

心血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001588

# eNOS 谷胱甘肽化在缺氧预适应保护人脐静脉内皮细胞 缺氧复氧损伤中的作用及机制

唐 容, 李袁静, 高凌云

(重庆医科大学附属第一医院心血管内科, 重庆 400016)

**【摘要】目的:**研究缺氧预适应(hypoxic preconditioning, HPC)保护人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)缺氧/复氧损伤的可能机制。**方法:**将培养的 HUVECs 分为 5 组:对照(Control)组、缺氧复氧(hypoxia/reoxygenation, HR)组、HPC 组、HR+自由基清除组(HR+EUK134 组)、HPC 组+自由基处理组(HPC+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组)。先将 Control 组和 HR 组、HR+EUK134 组放在常规孵育箱中,而 HPC 组和 HPC+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组放入三气低氧箱中进行 3 个 10 min 的缺氧/复氧小循环,即缺氧预适应,再将 HR 组、HR+EUK134 组与 HPC 组、HPC+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组一起放入三气低氧箱中进行 1 h 大缺氧。1 h 后,向 HPC+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100 mmol/L)、HR+EUK134 组加入 EUK134(10 mmol/L),然后将 4 组同时放入常规孵育箱复氧 2 h。复氧后检测细胞存活率,测定细胞内还原型谷胱甘肽(reductive glutathione, GSH)和氧化型谷胱甘肽(oxidative glutathione, GSSG)内皮型一氧化氮合成酶(endothelial nitric oxide synthetase, eNOS)谷胱甘肽化水平、超氧化物阴离子(superoxide anion, O<sub>2</sub><sup>-</sup>)和一氧化氮(nitric oxide, NO)水平以及抗氧化酶过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性。**结果:**与对照组相比,HR 组 O<sub>2</sub> 增加( $P=0.004$ ),抗氧化酶活性降低( $P=0.000$ ),细胞内氧化型谷胱甘肽/还原型谷胱甘肽比例(GSSG/GSH)和 eNOS 谷胱甘肽化水平( $P=0.000$ )均增加,而 NO 生成减少( $P=0.003$ )。自由基清除剂 EUK134 和 HPC( $P=0.028$ )均可减少 O<sub>2</sub> 生成,增加 SOD( $P=0.002$ )和 CAT 活性( $P=0.003$ ),降低 GSSG/GSH 和 eNOS 谷胱甘肽化水平( $P=0.001$ ),NO 生成增加( $P=0.042$ ),高浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可消除 HPC 的作用。**结论:**HPC 可提高细胞存活率,恢复内皮细胞 eNOS 功能活性,其机制可能是通过减轻氧化应激,降低细胞内 GSSG/GSH 和 eNOS 谷胱甘肽化水平,促进 NO 生成而实现。

**【关键词】**缺氧预适应;缺血再灌注损伤;eNOS 谷胱甘肽化;氧化应激;心肌梗死

**【中图分类号】**R541.4

**【文献标志码】**A

**【收稿日期】**2017-11-06

## Role of eNOS glutathionylation in hypoxic preconditioning protecting human umbilical vein endothelial cells from hypoxia and reoxygenation injury

Tang Rong, Li Yuanjing, Gao Lingyun

(Cardiovascular Department, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

**【Abstract】Objective:** To explore the effect of hypoxic preconditioning(HPC) on human umbilical vein endothelial cells(HUVECs) undergoing hypoxia and reoxygenation. **Methods:** Cultured HUVECs were divided into 5 groups, control, hypoxia/reoxygenation(HR), hypoxic preconditioning(HPC), HR+EUK134 and HPC+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The hypoxia with tri-gas incubator and glucose-free and serum-free DMEM culture medium was stimulated and reoxygenation was generated using normal incubator and high glucose DMEM culture medium containing 10% fetal bovine serum. First, group control, HR and HR+EUK134 were put into normal incubator, and groups HPC and HPC+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into tri-gas incubator to exert hypoxic preconditioning with three 10 minutes hypoxia/reoxygenation cycles. Then together with group HR and HR+EUK134, the two groups underwent one-hour hypoxia in tri-gas incubator to generate a longer hypoxia. One hour later added EUK134(10 μmol/L) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(100 μmol/L) were added into group HR+EUK134 and HPC+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and all the five groups were oxygenated in normal incubator for two hours. After reoxygenation, the cells were harvested to detect cell viability, oxidative and reductive glutathione(GSSG and GSH), and endothelial nitric oxide synthetase(eNOS) glutathionylation,

superoxide anion(O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and nitric oxide(NO) levels, also the activities of superoxide dismutase(SOD) and catalase(CAT).

