模拟微重力效应对心肌细胞一氧化氮水平的影响及其相关机制的研究*

熊江辉 李莹辉** 聂捷琳
(航天医学工程研究所航天细胞与分子生物学实验室, 北京 100094)

摘要 空间微重力导致的心肌收缩功能下降是航天医学的重要问题, 其发生机制尚不清楚. 采用电子自旋共振(ESR)、免疫细胞化学和核酸原位杂交等技术研究了模拟微重力效应对心肌细胞一氧化氮(NO)水平、诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)表达的影响及其调控的信号转导途径, 以探讨模拟微重力影响心肌细胞收缩功能的可能机制. 结果表明, 模拟微重力导致心肌细胞 NO 水平增高, iNOS 蛋白及其 mRNA 表达上调; 非选择性的蛋白激酶抑制剂 staurosporine 和选择性的蛋白激酶 C (PKC)抑制剂 calphostin C 均可显著抑制模拟微重力下心肌细胞 NO 水平增高, 说明模拟微重力对 iNOS 表达的调节至少是部分地依赖于 PKC 途径. 结果提示, 心肌细胞 NO 途径对模拟微重力条件敏感, 该途径可能在模拟微重力影响心肌细胞收缩功能的机制中发挥重要作用.

关键词 模拟微重力 心肌细胞 一氧化氮 一氧化氮合成酶 蛋白激酶 C 信号转导

空间微重力可引起航天员的心血管系统功能失调, 心肌收缩力下降[1], 这一现象的发生机理尚不明了. 阐明微重力对心肌细胞的影响机制是航天医学的重要课题, 也有助于理解力学因素对心肌细胞信号转导的影响及相关疾病的病理过程. 一氧化氮(nitric oxide, NO)广泛参与细胞内信号转导过程, NO 水平是心肌收缩和舒张的重要调控因子[2]. 心肌细胞可以表达内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)和诱导型一氧化氮合成酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS). 前者合成基础水平的 NO, 为维持正常心肌收缩功能所必需; 后者合成高水平的 NO 则可抑制心肌的收缩, 在一定条件下对心肌细胞产生毒副作用. 众多病理状态(如脓毒性休克、缺血再灌注损伤等)中出现的心肌收缩功能不良都与 NO 密切相关. 细胞因子、细菌脂多糖、内毒素可使心肌细胞 iNOS 表达上调、NO 生成过多进而导致心肌收缩功能下降. 模拟微重力条件下心肌细胞的收缩力下降, 可能也涉及 NO 水平的变化.

心肌细胞的力学状态可影响 iNOS 的表达. 机械应变可抑制细胞因子刺激引起的心肌细胞 NO 水平、iNOS 蛋白和 iNOS mRNA 表达的变化, 这种抑制作用随应变强度的增加而增强, 该过程依赖于 iNOS 表达调节的蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)途径[3]. 而有关空间微重力或模拟微重力条件下心肌细胞 iNOS 表达及其调控尚未见报道. 国内外一般采用回转器作为模拟微重力手段, 在地面培养细胞体系中研究微重力的细胞学效应. 本文采用小型回转器模拟微

2002-05-14 收稿, 2002-07-23 收修改稿
* 国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(批准号: 863-2-2-2-4)
** 联系人, E-mail: yinghuidd@sina.com

重力效应, 检测了模拟微重力下心肌细胞培养体系的 NO 水平、iNOS 蛋白及其 mRNA 表达的变化, 并观察了非选择性蛋白激酶抑制剂 staurosporine 和选择性的 PKC 抑制剂 calphostin C 处理条件下 NO 水平的变化, 以探讨模拟微重力效应对心肌细胞 NO 水平的影响及其机制.

1　材料与方法

1.1　材料

二乙基二硫氨甲酸(diethyl-dithiocarbamate, DETC), 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), N-硝基-L-精氨酸(Nω-Nitro-L-Arginine, L-NNA), 二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB), staurosporine, calphostin C 购自 Sigma 公司; 兔抗大鼠 iNOS 多克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自 Santa Cruz 公司; 细胞培养片(Cell Culture Coverslip)为 Nalge Nunc International 公司产品; iNOS mRNA 原位杂交检测试剂盒由北京大学医学部病理学教研室提供; 硫酸亚铁($FeSO_4$)、连二亚硫酸钠($Na_2S_2O_4$)、乙酸乙酯为国产分析纯.

