

· 基础研究 ·

过氧亚硝基阴离子分解催化剂对衰老大鼠血管舒张功能的保护作用

权琳¹, 王可¹, 杜芸辉¹, 王洁², 吕婷婷², 徐海波¹, 刘慧荣^{1,2}(¹首都医科大学生理学与病理生理学系, 北京 100069; ²山西医科大学生理学教研室, 太原 030001)

【摘要】目的 利用过氧亚硝基阴离子(ONOO⁻)分解催化剂 FeTMPyP 探讨衰老大鼠血管舒张功能障碍的可能机制。方法 选取雄性 SD 大鼠, 随机分为成年组(3~4月, $n=8$)、衰老组(18~20月, $n=8$)及给予 FeTMPyP 的衰老组($n=6$); 制备离体胸主动脉环, 观察血管舒张功能; 采用免疫组织化学法和 Western blot 法测定血管组织中可代表 ONOO⁻ 生成的标记物 3-硝基酪氨酸(3-NT)的表达。结果 与成年组大鼠比较, 衰老组大鼠胸主动脉环对 10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L 累积浓度的内皮依赖性舒张剂乙酰胆碱(ACh)的最大舒张程度显著下降[(29.74%±8.28%) vs (69.52%±5.51%), $P<0.001$]; 对 10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L 累积浓度的非内皮依赖性舒张剂硝普钠(SNP)的最大舒张程度也显著下降[(92.01%±3.19%) vs (99.26%±1.33%), $P<0.001$]。与成年组大鼠比较, 衰老组大鼠血管组织中 3-NT 蛋白表达增加($P<0.05$)。给予 FeTMPyP 后, 衰老组大鼠血管组织中 3-NT 蛋白表达下降($P<0.01$); 抑制 ONOO⁻ 的生成后, 衰老组大鼠胸主动脉环对累积浓度 ACh 的最大舒张程度显著升高[(65.96%±11.36%) vs (29.74%±8.28%), $P<0.001$], 对累积浓度 SNP 的最大舒张程度也显著升高[(98.15%±2.79%) vs (92.01%±3.19%), $P<0.001$]。结论 FeTMPyP 改善了衰老大鼠血管舒张功能, 提示 ONOO⁻ 可能在衰老大鼠血管功能障碍中起重要作用。

【关键词】衰老; 血管; 血管舒张; 3-硝基酪氨酸; 大鼠**【中图分类号】** R331.3⁺2**【文献标识码】** A**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2012.00054

Peroxynitrite decomposition catalyst improves vascular dysfunction in aging rats

QUAN Lin¹, WANG Ke¹, DU Yunhui¹, WANG Jie², LV Tingting², XU Haibo¹, LIU Huirong^{1,2}(¹Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069;²Department of Physiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)

【Abstract】 Objective To investigate the possible mechanisms of aging-associated vascular dysfunction by peroxynitrite (ONOO⁻) decomposition catalyst FeTMPyP. **Methods** Male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: adult group (3-4-month-old, $n=8$), aging group (18-20-month-old, $n=8$), and FeTMPyP treatment aging group ($n=6$). The thoracic aorta was isolated for measurement of vascular diastolic function. Immunohistochemistry and Western-blot were performed to determine the expression of 3-nitrotyrosine (3-NT, a marker of ONOO⁻ formation) in thoracic aortic arteries. **Results** (1) Comparing with adult group, the maximal vasodilation in aging rats induced by acetylcholine (ACh, an endothelium-dependent vasodilator, 10^{-9} to 10^{-5} mol/L) was significantly decreased from (69.52%±5.51%) to (29.74%±8.28%) ($P<0.001$); the maximal vasodilation induced by sodium nitroprusside (SNP, an endothelium-independent vasodilator, 10^{-9} to 10^{-5} mol/L) was also decreased from (99.26%±1.33%) to (92.01%±3.19%) ($P<0.001$). (2) The expression of 3-NT in aging vascular tissues was increased ($P<0.05$) compared with adult group. (3) In aging rats treated with FeTMPyP, the expression of 3-NT was decreased ($P<0.01$). Moreover, FeTMPyP significantly improved vascular endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilations in aging rats. After inhibiting the generation of ONOO⁻, ACh-induced maximal vasorelaxation was markedly increased [(65.96%±11.36%) vs (29.74%±8.28%), $P<0.001$] and SNP-induced maximal vasodilation was also increased [(98.15%±2.79%) vs (92.01%±3.19%), $P<0.001$]. **Conclusion** FeTMPyP can improve vasodilation dysfunction in aging rats, suggesting that ONOO⁻ may play an important role in aging-related vascular dysfunction.

