

氨氯地平对实验性兔动脉粥样硬化进程中一氧化氮合酶——一氧化氮和血红素氧合酶——一氧化碳系统的影响

于清霞¹, 刘同涛², 孙春丽², 田庆印², 李博勤³

(1. 烟台市毓璜顶医院 ICU, 山东省烟台市 264000; 2. 山东大学齐鲁医院心内科,
3. 山东大学医学院电镜室, 山东省济南市 250012)

[关键词] 病理学与病理生理学; 动脉粥样硬化; 血红素氧合酶; 一氧化氮合酶; 一氧化氮; 一氧化碳; 氨氯地平; 免疫组织化学

[摘要] **目的** 探讨血红素氧合酶——一氧化碳和一氧化氮合酶——一氧化氮系统在动脉粥样硬化中的变化、相互关系及氨氯地平对动脉粥样硬化进程中血红素氧合酶——一氧化碳和一氧化氮合酶——一氧化氮的影响。**方法** 家兔予以高胆固醇饮食 8 周, 8 周后停用高胆固醇饮食或另外给予喂饲氨氯地平进行药物干预 8 周。**结果** 与对照组比较, 模型组血脂水平明显升高, 血清一氧化氮含量明显降低, 血浆一氧化碳水平明显升高, 血红素氧合酶 1 及诱导型一氧化氮合酶表达明显升高 (P 均 < 0.01)。与模型组比较, 氨氯地平组血浆胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇差异无显著性 ($P > 0.05$); 血清一氧化氮含量差异亦无显著性 ($P > 0.05$), 血浆一氧化碳水平明显降低 ($P < 0.01$), 血红素氧合酶 1 及诱导型一氧化氮合酶表达明显减少 ($P < 0.01$)。**结论** 动脉粥样硬化进程中, 血红素氧合酶——一氧化碳和一氧化氮合酶——一氧化氮系统显示出互补及代偿性调节作用, 氨氯地平可以通过下调血红素氧合酶——一氧化碳和一氧化氮合酶——一氧化氮系统而延缓动脉粥样硬化的进程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Amlodipine on Heme Oxygenase/Carbon Monoxide and Nitric Oxide Synthase/Nitric Oxide Systems in Atherosclerosis Model of Rabbits

YU Qing-Xia¹, LIU Tong-Tao², SUN Chun-Li², TIAN Qing-Yini², and LI Bo-Qin³

(1. Department of ICU Yantai yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China; 2. Department of Cardiology, Qilu Hospital of Shandong University; 3. Institute of histology and embryology, School of medicine of Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Atherosclerosis; Heme Oxygenase; Nitric Oxide Synthase; Nitric Oxide; Carbon Monoxide; Amlodipine; Immunohistochemistry

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the change rule and correlation of heme oxygenase 1 (HO-1)/carbon monoxide (CO) and nitric oxide synthase (NOS)/nitric oxide (NO) and the influence of amlodipine on the two systems in atherosclerotic progress.

Methods The rabbits received 1% cholesterol diet ($n = 16$) for eight weeks; after the eight weeks, one group ($n = 8$) were fed with normal diet for eight weeks and another group ($n = 8$) were administrated with amlodipine.

Results Compared with contrast group, in model group the levels of serum lipids and plasma carbon monoxide were increased obviously ($P < 0.01$); however, the levels of serum nitric oxide and the expression of heme oxygenase 1 and inducible nitric oxide synthase in aortic were decreased markedly ($P < 0.01$). Compared with model group, in amlodipine group the levels serum lipids and serum nitric oxide were no significant effects ($P > 0.05$), the levels of plasma carbon monoxide were decreased obviously ($P < 0.01$), while the expression of heme oxygenase 1 and inducible nitric oxide synthase in aortic reduced greatly ($P < 0.01$). **Conclusion** In atherosclerotic progress, between heme oxygenase 1 (HO-1)/carbon monoxide (CO) and nitric oxide synthase (NOS)/nitric oxide (NO) system appears the reciprocal relationship, and amlodipine may delay atherosclerotic progress by downregulate the two systems.

