

口服 L-精氨酸对腹主动脉缩窄后大鼠血压、心肌肥厚和血管舒张功能的影响

吴洁 文格波 韦兵^① 孙明^② 万腊香^③ 王佐^③ 杨和平^③

(衡阳医学院附属第一医院心内科 ①胸外科, ③学院分子生物学研究中心, 衡阳 421001)

Effect of Long-term Oral L-arginine on Vasodilation and Myocardial Hypertrophy from Rats with Aortic Coarctation-induced Hypertension

WU Jie, WEN Ge-Bo, WEI Bin, SUN Ming, WAN La-Xiang, WANG Zuo and YANG He-Ping
(The First Affiliate Hospital of Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT We contrasted, in normotensive and oral, not oral L-arginine hypertensive rats, the changes of blood pressure, vasodilation and myocardium. The rats after aorta coarctation had severe hypertension and myocardial hypertrophy. L-arginine administration two weeks did not prevent the development from hypertension but could decrease myocardial hypertrophy in rats with aorta coarctation (heart weight/body weight ratio 3.78 ± 0.19 vs 4.11 ± 0.22 mg/g, $P < 0.05$). The vasodilation to acetylcholine attenuated in isolated thoracic aorta from hypertensive rats with not oral L-arginine. L-arginine ($10^{-5} \sim 10^{-3}$ mol/L) induced concentration-dependent relaxation of thoracic aorta rings taken from hypertensive rats after aorta coarctation, but no effects on isometric tension of thoracic aorta rings from normotensive or oral L-arginine hypertensive rats. These findings suggest that L-arginine may attenuate myocardial hypertrophy and improve vasodilation on hypertensive rats. This effects did not depend on the change of blood pressure.

KEY WORDS L-arginine; Rats; Aorta coar-

tation; Myocardial hypertrophy; Vasodilation

摘要 本文利用缩窄大鼠腹主动脉的方法制备高血压模型,观察了正常大鼠、未服和口服 L-精氨酸两周的腹主动脉狭窄的大鼠的血压、心肌肥厚及血管舒张功能的改变,旨在了解 L-精氨酸对腹主动脉缩窄性高血压大鼠的作用。研究发现腹主动脉狭窄后大鼠发生了严重的高血压及心肌肥厚。未服 L-精氨酸的大鼠心肌肥厚,且血管环对 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ mol/L 乙酰胆碱诱导的舒张反应明显减低;而 L-精氨酸口服治疗两周能减轻其心肌肥厚,并部分改善乙酰胆碱诱导的血管舒张功能,但两组大鼠腹主动脉缩窄后的血压均升高,两者相比较差别无统计学意义($P > 0.05$)。结果提示: L-精氨酸 ($10^{-5} \sim 10^{-3}$ mol/L) 有直接舒张该大鼠血管环的作用,且呈剂量依赖关系,长期口服 L-精氨酸可减轻腹主动脉缩窄性大鼠的心肌肥厚,改善其血管的舒张功能,而其血压的变化与上述作用无关。

关键词 L-精氨酸; 大鼠; 主动脉缩窄; 心肌肥厚; 血管舒张功能

高血压病是一种世界范围内的常见疾病,能引起心、肺、肾等多器官损伤,对人类健康危害极大。高血压病的发病原因很多,其中内皮细胞源性一氧化氮(nitric oxide, NO)生成缺陷关系到高血压病的发生与发展近年来逐渐为人们所重视。

现已清楚,NO 是由底物 L-精氨酸在一氧化氮合成酶(nitric oxide synthetase, NOS)催化下合成的^[1],具有抗血栓、舒张血管和抑制血管平滑肌细胞增殖的作用,并在维持人和动物血管的基础张力及机体血流动力学的恒定方面起重要作用^[2~4]。高血压大鼠内皮依赖性血管舒张功能减低主要原因是 NO 释放减少^[5]。由

② 湖南医科大学湘雅医院心内科

此推测补充外源性 L-精氨酸有可能增加 NO 的释放,改善血管的舒张功能。人体研究发现静脉输注 L-精氨酸能迅速降低高血压患者及健康人的血压,并降低高血压患者血管的外周阻力,增加心输出量^[6]。动物实验也显示长期口服 L-精氨酸能防止盐敏感大鼠高盐摄入后高血压的发生,特别是防止高血压性肾功能衰竭的发生^[7]。然而静脉短期输注 L-精氨酸并不降低腹主动脉狭窄性高血压大鼠的血压^[8],较长期口服 L-精氨酸对此型高血压大鼠的作用亦未见报道。本研究旨在观察较长期口服 L-精氨酸对腹主动脉狭窄性高血压大鼠血压、心肌肥厚及血管舒张功能的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂及成分 ① L-精氨酸,上海康达氨基酸厂产品。② Kerb's 液(mmol/L): NaCl 118.6, KCl 4.7, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25.1, Na₂EDTA 0.023, 葡萄糖 11.1。③ 新福林,上海第十制药厂产品。④ 乙酰胆碱(acetylcholine, ACh),北京化学公司产品。

