

## SCAD 重组腺病毒对自发性高血压大鼠血管重构的影响

钟小艺<sup>1</sup>, 李忠洪<sup>1</sup>, 廖英勤<sup>1</sup>, 苏永少<sup>1</sup>, 马智超<sup>1</sup>, 刘培庆<sup>2</sup>, 路静<sup>2</sup>, 臧林泉<sup>1</sup>, 周四桂<sup>1</sup>

(1. 广东药科大学临床药理学系, 广东省广州市 510006; 2. 中山大学药学院药理与毒理学实验室, 广东省广州市 510006)

[关键词] 短链酰基辅酶 A 脱氢酶; 重组腺病毒; 高血压; 血管重构

[摘要] **目的** 探究尾静脉注射短链酰基辅酶 A 脱氢酶 (SCAD) 重组腺病毒能否改善自发性高血压大鼠 (SHR) 血管重构。**方法** 实验分为 6 组: Wistar+NS 组、Wistar+GFP 组、Wistar+Ad-SCAD 组、SHR+NS 组、SHR+GFP 组和 SHR+Ad-SCAD 组。腺病毒包装的 SCAD 和 GFP 纯化后, 以尾静脉方式注射给药 8 周。采用超声心动图检测大鼠心功能情况; 采用无创血压仪检测大鼠的血压变化; 主动脉 HE 染色、天狼星红染色、DHE 染色、TUNEL 染色、EVG 染色, 观察血管重构。采用实时荧光定量 PCR 检测相关基因 mRNA 表达变化、Western blot 检测相关蛋白表达变化, 观察游离脂肪酸、一氧化氮 (NO) 和 ATP 含量变化。**结果** (1) 尾静脉注射 SCAD 重组腺病毒, 大鼠主动脉中 SCAD 蛋白出现过表达, mRNA 水平增高, SCAD 酶活性增加; (2) 在病理状态下, 增加主动脉中 SCAD 表达, 可以降低血压, 改善心功能, 改善血管腔大小, 减少胶原沉积, 减少血管活性氧 (ROS) 的生成和细胞凋亡; (3) 在病理状态下, SCAD 的表达增加可减少血清和主动脉中游离脂肪酸的含量, 增加组织中的 ATP 水平, 激活内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 磷酸化, 增加主动脉 NO 的生成。**结论** 自发性高血压大鼠主动脉 SCAD 的表达增加能逆转高血压血管重构, 可能与其减少血清中游离脂肪酸的含量、增加 NO 水平、减少活性氧生成、消除氧化应激有关。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

### Effect of short chain acyl-CoA dehydrogenase recombinant adenovirus on vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats

ZHONG Xiaoyi<sup>1</sup>, LI Zhonghong<sup>1</sup>, LIAO Yingqing<sup>1</sup>, SU Yongshao<sup>1</sup>, MA Zhichao<sup>1</sup>, LIU Peiqing<sup>2</sup>, LU Jing<sup>2</sup>, ZANG Linquan<sup>1</sup>, ZHOU Sigui<sup>1</sup>

(1. Department of Clinical Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong 510006, China;

2. Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

[KEY WORDS] short chain acyl-CoA dehydrogenase; recombinant adenovirus; hypertension; vascular remodeling

[ABSTRACT] **Aim** To investigate whether the recombinant adenovirus with short chain acyl CoA dehydrogenase (SCAD) injected via tail vein can improve the vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** The experiment was divided into 6 groups: Wistar+NS group, Wistar+GFP group, Wistar+Ad-SCAD group, SHR+NS group, SHR+GFP group and SHR+Ad-SCAD group. After purification of SCAD and GFP packed with adenovirus, the drug was injected by tail vein for 8 weeks. The cardiac function of rats was detected by echocardiography. The blood pressure changes of rats were detected by non-invasive blood pressure meter. HE staining, Sirius red staining, DHE staining, TUNEL staining, EVG staining, were used to observe the phenomenon of vascular remodeling. The expression of related proteins was detected by Western blot, and mRNA expression was detected by RT-PCR. The free fatty acid (FFA), nitric oxide (NO) content and ATP content were observed. **Results** (1) After SCAD recombinant adenovirus was injected via tail vein, the expression of SCAD protein was significantly upregulated in the aorta of rats, meanwhile, the mRNA level was observably increased, and the activity of SCAD was markedly increased. (2) In the pathological

