

[文章编号] 1007-3949(2010)18-02-0125-04

• 实验研究 •

褪黑素对内毒素血症大鼠胸主动脉诱导型 一氧化氮合酶活性的影响

邢邯英¹, 付玲娣¹, 野战鹰¹, 凌亦凌²

(1. 河北省人民医院老年病实验室, 河北省石家庄市 050051; 2. 河北医科大学病理生理教研室, 河北省石家庄市 050017)

[关键词] 褪黑素; 诱导型一氧化氮合酶; 脂多糖; 胸主动脉

[摘要] 目的 探讨诱导型一氧化氮合酶在褪黑素改善脂多糖诱导的体循环血管反应性失调中的作用。方法 实验分为溶剂对照组、脂多糖组、脂多糖+褪黑素组和褪黑素组。制备离体胸主动脉环,应用血管张力检测技术检测各组血管环在诱导型一氧化氮合酶抑制剂氨基胍、或非特异性一氧化氮合酶抑制剂 L-硝基精氨酸孵育前后对苯肾上腺素和乙酰胆碱的反应性变化;应用扫描电镜技术观察血管内皮超微形态学改变;酶法检测血管组织匀浆中诱导型一氧化氮合酶活性。结果 褪黑素可显著改善脂多糖诱导的胸主动脉对缩血管剂苯肾上腺素的低反应性;氨基胍孵育后,脂多糖组和脂多糖+褪黑素组对苯肾上腺素的收缩反应分别提高了 51.43% 和 24.53%, 差异有显著性 ($P < 0.01$);与脂多糖组比较,脂多糖+褪黑素组的诱导型一氧化氮合酶活性显著降低 ($P < 0.05$)。结论 褪黑素对诱导型一氧化氮合酶有一定的抑制作用,这可能是褪黑素改善内毒素血症大鼠的血管反应性失调的机制之一。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Melatonin on Inducible Nitric Oxide Synthase Activity in Thoracic Aorta of Endotoxemia Rats

XING Han-Ying, FU Ling-Di, YE Zhan-Ying and LING Yi-Ling

(Geriatric Key Laboratory, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 2 Department of Pathophysiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

[KEY WORDS] Melatonin, Inducible Nitric Oxide Synthase, Lipopolysaccharide, Thoracic Aorta

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of melatonin (MT) on the activity of inducible nitric oxide synthase in thoracic aorta of endotoxemia rats. **Methods** Sprague-Dawley rats were divided into four groups randomly: Vehicle group, Lipopolysaccharide (LPS) group (LPS 4 μg/g), LPS+MT group (MT 5 μg/g i.p.) which was given twice, one injected 30 min before LPS and the other injected 60 min after LPS (4 μg/g, i.p.), and MT group. Six hours after LPS injection, rats were killed and thoracic aortic rings were prepared. The contraction response to phenylephrine and the endothelium-dependent relaxation response to acetylcholine before and after the incubation of aminoguanidine and N^ω-nitro-L-arginine (L-NNA) were observed with the isolated artery rings technique. Inducible nitric oxide synthase activity in the artery tissues were detected. The ultrastructure of endothelium on the artery was observed by scanning electron microscope. **Results** Compared with LPS group, thoracic aortic rings in LPS+MT group exhibited an increased contraction response to phenylephrine. After incubation with aminoguanidine, the contractile response to phenylephrine increased significantly in LPS and LPS+MT group. Inducible nitric oxide synthase activity in LPS+MT group decreased markedly compared with that of LPS group in thoracic aorta. **Conclusion** The protective role of MT on vascular activity in endotoxemia may be due to its properties to inhibit inducible nitric oxide synthase in a certain degree.

在内毒素引起的病理改变中,内皮细胞及内皮衍生性舒张因子——一氧化氮((nitric oxide, NO)在调控血管反应性的过程中发挥重要作用。内毒素主要的致毒成分脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)可

诱导诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, NOS)过量表达,NO超量生成,使血管对活性物质的反应性发生改变,加重血管功能失调^[1,2]。褪黑素(melatonin, MT)是松果体分泌的一种吲哚类神经内分泌激素,根据已有资料强烈提示褪黑素是体内清除自由基和抗氧化成分之一^[3,4],对多种氧化性物质造成的机体组织损伤有保护作用。本课题组前期研究工作已证实褪黑素可以改善内毒素血症时主动脉血管反应性^[5],在此基础上我们拟观察内毒素血症时褪黑素对血管组织 NOS活性的影响,