1.1.2 主要仪器 ① L₇ MA 型离体器官实验仪,成都仪器厂产品。② LMS-2B 型二道生理记录仪,成都仪器厂产品。③ JN-A 型精密扭力天平,上海第二天平仪器厂产品。④ 991 型高效液相色谱仪,美国 WATERS 公司产品。⑤ EM-109 型透射电镜,西德欧波同公司产品。

1.2 方法

1.2.1 动物选择 体重 180~220 g, 14~16 周雄性 Wistar 大鼠 21 只,随机分为三组:手术组、手术+L-精氨酸组(简称精氨酸组)和对照组。动物由衡阳医学院实验动物部提供。

1.2.2 高血压模型制备及喂养 参照 Anderson PG^[9]方法制作高血压模型。手术组动物($n=7$)用 2.5%戊巴比妥钠(1 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉,行腹正中切口,以左肾动脉上方 5 mm 处用丝线将腹主动脉和 8 号注射针头共同结扎,然后抽去针头,致使该部位不全结扎形成狭窄,狭窄程度 65%±7%,逐层缝合腹部切口,饲以常规饲料,饮用自来水。精氨酸组动物($n=7$)的手术操作同前,术后饲以常规饲料,饮用含 1.25 g/L L-精氨酸的自来水^[8],平均每只鼠每日饮水约 25

ml,即每只鼠口服 L-精氨酸 31.25 mg/日。对照组动物($n=7$)除不结扎腹主动脉外余下操作与手术组相同,饲以常规饲料,饮自来水。三组动物均分笼饲养两周。

1.2.3 血压及心肌重量的测定 动物喂养两周后测血压,术前禁食 12 h,自由饮水。2.5%戊巴比妥钠(1 mg/kg 体重)腹腔注射麻醉。称体重后,用充满肝素生理盐水(80 ku/L)的动脉插管行右颈总动脉插管,动物稳定 10 min 后,经压力换能器(P-213D)连接二道生理记录仪,描记动物血压,然后经颈动脉放血,收集血液测血浆 L-精氨酸浓度。动物放血致死,迅速取心脏和胸主动脉。以滤纸吸干心脏表面血液后称量全心及左室加室间隔重量。胸主动脉则置于 95%O₂、5%CO₂ 平衡预冷后的 Kerb's 液中。

1.2.4 血浆 L-精氨酸测定 参照文献[10],采用 Pico-Taq 氨基酸分析法测定全部大鼠血浆 L-精氨酸的浓度。

1.2.5 大鼠血管舒张功能测定 将鼠胸主动脉制成宽约 4 mm 的动脉环,置于含 95%O₂-5%CO₂ 平衡的 37℃ Kerb's 液的浴槽中,经张力换能器与二道生理记录仪相连。给动脉环施加 3 g 前负荷,平衡 60 min,用 120 mmol/L KCl 使血管环去极化达最大收缩后用 Kerb's 液反复冲洗血管环 3~5 次。再平衡 30 min,加入 10⁻⁵ mol/L 新福林,使血管环达最大收缩的 40%~50%,然后每间隔 15 min 依次加入 10⁻⁸~10⁻⁵ mol/L ACh,观察血管环对 ACh 的舒张反应。另一部分血管环每间隔 15 min 依次加入 10⁻⁵~10⁻³ mol/L L-精氨酸,观察 L-精氨酸对大鼠动脉环的舒张作用。

1.2.6 电镜标本制作 大鼠处死后,迅速取左室游离壁中段一全层心肌组织及胸主动脉,置于预冷的 Kerb's 液中清洗血迹→2.5%戊二醛固定→0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液清洗→1%锇酸固定→双蒸水洗→丙酮脱水→环氧树脂包埋→超薄切片→电子染色→透射电镜观察。

1.2.7 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,方差分析,组间比较 t 检验, $P < 0.05$ 作为差别显著性判定。

2 结果

2.1 血压和心肌重量

腹主动脉狭窄后,大鼠血压均升高,两组平均动脉压均明显高于对照组($P < 0.01$),而手术组与精氨酸组的平均动脉压相比较,差别无统计学意义($P > 0.05$)。同时,手术组大鼠出现严重的心肌肥厚,尤以左室加室间隔肥厚为主

(Table 1)。与对照组比较,心系数(心脏重/体重)增加 27.2%,左心系数(左心加室间隔重/体重)增加 32.1%。精氨酸组大鼠也出现心肌梗厚,与对照组比较,心系数只增加 17%,左心系数增加 20.4%,与手术组比较,心系数降低 8.7%,左心系数降低 9.7%。

Table 1. The Changes of mean arterial blood pressure, body weight, heart weight, left ventricular + septum weight in three groups.

