

• 论著 •

γ-干扰素对过氧化氢诱导血管内皮氧化应激损伤的作用研究

周荣 刘良明 胡德耀 程凤 李强

【摘要】 目的 观察 γ-干扰素(IFN-γ)对血管内皮氧化应激损伤的保护作用,并评价 26S 蛋白酶体在其中的作用。方法 建立由过氧化氢(H₂O₂)诱导的血管内皮氧化应激损伤细胞及离体器官模型,以细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)及丙二醛(MDA)浓度评价血管内皮细胞(VEC)的损伤程度,以内皮依赖性血管松弛反应评价离体器官水平 VEC 的损伤程度。结果 H₂O₂ 可呈剂量依赖性和时间依赖性引起 VEC 损伤,表现为细胞培养上清液中 LDH 及 MDA 浓度增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),由乙酰胆碱(Ach)诱导的血管内皮依赖性松弛反应明显降低,表现为 10^{-5} mol/L Ach 引起血管最大舒张反应由 $(95.82 \pm 9.25)\%$ 降至 $(12.61 \pm 2.96)\%$ ($P < 0.01$);采用 20 μg/L IFN-γ 预孵育 VEC 48 h 后可明显降低由 H₂O₂ 引起的 LDH 及 MDA 生成 (P 均 < 0.05),改善内皮依赖性血管松弛反应,由 Ach 诱导的血管最大舒张反应增至 $(72.68 \pm 18.82)\%$ ($P < 0.01$);26S 蛋白酶体抑制剂 lactacystin 可取消由 IFN-γ 诱导的内皮抗氧化保护作用。结论 IFN-γ 可诱导血管内皮对氧化应激的保护,其机制与 26S 蛋白酶体有关。

【关键词】 血管; 内皮; 氧化应激; γ-干扰素

The role of interferon-γ in prevention of hydrogen peroxide-induced oxidative injury to vascular endothelium
 ZHOU Rong, LIU Liang-ming, HU De-yao, CHENG Feng, LI Qiang. State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, the Second Department of Military Surgery Research Institute, the Third Military Medical University, Daping Hospital, Chongqing 400042, China

【Abstract】 Objective To observe the protective effects of interferon-γ (IFN-γ) on hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced oxidative injury to vascular endothelial cell (VEC), and to explore the role of 26S proteasome protection against IFN-γ-induced endothelial oxidative injury. **Methods** A H₂O₂-induced VEC oxidative injury to cell and isolated organ models were reproduced in the current study. The VEC oxidative damage in cellular level was evaluated by the contents of lactate dehydrogenase (LDH) and malondialdehyde (MDA) in culture medium, and the degree of oxidative injury of VEC in isolated organ level was evaluated by acetylcholine (Ach)-induced endothelium-dependent vascular relaxation. **Results** H₂O₂ triggered the oxidative injury in cultured VEC in a dose- and time-dependent manner, characterized by an increased contents of LDH and MDA in culture medium ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The Ach-induced endothelium-dependent vascular relaxation was decreased, and as shown by a decrease in 10^{-5} mol/L Ach induced maximum reaction of relaxation of vasculature from $(95.82 \pm 9.25)\%$ to $(12.61 \pm 2.96)\%$ ($P < 0.01$). The damage to VEC induced by H₂O₂ was diminished significantly after incubation with IFN-γ (20 μg/L) for 48 hours, characterized by a decreased production of LDH and MDA (both $P < 0.05$) and restoration of endothelium-dependent vasodilation, and Ach-induced maximum reaction of vascular relaxation was increased to $(72.68 \pm 18.82)\%$ ($P < 0.01$). 26S proteasome inhibitor lactacystin could partly antagonize the protective effects of IFN-γ on H₂O₂-induced oxidative injury. **Conclusion** IFN-γ possesses protective effects on H₂O₂-induced oxidative injury to vascular endothelium, and its mechanism is at least partly related with 26S proteasome.