[收稿日期] 2009-12-18 [修回日期] 2010-01-08

[作者简介] 邢邯英,博士,主治医师,主要从事血管病理生理学研究, E-mail为 xinghanying@yahoo.com.cn。付玲娣,主管技师,研究方向为休克的临床治疗, E-mail为 fukd2000@yahoo.com.cn。野战鹰,硕士,主治医师,研究方向为血管病理生理, E-mail为 yez33@tm.com。

探讨可能的作用机制,为褪黑素的临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

褪黑素,脂多糖,乙酰胆碱,氨基胍, N ω -硝基-L-精氨酸 (N ω -nitro-L-arginine, L-NNA) 均为 Sigma 公司产品,苯肾上腺素购于上海天丰制药厂,其余试剂为国产分析纯。

1.2 动物模型制备和分组

健康雄性 SD 大鼠,体重 230~260 g 由河北省实验动物中心提供。实验前禁食 12 h 不禁水。将大鼠随机分为 4 组: (1) 溶剂对照组: 腹腔注射生理盐水; (2) LPS 组: 腹腔注射 LPS 4 μ g/g (3) LPS+MT 组: MT 5 μ g/g (无水乙醇溶解,终浓度为 0.5%) 腹腔注射, 30 min 后 LPS 4 μ g/g 腹腔注射, 给予 LPS 后 60 min 再次给予 MT 5 μ g/g (4) MT 组: MT 5 μ g/g 腹腔注射, 90 min 后再次给予 MT 5 μ g/g。LPS 或生理盐水注射后 6 h 处死大鼠, MT 组第二次给药后 5 h 处死动物。各组大鼠在同样自然光照下饲养。本实验 MT 给药均在上午 8:30~10:00 之间完成。

1.3 扫描电镜下形态学观察

常规制备扫描电镜标本,扫描电镜观察各组胸主动脉血管内皮细胞的超微结构改变。

1.4 血管组织诱导型一氧化氮合酶活性测定

各组血管组织加 0.9% 生理盐水研磨 (10% 重量/体积),用电动匀浆器研磨过程中应置于冰中以降低温度。研成匀浆后, 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min, 取上清液进行 NOS 活性检测, 结果最终用蛋白浓度标化 (单位为 kU/g protein)。

1.5 血管环制备及血管环张力记录

动物麻醉后分离颈动脉放血处死。立即开胸, 仔细分离胸主动脉, 剪成约 3~4 mm 宽的胸主动脉环。应用离体血管张力检测技术观察各组血管环对 10^{-6} mol/L 苯肾上腺素的收缩反应和对 10^{-6} mol/L 乙酰胆碱的内皮依赖性舒张反应; 然后用 (1) NOS 抑制剂氨基胍 (10^{-4} mol/L); (2) 非特异性一氧化氮合酶抑制剂 L-NNA (10^{-4} mol/L) 分别孵育 20 min, 再加入 10^{-6} mol/L 苯肾上腺素、乙酰胆碱观察张力变化。对前一试剂的反应完成后, 用 KRB 液冲洗至张力回到基线后进行下一试剂的反应。实验结束后将血管环置于恒温干燥箱 (60~70 $^{\circ}$ C) 烘烤至重量不再变化, 记录干重, 用以标化张力。收缩反应结果

以 kg/g 干重表示, 舒张反应结果以占苯肾上腺素 (10^{-6} mol/L) 收缩值的百分比表示。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 给药前后行配对 *t* 检验, 组间差异用单因素方差分析, 差异有显著性进一步用 Newman-Kuels *q* 检验进行两两比较, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 扫描电镜观察结果

对照组内皮细胞形态规则, 排列整齐 (图 1A)。LPS 组动脉内皮细胞形态不规则, 大小不一, 细胞连接破坏严重 (图 1B)。LPS+MT 组内皮细胞形态接近对照组, 排列较整齐 (图 1C)。

2.2 血管组织诱导型一氧化氮合酶活性

与对照组相比, LPS 组 NOS 活性显著增加 ($P < 0.01$); LPS+MT 可降低主动脉 NOS 活性 (9.72 ± 1.62 , $P < 0.01$); MT 组与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 血管组织诱导型一氧化氮合酶活性 (kU/g 蛋白)