【Key words】 aging; blood vessels; vasodilation; 3-nitrotyrosine; rats

This work was supported by National Natural Science Foundation of China (No. 30973163, 30572084) and Beijing Higher School Talent Strong Education Deepen Plan "Academic Innovation Team Construction Plan" Project (No. PHR201106112).

收稿日期: 2011-09-01; 修回日期: 2012-01-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.30973163, 30572084); 北京市属高等学校人才强教深化计划“学校创新团队建设计划”项目(No. PHR201106112)

通讯作者: 刘慧荣, Tel: 010-83911830, E-mail: liuhr2000@126.com

流行病学调查研究显示,即使在无其他心血管疾病危险因素的情况下,衰老本身即可明显增加心血管疾病发生的危险,但其具体发病机制目前尚未明确。有文献报道,血管内皮功能障碍已成为心血管疾病发生的重要标志之一^[1,2];而血管内皮年龄依赖性的舒张功能障碍是人和动物血管老化的标志^[3,4]。在生理情况下,血管舒张主要是由一氧化氮(nitric oxide, NO)来发挥作用的,然而,在病理情况下,体内会产生高浓度的 NO,可与超氧阴离子(superoxide anion, O_2^-)以弥散限制速率反应生成过氧亚硝基阴离子(peroxynitrite, $ONOO^-$)^[2,5,6]。 $ONOO^-$ 是一种具有很强的氧化和硝基化作用的活性氮簇,可导致体内许多重要的酶/蛋白功能受损或活性下降,引起心血管功能障碍^[7]。研究发现,衰老大鼠血管组织中代表 $ONOO^-$ 生成的标记物硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT)含量增加,然而这一现象并不足以证实 $ONOO^-$ 与衰老血管舒张功能障碍的因果关系。因此,本实验通过在体给予衰老大鼠 $ONOO^-$ 的分解催化剂 FeTMPyP(一种铁卟啉类化合物),观察血管舒张功能是否改善,进而为证实 $ONOO^-$ 与衰老血管舒张功能障碍的关系提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

重酒石酸去甲肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司);注射用硝普钠(sodium nitroprusside, SNP, 北京双鹤药业股份有限公司);乙酰胆碱(acetylcholine, ACh, Sigma 公司, 美国);FeTMPyP($C_{44}H_{36}FeN_8 \cdot 5Cl$, Cayman Chemical 公司, 美国);抗 3-NT 单克隆抗体(StressMarq 公司, 加拿大);小鼠超敏二步法免疫组化检测试剂、浓缩型 DAB 试剂盒、马抗小鼠 IgG/生物素标记、辣根过氧化物酶标记链亲合素(北京中杉金桥);抗 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GADPH)单克隆抗体(上海康晨生物工程有限公司);Krebs-Henseleit 液(mmol/L): NaCl 118、KCl 4.75、 KH_2PO_4 1.19、 $MgSO_4$ 1.19、 $NaHCO_3$ 25、Glucose 10.0、 $CaCl_2$ 2.54, pH 7.4;血管环张力换能器(Powerlab, Australia);离体组织器官恒温灌流装置和 BL-420F+生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司)。

1.2 动物分组

3~4 月龄雄性 SD 成年组大鼠, 18~20 月龄雄性 SD 衰老大鼠[长沙市开福区东创实验动物科技服

务部, 许可证号: SCXK(湘) 2009-0012]。衰老大鼠随机分为衰老组($n=8$)及给予 $ONOO^-$ 分解催化剂 FeTMPyP 的衰老实验组($n=6$), 给药方式是衰老大鼠于处死前 30min 静脉注射 FeTMPyP (3mg/kg)^[8]。

