

有氧运动抑制老年高血压大鼠血管功能重塑的氧化应激机制

叶芳, 吴迎, 曾凡星, 石丽君

(北京体育大学运动与体质健康教育部重点实验室, 北京市 100084)

[关键词] 有氧运动; 老年高血压; 血管内皮功能; 氧化应激

[摘要] **目的** 研究有氧运动对老年自发性高血压大鼠(SHR)内皮功能的影响,探讨氧化应激在其中的作用机制。**方法** 实验选用 24 只 16 月龄雄性 SHR 大鼠,随机分为高血压安静组(SHR-C, $n=12$)、高血压运动组(SHR-EX, $n=12$);选用 24 只同龄雄性正常血压大鼠(WKY),随机分为正常血压安静组(WKY-C, $n=12$)、正常血压运动组(WKY-EX, $n=12$)。运动组以 16~18 m/min 进行 8 周跑台运动(0° slope, 5 d/w, 60 min/d),安静组不进行任何运动干预。8 周训练末进行血压测定、离体肠系膜动脉张力测定、氧化应激相关指标和一氧化氮(NO)含量检测。**结果** SHR-EX 组收缩压显著低于 SHR-C 组($P<0.05$),而 WKY-EX 组收缩压与 WKY-C 组无显著性差异($P>0.05$)。SHR-C 组血清丙二醛(MDA)含量($11.8\pm 1.0 \mu\text{mol/L}$)显著高于 WKY-C 组($7.2\pm 0.3 \mu\text{mol/L}$, $P<0.05$),而 SHR-EX 组血清丙二醛(MDA)含量($7.9\pm 0.3 \mu\text{mol/L}$)显著低于 SHR-C 组($P<0.05$);各组间主要的抗氧化酶谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化物歧化酶没有显著差异($P>0.05$)。SHR-C 组 NE 诱发的血管收缩反应($153.2\pm 1.9 \%K_{\text{MAX}}$)显著高于 WKY-C 组($120.2\pm 5.6 \%K_{\text{MAX}}$, $P<0.05$),SHR-EX 组 NE 诱发的血管收缩反应($136.0\pm 1.8 \%K_{\text{MAX}}$)显著低于 SHR-C 组($P<0.05$),但 WKY-EX 组 NE 诱发的血管收缩反应($143.9\pm 4.3 \%K_{\text{MAX}}$)仍显著高于 WKY-C 组($P<0.05$);SHR-C 组内皮依赖性血管舒张($50.2\pm 2.8 \%NE$)显著小于 WKY-C 组($100.1\pm 0.6 \%NE$, $P<0.05$),SHR-EX 组内皮依赖性血管舒张($97.0\pm 1.5 \%NE$)显著高于 SHR-C 组($P<0.05$)。离体微血管环加入 NADPH 氧化酶抑制剂 Apocynin 预孵育 15 min 后,SHR-C 组血管内皮最大舒张($98.6\pm 1.3 \%NE$)显著增高($P<0.05$)。SHR-C 组 NO 依赖性血管舒张($25.5\pm 2.3\%$)显著低于 WKY-C 组($85.2\pm 0.7\%$, $P<0.01$),SHR-EX 组和 WKY-EX 组 NO 依赖性血管舒张($86.8\pm 3.4\%$ 和 $98.8\pm 1.5\%$)显著高于对应的安静组($P<0.05$)。**结论** 长期有氧运动抑制由衰老和/或高血压诱导的氧化应激水平增高、NO 生物利用度降低,进而改善血管内皮功能障碍。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The oxidative stress mechanism underlying aerobic exercise induced endothelium functional remodeling in elderly hypertensive rats

YE Fang, WU Ying, ZENG Fan-Xing, SHI Li-Jun

(Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

[KEY WORDS] Aerobic exercise; Elderly hypertension; Vascular endothelial function; Oxidative stress

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of aerobic exercise on endothelial function in elderly spontaneously hypertensive rats (SHR), and the oxidative stress mechanism. **Methods** Sixteen-month-old male spontaneously hypertensive rats ($n=24$) and male Wistar Kyoto rats (WKY, $n=24$) with the same age were selected. Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats were randomly assigned to sedentary control groups (WKY-C and SHR-C) and exercise-trained groups (WKY-EX and SHR-EX), separately. The animals in exercise-trained groups ran on a motor treadmill (0° slope, 5 d/w, 60 min/d) at 16~18 m/min for 8 weeks. Blood pressure was examined by non-invasive methods, isolated vessel rings were applied to evaluate vasomotor response, plasma samples were used for measurement of NO level and relative oxidative stress markers. **Results** The systolic blood pressure was significantly lower in SHR-EX

[收稿日期] 2016-10-26

[修回日期] 2017-04-29

[基金项目] 中央高校基本科研业务费专项基金项目资助(2015ZD008);国家体育总局全民健身领域课题项目(2015B035)

[作者简介] 叶芳,博士研究生,研究方向为运动和心血管生理学,E-mail 为 15600612858@163.com。通讯作者石丽君,教授,博士研究生导师,研究方向为运动和心血管生理学,E-mail 为 l_j_shi72@163.com。

group than that in SHR-C group ($P < 0.05$). Serum malondialdehyde (MDA) in SHR-EX group ($7.9 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$) was lower than that in SHR-C group ($11.8 \pm 1.0 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$), serum MDA in SHR-C group was significantly higher than that in WKY-C group ($7.2 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$). Antioxidant enzymes including glutathione peroxidase (GSH-PX) and superoxide dismutase (SOD), however, there was no significant difference between four groups. Exercise had significant changes of NE-induced vascular contraction in SHR (SHR-EX; $136.0 \pm 1.8 \%K_{\text{MAX}}$; SHR-C; $153.2 \pm 1.9 \%K_{\text{MAX}}$, $P < 0.05$). Compared with SHR-C group, NE-induced vascular constriction in WKY-C group ($120.2 \pm 5.6 \%K_{\text{MAX}}$, $P < 0.05$) were significantly lower, and that in WKY-EX group ($143.9 \pm 4.3 \%K_{\text{MAX}}$) were significantly higher than that in WKY-C group ($P < 0.05$). Endothelium-dependent vasodilation in SHR-C group ($50.2 \pm 2.8 \%NE$) was significantly lower than that in WKY-C group ($100.1 \pm 0.6 \%NE$, $P < 0.05$), endothelium-dependent vasodilation in SHR-EX group ($97.0 \pm 1.5 \%NE$) was significantly higher than that in SHR-C group ($P < 0.05$). After 15 min incubation with NADPH oxidase inhibitor Apocynin in vitro, endothelium-dependent vasodilation in SHR-C group ($98.6 \pm 1.3 \%NE$) significantly increased. NO-dependent vasodilation in SHR-C group ($25.5\% \pm 2.3\%$) was significantly lower than that in WKY-C group ($85.2\% \pm 0.7\%$, $P < 0.01$), NO-dependent vasodilation in SHR-EX ($86.8 \pm 3.4\%$) and WKY-EX ($98.8 \pm 1.5\%$) was significantly higher than the corresponding control group ($P < 0.05$).

