

Cariporide 对晚期氧化蛋白产物损伤 血管内皮功能的保护作用

李先霞¹, 陈双秀¹, 曹 维²

(1. 岳阳职业技术学院药学与检验系, 湖南省岳阳市 414000; 2. 中山大学药物开发中心, 广东省广州市 510080)

[关键词] 药理学; Cariporide; 晚期氧化蛋白产物; 内皮依赖性舒张; 氧化应激; 超氧化物歧化酶

[摘要] 目的 研究晚期氧化蛋白产物在体外能否直接损伤大鼠离体胸主动脉的内皮功能, 及观察 Cariporide 对晚期氧化蛋白产物诱导的血管内皮损伤是否具有保护作用并探讨其可能的机制。方法 雄性 SD 大鼠在戊巴比妥麻醉下, 开胸切取胸主动脉, 制成 3~4 mm 血管环备用, 按文献方法制备晚期氧化蛋白产物。用不同浓度晚期氧化蛋白产物(1, 2 和 3 mmol/L) 和 Cariporide 孵育大鼠离体胸主动脉环, 分别检测乙酰胆碱引起的内皮依赖性舒张反应和硝普钠引起的非内皮依赖性舒张反应。并测定血管组织中超氧化物歧化酶的活性、丙二醛及一氧化氮的含量。结果 晚期氧化蛋白产物能损伤乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张反应, 且血管组织丙二醛含量增加, 超氧化物歧化酶活性下降, 一氧化氮释放减少。Cariporide (0.01~1 μmol/L) 与晚期氧化蛋白产物(3 mmol/L) 共同孵育血管环 90 min, 能改善晚期氧化蛋白产物对血管内皮依赖性舒张反应的损害, 丙二醛含量减少, 超氧化物歧化酶活性升高, 一氧化氮释放增加。结论 Cariporide 对晚期氧化蛋白产物所致血管内皮依赖性舒张反应的损害具有明显保护作用, 其机制可能与抗氧化作用和促进一氧化氮的合成或释放有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Protective Effects of Cariporide on Endothelial Dysfunction Induced by Advanced Oxidation Protein Products in Rat Thoracic Aorta

LI Xiann Xia¹, CHEN Shuang Xiu¹, and CAO Wei²

(1. Department of Pharmacy and Laboratory, Yueyang Occupation and Technology Academy, Yueyang 414000; 2. Drug Development Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

[KEY WORDS] Cariporide; Advanced Oxidation Protein Products; Endothelium-dependent Relaxation; Oxidative Stress; Superoxide Dismutase

[ABSTRACT] **Aim** To explore whether Cariporide exerts beneficial effect on impaired vascular endothelial function elicited by exogenous advanced oxidation protein products (AOPP), and to investigate the potential mechanisms. **Methods** Male SD rats were killed by exsanguination after anesthesia with pentobarbital sodium (30 mg/kg, IP). The thoracic aorta was immediately isolated and was cut into 3~4 mm rings. AOPP was prepared according to the methods of article. Rat aortic isolated rings were incubated with AOPP (1, 2, 3 mmol/L) and Cariporide (0.01~1 μmol/L) for 90 min. Endothelium-dependent relaxation (EDR) induced by acetylcholine (ACh), endothelium-independent relaxation induced by sodium nitroprusside (SNP), superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) were measured in rat isolated aorta. **Results** Co-incubation of aortic rings with AOPP-BSA (3 mmol/L) for 90 min resulted in a significant inhibition of EDR response to ACh.

Cariporide (0.01~1 μmol/L) groups were significantly attenuated the inhibition of EDR response induced by AOPP-BSA.

Conclusion Cariporide was able to protect against vascular endothelial dysfunction caused by AOPP-BSA. The mechanisms may be involved in antioxidative stress and increasing the synthesis and release of NO.

