

一氧化氮及其合酶在家兔粥样硬化动脉的改变及 L- 精氨酸的作用

徐少平 李鲁光 唐朝枢 余燕秋 沙鸥 程友琴 徐幼月

(北京军区总医院心内科, 北京 100700)

主题词 动脉粥样硬化; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 主动脉; 家兔; 胆固醇; 精氨酸; 精氨酸, 二甲基, 非对称性; 脂蛋白, 低密度, 氧化型

摘要 为探讨一氧化氮及其合酶在高胆固醇饮食诱导的动脉粥样硬化中的改变及 L- 精氨酸的抗动脉粥样硬化作用, 在高胆固醇饮食诱导的动脉粥样硬化模型上, 检测了血清总胆固醇、血浆精氨酸、非对称性二甲基精氨酸和氧化型低密度脂蛋白浓度, 主动脉一氧化氮合酶活性、一氧化氮生成量及内膜斑块面积。结果发现, 高胆固醇饮食对血浆 L- 精氨酸水平无明显影响, 但血清总胆固醇、血浆非对称性二甲基精氨酸和氧化型低密度脂蛋白浓度显著升高, 主动脉一氧化氮合酶活性及一氧化氮生成量分别较正常对照组降低 45% 及 30% ($P < 0.01$), 内膜斑块面积达 $42.6\% \pm 9.2\%$ 。口服 L- 精氨酸虽无降低血清总胆固醇、血浆非对称性二甲基精氨酸和氧化型低密度脂蛋白浓度作用, 但血浆 L- 精氨酸浓度约升高一倍, 主动脉一氧化氮合酶活性显著升高, 一氧化氮生成量恢复正常 ($P < 0.01$), 内膜斑块面积减少至 $19.5\% \pm 7.4\%$ ($P < 0.05$)。结果提示, 高胆固醇饮食诱导的动脉粥样硬化兔主动脉一氧化氮合酶- 一氧化氮系统活性显著受损, 动脉粥样硬化的发生发展与该系统活性受损密切相关。内源性一氧化氮生成减少是由于主动脉一氧化氮合酶活性降低所致。L- 精氨酸通过升高主动脉一氧化氮合酶活性, 恢复一氧化氮生成量而在一定程度上抑制动脉粥样硬化进展。

Changes of Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases in Atherosclerotic Rabbit Aorta and Antiatherosclerotic Effect of L- Arginine

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

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

MeSH Atherosclerosis; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Aorta; Rabbits; Cholesterol; Arginine; Arginine, Dimethyl, Asymmetric; Lipoprotein, LDL

ABSTRACT **Aim** To investigate the changes of aortic nitric oxide (NO) and NO synthases (cNOS and iNOS) in atherosclerotic rabbits induced by high cholesterol diet and the antiatherosclerotic effect of L- arginine. **Methods** Male New Zealand white rabbits were divided into three groups in random: the rabbits received either normal rabbit chow (normal group), 1% cholesterol diet only (cholesterol group) or 1% cholesterol diet plus L- arginine (22.5% in drinking water, arginine group). Serum total cholesterol (TC), plasma L- arginine, asymmetric dimethylarginine (ADMA) and oxidized low density lipoprotein (ox- LDL) concentrations were detected. After 10 weeks, the aorta were harvested for assessment of NO production, NOS activities and area of intimal lesions. **Results** Compared with normal group, plasma L- arginine level had no significant alteration in cholesterol group, but serum TC, plasma ADMA and ox- LDL concentrations elevated markedly ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Aortic cNOS activity and NO production decreased about 45% and 30% respectively ($P < 0.01$). Intimal lesions increased to $42.6\% \pm 9.2\%$. Compared with cholesterol group, dietary L- arginine had no effects on serum TC, plasma ADMA and ox- LDL concentrations, but plasma L- arginine level increased about one time, aortic cNOS activity and NO production increased significantly ($P < 0.01$). Intima lesion formation were inhibited markedly ($19.5\% \pm 7.4\%$ vs $42.6\% \pm 9.2\%$, $P < 0.05$).