Conclusion Long-term aerobic exercise inhibits the increase of oxidative stress and the decrease of NO bioavailability induced by aging and/or hypertension and improves vascular endothelial dysfunction.

氧化应激是一种氧化水平与抗氧化水平的失衡状态,导致活性氧蓄积而引起氧化损伤。活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)包括超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢,主要源自 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶、线粒体呼吸链酶复合体等^[1]。不同的氧化应激程度对机体会产生不同的影响。在氧化应激严重的条件下,可能会导致大分子如 DNA、脂质、蛋白质的改变和破坏,甚至危及到细胞死亡和组织损伤^[2]。然而,在适宜程度的氧化应激状态下,机体还可以产生一些适应性变化,有益于细胞生存,保护细胞抵御大面积的氧化损伤和细胞死亡^[3-4]。ROS 是信号传递的调控介质,对细胞发挥正常功能起到关键作用,太低的氧化物水平并不利于身体健康,所以过高的抗氧化酶含量并不利于 ROS 介导的生理进程,影响细胞功能的正常发挥^[5]。

无论是动物模型还是人体实验,高血压模型中心血管系统都伴随着氧化应激水平增加^[6]。有研究表明,运动可以改善高血压氧化应激水平,有利于血管结构与功能的重塑^[7-8]。此外,衰老也伴随着氧化应激的产生,诱导血管结构和功能产生改变,表现为血管结构重塑、血管弹性下降、内皮功能障碍^[9-10]。我们前期关于运动与衰老之间关系的研究表明,有氧运动可以逆转衰老所伴随的肠系膜动脉平滑肌上 MaxiK 通道的 α 和 β 亚基的不平行性下调,从而改善衰老所致的血管舒张功能下降。有研究表明,当机体长期进行中等强度运动训练,无论对于青年大鼠还是老年大鼠都可以增加 ROS 的产生及提高抗氧化水平的能力。所以,适宜强度的

有氧运动对高血压或衰老伴随的氧化应激水平均可发生逆转,改善血管功能。增龄是高血压发生的独立危险因素,而运动、衰老和高血压都是氧化应激的诱因,使机体产生 ROS。那么,运动对老年高血压大鼠所产生的氧化应激对机体是正向还是负向作用至今尚不明确。本实验以老年高血压大鼠作为研究对象,观察有氧运动对老年高血压大鼠氧化应激水平和血管功能的影响,为有氧运动有效治疗老年人心血管疾病提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

实验选用 24 只 16 月龄雄性原发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 与 24 只 16 月龄雄性正常血压大鼠 (Wistar Kyoto, WKY), 体重约 400 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供。将 SHR、WKY 分别随机分为高血压安静组 (SHR-C, $n = 12$)、高血压运动组 (SHR-EX, $n = 12$) 和正常血压安静组 (WKY-C, $n = 12$)、正常血压运动组 (WKY-EX, $n = 12$)。在饲养过程中,饲养室温约 22°C ,湿度保持在 $40\% \sim 45\%$,国家标准啮齿类动物饲料,单笼饲养,自由饮食,12:12 昼夜节律人工控制光照(光照时间为 6:00~18:00)。

1.2 运动方案

运动组的实验方案:以坡度 0° 、跑速 10 m/min 、 15 min/d 、 5 d/w 进行 1 周适应性训练。8 周正式跑台训练方案:坡度 0° ,跑速 $16 \sim 18 \text{ m/min}$ ($55\% \sim 65\% \text{ VO}_{2\text{max}}$), 60 min/d 、 5 d/w ,安静组不进行任何

