

血红素加氧酶/一氧化碳系统对家兔 动脉粥样硬化发病的影响

徐少平 李鲁光 程友琴 唐朝枢^① 沙 鸥 余燕秋

北京军区北京总医院心内科, 北京 100700

主题词 动脉粥样硬化; 血红素加氧酶; 一氧化碳; 主动脉; 家兔; 胆固醇; 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 活性
摘要 为探讨血红素加氧酶/一氧化碳系统对动脉粥样硬化发病的影响, 采用高胆固醇饮食建立了动脉粥样硬化家兔模型, 并检测了血清总胆固醇、血浆氧化型低密度脂蛋白浓度及主动脉血红素加氧酶活性、一氧化碳生成量和主动脉内膜斑块面积。结果显示, 高胆固醇饮食显著升高血清总胆固醇及血浆氧化型低密度脂蛋白浓度, 血红素加氧酶活性及一氧化碳生成量分别较正常组降低 40% 及 30% ($P < 0.01$), 主动脉斑块面积达 $42.6\% \pm 9.2\%$; 血红素-L-赖氨酸盐恢复了一氧化碳生成量 ($P < 0.01$), 斑块面积减少至 $28.4\% \pm 8.1\%$ ($P < 0.05$)。以上提示, 动脉粥样硬化家兔主动脉血红素加氧酶/一氧化碳系统活性显著受损, 血红素-L-赖氨酸盐通过恢复主动脉一氧化碳生成量而在一定程度上抑制动脉粥样硬化进展。

Influence of Heme Oxygenase/Carbon Monoxide System on Atherosclerotic Process in Rabbits

XU Shao-Ping, LI Lu-Guang, CHENG You-Qin, TANG Chao-Shu, SHA Ou and YU Yan-Qiu

(Cardiovascular Department, General Hospital of Beijing Command, Beijing 100700, China)

MeSH Atherosclerosis; Heme Oxygenase; Carbon Monoxide; Aorta; Rabbits; Cholesterol; Lipoprotein, LDL, Oxidized; Activity

ABSTRACT **Aim** To investigate the influence of aortic heme oxygenase/carbon monoxide (HO/CO) system on atherosclerosis induced by high cholesterol diet in rabbits. **Methods** Male New Zealand white rabbits were divided into three groups in random: normal group, cholesterol group and heme group. Serum total cholesterol (TC) and plasma oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) levels were detected.

After 10 weeks, the aorta were harvested for assessment of HO activity, CO production and area of intima lesions. **Results** Compared with normal group, serum TC and plasma ox-LDL levels elevated markedly in cholesterol group. Aortic HO activity and CO production decreased about 40% and 30% respectively ($P < 0.01$). Intima lesions increased to $42.6\% \pm 9.2\%$. Compared with cholesterol group, administration of heme-L-lysinate did not altered serum TC and plasma ox-LDL levels, but restored CO production ($P < 0.01$), inhibited aortic intima lesion formation $28.4\% \pm 8.1\%$ vs. $42.6\% \pm 9.2\%$, ($P < 0.05$). **Conclusion** The activity of aortic HO/CO system is impaired markedly in atherosclerotic rabbits induced by cholesterol diet. Heme-L-lysinate inhibits atherosclerotic progression in some degree by restoring CO elaboration.

近年研究发现, 内源性一氧化碳 (carbon monoxide, CO) 是体内另一个简单的气体信使分子, 具有与一氧化氮 (nitric oxide, NO) 相似的生理功能^[1]。CO 是由血红素加氧酶 (heme oxygenase, HO) 氧化分解血红素产生的。有关 HO/CO 系统在心血管疾病发生发展中的作用已有较多报道^[2], 最近 Wang 等^[3]首次报道了在粥样硬化动脉的内皮细胞、泡沫细胞以及进展性斑块的中层平滑肌细胞中均有 HO 的表达。然而有关 HO/CO 系统在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 发病中的作用尚不清楚。本文就此对 HO/CO 系统进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