血管内皮损害是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生发展的始动环节, 其早期表现为内皮依赖性舒张功能(endothelium-dependent relaxation, EDR)降低。晚期氧化蛋白产物(advanced oxidation protein products, AOPP)是蛋白质被氧化修饰的产物。研究

发现 As 患者血浆 AOPP 水平明显高于正常人^[1], 这提示 AOPP 可能与 As 的发生和发展有关。AOPP 可引起中性粒细胞和单核细胞的激活, 能诱导或加重氧化应激^[2]。外源性 AOPP 直接孵育血管环可诱导 EDR 损伤^[3]。Cariporide 是一种新的选择性钠氢交换蛋白(Na⁺-H⁺ exchanger-1, NHE-1)抑制剂。文献[4]报道, Cariporide 可显著抑制高糖诱导的单核细胞一内皮细胞粘附及粘附分子的表达。但 Cariporide 对 AOPP 在体外直接损伤血管内皮功能是否有保护作用尚未见文献报道。本实验采用不同浓度

[收稿日期] 2007-05-08

[修回日期] 2007-12-20

[作者简介] 李先霞, 副教授, 从事药理教学与心血管药理研究, E-mail for why6100@163.com。陈双秀, 硕士, 副教授, 主要从事心血管药理研究。曹维, 硕士, 教授, 主要从事药物开发研究。

AOPP 孵育大鼠离体胸主动脉环诱导内皮功能损伤,并观察 Cariporide 对其损伤血管依赖性舒张反应的影响,为 Cariporide 临床用于防治 As 等心血管疾病提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

雄性 Sprague-Dawley 大鼠 40 只,体重 200 ± 20 g,由中南大学湘雅医学院动物学部提供。无内毒素牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、Cariporide、去氧肾上腺素(phenylephrine)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)和硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)均购自 Sigma 公司(美国),其余试剂均为国产分析纯。丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及一氧化氮(NO)测试盒购自南京建成生物工程公司。

1.2 晚期氧化蛋白产物的制备

晚期氧化蛋白产物(AOPP)的制备采用 Witko-Sarsat 等^[2]介绍的方法。将 BSA 与次氯酸以 1:120 的摩尔比等体积混合,室温放置 30 min,制备出氧化修饰的 AOPP-BSA。制备的 AOPP-BSA 装入透析袋后用 PBS 液透析 24 h,除去游离的次氯酸,以碘试法检测直至透析液中无次氯酸,过滤后 4℃ 保存。AOPP 含量测定:以氯胺-T($0 \sim 100 \mu\text{mol/L}$) 340 nm 处吸光度值为标准曲线,测定酸性条件下 AOPP 在 340 nm 处的吸光度值。AOPP 浓度以相应的氯胺-T 浓度($\mu\text{mol/L}$)表示。

1.3 动脉环的制备和血管张力的检测

将大鼠击昏后,迅速分离、剪取胸主动脉置入以 95% O_2 和 5% CO_2 饱和的 4℃ 的 K-H 液中,细心剔除血管周围组织,制备成 3~4 mm 长的血管环。而后将血管环悬挂于不锈钢挂钩上,一端固定于盛 K-H 液的浴槽中,持续充以 95% O_2 和 5% CO_2 , 37℃ 恒温,每 15 min 换液一次,另一端连接张力换能器。开始实验时施加 2 g 的静息张力,平衡 60 min 后用去氧肾上腺素($1 \mu\text{mol/L}$)收缩血管,待张力上升达坪值并平稳后依次加入累积终浓度为 $10^{-8} \text{ mol/L} \sim 3 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ 的 Ach 舒张血管以检测血管内皮完整性,对 Ach 诱导的最大舒张超过 80% 的血管环被认为内皮是完整的,可用于实验。

1.4 晚期氧化蛋白产物对内皮依赖性舒张反应的影响和 Cariporide 的干预作用

1.4.1 晚期氧化蛋白产物对内皮依赖性反应的影响 实验分为 5 组,每组 8 个血管环。正常对

照组:血管环平衡 90 min; ④BSA 组:用 3 mmol/L BSA 孵育血管环 90 min; ④低浓度 AOPP-BSA 组:用 1 mmol/L AOPP-BSA 孵育血管环 90 min; 中浓度 AOPP-BSA 组:用 2 mmol/L AOPP-BSA 孵育血管环 90 min; 高浓度 AOPP-BSA 组:用 3 mmol/L AOPP-BSA 孵育血管环 90 min。