分 组	<i>n</i>	一氧化氮合酶活性
对照组	6	8.39 \pm 1.62
LPS 组	6	13.05 \pm 2.97 ^a
LPS+MT 组	8	9.72 \pm 1.62
MT 组	6	8.66 \pm 1.82

a 为 $P < 0.05$ 与其他 3 组比较。

2.3 褪黑素改善脂多糖诱导的血管反应性紊乱的机制探讨

胸主动脉血管环 LPS 组对苯肾上腺素的收缩反应较对照组减弱 ($P < 0.01$), 对乙酰胆碱的舒张反应与对照组比较虽有下降趋势, 但差异无显著性; LPS+MT 组对苯肾上腺素的收缩反应较 LPS 组明显增高 ($P < 0.01$), 但仍低于对照组 ($P < 0.05$)。MT 组反应性较对照组均无明显变化。 10^{-4} mol/L 氨基胍孵育 20 min 后, LPS 组和 LPS+MT 组对苯肾上腺素的收缩反应分别提高了 51.43% 和 24.53%, 收缩性较孵育前均显著增加 ($P < 0.01$), 两组增长百分比相比差异有显著性 ($P < 0.01$; 表 2); MT 组和对照组在孵育前后的收缩性和胸主动脉各组对 10^{-6} mol/L 乙酰胆碱舒张百分比在氨基胍孵育前后无显著改变 ($P > 0.05$; 表 3)。

10^{-4} mol/L L-NNA 预孵育 20 min 后, 各组血管

环对乙酰胆碱的舒张反应较孵育前明显减弱 ($P < 0.01$), 对苯肾上腺素的收缩反应较孵育前均显著增加 ($P < 0.01$)。

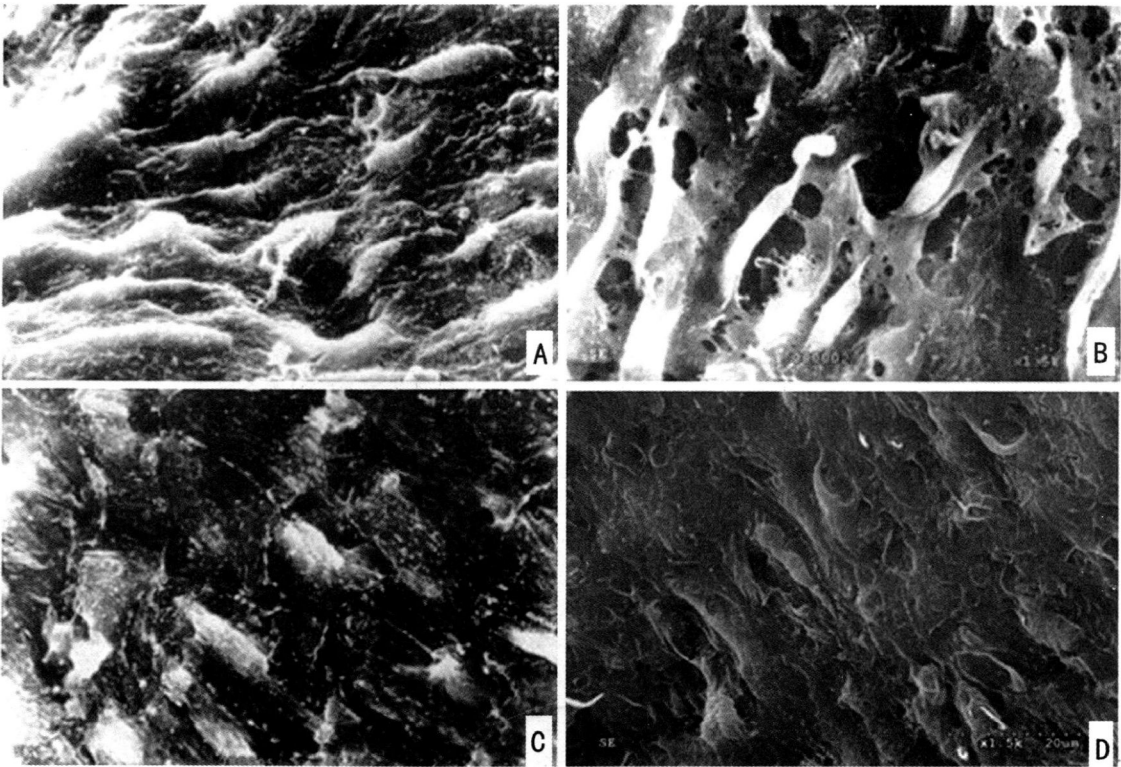


图 1 大鼠胸主动脉内皮细胞扫描电镜照片 (×1500) A 为对照组, B 为 LPS 组, C 为 LPS+MT 组, D 为 MT 组。

表 2 胸主动脉血管环孵育前后对 10^{-6} mol/L 苯肾上腺素的收缩反应 (kg/g)

