

Martentoxin 对 TNF-α 引起脐静脉内皮细胞释放一氧化氮的影响

陈 健¹ 徐 艳¹ 王 艳² 王 强¹ 环 飞¹ 肖 杭^{1△}

(1 南京医科大学公共卫生学院神经毒理实验室 江苏 南京 210029 ;

2 南京医科大学附属南京市妇幼保健院 江苏 南京 210029)

摘要 目的 :研究东亚钳蝎毒素 Martentoxin 对脐静脉内皮细胞释放 NO 的影响。方法 :人脐带经胶原酶消化分离后获得脐静脉内皮细胞 ,经抗血管性血友病 8 因子鉴定后 ,用 TNF-α 建立 NO 释放模型 ,观察 Martentoxin 对脐静脉内皮细胞释放 NO 的影响。结果 :①经 6 ,12 ,24h 作用后 ,10μM、100 μM Martentoxin 能降低 TNF-α 引起的 NO 释放增加(P<0.05)。②Martentoxin 降低 TNF-α 引起的 iNOS 活性增强并对 TNF-α 引起的内皮源性一氧化氮合酶 mRNA 下调具有一定保护作用 (P<0.05)。结论 :Martentoxin 抑制 TNF-α 引起的脐静脉内皮细胞释放 NO 增加。

关键词 :东亚钳蝎 ,Martentoxin ,一氧化氮 ,脐静脉内皮细胞

中图分类号 :Q813 ,Q342 ,R394.6 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)11-2045-04

Effects of Buthus Martensii Karsch Toxin Martentoxin in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Releasing Nitric Oxide Induced by TNF-α

CHEN Jian¹, XU Yan¹, WANG Yan², WANG Qiang¹, HUAN Fei¹, XIAO Hang^{1△}

(1 Dept. of Toxicology, school of public health, Nanjing Medical University, Nanjing, 210029, PR China;

2 Center of Prenatal Diagnosis, Nanjing Maternal and Child Health Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, 210029, PR China)

ABSTRACT Objective: To investigate the impact of Martentoxin on Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) releasing nitric oxide induced by TNF-α. Methods: HUVECs were isolated and identified by Immunocytochemistry with Anti-von willebrand Factor (vWF). The NO releasing model of HUVECs was established by treating with 10 ng/ml TNF-α and the effect of Martentoxin on NO releasing was observed. Results: ① Application of 10 μM and 100μM Martentoxin inhibits TNF-α-induced NO release after exposure for 6 h, 12 h and 24 h (P<0.05). ② Martentoxin inhibits the activity of iNOS and retarded the down-regulation of eNOS mRNA regulated by TNF-α (P<0.05). Conclusion: Martentoxin inhibits the NO production in HUVECs induced by TNF-α.

Key words: BMK; Martentoxin Nitric oxide; HUVECs

Chinese Library Classification(CLC): Q813, Q342, R394.6 Document code: A

Article ID:1673-6273(2011)11-2045-04

前言

东亚钳蝎(Buthus martensii Karsch ,BmK)是一种广泛分布于中国北部、蒙古、朝鲜的蝎子。中国传统中医使用蝎子提取物、尾巴以及全蝎作为药物用来治疗癫痫、中风、面瘫等疾病已经有数千年历史。在过去的 20 年中 ,分离出超过 70 种不同的毒素^[1] ,它们大多数作用于离子通道^[2]。Martentoxin^[3] 是从东亚钳蝎中分离出来包含 37 个氨基酸残基 ,属于 16 亚家族(α-KTx 16.2)^[4, 5]的一种毒素多肽 ,它能特异性阻断大电导钙激活钾通道^[6]。但是目前对于 Martentoxin 的研究仅局限于电生理 ,对于其它生物学功能未见报道。本研究用肿瘤坏死因子 α(TNF-α)在脐静脉内皮细胞上建立一氧化氮释放模型 ,观察 Martentoxin 对 HUVECs 释放 NO 的影响 ,并探讨相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