[收稿日期] 2019-10-17

[修回日期] 2019-12-06

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81670239); 广东省科技计划项目 (2014A020212315); 广东省自然科学基金项目 (2016A030313729); 广东药科大学“创新强校工程”资助项目和广东省研究生分子药理学示范课程建设项目 (2017SFKC27); 广东省“十二五”医学重点学科, 依托广东药科大学附属第一医院、药学院

[作者简介] 钟小艺, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 949244087@qq.com。通信作者周四桂, 博士, 教授, 研究方向为心血管药理, E-mail 为 zhouzg201014@163.com。

state of rats, the rising of SCAD can lower blood pressure, improve heart function and vascular lumen size, reduce collagen deposition, result a poor production of vascular ROS, consequently, give lower to apoptosis. (3) Under pathological conditions, overexpression of SCAD can reduce FFA content of serum and aorta, increase the ATP level in aorta, activate eNOS phosphorylation, increase NO production in aorta. **Conclusion** The upregulation of SCAD in aorta of SHR can reverse hypertensive vascular remodeling, which may be related to decreasing FFA content of serum, increasing NO levels, reducing ROS production and eliminating oxidative stress.

高血压是最常见的心血管疾病,可导致脑卒中、冠心病、心功能衰竭和肾脏疾病。高血压时,血流量或血流的速率增加,血流对血管壁的剪切力增加,血管壁张力增加,可导致血管壁增厚、血管顺应性降低。高血压血管重塑几乎影响所有的组织器官,会使高血压患者发生心肌缺血、动脉粥样硬化以及肾功能衰竭等并发症<sup>[1-2]</sup>。临床上治疗高血压,尽管治疗期间血压降至正常范围,然而,高血压并发的心、脑、肾等靶器官的损伤并未得到显著改善,这与其血流灌注量未恢复正常有关。

短链酰基辅酶 A 脱氢酶(short chain acyl-CoA dehydrogenase, SCAD)是脂肪酸  $\beta$  氧化的限速酶,参与脂肪酸  $\beta$  氧化的第一步脱氢反应<sup>[3]</sup>。本课题组前期研究发现,自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)的肥厚心肌中,SCAD 表达出现了明显下调<sup>[4]</sup>。进一步研究发现,在 SHR 主动脉中,SCAD 的表达也出现了显著下调,经过有氧运动训练后,SHR 血管重构得到了明显改善,主动脉中 SCAD 表达也明显上调<sup>[5]</sup>。然而,SCAD 重组腺病毒是否能改善 SHR 的血管重构,尚不清楚。

本研究采用 SHR 作为血管重构模型,以 Wistar 大鼠作为正常对照,采用尾静脉注射 SCAD 重组腺病毒治疗 8 周,观察 SCAD 过表达对高血压血管重构的影响,为高血压血管重构的防治提供新靶点和新思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

重组腺病毒载体 Ad-SCAD、GFP 购自汉恒生物科技(上海)有限公司;腺病毒纯化试剂盒购自 Clontech 公司;SCAD、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthetase, eNOS)、磷酸化 eNOS(phosphorylated eNOS, p-eNOS)、NADPH 氧化酶 2(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 2, NOX-2)、NOX-4 和  $\alpha$ -tubulin 购于 Proteintech 公司;Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3 购于 Abcam 公司;ATP 检测试剂盒购于碧云天生物科技有限公司。

SCAD 酶活性检测试剂盒购于上海杰美基因;游离脂肪酸测定试剂盒购于上海酶联生物;PCR 引物由上海生工生物工程公司设计;qPCR 测定试剂盒购于 TaKaRa;Western blot 发光液购于 BIORAD;BCA 蛋白定量试剂盒购于 Thermo。