1.3 血管功能的测定

20%乌拉坦溶液(5ml/kg)腹腔注射麻醉动物, 剪开胸骨, 迅速取出胸主动脉, 放入预冷且氧饱和的 Krebs-Henseleit (K-H) 液中, 去除周围结缔组织, 将血管剪成约 3~4mm 的血管环, 悬挂固定于与张力换能器相连的恒温器官浴管中, 浴管中持续通以 95% O_2 + 5% CO_2 的混合气体。调节最适前负荷至 2.0 g, 平衡 90 min, 期间每 15min 更换 1 次 K-H 液。待血管环稳定后, 给予 10^{-6} mol/L 的去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)收缩血管, 达峰值后, 以累积给药的方式给予 10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L 的 ACh 或 SNP 来观察血管的舒张功能。以 10^{-6} mol/L 去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)诱发最大收缩幅度为 100%, 以加入药物后的血管舒张幅度与 NE 诱发最大收缩幅度之间的比率反映血管张力的变化。

1.4 血管组织中 3-NT 的表达

$ONOO^-$ 极不稳定, 很容易降解, 因此无法直接检测其含量。组织硝基化酪氨酸形成是体内 $ONOO^-$ 形成的印记和标记, 其含量可以直接反应 $ONOO^-$ 的水平^[9]。本实验中采用免疫组织化学法和 Western blot 法检测血管组织中 3-NT 表达。

1.4.1 免疫组织化学法检测血管组织中 3-NT 表达 将胸主动脉固定、包埋、切片、脱蜡、抗原修复后, 依次滴加 3% H_2O_2 、0.3% Triton X-100 和 5%胎牛血清, 随后加入一抗 3-NT 单克隆抗体(1:1000, 4℃过夜)、小鼠超敏二步法免疫组化检测试剂, DAB 显色、脱水、透明、封片。阴性对照采用 PBS 代替一抗。

1.4.2 Western blot 法检测血管组织中 3-NT 表达 称取适量的血管组织, 加入裂解液, 置冰上剪碎、匀浆、离心 10min (4℃, 10000r/min), 提取上清, BCA 法检测蛋白浓度。随后进行电泳、转膜、加入 3-NT 单克隆抗体(1:1000, 4℃过夜)、加入二抗, 最后于暗室进行发光。以 GAPDH 作为内参对照。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。3-NT 表达实验结果选用两样本 t 检验; 血管环实验结果统计方法选用重复测量定量资料的方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 衰老大鼠离体胸主动脉环内皮依赖性和非内皮依赖性舒张功能均明显下降

给予 $10^{-9} \sim 10^{-5}$ mol/L 累积浓度的内皮依赖性舒张剂 ACh 后, 衰老组大鼠胸主动脉环对 ACh 的舒张反应与成年组大鼠比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 而且血管最大舒张程度由 ($69.52\% \pm 5.51\%$) 降低至 ($29.74\% \pm 8.28\%$) (图 1A); 给予 $10^{-9} \sim 10^{-5}$ mol/L 累积浓度的非内皮依赖性舒张剂 SNP 后, 与成年组相比, 衰老组大鼠血管环对 SNP 的舒张反应也明显下降 ($P < 0.001$), 血管最大舒张程度由 ($99.26\% \pm 1.33\%$) 降低至 ($92.01\% \pm 3.19\%$) (图 1B)。

2.2 衰老大鼠血管组织中 3-NT 的表达增加

采用免疫组织化学法检测血管组织中 3-NT 的表达, 与成年组大鼠相比, 衰老组血管组织中表达大量阳性 3-NT 棕黄色颗粒 (图 2A); 同时, Western

blot 法测定血管组织中 3-NT 表达, 显示衰老血管组织中 3-NT 表达升高, 与成年组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 2B)。

2.3 抑制 ONOO^- 的生成后, 衰老大鼠离体胸主动脉环内皮依赖性和非内皮依赖性舒张功能均明显改善

给予 ONOO^- 的分解催化剂 FeTMPyP 后, 衰老大鼠血管组织中 3-NT 阳性棕黄色颗粒表达减少 (图 2A), 蛋白表达下降 ($P < 0.01$; 图 2B); 同时, 观察到 FeTMPyP 可改善衰老大鼠血管舒张功能。给予 FeTMPyP 后, 衰老大鼠离体胸主动脉环对 $10^{-9} \sim 10^{-5}$ mol/L 累积浓度的 ACh 的舒张反应显著改善 ($P < 0.001$), 且血管最大舒张程度由 ($29.74\% \pm 8.28\%$) 升高到 ($65.96\% \pm 11.36\%$) (图 1A); 对 $10^{-9} \sim 10^{-5}$ mol/L 累积浓度的 SNP 的舒张反应也显著改善 ($P < 0.001$), 且血管最大舒张程度由 ($92.01\% \pm 3.19\%$) 升高到 ($98.15\% \pm 2.79\%$) (图 1B)。