1.2　心肌细胞原代培养

取 2 ~ 3 d Wistar 乳鼠, 开胸剪取心尖组织, 洗涤剪碎成 1 mm^3 碎块; 洗涤后用 0.25%胰酶-0.02%乙二胺四乙酸(EDTA)于 37℃多次消化; 过滤收集细胞, 1000 r/min 离心 3 次, 每次 8 min; 差速贴壁法去除部分成纤维细胞后计数, 按 5×10^5 细胞/mL 的密度接种于含 8%血清的改良伊格尔培养基(modified Eagle's medium, MEM)中, 37℃密闭培养. 一般在接种后 1 ~ 2 d 内可见搏动的心肌细胞球形聚集体.

1.3　模拟微重力条件下心肌细胞 NO 水平的检测

接种后 4 ~ 5 d 挑选细胞生长良好的培养瓶, 将培养细胞随机分成 8 组(n = 3), 其中 4 组为模拟微重力组(30 r/min 回转, 置于 37℃培养箱中, 培养瓶充满培养液以减小回转引起的机械剪切力), 另 4 组为对照组. 模拟微重力条件下 NO 的捕集参照张德良等人[4]建立的方法作部分修改, 即细胞灌满 MEM 培养液回转一定时间(分别为 8, 24, 36, 48 h)后换液, 在培养液中分别加入 1 mmol/L $FeSO_4$, 5 mmol/L $Na_2S_2O_4$ 和 2 mmol/L DETC, 灌满混匀继续回转 2 h 以捕集回转过程中产生的 NO. 收集培养液, 加入 5 mL 乙酸乙酯剧烈震荡 3 min; 4℃, 5500 r/min 离心 20 min; 取上层酯相, 进行 ESR 检测或 4℃避光保存. 对照组灌满后静置于培养箱中, 其他处理同模拟微重力组. ESR 检测方法如下: 取 150 μL 样品注入石英测试管, 用 BRUKE 200 自旋共振仪在室温下记录. 测试条件为: X 波段, 调制频率 100 kHz, 调幅 3.2 G, 微波功率 20 mW, 时间常数 0.3 s, 扫描时间 4 min, 扫描次数 4 次. NO 信号强度以 g = 2.034 处氮的三重超精细分裂第一峰的高度计算.

1.4　核酸原位杂交法测量心肌细胞 iNOS mRNA 表达的变化

原代培养时将细胞接种在贴有细胞培养片的培养瓶中, 37℃密闭培养. 接种后 4 ~ 5 d 挑选细胞生长良好的培养瓶, 分为 4 组: 模拟微重力组, 回转处理 48 h; 对照组为静止培养; 阳性对照组静止培养, 在培养液中加入 LPS(终浓度为 10 μg/mL)处理 24 h; 阴性对照组为静止培养, 在原位杂交步骤中不用 cRNA 探针处理, 代之以磷酸盐缓冲液(PBS). 原位杂交程序如下: 细胞培养片经 PBS 洗涤后用 100%丙酮固定 20 min; PBS 洗涤, 0.1 mol/L 盐酸处理 10 min; PBS 洗涤, 蛋白酶 K 37℃孵育 10 min; PBS 洗涤后用 4%多聚甲醛固定 10 min; PBS 洗涤, 90%乙醇脱水 15 s; 滴加杂交液(含地高辛标记 cRNA 探针), 42℃孵育 20 h; 分别加入含 50%甲酰胺的 2

× 氯化钠/柠檬酸钠溶液(SSC)30 min, 2 × SSC 15 min, 2 × SSC 15 min, 0.1 × SSC 15 min; Buffer Ⅰ (pH 7.5 Tris-Cl 100 mmol/L, NaCl 150 mmol/L)洗涤; 马血清(1∶100, Buffer Ⅰ稀释)封闭 45 min; 碱性磷酸酶标记的地高辛抗体(1∶500, Buffer Ⅰ稀释)孵育 1 h; Buffer Ⅰ洗涤 15 min × 3 次; Buffer Ⅲ(pH 9.5 Tris-Cl 100 mmol/L, NaCl 100 mmol/L, $MgCl_2$ 50 mmol/L)洗涤 1 min × 2 次; 滴加氮蓝四唑和溴氯吲哚磷酸盐混和液(NBT/BCIP)室温显色 20 min, PBS 洗涤以终止显色反应, 37℃烘干, 二甲苯透明, 树胶封片.