Tris、蔗糖、Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、大鼠肝细胞、NADP、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、血红素和纯血红蛋白均为 Sigma 公司产品。实验中所用仪器为 7150 生化分析仪 (HITACH)、碳氧计 (Corning 270, Ciba Corning Diagnostics)、WFZ 800-D2 双波长紫外分光光度计 (北京第二光学仪器厂) 和多媒体彩色病理图文分析系统 (同济医科大学清平影像工程公司)。

1.2 实验分组

24 只新西兰白兔 (购自解放军总医院动物室), 体重 1.9~2.5 kg, 分笼饲养, 饮水不限, 观察 1 周后进入实验。根据不同处理随机分为三组 (饲料量 100

~120 g/d)。① 正常组, 喂饲正常普通饲料。② 胆固醇组, 喂饲含 1 % 胆固醇饲料。③ 血红素组, 在喂饲高胆固醇饮食的同时, 经腹腔注射血红素-L-赖氨酸盐每天 9 mg/kg, 共 10 周。血红素-L-赖氨酸盐参照 Tenhunen 等^[4]的方法配制, 每毫升血红素-L-赖氨酸盐约含 25 mg 氯化血红素 (hemin)。血标本在禁食 12 h 后从耳中央动脉抽取。

1.3 血液生物化学分析

血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 测定用氧化酶法, 血浆氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, ox-LDL) 测定先采用柠檬酸钠沉淀 LDL, 然后用硫代巴比妥酸法^[5]测定。

1.4 一氧化碳生成量及血红素加氧酶活性测定

实验结束时, 在最后一次腹腔注射血红素-L-赖氨酸盐后 20 h 内用硫喷妥纳 (40 mg/kg) 麻醉后取主动脉标本, 立即置入预冷的 PBS 中并仔细剥去外周脂肪组织。

主动脉 CO 释放试验参照 Morita 等^[6]方法进行。取胸主动脉环 10~15 mm, 纵向剪开, 置于 2 mL RPMI 1640 孵育液中 (含 50 μ mol/L pure hemoglobin, Hb), 在富含 95% O₂ 及 5% CO₂ 的 37℃ 水浴箱中避光振荡孵育 2 h 后, 在波长 569 nm 下用碳氧计测定碳氧血红蛋白 (HbCO) 的最大吸收值, 以外源性 CO 和不同浓度的 Hb 制作标准曲线, 根据标准曲线计算样本中 HbCO 的量 (μ mol/g), 代表主动脉 CO 的释放量。

主动脉血红素加氧酶活性测定参照 Morita 等^[7]的方法进行。取胸主动脉环 10~15 mm, 置于 5 倍体积的预冷缓冲液 50 μ mol/L Tris/HCl pH 7.4, 内含 250 μ mol/L 蔗糖, 0.4 mmol/L PMSF, 0.5 mmol/L EDTA 中, 冰浴中匀浆, 匀浆液分别用 2 层及 4 层 Cheesecloth 过滤后, 800 g 离心 10 min, 13 500 g 离心 20 min 以沉淀线粒体, 然后取上清液, 105 000 g 离心

90 min 以分离微粒体组分。弃上清, 微粒体用 100 mmol/L 焦磷酸钠 (pH 7.4) 洗涤去除 Hb 后, 再将微粒体悬浮于 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 (含 0.1 mmol/L EDTA, pH 7.4) 中, 用考马斯亮兰法测定蛋白含量并调蛋白浓度在 4 g/L 以上。然后取 0.5 mg 微粒体, 加入 0.4 mL 的反应混合液 (含 0.6 mg 大鼠肝细胞, 0.8 mmol/L NADP, 1 mmol/L 6-磷酸葡萄糖和 0.2 u 6-磷酸葡萄糖脱氢酶), 以及 10 μ L 2.5 mmol/L 血红素, 在 37℃ 富含氧的水浴箱中避光孵育 10 min 后, 再加入 50 μ L 10% HgCl₂ 终止反应。然后在 464~530 nm 用双波长紫外分光光度计测定所生成的胆红素量 (消光系数为每厘米 40 mmol/L), 并以此代表 HO 的活性 [μ mol/(g·h)]。