1.4.2 Cariporide 的干预作用 实验分为 4 组,每组 8 个血管环。低剂量 Cariporide 组:用 $0.01 \mu\text{mol/L}$ Cariporide 与 3 mmol/L AOPP-BSA 共孵育血管环 90 min; ④中剂量 Cariporide 组:用 $0.1 \mu\text{mol/L}$ Cariporide 与 3 mmol/L AOPP-BSA 共孵育血管环 90 min; ④高剂量 Cariporide 组:用 $1 \mu\text{mol/L}$ Cariporide 与 3 mmol/L AOPP-BSA 共孵育血管环 90 min; Cariporide 对照组:用 $1 \mu\text{mol/L}$ Cariporide 孵育血管环 90 min。所有血管环经上述处理后,先加入去氧肾上腺素收缩至坪值并平稳后再加入累积浓度的 Ach 检测 EDR 反应。结束实验前再加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 SNP 以检测非内皮依赖性舒张反应。结果以最大舒张百分比(给药后血管环最大舒张百分率/给药前血管环最大舒张百分率)表示。

1.5 Cariporide 和晚期氧化蛋白产物对血管组织生物化学指标的影响

实验分 5 组:正常对照组; ④BSA 组(3 mmol/L BSA); ④AOPP-BSA 损伤组(3 mmol/L AOPP-BSA); Cariporide + AOPP-BSA 组(3 mmol/L AOPP-BSA + $1 \mu\text{mol/L}$ Cariporide); Cariporide 对照组($1 \mu\text{mol/L}$ Cariporide)。每组 8 个血管环(长 2 cm)。每 15 min 换液一次,培育 90 min 后,将血管环转到 1 mL 平衡盐(PSS)液(含 Ach $1 \mu\text{mol/L}$)中,30 min 后,将培养液和血管环收集,用于测定血管组织丙二醛、SOD 和培养液中的 NO。

1.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,半数有效浓度采用线性回归从量效反应曲线求出。各组间差异比较用单因素方差分析,双侧 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 晚期氧化蛋白产物对内皮依赖性舒张反应的影响

血管环与不同浓度 AOPP-BSA 孵育 90 min 后最大舒张反应比对照组明显减小(图 1),最大舒张百分率(maximal relaxation rate, E_{max})和半数有效浓度(half maximum effective concentration, EC_{50})显著升高(表 1)。

2.2 Cariporide 对晚期氧化蛋白产物抑制离体血管环内皮依赖性舒张反应的影响

用 0.01~1 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cariporide 与 3 mmol/L 的 AOPP-BSA 共同孵育血管环,能明显降低 AOPP-BSA 对血管内皮依赖性舒张反应的抑制。1 $\mu\text{mol/L}$ Cariporide 可逆转 AOPP-BSA 对血管环内皮依赖性舒张反应的损害(图 2)。Emax 较 AOPP-BSA 损伤组显著升高,EC₅₀ 较 AOPP-BSA 损伤组显著降低(表 1)。Cariporide 对 SNP 诱导的血管环非内皮依赖性舒张反应无明显影响(表 2)。

2.3 Cariporide 和晚期氧化蛋白产物对血管组织生物化学指标的影响

与正常对照组比较,AOPP-BSA 损伤组血管组织丙二醛含量增加,SOD 活性下降,NO 释放减少。经 Cariporide(1 $\mu\text{mol/L}$) 处理后,丙二醛含量下降,SOD 活性恢复,NO 的释放增多。与正常对照组比较,Cariporide 对照组和 BSA 组丙二醛含量、SOD 活性和 NO 的释放无改变(表 3)。