1.5 免疫细胞化学法测量心肌细胞 iNOS 表达的变化

细胞接种和分组同核酸原位杂交法. 取出细胞培养片, PBS 洗 1 次, 3.7%多聚甲醛固定 30 min; PBS 洗涤后用正常羊血清(5%, PBS 稀释)封闭 30 min, 兔抗 iNOS 抗体(1∶50 稀释)室温孵育 90 min, PBS 洗涤后用碱性磷酸酶标记的二抗(羊抗兔 IgG, 1∶1000 稀释)室温孵育 120 min, PBS 洗涤, 入 DAB 溶液(含 0.1% H_2O_2)孵育 30 min, PBS 浸洗, 常规脱水、透明、封片.

1.6 统计方法

数据按平均值 ± 标准差的方式表示, 组间的显著性检验采用 *t* 检验. $P < 0.05$ 具有显著性差异, $P<0.01$ 具有非常显著性差异.

2 结果

2.1 模拟微重力下心肌细胞 NO 水平的变化

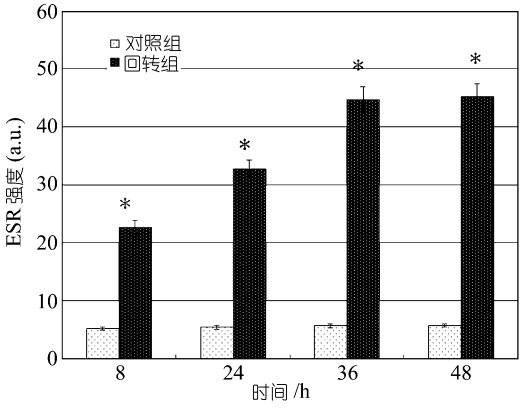


图 1 不同回转时间心肌细胞培养体系中 NO 水平
* 示 $P < 0.05$, ** 示 $P < 0.01$ (与静置对照组相比)

模拟微重力组心肌细胞培养体系中 NO 水平高于静置对照组, 回转 8 h 后即可检测到显著的 NO 信号(ESR 谱 g =2.034 处氮的三重分裂峰为 NO 的特征峰). 回转 8, 24, 36 和 48 h 后 NO 水平分别为相应对照组的 2.16, 3.02, 3.94, 4.00 倍(图 1). 说明模拟微重力效应导致心肌细胞 NO 合成水平显著升高.

2.2 模拟微重力下心肌细胞 iNOS mRNA 表达的变化

用 LPS 处理细胞作为 iNOS mRNA 表达的阳性对照(图未显示), 阳性反应典型特点是胞浆内充满蓝色颗粒, 胞核区浅染或不着色; 不加探针为阴性对照, 细胞不着色或着色很浅(图未显示). 模拟微重力组细胞呈蓝阳性反应(图 2(a)), 静置对照组细胞不着色或着色很浅(图 2(b)). 该结果提示模拟微重力效应可导致心肌细胞 iNOS mRNA 表达上调.

2.3 模拟微重力下心肌细胞 iNOS 表达的变化

用 LPS 处理心肌细胞作为 iNOS 表达的阳性对照, 染色为黄色(图未显示), 不加一抗作为阴性对照, 细胞基本不着色(图未显示). 模拟微重力细胞呈黄色阳性反应(图 3(a)), 静置对照组细胞透明, 基本不着色(图 3(b)). 该结果提示模拟微重力下心肌细胞 iNOS 表达亦有所上调.

