

## 血管组织肾素—血管紧张素系统激活 对活性氧及一氧化氮生成的影响

孙文清<sup>1</sup>, 冯大明<sup>1</sup>, 唐朝克<sup>2</sup>, 刘录山<sup>2</sup>, 王仁<sup>1</sup>, 万载阳<sup>2</sup>, 杨永宗<sup>2</sup>

(南华大学 1. 病理生理学教研室, 2. 心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 猪; 动脉粥样硬化; 血管紧张素 $\text{Ang I}$ ; 活性氧; 一氧化氮

[摘要] 目的 研究血管组织肾素—血管紧张素系统激活对活性氧及一氧化氮生成的影响。方法 采用五指山小型猪 10 头, 分为 2 组, 每组 5 头, 分别喂饲正常或高脂饮食 3 个月, 观察颈总动脉组织胆固醇含量、血管紧张素 $\text{Ang I}$ 、活性氧、一氧化氮及总抗氧化能力的变化, 并应用 chymostatin 和氯沙坦分别抑制培养的人脐静脉内皮细胞血管紧张素 $\text{Ang I}$ 生成或阻断其与受体结合, 测定细胞培养液中活性氧和一氧化氮含量。结果 高脂血症猪血管组织内膜与中膜胆固醇含量较对照组增加了  $108\% \pm 25\%$ , 血管紧张素 $\text{Ang I}$ 含量增加了  $115\% \pm 20\%$ , 活性氧含量增加了  $144\% \pm 28\%$ , 一氧化氮减少了  $51\% \pm 5\%$ , 血管组织总抗氧化能力降低  $56\% \pm 5\%$  ( $P$  均  $< 0.01$ )。人脐静脉内皮细胞培养液中加入血管紧张素 iv  $10 \text{ nmol/L}$ , 培养液中血管紧张素 $\text{Ang I}$ 增加 11 倍, 活性氧生成显著增加, 一氧化氮则显著减少 ( $P$  均  $< 0.01$ )。人脐静脉内皮细胞培养液中加入血管紧张素 iv  $10 \text{ nmol/L}$  和 Chymostatin  $100$  或  $500 \text{ } \mu\text{mol/L}$ , 血管紧张素 $\text{Ang I}$ 的生成分别降低了  $61\% \pm 6\%$  和  $65\% \pm 7\%$ , 同时活性氧生成减少, 一氧化氮生成增加 ( $P < 0.01$ ); 人脐静脉内皮细胞培养液中加入氯沙坦, 在血管紧张素 $\text{Ang I}$ 生成不减少的情况下, 活性氧与一氧化氮生成量与对照组相近。结论 高胆固醇血症能使猪血管组织肾素—血管紧张素系统活化, 导致活性氧生成增多, 一氧化氮减少, 这一作用可能由血管紧张素 $\text{Ang I}$ 的 I 型受体介导。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### The Effects of Activation of the Vascular Tissue Renin Angiotensin System on Production of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide

SUN Wen Qing<sup>1</sup>, FENG Da Ming<sup>1</sup>, TANG Chao Ke<sup>2</sup>, LIU Lu Shan, WANG Ren, WAN Zai Yang<sup>2</sup>, and YANG Yong Zong<sup>2</sup>

(1. Department of Pathophysiology, 2. Institute of Cardiovascular Disease, Faculty Medicine, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Pig; Atherosclerosis; Angiotensin $\text{Ang I}$ ; Reactive Oxygen Species; Nitric Oxide