**Results:** Compared with control, group HR showed an increase in O<sub>2</sub> level ( $P=0.004$ ) and a decrease in SOD and CAT activities ( $P=0.000$ ), and had a higher GSSG/GSH ratio and eNOS glutathionylation( $P=0.000$ ), thus a lower production of NO( $P=0.003$ ). The free radical scavenger EUK134 and hy-

**作者介绍:**唐 容, Email: honey20060928@qq.com,

研究方向:心脏缺血再灌注损伤及其保护机制研究。

**通信作者:**高凌云, Email: 80684180@qq.com。

**基金项目:**国家自然科学基金青年科学基金资助项目(编号:31400985);

重庆市教育委员会科学技术研究资助项目(编号:KJ1600234)。

**优先出版:** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180408.1429.018.html>

(2018-04-08)

poxic preconditioning ( $P=0.028$ ) both could ameliorate  $O_2$  level and increase activities of SOD ( $P=0.002$ ) and CAT ( $P=0.003$ ), resulting lower GSSG/GSH ratio and eNOS glutathionylation ( $P=0.001$ ), thus a higher production of NO ( $P=0.042$ ), but the effect of hypoxic preconditioning could be counteracted by high dose  $H_2O_2$ . **Conclusion:** Hypoxic preconditioning could promote cell viability and eNOS activity probably through reducing oxidative stress and eNOS glutathionylation, thus increasing the production of NO.

**[Key words]** hypoxic preconditioning; ischemic reperfusion injury; eNOS glutathionylation; oxidative stress; myocardial infarct

急性心肌梗死及随后导致的心力衰竭是全球致死致残的主要病因,及时再灌注以挽救存活心肌是目前的主要治疗方式<sup>[1]</sup>。但恢复冠脉血流时仍可能导致心肌损伤和死亡,从而降低再灌注治疗总体获益,这种现象称为缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion injury, IRI)。IRI 损伤决定最终的梗死面积,并与后期的左室重构、心力衰竭明显相关<sup>[2]</sup>。在再灌注早期,内皮功能障碍随即发生且持续很长时间,与微循环障碍及“无复流”有关,而血管舒张因子一氧化氮(nitric oxide, NO)明显减少是其重要影响因素<sup>[3]</sup>。研究表明,体内缺血预适应(ischemic preconditioning, IPC)的心脏保护作用与 NO 的增高有关<sup>[4]</sup>。一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)有 3 种不同亚型,神经元型 NOS(neuronal nitric oxide synthetase, nNOS)、诱导型 NOS(inducible nitric oxide synthetase, iNOS)和内皮型 NOS(endothelial nitric oxide synthetase, eNOS)。血管内皮细胞中 NO 主要由 eNOS 催化产生。近来实验研究表明,增加 eNOS 的活性是 IPC 保护心肌的重要机制<sup>[5]</sup>,而敲除 eNOS 则消除了 IPC 的心肌保护作用。氧化应激时 eNOS 谷胱甘肽化脱偶联,脱偶联的 eNOS 功能紊乱又会加重氧化应激。因此,作者拟在体外建立人脐静脉内皮细胞缺氧预适应(hypoxic preconditioning, HPC)模型模拟缺血预适应,通过对比检测分析各组细胞内相应分子水平的差异来进一步探讨 eNOS 谷胱甘肽化在缺氧预适应保护内皮细胞缺氧/复氧损伤的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)由重庆医科大学神经科学研究中心实验室提供。胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Hyclone 公司, DMEM 培养基购自 Gibco 公司,双抗、胰酶购自碧云天公司, EUK134(自由基清除剂)、NEM(巯基烷化剂)、氧化型谷胱甘肽(oxidative glutathione, GSSG)/还原型谷胱甘肽(reductive glutathione, GSH)测定试剂盒购自 Sigma 公司,琼脂糖连接的

eNOS 抗体购自 Santa Cruz 公司,台盼蓝染色细胞存活率检测试剂盒、过氧化氢酶(catalase, CAT)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒、超氧化物阴离子(superoxide anion,  $O_2^-$ )检测试剂盒、谷胱甘肽测定试剂盒、RIPA 裂解液及  $H_2O_2$  均购自碧云天公司,BCA 蛋白测定试剂盒、NO 检测试剂盒购自南京建成公司,多功能酶标仪、三气低氧孵育箱购自 Thermo Scientific 公司,多功能酶标仪。