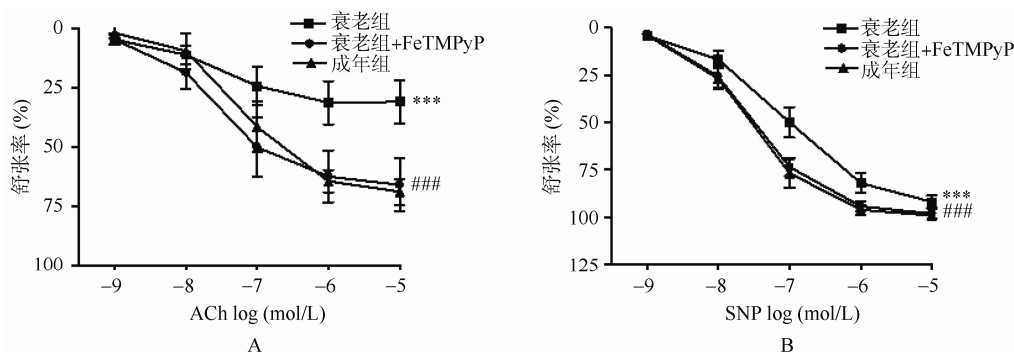


图 1 大鼠离体胸主动脉环对内皮依赖性舒张剂乙酰胆碱(A)和非内皮依赖性舒张剂硝普钠(B)的反应
Figure 1 Vasodilation responses of isolated thoracic aortic rings to acetylcholine and sodium nitroprusside
A: 对乙酰胆碱的反应; B: 对硝普钠的反应。与成年组比较, *** $P < 0.001$; 与衰老组比较, ### $P < 0.001$

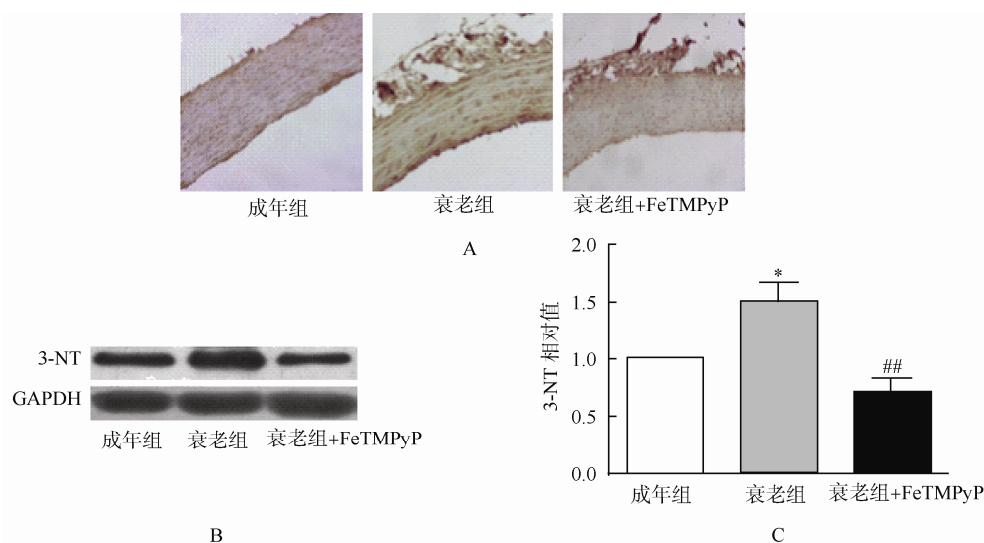


图 2 血管组织中 3-硝基酪氨酸的表达

Figure 2 Expression of 3-nitrotyrosine (3-NT) in vascular tissues

A: 免疫组织化学 (DAB, ×10); B: Western blot 方法; C: Western blot 灰度扫描图。与成年组比较, * $P < 0.05$; 与衰老组比较, ## $P < 0.01$