研究发现, 血管内皮及平滑肌细胞能产生内源性一氧化氮 (nitric oxide, NO) 及一氧化碳 (carbon monoxide, CO), 二者在动脉粥样硬化 (atherosclerosis,

As) 进程中具有重要作用^[1,2]。一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 是 NO 合成的关键酶, 有 3 个亚型, 即内皮型 NOS (endothelial NOS, eNOS)、神经元型 NOS (neuronal NOS, nNOS) 及诱导型 NOS (inducible NOS, iNOS)。nNOS 和 eNOS 一起称为结构型 NOS (constitutive nitric oxide synthase, cNOS); 血红素氧合酶 (heme oxygenase, HO) 是内源性 CO 的限速酶和关键酶, 有三种同工异构酶, 即 HO-1、HO-2 及 HO-3^[3]。

[收稿日期] 2007-12-25

[修回日期] 2008-06-25

[作者简介] 于清霞, 硕士, 主治医师, 主要研究方向为冠心病发病机制及防治, 联系电话为 13864531732, E-mail 为 yuqingxia2008@163.com。通讯作者刘同涛, 博士, 副教授, 主要研究方向为冠心病发病机制及防治, 联系电话为 0531-86650563, E-mail 为 liutongtao@medmail.com.cn。孙春丽, 博士, 主治医师。

本文通过动物试验观察了食饵性家兔主动脉诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)及血红素氧合酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达及 NO、CO 生成量的变化以及氨氯地平对 HO/CO 与 NOS/NO 系统的影响。

1 材料与方法

1.1 动脉粥样硬化模型的复制及动物分组

16 只新西兰雄性大白兔(购自山东省农业科学院), 饲以 120~140 g 普通饲料添加 1% 胆固醇粉 1 g/d(湖南华富制药有限公司), 于傍晚给药。16 只大白兔以胆固醇膳食 8 周后, 随机分为两组, 每组 8 只。模型组用普通饲料; 氨氯地平组, 每次氨氯地平(由陕西超群科技股份有限公司制药厂提供, 药品批号: 000518) 5 mg, 每日 1 次。每组继续给予普通饲料 120~140 g, 喂养 8 周。对照组(普通喂食对照组): 8 只新西兰大白兔, 给予普通饲料 120~140 g 喂养 16 周。

1.2 血脂测量过程及方法

于实验开始、8 周末、16 周末, 禁食 12 h 以上, 经耳缘静脉抽血, 然后采用沉淀漂浮酶联法检测总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDLC)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDLC)。

1.3 内源性一氧化碳含量的测定

于实验开始、8 周末、16 周末, 禁食 12 h 以上, 经耳缘静脉抽血, 然后应用文献[4]的方法检测一氧化碳复合物的含量。

1.4 血清一氧化氮含量的测定

于实验开始、8 周末、16 周末, 禁食 12 h 以上, 经耳缘静脉抽血, 然后应用硝酸还原酶法测定血清一氧化氮的含量, 测定的试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。

1.5 主动脉光镜标本制作

16 周末, 麻醉动物后迅速开胸, 暴露心脏, 采用冰生理盐水(4℃)充分灌洗心脏, 分离整个主动脉, 于主动脉弓下缘水平切取主动脉长约 1~2 cm, 剥除外膜结缔组织, 部分组织置入 10% 中性缓冲甲醛液中固定, 常规石蜡切片, HE 染色。

1.6 主动脉 α -actin、CD68、血红素氧合酶 1 及诱导型一氧化氮合酶的表达

采用免疫组织化学方法进行染色, 兔抗人 HO-1 多克隆抗体试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司

提供, 兔抗人 α -actin 单克隆抗体、兔抗人 CD68 单克隆抗体、兔抗人 iNOS 多克隆抗体试剂盒均由北京中山生物工程有限公司提供。并采用武汉同济医科大学清平公司软件 MPI-500 多媒体彩色病理图文分析系统对 HO-1 及 iNOS 的表达进行定量分析。