### 1.2 细胞培养及实验分组

HUVECs 在常规孵育箱( $5\%CO_2$ ,  $20\%O_2$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ )中培养于含  $10\%$  FBS 的高糖 DMEM 培养基中。待细胞长到对数期进行传代培养,长满后模拟缺氧/复氧。共分为 5 组:对照组(Control)组、缺氧复氧组(hypoxia/reoxygenation, HR)、缺氧预适应(hypoxic preconditioning, HPC)组、缺氧复氧+自由基清除剂(HR+EUK134 组)、缺氧预适应组+自由基处理组(HPC+ $H_2O_2$  组)。在三气低氧箱中充入  $N_2$  降低氧浓度,缺氧时  $O_2$  浓度低于  $2.5\%$  ( $5\%CO_2$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ ),加入无糖无血清培养基模拟缺氧;复氧时培养液换为完全培养基,置于常规孵育箱中进行复氧。将 5 组细胞均用无菌 PBS 洗 3 次, HPC 组和 HPC+ $H_2O_2$  组加入无糖无血清培养基,放入三气低氧箱中;其余 3 组加入完全培养基,放入常规孵育箱中。HPC 组和 HPC+ $H_2O_2$  组先进行 3 次  $10\text{ min}$  的缺氧/复氧小循环,而后与 HR 组和 HR+EUK134 组一起进行  $1\text{ h}$  大缺氧。 $1\text{ h}$  后将这 4 组均更换为完全培养基,并向 HPC+ $H_2O_2$  组加入  $H_2O_2$  ( $100\text{ }\mu\text{mol/L}$ ), HR+EUK134 组加入 EUK134 ( $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ ),放在常规孵育箱中复氧  $2\text{ h}$ <sup>[6]</sup>。复氧后测定相关指标,每组重复 5 次。

### 1.3 细胞存活率测定

用  $0.25\%$  胰蛋白酶消化细胞,制成单细胞悬液,在细胞离心机  $1\text{ }000\text{ g}$  离心  $1\text{ min}$ ,弃上清,用  $1\text{ mL}$  细胞重悬液重悬细胞。将细胞重悬液与台盼蓝染色液按  $100\text{ mL}:100\text{ }\mu\text{L}$  加入离心管内,轻轻混匀后染色  $5\text{ min}$ 。吸取少量经过染色的细胞,用血细胞计数板计数。细胞存活率=(细胞总数-蓝色细胞数)/细胞总数 $\times 100\%$ 。

### 1.4 抗氧化酶 SOD、CAT 及 $O_2^-$ 、NO 测定

用含  $10\%$  PMSF 的 RIPA 裂解液裂解细胞制备好蛋白质后,BCA 法测定蛋白质浓度,按照试剂说明制备相应工作液并进行反应,利用多功能酶标仪分别测定 CAT  $520\text{ nm}$ 、SOD  $450\text{ nm}$  和 NO 在  $550\text{ nm}$  的吸光度(absorbance, A)值,并计算结果,前两者单位以 units/mg 蛋白质表示,后者以 mmol/mg 蛋白质表示。测定  $O_2^-$  时,先将细胞接种在 96 孔板后进行缺氧/复氧,利用超氧化物还原 WST-1 形成可溶性有色物质后直接测定  $A_{450\text{ nm}}$ 。

1.5 GSSG、GSH 和 eNOS 谷胱甘肽化水平测定

收集细胞并称量细胞干重,利用液氮和 37 °C 恒温水浴反复冻融细胞 3 次,按试剂说明测定氧化型 GSSG 和 GSH 水平,单位均以 mmol/mg 细胞表示。测定 eNOS 谷胱甘肽化,在 RIPA 裂解液中加入 PMSF 及 NEM(巯基烷化剂,50 μmol/L)后,将细胞样本中在 4 °C 下振荡裂解 1 h,离心后取上清。BCA 法测定上清中蛋白质浓度后,按 0.1 mg 蛋白质浓度加入琼脂糖连接的 eNOS 抗体 3 mg,在 4 °C 振荡孵育过夜进行免疫沉淀。次日用预冷的 PBS 清洗沉淀 3 次,检测 eNOS 沉淀中 GSH 含量来反映 eNOS 谷胱甘肽化水平。

1.6 统计学分析

所有资料利用 SPSS 19.0 统计分析软件进行处理,所得到的数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多样本均数比较用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准  $\alpha=0.05$  (双侧)。利用 Graphpad 软件对 O<sub>2</sub> 和 eNOS 谷胱甘肽化进行 Pearson 相关性分析,检验水准  $\alpha=0.01$ 。