### 1.2 实验动物与分组

27 只健康雄性 12 周龄 Wistar 大鼠购自南方医科大学动物实验中心[许可证编号为 SYXK(粤)2016-0041];27 只雄性 12 周龄 SHR 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证为 SCXK(京)2016-0006]。实验分组:(1)正常生理盐水组(Wistar+NS):9 只 12 周龄 Wistar 大鼠尾静脉注射生理盐水 8 周;(2)正常 GFP 阴性对照组(Wistar+GFP):9 只 12 周龄 Wistar 大鼠尾静脉注射纯化后的腺病毒空载体 GFP 8 周;(3)正常 Ad-SCAD 给药组(Wistar+Ad-SCAD):9 只 12 周龄 Wistar 大鼠尾静脉注射纯化后的 SCAD 重组腺病毒 8 周;(4)血管重构模型生理盐水组(SHR+NS):9 只 12 周龄 SHR 尾静脉注射生理盐水 8 周;(5)血管重构模型 GFP 阴性对照组(SHR+GFP):9 只 12 周龄 SHR 尾静脉注射纯化后的腺病毒空载体 GFP 8 周;(6)血管重构模型 Ad-SCAD 给药组(SHR+Ad-SCAD):9 只 12 周龄 SHR 尾静脉注射纯化后的 SCAD 重组腺病毒 8 周。

### 1.3 Ad-SCAD 重组腺病毒的扩增与纯化

用 10  $\mu$ L 的第一代 Ad-SCAD 重组腺病毒感染 293A 细胞,转染后 48~72 h,使细胞呈现出 CPE 效应(细胞变圆并大串脱落)。随后,收集细胞液,反复冻融 3 次,1 500 r/min 离心 5 min 收集上清液。此时,上清液是第二代腺病毒,标记为 Ad-SCAD P2;扩增到 P4 时,将病毒浓缩液按照制造商的规程通过 Adeno-X<sup>TM</sup> Maxi 纯化试剂盒(Clontech)进行纯化,并使用紫外分光光度法进行滴定,以检测 OD<sub>260 nm</sub> 值,以计算用于动物体内实验的浓度。重组腺病毒给药剂量为  $5 \times 10^8$  VP/(mL · d)。公式:病毒滴度(VP/mL) = OD<sub>260</sub> × 稀释倍数 ×  $1.1 \times 10^{12}$ 。

### 1.4 血压测定方法

利用大鼠无创血压测定仪(CODA Monitor,

Kent)测定大鼠尾动脉的收缩压和舒张压。每2周测定体质量和血压。

### 1.5 超声心动图检查

用小动物麻醉设备,麻醉各组大鼠,采用超声监测大鼠心功能变化,记录大鼠心脏实时图。测出数据取 M 超曲线,测定大鼠左心室射血分数(ejection fraction, EF)、左心室缩短率(fractional shortening, FS)、心输出量(cardiac output, CO)、每搏输出量(stroke volume, SV)、左心室舒张期末内径(left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD)、左心室收缩期末内径(left ventricular end-systolic dimension, LVESD)、左心室舒张期末容积(left ventricular end diastolic volume, LVEDV)、左心室收缩期末容积(left ventricular end systolic volume, LVESV)及左心室前壁厚度(left ventricular anterior wall thickness, LVAW)。

### 1.6 游离脂肪酸含量检测

使用戊巴比妥钠(45 mg/kg)麻醉大鼠,腹部切开暴露腹主动脉,采用不含 EDTA 的真空采血管腹主动脉取血 5 mL,全血室温静置 30 min 后,冷冻离心机 3 500 r/min 离心 10 min,收集上层透明血清,-80 °C 保存备用。用预冷的 PBS 灌注心脏,将体内脏器血液冲刷干净,分离大鼠的主动脉,去除主动脉外层脂肪,用预冷的 PBS 冲洗干净后,液氮速冻,-80 °C 保存。严格按照上海酶联游离脂肪酸测定 ELISA 试剂盒说明书,对大鼠的血清、主动脉组织进行游离脂肪酸含量检测,根据吸光度值、组织蛋白的浓度,按公式计算出血清和主动脉的游离脂肪酸含量。