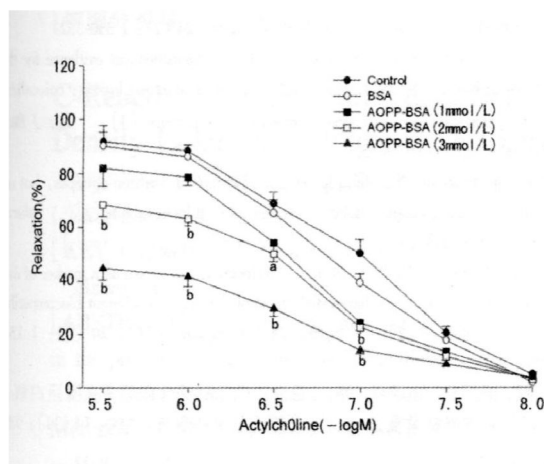


图 1. 晚期氧化蛋白产物对乙酰胆碱诱导的内皮依赖性舒张反应的影响 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

表 1. 晚期氧化蛋白产物和 Cariporide 对乙酰胆碱诱导的血管环最大舒张百分率和半数有效浓度的影响($n = 8$)

分 组	Emax	EC ₅₀ (nmol/L)
正常对照组	91.8% $\pm$ 6.1%	102.0 $\pm$ 11.4
BSA 组	90.1% $\pm$ 5.3%	106.0 $\pm$ 10.5
低浓度 AOPP-BSA 组	81.7% $\pm$ 6.6%	131.0 $\pm$ 12.6
中浓度 AOPP-BSA 组	67.3% $\pm$ 4.3% ^a	156.0 $\pm$ 12.8 ^a
高浓度 AOPP-BSA 组	44.8% $\pm$ 4.5% ^b	169.0 $\pm$ 14.2 ^b
Cariporide 对照组	90.7% $\pm$ 6.0%	104.0 $\pm$ 9.4
低剂量 Cariporide 组	53.5% $\pm$ 4.0%	152.0 $\pm$ 13.4
中剂量 Cariporide 组	64.5% $\pm$ 4.3% ^c	130.0 $\pm$ 13.1 ^c
高剂量 Cariporide 组	81.5% $\pm$ 6.2% ^d	109.0 $\pm$ 9.9 ^d

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与高浓度 AOPP-BSA 组比较。

表 2. Cariporide 对血管环非内皮依赖性舒张反应的影响

分 组	n	Emax
正常对照组	8	97.4% $\pm$ 7.8%
BSA 组	8	94.7% $\pm$ 6.3%
AOPP-BSA 损伤组	8	95.6% $\pm$ 7.5%
低剂量 Cariporide 组	8	96.3% $\pm$ 5.1%
中剂量 Cariporide 组	8	93.9% $\pm$ 6.5%
高剂量 Cariporide 组	8	96.5% $\pm$ 7.2%

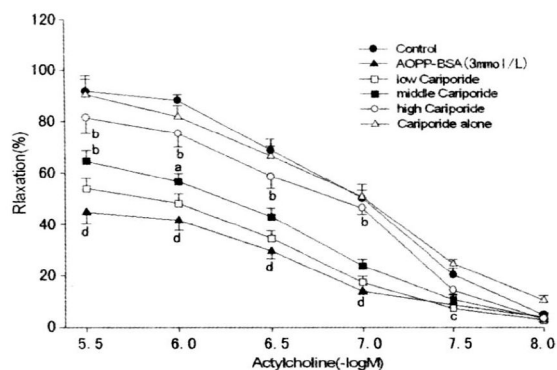


图 2. Cariporide 对晚期氧化蛋白产物抑制离体血管环内皮依赖性舒张反应的影响 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 AOPP-BSA (3 mmol/L) 组比较。

表 3. Cariporide 和晚期氧化蛋白产物对血管组织生物化学指标的影响 ($n = 8$)