2 结果

2.1 缺氧预适应可提高细胞存活率

与对照组相比,HR 组的 HUVECs 存活率明显降低( $P=0.000$ ),在 HR 组复氧时加入 EUK134,相比 HR 组 HUVECs 存活率有所提高( $P=0.097$ )。但 HPC 组较 HR 组 HUVECs 存活率明显增高( $P=0.000$ ),且稍低于对照组( $P=0.001$ )。在 HPC 组加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,相比 HPC 组 HUVECs 细胞存活率有所降低( $P=0.132$ )。以上结果表明缺氧预适应可明显提高细胞缺氧复氧后的存活率,自由基清除可提高细胞存活率,自由基加入可降低细胞存活率。见表 1。

表 1 检测各组细胞平均存活率 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab.1 Average cell viability in each group ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	细胞存活率 (%)
Control组	99.05 ± 0.47
HR组	95.91 ± 0.42 <sup>a</sup>
HPC组	97.92 ± 0.41 <sup>b</sup>
HR+EUK134组	96.44 ± 0.48
HPC+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	97.44 ± 0.57
F 值	34.000
P 值	0.000

注:a,与 Control 组比较, $P<0.05$ ;b:与 HR 组比较, $P<0.05$

2.2 缺氧预适应降低细胞内氧化应激水平

HUVECs 经过大缺氧/复氧后,HR 组的 O<sub>2</sub>水平较对照组明显增高( $P=0.004$ ),抗氧化酶 SOD、CAT 活性降低( $P=0.000$ )。缺氧预适应可降低 O<sub>2</sub>水平( $P=0.028$ ),明显增加 SOD 活性( $P=0.002$ )和 CAT 活性( $P=0.003$ )。在 HR 组复氧时加入自由基清除剂 EUK134 亦可提高 SOD 和 CAT 活性( $P=0.004$ )。经过缺氧预适应的 HPC+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组在加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 进行大复氧后,其 O<sub>2</sub>水平增加,而 2 种抗氧化酶活性降低( $P=0.003, P=$

0.001)。以上结果表明缺氧预适应和自由基清除剂可减轻细胞内氧化应激,高浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可消除 HPC 的作用(表 2、图 1)。

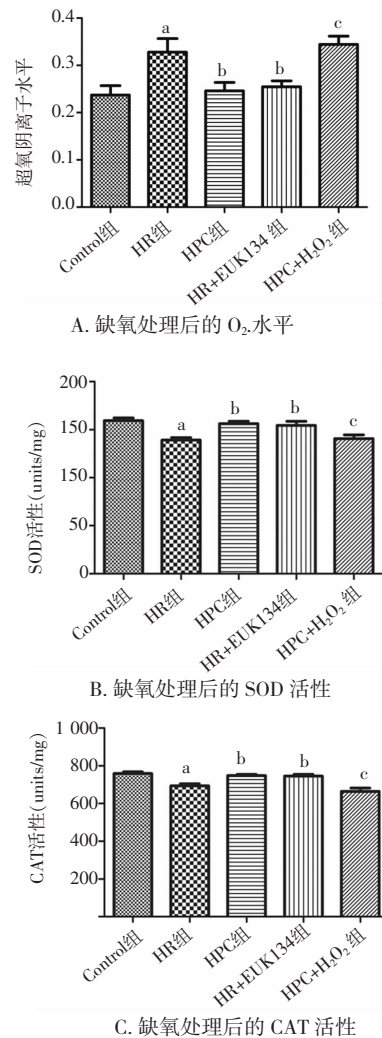
表 2 检测各组氧化应激指标 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab.2 Average oxidative stress indicators in each group

( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

指标	O <sub>2</sub>	SOD	CAT (10 <sup>4</sup> )
Control组	0.237 ± 0.440	159.42 ± 6.32	758.68 ± 19.99
HR组	0.328 ± 0.060 <sup>a</sup>	139.30 ± 5.46 <sup>a</sup>	693.49 ± 24.07 <sup>a</sup>
HPC组	0.246 ± 0.040 <sup>b</sup>	156.23 ± 5.78 <sup>b</sup>	747.72 ± 15.92 <sup>b</sup>
HR+EUK134组	0.254 ± 0.030 <sup>b</sup>	154.41 ± 9.61 <sup>b</sup>	745.33 ± 20.74 <sup>b</sup>
HPC+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	0.344 ± 0.390 <sup>c</sup>	140.75 ± 8.58 <sup>c</sup>	664.90 ± 37.90 <sup>c</sup>
F 值	6.261	8.059	13.360
P 值	0.002	0.001	0.001