1.5 主动脉斑块面积测定

腹主动脉经 10% 中性福尔林固定, 常规脱水后入油红 O 染色 (斑块部位着色), 然后用多媒体彩色病理图文分析系统分别测量斑块面积和主动脉内膜面积, 计算斑块面积占内膜面积的百分比。

1.6 统计学分析

结果以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用 one way ANOVA 进行统计学处理, 组间比较用 student-Newman-Keuls 法检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性, $P < 0.01$ 为差异有高度显著性。

2 结果

2.1 血脂及脂蛋白变化

整个实验期间, 正常组血清 TC 及血浆 ox-LDL 水平变化无统计学意义。和正常对照组比较, 胆固醇组及血红素组血清 TC 及血浆 ox-LDL 浓度于第 5 周末明显升高 ($P < 0.01$), 并维持这一高水平至实验结束。血红素-L-赖氨酸盐对血清 TC 及血浆 ox-LDL 水平无明显影响 (表 1, Table 1)。

表 1. 血清总胆固醇 (μ mol/L) 和血浆氧化型低密度脂蛋白 (μ mol/L) 浓度变化

Table 1. Serum TC (μ mol/L) and plasma ox-LDL (μ mol/L) concentrations ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	5 weeks		10 weeks	
		TC	ox-LDL	TC	ox-LDL
Normal	6	1.38 \pm 0.42	1.20 \pm 0.21	1.42 \pm 0.50	1.32 \pm 0.24
Cholesterol	7	34.80 \pm 9.59 ^a	2.45 \pm 0.68 ^a	36.98 \pm 10.43 ^a	2.61 \pm 0.61 ^a
Heme	9	32.78 \pm 8.47 ^a	2.49 \pm 0.75 ^a	35.15 \pm 7.13 ^a	2.78 \pm 0.60 ^a

a: $P < 0.01$, compared with normal group

2.2 主动脉血红素加氧酶活性及一氧化碳生成量变化

主动脉血红素加氧酶活性及 CO 生成量如表 2 (Table 2) 所示, 与正常组比较, 胆固醇组 HO 活性降

低 40%, CO 生成量减少 31% ($P < 0.01$), 应用血红素-L-赖氨酸盐治疗的血红素组 HO 活性较胆固醇组有所升高, 但差异无显著性 ($P < 0.05$), 而 CO 生成量较胆固醇组明显升高并基本恢复正常 ($P < 0.01$)。

表 2. 主动脉一氧化碳生成量 ($\mu\text{mol/g}$) 和血红素加氧酶活性变化 [$\mu\text{mol/ (g}\cdot\text{h)}$]

Table 2. Aortic CO production ($\mu\text{mol/g}$) and HO activity [$\mu\text{mol/ (g}\cdot\text{h)}$] ($\bar{x} \pm s$)

Groups	n	HbCO	HO
Normal	6	84.17 \pm 4.99	363.33 \pm 47.32
Cholesterol	7	58.29 \pm 7.48 ^a	260.86 \pm 41.44 ^a
Heme	9	79.22 \pm 7.66 ^b	292.80 \pm 50.15

a: $P < 0.01$, compared with normal group; b: $P < 0.01$, compared with cholesterol group

2.3 主动脉斑块面积

动脉壁油红 O 染色显示, 正常组无斑块, 胆固醇组斑块面积占主动脉内膜面积的 42.6% \pm 9.2%, 血红素组为 28.4% \pm 8.1%。和胆固醇组比较, 血红素组斑块面积明显降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