分 组	n	孵育前	氨基胍孵育后	L-NNA 孵育后
对照组	6	0.75 ± 0.08	0.81 ± 0.13	1.08 ± 0.09 ^{de}
LPS 组	6	0.35 ± 0.09 ^b	0.53 ± 0.14 ^d	0.70 ± 0.11 ^{de}
LPS+MT 组	8	0.53 ± 0.10 ^{ac}	0.66 ± 0.12 ^d	0.81 ± 0.16 ^{de}
MT 组	6	0.69 ± 0.06	0.73 ± 0.13	1.03 ± 0.11 ^{de}

a 为 $P < 0.05$ b 为 $P < 0.01$ 与孵育前对照组比较; c 为 $P < 0.01$ 与孵育前 LPS 组比较; d 为 $P < 0.01$ 与同组孵育前比较; e 为 $P < 0.01$ 与同组氨基胍孵育后比较。

表 3 胸主动脉血管环孵育前后对 10^{-6} mol/L 乙酰胆碱的舒张反应

分 组	n	孵育前	氨基胍孵育后	L-NNA 孵育后
对照组	6	76.01% ± 9.70%	70.35% ± 13.72%	4.41% ± 3.18% ^{ab}
LPS 组	6	65.13% ± 12.03%	57.95% ± 16.98%	4.10% ± 4.22% ^{ab}
LPS+MT 组	8	65.06% ± 11.22%	57.10% ± 14.79%	2.08% ± 1.10% ^{ab}
MT 组	6	71.10% ± 15.29%	68.64% ± 19.65%	5.23% ± 1.88% ^{ab}

a 为 $P < 0.01$ 与同组孵育前比较; b 为 $P < 0.01$ 与同组氨基胍孵育后比较。

3 讨论

血管张力取决于血管收缩和舒张的平衡, 其中内皮源性舒张因子 NO 的重要作用逐渐被人们所认

识。目前普遍认为 NO 在调节血管舒缩中有双重作用。在正常生理状况下甚至内毒素血症早期, NO 主要由固有型一氧化氮合酶催化底物生成, 介导乙酰胆碱的舒血管效应, 在调控血管反应性上起到积极作用。内毒素血症中、晚期 LPS 可以诱导多种生物介质和细胞因子的释放, 如组胺、肿瘤坏死因子 α 、干扰素 γ ^[6,7] 等, 造成内皮细胞的损伤。同时 LPS 及肿瘤坏死因子等物质还可诱导 NOS 过量表达、NO 大量生成。本实验 LPS 组血管组织匀浆 NOS 活性较对照组明显增高, 而且血管环用 NOS 抑制剂氨基胍孵育后, 血管环收缩明显改变, 提示此时 NO 大量生成与 NOS 诱生相关。由 NOS 途径诱生的 NO 细胞毒性极大, 同时对体循环和肺循环血管反应性影响不同。本实验观察到主动脉 LPS 组收缩明显受损, 舒张较对照组虽有下降趋势, 但无统计学差异。LPS 对胸主动脉收缩性的影响以往研究报道趋于一致, 无论整体注射还是离体孵育均可引起胸主动脉对苯肾上腺素收缩反应呈时间、剂量依赖性下降。LPS 组血管环在用 NOS 选择性抑制剂氨基胍孵育后收缩明显增强说明 NOS 诱生的大量 NO 是导致血管对收缩剂反应性降低的重要原因。

以往对于内毒素血症时主动脉舒张情况报道不一。Donaldson等^[8]观察到 LPS 静脉注射不影响胸主动脉对乙酰胆碱的最大舒张反应。Mchtyre等^[9]在内毒素血症大鼠模型中观察到主动脉环的舒张受损,但是受损程度明显弱于肺动脉。不同的实验现象可能与所用 LPS 剂量及作用时间有关。