3 讨 论

衰老是心血管疾病发生的主要危险因素之一,可能因为衰老过程中有血管内皮和平滑肌细胞功能障碍的发生,或同时伴有二者之间信号转导通路的改变^[10]。已有文献报道,与成年组相比,衰老组离体血管环(如胸主动脉、冠状动脉、肠系膜动脉等)对 ACh 反应明显下降,对 SNP 反应无明显差异^[3,11]。ACh 和 SNP 均为血管扩张剂,不同的是, ACh 须通过内皮细胞分泌的一氧化氮(NO)间接作用于平滑肌才能导致血管的舒张反应,因此,由其引起的血管舒张被称为内皮依赖性舒张,反应血管内皮舒张功能; SNP 则不依赖内皮,而作为 NO 供体直接作用于血管平滑肌引起舒张,这种舒张被称为非内皮依赖性舒张,反应血管平滑肌舒张功能。本实验结果显示,与成年组相比,衰老组大鼠离体胸主动脉环对 ACh 反应明显下降,这与文献报道的结果一致;但衰老大鼠血管环对 SNP 舒张反应也明显下降。这种血管舒张功能下降的机制不清楚,可能是因 NO 生物利用度下降,或衰老大鼠血管平滑肌表型发生改变,即由收缩型变为分泌型^[12],或平滑肌细胞信号转导通路的改变^[10,12],或 ONOO⁻生成增加导致的毒性作用等^[13]。

目前所知最强的内源性血管舒张因子是 NO,它是在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)作用下由左旋精氨酸转化而来。NOS 主要包括原生型 NOS(constitutive NOS, cNOS)和诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS), cNOS 又可分为神经源性 NOS 和内皮细胞 NOS。生理情况下, cNOS 即可表达,而 iNOS 一般不被诱导产生。cNOS 促进生成少量 NO,发挥舒血管生理作用;病理情况下, iNOS 被诱导生成,催化合成大量 NO。体内产生的高浓度 NO,与 O₂⁻以弥散限制速率($6.7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{S}^{-1}$)反应生成 ONOO⁻^[5,6]。ONOO⁻可快速地穿过膜脂质层,浸润细胞,破坏许多细胞生物分子和结构,导致细胞内受体和酶功能的钝化、DNA 断裂等一系列损伤作用。然而, ONOO⁻极不稳定,可与蛋白质酪氨酸残基或游离酪氨酸发生硝化反应生成 3-NT, 3-NT 被认为是组织中 ONOO⁻生成的稳定生物学标志物^[9]。我们前期研究发现^[14],在衰老大鼠血管组织中, iNOS 表达增加;给予 iNOS 特异性抑制剂 1400w 后, iNOS 表达下降,血管舒张功能部分改善。本研究中,我们进一步观察到衰老大鼠血管组织中 3-NT 表达增加,给予 ONOO⁻分解催化剂 FeTMPyP 后, 3-NT

表达减少,血管舒张功能明显改善,提示 ONOO⁻的增加可能是衰老血管舒张功能障碍的机制之一。

FeTMPyP 是一种水溶性的金属卟啉类 ONOO⁻分解催化剂,具有低浓度和高效率的特点,主要通过催化 ONOO⁻转化为硝酸盐(>90%),而减轻其毒性作用,对机体起保护作用。已有报道, FeTMPyP 改善糖尿病大鼠神经病变和降低氧化硝化反应^[15]、减轻顺铂诱导的肾损伤^[16]及离体细胞中 ONOO⁻的毒性反应等^[17]。本研究中给予 FeTMPyP 后,衰老大鼠胸主动脉环对 ACh 和 SNP 舒张反应明显改善,证实, ONOO⁻参与衰老大鼠血管环内皮依赖性和非内皮依赖性舒张功能障碍。

综上所述,衰老大鼠胸主动脉环对内皮依赖性舒张剂 ACh 和非内皮依赖性舒张剂 SNP 反应均下降,且血管组织中 3-NT 表达增加;给予 ONOO⁻的分解催化剂 FeTMPyP 后,衰老大鼠血管环对 ACh 和 SNP 舒张反应均明显改善,提示 ONOO⁻在衰老血管舒张功能障碍中起重要的作用,其分解催化剂类物质可为治疗与血管功能障碍有关的心血管等疾病提供一种新的方法。

