

烟草烟雾对大鼠胸主动脉硫化氢/胱硫醚- γ -裂解酶体系的影响

张涛^{1,2}, 张海涛¹, 刘朝中¹, 谈诚³, 黄丛春¹

(1. 空军总医院心内科, 北京市 100142; 2. 安徽医科大学, 安徽省合肥市 230032;

3. 中国航天员科研训练中心航天医学基础与应用国家重点实验室, 北京市 100094)

[关键词] 烟草烟雾; 胸主动脉; 硫化氢; 胱硫醚- γ -裂解酶

[摘要] **目的** 探讨烟草烟雾对大鼠胸主动脉硫化氢(H_2S)/胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)体系的影响。**方法** 以 10 周龄 SD 大鼠为研究对象, 随机分为对照组、短期吸烟组、中期吸烟组和长期吸烟组。采用烟草烟雾熏吸方法建立被动吸烟大鼠模型, 采用敏感硫电极法测定血清中 H_2S 浓度, 采用免疫组织化学染色和显微图像定量分析法观察胸主动脉平滑肌 CSE 的表达。**结果** 短期吸烟组血清 H_2S 浓度与对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 长期吸烟组、中期吸烟组血清 H_2S 浓度明显低于对照组和短期吸烟组 ($P < 0.01$), 长期吸烟组血清 H_2S 浓度明显低于中期吸烟组 ($P < 0.05$), H_2S 浓度随着烟草烟雾熏吸时间的延长而降低, 并呈时间依赖性。短期吸烟组胸主动脉 CSE 面积密度和光密度与对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 长期吸烟组、中期吸烟组胸主动脉 CSE 面积密度和光密度明显低于对照组和短期吸烟组 ($P < 0.05$), 长期吸烟组胸主动脉 CSE 面积密度和光密度明显低于中期吸烟组 ($P < 0.05$), CSE 的表达随着烟草烟雾熏吸时间的延长而降低, 并呈时间依赖性。**结论** 烟草烟雾可显著下调大鼠血清 H_2S 的浓度及胸主动脉中 CSE 的表达。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

Effect of Tobacco Smoke on Hydrogen Sulfide/Cystathionine- γ -Lyase System in Rat Thoracic Aorta

ZHANG Tao^{1,2}, ZHANG Hai-Tao¹, LIU Chao-Zhong¹, TAN Cheng³, and HUANG Cong-Chun¹

(1. Department of Cardiology, Air Force General Hospital, Beijing 100142, China; 2. Anhui Medical University, Anhui, Hefei 230032; 3. State Key Laboratory of Space Medicine Fundamentals and Application, China Astronaut Training and Research Center, ACC, Beijing 100094, China)

[KEY WORDS] Tobacco Smoke; Thoracic Aorta; Hydrogen Sulfide; Cystathionine- γ -Lyase

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of tobacco smoke on hydrogen sulfide (H_2S)/cystathionine- γ -lyase (CSE) system in rat thoracic aorta. **Methods** 10-week-old SD rats for the study were randomly divided into control group, short-term smoking group, mid-term smoking group and long-term smoking group. Passive cigarette smoking rat model was established by the method of tobacco smoked suction. The concentrations of H_2S in the serum was measured with sensitive sulfur electrode. The expression of CSE in the thoracic aortic smooth muscle was observed with the methods of immunohistochemical staining and quantitative microscopic image analysis. **Results** H_2S concentration between short-term smoking group and control group had no significant difference ($P > 0.05$). H_2S concentration of long-term smoking group and mid-term smoking group were respectively lower than that of the control group and short-term smoking group ($P < 0.01$). H_2S concentration of long-term smoking group was significantly lower than that of the mid-term smoking group ($P < 0.05$). The concentration of H_2S reduced with the extension of time of tobacco smoke suction and was time-dependent. The CSE expression in the thoracic aortic between short-term smoking group and control group had no significant difference ($P > 0.05$), expression in long-term smoking group and mid-term smoking group were respectively lower than in control group and short-term smoking group ($P < 0.05$), and in long-term smoking group was significantly lower than in the mid-term smoking group ($P < 0.05$). The CSE and SUR-2 expression reduced with the extension of