Conclusions The activity of aortic NOS- NO system is impaired significantly in atherosclerotic rabbits induced by cholesterol diet. Progressive intimal lesion formation is associated with impaired activity of NOS- NO system. Decrease of cNOS activity results in reduction of NO production. L- arginine inhibits atherosclerotic progression by augmenting cNOS activity and restoring NO elaboration.

一氧化氮(nitric oxide, NO) 是近年发现的体内最重要的细胞信使之一。内皮源性 NO 是以 L- 精

氨酸及分子氧为底物, 在一氧化氮合酶(NO synthases, NOS) 作用下由内皮细胞合成的。NOS 分为结构型 NOS (constitutive NOS, cNOS) 及诱导型 NOS (inducible NOS, iNOS), 血管内皮细胞为 cNOS, 而平滑肌

细胞及其它可诱导细胞如巨噬细胞主要为 iNOS。研究表明,内皮源性 NO 不仅是维持血管正常舒缩功能的重要介质,而且还有抑制单核粒细胞及血小板向内皮的粘附和聚集,抑制血管平滑肌细胞增殖等作用^[1~4]。各种致动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)因子损伤内皮引起的内皮源性 NO 生成减少是 As 发生发展最重要的病理生理改变。应用 NO 合成的前体 L-精氨酸(L-arginine)可显著减轻高胆固醇饮食所致的内皮损伤,改善内皮功能而发挥抗 As 作用^[5,6]。但是,As 时内源性 NO 生成减少究竟是由于其合成的底物 L-精氨酸不足,还是由于其合酶活性低下,抑或是两者共同作用的结果,报道不一。本文通过高胆固醇饮食复制家兔 As 模型,对此进行深入探讨,并观察了 L-精氨酸的抗动脉粥样化作用。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

Tris、L-精氨酸、L-脯氨酸、非对称性二甲基精氨酸、钙离子载体(A23187)、钙调素、还原型辅酶 II(NADPH)、二硫苏糖醇(DTT)、氟化苯甲磺酰(PMSF)、亮肽素、抑胃肽素 A 均为 Sigma 公司产品, L-(2,3-³H)精氨酸(比活性 2.29 TBq/mmol)购自 Dupont NEN, Dowex AG 50w-X8 (Na⁺型)购自 Fluka 公司。

1.2 实验分组

24 只雄性新西兰白兔(购自解放军总医院动物室),体重 1.9~2.5 kg,随机分为三组(饲料量 100~120 g/d):正常对照组喂饲正常饲料;胆固醇组喂饲含 1%胆固醇饲料;精氨酸组在予以高胆固醇饮食的同时,经饮水予以 2.25% L-精氨酸,共 10 周。血标本在禁食 12 h 后经耳中央动脉抽取。实验结束时以硫喷妥钠(10 mg/kg)麻醉后留取主动脉标本,立即置入预冷的冰磷酸盐缓冲液中,仔细剥去外膜脂肪组织以作进一步实验。

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)测定先用柠檬酸钠沉淀低密度脂蛋白,然后按化学发光法(硫代巴比妥法)^[7]测定。血浆 L-精氨酸及非对称性二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)浓度用 L-8500 氨基酸分析仪(HITACHI)测定

1.4 主动脉一氧化氮合酶活性及一氧化氮生成量测定

1.4.1 主动脉一氧化氮释放试验 取胸主动脉环 10 mm 左右,纵向剪开并置于 2 mL RPMI 1640 孵育液中(内含 1 μ mol/L 钙离子载体, 100 μ mol/L L-精氨酸),在富含 0.95 O₂ 和 0.05 CO₂ 的 37 °C 水浴箱中闭光振荡孵育 2 h,然后吸取 1.5 mL 孵育液,按 Greiss 法^[8]测定。以样品中亚硝酸盐(NO₂⁻)含量代表 NO 的生成量,用考马斯亮兰(CBB)法测定样品匀浆液蛋白含量,结果以 μ mol/g 表示。