运动干预^[11]。确定最大摄氧量实验方法:大鼠进行递增运动跑台实验,以每 3 min 增加 5 m/min 的速度进行跑台运动直至力竭^[12-13]。

1.3 体重、血压测量

8 周运动结束,测量大鼠血压、体重。应用大鼠智能无创血压计(BP-2010A,软隆科技有限公司,日本)间接无创测量大鼠血压。

1.4 肠系膜动脉血管环制备

8 周运动结束,大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg),麻醉后迅速取出肠系膜组织,置于 4℃ Na-Hepes 缓冲液的平皿中。选取一小段含肠系膜动脉零级及其分支的血管,固定于含有 4℃ Na-Hepes 缓冲液的胶皿。在体视显微镜下轻轻剥离肠系膜动脉上的脂肪组织,暴露出肠系膜动、静脉,去除静脉后剪取 4 段约 1.5 mm 长的三级肠系膜动脉备用。为保证血管活性,全程杜绝牵扯。将两根 1.5 cm 左右长的钨丝穿进备好的三级肠系膜动脉管腔中,并固定在离体微血管环张力测定仪浴槽中。一根钨丝固定在微调标尺上,另一根与张力换能器相连。浴槽中加入 5 mL Na-Hepes (pH = 7.4, 37℃),并向浴液内通以 95%O₂+5%CO₂ 的混合气体,平衡 20 min,使血管基础张力维持在 0.8 mN 左右。平衡后,动脉血管环浴槽中加入 60 mmol/L KCl 进行预收缩,达到收缩平台后用 5 mL Na-Hepes 洗脱 3 次。等到血管环张力稳定在 0.8 mN,依次进行以下步骤,注意每次舒张反应结束后进行 Na-Hepes 洗脱 3 次,并保证下次给予血管药物刺激前血管环张力稳定在 0.8 mN:①加入去甲肾上腺素(norepinephrine, NE, 10⁻⁵ mol/L, Sigma 公司),待血管张力达到平台时,在浴槽中依次加入以半对数递增浓度的乙酰胆碱(acetylcholine, Ach, 10⁻⁹~10⁻⁵ mol/L);②随机选择两个浴槽,内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)抑制剂 N-硝基-L-精氨酸甲酯(N-nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME, 10⁻⁴ mol/L, Sigma 公司)在浴槽中孵育 20 min,再加入 NE(10⁻⁵ mol/L),待血管张力达到平台时,在浴槽中依次加入递增浓度的 Ach,观察血管舒张程度;加入 NADPH 氧化酶抑制剂 Apocynin (3×10⁻⁴ mol/L)在浴槽中孵育 15 min,再加入 NE (10⁻⁵ mol/L),待血管张力达到平台时,在浴槽中依次加入递增浓度的 Ach,观察血管舒张程度;③为排除药品对血管功能干扰,替换同一级血管上新的微血管环,重新加入 NE(10⁻⁵ mol/L)达到收缩平台后,加入递增浓度的硝普钠(sodium nitroprusside, SNP, 10⁻⁹~10⁻⁵ mol/L),观察血管舒张程度。Na-Hepes 缓

冲液成分:121.1 mmol/L NaCl、10 mmol/L Hepes、15.16 mmol/L KCl、2.4 mmol/L MgSO₄、11.08 mmol/L Glucose、1.6 mmol/L CaCl₂^[14]。

1.5 氧化应激相关的血清指标检测

麻醉后取大鼠下腔静脉血,在离心机上以 3000 r/min 离心 20 min,取上层血清并于 -80℃ 储存。

1.5.1 血清丙二醛含量检测 丙二醛(malondialdehyde, MDA)是最主要的氧化产物,是由多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化作用所产生。取血清按照 MDA 试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书步骤进行实验。

1.5.2 血清超氧化物歧化酶活力检测 取血清按照超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书步骤进行实验。

1.5.3 血清谷胱甘肽过氧化物酶活力检测 谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)是机体重要的过氧化物分解酶,它特异性催化还原性谷胱甘肽(GSH)对过氧化氢的还原反应。取血清按照谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书步骤进行实验。

1.5.4 血清一氧化氮含量检测 内皮细胞主要以旁分泌方式分泌血管活性物质,作用于临近的组织、细胞。NO 是内皮细胞分泌的最重要的血管舒张因子。取血清按照一氧化氮(NO)试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书步骤进行实验。

1.6 统计学分析

数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以单因素方差分析同一指标多组间的比较,以配对样本 *T* 检验分析同组血管环中加入抑制剂前后血管最大舒张之间的差异。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 有氧运动提高老年高血压大鼠的收缩压

收缩压(systolic blood pressure, SBP)在 WKY-EX 组(148.8 ± 3.2 mmHg)与 WKY-C 组(155.8 ± 4.3 mmHg)不存在显著性差异(*P* > 0.05),在 SHR-C 组(227.5 ± 4.5 mmHg)显著高于 WKY-C 组,在 SHR-EX 组(215.2 ± 4.6 mmHg)显著低于 SHR-C 组(*P* < 0.05)。16 月龄大鼠之间体重无显著性差异,8 周有氧运动末各组体重亦无显著性差异(*P* > 0.05; 图 1)。

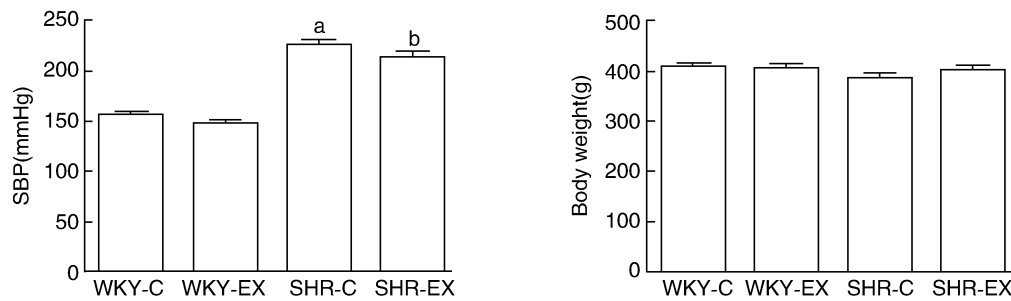


图 1. 大鼠体重和收缩压 a 为 $P < 0.05$, 与 WKY-C 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 SHR-C 组比较。

Figure 1. Body weight and systolic blood pressure of rats

2.2 有氧运动降低老年高血压大鼠的氧化应激水平

血清 MDA 含量在 SHR-C 组 ($11.8 \pm 1.0 \mu\text{mol/L}$) 显著高于 WKY-C 组 ($7.2 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$), 在 SHR-EX 组 ($7.9 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$) 显著小于 SHR-C 组 ($P < 0.05$), 在 WKY-EX 组 ($7.7 \pm 0.5 \mu\text{mol/L}$) 与 WKY-C 组没有显著性差异 ($P > 0.05$)。血清 T-SOD 含量在 SHR-C 组与 WKY-C 组相比有下降趋势, 但无显著性差异 ($P > 0.05$), 在 SHR-EX 与 SHR-C 及 WKY-EX 与 WKY-C 之间亦无显著性差异 ($P > 0.05$)。血清

Cu/Zn-SOD 含量在 SHR-C 组 ($38.2 \pm 0.7 \text{ kU/L}$) 与 WKY-C 组 ($44.3 \pm 1.6 \text{ kU/L}$) 相比具有统计学差异 ($P < 0.05$)。有氧运动后, Cu/Zn-SOD 含量在 SHR-EX 组 ($42.0 \pm 1.0 \text{ kU/L}$) 显著高于 SHR-C 组 ($P < 0.05$), 在 WKY-EX 组 ($46.7 \pm 1.1 \text{ kU/L}$) 与 WKY-C 组相比无显著性差异 ($P > 0.05$)。WKY-C 组、WKY-EX 组、SHR-C 组、SHR-EX 组血清 GSH-PX 活力分别为 $911.2 \pm 59.4 \text{ U}$ 、 $923.1 \pm 66.7 \text{ U}$ 、 $870.0 \pm 74.2 \text{ U}$ 、 $939.7 \pm 99.5 \text{ U}$, 四组 GSH-PX 活力均无显著性差异 ($P > 0.05$; 图 2)。