新鲜脐带由南京市妇幼保健院提供。细胞培养所用 M199 培养基、胰酶、青霉素、链霉素购买自 Hyclone ;蛋白浓度测定试剂盒购买自上海捷瑞公司 ,二型胶原酶、L-NAME 购买自 Sigma 公司 ;TNF-α 购买自 PEPROTHCH 公司 ,新生小牛血清由杭州四季青公司提供 ,一氧化氮测定试剂盒、iNOS 活性测定试剂盒购买自南京建成生物工程研究所 ,Real-time RT-PCR 试剂盒购买自 TOYOBO ,eNOS、GAPDH 引物由上海英俊公司英骏生物技术有限公司合成。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 脐静脉内皮细胞的分离 ,培养 脐静脉内皮细胞的分离参照 JAFF^[7]法并加以改进。新生儿脐带置入冰盒 ,并在 1 h 内进行无菌分离。用 10 ml 一次性注射器 PBS 冲洗脐静脉后 ,止血钳夹住一端 ,注入 2 型胶原酶后另一端也用止血钳封住。37℃ ,5 % CO₂ 培养箱孵育 15 min ,将血管内消化液放入培养皿 ,加入 20 % FBS 的 M199 培养基培养 ,6 h 后倒置显微镜观察细胞贴壁换液。细胞三次传代后用于实验。

1.2.2 脐静脉内皮细胞的鉴定 采用抗血友病相关因子 8 抗体 ,免疫细胞化学方法鉴定 ,一抗为 1 :400 anti-von willebrand Factor(Factor VIII-related antigen)抗体 ,二抗为 1:100 的山羊抗兔 ,细胞核用 DAPI 染色。阴性对照则用 PBS 代替一抗 ,其余步骤相同。

作者简介 :陈健(1985-) ,男 ,硕士 ,主要研究方向 :东亚钳蝎毒素多肽纯化与功能研究

△通讯作者 :肖杭 电话 :025-86862956 E-mail: hxiao@njmu.edu.cn

(收稿日期 2010-12-23 接受日期 2011-01-18)

1.2.3 Martentoxin 对 HUVECs 释放 NO 的影响 实验分 6 组 (10 ng/ml TNF- α 组 ;10ng/ml TNF- α +1 μ M Martentoxin ;10 ng/ml TNF- α +10 μ M Martentoxin ; 10 ng/ml TNF- α +100 μ M Martentoxin ;10 ng/ml TNF- α +100 μ M L-NAME), 对照组。10 ng/ml TNF- α 预处理 2 h 后 加入 Martentoxin、非特异性一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME, 经 6、12、24 小时分别收集细胞上清, 进行一氧化氮测定。贴壁细胞胰酶消化下来, 经超声碎细胞后, BCA 法测定蛋白浓度, PBS 调整至相同浓度后进行 iNOS 活性测定。

1.2.4 Martentoxin 对 HUVECs 释放 NO 影响的机制研究 实验

共分为四组 (10 ng/ml TNF- α ,100 μ M Martentoxin ,10 ng/ml TNF- α +100 μ M Martentoxin control) 加入药物 6h 后 取去上清测定 NO 含量。贴壁细胞经 TRIZOL 提取 mRNA ,0.5 μ g mRNA 在 10 μ l 体系中逆转录成 cDNA, 并保存于 -80 $^{\circ}$ C。Real-time RT-PCR 采用 20 μ l 反应体系 ,所用引物如(表 1) ,实验所用仪器为 ABI PRISM 7300 Sequence of Detection system ,反应温度如下 94 $^{\circ}$ C 进行 4min 然后 94 $^{\circ}$ C 30s 经行 40 个循环 59 $^{\circ}$ C 45s ;最后 72 $^{\circ}$ C for 45 s。每组采用四个平行样,管家基因 GAPDH 作为内参。eNOS 表达水平用 SYBR green 荧光值记录 并根据其与内参的比值进行分析。

表 1 real-time PT-PCR 中 eNOS ,GAPDH 引物序列

Table 1 The primer sequence used for real-time RT-PCR experiments

Gene name	Forward primer	Reverse primer	Product size (bp)	Accession Number
GAPDH	GGAAGCTCACTGGCATGGCCTTCC	CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC	318	NM_002046
eNOS	CACATGTTTGTCTGCGG	GAGGGGCCTTCCAGATTAAG	511	NM_00603