分 组	丙二醛 ($\mu\text{mol/g}$)	SOD 活性 ($\mu\text{U/g}$)	NO (mmol/g)
正常对照组	4.3 $\pm$ 0.6	168 $\pm$ 23	0.93 $\pm$ 0.14
BSA 组	4.4 $\pm$ 0.5	166 $\pm$ 25	0.85 $\pm$ 0.13
AOPP-BSA 损伤组	7.5 $\pm$ 1.2 ^a	90 $\pm$ 15 ^a	0.51 $\pm$ 0.11 ^a
Cariporide+ AOPP-BSA 组	4.8 $\pm$ 0.7 ^b	147 $\pm$ 19 ^b	0.90 $\pm$ 0.10 ^b
Cariporide 对照组	4.6 $\pm$ 0.7	148 $\pm$ 30	0.86 $\pm$ 0.12

a 为 $P < 0.01$ 与对照组比; b 为 $P < 0.01$, 与 AOPP-BSA 损伤组比。

3 讨 论

在本研究中,我们发现大鼠离体胸主动脉血管环用 AOPP-BSA 培育 90 min 后,内皮依赖性舒张反应明显降低,NO 释放减少,但是 SNP(NO 的供体)诱导的非内皮依赖性舒张反应无变化。这表明 AOPP-BSA 抑制血管环内皮依赖性舒张反应主要是通过影响内皮 NO 释放所致,与平滑肌无关。而相同浓度的 BSA 没有影响血管内皮依赖性舒张反应。这些结果与文献报道的结果一致^[3]。此外,我们用不同剂量的 Cariporide 与 AOPP-BSA 共孵育血管环,发现 Cariporide 浓度依耐性地抑制 AOPP-BSA 对血管内皮

功能的损伤。同时 Cariporide 也显著促进了血管组织中 NO 的释放,说明 Cariporide 的保护作用可能与增加 NO 的合成和释放有关。

大量研究表明 AOPP 在 As 的发生、发展中起重要作用。AOPP 被认为不仅在结构上与晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)相似,而且具有与 AGE 相似的生物活性,如诱导促炎因子和粘附分子的表达^[5]。临床研究表明慢性肾功能减退患者血浆 AOPP 水平是 As 性心血管事件发生的重要危险因素^[6]。有文献报道^[7],AOPP 可诱导体外培养的人脐静脉内皮细胞产生活性氧,活性氧氧化能力极强,可激活核因子 κ B,引起脂质过氧化,使膜通透性增高,促进钙超载的发生,并参与一系列炎症性疾病的形成过程。Malle 等^[8,9]在人 As 斑块中发现有 AOPP 存在,同时在兔 As 模型中也得到证实。文献报道^[1,10],AOPP 的积累伴随有血浆抗氧化酶如谷胱甘肽过氧化物酶和 SOD 等的降低及活性氧的产生。此外,有研究报道 AOPP 也是冠心病和糖尿病血管并发症发生的重要危险因素之一^[11-13]。本研究也发现 AOPP-BSA 与离体血管环共孵育可致 SOD 明显降低及丙二醛升高。由此表明,AOPP 对血管内皮功能的损害是心血管疾病和慢性肾功能减退患者心血管并发症发生、发展的重要原因之一,其机制可能与氧化应激损伤有关。

虽然 AOPP 与心血管疾病之间的关系已经基本明确,但其机制尚不清楚。因此,本实验通过离体血管环来研究探讨 AOPP 损伤血管内皮的可能机制,并进一步寻找有效的保护药物。现已证实 NO 的合成减少和 NO 的降解增加是内皮功能紊乱的重要诱因,许多研究表明^[1,2,7],AOPP 的积累导致了大量氧自由基的产生,而这些氧自由基可加速 NO 的降解,形成有毒性的硝基过氧化物,从而导致血管内皮功能紊乱。这些研究都支持本实验结果。