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of activated renin angiotensin system in the vascular tissue on production of reactive oxygen species and nitric oxide. **Methods** Ten male Wuzhishan minipigs were divided into two groups, fed with normocholesterolemic (control;  $n = 5$ ) or hypercholesterolemic (2% cholesterol, hyperlipid,  $n = 5$ ) food for 3 months. Carotid arteries were isolated and the changes of TC,  $\text{Ang I}$ , ROS, NO and T-AOC of the vascular tissue were determined. In addition, hUVEC (human umbilical vein endothelial cell) were incubated with  $\text{Ang I}$  and chymostatin or with  $\text{Ang I}$  and losartan respectively for 24 h, the supernatant was collected to measure the concentration of  $\text{Ang I}$ , ROS and NO. **Results** In comparison to the normocholesterolemic state, hypercholesterolemia led to a significant increase in TC content ( $108\% \pm 28\%$ ,  $P < 0.01$ ),  $\text{Ang I}$  generation ( $115\% \pm 20\%$ ,  $P < 0.01$ ) and ROS production ( $144\% \pm 28\%$ ,  $P < 0.01$ ), but it led to a significant decrease in NO ( $51\% \pm 5\%$ ,  $P < 0.01$ ) and T-AOC ( $56\% \pm 5\%$ ,  $P < 0.01$ ). Cultured hUVEC could convert  $\text{Ang I}$  to  $\text{Ang I}$ .  $\text{Ang I}$  increased by 11 times in the presence of  $10 \text{ nmol/L}$   $\text{Ang I}$  as compared with control group, and the level of ROS also increased while NO decreased significantly. When hUVEC were incubated with  $\text{Ang I}$  plus 100 or  $500 \text{ } \mu\text{mol/L}$  chymostatin,  $\text{Ang I}$  generation was reduced by  $61\% \pm 6\%$  or  $65\% \pm 7\%$  respectively, and the ROS decreased while NO increased significantly as compared with only  $\text{Ang I}$ . When hUVEC were incubated with  $\text{Ang I}$  plus Losartan, the generation of ROS and NO was almost the same as compared with control group on condition that  $\text{Ang I}$  generation was not reduced. **Conclusion** hypercholesterolemia could activate renin angiotensin system of the vascular tissue, which results in an increased vascular tissue production of ROS and a decreased NO. This effect might be mediated by AT1 receptor.

[收稿日期] 2005-04-29 [修回日期] 2006-01-23

[基金项目] 湖南省重点科技项目(OISSY1003)

[作者简介] 孙文清, 副教授, 主要从事心血管病理生理学研究, 联系电话 0734-8281409, E-mail 为 wenqingsun@163.com。通讯作者冯大明, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病理生理学研究。唐朝克, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管病理生理学研究。

近年的研究表明, 动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是血管系统氧化还原作用失调导致的慢性炎症病变<sup>[1]</sup>。活性氧(reactive oxygen species, ROS)的蓄积, 即氧化应激与As的发生密切相关<sup>[2]</sup>。血管紧张素 $\text{Ang I}$  (angiotensin  $\text{Ang I}$ ) 在As的发生、发展中起重要作用, 应用血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)和

Ang Ⅱ型受体(AT1-R)拮抗剂能减轻兔和鼠的As病变<sup>[3]</sup>。然而,文献[4]报道,与正常人相比,冠心病患者血浆Ang Ⅱ无明显增高,而且血浆Ang Ⅱ水平与血管紧张素转化酶(ACE)无显著相关。提示血管组织中存在的肾素-血管紧张素系统在As中可能起着更为重要的作用。我们给五指山小型猪喂饲高胆固醇饮食3个月,观察猪血管组织Ang Ⅱ、ROS、NO、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)的变化,并在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)培养液中加入Ang Ⅱ生成抑制剂或AT1-R拮抗剂,观察其对血管内皮细胞ROS及NO生成的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与分组

雄性五指山小型猪(由北京农大动物实验中心提供)10头,分为2组,每组5头。正常组喂饲普通饮食,实验组动物于普通饮食中加2%胆固醇和10%猪油3个月,称体重并经眶静脉窦<sup>[5]</sup>取血测血浆脂质,之后处死动物,取颈总动脉备用。