[收稿日期] 2011-12-12

[作者简介] 张涛, 硕士研究生, 主要从事动脉粥样硬化研究, E-mail 为 zt1982zt@163.com。张海涛, 博士, 副主任医师, 主要从事动脉粥样硬化研究。通讯作者刘朝中, 硕士, 主任医师, 主要从事动脉粥样硬化研究, E-mail 为 liu_chaozhong@sohu.com。

time of tobacco smoked suction, and was time-dependent. content in the rat serum and CSE expression in the rat thoracic aorta.

Conclusions Tobacco smoke can significantly lower H_2S

吸烟给人类健康带来巨大的危害,2011 年 WHO 全球烟草流行报告指出,目前每年因吸烟死亡的人数高达 600 万人,其中约 1/3 死于心、脑血管疾病。流行病学已经证实,吸烟是冠心病、高血压病主要危险因素之一^[1]。烟草烟雾中含有一氧化碳(CO)、尼古丁等多种有害物质,它们可以导致血管内皮功能紊乱,血管平滑肌细胞增殖,脂类代谢障碍,加速动脉血管粥样硬化,影响血管舒张功能,其具体机制仍未完全阐明^[2]。硫化氢(H_2S)是近年来继一氧化氮(NO)和 CO 之后发现具有其相似舒张血管功能但作用机制不同的新型气体信号分子^[3],在体内发挥着重要作用,在心血管中由 L-半胱氨酸在胱硫醚- γ -裂解酶(cystathionine- γ -lyase, CSE)的代谢下生成^[4]。烟草烟雾是否会对大鼠胸主动脉 H_2S /CSE 体系影响,本研究通过建立被动吸烟大鼠模型,采用敏感硫电极法研究烟草烟雾对血清中 H_2S 的影响,用免疫组织化学和显微图像分析法研究烟草烟雾对大鼠胸主动脉 CSE 的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

雄性 10 周龄 SD 大鼠 32 只,体重 200 ~ 250 g,由军事科学院实验动物中心提供,生产许可号为 SCXK-军-2007-004。一抗 CSE 小鼠抗大鼠单克隆抗体购于美国 Abgene 公司,二抗过氧化辣根酶 PV-6000G 购于北京中杉金桥生物公司;硫氢化钠(NaHS)购于 Sigma 公司;其他化学试剂为国产分析纯产品。

1.2 被动吸烟大鼠模型的建立

将 32 只雄性 SD 大鼠随机分为四组,每组 8 只:对照组在正常呼吸条件下饲养 90 天;短期吸烟组每天吸烟 20 支,连续 30 天;中期吸烟组每天吸烟 20 支,连续 60 天;长期吸烟组每天吸烟 20 支,连续 90 天。参照 Zheng 等^[5]的方法自制半封闭有机玻璃箱,将吸烟组大鼠放入箱中,点燃市场某种常见品牌香烟(烟气烟碱量 1.1 mg,焦油量 12 mg,烟气 CO 13 mg),用空气泵将烟草烟雾吹入箱中,每次 5 支香烟一起点燃,待香烟燃烧熄灭后,用空气泵吹入空气 10 min 进入箱中,然后再次点燃香烟,每天共点燃 20 支香烟。动物模型建立后,用 5% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉大鼠,从腹主动脉采血,4℃ 离心机

3000 r/min,离心 10 min,取血清用敏感硫电极法测血清 H_2S 浓度。

1.3 血清中 H_2S 的测定

采用敏感硫电极法测定血清 H_2S 浓度^[6],血清中的 H_2S 通常以 1/3 的 H_2S 气体和 2/3 的 NaHS 两种形式存在,在试管中加入大鼠血清和等体积的抗氧化液(NaOH 8 g,EDTA 7 g,去离子水 85 mL 配制或存储液,临用前加入抗坏血酸 10 g)混匀, H_2S 和 NaHS 与抗氧化液反应生成 S^{2-} ,在使用敏感硫电极(上海雷磁仪器厂)前用去离子水活化 2 h 以上,将活化好的敏感硫电极与参比电极一起浸入加有等体积抗氧化液的待测血清标本中,用 PHS-25 型离子计(上海雷磁仪器厂)测定硫离子含量;测定前用抗氧化液将硫离子标准液稀释成 1、10、20、40 及 80 $\mu\text{mol/L}$ 等浓度测定硫离子含量做标准曲线,然后根据标准曲线计算 H_2S 浓度,每次测完样品结束后,电极浸入去离子水中以保持其活化状态。