1.3 统计学分析

各分组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}$ +S.D.)表示 ,用 SPSS13.0 软件处理数据 ,单因素方差分析。检验水准 α =0.05 , P <0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 脐静脉内皮细胞的鉴定

细胞培养 7 天后 ,采用免疫细胞化学法测定(图 1) ,脐静脉内皮细胞在荧光显微镜下 ,显示特异性绿色荧光 ,且内皮细胞纯度大于 95% ,可用于实验。

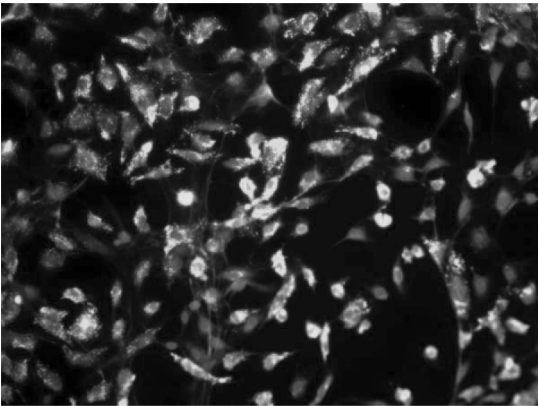


图 1 培养 7 天后内皮细胞经 anti-von willebrand factor 免疫细胞化学染色(400 $\times$) 绿色为羊抗兔 IgG-FITC 细胞核为蓝色 DAPI 染色

Fig.1 Photomicrographs of 7-d-old cultures of human umbilical vein endothelial cells immunostained with anti-von willebrand factor and anti-rabbit IgG-FITC (green). Nuclei were stained with DAPI (blue), magnification 400 $\times$

2.3 Martentoxin 对脐静脉内皮细胞释放 NO 的影响

给药 6、12、24 h 后 TNF- α (10 ng/ml) 组相对空白对照组 , NO 的释放量明显增高。Martentoxin 组和 L-NAME 组的 NO 释放量显著性降低(图 2)。在另一组实验中 ,Martentoxin 单独作用 ,也能引起 NO 释放量增加(图 3)。TNF- α 组中 iNOS 活性明显升高 ,Martentoxin 组和 L-NAME 组对 TNF- α 引起的 iNOS 活性升高特异性抑制(图 4)。Martentoxin 能够抑制 TNF- α 引起的

内皮细胞释放 NO 增加和 iNOS 活性增强。

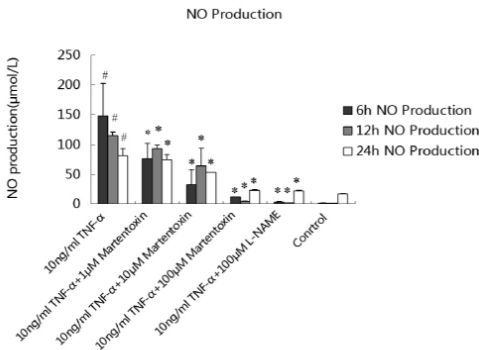


图 2 Martentoxin(1, 10, 100 μ M)和 L-NAME (100 μ M)对 TNF 引起 NO 增加具有抑制作用

Fig.2 Inhibitory effect of Martentoxin (1, 10, 100 μ M) and L-NAME (100 μ M) on NO production in HUVECs treated with TNF- α (10 ng/ml), # and * indicate a significant difference (P < 0.05) compared with the control and condition stimulated by TNF- α . Each value denote the mean +S.D. (n=5)

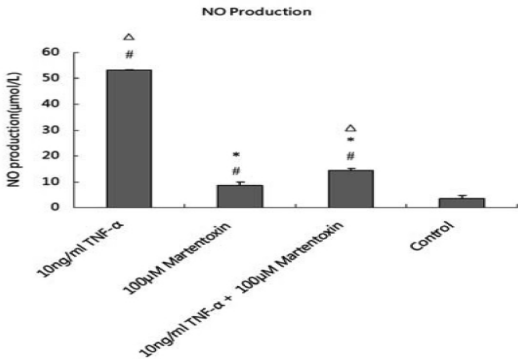


图 3 Martentoxin 单独作用于 HUVECs 也能引起 NO 释放量增加 ,但是此作用小于 TNF- α 单独作用

Fig.3 Martentoxin induced the NO production. Combining with TNF- α , the effect was lower then only treated with TNF- α . # and * indicate a significant difference compared with the control and condition stimulated by TNF- α ; Δ significantly different from Martentoxin(100 μ M) (P < 0.05 by ANOVA). Each value denote the mean +SD (n=5)