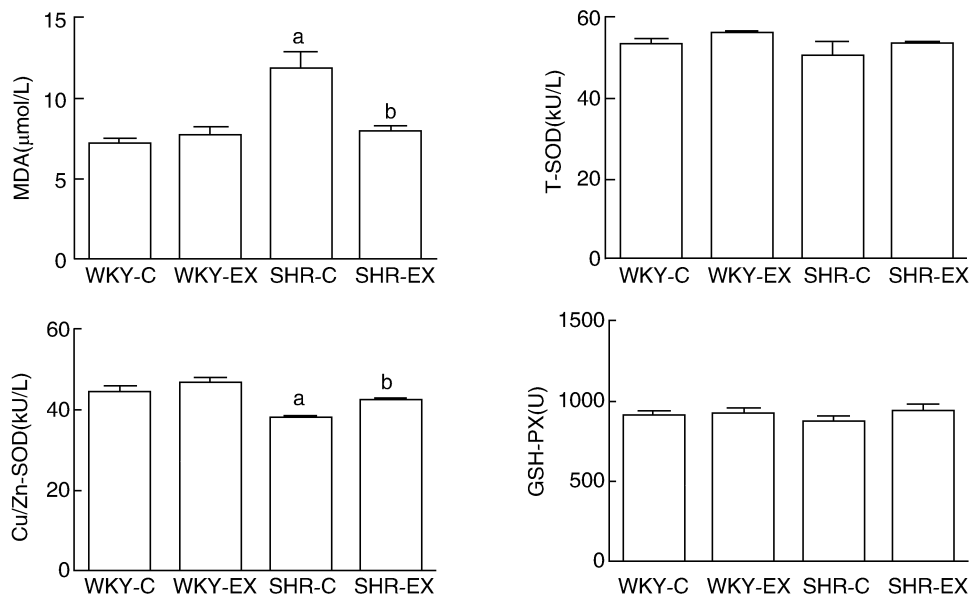


图 2. 血清氧化应激指标 a 为 $P < 0.05$, 与 WKY-C 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 SHR-C 组比较。

Figure 2. Indicators of oxidative stress in serum

2.3 有氧运动对老年高血压大鼠肠系膜动脉血管张力的影响

2.3.1 有氧运动降低老年 SHR 肠系膜动脉收缩反应性

10^{-5} mol/L NE 可以诱发肠系膜动脉收缩反应。60 mmol/L KCl 进行预收缩后, 在浴槽中加入

NE, 将其张力标准化为 K_{MAX} 百分比 ($\%K_{\text{MAX}}$), 以 $\%K_{\text{MAX}}$ 作为评价血管收缩反应的指标, 比较四组血管收缩反应性。四组对 KCl (60 mmol/L) 收缩反应无统计学差别 (WKY-C 组、WKY-EX 组、SHR-C 组、SHR-EX 组分别为 $6.39 \pm 0.19 \text{ mN}$ 、 $6.15 \pm 0.33 \text{ mN}$ 、 $6.74 \pm$

0.46 mN, 6.51 ± 0.54 mN)。NE 诱发的血管收缩反应在 SHR-C 组 (153.2 ± 1.9 % K_{MAX}) 显著高于 WKY-C 组 (120.2 ± 5.6 % K_{MAX})，在 SHR-EX (136.0 ± 1.8 % K_{MAX})

组显著低于 SHR-C 组，在 WKY-EX (143.9 ± 4.3 % K_{MAX}) 则显著高于 WKY-C 组 ($P < 0.05$; 图 3)。

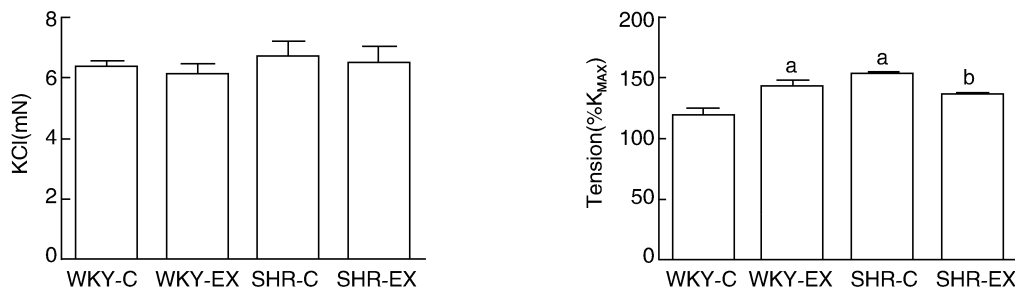


图 3. 大鼠肠系膜动脉收缩张力比较 a 为 $P < 0.05$, 与 WKY-C 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 SHR-C 组比较。

Figure 3. Comparison of contraction tension in mesenteric arteries of rats

2.3.2 有氧运动改善老年 SHR 肠系膜动脉舒张反应 肠系膜动脉在 10^{-5} mol/L NE 预收缩情况下, Ach 可以诱导血管舒张, 且具有浓度依赖性 (图 4A)。Ach 诱发的最大舒张反应在 SHR-C 组 (50.2 ± 2.8 %NE) 显著低于 WKY-C 组 (100.1 ± 0.6 %NE), 在 SHR-EX 组 (97.0 ± 1.5 %NE) 显著高于 SHR-C 组 ($P < 0.05$), 而在 WKY-EX 组 (99.7 ± 1.4 %NE) 与 WKY-C 组没有统计学差异 ($P > 0.05$; 图 4B)。利用 GraphPad Prism 5.0 浓度-反应的非线性回归曲线计算得出 EC_{50} , pIC_{50} 是 EC_{50} 的负对数, pIC_{50} 值表示对药物的敏感性, 数值越大表示对药物的敏感性越高。对比各组 Ach 诱发舒张的 pIC_{50} 值, 结果发现, pIC_{50} 值在 SHR-C 组 (6.24 ± 0.14) 显著小于 WKY-C 组 (7.90 ± 0.06), 在 WKY-EX 组 (8.50 ± 0.25) 和 SHR-EX 组 (7.05 ± 0.10) 显著高于各自对应的安静组 ($P < 0.05$; 图 4C)。表明 SHR 表现出内皮舒张功能障碍, 有氧运动可改善高血压血管舒张功能; 无论是正常血压还是高血压, 有氧运动均可有效改善肠系膜动脉对血管舒张剂的敏感性。