2.4 抑制剂对模拟微重力下心肌细胞 NO 水平的影响

分别在回转同时加入抑制剂 staurosporine 和 calphostin C, 处理 48 h 后测定 NO 水平, 不

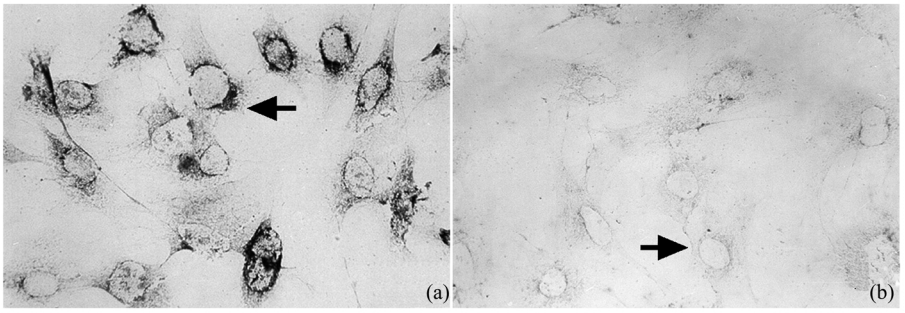


图 2　培养心肌细胞 iNOS mRNA 的原位杂交检测结果
(a) 模拟微重力组; (b) 静置对照组

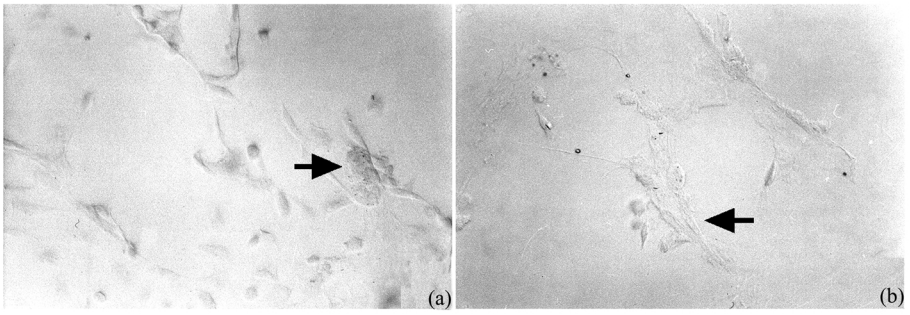


图 3　培养心肌细胞 iNOS 蛋白的免疫细胞化学检测结果
(a) 模拟微重力组; (b) 静置对照组

加抑制剂作为对照组. 发现 500 nmol/L staurosporine 可以显著抑制心肌细胞培养体系中 NO 信号(使 NO 信号强度减弱 23.6%, 图 4). 由于 staurosporine 是非选择性蛋白激酶抑制剂, 说明蛋白激酶系统磷酸化调节方式参与了 iNOS 活性的调节. 如果回转同时使用 1 μmol/L calphostin C, 则可以显著抑制心肌细胞培养体系中 NO 信号(使 NO 信号强度减弱 38.3%, 图 4). 由于 calphostin C 是特异的 PKC 抑制剂, 说明蛋白激酶系统中的 PKC 参与了 iNOS 活性的调节.

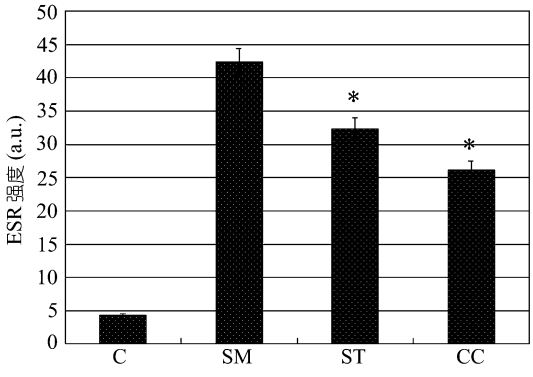


图 4　staurosporine 和 calphostin C 对模拟微重力下心肌细胞培养体系中 NO 生成的影响
C 示静置对照组; SM 示模拟微重力组; ST 示 staurosporine 组; CC 示 calphostin C 组. * 示 $P<0.01$(与模拟微重力组相比)

3　讨论

3.1　模拟微重力效应对心肌细胞 NO 水平的影响

研究发现回转处理第 8 小时后开始有 NO 水平的显著增高, 并持续到第 48 小时. 免疫细胞化学和原位杂交的结果从蛋白质和 mRNA 水平证实回转模拟微重力使心肌细胞 iNOS 表达上调; iNOS 持续合成过量的 NO, 从而影响心肌的收缩功能.