NOS 的诱生及 NO 的大量产生在内毒素血症时对血管反应性的负面影响促使人们寻找一氧化氮合成酶抑制剂,从减少 NO 异常生成的途径来遏制 LPS 的致病环节。早期对应用 NOS 抑制剂的疗效争论不一。目前倾向于使用 NOS 的选择性抑制剂如氨基胍等,通过抑制 NOS 的活性,使 NO 合成减少,对抑制内毒素血症时的血压下降和对 PE 的低反应性起到积极作用^[10]。本实验中主动脉 LPS 组用氨基胍孵育后也可证明此点,而非选择性 NOS 抑制剂虽然可增加血管的收缩反应,但却强烈抑制血管的舒张反应,实验中各组血管环用 L-NNA 孵育后,舒张反应强烈受抑,下降到十个百分点以下,这无疑对内毒素血症的治疗是不利的。有资料显示 MT 对 NOS 有选择性抑制作用^[11,12]。在本实验中 MT+LPS 组血管组织 NOS 含量较 LPS 组减少, LPS 组经选择性 NOS 抑制剂预处理后对苯肾上腺素的收缩反应与 LPS+MT 组氨基胍预处理前的反应性无明显差异,证明 MT 可抑制 NOS 活性。加用 MT 后主动脉收缩性并未减弱,说明 MT 同时对固有型一氧化氮合酶影响较小。LPS+MT 组的收缩性在氨基胍孵育前后仍有差异,可能是因为 MT 对 NOS 的抑制不是完全性之故。适量的 NO 对机体是有积

极意义的,而 MT 对 NOS 的不完全抑制可能正是 MT 对机体保护作用的体现。

[参考文献]

- [1] 赵晓云,凌亦凌,谷振勇,等. 内源性 CO/NO 在内毒素休克大鼠主动脉低收缩反应中的介导作用[J]. 山东大学学报(医学版), 2002, 40(2): 106-108
- [2] Takahashi Y, Nakano T, Wakabayashi I. Increased induction of inducible nitric oxide synthase expression in aortae of type 2 diabetes rats[J]. *J Pharmacol Sci* 2008, 107(2): 190-200
- [3] 舒毅,钟历勇,石立. 褪黑素和维生素 E 对早期糖尿病大鼠肾脏氧化应激的影响[J]. 东南大学学报(医学版), 2007, 26(4): 275-278
- [4] 胡曼丽,吴汉妮. 褪黑素对实验性糖尿病肾脏氧化应激的影响[J]. 医药导报, 2008, 27(12): 1443-445
- [5] 邢郁英,凌亦凌,孟爱宏,等. 褪黑素改善内毒素血症大鼠血管反应性[J]. 生理学报, 2005, 57(3): 367-372
- [6] Matsuda N, Hattori Y, Zhang XH, et al. Contractions to histamine in pulmonary and mesenteric arteries from endotoxaemic rabbits: modulation by vascular expressions of inducible nitric-oxide synthase and histamine H1-receptors[J]. *J Pharmacol Exp Ther* 2003, 307(1): 175-181
- [7] 李凝旭,李建军,李庚山,等. 细菌脂多糖诱导人外周血单核细胞肿瘤坏死因子 α 的合成及核因子 κ B 的活化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10(4): 320-323
- [8] Donaldson U, Myers AK. Effect of pharmacological agonists on contractile responses in aortic rings derived from endotoxaemic rats[J]. *J Vet Pharmacol Ther* 1996, 19(5): 389-396
- [9] Mchtyre RC, Sheridan B, Agrafojo J. Endotoxin differentially impairs cyclic guanosine monophosphate-mediated relaxation in the pulmonary and systemic circulation[J]. *Crit Care Med* 1997, 25(2): 318-323
- [10] 唐浩勋,樊寻梅,王雷. 地塞米松、氨基胍和氨力农对内毒素休克兔心血管系统作用的研究[J]. 小儿急救医学, 2005, 12(5): 360-362
- [11] 梅俏,于皆平,许建明,等. 褪黑素对结肠炎大鼠结肠内 NO 合酶和环氧合酶-2 含量的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2002, 16(4): 282-286
- [12] 张慧,张玉西. 褪黑素对高糖条件下牛主动脉内皮细胞 NOS 活性和 NOS mRNA 表达的影响[J]. 东南国防医药, 2007, 9(2): 95-97

(此文编辑 李小玲)