2.3 Martentoxin 对 eNOS mRNA 的表达的影响

TNF-α 引起 eNOS mRNA 表达下调，但是加入 100 μM Martentoxin 后，未发现此作用（图 5），提示 Martentoxin 对 TNF-α 引起的 eNOS mRNA 表达下调具有一定的保护作用。

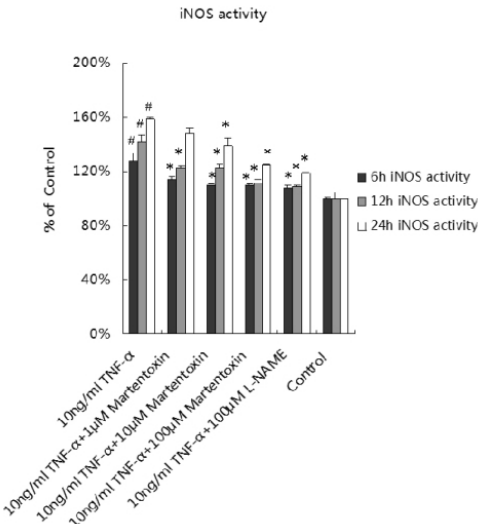


图 4 Martentoxin (10, 100 μM)经 6, 12, 24 h 显著性下调TNF-α 引起的 iNOS 活性增强
Fig.4 Martentoxin (10, 100 μM) downregulated the activity of iNOS activated by TNF-αafter treated for 6, 12 and 24 h. # and * indicate a significant difference compared with the control and condition stimulated by TNF-α (P< 0.05 by ANOVA). Each value denote the mean +SD

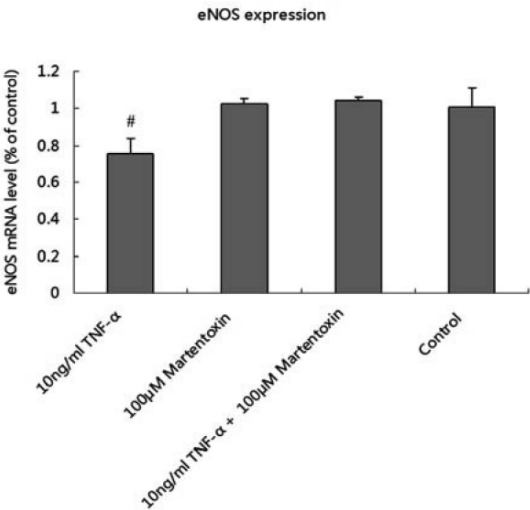


图 5 100 μM Martentoxin 与 10 ng/ml 的 TNF-α 共同作用后，eNOS mRNA 表达未见降低
Fig.5 TNF-α(10 ng/ml) down regulated the eNOS mRNA expression. # Significantly different from control (P< 0.05 by ANOVA). Each value denote the mean +SD