1.4.2 主动脉一氧化氮合酶活性采用³H-精氨酸转化生成³H-脯氨酸法测定^[9] 取胸主动脉 10 mm 左右,加入 2 mL 酶提取液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4,含 0.1 mmol/L EGTA, 0.5 mmol/L 二硫苏糖醇, 1 mmol/L 氟化苯甲磺酰, 2 μ mol/L 亮肽素, 1 μ mol/L 抑胃肽素 A),冰浴中匀浆,4 °C 20 000 r/min 离心 60 min,取上清,测蛋白并调蛋白浓度为 1 g/L,然后取 0.2 mL 此上清液加 0.1 mL 孵育液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.4,含 100 μ mol/L 还原型辅酶 ②, 30 μ mol/L L-精氨酸, 18.5 $\times 10^4$ kBq/L ³H-L-精氨酸, 2 mmol/L 氯化钙, 10 mg/L 钙调素,此为总 NOS(tNOS)测定,而 iNOS 测定管中不加氯化钙及钙调素, cNOS = tNOS - iNOS), 37 °C 水浴中振荡孵育 30 min 后,加入 0.15 mL 预冷的终止液(含 20 mmol/L 乙酸钠, 1 mmol/L L-脯氨酸, 2 mmol/L EDTA, 0.2 mmol/L EGTA)终止反应,室温放置 10 min 后经 1 mL Dowex AG 50W-X8(Na⁺型)阳离子交换层析柱以分离反应液中的³H-L-精氨酸及新生成的³H-L-脯氨酸。取流出液 0.2 mL,置于闪烁瓶中不加盖过夜,然后加入闪烁液测样本的放射活性,由此计算³H-L-脯氨酸的生成量代表 NOS 的活性,结果以 nmol/(g·min)表示。

1.5 主动脉斑块面积测定

腹主动脉经 10% 中性福尔马林固定,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 血液生物化学指标变化

整个实验期间,正常对照组血清总胆固醇、血浆 L-精氨酸、非对称性二甲基精氨酸及氧化型低密

度脂蛋白浓度改变皆无统计学意义。和正常对照组比较,第 5 周末时胆固醇组及精氨酸组血清总胆固醇约升高 24 倍($P < 0.01$),血浆氧化型低密度脂蛋白约升高一倍($P < 0.01$),并维持这种高浓度至实验结束。但血清总胆固醇及血浆氧化型低密度脂蛋白在精氨酸组与胆固醇组之间无显著性差异(表 1,

Table 1); 血浆 L- 精氨酸浓度在胆固醇组和正常对照组之间的差异无显著性($P > 0.05$)。但精氨酸组血浆 L- 精氨酸浓度较正常对照组约升高一倍($P < 0.01$); 胆固醇组及精氨酸组血浆非对称性二甲基精氨酸浓度较正常对照组显著升高($P < 0.01$)(表 2, Table 2)。

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

Table 1. Serum TC (mmol/L) and plasma ox- LDL (μ mol/L) concentrations

Groups	n	end of week 5		end of week 10	
		TC	ox- LDL	TC	ox- LDL
Control	6	1.38 \pm 0.42	1.20 \pm 0.21	1.42 \pm 0.50	1.32 \pm 0.24
Cholesterol	7	34.87 \pm 9.58 ^b	2.45 \pm 0.68 ^b	36.98 \pm 10.43 ^b	2.61 \pm 0.61 ^b
L- Arginine	9	37.25 \pm 10.87 ^b	2.53 \pm 0.57 ^b	35.59 \pm 8.76 ^b	2.42 \pm 0.41 ^b

b: $P < 0.01$, compared with control group

表 2. 血浆 L- 精氨酸和非对称性二甲基精氨酸(μ mol/L) 浓度变化

Table 2. Plasma L- arginine and asymmetric dimethylarginine (μ mol/L) concentrations