【Key words】 vascular; endothelium; oxidative stress; interferon-γ

由于血管内皮生物学屏障功能的特殊性和长期暴露于血浆中氧化脂质及蛋白等的持续作用,导致血管内皮细胞(VEC)极易发生氧化应激反应。VEC 氧化应激损伤也是多种临床疾病发生发展的关键环节,常见于创伤失血后的液体复苏、组织缺血/再灌

注、动脉粥样硬化等^[1]。如何防止氧化应激时血管内皮损伤是临床亟需解决的难题。

γ-干扰素(IFN-γ)在机体的炎症反应及免疫调节中发挥重要作用,研究发现其可诱导 VEC 26S 蛋白酶体 β 亚基的构成发生改变。如 Stohwasser 等^[2]证实 IFN-γ 可诱导表达 β1i、β2i 及 β5i 亚基来分别替换 β1、β2 和 β5 亚基,并导致蛋白酶体功能发生改变;由于 26S 蛋白酶体作为细胞内非溶酶体蛋白降解通路的重要成分,可通过降解细胞及变性蛋白来

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.09.009

基金项目:重庆市自然科学基金项目(CSTC,2008BB5106)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学第三附属医院野战外科

研究所第二研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

Email:zhourong200012@163.com

防止由氧化应激引起的细胞损伤^[3],且 26S 蛋白酶体 β 1i 亚基高表达具有抗氧化损伤功能^[4]。故本研究中拟观察 IFN- γ 是否对血管内皮氧化应激损伤具有保护作用及其与 26S 蛋白酶体间的关系,旨在为抗血管内皮氧化应激损伤提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂:SD 大鼠,体重(200±20)g,雌雄不限,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。重组大鼠血管内皮生长因子(VEGF)和 IFN- γ (美国 Peprotech 公司)、26S 蛋白酶体抑制剂 lactacystin(美国 Cayman Chemical 公司)、乙酰胆碱(Ach,美国 BBI 公司)、微量乳酸脱氢酶(LDH)及丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物制品公司),其他试剂为国产分析纯产品。

1.2 VEC 的分离培养:按本实验室前期报道的组织贴块法^[5]分离培养大鼠 VEC,待细胞生长至 80% 融合时进行传代,取 3~4 代的 VEC 进行实验。

1.3 细胞氧化应激损伤模型建立及分组:参照文献^[6]方法,采用不同剂量过氧化氢(H₂O₂)孵育培养 VEC 来模拟不同时间细胞氧化应激损伤模型。细胞按 5×10⁵ 个/孔接种于 6 孔板,每组设立 6 个平行孔。将细胞用无血清培养基孵育 24 h 后随机分为:①空白对照组;②不同剂量 H₂O₂ (1、10、100、500、1 000 μ mol/L)孵育 24 h 组;③500 μ mol/L H₂O₂ 孵育不同时间(0.5、1、2、3、6 h)组;④不同剂量 IFN- γ (20、200、400 μ g/L)孵育 48 h 组;⑤20 μ g/L IFN- γ 孵育 48 h+1 μ mol/L、10 μ mol/L lactacystin 孵育 30 min 组。收集各组上清液备检。

1.4 培养上清液中 LDH 及 MDA 浓度测定:按试剂盒说明书进行检测。

1.5 血管环的离体培养:按本实验室前期报道的方法进行大鼠血管环离体培养^[5]。血管环按不同处理方法分为:正常对照组(血管环培养 48 h,不做任何处理);500 μ mol/L H₂O₂ 孵育 3 h 及 6 h 组;20 μ g/L IFN- γ 孵育 48 h+500 μ mol/L H₂O₂ 孵育 3 h 组;IFN- γ +H₂O₂ 孵育 3 h+1 μ mol/L、10 μ mol/L lactacystin 组。

