 \text{ u/L}$ ; PDBU group:  $200 \text{ nmol/L} + \text{IL} - 1\beta \ 5 \times 10^4 \text{ u/L}$ . a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.001$ , compared with control group; c:  $P > 0.05$ , d:  $P < 0.01$ , compared with IL - 1 $\beta$  group; e:  $P < 0.01$ , compared with genistein group

信号转导中起着至关重要的作用。白细胞介素 - 1 $\beta$  与其膜上受体结合后通过受体胞浆部分激活与之连接的非受体型 PTKs, 非受体型 PTKs 主要有两大家族: Src 家族及 Jak 家族, PTKs 通过磷酸化底物蛋白的酪氨酸残基而使其激活。有报道白细胞介素 - 1 $\beta$  激活 pp60<sup>Src</sup> 样的 PTKs<sup>[8]</sup>, Src 可通过磷脂酶 C $\gamma$  途径激活丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen - activated protein kinase, MAPK), 再通过 MAPK 调控 iNOS 基因的表达<sup>[9]</sup>。PTKs 调控 iNOS 基因的表达的另一途径是激活 NF -  $\kappa$ B, NF -  $\kappa$ B 再结合到 iNOS 基因的 NF -  $\kappa$ B 结合位点调控基因表达<sup>[10]</sup>。小剂量 PTKs 抑制剂 Genistein 即可抑制 PTKs 的活性。Genistein 另一作用部位是 MAPK, MAPK 激活需上游激酶磷酸化其酪氨酸及苏氨酸残基, Genistein 通过抑制 MAPK 酪氨酸残基磷酸化而抑制其活性。应用 PDBU 耗竭细胞 PKC 并不影响白细胞介素 - 1 $\beta$  诱导的血管平滑肌细胞 iNOS mRNA 表达及 NO 合成、释放。Kanno 等<sup>[11]</sup> 也报道 PKC 抑制剂 staurosporine 对血管平滑肌细胞 iNOS mRNA 表达无影响。说明白细胞介素 - 1 $\beta$  诱导的血管平滑肌细胞 iNOS 基因表达是非 PKC 依赖性的。结果表明 PTKs 介导了白细胞介素 - 1 $\beta$  诱导的血管平滑肌细胞 iNOS 基因表达, PKC 不影响白细胞介素 - 1 $\beta$  诱导的血管平滑肌细胞 iNOS 基因表

达。

#### 参考文献

- 1 Pual A, Pendereigh RH, Plevin R. Protein kinase C and tyrosin kinase pathways regulation lipopolysaccharide - induced nitric oxide synthase activity in RAW 264.7 murine macrophage. *Br J Pharmacol*, 1995, **114** (2): 482 - 488
- 2 Tetsuka T, Morrison AR. Tyrosin kinase activation is necessary for inducible nitric oxide synthase expression by interleukin - 1 beta. *Am J Physiol*, 1995, **269** (part 1): C55 - 59
- 3 Muhl H, Dfeilschifter J. Possible role of protein kinase C - epsilon isoenzyme in inhibition of interleukin 1beta induction of nitric oxide synthase in rat renal mesangial cells. *Biochem J*, 1994, **303** (2): 607 - 612
- 4 Lopinte MC, Sitkins JR. Mechanism of interleukin 1 beta regulation of nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Hypertension*, 1996, **27** (part 2): 709 - 714
- 5 Colasanti M, Persichini T, Menegazzi M. Induction of nitric oxide synthase mRNA expression suppression by exogenous nitric oxide. *J Biol Chem*, 1995, **270** (45): 26 731 - 733
- 6 Balligand JL, Ungareanu LD, Simmon WW. Induction of nitric oxide synthase in rat cardiac microvascular endothelial cells by interleukin 1 beta and INF gama. *Am J Physiol*, 1995, **268** (part 2): 1 293 - 303
- 7 Seyed N, Xu XB, Najletti A. Coronary kinin generation mediates nitric oxide release after angiotensin receptor stimulation. *Hypertension*, 1995, **26** (1): 164 - 170
- 8 Guy GR, Phill R, Tan YH. Activation of protein kinase C and the inactivation of protein phosphates 2A in tumor necrosis factor and interleukin 1 signal transduction pathways. *Eur J Biochem*, 1995, **229** (2): 503 - 511
- 9 Singh K, Balliand JL, Fischer TA. Regulation cytokine - induced nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 1996, **271** (2): 1 111 - 117
- 10 Xie QW, Whisnawt R, Nathan C. Role of transcription factor NF -  $\kappa$ B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1994, **269** (7): 4 705 - 708
- 11 Kanno K, Hirata Y, Imai T. Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin in vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1993, **22** (1): 34 - 39

此文 1998 - 10 - 05 收到, 1999 - 05 - 10 修回)

此文编辑 朱雯霞)