Groups	n	end of week 5		end of week 10	
		L- Arginine	ADMA	L- Arginine	ADMA
Control	6	82.53 \pm 13.48	1.19 \pm 0.15	84.17 \pm 12.76	1.27 \pm 0.20
Cholesterol	7	88.19 \pm 15.52	1.53 \pm 0.21 ^a	87.55 \pm 17.18	1.75 \pm 0.19 ^b
L- Arginine	9	134.86 \pm 30.29 ^{bd}	1.49 \pm 0.20 ^a	169.24 \pm 31.46 ^{bd}	1.82 \pm 0.23 ^b

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with control group d: $P < 0.01$, compared with cholesterol group

表 3. 主动脉一氧化氮生成量(μ mol/g. protein) 及一氧化氮合酶活性[nmol/(g. min)] 变化

Table 3. Aorta NO production (μ mol/g. protein) and NOS activity [nmol/(g. min)]

Groups	n	NO ₂	eNOS	iNOS
Control	6	109.67 \pm 16.97	97.83 \pm 10.85	103.17 \pm 11.43
Cholesterol	7	76.17 \pm 14.30 ^b	53.14 \pm 8.36 ^b	128.71 \pm 13.94 ^b
L- Arginine	9	106.98 \pm 16.85 ^d	79.56 \pm 8.59 ^{bd}	123.67 \pm 12.28 ^b

b: $P < 0.01$, compared with control group d: $P < 0.01$, compared with cholesterol group

2.2 主动脉一氧化氮合酶活性和一氧化氮生成量的变化

和正常对照组比较,胆固醇组主动脉 eNOS 活性约降低 45%,NO 生成量减少约 30%,但 iNOS 活性约升高 25% ($P < 0.01$)。和胆固醇组比较,精氨酸组主动脉 eNOS 活性明显升高,NO 生成量恢复正常($P < 0.01$),iNOS 活性两组相似(表 3, Table 3)。

2.3 主动脉斑块面积

动脉壁油红 O 染色显示,正常对照组主动脉壁无粥样硬化斑块形成,胆固醇组斑块面积占主动脉内膜面积的 42.6% \pm 9.2%,精氨酸组为 19.5% \pm 7.4%,两组比较,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

3 讨论

生理状态下,机体内源性 L- 精氨酸足以饱和 NOS 以合成适量的 NO,后者通过激活细胞内可溶性鸟苷酸环化酶,升高细胞内 cGMP 浓度而发挥生物学效应。因此,NO 的生成量受其前体 L- 精氨酸及 NOS 活性的双重影响。

本研究发现:高脂血症家兔血浆 NO 的前体 L- 精氨酸水平并无明显降低,然而内源性 NOS 抑制物—非对称性二甲基精氨酸明显升高,氧化型低密度脂蛋白也显著升高,主动脉 eNOS 的活性显著降低,尽管诱导升高了 iNOS 的活性,但主动脉 NO 的