注:a,与 Control 组比较, $P<0.05$ ;b:与 HR 组比较, $P<0.05$ ;c:与 HPC 组比较, $P<0.05$



a:与 Control 组对比, $P<0.05$ ;b:与 HR 组对比, $P<0.05$ ;c:与 HPC 组对比, $P<0.05$

图 1 酶标仪检测 O<sub>2</sub>与 SOD 和 CAT 活性

Fig.1 Superoxide anion level and activities of SOD and CAT detected by multiscan spectrum



2.3 缺氧预适应调整内皮细胞 GSSG/GSH 和 eNOS 谷胱甘肽化

利用 Samarasinghe 等的方法<sup>[9]</sup>检测 eNOS 谷胱甘肽化,结果显示对照组中 eNOS 谷胱甘肽化水平较低,而 HR 组中 eNOS 谷胱甘肽化水平明显增高( $P=0.000$ )。经过 HPC 处理后,eNOS 谷胱甘肽化可明显降低( $P=0.001$ ),EUK134 亦可产生此作用( $P=0.008$ )。与 HPC 组相比,HPC+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组因高浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可使 eNOS 谷胱甘肽化水平增加( $P=0.010$ )。表明 EUK134 和 HPC 均可减少 eNOS 谷胱甘肽化,而 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可消除 HPC 的作用。eNOS 谷胱甘肽化受 GSSG 和 GSH 水平的影响,进一步测定 GSSG 和 GSH 结果显示,缺氧复氧过程中细胞内 GSSG 和 GSH 浓度发生变化。在 HR 组中,GSH 水平较对照组降低( $P=0.002$ )而 GSSG 水平增高( $P=0.001$ ),HPC 可提高 GSH 水平( $P=0.006$ ),降低 GSSG 水平( $P=0.004$ ),自由基清除亦可产生相同作用。加入自由基 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可使 GSH 减少( $P=0.019$ )而 GSSG 升高( $P=0.001$ )。以上结果表明缺氧预适应可降低 GSSG/GSH 比例,抑制 eNOS 谷胱甘肽化(表 3、图 2)。

表 3 各组相关指标均值 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab.3 Average of indicators in each group ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	NO	eNOS谷胱甘肽化	GSSG	GSH
Control组	1.18 ± 0.13	1.98 ± 0.12	0.11 ± 0.02	0.58 ± 0.03
HR组	0.94 ± 0.13 <sup>a</sup>	2.36 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.17 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.41 ± 0.03 <sup>a</sup>
HPC组	1.09 ± 0.12 <sup>b</sup>	2.06 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.02 <sup>b</sup>	0.56 ± 0.04 <sup>b</sup>
HR+EUK134组	1.10 ± 0.06 <sup>b</sup>	2.12 ± 0.11 <sup>b</sup>	0.12 ± 0.03 <sup>b</sup>	0.51 ± 0.05 <sup>b</sup>
HPC+H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 组	0.77 ± 0.11 <sup>c</sup>	2.37 ± 0.10 <sup>c</sup>	0.18 ± 0.04 <sup>c</sup>	0.43 ± 0.16 <sup>c</sup>
F 值	10.381	9.546	9.050	4.827
P 值	0.001	0.001	0.001	0.007

注:a,与 Control 组比较, $P<0.05$ ;b,与 HR 组比较, $P<0.05$ ;c,与 HPC 组比较, $P<0.05$

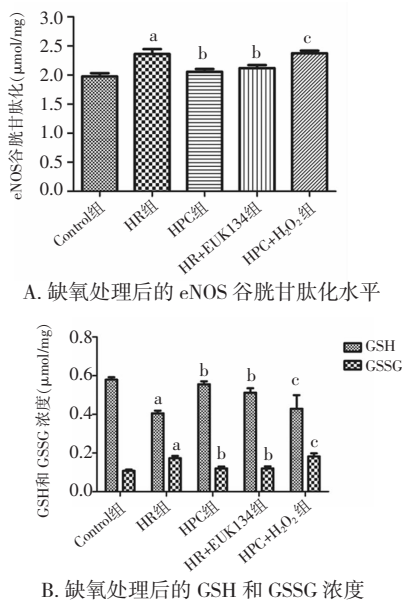
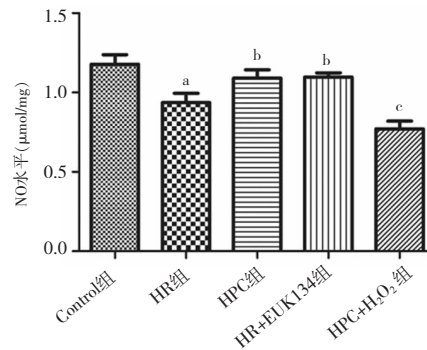


图 2 酶标仪检测氧化型和还原型谷胱甘肽以及 eNOS 谷胱甘肽化 Fig.2 GSH and GSSG concentrations and eNOS glutathionylation evaluated by multiscan spectrum