1.7 统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计软件整理、分析数据、数值变量以均数 \pm 标准差表示。两组间均数比较采用 Student's *t* 检验。同组用药前后均数比较采用配对 *t* 检验。双变量间作直线相关分析用 Pearson 法, 统计学显著性检验水准为 0.05(双侧)。

2 结果

2.1 血脂检测结果

与对照组比较, 模型组血脂水平明显升高($P < 0.01$), 氨氯地平干预组血浆 TC、TG、LDL、HDL 与模型组比较差异无显著性($P > 0.05$; 表 1)。

表 1. 实验各组血脂测定结果($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

指标	时间	对照组	模型组	氨氯地平组
TC	0 周	1.27 \pm 0.45	1.33 \pm 0.52	1.35 \pm 0.33
	8 周	1.33 \pm 0.55	12.15 \pm 4.37 ^a	12.01 \pm 2.88 ^a
	16 周	1.28 \pm 0.43	11.74 \pm 3.11 ^a	9.66 \pm 4.56 ^a
TG	0 周	0.76 \pm 0.27	0.73 \pm 0.21	0.73 \pm 0.19
	8 周	0.86 \pm 0.33	1.38 \pm 0.58 ^a	1.12 \pm 0.43 ^a
	16 周	0.85 \pm 0.44	1.28 \pm 0.36 ^a	1.04 \pm 0.31 ^a
HDLC	0 周	0.44 \pm 0.17	0.43 \pm 0.17	0.42 \pm 0.20
	8 周	0.45 \pm 0.19	0.38 \pm 0.21	0.43 \pm 0.22
	16 周	0.50 \pm 0.13	0.44 \pm 0.21 ^a	0.48 \pm 0.19
LDLC	0 周	0.74 \pm 0.23	0.79 \pm 0.21	0.78 \pm 0.25
	8 周	0.88 \pm 0.14	11.32 \pm 6.01 ^a	9.22 \pm 2.98 ^a
	16 周	0.95 \pm 0.25	9.34 \pm 2.88 ^a	8.89 \pm 3.42 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.2 血清一氧化氮测定结果

与对照组比较, 模型组血清 NO 含量明显降低($P < 0.01$), 用氨氯地平进行干预后血清 NO 含量与模型组比较差异无显著性($P > 0.05$; 表 2)。

2.3 血浆一氧化碳测定结果

与对照组相比较, 血浆 CO 水平明显升高($P < 0.01$), 用氨氯地平进行干预后血浆 CO 水平明显降低($P < 0.01$; 表 3)。

2.4 一氧化氮与一氧化碳的相关分析

血浆 CO 水平与血清 NO 含量在 8 周时($r =$

- 0.914, $P < 0.01$) 及 16 周时均呈负相关 ($r = -0.827, P < 0.01$)。

表 2. 氨氯地平对兔血清一氧化氮含量的影响($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol/L}$)

时间	对照组	模型组	氨氯地平组
0 周	97.19 ± 6.24	97.50 ± 2.70	98.44 ± 3.87
8 周	98.44 ± 7.24 ^b	72.50 ± 3.95 ^a	71.56 ± 5.72 ^a
16 周	99.06 ± 9.15 ^b	73.75 ± 1.02 ^a	78.44 ± 2.77 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

表 3. 氨氯地平对兔血浆一氧化碳含量的影响($\bar{x} \pm s$, mg/L)

时间	对照组	模型组	氨氯地平组
0 周	0.142 ± 0.084	0.134 ± 0.071	0.129 ± 0.086
8 周	0.135 ± 0.149 ^b	0.505 ± 0.030 ^a	0.499 ± 0.176 ^a
16 周	0.133 ± 0.152 ^b	0.490 ± 0.250 ^a	0.189 ± 0.115 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