为排除内皮依赖性血管舒张的差异是源自血管平滑肌的舒张作用, 当 NE 收缩达平台, 本实验加入递增浓度 SNP。结果发现, SNP 作用后血管最大舒张程度并没有因为运动而发生显著变化, 四组均可以完全舒张, 不具有统计学差异 ($P > 0.05$; 图 4D)。NADPH 氧化酶抑制剂 Apocynin (3×10^{-4} mol/L) 在浴槽中孵育 15 min 后, 在 NE 的刺激下, 血管环对 Ach 表现出浓度依赖性舒张。四组血管环在加入 Apocynin 前后对 Ach 诱发的最大血管舒张反应均表现出增加的趋势, 但仅 SHR-C 组在加药前后对 Ach 诱发的最大血管舒张反应存在显著

性差异 ($P < 0.05$; 图 5)。表明氧化产物是影响 SHR-C 内皮舒张功能降低的主要原因。

2.3.3 肠系膜动脉 NO 依赖性血管舒张 eNOS 抑制剂 L-NAME (10^{-4} mol/L) 在浴槽中孵育 20 min, 用 NE 诱导血管收缩, 依次加入递增浓度 Ach, 舒张反应呈浓度依赖性增加。四组在加入 L-NAME 后对 Ach 诱导的舒张反应受抑制。NO 依赖性血管舒张 (%) = Ach 诱导的最大血管舒张 (%) - (Ach + L-NAME) 诱导的最大血管舒张 (%)^[15]。NO 依赖性血管舒张在 SHR-C 组 ($25.5\% \pm 2.3\%$) 显著低于 WKY-C 组 ($85.2\% \pm 0.7\%$), 在 SHR-EX 组 ($86.8\% \pm 3.4\%$)、WKY-EX 组 ($98.8\% \pm 1.5\%$) 显著高于对应的安静组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。血清 NO 含量在 SHR-C 组 (7.4 ± 0.9 μ mol/L) 显著低于 WKY-C 组 (14.5 ± 0.6 μ mol/L, $P < 0.05$), 在 WKY-EX 组 (21.4 ± 0.8 μ mol/L) 和 SHR-EX 组 (12.0 ± 0.4 μ mol/L) 显著高于对应的安静组 ($P < 0.05$; 图 6)。

3 讨论

众多研究表明, 衰老和高血压等心血管疾病会加重血管内皮功能紊乱^[16-17]。运动对机体产生良好的作用已被广泛接受, 有研究表明, 适宜运动强度对衰老大鼠模型的内皮功能起到改善作用^[18-19], 而适宜强度运动对高血压大鼠内皮功能也产生良好的效果。适宜强度运动不仅可以提高 eNOS 表达, 增加其主要的活性位点磷酸化^[20-21], 而且通过提高抗氧化酶能力、降低氧化应激水平、增加 NO 通路^[22], 提高内皮依赖性血管舒张能力。众所周知, 运动、衰老、疾病都导致 ROS 增加, 当机体抗氧

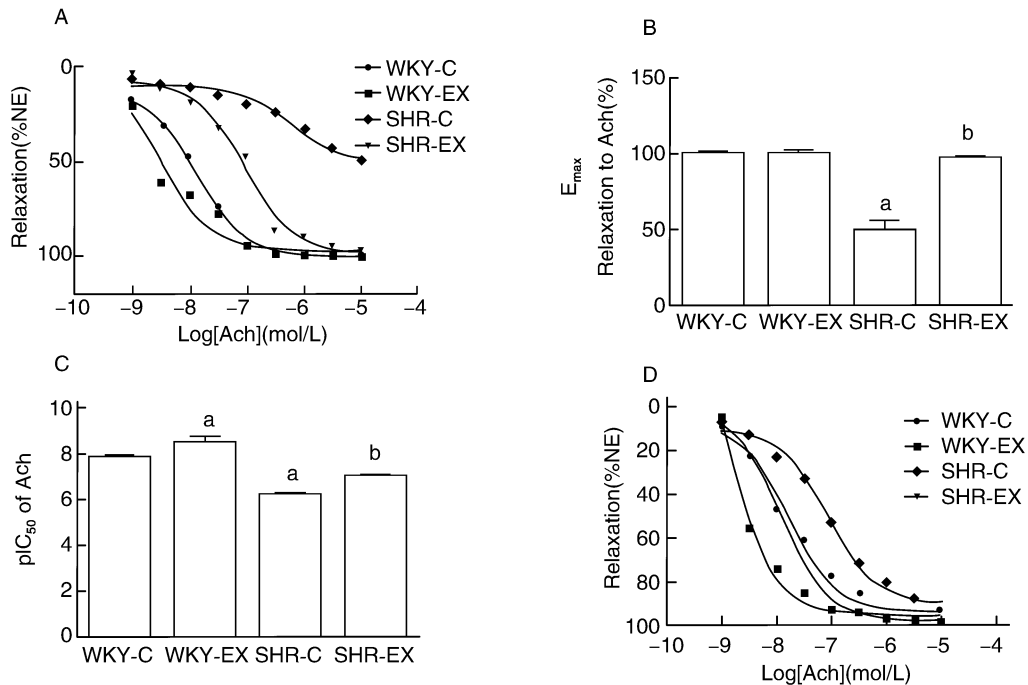


图 4. 血管舒张的剂量-反应曲线 a 为 $P < 0.05$, 与 WKY-C 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 SHR-C 组比较。