### 1.7 活性氧含量测定

将新鲜取材预处理后的主动脉,液氮速冻。采用 OCT 包埋,冰冻切片,二氢乙啶(dihydroethidium, DHE)染色法检测主动脉中活性氧(reactive oxygen species, ROS)的含量,荧光显微镜观察并拍照。

### 1.8 主动脉形态学检查

将新鲜取材预处理后的主动脉,吸干多余的 PBS,泡于 4% 多聚甲醛组织固定液中固定,石蜡包埋组织,进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin stain, HE)染色、VERHOEFF'S VAN GIESON(EVG)染色、天狼星红染色、SCAD 荧光单标检测、TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL)染色,对主动脉重构情况进行多方位分析。

### 1.9 实时荧光定量 PCR

提取主动脉的总 RNA,检测 RNA 的纯度及浓度。参照 RT-PCR 试剂盒说明书进行反转录操作,

按照 SYBR Green 说明书进行 PCR 的 cDNA 扩增反应。SCAD 上游 5'-CCAGTCTGTGGAACCTACCTGAG-3',下游 5'-CCCTTCTTCTTCACCTGCCA-3'; GAPDH 上游 5'-AGGAGTAAGAAACCCTGGAC-3',下游 5'-CTGGGATGGAATTGTGAG-3'。

### 1.10 SCAD 酶活性检测

按照 SCAD 酶活性检测试剂盒操作,根据组织蛋白的浓度和 OD<sub>600 nm</sub> 的吸光度计算出主动脉组织中 SCAD 的酶活性。

### 1.11 ATP 含量测定

严格按照 Bytime ATP 检测试剂盒说明书进行操作。用连续波长多功能酶标仪(Luminometer)检测样品、标准品的 RLU 值。设定标准曲线,并将样品 RLU 值代入标准曲线中,算得 ATP 含量。

### 1.12 一氧化氮含量检测

用 PBS 将主动脉进行组织匀浆,按照南京建成一氧化氮(nitric oxide, NO)检测(硝酸还原法)试剂盒说明书进行操作。用紫外可见分光光度计在 OD<sub>550 nm</sub> 处测定吸光度值,代入公式计算出 NO 的含量。

### 1.13 Western blot 检测蛋白表达水平

提取主动脉组织蛋白,用 BCA 定量液检测蛋白浓度,定量分装后置于-20 °C。经聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶电泳分离蛋白、湿转法转膜、5% BSA 封闭,一二抗抗体结合、化学发光法显影摄图保存,比对。

### 1.14 统计学分析

利用 SPSS13.0 进行统计学处理,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 Bonferroni *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 SCAD 重组腺病毒在主动脉中的转染表达

在 Wistar 大鼠中筛选出最佳的 SCAD 重组腺病毒给药剂量,尾静脉注射重组腺病毒剂量为  $5 \times 10^8$  VP/mL,并对实验组进行 8 周的给药处理。与生理盐水组、GFP 组相比,给予 SCAD 重组腺病毒后,主动脉中均出现了 SCAD mRNA 表达水平、酶活性、蛋白表达水平增高及 SCAD 荧光增强,表明 SCAD 重组腺病毒成功转染进入大鼠的主动脉中,并产生过表达(图 1)。

### 2.2 SCAD 重组腺病毒对大鼠血压和心功能的影响

与 Wistar 组相比,SHR 组大鼠的收缩压和舒张压均明显增高。与 SHR+NS 组和 SHR+GFP 组相

比,在 SCAD 重组腺病毒给药后的第 6 周、第 8 周,即 18、20 周龄时,SHR+Ad-SCAD 组的收缩压和舒张压均出现了显著的下趋势。与 SHR+NS 组和 SHR+GFP 组相比,SHR 给予 Ad-SCAD 治疗 8 周,能显著改善舒张期末/收缩期末心室容积(LVEDV/