Index	control (n=7)	operated (n=7)	L-arginine (n=7)
MABP(kPa)	12.9±1.5	24.0±2.8 ^b	22.9±0.8 ^b
BW(g)	200±22	196±32	197±21
HW(mg)	647±72	804±148 ^a	748±82 ^a
(LV+S)(mg)	478±73	616±142 ^a	565±81
HW/BW(mg/g)	3.2±0.2	4.1±0.2 ^c	3.8±0.2 ^{b,d}
(LV+S)/BW (mg/g)	2.4±0.3	3.2±0.2 ^c	3.0±0.1 ^{b,d}

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, c: $P<0.01$ compared with control group, d: $P<0.05$ compared with operated group. MABP, mean arterial blood pressure; BW, body weight; HW, heart weight; LV+S, left ventricular+septum.

2.2 L-精氨酸水平变化

口服 L-精氨酸两周后,手术组血浆 L-精氨酸浓度稍低于对照组,但差别无统计学意义($145\pm15\text{ }\mu\text{mol/L}$ 比 $175\pm47\text{ }\mu\text{mol/L}$, $P>0.05$),精氨酸组血浆 L-精氨酸浓度明显提高,与手术组比较提高约 $211\text{ }\mu\text{mol/L}$ ($356\pm82\text{ }\mu\text{mol/L}$ 比 $145\pm15\text{ }\mu\text{mol/L}$, $P<0.01$)。

Table 2. Relaxant rate to acetylcholine of thoracic aorta rings ($\bar{x}\pm s$, %).

Concentration of ACh (mol/L)	control (n=7)	operated (n=7)	L-arginine (n=7)
10^{-8}	35.8±4.2	16±2.3 ^b	40.0±1.0 ^a
10^{-7}	64.3±5.1	25±2.5 ^b	5.9±2.7 ^a
10^{-6}	85.7±4.6	37±4.1 ^b	68.8±4.0 ^a
10^{-5}	92.9±5.8	42±5.2 ^b	80.3±5.7 ^a

Compared with control group, a: $P>0.05$, b: $P<0.05$.

2.3 血管环对乙酰胆碱的舒张反应

从 Table 2 可见,手术组大鼠血管环对 ACh 的舒张反应显著降低,精氨酸组大鼠血管环对 ACh 的舒张反应较手术组有明显改善,提示口服 L-精氨酸两周可部分改善腹主动脉缩窄性高血压大鼠的血管舒张功能。

2.4 血管环对 L-精氨酸的舒张反应

结果见 Table 3, L-精氨酸有直接舒张手术组大鼠血管环的作用,且与 L-精氨酸的浓度呈剂量依赖关系,但 L-精氨酸对精氨酸组及对照组大鼠的血管环均无明显舒张作用。

Table 3. Relaxant rate to L-arginine of thoracic aorta rings ($\bar{x}\pm s$, %).

Concentration of ACh (mol/L)	control (n=7)	operated (n=7)	L-arginine (n=7)
10^{-5}	-	20±5 ^b	-
10^{-4}	-	48±6 ^b	-
10^{-3}	-	62±8 ^b	-

Compared with control group, a: $P>0.05$; b: $P<0.05$.

2.5 胸主动脉及心肌超微结构改变

对照组大鼠血管内皮层薄,覆盖于血管腔,内皮细胞胞质中有吞饮小泡,基膜薄,内皮下层为疏松结缔组织。

手术组大鼠血管内皮细胞向管腔突出、脱落,细胞内出现空泡,内皮下层明显增厚,有大量细胞外基质及膜溶解碎片(Figure 1)。精氨酸组大鼠血管内皮及内皮下层改变与手术组大鼠相似(Figure 2)。

对照组正常心肌细胞肌原纤维、线粒体排列规则。线粒体位于肌原纤维之间,线粒体嵴排列密集,肌节各区带明显可见,细胞核呈长椭圆形,染色体疏松,浅染,核膜光滑(Figure 3)。

手术组心肌细胞线粒体成堆排列于肌原纤维间,线粒体内室肿胀,嵴断裂,溶解呈空泡状,肌原纤维排列紊乱,核膜皱折,染色质聚边(Figure 4)。

精氨酸组心肌细胞线粒体排列规则,位于

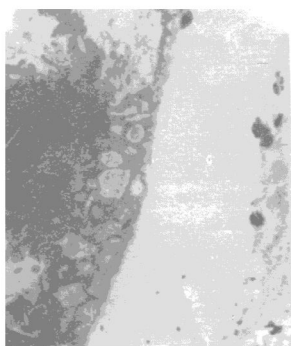


Figure 1. Electron micrograph of thoracic aorta from a hypertensive rat not oral L-arginine. Subendothelial spaces were greatly thickened. Excess extracellular matrix was seen in the subendothelial (X7000, operated group).