Figure 4. Dose-response curve of vasodilation

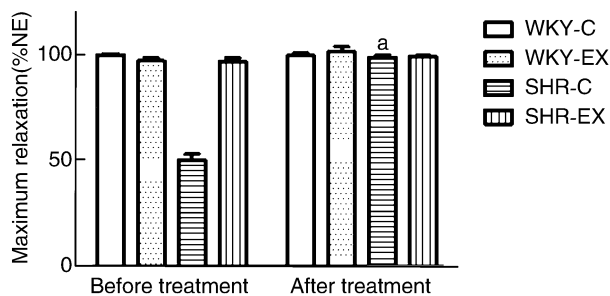


图 5. Apocynin 对 Ach 诱发的最大血管舒张的影响 a 为 $P < 0.05$, 与对应组加药前比较。

Table 5. Effect of Apocynin on maximal vasodilation induced by Ach

化物酶不能适应性增加含量,清除过多的氧化产物则会导致大量 ROS 蓄积,攻击细胞和组织,对机体产生不利影响。所以,老年高血压患者能否运动?选择什么样的运动尤为关键。但是,老年高血压大鼠模型进行长期有氧运动的效果如何,以及其中的机制国内外研究尚少。所以,本实验以 16 月龄正常血压大鼠和高血压大鼠为研究对象,8 周有氧运动后对各组三级肠系膜动脉进行血管功能测定,并进行氧化应激相关指标和血清 NO 含量检测。本研究首次提出,有氧运动可以通过降低老年 SHR 氧化应激水平、提高 NO 生物利用率,改善老年高血压大鼠血管内皮功能。

经过 8 周有氧跑台训练,SHR-EX 组 SBP 显著低于 SHR-C 组,WKY-EX 组 SBP 与 WKY-C 组相比有下降趋势,但不具有统计学差异。MDA 是由多不饱和脂肪酸发生脂质过氧化作用所产生的,是作为氧化产物重要的评价指标。本研究结果发现,SHR-C 组与 WKY-C 组相比 MDA 含量有显著性差异。长期有氧运动,高血压大鼠 MDA 含量减少。而抗氧化酶 GSH-PX 活力并没有发生变化,这与有关研究结果相同^[23]。SOD 被认为是清除氧化物的最重要的内源性抗氧化酶,在内皮细胞中,SOD 可以抑制 NO 由于氧化所造成的失活,所以 SOD 可以有效减少 ONOO⁻的形成^[24]。本研究中,SHR-EX 组 T-SOD 有上升趋势,但并没有显著性差异,而 Cu/Zn-SOD 含量在 SHR-C 组显著低于 WKY-C,在 SHR-EX 组显著高于 SHR-C 组,说明运动可以改善高血压引起 Cu/Zn-SOD 的下调。所以老年 SHR-C 氧化水平增高,有氧运动降低高血压伴随的高氧化应激水平,主要以氧化产物的减少为主,反映出氧化和抗氧化的平衡重心向抗氧化倾斜。

KCl 和 NE 均使血管平滑肌发生收缩。KCl 引起血管平滑肌收缩主要是因为细胞外高钾引起的细胞膜去极化,使电压依赖性钙通道开放,导致钙离子内流、血管收缩。NE 作用于外周血管,可直接兴奋 α_1 、 α_2 受体,而对比 α_2 受体,NE 诱导的血管