2.4 缺氧预适应增加内皮细胞 NO 的产生

在内皮细胞中,NO 主要由 eNOS 产生,通过测定 NO 来反应 eNOS 功能活性。与对照组相比,缺氧复氧损伤可使 NO 生成明显减少( $P=0.003$ ),而经过 HPC 后,细胞 NO 生成有所增加( $P=0.042$ ),与 eNOS 谷胱甘肽化水平呈相反趋势。在 HR+EUK134 组中加入 EUK134,可使 NO 较 HR 组生成增加( $P=0.034$ ),而在 HPC+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 组中加入 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,可使 NO 较 HPC 组生产明显减少( $P=0.000$ )。以上结果表明 eNOS 谷胱甘肽化可使 NO 生成减少(表 2、图 3)。



a: 与 Control 组对比, $P<0.05$ ;b: 与 HR 组对比, $P<0.05$ ;c: 与 HPC 组对比, $P<0.05$

图 3 硝基还原法检测一氧化氮水平

Fig.3 Nitric oxide level detected by nitro reduction method

2.5 氧化应激水平影响 eNOS 谷胱甘肽化

为进一步探讨 eNOS 谷胱甘肽化与氧化应激之间的关系,对 O<sub>2</sub><sup>-</sup>和 eNOS 谷胱甘肽化进行相关性分析。结果显示,氧化应激水平越高,eNOS 谷胱甘肽化水平越高,Pearson 相关性具有显著性( $r=0.683, P=0.0002$ )。因此,eNOS 谷胱甘肽化水平受到细胞内受到氧化应激影响(图 4)。

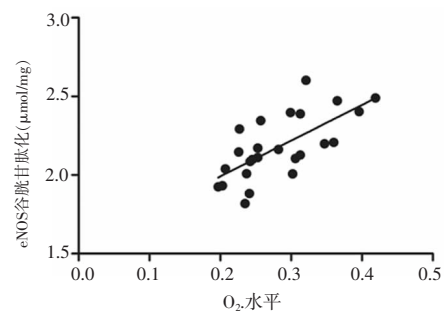


图 4 超氧阴离子与 eNOS 谷胱甘肽化相关性分析

Fig.4 The correlation of superoxide anion and eNOS glutathionylation

3 讨论

随着支架技术进步和新型药物出现使再灌注最大化地挽救了心肌,心梗死亡率逐渐降低,但与

之相关的心功能不全不断攀升,表明心肌梗死的处理仍有巨大改善空间,其中 IRI 对心肌梗死的影响被大大忽视了<sup>[7]</sup>。缺氧时,线粒体电子传递链维持还原状态,使活性氧(reactive oxygen species,ROS)增加明显超过抗氧化系统清除作用,导致氧化应激水平增高;复氧时氧分压急剧增高,使电子传递链进一步产生大量 ROS,加剧氧化应激<sup>[8-9]</sup>,其中  $O_2$  是最主要的 ROS。在本研究前期体内实验中,IPC 可通过恢复线粒体呼吸链上酶活性,保证氧呼吸正常进行,并降低氧分压,维持组织内还原状态,并可能通过增加线粒体内 SOD 活性来减少 ROS 产生以及降低氧化应激<sup>[10-11]</sup>,与本次体外实验一致。在本次实验中,缺氧复氧可降低细胞存活率,导致细胞内  $O_2$  水平升高而抗氧化酶 SOD、CAT 活性降低,增加氧化应激,而缺氧预适应可减少  $O_2$  生成和增加 SOD 和 CAT 活性,降低氧化应激。同时 HUVECs 在经过缺氧复氧处理后存活率明显降低,而经过缺氧预适应处理后细胞存活率增加。