LVESV)以及舒张期末/收缩期末左心室前壁厚度(LVAWd/LVAWs)。以上结果表明,SCAD 给药 8 周能有效降低 SHR 大鼠的血压,改善 SHR 大鼠的心功能(图 2 和表 1。)

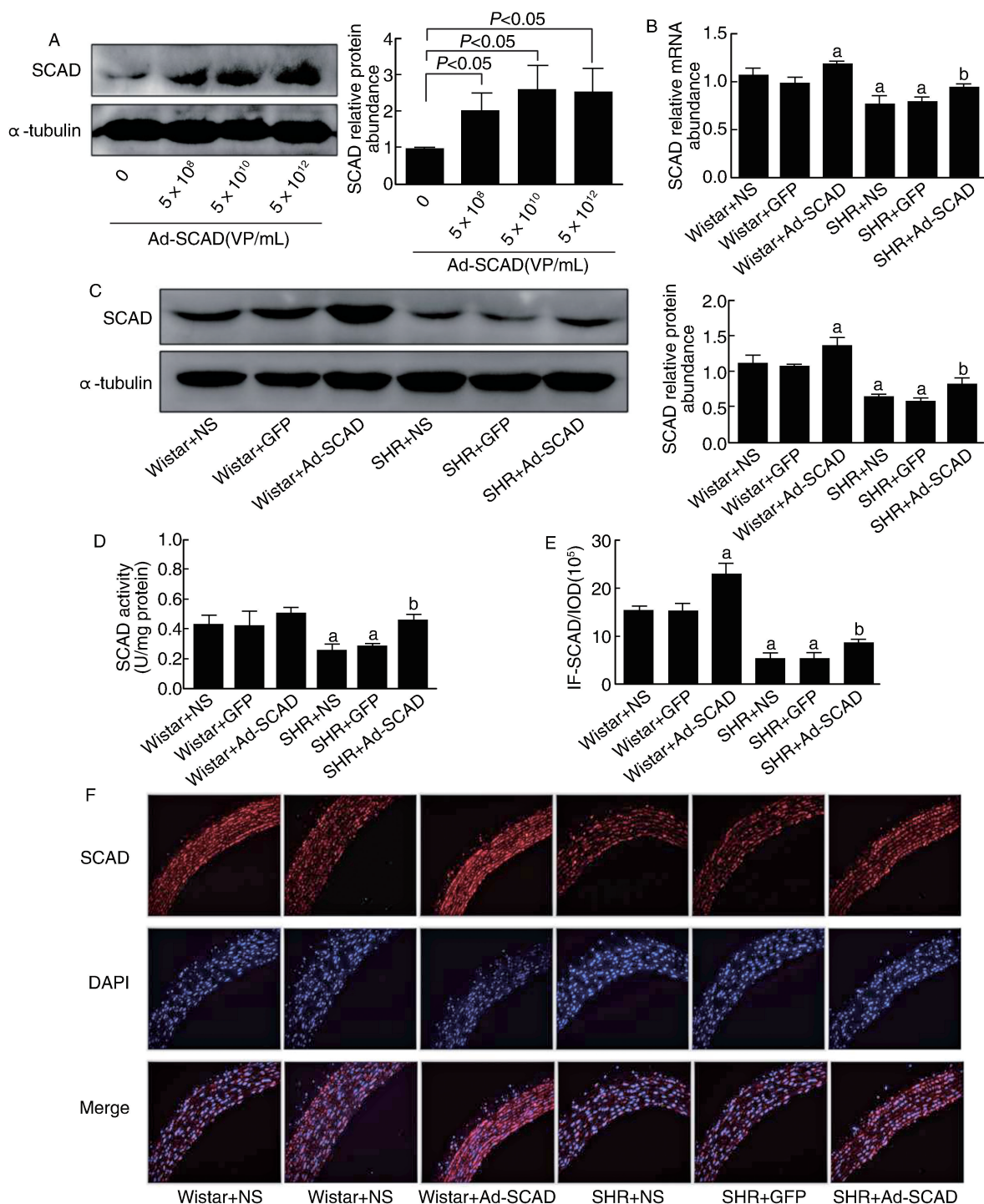


图 1. 各组大鼠主动脉 SCAD 的表达变化 ( $n=5$ ) A 为尾静脉 Ad-SCAD 剂量筛选;B 为尾静脉注射腺病毒后,各组大鼠主动脉 SCAD 基因表达水平;C 为 SCAD 蛋白表达水平;D 为 SCAD 酶活性;E 为荧光单抗 SCAD 量化统计图;F 为主动脉 SCAD 荧光单抗图(200 $\times$ )。a 为  $P < 0.05$ ,与 Wistar+NS 组相比;b 为  $P < 0.05$ ,与 SHR+NS 组相比。