Figure 3. Electron micrograph of myocardium from a normotensive rat. Myofibril and mitochondrion appeared normal. Nuclear shape was regular (X7000, control group).

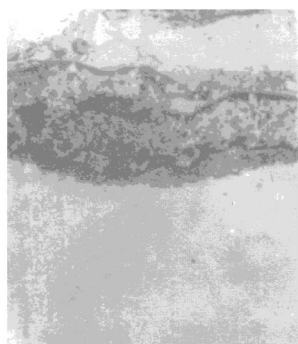


Figure 2. Electron micrograph of thoracic aorta from a hypertensive rat oral L-arginine. Subendothelial spaces were thickened. Excess extracellular matrix was seen in the subendothelial (X7000, operated + L-arginine group).



Figure 4. Electron micrograph of myocardium from a not oral L-arginine hypertensive rat. Excess mitochondrion with loss cristae and vacuolar changes were arranged between with myofibril. Nuclear shape was irregular (X7000, operated group).

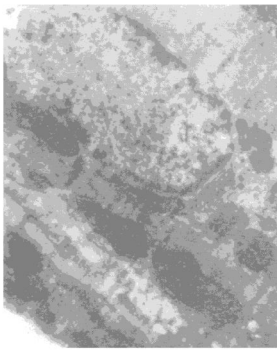


Figure 5. Electron micrograph of myocardium from a oral L-arginine hypertensive rat. Myofibril and mitochondrion appeared normal. But nuclear shape was irregular ($\times 12\ 000$, operated + L-arginine group).

肌原纤维之间,结构正常,肌原纤维形态结构正常,但细胞核膜皱折,染色体紊乱,核边移(Figure 5)。与手术组比较,心肌损害减轻。

3 讨论

实验性腹主动脉狭窄诱导的高血压发展很快,突出的特点是心肌出现向心性肥厚而无心腔的扩大^[11],尤以左室肥厚为主,是心腔后负荷增加的结果。然而血管加压物质血管紧张素 I (angiotensin- I, AT- I) 也参与心肌肥厚的形成。在动脉狭窄后高血压形成的早期(1~14 天),血浆肾素-血管紧张素水平明显升高,AT- I 可能刺激蛋白合成,而引起心肌肥厚^[12]。

一氧化氮是内皮细胞释放的一种重要的舒血管物质,能作为生理拮抗剂抑制 AT- I 等多种血管收缩因子的合成^[13]。正常情况下,血管内皮细胞内存在 NOS,能催化 L-精氨酸合成 NO。高血压等病理情况下,血管长期处于过度紧张牵拉中,可增加 L-精氨酸的消耗,因而有 NO 的合成减少^[15]。本研究发出口服两周 L-精氨酸能明显提高腹主动脉狭窄诱导的高血压大鼠血浆 L-精氨酸的浓度,但不能防止高血压

的发生。而 Chen^[2]等用相同剂量的 L-精氨酸 (1.25 g/L) 却能防止高盐摄入两周后盐敏感大鼠高血压的发生。因此长期口服 L-精氨酸对不同的血压模型血压的作用不尽相同,其机制值得进一步探讨。

国外资料显示高血压大鼠有肾血管内皮损害,内皮细胞出现空泡增多,内皮下层增厚,出现大量细胞外基质。肾小球小动脉及小叶间动脉血管壁增厚,肾小球系膜增生,而长期口服 L-精氨酸能增加或防止这些损害^[8,7]。本文研究结果显示口服 L-精氨酸两周后,高血压大鼠胸主动脉内皮细胞的损害无明显改善,但心肌肥厚程度有所减轻,心肌细胞损伤减轻,提示长期口服 L-精氨酸有保护心肌的作用。而这一作用并不依赖于血压的变化,可能与 L-精氨酸抑制肾素-血管紧张素系统有关。人体研究已经证实静脉输注 L-精氨酸能抑制血管紧张素转换酶的活性,使血浆 AT- I 水平下降^[14],从而减轻 AT- I 对心肌的作用。因此,长期口服 L-精氨酸对心肌的保护作用可能与 L-精氨酸对肾素-血管紧张素系统的作用有关。