文献报道降低肺血管内皮细胞 NHE-1 的活性能延缓氧化产物的生成^[14],NHE-1 抑制剂能逆转氧化引起的肝星形细胞丙二醛产生,其保护机制与抗氧化作用有关^[15]。研究表明,Cariporide 可明显保护离体鼠心脏的缺血再灌注损伤^[16]。Cariporide 通过抗氧化作用,减少氧化型低密度脂蛋白的产生,减少内皮细胞的损伤和抑制单核细胞向内膜下层的浸润,从而减少 As 的形成^[17]。本研究中我们发现 Car-

iporide 也能够抑制 AOPP-BSA 引起的 SOD 活性降低和丙二醛含量升高,表明 Cariporide 的保护作用可能与抗氧化作用有关。但其确切机制尚需进一步研究探讨。

[参考文献]

- [1] Kaneda H, Taguchi J, Ogasawara K, et al. Increased level of advanced oxidation protein products in patients with coronary artery disease [J]. *Atherosclerosis*, 2002, **162** (1): 221-225.
- [2] Witko-Sarsat V, Gausson V, Nguyen AT, et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism: a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients [J]. *Kidney Int*, 2003, **64** (1): 82-9.
- [3] Chen S, Liu L, Sun X, et al. Captopril restores endothelium-dependent relaxation induced by advanced oxidation protein products in rat aorta [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2005, **46** (6): 803-809.
- [4] Wang SX, Sun XY, Zhang XH, et al. Cariporide inhibits high glucose-mediated adhesion of monocyte-endothelial cell and expression of intercellular adhesion molecule-1 [J]. *Life Sci*, 2006 **79**: 1 399-404.
- [5] Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen KT, et al. Advanced oxidation protein products as a novel inflammation and monocyte activation in chronic renal failure [J]. *J Immunol*, 1998, **161** (5): 2 524-532.
- [6] Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients [J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, **45** (1): 39-47.
- [7] 袁方, 刘尚喜, 侯凡凡, 等. 晚期氧化蛋白产物导致血管内皮细胞氧化应激损伤[J]. 第一军医大学学报, 2004, **24** (2): 1 350-352.
- [8] Malle E, Waeg G, Schreiber R, et al. Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerosis lesions: colocalization of myeloperoxidase and hyperchlorite-modified proteins [J]. *Eur J Biochem*, 2000, **267**: 4 495-503.
- [9] Brisen JH, Hakkinen T, Malle E, et al. Patterns of oxidized epitopes, but not NF- κ B expression, change during atherogenesis in WHHL rabbits [J]. *Atherosclerosis*, 2003, **166**: 13-21.
- [10] Wu CC, Chen JS, Wu WM, et al. Myeloperoxidase serves as a marker of oxidative stress during single haemodialysis session using two different biocompatible dialysis membranes [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2005, **20** (6): 1 134-139.
- [11] 冯毅, 王积慧, 沈成兴, 等. 急性冠状动脉综合征患者血浆蛋白氧化产物升高的机制及意义[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, **14** (11): 983-985.
- [12] Martir-Gallan P, Carrascosa A, Gussinye M, et al. Biomarkers of diabetes-associated oxidative stress and antioxidant status in young diabetic patients with or without subclinical complications [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, **34**: 1 563-574.
- [13] 何德剑, 陈双秀, 李云峰. 蛋白氧化终产物与糖尿病血管并发症的关系[J]. 中国糖尿病杂志, 2007, **15** (9): 552-555.
- [14] Cutaia M, Kroczyński J, Tollefson K. pH-dependent oxidant production following inhibition of the mitochondrial electron transport chain in pulmonary endothelial cells [J]. *Endothelium*, 2002, **9**: 109-121.
- [15] Svegliati-Baroni G, Di Sario A, Casini A, et al. The Na⁺/H⁺ exchanger modulates the fibrogenic effect of oxidative stress in rat hepatic stellate cells [J]. *J Hepatol*, 1999, **30**: 868-875.
- [16] Wang P, Zaragoza C, Holman W. Sodium-hydrogen exchange inhibition and beta-blockade additively decrease infarct size [J]. *Ann Thorac Surg*, 2007, **83** (3): 1 121-127.
- [17] 刘立英, 文继舫, 涂江华, 等. Cariporide 对高脂饮食所致兔动脉粥样硬化的保护作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, **10** (1): 1-5.

(此文编辑 许雪梅)