Figure 1. The expression of SCAD was changed with the treatment of Ad-SCAD for 8 weeks ( $n=5$ )

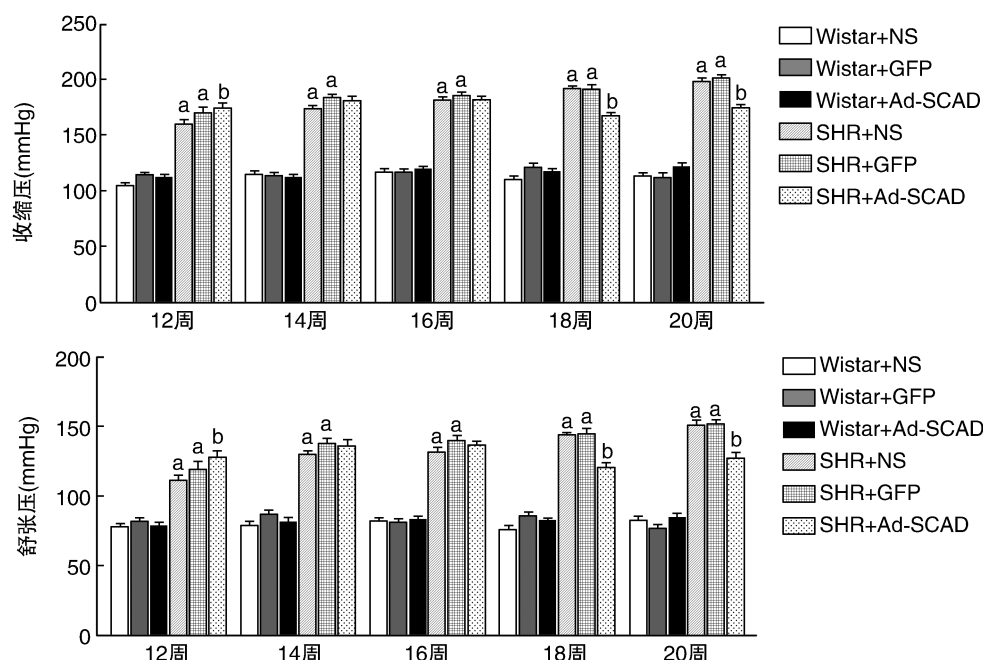


图 2. 各组大鼠血压的变化( $n=9$ ) a 为  $P<0.05$ , 与 Wistar+NS 组相比; b 为  $P<0.05$ , 与 SHR+NS 组相比。

Figure 2. The blood pressure of the rats at different weeks( $n=9$ )