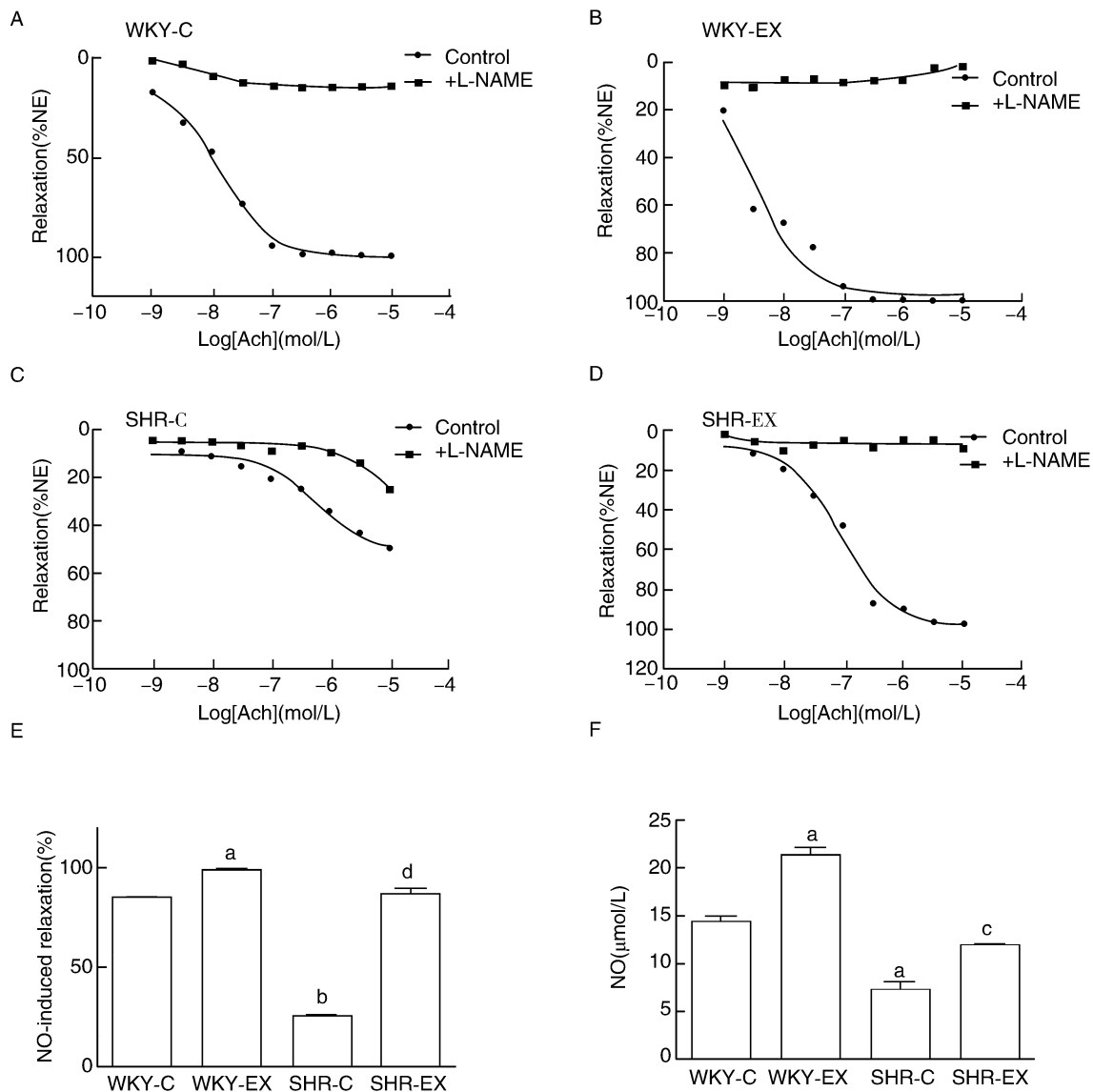


图 6. 肠系膜动脉 NO 依赖性血管舒张 图 A-D 中 Control 组是正常血管舒张状态, +L-NAME 是预先用 L-NAME 孵育, 抑制 Ach 诱发内皮依赖性血管舒张, 抑制的部分是 NO 作用于血管舒张, 因此计算 NO 依赖性血管舒张作为评价 NO 生物利用度指标; E 是对各组 NO 依赖性血管舒张进行统计学分析; F 是血清 NO 含量。a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 WKY-C 组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 SHR-C 组比较。

Figure 6. NO-mediated vascular relaxation on MA

收缩主要是作用于 α_1 受体介导的细胞内信号转导机制。另外, NE 通过酪氨酸激酶和 Rho 激酶抑制肌球蛋白轻链磷酸酯酶活性, 增加平滑肌对 Ca^{2+} 的敏感性引起平滑肌收缩。有研究表明, 高钾溶液对老年 SHR 和 WKY 肠系膜动脉所产生的收缩反应并没有显著性差异, 但是 NE 对 SHR 的收缩反应显著高于 WKY, 这与本实验结果相一致。众多研究表明, 高血压微动脉对 NE 的敏感性增高^[25]。这种敏感性的增加主要是通过上调血管平滑肌 α_1 肾上腺素能受体。经过 8 周有氧训练后, SHR 的收缩反应性显著降低。本研究结果表明, 有氧运动可以逆转因衰老和高血压所引起的血管收缩活性增加。

本研究表明, SHR-C 组 Ach 诱导的舒张反应低于 WKY-C 组, 并具有显著性差异。有氧运动后, SHR-EX 组 Ach 诱导的舒张反应高于 SHR-C 组。SNP 作用于平滑肌细胞使血管舒张, 并呈浓度依赖性增加, 四组均可以完全舒张, 进一步说明 SHR 和 WKY 阻碍血管舒张反应的差异不是来自平滑肌的直接扩张作用而是来自血管内皮功能的差异, 排除肠系膜动脉在非内皮依赖性血管舒张的影响。所以, 通过有氧运动明显改善老年 SHR 血管内皮功能障碍。

ROS 作用于内皮细胞和平滑肌细胞, 影响细胞钙离子信号, 对血管收缩产生影响。因此, ROS 大

量增加会造成钙离子信号紊乱,使血管功能改变。ROS 主要源自 NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶、线粒体呼吸链酶复合体等^[1]。Apocynin 是广泛应用于抑制 NADPH 氧化酶活性的药理学手段。为了探讨老年 SHR 是否通过 ROS 影响血管功能,加入 Apocynin 后四组血管环对 Ach 诱导的舒张反应都存在增强趋势,但仅有 SHR-C 组加药前后具有统计学差异。结果表明,老年高血压大鼠可能与 ROS 的增加而导致血管内皮功能障碍有关,而运动减少了 ROS 增加。本研究对 Ach 诱导的舒张反应进行 pIC₅₀ 值比较,有氧运动后可以通过减少衰老和高血压状态下的 ROS 增高增加对 Ach 的敏感性。

有研究表明,氧化应激状态通过影响 eNOS-NO 通路影响 NO 依赖性血管舒张功能^[16]。运动锻炼所提高的内皮功能主要依赖于提高 NO 的生物利用度。有氧运动改善老年高血压大鼠的血管内皮功能是否通过提高 NO 生物利用度来实现呢? 本实验通过加抑入抑制剂 L-NAME,运动组 NO 依赖性舒张反应更明显,说明运动通过 NO 通路改善内皮舒张功能。在血清指标中,SHR-C 组 NO 含量仍显著低于 WKY-C 组。NO 含量下降主要由两方面影响:第一,超氧阴离子自由基与 NO 结合的速率是其与 SOD 结合速率的 3 倍,大量超氧化物的产生会加速 NO 降解。第二,NO 与超氧阴离子结合的产物过氧亚硝酸根离子(ONOO⁻)可以氧化 BH₄,使 eNOS 脱耦联,产生大量的超氧阴离子,而不是 NO。规律性有氧运动后,WKY-EX 组 NO 含量显著高于 WKY-C 组,SHR-EX 组 NO 含量显著高于 SHR-C 组。所以,老年高血压大鼠是因为 ROS 增加、NO 生物利用度减少所导致的内皮功能障碍。而 8 周有氧运动可以减少高血压大鼠模型 ROS 产生、增加 NO 生物利用度、改善 eNOS-NO 通路,进而提高内皮功能。

中等强度运动对老年大鼠模型无论是正常血压组还是高血压组的内皮功能均产生良好效果。老年正常血压运动组主要以提高 NO 生物利用度、提高对舒张药物敏感性,对内皮功能产生良好效果;而老年高血压运动组以降低氧化应激水平、提高 NO 生物利用度、增加对舒张药物敏感性,提高内皮舒张能力。运动对老年正常血压组和老年高血压组改善内皮功能的机制不同,可能与其基础氧化应激水平不同有关,这可能与运动改善机体自稳态现象有关^[26]。这种自稳态总的来说是指在肌肉收缩过程中会有 ROS 产生,对于有氧运动产生 ROS 的过程,机体会发生一种适应性变化,细胞的抗氧化系统增强。本研究有氧运动降低高血压伴随的