本研究发现高血压大鼠血管环对 ACh 诱导的内皮依赖性舒张反应明显降低。较长期口服 L-精氨酸治疗可恢复高血压大鼠的内皮依赖性血管舒张功能,与国外研究结果一致^[4]。正常动物血管内皮合成释放的 NO 是由内皮细胞内组成型 NOS 催化的,而且动物体内有足够的 L-精氨酸以合成 NO,因此 L-精氨酸不影响正常动物的内皮依赖性血管舒张功能^[1]。但在高血压等病理情况下,血管内皮细胞变性受损,NO 可能由血管平滑肌细胞及变性的内皮细胞内诱导型 NOS 催化合成^[15,16]。腹主动脉狭窄性高血压大鼠动脉血管壁有白细胞及巨噬细胞浸润,这些细胞也有一定的非内皮细胞性 NO 合成^[17,18]。因此腹主动脉狭窄性高血压大鼠动脉血管除内皮细胞之外还有其它细胞亦可合成 NO,补充外源性 L-精氨酸增加非内皮细胞性 NO 的释放^[8]。这可能是 L-精氨酸能直接舒张内皮功能减退的高血压大鼠胸主动脉环的机制。而 L-精氨酸对长期口服 L-精氨酸的高血

压大鼠胸主动脉环无舒张作用,其机制可能与L-精氨酸抑制肾素-血管紧张素系统有关。

参考文献

- 1 Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 1988, **333**: 664~666.
- 2 Gardiner SM, Compton AM, Bennett T, et al. Control of regional blood flow by endothelium-derived nitric oxide. *Hypertension* (Dallas), 1990, **15**(5): 486~492.
- 3 Rees DD, Palmer RMJ, Moncada S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 3 375~378.
- 4 Vallance P, Collier J, Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. *Lancet*, 1989, **11**: 997~1 000.
- 5 Hayakawa H, Hirata Y, Suzuki E, et al. Long-term administration of L-arginine improves nitric oxide release from kidney in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension*, 1994, **23**(6 Part 1): 752~756.
- 6 Hisikawa K, Nakaki T, Suzuki H, et al. L-arginine as an antihypertensive agent. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1992, **20**(Suppl 12): S196~197.
- 7 Chen PY, John PLS, Kirk KA, et al. Hypertensive nephrosclerosis in the Dahl/Rapp rat: initial sites of injury and effect of dietary L-arginine supplementation. *Lab Invest*, 1993, **68** (2): 174~184.
- 8 Pucci ML, Dick LB, Miller KB, et al. Enhanced responses to L-arginine in aortic rings from rats with angiotensin-dependent hypertension. *J Pharm Exp Ther*, 1995, **274**(1): 1~7.
- 9 Anderson PG, Allard MF, Thomas GD, et al. Increased ischemic injury but decreased hypoxic injury in hypertrophied rat heart. *Circ Res*, 1990, **67**(4): 946~959.
- 10 王佐, 刘易林, 姜志胜. 一种测定家兔主动脉壁L-精氨酸水平的新方法. *中国动脉硬化杂志*, 1996, **4**(1): 72~74.
- 11 Rossi MA, Carillo SV. Cardiac hypertrophy due to pressure and volume overload: distinctly different biological phenomena. *Int J Cardiol*, 1991, **31**: 133~141.
- 12 Sohuncert R, Dzau VJ, Tang SS, et al. Increased rat cardiac angiotensin converting-enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy. *J Clin Invest*, 1990, **86**: 1 913~920.
- 13 Gruetter CA, Ryan EF, Lenke SM, et al. Endothelium-dependent modulation of angiotensin I-induced contraction in blood vessels. *Eur J Pharmacol*, 1988, **146**: 85~95.
- 14 Higashi T, Oshima T, Ono N, et al. Intravenous administration of L-arginine inhibits angiotensin-converting enzyme in human. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995, **80**(7): 2 198~202.
- 15 Basse R, Mulsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FBBS Lett*, 1990, **275**: 87~90.
- 16 Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive nitric oxide synthetase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **89**: 10 043~047.
- 17 Guyton JR, Dao DT, Kay LL, et al. Ultrastructure of hypertensive rat aorta: Increased basement membrane-like material. *Hypertension*(Dallas), 1990, **15**(1): 56~57.
- 18 Stuehr DJ, Gross SS, Sakuma L, et al. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med*, 1989, **169**: 1 011~020.

(1996-05-24 收到, 1996-08-09 修回)