### 1.2 血浆总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇含量的测定

血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL)含量按本实验室常规方法测定。血浆HDL/TC由二者的测定值计算而得。

### 1.3 血管组织生物化学指标测定

颈总动脉取出后立即置入由生理盐水制成的冰盒内,迅速分离外膜组织,将血管剪碎制成匀浆。Ang Ⅱ测定用放射免疫法,以<sup>125</sup>I-Ang Ⅱ与样品中Ang Ⅱ同时竞争抗体结合位点,根据样品管中放射线含量直接从标准曲线上查找相应的Ang Ⅱ含量,药盒购自中国北方免疫试剂研究所;NO测定用Griess反应法,用亚硝酸盐(NO<sub>2</sub><sup>-</sup>)和硝酸盐(NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)作为NO相对含量,ROS与组织T-AOC测定均采用化学比色法,严格按解放军总医院东亚免疫技术研究所试剂盒操作步骤进行。组织匀浆的蛋白含量用考马斯亮兰法测定;胆固醇含量按本实验室常规方法测定。

### 1.4 人脐静脉内皮细胞培养及分组处理

人脐静脉内皮细胞(HUVEC)培养采用胶原酶消化法,Ⅱ因子相关抗原阳性鉴定为内皮细胞。第1与第2代细胞用于实验,将细胞接种于24孔培养板,浓度为 $2.5 \times 10^5$ /L,静置24h后换成无血清细胞培养液,孵育24h使细胞处于静止状态再进行实验。实验分为6组,每组6孔细胞:对照组为无血清

的M1640培养液,Ang I组为Ang I 10 nmol/L, Chymostatin(胃促胰酶抑制剂)100(Chy100)组为Ang I 10 nmol/L + Chymostatin 100 μmol/L, Chymostatin500(Chy500)组为Ang I 10 nmol/L+ Chymostatin 500 μmol/L, 氧沙坦10组为Ang I 10 nmol/L+ 氯沙坦(AT1-R拮抗剂)10 μmol/L, 氯沙坦50组为Ang I 10 nmol/L+ 氧沙坦50 μmol/L。Ang I、chymostatin为Sigma公司产品,氯沙坦为默沙东医药公司产品。

### 1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS8.0统计软件处理,多组间比较用单因素方差分析,两两比较用 $t$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 两组动物体重及血浆脂质含量

实验组血浆TC为 $20.81 \pm 3.68$  mmol/L,与正常组比较,具有显著性差异( $P < 0.01$ );HDL/TC为 $2.56 \pm 0.62$  mmol/L,与正常组比较,也有显著性差异( $P < 0.01$ );但HDL/TC值则显著降低( $P < 0.01$ ),两组动物的体重及血浆TG则无明显差异(表1)。

表1. 两组动物体重及血浆脂质含量的比较( $\bar{x} \pm s$ )

指 标	正常组( $n=5$ )	实验组( $n=5$ )
TC (mmol/L)	$1.85 \pm 0.41$	$20.67 \pm 3.28^a$
TG (mmol/L)	$0.52 \pm 0.13$	$0.54 \pm 0.15$
HDL (mmol/L)	$0.69 \pm 0.15$	$2.56 \pm 0.52^a$
HDL/TC	$0.39 \pm 0.07$	$0.14 \pm 0.04^a$
体重 (kg)	$42.28 \pm 3.68$	$44.00 \pm 4.05$

a为 $P < 0.01$ ,与正常组比较。

表2. 两组动物颈总动脉组织各生物化学指标检测结果比较( $\bar{x} \pm s$ )