3 讨论

内皮位于血管壁的内层，是血液与血管平滑肌细胞之间的屏障，内皮层的功能完整对于防止血液渗出和粥样斑块的形成有重要意义。NO 是内皮释放的一种重要血管活性分子，NO

参与调解血管舒张，神经传递，炎症反应等。内皮细胞释放的 NO，主要通过精氨酸在一氧化氮合酶的作用下生成。一氧化氮合酶(NOS)主要有 3 种，神经型(nNOS)，内皮型(eNOS)和诱导型(iNOS)。内皮细胞中研究两个类型的 NOS iNOS 和 eNOS，其中 eNOS 为钙依赖性，iNOS 为非钙依赖性。内皮细胞正常状态下主要表达 eNOS，在许多类型的心血管疾病中，如动脉粥样硬化，糖尿病，高血压，eNOS 的表达都有改变^[8]。当细胞受到损伤，释放各种炎症细胞因子，iNOS 也同时被激活，释放大量 NO，以此引发细胞损伤和凋亡。TNF-α 是一种在炎症和免疫反应中起关键作用炎症细胞因子，TNF-α 在内皮细胞中上调精氨酸酶^[9]，而精氨酸酶是 L-精氨酸-NO 途径中的重要调节酶，通过上调精氨酸酶，进而使 NO 的释放增加，TNF-α 也能激活 iNOS 活性来促进 NO 释放^[10]。本研究中，我们证实了在 HUVECs 中 TNF-α 能够刺激 NO 的产生，并且这种作用，能够被非特异一氧化氮合酶抑制剂 L-NAME 所抑制。研究报道东亚钳蝎毒素提取物能够抑制 FLG 29.1 细胞释放 NO^[11]，在我们的实验中，我们观察到 TNF-α 增加了 iNOS 的活性，L-NAME 能够抑制这一作用。Martentoxin 能够抑制 TNF-α 诱导的 HUVECs 释放 NO，可能的机制之一是 Martentoxin 降低了 iNOS 的活性增强，实验结果中证实了 Martentoxin 能特异性降低 TNF-α 引起的 iNOS 活性增强。已有研究表明，TNF-α 能够降低 eNOS mRNA 启动子活性^[12]以及稳定性^[13]，而 eNOS 通常被认为对于维持细胞正常稳态和生理功能非常重要。目前的实验结果表明，Martentoxin 能够保护 TNF-α 作用下的 eNOS mRNA 表达下调。

Martentoxin 单独作用于 HUVECs 后，也观察到促进 NO 的释放，但此作用显著性低于 TNF-α 单独作用，我们推测 Martentoxin 单独作用可能是种促炎剂，相关机制可能与 Martentoxin 是一种 BKCa 通道阻断剂有关。内皮细胞不表达电压门控钙通道，但是钙稳态对于内皮细胞的功能具有非常重要的作用^[14]。细胞膜上表达的钾离子通道^[15]被认为是调节细胞膜电位，以此来影响胞内钙水平，因此钾离子在内皮细胞释放 NO 中发挥着重要的作用^[16]。内皮细胞膜上主要有 4 种钾离子通道：大电导钙激活钾通道(BKCa)、中间电导激活钾通道、小电导钙激活钾通道和电压门控钾通道^[17]。Wrzosek 等研究发现 BKCa 开放剂在 EA.h926 细胞中能够 CGS7184 能够激活 NOS 途径^[18]，而对于 BKCa 通道与 NO 释放之间的详尽机制，目前还没有彻底阐明。Martentoxin 作为一种 BKCa 通道阻断剂，降低 TNF-α 引起的 NO 释放是否通过这一机制，或其它机制还需要进一步的研究。

参考文献(References)

[1] Feng L, Gao R, Gopalakrishnakone P. Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion Buthus martensi[J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2008, 148: 250-257

[2] Rodriguez de la Vega RC, Possani LD. Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution [J]. Toxicon, 2005, 46: 831-844

[3] Cao ZY, Shen WQ, Pan YP, et al. Purification, characterization of two peptides from Buthus martensi Karch[J]. J Pept Res, 2003, 62:252-259