1.6 血管张力的测定:采用由 Ach 诱导大鼠腹主动脉松弛功能的变化评价内皮损伤程度,血管张力测定按本实验室以往报道的方法^[7]进行检测,记录血管张力曲线的变化情况,以血管收缩张力的变化评价血管内皮依赖性松弛反应性。血管收缩张力变化率(%)=(加入去甲肾上腺素后血管环的张力-加入 Ach 后血管环的张力)/(加入去甲肾上腺素后

血管环的张力-血管环的静息张力)×100%。

1.7 统计学分析:采用 SPSS 10.0 统计软件,数据以均数±标准差(\bar{x} ±s)表示,采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H₂O₂ 时间及剂量依赖性诱导 VEC 氧化应激损伤结果(表 1~2):500 μ mol/L H₂O₂ 孵育培养细胞 0.5~6 h 可呈时间依赖性诱导 VEC 氧化应激损伤,其中孵育 3 h、6 h 可引起培养 VEC 的明显损伤,表现为在培养上清液中 LDH 及 MDA 浓度显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。用 1~1 000 μ mol/L H₂O₂ 孵育培养 VEC 24 h,还可呈剂量依赖性地诱导培养 VEC 的氧化应激损伤,其中 500 μ mol/L、1 000 μ mol/L H₂O₂ 可引起培养 VEC 的明显损伤,表现为培养上清液中 LDH 及 MDA 浓度明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。说明 500 μ mol/L H₂O₂ 孵育培养细胞 3 h 可复制有效的 VEC 氧化应激损伤模型。

表 1 500 μ mol/L H₂O₂ 孵育培养 VEC 不同时间的氧化应激损伤(\bar{x} ±s)

组别	孔数	LDH(U/L)	MDA(μ mol/L)
空白对照组	6	7.90±2.03	1.02±0.68
H ₂ O ₂ 0.5 h	6	8.96±3.57	0.99±0.31
H ₂ O ₂ 1 h	6	9.17±0.70	1.10±0.21
H ₂ O ₂ 2 h	6	9.92±0.99*	1.25±0.49
H ₂ O ₂ 3 h	6	10.44±0.82*	2.02±0.74*
H ₂ O ₂ 6 h	6	13.78±1.93 ^b	2.65±1.81*

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,^b $P<0.01$

表 2 不同浓度 H₂O₂ 孵育培养 VEC 24 h 的氧化应激损伤(\bar{x} ±s)

组别	孔数	LDH(U/L)	MDA(μ mol/L)
空白对照组	6	7.90±2.03	1.02±0.68
H ₂ O ₂ 1 μ mol/L	6	7.73±1.64	0.92±0.25
H ₂ O ₂ 10 μ mol/L	6	8.65±1.06	1.23±0.71
H ₂ O ₂ 100 μ mol/L	6	10.33±1.67*	1.34±0.88
H ₂ O ₂ 500 μ mol/L	6	14.31±2.02*	2.37±0.96*
H ₂ O ₂ 1 000 μ mol/L	6	18.75±5.99 ^b	3.15±1.69 ^b

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,^b $P<0.01$

2.2 IFN- γ 预处理对 H₂O₂ 诱导 VEC 氧化应激的影响(表 3):与空白对照组比较,500 μ mol/L H₂O₂ 孵育 3 h 可引起培养 VEC 明显损伤,LDH 及 MDA 生成明显升高(P 均 <0.05)。与 500 μ mol/L H₂O₂ 孵育 3 h 比较,20 μ g/L IFN- γ 预孵育 VEC 48 h 后可明显抑制由 H₂O₂ 诱导的 VEC 损伤,表现为 LDH 及 MDA 生成明显减少(P 均 <0.05);但较高浓度的 IFN- γ (200~400 μ g/L)预孵育 48 h 并不能诱导

细胞的抗氧化损伤保护作用。

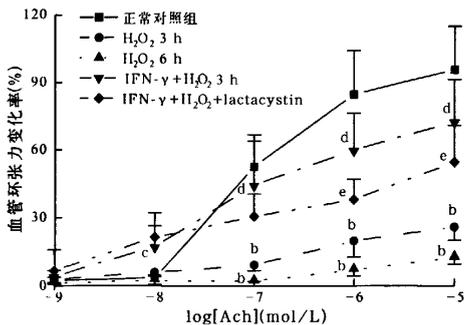
表3 IFN-γ 预处理对 H₂O₂ 诱导 VEC 氧化应激损伤的影响及 lactacystin 的干预作用(̄x±s)