2.5 大体病理学观察

16 周正常对照组兔主动脉内膜光滑, 无脂质沉积。As 模型组, 可见动脉内膜面有浅黄色斑块状突起, 散在或融合成片, 多分布于血管分叉周围, 其长轴多与主动脉长轴平行, 以主动脉弓部病变最重。16 周末药物治疗组斑块突起较 As 组减少(图 1)。

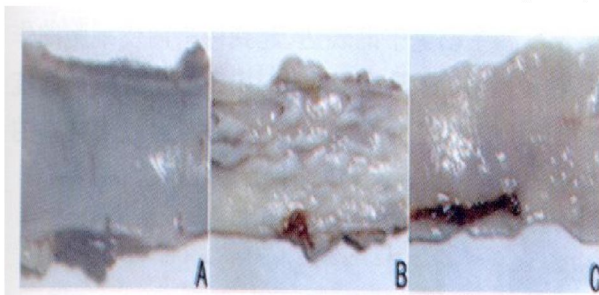


图 1. 兔主动脉的大体病理 A 为对照组, B 为模型组, C 为氨氯地平组。

2.6 免疫组织化学检测结果

巨噬细胞 CD68 染色阳性信号为细胞膜上的棕黄色颗粒, 平滑肌肌动蛋白 $\alpha\text{-actin}$ 染色阳性信号为细胞浆内的棕黄色颗粒。正常对照组兔主动脉内膜区未见明显 CD68 及 $\alpha\text{-actin}$ 阳性染色区, 但中膜可见 $\alpha\text{-actin}$ 广泛着色。模型组兔主动脉 CD68 阳性染色区广泛分布于显著增厚的整个内膜层, $\alpha\text{-actin}$ 阳性染色区增多但局限分布于内膜近管腔面的数层细胞范围内。用氨氯地平药物干预组兔主动脉 $\alpha\text{-actin}$ 阳性染色区显著低于模型组, 而 CD68 的阳性细胞数则明显少于模型组(图 2, 图 3)。

神经元型 NOS(iNOS) 的阳性染色主要位于中膜的平滑肌细胞胞浆内及内膜的巨噬细胞胞浆内, 呈

棕黄色颗粒。在正常对照组主动脉内膜及中膜呈阴性反应, 模型组主动脉内膜及中膜均可见呈条状及点片状的阳性染色区。用氨氯地平药物干预组兔主动脉内膜及中膜 iNOS 染色呈弱阳性(图 4)。

血红素氧合酶 1(HO-1) 的阳性染色主要位于内膜的内皮细胞胞浆内及中膜的平滑肌细胞胞浆内, 染色成棕色颗粒状或条状。在正常对照组主动脉内皮细胞内呈扭曲线状阳性反应, 在平滑肌细胞内呈阴性反应。在模型组主动脉内膜及内膜下有强阳性反应带, 中膜平滑肌内见灶片状强阳性。用氨氯地平药物干预组主动脉内皮细胞内可见阳性反应颗粒, 而中膜平滑肌内呈弱阳性或阴性(图 5)。

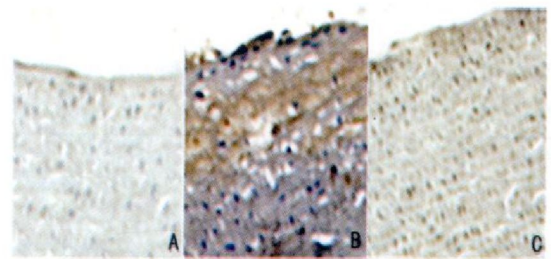


图 2. 主动脉 CD68 免疫组织化学染色结果($\times 400$) A 为对照组, B 为模型组, C 为氨氯地平组。

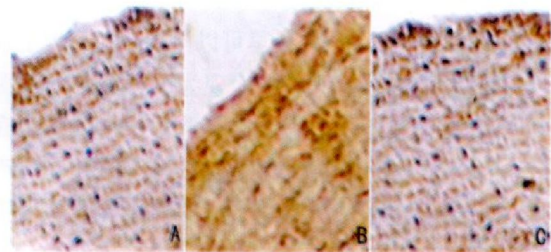


图 3. 主动脉 $\alpha\text{-actin}$ 免疫组织化学染色结果($\times 400$) A 为对照组, B 为模型组, C 为氨氯地平组。