生成量明显减少, 内膜斑块面积明显增加; 外源性 L- 精氨酸虽未显示有降低血清 TC 作用, 亦无降低血浆非对称性二甲基精氨酸及氧化型低密度脂蛋白浓度的作用, 但明显升高了血浆 L- 精氨酸水平及主动脉 eNOS 活性, 恢复了内源性 NO 的生成量, 在一定程度上抑制了 As 进展。本研究结果显示, 高胆固醇饮食诱导的 As 时, 主动脉 NO 生成减少并非由于 NO 的前体 L- 精氨酸不足所致, 一个可能机制是升高的非对称性二甲基精氨酸和 L- 精氨酸竞争性与 NOS 结合, 从而抑制了 NOS 活性。有研究显示^[10, 11], 病理状态下, 血浆非对称性二甲基精氨酸在可检测的浓度以上即可抑制鼠肠系膜静脉及脑组织的 NOS 活性。因此推测高胆固醇饮食诱导的 As 时血浆非对称性二甲基精氨酸浓度的升高, 可反映细胞内非对称性二甲基精氨酸有更显著的增加, 并竞争性地抑制 NOS 活性, 减少 NO 的生成量。外源性 L- 精氨酸通过提高血浆 L- 精氨酸浓度并竞争性地逆转非对称性二甲基精氨酸对 NOS 活性的抑制作用, 增加 NO 的生成而发挥其抗 As 作用。NO 生成减少的另一个机制可能和血浆氧化型低密度脂蛋白浓度的增加有关。我们以前的研究表明^[12, 13], 脂质过氧化损伤是 As 发生发展的重要因素之一。Liao 等^[14]的研究发现, 氧化型低密度脂蛋白可明显降低培养的内皮细胞 eNOS 活性及其基因的表达, 从而减少内皮源性 NO 的产生, 这种抑制作用的强弱取决于 LDL 氧化修饰的程度及氧化型低密度脂蛋白的浓度。本研究应用外源性 L- 精氨酸未能降低血浆氧化型低密度脂蛋白浓度, 因此可部分解释 eNOS 活性未能恢复正常的原因。

综上所述, 本研究结果表明, 高胆固醇饮食虽然未降低 NO 前体 L- 精氨酸的血浆浓度, 但却明显增加了血浆非对称性二甲基精氨酸及氧化型低密度脂蛋白浓度, 从而在不同环节抑制了 NOS 活性, 导致内源性 NO 生成明显减少, As 进展。L- 精氨酸逆转了非对称性二甲基精氨酸对 NOS 的这种竞争性抑制作用, 升高了主动脉 NOS 活性, 恢复了 NO 生成量, 显示了其抗 As 作用。如联合应用抗氧化剂有可

能产生更强的抗 As 作用。

参考文献

- 1 Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelial-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, **327**: 524- 526
- 2 Gauthier TW, Scalia R, Murohara T, et al. Nitric oxide protects against leukocyte-endothelium interactions in the early stages of hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1995, **15**: 1 652- 659
- 3 de Graaf JC, Banga JD, Moncada S, et al. Nitric oxide functions as an inhibitor of platelet adhesion under flow conditions. *Circulation*, 1992, **85**: 2 284- 290
- 4 Dubey RK, Jackson EK, Luscher TF. Nitric oxide inhibits angiotensin II-induced migration of rat aortic smooth muscle cell. Role of cyclic nucleotides and angiotensin II receptors. *J Clin Invest*, 1995, **96**: 141- 149
- 5 杨和平, 杨爱莲, 王小平, 等. L- 精氨酸抗家兔动脉粥样硬化内皮损伤. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3**: 40- 44
- 6 杨永宗, 杨和平, 戴爱国, 等. L- 精氨酸/一氧化氮抗动脉粥样硬化的作用及机制. *中国动脉硬化杂志*, 1997, **5**: 258- 264
- 7 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, **1 186**: 273- 278
- 8 Green LC, Wagner DA, Glogowski J, et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982, **126**: 131- 138
- 9 王新波, 黄海鹭, 张灵芝, 等. 一氧化氮合酶的测定及其应用. *北京医科大学学报*, 1994, **26** (增刊): 173- 176
- 10 Kurose I, Wolf R, Grisham MB, et al. Effects of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis on postcapillary venules. *Am J Physiol*, 1995, **268**: H2 224- 231
- 11 Faraci FM, Brian JE, Heistad DD. Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am J Physiol*, 1995, **269**: H1 522- 527
- 12 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
- 13 徐少平, 孙静平. Isradipin 对动脉粥样硬化进程影响的实验研究. *中华心血管病杂志*, 1994, **22**: 455- 457
- 14 Liao JK, Shin WS, Lee WY, et al. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 319- 324

(此文 1999- 01- 11 收到, 1999- 08- 18 修回)

(此文编辑 胡必利)