指 标	正常组( $n=5$ )	实验组( $n=5$ )
TC (mg/g)	$1.47 \pm 0.15$	$3.06 \pm 0.13^a$
Ang Ⅱ (ng/g)	$12.4 \pm 1.5$	$25.7 \pm 2.0^a$
ROS (ku/g)	$25.5 \pm 1.2$	$62.2 \pm 5.4^a$
NO (mmol/g)	$11.40 \pm 0.68$	$5.54 \pm 0.22^a$
T-AOC (ku/g)	$25.4 \pm 2.2$	$11.1 \pm 1.4^a$

a为 $P < 0.01$ ,与正常对照组比较。

### 2.2 高脂血症猪血管组织血管紧张素 Ⅱ、活性氧、一氧化氮及总抗氧化能力的变化

五指山小型猪喂饲高脂饮食12周,颈总动脉组织内、中膜TC含量增加了 $108\% \pm 25\%$ , Ang Ⅱ含量增加了 $115\% \pm 20\%$ , ROS增加了 $144\% \pm 28\%$  ( $P$ 均 $< 0.01$ ), NO减少 $51\% \pm 5\%$ , 血管组织总抗氧化能

力降低 56% ± 5% ( $P$  均 < 0.01, 表 2)。

### 2.3 血管紧张素 Ⅱ对人脐静脉内皮细胞活性氧及一氧化氮生成的影响

人脐静脉内皮细胞培养液中加入 Ang I 10 nmol/L, 培养液中 Ang Ⅱ由  $11.5 \pm 0.5$  ng/L 增加至  $131.3 \pm 9.3$  ng/L ( $P$  < 0.01), ROS 生成显著增加, NO 的生成则显著减少 ( $P$  均 < 0.01); 培养液中再加入 Chymostatin 100、500 μmol/L, 分别使 Ang Ⅱ的生成减少了 61% 和 65%, ROS 生成减少 20% 和 30%, NO 生成增加 23% 和 28% ( $P$  均 < 0.01); 人脐静脉内皮细胞培养液中加入氯沙坦, 在 Ang Ⅱ生成不减少的情况下, ROS 与 NO 生成量与对照组相近(表 3)。

表 3. 血管紧张素 Ⅱ对人脐静脉内皮细胞活性氧及一氧化氮生成的影响( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	Ang Ⅱ(ng/L)	ROS(ku/L)	NO(mmol/L)
对照组	$11.5 \pm 0.7$	$238.8 \pm 10.2$	$802.7 \pm 10.4$
AngI	$131.3 \pm 9.3^a$	$348.6 \pm 8.6^a$	$546.9 \pm 9.9^a$
Chy100	$51.1 \pm 2.3^{ac}$	$280.1 \pm 10.2^{ac}$	$674.9 \pm 10.3^{ac}$
Chy500	$46.0 \pm 2.0^{ac}$	$244.0 \pm 8.2^c$	$700.0 \pm 12.4^{ac}$
氯沙坦 10	$142.2 \pm 10.6^a$	$258.9 \pm 9.4^c$	$755.5 \pm 11.6^c$
氯沙坦 50	$133.4 \pm 9.2^a$	$244.1 \pm 6.0^c$	$797.4 \pm 9.4^c$

每组为 6 孔细胞, 实验重复 6 次; Chy 为 chymostatin。a 为  $P$  < 0.01, 与对照组比较; c 为  $P$  < 0.01, 与 Ang I 组比较。

## 3 讨论

近年的研究表明, 血管组织 Ang Ⅱ生成包括 ACE 途径和非 ACE 途径<sup>[5]</sup>, 后者包括组织蛋白酶 G 和胃促胰酶途径, 组织蛋白酶 G 来自中性粒细胞, 胃促胰酶由肥大细胞分泌。非 ACE 途径生成的 Ang Ⅱ的病理生理意义尚具争议。在 As 过程中, 血管组织中的胃促胰酶活性增高, 且与血浆 TC 水平呈正相关<sup>[6]</sup>。培养液中加入胃促胰酶抑制剂 Chymostatin 使 Ang Ⅱ的生成呈剂量依赖性减少, 减少幅度达 61% 和 68%, ROS 生成也显著减少, NO 则明显增多。这说明胃促胰酶是血管组织将 AngI 转化为 Ang Ⅱ的主要酶类<sup>[7]</sup>, 这一结果与 Takai 等<sup>[8]</sup>报道相似。