研究证实,NOS 参与了 IPC 对内皮细胞的保护作用,当完全抑制或敲除 NOS 时,IPC 的保护作用消失,而且当 NOS 活性降低时,可出现血管内皮依赖舒张功能障碍<sup>[3]</sup>。eNOS 是内皮细胞中主要的 NOS。已有多项表明,eNOS 维持 NO 合成的功能是在缺血预适应中促进冠脉血流恢复、减少梗死面积、减轻再灌注损伤的重要机制<sup>[12-14]</sup>。最近的研究也表明,敲除 eNOS 可消除 IPC 的心肌保护作用<sup>[5]</sup>。在缺血再灌注过程中,eNOS 可脱偶联生成大量  $O_2$ ,并伴随血管舒张因子 NO 生成的减少,eNOS 在脱偶联时生成的  $O_2$  和 NO 在位置上更加接近,所以更易形成 ONOO<sup>-</sup>,加重细胞损伤<sup>[15]</sup>。因此,脱偶联的 eNOS 生理功能紊乱,是缺血再灌注损伤的一大重要机制。除氧化应激导致 BH4 缺乏外,eNOS 脱偶联亦受到谷胱甘肽化影响<sup>[16-17]</sup>。eNOS 含大量氧化环境敏感的巯基(-SH),氧化应激时容易与 GSSG 进行二硫键交换从而脱偶联<sup>[8]</sup>。在本实验中,氧化应激增高时 GSH 浓度降低而 GSSG 浓度增加,两者比例降低,引起 eNOS 谷胱甘肽化水平增高,而 NO 生成减少,这与 Chen 等<sup>[16]</sup>的研究结果一致,他们首次发现氧化应激导致 eNOS 谷胱甘肽化后功能受抑,生成 NO 减少。本实验结果还发现内皮细胞经过缺氧预适应处理后,GSSG/GSH 降低而 eNOS 谷胱甘肽降低,NO 生

成增加,这说明缺氧预适应可通过抑制 eNOS 谷胱甘肽化减少 eNOS 脱偶联,促进 NO 生成。NO 是重要的血管舒张因子,缺血预适应通过抑制 eNOS 谷胱甘肽化来恢复内皮依赖血管舒张功能,其机制有待进一步在血管水平进行验证。

如前所述,缺氧预适应可增加抗氧化酶活性和降低 ROS 水平来减轻氧化应激,从而改变细胞内 GSSG/GSH,对蛋白谷胱甘肽化产生影响。本实验中主要观察到氧化应激水平增高,GSSG/GSH 升高,eNOS 谷胱甘肽化增加;氧化应激水平降低,GSSG/GSH 降低,则 eNOS 谷胱甘肽化降低,通过分析氧化应激与 eNOS 谷胱甘肽化之间的相关性,同样发现氧化应激与 eNOS 谷胱甘肽化成正相关。然而缺氧预适应降低氧化应激后通过何种途径调节 GSSG 和 GSH 来降低 eNOS 谷胱甘肽化目前仍不清楚。研究表明,谷氧还蛋白可调节蛋白谷胱甘肽化<sup>[19]</sup>。细胞内含大量 GSH 和谷氧还蛋白,后者在 NADPH 和谷胱甘肽化还原酶作用下利用 GSH 将蛋白二硫键还原,降低谷胱甘肽化水平<sup>[20]</sup>。还有研究显示,在内皮细胞中,血管紧张素 II 可通过提高 NADPH 氧化酶活性增加 eNOS 谷胱甘肽化,使其脱偶联生成  $O_2$  增加,而 NO 减少<sup>[22]</sup>。最近,在 eNOS 敲除小鼠中,线粒体 GSSG 明显增加而 GSH/GSSG 比例降低,而复合体 I 上活性巯基和谷胱甘肽化增加, $O_2$  生成明显增加导致氧化应激水平增高,过表达 SOD2 可减少活性巯基,表明 eNOS 维持正常功能在通过复合体 I 调节氧化还原平衡中起重要作用<sup>[23]</sup>。缺氧预适应通过何种途径减少氧化应激和 eNOS 谷胱甘肽化,维持 eNOS 正常生理功能,尚有待进一步研究。

综上所述,本研究发现缺氧预适应可能通过增加内皮细胞内 SOD 和 CAT 的活性及减少 ROS 生成,从而降低细胞内氧化应激水平,引起 GSSG/GSH 降低,减少 eNOS 谷胱甘肽化,纠正 eNOS 功能紊乱,维持血管舒张因子 NO 生成功能达到保护作用,但它们之间的具体调节机制还需要进一步研究。目前缺血预适应已发展至缺血适应,并在临床中应用<sup>[24]</sup>,部分研究结果令人振奋。本研究通过将 eNOS 谷胱甘肽化功能调节作为研究切入点,可以为将来进一步研究改善血管内皮舒张功能、减少缺血再灌注损伤提供一个参考,在心血管疾病防治中具有重大意义。