1.4 免疫组织化学法和显微图像定量法测定 CSE

取大鼠近心端胸主动脉用 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,切片(厚度 5 μm),60℃ 温箱烤 2 h,脱蜡(二甲苯浸泡 10 min,更换二甲苯再浸泡 10 min),水化(无水乙醇、95% 乙醇、70% 乙醇浓度梯度顺序各浸泡 5 min),PBS 液(NaCl 137 mmol/L, KCl 2.7 mmol/L, Na_2HPO_4 4.3 mmol/L, KH_2PO_4 1.4 mmol/L, pH7.2 ~ 7.4)洗 3 次,每次 5 min,加入 3% H_2O_2 室温 10 min 抑制内源性过氧化物酶活性,PBS 液洗 2 次,抗原修复(高压锅法修复),PBS 液洗 3 次,滴加 10% 山羊血清室温封闭 20 min 减少背景非特异性显色,滴加一抗(效价比 1:200)放入 37℃ 温箱 1 h,PBS 液洗 3 次,再加二抗 37℃ 温箱 1 h,PBS 洗 3 次,DAB 显色 3 min,蒸馏水冲洗终止显色,苏木素复染,盐酸酒精分化,脱水,透明,封片,镜检,阳性指标为棕褐色。本研究设置胸主动脉阴性对照(PBS 液代替 CSE 一抗,其余步骤同上),每张片子 400 倍镜下随机采图 5 张,采用 CMIAS 多功能真彩色医学图像分析系统对 CSE 蛋白表达进行定量分析,测其面积密度(面积密度 = 阳性目标的面积/场总面积 $\times 100$)和光密度^[7]。

1.5 统计学方法

所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用单因素方差中 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清中 H₂S 浓度

短期吸烟组血清 H₂S 浓度与对照组比较无统计学差异($P > 0.05$),中期吸烟组和长期吸烟组血清 H₂S 浓度明显低于对照组和短期吸烟组($P < 0.01$),长期吸烟组血清 H₂S 浓度明显低于中期吸烟组($P < 0.05$),血清 H₂S 浓度随着烟草烟雾熏吸时间的延长而降低,并呈时间依赖性(表 1)。

2.2 大鼠胸主动脉 CSE 的表达

CSE 在大鼠胸主动脉中的阳性表达物为棕褐色。对照组和短期吸烟组大鼠胸主动脉中有大量 CSE 表达,中期吸烟组大鼠胸主动脉中有中量 CSE 表达,长期吸烟组大鼠胸主动脉中有少量 CSE 表

达,且对照组、短期吸烟组、中期吸烟组和长期吸烟组 CSE 阳性表达物递减,阴性对照组大鼠胸主动脉中无 CSE 阳性表达物(图 1)。

表 1. 各组血清中 H₂S 浓度

分 组	<i>n</i>	H ₂ S(μmol/L)
对照组	8	20.88 ± 1.25
短期吸烟组	8	20.13 ± 1.13
中期吸烟组	8	18.25 ± 1.03 ^{ab}
长期吸烟组	8	16.75 ± 1.28 ^{abc}