组别	孔数	LDH(U/L)	MDA(μmol/L)
空白对照组	6	7.90±2.03	1.02±0.68
H ₂ O ₂ 500 μmol/L 3 h	6	10.44±0.82*	2.02±0.74*
IFN-γ 20 μg/L	6	8.25±1.29*	1.40±0.41*
IFN-γ 200 μg/L	6	9.45±2.73	1.69±0.98
IFN-γ 400 μg/L	6	9.31±3.13	1.80±0.64
IFN-γ 20 μg/L+lactacystin 1 μmol/L	6	10.47±3.48	0.85±0.60
IFN-γ 20 μg/L+lactacystin 10 μmol/L	6	14.28±4.99*	4.31±5.85*

注:与空白对照组比较,*P<0.05;与 H₂O₂ 500 μmol/L 3 h 比较,*P<0.05;与 IFN-γ 20 μg/L 比较,*P<0.05

2.3 IFN-γ 干预 VEC 损伤与 26S 蛋白酶体的关系(表3);10 μmol/L lactacystin 可取消由 IFN-γ 预孵育诱导的细胞抗氧化损伤作用,培养上清液中 LDH 与 MDA 含量较 20 μg/L IFN-γ 孵育 48 h 显著升高(P 均<0.05)。

2.4 IFN-γ 对 VEC 保护作用及其与 26S 蛋白酶体的关系(图1);与正常对照组比较,H₂O₂ 孵育 3 h 及 6 h 可引起由 Ach 诱导的血管内皮依赖性松弛反应明显降低,量效曲线明显右移,10⁻⁵ mol/L Ach 引起的血管最大舒张反应由(95.82±9.25)%降至 3 h (26.11±5.86)%、6 h (12.61±2.96)% (P 均<0.01)。与 H₂O₂ 孵育 3 h 组比较,20 μg/L IFN-γ 预孵育血管环 48 h 可显著改善由 Ach 诱导的松弛反应,量效曲线明显左移,10⁻⁵ mol/L Ach 引起的血管最大舒张反应由(26.11±5.86)%增至(72.68±18.82)% (P<0.01);高浓度 lactacystin (10 μmol/L)非选择性抑制 26S 蛋白酶体活性,可部分取消 IFN-γ 对内皮的保护作用,10⁻⁵ mol/L Ach 引起的血管最大舒张反应由(72.68±18.82)% 降至(54.80±16.18)% (P<0.05)。



注:与对照组比较,*P<0.01;与 H₂O₂ 3 h 比较,*P<0.05, dP<0.01;与 IFN-γ+H₂O₂ 3 h 比较,*P<0.05

图1 H₂O₂ 损伤大鼠腹主动脉由 Ach 诱导内皮依赖性松弛反应以及 IFN-γ 对内皮依赖性松弛反应的保护作用

3 讨论

本研究中采用 H₂O₂ 模拟血管内皮氧化应激损伤模型,发现 500 μmol/L H₂O₂ 孵育培养 VEC 3 h 即可使培养上清液中 LDH 及 MDA 水平明显升高,由 Ach 诱导的血管内皮依赖性松弛反应明显降低,提示 H₂O₂ (500 μmol/L, 3 h) 可有效诱导细胞水平与离体器官水平的血管内皮损伤,与文献[8-9]报道的结果一致。