血管组织的氧化还原状态的改变参与 As 的发生、发展。局部 Ang Ⅱ可激活 NADH/NADPH 氧化酶, 使  $O_2^-$ 、 $H_2O_2$  等 ROS 生成增多, ROS 可作为第二信使, 介导核因子 kB 和 AP-1 活化, 上调趋化因子、

黏附分子的基因<sup>[9]</sup>, 这些基因产物刺激白细胞、单核细胞与血管壁相互作用, 穿越血管内皮浸润至内膜或内膜下, 引起血管壁炎症, 单核细胞进入血管壁转化为巨噬细胞后, 摄取修饰和氧化的 LDL, 成为泡沫细胞; 炎症细胞又能释放 ACE、胃促胰酶和组织蛋白酶 G, 导致血管局部的 Ang Ⅱ进一步增多, 形成正反馈, 使血管壁的慢性炎症过程得以持续, As 病变得以发生、发展。NO 则是内源性核因子 kB、AP-1 活化和前炎症细胞因子表达的抑制剂。ROS 可使 NO 分解增多, 导致 NO 减少。培养液中同时加入 AngI 和氯沙坦, Ang Ⅱ的含量虽未减少, 但血管内皮细胞 ROS 和 NO 的生成量却与未加入 AngI 的对照者相近, 这可能是由于 AT1-R 拮抗剂同时阻断了 ACE 和非 ACE 途径生成的 Ang Ⅱ的作用所致。说明 Ang Ⅱ是血管组织 ROS 增多和 NO 减少的主要原因, 其作用可能由 AT1-R 介导。

综上所述, 高胆固醇血症引起血管组织肾素-血管紧张素系统活化, 导致 ROS 生成增多, NO 减少, 抑制 Ang Ⅱ的生成或阻断其与 AT1-R 结合可减少血管组织 ROS 生成, 增加 NO。

### [参考文献]

- [1] 徐也鲁. 动脉粥样硬化——一种慢性炎症过程[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(2): 93-95
- [2] 刘虹彬, 温进坤, 韩梅. 氧化应激与动脉粥样硬化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, 9(4): 360-362
- [3] 谈红, 潘其兴, 梁春香, 魏敏, 克丙中, 尹格平, 等. 氯沙坦、卡托普利及联合用药对肾动脉粥样硬化的干预[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(4): 299-303
- [4] 纪泽泉, 黄翠雯, 梁成结, 陈波, 陈盛强, 孙卫文, 等. 阻断肾素-血管紧张素系统对肾小球硬化大鼠肾 TGFβ1 的影响及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(14): 41-47
- [5] 胡福利, 齐晓勇, 谷剑, 李树仁, 程文杰, 缴涛, 等. 冠心病患者血管紧张素转化酶基因多态性与其血清活性及血管紧张素 Ⅱ水平的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(4): 352-354
- [6] Voors AA, Oosterga M, Buikema H, Mariani M, Grandjean JG, van Gilst WH. Differences between angiotensin converting enzyme inhibition and angiotensin Ⅱ AT1 antagonism on angiotensin mediated responses in human internal mammary arteries[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2003, 41(2): 178-184
- [7] Uehara Y, Urata H, Sasaguri M, Ideishi M, Sakata N, Tashiro T, et al. Increased chymase activity in internal thoracic artery of patients with hypercholesterolemia[J]. Hypertension, 2000, 35(1pt1): 55-60
- [8] Takai S, Shiota N, Jin D, Miyazaki M. Functional role of chymase in angiotensin Ⅱ formation in human vascular tissue[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1998, 32(5): 826-833
- [9] Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-κB and cytokine inducible enhancers[J]. FASEB J, 1995, 9(10): 899-909

(此文编辑 胡必利)