生理浓度的 NO 可以促进和维持心肌的收缩功能，而 iNOS 诱导表达导致的过高浓度的 NO 则使收缩功能减弱[5]。最近的研究表明 NO 可通过如下途径发挥作用: (ⅰ) NO 通过环腺苷酸(cAMP)依赖途径和环鸟苷酸(cGMP)依赖途径发挥作用. 生理浓度的 NO 将提高 cAMP 含量，同时抑制磷酸二酯酶 3(phosphodiesterase Ⅲ，PDE_3)，诱导正性的收缩反应；高水平的 NO 导致 cGMP 含量的大量增加，降低肌丝对钙离子的敏感性，从而降低心肌的收缩功能[5,6]. (ⅱ) NO 可以显著地逆转由β-肾上腺素能刺激心肌的收缩性反应[7]. (ⅲ) NO 可以直接抑制 ATP 合成和电压敏感的钙离子通道，降低心肌的收缩性能[8].

iNOS 表达的调节主要发生于转录水平，早期研究显示 LPS 和一些细胞因子如肿瘤坏死因子-α，白细胞介素-1 和干扰素-γ可诱导多种细胞 iNOS 表达. 细胞因子、细菌脂多糖、内毒素的使用都可以降低心肌的收缩性能，一般认为这是由于 iNOS 的诱导表达，导致 NO 生成过多. 本研究从蛋白质和 mRNA 水平证明，模拟微重力也是心肌细胞 iNOS 表达的一种诱导因素，从而导致心肌的收缩功能下降. 模拟微重力与细胞因子对 iNOS 的诱导是否有共同的途径？是一个值得进一步研究的课题.

另外，心肌细胞牵(张)力的变化可参与 iNOS 的表达调控. Yamamoto 等人发现机械应变可抑制鼠心肌细胞在细胞因子刺激条件下的 NO 生成、iNOS 蛋白和 iNOS mRNA 表达，这种抑制作用随应变强度的增强而增强. 使用非特异的蛋白激酶抑制剂和特异的 PKC 抑制剂都可以阻断其抑制效应，认为机械应变调节 iNOS 表达的机理涉及到 PKC 的激活[3]. 本研究结果显示模拟微重力这种力学变化可诱导/提高 iNOS 在心肌细胞中的表达，为进一步研究微重力效应对心肌细胞基因表达和功能变化奠定了基础.

3.2 PKC 在 iNOS 活性调控中的作用

实验结果显示，staurosporine 和 calphostin C 均可显著抑制心肌细胞在模拟微重力诱导下的 NO 水平增高，说明模拟微重力条件对心肌细胞的影响至少是部分地通过激活 PKC 途径来进行的. 机械应变可以抑制 iNOS 的表达，抑制作用的机理涉及到 PKC 的激活. 因此模拟微重力和机械应变这两种力学变化，都可以通过 PKC 途径调节 iNOS 表达.

PKC 在 iNOS 蛋白磷酸化调控中占有中心地位，心肌细胞中多种 iNOS 的调控过程均涉及 PKC. 例如, LPS[9]，细胞因子[10]和佛波醇[11]诱导 iNOS 及心肌细胞收缩力下降，慢性缺氧诱导心肌 iNOS 表达过程[12]，血管紧张素Ⅱ抑制细胞因子对心肌细胞 iNOS 表达的诱导[13]，牵张刺激对心肌细胞信号转导过程的影响[14]都依赖于 PKC 途径. PKC 还参与许多力学刺激诱导的心肌细胞适应性变化过程. 例如，牵张刺激体外培养的心肌细胞，可引起其快速释放血管内皮生长因子以适应超负荷环境，该过程是 PKC 依赖的[15]. 因此 PKC 与牵张刺激诱导的心肌肥大反应密切相关, calphostin C 或 lovastatin 等 PKC 抑制剂可显著抑制心肌细胞在牵张刺激条件下细胞外信号调节激酶(ERK)、细胞分裂素活化蛋白激酶(MAPK)的活性，抑制 c-fos 等原癌基因的表达和蛋白质合成，因而可保护牵张诱导的心肌肥大[16]. Obadia 等人[17]报道的牵张刺激对心肌缺血的保护作用机制也涉及 PKC 的激活，因此 PKC 可能是心肌细胞在不同力学信号下 iNOS 表达与活性的通用调节因子.

由于空间实验的机会难得，样品数有限，且实验条件较难控制，在地面进行模拟微重力效应实验作为预研就显得非常必要. 回转器是自 1965 年以来开始采用的在地面研究微重力细胞学效应的主要手段之一，回转使细胞处在不断改变方向的力场中，在适当转速下，细胞总是来

不及对重力作出响应, 从而达到模拟微重力条件下生物效应的结果, 大量与空间实验结果的比较证明了其有效性[18]. 研究发现, 模拟微重力可通过 PKC 途径使心肌细胞 iNOS 表达上调, NO 途径的研究可能为解释模拟微重力影响心肌细胞收缩功能的机制提供一个新的角度. 如通过空间实验得到证实, 将为制定针对中长期空间飞行条件下心脏功能下降的防护措施提供理论依据. 心肌细胞 NO 途径受力学因素的调控也是阐明包括心衰、高血压等心脏疾病发生机制的重要线索.