a 为 $P < 0.01$,与对照组相比;b 为 $P < 0.01$,与短期吸烟组相比;c 为 $P < 0.05$,与中期吸烟组相比。

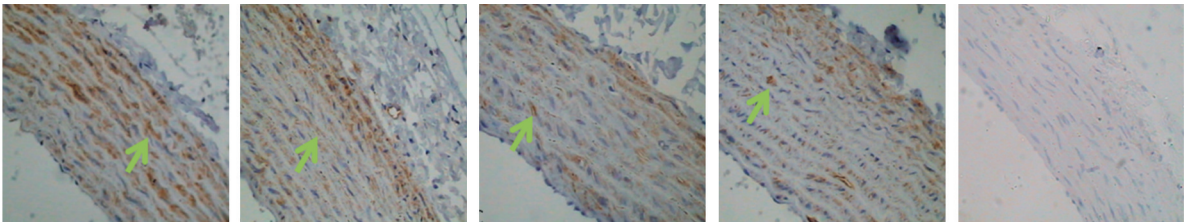


图 1. 免疫组织化学染色检测 CSE 的表达(×400) 从左至右为对照组、短期吸烟组、中期吸烟组、长期吸烟组、阴性对照组。

Figure 1. Immunohistochemical staining detected the expression of CSE

2.3 大鼠胸主动脉 CSE 的面积密度和光密度改变

短期吸烟组大鼠胸主动脉 CSE 的面积密度和光密度与对照组比较无统计学差异($P > 0.05$),中期吸烟组和长期吸烟组大鼠胸主动脉 CSE 的面积密度和光密度明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),长期吸烟组大鼠胸主动脉 CSE 的面积密度和光密度明显低于短期吸烟组($P < 0.05$)。CSE 的表达随着烟草烟雾熏吸时间的延长而降低,并呈时间依赖性(表 2)。

表 2. 胸主动脉 CSE 的面积密度和光密度

Table 2. CSE area density and optical density of rat thoracic aorta

分 组	<i>n</i>	面积密度	光密度
对照组	8	14.98 ± 2.32	0.21 ± 0.03
短期吸烟组	8	12.30 ± 1.68	0.20 ± 0.01
中期吸烟组	8	9.37 ± 0.59 ^a	0.17 ± 0.02 ^a
长期吸烟组	8	6.79 ± 1.04 ^{bc}	0.15 ± 0.04 ^{bc}

a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与对照组相比;c 为 $P < 0.05$,与短期吸烟组相比。

3 讨论

H₂S 是近年来发现的新型气体信号分子,具有和 NO、CO 相似舒张血管功能,但其作用机制不同。研究表明,NO 和 CO 主要通过激活血管平滑肌细胞内的 cGMP 途径来舒张血管,而 H₂S 主要作用于血管平滑肌细胞 K_{ATP}通道,增加 K_{ATP}通道电流,使血管平滑肌细胞膜超级化,抑制 Ca²⁺内流,引起血管平滑肌舒张^[8]。NO 舒张血管功能的作用已被广泛应用于临床,对冠心病的治疗,增加冠状动脉血流,抑制血管平滑肌细胞增殖等,发挥着重要的作用^[9]。相关基础研究发现,H₂S 能够下调丝裂素活化蛋白激酶途径,减少内皮素释放,抑制内皮素诱导的血管平滑肌细胞增殖,并呈浓度依赖性^[10];H₂S 能够扩张心脏冠状动脉,增加心肌血流,减少心肌缺血损伤,抑制细胞色素 C 氧化酶,降低组织器官的氧化磷酸化,减少 ATP 消耗,保护心肌功能,减少心肌细胞凋亡^[11],H₂S 在心血管系统的调节中发挥着重要作用。

吸烟对心血管系统的损害已被流行病学证实呈高度相关性^[1],烟草烟雾中主要的有害物质是尼古

丁、CO、烟焦油。尼古丁可增加成纤维细胞因子释放,使血管平滑肌细胞增殖,影响血管舒张功能^[12]; CO与红细胞中血红蛋白结合,生成碳氧合血红蛋白,使红细胞失去正常运输氧气的能力,导致机体慢性缺氧,产生大量的氧自由基和炎性因子释放^[13]; 烟焦油含有多种已知和未知有害有机溶解物,它们可以导致血管内皮功能紊乱、脂类代谢紊乱、加速动脉粥样硬化,影响血管平滑肌舒张功能^[14],烟草烟雾对心血管平滑肌的损害机制未完全阐明。 H_2S 在心血管中由L-半胱氨酸在CSE代谢下生成^[5],然而烟草烟雾是否会对心血管中 H_2S 生成产生影响,是否会抑制大鼠胸主动脉中CSE的含量,目前尚未见报道。