【参考文献】

- [1] Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, *et al.* Mechanisms of vascular aging: new perspectives[J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2010, 65(10): 1028-1041.
- [2] Herrera MD, Mingorance C, Rodríguez-Rodríguez R, *et al.* Endothelial dysfunction and aging: an update[J]. Aging Res Rev, 2010, 9(2): 142-152.
- [3] Csizsar A, Ungvari Z, Edwards JG, *et al.* Aging-induced phenotypic changes and oxidative stress impair coronary arteriolar function[J]. Circ Res, 2002, 90(11): 1159-1166.
- [4] Ungvari Z, Csizsar A, Kaley G. Vascular inflammation in aging[J]. Herz, 2004, 29(8): 733-740.
- [5] Fink MP. Reactive oxygen species as mediators of organ dysfunction caused by sepsis, acute respiratory distress syndrome, or hemorrhagic shock: potential benefits of resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2002, 5(2): 167-174.
- [6] Morisue A, Wakabayashi G, Shimazu M, *et al.* The role of nitric oxide after a short period of liver ischemia-reperfusion[J]. J Surg Res, 2003, 109(2): 101-109.
- [7] Laursen JB, Somers M, Kurz S, *et al.* Endothelial regulation of vasomotion in apoE-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin[J]. Circulation, 2001, 103(9): 1282-1288.

- [8] Thiagarajan M, Kaul CL, Sharma SS. Neuroprotective efficacy and therapeutic time window of peroxynitrite decomposition catalysts in focal cerebral ischemia in rats[J]. Br J Pharmacol, 2004, 142(5): 899-911.
- [9] Muijsers RB, Folkerts G, Henricks PA, *et al.* Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide[J]. Life Sci, 1997, 60(21): 1833-1845.
- [10] Yildiz O. Vascular smooth muscle and endothelial functions in aging[J]. Ann N Y Acad Sci, 2007, 1100(1): 353-360.
- [11] Podlutzky A, Ballabh P, Csiszar A. Oxidative stress and endothelial dysfunction in pulmonary arteries of aged rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298(2): H346-H351.
- [12] Lundberg MS, Crow MT. Age-related changes in the signaling and function of vascular smooth muscle cells[J]. Exp Gerontol, 1999, 34(4): 549-557.
- [13] Li J, Li W, Su J, *et al.* Peroxynitrite induces apoptosis in rat aortic smooth muscle cells: possible relation to vascular diseases[J]. Exp Biol Med, 2004, 229(3): 264-269.
- [14] Tian J, Yan Z, Wu Y, *et al.* Inhibition of iNOS protects endothelial-dependent vasodilation in aged rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(10): 1324-1328.
- [15] Negi G, Kumar A, Sharma SS. Concurrent targeting of nitrosative stress-PARP pathway corrects functional, behavioral and biochemical deficits in experimental diabetic neuropathy[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 391(1): 102-106.
- [16] Jung M, Hotter G, Viñas JL, *et al.* Cisplatin upregulates mitochondrial nitric oxide synthase and peroxynitrite formation to promote renal injury[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 234(2): 236-246.
- [17] Módol T, Natal C, Pérez de Obanos MP, *et al.* Apoptosis of hepatic stellate cells mediated by specific protein nitration[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(3): 451-458.
- (编辑: 王雪萍)

· 重要消息 ·

热烈祝贺英文版《老年心脏病学杂志》被 SCIE 收录

由王士雯院士创办并担任总编辑的英文版《老年心脏病学杂志》(*Journal of Geriatric Cardiology*), 在 2011 年 11 月的评审中, 被国际知名检索系统——科学引文索引网络版 (Science citation Index Expanded, SCIE) 收录。

《老年心脏病学杂志》创刊于 2004 年, 由解放军总医院主管, 老年心血管病研究所主办。王士雯院士为该刊的创办、编辑、出版倾注了大量的心血。该杂志是我国心血管病领域被 SCIE 收录的首份杂志, 也是目前国内为数极少的被 SCIE 收录的临床医学期刊之一。另外, 该杂志已通过 Pubmed Central 的初步评审, 近期内也将进入 Pubmed 检索系统。