传统观点认为,26S 蛋白酶体通过降解细胞氧化应激时形成的损伤蛋白参与细胞对氧化应激时的细胞存活,如一氧化氮(NO)、莱菔硫烷(sulforaphane)等可上调 26S 蛋白酶体活性,通过清除氧化应激时产生的损伤蛋白、错误折叠蛋白及变性蛋白,防止由氧化应激诱导的细胞损伤[3];但近年来关于 26S 蛋白酶体在细胞氧化应激反应中的作用报道不一。如研究发现,在 PC12 细胞中 lactacystin 可呈剂量依赖性增加谷胱甘肽的合成,保护由 H₂O₂ 引起的细胞氧化应激损伤[10];抑制蛋白酶体活性可保护局部缺血/再灌性损伤脑组织[11]。可见,26S 蛋白酶体在内皮细胞氧化应激中的作用还远未阐明。

已发现 IFN-γ 除了在机体炎症反应及免疫调节过程中发挥重要作用外,还在抗癌、抗病毒感染、抑制视网膜上皮细胞增生、多发性硬化症等治疗中显示其多种功能。研究证实,26S 蛋白酶体在 IFN-γ 诱导下可发生亚基构成的改变,即 IFN-γ 通过诱导 β1i、β2i 和 β5i 亚基表达,并分别替换 26S 蛋白酶体的 β1、β2 和 β5 亚基,导致蛋白酶体的亚基构成及功能发生改变。Gaczynska 等[12]发现,在淋巴瘤细胞及 HeLa 细胞,转染 β5i 亚基可导致 26S 蛋白酶体胰凝乳蛋白酶样及胰蛋白酶样活性上调,而转染 β1i 亚基可引起胰蛋白酶样活性上调。在免疫组织,26S 免疫蛋白酶体 β1i、β2i 及 β5i 亚基表达参与了抗原的加工呈递,但 β1i 及 β5i 亚基在血管内皮等非免疫组织中的表达,提示它们还具有非免疫功能。大量研究表明,26S 蛋白酶体 β1i 亚基与氧化应激反应相关疾病的发生发展关系十分密切,β1i 亚基高表达具有抗氧化损伤功能。如在由 H₂O₂ 诱导的内皮氧化应激损伤模型中,NO 可通过上调免疫蛋白酶体 β1i 亚基的表达来发挥抗内皮氧化损伤的作用,转染 β1i 反义寡核苷酸则可取消 NO 的内皮保护作用[4]。此外,动物实验也发现,在 β1i 亚基缺陷型小鼠,由缺血预处理诱导的抗氧化应激保护作用丧失[13]。