本研究采用烟草烟雾熏吸法成功建立被动吸烟大鼠模型,大鼠胸主动脉中CSE的免疫组织化学染色和显微图像定量分析检测结果表明,烟草烟雾抑制大鼠胸主动脉中CSE的表达,并随着烟草烟雾熏吸的时间增长而减少,呈时间依赖性,可能是烟草烟雾中的有害物质抑制血管平滑肌、内皮细胞功能,从而使CSE生成障碍的主要机制之一。本研究同时采用敏感硫电极法检测血清中 H_2S 浓度,结果发现烟草烟雾可以显著减少血清中 H_2S 浓度,并随着熏吸的时间增长而减少,呈时间依赖性,其机制可能与烟草烟雾使血管平滑肌及内皮细胞中产生 H_2S 的关键酶—CSE的含量减少,从而导致 H_2S 生成减少。Chen等^[15]临床研究发现,吸烟者血清中 H_2S 的含量明显低于不吸烟者,这与本研究结果一致。

综上所述,本研究结果表明烟草烟雾可以导致大鼠血清中 H_2S 生成减少和胸主动脉中CSE含量降低。但如何逆转这一进程,预防烟草烟雾对心血管机能的进一步损害将是我们今后研究更为重要的课题。

[参考文献]

- [1] WHO. WHO report on the global tobacco epidemic[M]. Geneva: WHO, 2011.
- [2] Guo X, Oldham MJ, Kleinman MT, et al. Effect of cigarette smoking on nitric oxide, structural, and mechanical properties of mouse arteries[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291 (5): H2 354-361.

- [3] Kamoun P. Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals[J]. Amino Acids, 2004, 26 (3): 243-254.
- [4] Wang R. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter [J]? FASEB J, 2002, 16 (13): 1 792-798.
- [5] Zheng H, Liu Y, Huang T, et al. Development and characterization of a rat model of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by sidestream cigarette smoke [J]. Toxicol Lett, 2009, 189 (3): 225-234.
- [6] 耿彬, 杜军保, 唐朝枢. 敏感硫电极法在测定心血管组织细胞及血浆胱硫醚- γ -裂解酶/硫化氢的应用[J]. 北京大学学报(医学版), 2005, 37 (5): 545-548.
- [7] 孙颖, 李敏, 王翠英, 等. 非诺贝特对载脂蛋白E基因敲除小鼠动脉组织CXCL16表达的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (3): 203-207.
- [8] Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener [J]. EMBO J, 2001, 20 (21): 6 008-016.
- [9] Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, et al. Nitric oxide and cardiac function[J]. Life Sci, 2007, 81 (10): 779-793.
- [10] Du J, Hui Y, Cheung Y, et al. The possible role of hydrogen sulfide as a smooth muscle cell proliferation inhibitor in rat cultured cells [J]. Heart Vessels, 2004, 19 (2): 75-80.
- [11] Zhu YZ, Wang ZJ, Ho P, et al. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats [J]. J Appl Physiol, 2007, 102 (1): 261-268.
- [12] Cucina A, Sapienza P, Corvino V, et al. Nicotine-induced smooth muscle cell proliferation is mediated through b-FGF and TGF-beta 1 [J]. Surgery, 2000, 127 (3): 316-322.
- [13] Zevin S, Saunders S, Gourlay SG, et al. Cardiovascular effects of carbon monoxide and cigarette smoking [J]. J Am Coll Cardiol, 2001, 38 (6): 1 633-638.
- [14] Zhang JY, Cao L, Zheng XH, et al. Dimethylsulfoxide-soluble smoking particles and nicotine affect vascular contractility[J]. Arch Pharm Res, 2009, 32 (10): 1 475-481.
- [15] Chen YH, Yao WZ, Geng B, et al. Endogenous hydrogen sulfide in patients with COPD [J]. Chest, 2005, 128 (5): 3 205-211.

(此文编辑 文玉珊)