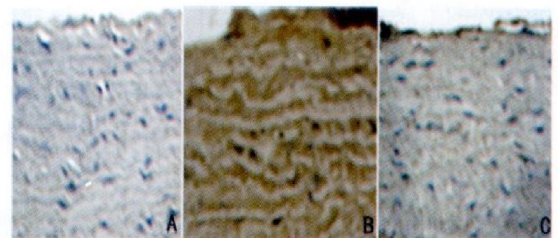


图 4. 主动脉内诱导型一氧化氮合酶的表达($\times 400$) A 为对照组, B 为模型组, C 为氨氯地平组。

2.7 主动脉血红素氧合酶 1 及诱导型一氧化氮合酶表达的定量检测

采用图像分析仪定量检测, 模型组血红素氧合

酶 1 及诱导型一氧化氮合酶表达明显高于其他各组 ($P < 0.01$), 氨氯地平组血红素氧合酶 1 及诱导型一氧化氮合酶表达低于模型组, 与模型组之间差异有显著性 ($P < 0.05$; 见表 4)。

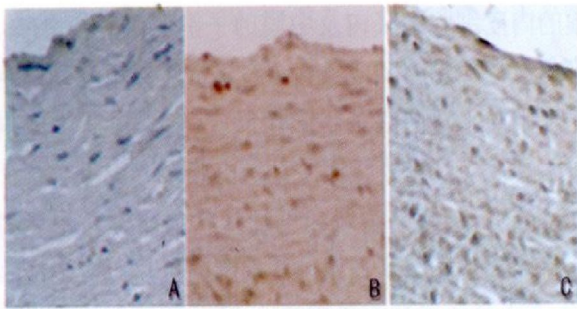


图 5. 主动脉内血红素氧合酶 1 的表达 ($\times 400$) A 为对照组, B 为模型组, C 为氨氯地平组。

表 4. 氨氯地平对兔主动脉血红素氧合酶 1 及诱导型一氧化氮合酶表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

分组	iNOS	HO-1
对照组	7.17 \pm 0.14	8.82 \pm 0.36
模型组	13.26 \pm 2.01 ^a	17.55 \pm 1.19 ^a
氨氯地平组	10.15 \pm 0.33 ^b	12.20 \pm 0.48 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

3 讨论

动脉粥样硬化 (As) 最早可以检测到的病理生理性改变是内皮功能障碍^[4]; 表现为生理性的内皮源性 NO 生成的缺乏。血管内皮细胞和平滑肌细胞在受到致病因子如高血脂、高血压的影响下, 可诱导产生 iNOS 并合成 NO, iNOS 产生的 NO 能参与并促进斑块的进程。CO 作为近年新发现的气体信号分子在生物体内的作用方式与 NO 相似, 主要通过激化可溶性鸟苷酸环化酶 (soluble guanylcyclase, sGC) 的亚铁血红素结合, 使其变构、激化, 增加环磷酸鸟苷 (cGMP) 的生成, 舒张血管平滑肌, 从而参与循环系统的调节。在缺氧和内皮损伤时, HO-1 的表达及 CO 的产生量大幅度提高, 可抑制诱导型一氧化氮合酶的产生及其活性, 减轻组织损伤, 部分取代 NO 的扩血管作用^[5-7]。

本实验通过高胆固醇饲料喂养造成食饵兔的高脂血症, 使血管内皮功能受损, 血清 NO 含量下降。而主动脉 iNOS 在 ox-LDL、炎性细胞因子等的诱导下表达增加。对实验所测得血浆 CO 水平及血清 NO 含量于 8 周时进行直线相关分析, 呈负相关。提示血清 NO 含量降低即血管内皮功能受损可代偿性使血浆 CO 水平升高。用第三代钙离子拮抗剂氨氯地