一氧化碳是 HO 氧化分解血红素的副产品。和 NO 一样, 内源性 CO 在血管的作用也是通过激活细胞内可溶性鸟苷环化酶, 升高细胞内 cGMP 浓度而实现的。任何原因引起 CO 生成减少都可导致血管的功能异常。

本研究发现, ①高胆固醇饮食诱导的 As 家兔血清 TC 及血浆 ox-LDL 浓度明显升高, 主动脉 HO 活性明显降低, CO 生成量显著减少, 主动脉内膜斑块面积显著增加; ②血红素-L-赖氨酸盐无降低血清 TC 及血浆 ox-LDL 的作用, 但基本恢复了主动脉 CO 生成量, 主动脉斑块面积较胆固醇组减少 33% ($P < 0.05$)。

Zakhary 等^[8]研究发现, 血管内皮细胞不仅有 NO 依赖性也有非 NO 依赖性血管舒张途径, 内源性 CO 就是非 NO 依赖性的血管舒张因子。我们以前的研究显示, 高脂血症及脂质过氧化可显著降低血小板膜流动性, 而膜流动性的降低可导致血小板粘附聚集及释放反应增强^[9]。体外研究发现, CO 通过升高血小板内 cGMP 浓度而抑制血小板钙内流及磷

脂酶 C 的活性, 抑制血小板花生四烯酸代谢, 进而抑制血小板聚集^[10]。Morita 等^[6]通过对低氧条件下内皮细胞及平滑肌细胞共同培养体系的研究发现, 平滑肌源性 CO 通过旁分泌作用显著抑制内皮细胞中内皮素-1 基因及血小板源性生长因子-B 基因的表达, 进而抑制平滑肌细胞自身的增殖及迁移。已知血管内皮依赖性舒张功能受损、血小板粘附聚集性增强和平滑肌细胞增殖并向内膜层迁移是 As 发生发展的重要特征。因此, 内源性 CO 的减少可加速 As 的进展, 也就是说, HO/CO 系统受损与 As 的发生发展密切相关。

本研究结果表明, 高胆固醇饮食诱导的 As 显著损害了 HO/CO 系统的活性, HO 活性降低是 CO 生成减少的主要原因, 然本研究未能回答导致 HO 活性降低的原因及机制。应用 HO 的底物血红素-L-赖氨酸盐后, 在 HO 活性并无明显升高的情况下, CO 生成量显著增加, 并在一定程度上抑制了 As 进展, 因此推测 As 时机体血红素可能不足, 也可能是导致内源性 CO 生成减少的原因之一。

参考文献

- Marks GS, Brien JF, Nakatsu K, et al. Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol Sci*, 1991, **121**: 185 - 188
- 程友琴, 王士雯. 内源性 CO 在心血管系统的细胞信使作用. *生理科学进展*, 1998, **29**: 145 - 147
- Wang LJ, Lee TS, Lee FY, et al. Expression of Heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol*, 1998, **152**: 711 - 720
- Tenhunen R, Tokola O, Linden IB. Haem arginate: a new stable haem compound. *J Pharm Pharmacol*, 1987, **39**: 780 - 786
- Sakurai T, Kinura S, Nakano M, et al. The oxidative modification of low density lipoprotein by nonenzymatically glycated peptide-Fe complex. *Biochim Biophys Acta*, 1991, **1186**: 273 - 278
- Morita T, Kourembanas S. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 676 - 682
- Morita T, Perrella MA, Lee ME, et al. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 475 - 479
- Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JL, et al. Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 795 - 798
- 徐少平, 孙静平. 动脉粥样硬化脂质过氧化损伤机制的实验研究. *中国循环杂志*, 1994, **9**: 419 - 421
- Brune B, Ullrich V. Inhibition of platelet aggregation by carbon monoxide is mediated by activation of guanylate cyclase. *Mol Pharmacol*, 1987, **32**: 497 - 504

此文 1999-01-08 收到, 1999-05-07 修回)

此文编辑 朱雯霞)