高氧化应激水平,提高抗氧化酶活力,主要以氧化产物的减少为主,反映出氧化和抗氧化的平衡重心向抗氧化倾斜。而老年正常血压组其氧化应激水平并没有因为运动发生显著改变,保持氧化与抗氧化水平的稳定。

在今后的研究中我们将进一步讨论有氧运动对肠系膜动脉氧化应激相关蛋白的影响,更深入地了解其发生机制。

有氧运动对老年高血压大鼠和正常血压大鼠均产生良好的效果,即长期有氧运动可抑制由衰老和/或高血压共同诱导的氧化应激水平增高、NO 生物利用度的降低,进而改善血管功能。

[参考文献]

- [1] Bonnefont D. Glucose and reactive oxygen species[J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2002, 5(5): 561-568.
- [2] Cai Z, Yan LJ. Protein oxidative modifications: Beneficial roles in disease and health[J]. *J Biochem Pharmacol Res*, 2013, 1(1): 15-26.
- [3] Malinin NL, West XZ, Byzova TV. Oxidation as "the Stress of Life"[J]. *Aging*, 2011, 3(9): 906-910.
- [4] Milisav I, Poljsak B, Suput D. Adaptive response, evidence of cross-resistance and its potential clinical use[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(9): 10 771-806.
- [5] Prosser BL, Ward CW, Lederer WJ. X-ROS signaling: rapid mechano-chemo transduction in heart[J]. *Sci*, 2011, 333(6048): 1 440-445.
- [6] Puddu P, Puddu GM, Cravero E, et al. The Molecular sources of reactive oxygen species in hypertension [J]. *Blood Press*, 2008, 17(2): 70-77.
- [7] Ceci R, Beltran Valls MR, Durranti G, et al. Oxidative stress responses to a graded maximal exercise test in older adults following explosive-type resistance training [J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 65-72.
- [8] Tanaka LY, BecharaLR, SantosAM, et al. Exercise improves endothelial function: A local analysis of production of nitric oxide and reactive oxygen species[J]. *Nitric Oxide*, 2015, 4(45): 7-14.
- [9] Ungvari Z, Tucsek Z, Sosnowska D, et al. Aging-induced dysregulation of dicer1-dependent microrna expression impairs angiogenic capacity of rat cerebrovascular endothelial cells[J]. *J Gerontol Biol Sci Med Sci*, 2013, 68(8): 877-891.
- [10] Lijun Shi, Liu B, Zhang Y, et al. Exercise training reverses unparallel downregulation of maxiK channel α - and β 1-subunit to enhance vascular function in aging mesenteric arteries [J]. *J Gerontol Am Biol Sci Med Sci*,

- 2014, 69(12): 1462-473.
- [11] Agarwal D, Welsch MA, Francis JNKAJ. Chronic exercise modulates RAS components and improves balance between pro- and anti-inflammatory cytokines in the brain of SHR [J]. *Basic Res Cardio*, 2011, 106(6): 1069-085.
- [12] Roque FR, Briones AM, García-redondo AB, et al. Aerobic exercise reduces oxidative stress and improves vascular changes of small mesenteric and coronary arteries in hypertension[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 168(3): 686-703.
- [13] Sylvain B, Singh R, Gayraud S, et al. Endothelial function does not improve with high-intensity continuous exercise training in SHR: implications of eNOS uncoupling [J]. *Hypertens Res.*, 2016, 39(2): 70-78.
- [14] Lijun Shi, Bailin Liu, Yanyan Zhang, et al. Exercise training reverses unparallel downregulation of maxi K channel α - and β 1-subunit to enhance vascular function in aging mesenteric arteries[J]. *J Gerontol Biol Sci Med Sci*, 2013, 301(4): 342-353.
- [15] Fleenor BS, Sindler AL, Marvi NK, et al. Curcumin ameliorates arterial dysfunction and oxidative stress with aging[J]. *Exp Gerontol*, 2013, 48(2): 269-276.
- [16] Schöttker B, Saun K, Jansen E, et al. Oxidative stress markers and all-cause mortality at older age: A population-based cohort study[J]. *J Gerontol*, 2015, 70(4): 518-524.
- [17] Montezano AC, Dulak-lis M, Tsiropoulou S, et al. Oxidative stress and human hypertension: vascular mechanisms, biomarkers and novel therapies[J]. *Can J Cardiol*, 2015, 31(5): 631-641.
- [18] Walker A, Kaplan R, Pierce G, et al. Prevention of age-related endothelial dysfunction by habitual aerobic exercise in healthy humans: possible role of nuclear factor κ B[J]. *Clin Sci*, 2014, 127(1): 645-654.
- [19] Zoppini G, Targher G, Zamboni C, et al. Effects of moderate-intensity exercise training on plasma biomarkers of inflammation and endothelial dysfunction in older patients with type 2 diabetes[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2006, 16(8): 543-549.
- [20] Grijalva J, Hicks S, Zhao X, et al. Exercise training enhanced myocardial endothelial nitric oxide synthase (eNOS) function in diabetic goto-kakizaki (GK) rats [J]. *Cardiovas Diabetol*, 2008, 7(1): 1-12.
- [21] Farah C, Kleindienst A, Bolea G, et al. Exercise-induced cardioprotection: A role for eNOS uncoupling and NO metabolites[J]. *Res Cardiol*, 2013, 108(6): 1-13.
- [22] Gielen S, Schuler G, Adams V. Cardiovascular effects of exercise training: molecular mechanisms [J]. *Circul*, 2010, 122(12): 1221-1238.
- [23] Bejma J, Ramirez P, Ji LL. Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver[J]. *Acta Physiol Scand*, 2000, 169(4): 343-351.
- [24] Maksimenko A. Experimental antioxidant biotherapy for protection of the vascular wall by modified forms of superoxide dismutase and catalase[J]. *Curr Pharma*, 2005, 11(16): 2007-2016.
- [25] Heagerty AM, Heerkens EH, Izzard AS. Small artery structure and function in hypertension [J]. *J Cell Mol Med*, 2010, 14(5): 1037-043.
- [26] Radak ZR, Chung HY, Goto S. Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(2): 153-159.

(此文编辑 文玉珊)