- [4] Wang Y, Chen X, Zhang N, et al. The solution structure of BmTx3B, a member of the scorpion toxin subfamily alpha-KTx 16 [J]. *Proteins*, 2005, 58:489-497
- [5] Wang YH, Cao ZY, He WY, et al. ¹H-NMR signal assignments and secondary structure analysis of martentoxin [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8:511-518
- [6] Shi J, He HQ, Zhao R, et al. Inhibition of martentoxin on neuronal BK channel subtype (alpha+beta4): implications for a novel interaction model [J]. *Biophys J*, 2008, 94:3706-3713
- [7] Jaffe EA, Grulich J, Weksler BB, et al. Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol trisphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262:8557-8565
- [8] A. Chatterjee, S.M. Black, J.D. Catravas, Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation [J]. *Vascul Pharmacol*, 2008, 49: 134-140
- [9] Gao X, Xu X, Belmadani S, et al. TNF-alpha contributes to endothelial dysfunction by upregulating arginase in ischemia/reperfusion injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27:1269-1275
- [10] Medeiros R, Prediger RD, Passos GF, et al. Connecting TNF-alpha signaling pathways to iNOS expression in a mouse model of Alzheimer's disease: relevance for the behavioral and synaptic deficits induced by amyloid beta protein[J]. *J Neurosci*, 2007, 27:5394-5404
- [11] Jin UH, Kim KS, Park SY, et al. Effect of *Buthus martensi* Karsch on aromatase activity and cytokine-induced NOS and NO production in osteoblasts and leukaemic cell line FLG 29.1 [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2006, 28:241-258
- [12] Neumann P, Gertzberg N, Johnson A. TNF-alpha induces a decrease in eNOS promoter activity [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286:L452-459
- [13] Yan G, You B, Chen SP, et al. Tumor necrosis factor-alpha downregulates endothelial nitric oxide synthase mRNA stability via translation elongation factor 1-alpha 1[J]. *Circ Res*, 2008, 103:591-597
- [14] Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium[J]. *Physiol Rev*, 2001, 81:1415-1459
- [15] Dong DL, Zhang Y, Lin DH, et al. Carbon monoxide stimulates the Ca²⁺ (+)-activated big conductance K channels in cultured human endothelial cells[J]. *Hypertension*, 2007, 50:643-651
- [16] Stankevicius E, Lopez-Valverde V, Rivera L, et al. Combination of Ca²⁺ -activated K⁺ channel blockers inhibits acetylcholine-evoked nitric oxide release in rat superior mesenteric artery [J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 149:560-572
- [17] P. Gluais, G. Edwards, A.H. Weston, et al. Feletou, Role of SK(Ca) and IK(Ca) in endothelium-dependent hyperpolarizations of the guinea-pig isolated carotid artery[J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 144: 477- 485
- [18] Wrzosek A, Lukasiak A, Gwozdz P, et al. Large-conductance K⁺ channel opener CGS7184 as a regulator of endothelial cell function[J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 602:105-111

封面说明

共同的画卷

封面设计说明

自 1997 年第一只克隆羊多利的诞生拉开了人造生命的序幕,2010 年,可谓是人造生命科学发展的一个新的里程碑。本刊 2011 年封面设计的灵感来自于人造生命技术的蓬勃发展。①封面背景以第三代测序技术即基于纳米孔的单分子实时 DNA 测序技术的研制成功为契机(图中,偏下),这为人造生命及人类健康提供了强有力的技术支撑。②封面图案以 2010 年诺贝尔生理与医学奖的体外受精技术(即试管婴儿),最强壮晶胚的筛选技术,人工卵巢及人类卵细胞的培育技术为主体(图上,右,中,左),这些不仅为不孕不育患者带来了福音,同时为社会的稳定与和谐贡献了力量。③封面图案同时也融合了人造生命的最新研究成果即首个能自我生长,繁殖的人造生命细胞 Synthia 的问世(六边形图,右),由干细胞培育出的肺脏(六边形图,左)等最新研究成果。④封面图案同时也展示了人造生命发展的伦理学争议与潜在的危机,关于艾滋病的研究取得了很多成就,但我们还没有攻克艾滋病,特别是 Superbug 耐药性超级细菌的出现,让无数人感到前所未有的恐慌(六边形,中)。⑤生命科学的一切研究成果,只不过是生物医学历史的长河中一朵浪花,因此图片采用波浪形设计,如河流奔涌向前,如画卷色彩缤纷,如电影胶片所有的成就与辉煌一闪而过,未来会更加让人期待。新技术新理论的发明与发展,需要有准备的大脑,也需要灵光突闪的思想火花。对于与人类密切相关的生物医学领域,我们如图中的小孩一样,睁大纯真的眼睛,好奇的观察、了解,我们也需要运用一系列的技术手段,面对未知的一个个"黑箱"问题,需要细心大胆的研究、推断,同时我们需要时刻警觉生命科学技术发展应用这把双刃剑潜伏的危机,应当科学探索并利用自然规律来更好的为人类服务。

我们坚信,《现代生物医学进展》正是为生物医学领域的科研工作者提供了这样一个可以充分挥洒展示的画卷的平台,不断记录着生物医学领域最新最成功的成果。这是我们共同的画卷,让我们与你们共同分享灵感与喜悦,成功与辉煌!