平进行干预治疗 8 周后 TC、TG、HDL 和 LDL 无明显改变; 血浆 CO 水平明显下降; 血清 NO 含量亦无明显变化; 免疫组织化学检查示兔胸主动脉 iNOS 和 HO-1 表达明显减弱。上述结果表明氨氯地平的抗 As 作用并非经降血脂起作用, 可能通过抗氧化、减少炎性因子及细胞因子的生成, 来抑制促 As 形成的 iNOS 在主动脉中的表达, 改善内皮功能来实现。在本研究中虽然代表内皮功能的血清 NO 含量无明显升高, 但对内皮功能障碍起代偿作用的 HO-1/CO 系统却呈下调趋势, 提示内皮功能可能较前改善; 血清 NO 含量无明显升高考虑可能机制为: NO 的合成过程中是以 L-精氨酸为底物, 在 NOS 作用下, 钙调蛋白/ Ca^{2+} 参与生成 L-肌氨酸及 NO。已有研究证实 iNOS 的异构体 cNOS 以 Ca^{2+} 浓度依赖方式使之激活。氨氯地平阻滞细胞 Ca^{2+} 通道, 影响细胞内 Ca^{2+} 水平, 从而影响作为 NO 合成限速因子 cNOS 的活性, 使 NO 合成减少, 降低血清 NO 水平。④启动 cNOS 的两种主要因素是血液的脉冲式流动和血流对血管的切应力。而氨氯地平具有降低血管张力的作用, 可通过反馈机制降低 cNOS 的基因表达, 减弱引起 NO 释放的启动刺激因素, 从而减少 NO 释放, 降低血清 NO 水平。

实验结果表明, 氨氯地平能够通过下调 HO-1 和 iNOS 在主动脉中的表达, 起到保护内皮细胞的作用, 对实验性 As 具有抑制作用。为氨氯地平的抗 As 机制的探索提供了新思路, 尚需要通过大样本的临床试验进一步观察和验证^[8]。

[参考文献]

- [1] Otterbein LE, Zuckerbraun BS, Haga M, et al. Carbon monoxide suppresses atherosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury [J]. *Nat Med*, 2003, 9 (2): 183-190.
- [2] Channon KM, Qian HS, Samuel EG. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury [J]. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Bio*, 2000, 20 (8): 1 873-881.
- [3] Masaharu, NNakayama, Kazuhiro, et al. Increased expression of heme oxygenase-1 and bilirubin accumulation in foam cells of rabbit atherosclerotic lesions [J]. *Arteriosclerosis Thrombosis Vasc Bio*, 2001, 21 (8): 1 373-377.
- [4] Chalmers AH. Simple, sensitive measurement of carbon monoxide in plasma [J]. *Clin Chem*, 1991, 37 (8): 1 442-445.
- [5] 邹燕, 李向平. 内皮性一氧化氮合酶抑制剂与血管内皮功能 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (2): 178-180.
- [6] 牟胶, 何作云, 王晓兵. 血红素氧合酶 1——一氧化碳和一氧化氮合酶——一氧化氮系统在动脉粥样硬化中的作用及相关研究 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, 13 (4): 401-404.
- [7] Visner GA, Kazemfar K, Agarwal A, et al. Rapamycin induces heme oxygenase-1 in human pulmonary vascular cells: implications in the antiproliferative response to rapamycin [J]. *Circulation*, 2003, 107 (6): 911-916.
- [8] Turgan N, Habif S, Kabaroglu CG. Effects of the calcium channel blocker amlodipine on serum and aortic cholesterol, lipid peroxidation, antioxidant status and aortic histology in cholesterol-fed rabbits [J]. *Biomed Sci*, 2003, 10 (1): 65-72.

(此文编辑 李小玲)