## 参 考 文 献

- [1] Zhang Z, Yang C, Shen M, et al. Autophagy mediates the beneficial effect of hypoxic preconditioning on bone marrow mesenchymal stem cells for the therapy of myocardial infarction[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 89.
- [2] Bulluck H, Yellon DM, Hausenloy DJ. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities[J]. *Heart*, 2016, 102(5): 341–348.
- [3] Andreadou J, Iliodromitis EK, Rassaf T, et al. The role of gaso-transmitters NO, H<sub>2</sub>S and CO in myocardial ischaemia/reperfusion injury and cardioprotection by preconditioning, postconditioning and remote conditioning[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(6): 1587–1606.
- [4] Vishwakarma VK, Goyal A, Gupta JK, et al. Involvement of atrial natriuretic peptide in abrogated cardioprotective effect of ischemic preconditioning in ovariectomized rat heart[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2017: Epub ahead of print.
- [5] Yang C, Talukder MA, Varadharaj S, et al. Early ischaemic preconditioning requires Akt- and PKA-mediated activation of eNOS via serine1176 phosphorylation[J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 97(1): 33–43.
- [6] Samarasinghe KT, Munkanatta Godage DN, VanHecke GC, et al. Metabolic synthesis of clickable glutathione for chemoselective detection of glutathionylation[J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136(33): 11566–11569.
- [7] Heusch G, Kleinbongard P, Skyschally A, et al. The coronary circulation in cardioprotection: more than just one confounder[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(2): 237–245.
- [8] Li Y, Cai M, Sun Q, et al. Hyperoxia and transforming growth factor  $\beta$ 1 signaling in the post-ischemic mouse heart[J]. *Life Sci*, 2013, 92(10): 547–554.
- [9] Lejay A, Fang F, John R, et al. Ischemia reperfusion injury, ischemic conditioning and diabetes mellitus[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 91: 11–22.
- [10] 李蒙蒙, 王雨晴, 张丽志, 等. 1-磷酸鞘氨醇后适应对人脐静脉内皮细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(2): 184–189.
- [11] Li Y, Cai M, Xu Y, et al. Late phase ischemic preconditioning preserves mitochondrial oxygen metabolism and attenuates post-ischemic myocardial tissue hyperoxygenation[J]. *Life Sci*, 2011, 88(1–2): 57–64.
- [12] Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Nitric oxide is a preconditioning mimetic and cardioprotectant and is the basis of many available infarct-sparing strategies[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70(2): 231–239.
- [13] Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, et al. Endothelial nitric oxide synthase plays an obligatory role in the late phase of ischemic preconditioning by activating the protein kinase C epsilon p44/42 mitogen-activated protein kinase-pSer-signal transducers and activators of transcription 1/3 pathway[J]. *Circulation*, 2007, 116(5): 535–544.
- [14] Talukder MA, Yang F, Shimokawa H, et al. eNOS is required for acute in vivo ischemic preconditioning of the heart: effects of ischemic duration and sex[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(2): H437–445.
- [15] Xie L, Talukder MA, Sun J, et al. Liposomal tetrahydrobiopterin preserves eNOS coupling in the post-ischemic heart conferring in vivo cardioprotection[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 86: 14–22.
- [16] Chen CA, Wang TY, Varadharaj S, et al. S-glutathionylation uncouples eNOS and regulates its cellular and vascular function[J]. *Nature*, 2010, 468(7327): 1115–1118.
- [17] Zweier JL, Chen CA, Druhan LJ. S-glutathionylation reshapes our understanding of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and nitric oxide/reactive oxygen species-mediated signaling[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(10): 1769–1775.
- [18] Sakai J, Li J, Subramanian KK, et al. Reactive oxygen species-induced actin glutathionylation controls actin dynamics in neutrophils[J]. *Immunity*, 2012, 37(6): 1037–1049.
- [19] Anathy V, Aesif SW, Hoffman SM, et al. Glutaredoxin-1 attenuates S-glutathionylation of the death receptor fas and decreases resolution of pseudomonas aeruginosa pneumonia[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2014, 189(4): 463–474.
- [20] Fernandes AP, Holmgren A. Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 6(1): 63–74.
- [21] Jiao JD, Garg V, Yang B, et al. Novel functional role of heat shock protein 90 in ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel-mediated hypoxic preconditioning[J]. *Cardiovasc Res*, 2008, 77(1): 126–133.
- [22] Galougahi KK, Liu CC, Gentile C, et al. Glutathionylation mediates angiotensin II-induced eNOS uncoupling, amplifying NADPH oxidase-dependent endothelial dysfunction[J]. *J Am Heart Assoc*, 2014, 3(2): e000731.
- [23] Kang PT, Chen CL, Chen YR. Increased mitochondrial prooxidant activity mediates up-regulation of Complex I S-glutathionylation via protein thiol radical in the murine heart of eNOS-/-[J]. *Free Radic Biol Med*, 2015, 79: 56–68.
- [24] Hausenloy DJ, Yellon DM. Ischaemic conditioning and reperfusion injury[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2016, 13(4): 193–209.

(责任编辑: 冉明会)