致谢　中国科学院生物物理研究所赵保路研究员、张德良博士对本研究给予很多帮助, 谨致谢意.

参　考　文　献

1 Goldstein M A, Edwards R J, Schroeter J P. Cardiac morphology after conditions of microgravity during COSMOS 2044. J Appl Physiol, 1992, 73: 94S ~ 100S
2 Kojda G, Kottenberg K. Regulation of basal myocardial function by NO. Cardiovasc Res, 1999, 41: 514 ~ 523
3 Yamamoto K, Dang Q N, Kelly R A, et al. Mechanical strain suppresses inducible nitric-oxide synthase in cardiac myocytes. J Biol Chem, 1998, 273: 11862 ~ 11866
4 张德良, 李美芬, 赵保路. 乙酸乙酯抽提法在 ESR 检测一氧化氮自由基中的应用. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28: 94 ~ 98
5 Joe E K, Schussheim A E, Longrois D, et al. Regulation of cardiac myocyte contractile function by inducible nitric oxide synthase (iNOS): mechanisms of contractile depression by nitric oxide. J Mol Cell Cardiol, 1998, 30: 303 ~ 315
6 Kinugawa K I, Kohmoto O, Yao A. Cardiac inducible nitric oxide synthase negatively modulates myocardial function in cultured rat myocytes. Am J Physiol, 1997, 272(1 Pt 2): H35 ~ H47
7 Murray D R, Freeman G L. Tumor necrosis factor-α induces a biphasic effect on myocardial contractillity in conscious dogs. Circ Res, 1996, 78: 154 ~ 160
8 Kaasik A, Minajeva A, De Sousa E, et al. Nitric oxide inhibits cardiac energy production via inhibition of mitochondrial creatine kinase. FEBS Lett, 1999, 444: 75 ~ 77
9 Tepperman B L, Chang Q, Soper B D. Protein kinase C mediates lipopolysaccharide- and phorbol-induced nitric-oxide synthase activity and cellular injury in the rat colon. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 295: 1249 ~ 1257
10 Singh K, Balligand J L, Fischer T A, et al. Regulation of cytokine-inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes and microvascular endothelial cells. Role of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/ERK2) and STAT1 alpha. J Biol Chem, 1996, 271: 1111 ~ 1117
11 McKenna T M, Li S, Tao S. PKC mediates LPS- and phorbol-induced cardiac cell nitric oxide synthase activity and hypocontractility. Am J Physiol, 1995, 269: H1891 ~ H1898
12 Rouet-Benzineb P, Eddahibi S, Raffestin B, et al. Induction of cardiac nitric oxide synthase 2 in rats exposed to chronic hypoxia. J Mol Cell Cardiol, 1999, 31: 1697 ~ 1708
13 Kopnisky K L, Sumners C. Angiotensin Ⅱ-induced decrease in expression of inducible nitric oxide synthase in rat astroglial cultures: role of protein kinase C. J Neurochem, 2000, 74: 613 ~ 620
14 Komuro I, Kudo S, Yamazaki T, et al. Mechanical stretch activates the stress-activated protein kinases in cardiac myocytes. FASEB J, 1996, 10: 631 ~ 636
15 Seko Y, Takahashi N, Tobe K, et al. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase (p125(FAK)) in cultured rat cardiac myocytes. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 259: 8 ~ 14
16 Sadoshima J, Izumo S. Mechanical stretch rapidly activates multiple signal transduction pathways in cardiac myocytes: potential involvement of an autocrine/paracrine mechanism. The EMBO Journal, 1993, 12: 1681 ~ 1692
17 Obadia J F, Ovize M, Maupoil V, et al. Beneficial actions of preconditioning and stretch on postischemic contractile function of isolated working rat heart: effects of staurosporine. J Cardiovasc Pharmacol, 1997, 30: 191 ~ 196
18 Cogoti T, Mariaune L, Zurich E. The fast rotating clinostat-a history of its use in gravitational biology and a comparison of ground-based and flight experiment results. ASGSB Bulletin, 1992, 5(2): 59 ~ 67