本研究中采用 IFN-γ 预孵育培养 VEC 及血管环,发现低浓度的 IFN-γ (20 μg/L) 预孵育 48 h 可

有效防止由 H_2O_2 诱导的血管内皮损伤,表现为细胞培养上清液中 LDH 及 MDA 生成明显减少,血管内皮依赖性松弛反应显著改善;26S 蛋白酶体抑制剂 lactacystin 可部分阻断 IFN- γ 预孵育诱导的内皮保护作用,提示 IFN- γ 诱导内皮抗氧化应激保护作用可能与 26S 蛋白酶体有关。尽管本实验结果还未提供直接的实验依据,但由于文献报道低浓度的 IFN- γ (20 μ g/L) 预孵育 48 h 可诱导 26S 蛋白酶体诱导型 β 1i 及 β 5i 亚基的表达及对标准蛋白酶体 β 1 及 β 5 亚基的替换,而 lactacystin 是 26S 蛋白酶体抑制剂^[12],提示 IFN- γ 诱导的血管内皮抗氧化应激保护作用可能与 26S 蛋白酶体诱导型 β 亚基(如 β 1i 及 β 5i) 的表达增强有关。本研究结果还显示,较高浓度的 IFN- γ 预孵育并不能诱导内皮抗氧化保护作用,可能与 IFN- γ 本身是一种对血管反应性有影响的细胞因子有关。至于低浓度 IFN- γ 诱导血管内皮抗氧化应激损伤是否与 β 1i 及 β 5i 亚基的高表达有关,相关信号通路是什么,尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, et al. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*, 2009, 73 (3): 411-418.
- [2] Stohwasser R, Giesebrecht J, Kraft R, et al. Biochemical analysis of proteasomes from mouse microglia: induction of immunoproteasomes by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Glia*, 2000, 29(4): 355-365.
- [3] Kwak MK, Cho JM, Huang B, et al. Role of increased expression of the proteasome in the protective effects of sulforaphane against hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity in murine neuroblastoma cells. *Free Radic Biol Med*, 2007, 43 (5): 809-817.
- [4] Kotamraju S, Matalon S, Matsunaga T, et al. Upregulation of immunoproteasomes by nitric oxide: potential antioxidative mechanism in endothelial cells. *Free Radic Biol Med*, 2006, 40 (6): 1034-1044.
- [5] Ming J, Li T, Zhang Y, et al. Regulatory effects of myoendothelial gap junction on vascular reactivity after hemorrhagic shock in rats. *Shock*, 2009, 31(1): 80-86.
- [6] Han H, Wang H, Long H, et al. Oxidative preconditioning and apoptosis in L-cells, roles of protein kinase B and mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, 2001, 276 (28): 26357-26364.
- [7] 明佳, 刘良明, 李涛, 等. 肌内皮缝隙连接对失血性休克大鼠血管收缩反应的影响. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(9): 519-522.
- [8] Lv PP, Fan Y, Chen WL, et al. COX-2 inhibitor nimesulide protects rat heart against oxidative stress by improving endothelial function and enhancing NO production. *Sheng Li Xue Bao*, 2007, 59(5): 674-680.
- [9] Wolkart G, Kaber G, Kojda G, et al. Role of endogenous hydrogen peroxide in cardiovascular ischaemia/reperfusion function: studies in mouse hearts with catalase-overexpression in the vascular endothelium. *Pharmacol Res*, 2006, 54(1): 50-56.
- [10] Yamamoto N, Sawada H, Izumi Y, et al. Proteasome inhibition induces glutathione synthesis and protects cells from oxidative stress; relevance to Parkinson disease. *J Biol Chem*, 2007, 282 (7): 4364-4372.
- [11] Williams AJ, Dave JR, Tortella FC. Neuroprotection with the proteasome inhibitor MLN519 in focal ischemic brain injury: relation to nuclear factor kappaB (NF-kappaB), inflammatory gene expression, and leukocyte infiltration. *Neurochem Int*, 2006, 49(2): 106-112.
- [12] Gaczynska M, Rock KL, Spies T, et al. Peptidase activities of proteasomes are differentially regulated by the major histocompatibility complex-encoded genes for LMP2 and LMP7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(20): 9213-9217.
- [13] Cai ZP, Shen Z, Van Kaer L, et al. Ischemic preconditioning-induced cardioprotection is lost in mice with immunoproteasome subunit low molecular mass polypeptide-2 deficiency. *FASEB J*, 2008, 22(12): 4248-4257.

(收稿日期: 2009-05-05 修回日期: 2009-07-10)

(本文编辑: 李银平)

• 书讯 •

《心血管疾病诊治关键流程》(中文版原书第 2 版)

由[美]Christopher P. Cannon 和[美]Patrick T. O'Gara 主编, 卢才义、张亚晶等翻译的《心血管疾病诊治关键流程》(中文翻译版, 原书第 2 版)一书于 2009 年 4 月在科学出版社出版, 本书为心血管疾病患者的入院前、急诊科治疗、门诊治疗、住院治疗及提供了以证据为基础并综合考虑成本及效益关系的重要流程。同时, 本书充分反映了心血管领域最新的研究成果及心血管疾病防治的最佳方案和最新流程。该书对急诊科医护人员、心血管内外科医师、保健医师具有重要的参考价值。

各地新华书店及医学专业店有售, 定价: 158.00 元。邮购电话: 010-64034601, 64019031; 地址: 100717 北京市东黄城根北街 16 号 科学出版社医学中心 温晓萍(请在汇款附言注明您购书的书名、册数、联系电话、是否要发票等)。