表 1. SCAD 腺病毒治疗对心功能的影响

Table 1. Effect of Ad-SCAD treatment on cardiac function in rats

指标	Wistar+NS 组 ( $n=5$ )	Wistar+GFP 组 ( $n=5$ )	Wistar+Ad- SCAD 组( $n=6$ )	SHR+NS 组 ( $n=5$ )	SHR+GFP 组 ( $n=5$ )	SHR+Ad- SCAD 组( $n=6$ )
体质量 (g)	357.10±19.27	361.20±21.43	360.10±26.31	296.60±3.00 <sup>a</sup>	304.90±28.44 <sup>a</sup>	273.10±14.34
LVW (mg)	511.90±39.98	614.60±90.13	515.50±73.75	798.70±53.45 <sup>a</sup>	835.20±24.25 <sup>a</sup>	665.90±79.89
LVW/BW (mg/g)	1.434±0.091	1.698±0.190	1.432±0.173	2.692±0.153 <sup>a</sup>	2.727±0.688 <sup>a</sup>	2.443±0.292
EF (%)	50.44±2.12	50.20±0.61	50.16±1.68	62.08±7.80 <sup>a</sup>	57.01±8.60 <sup>a</sup>	53.54±8.46 <sup>b</sup>
FS (%)	26.65±1.35	26.53±0.37	26.48±1.16	34.43±5.24 <sup>a</sup>	31.20±5.90 <sup>a</sup>	26.33±2.42 <sup>b</sup>
CO (mL/min)	62.74±3.65	62.21±6.23	62.97±5.92	50.81±2.49 <sup>a</sup>	47.51±6.77 <sup>a</sup>	52.08±8.23
SV (μL)	162.10±9.37	159.50±15.51	160.70±22.03	122.80±12.66 <sup>a</sup>	122.40±17.86 <sup>a</sup>	141.10±15.86
LVEDD (mm)	7.748±0.163	7.705±0.384	7.721±0.372	6.292±0.635 <sup>a</sup>	6.605±0.182 <sup>a</sup>	7.045±0.376 <sup>b</sup>
LVEDS (mm)	5.684±0.172	5.662±0.308	5.673±0.205	4.157±0.768 <sup>a</sup>	4.643±0.589 <sup>a</sup>	5.028±0.584 <sup>b</sup>
LVEDV (μL)	321.40±15.47	318.10±34.08	319.40±34.74	203.60±47.68 <sup>a</sup>	224.40±14.00 <sup>a</sup>	260.30±30.96 <sup>b</sup>
LVESV (μL)	159.30±11.08	158.60±18.61	158.80±13.29	80.79±37.25 <sup>a</sup>	101.90±29.36 <sup>a</sup>	122.20±32.30 <sup>b</sup>
LVAWd (mm)	1.675±0.769	1.534±0.058	1.517±0.154	2.063±0.168 <sup>a</sup>	2.116±0.158 <sup>a</sup>	1.834±0.112 <sup>b</sup>
LVAWs (mm)	2.169±0.092	2.046±0.150	2.046±0.165	2.857±0.252 <sup>a</sup>	2.769±0.251 <sup>a</sup>	2.381±0.161 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与 Wistar+NS 组相比; b 为  $P<0.05$ , 与 SHR+NS 组相比。

### 2.3 SCAD 重组腺病毒对血管重构的影响

与 Wistar+NS 组相比, SHR+NS 组大鼠血管中的 ROS 含量增加, 血管外壁的胶原增多, 血管中层的弹性纤维含量降低, 细胞凋亡率增加, 血管的管腔直径变小, 血管内膜增生明显; 然而, 经 SCAD 重组腺病毒处理 8 周的 SHR, 以上血管重构的现象均得到了明显改善。SCAD 重组腺病毒明显减少了血管中的 ROS 含量, 降低了血管外壁的胶原沉积, 减少了细胞凋亡, 增加了血管的管腔直径, 血管内膜

光滑。以上结果表明, SCAD 重组腺病毒能够明显改善高血压血管重构(图 3 和表 2)。

### 2.4 SCAD 重组腺病毒对大鼠游离脂肪酸、ATP 及 NO 含量的影响

与 Wistar+NS 组相比, SHR+NS 组大鼠的游离脂肪酸含量明显增高, ATP 和 NO 合成减少。SHR 经 SCAD 重组腺病毒治疗后, 血清和主动脉中的游离脂肪酸含量均出现明显减少, ATP 和 NO 合成增加。表明 SCAD 重组腺病毒给药 8 周, 能显著增加

SHR 的脂肪酸  $\beta$  氧化能力,从而减少主动脉中的游离脂肪酸含量,增加 ATP 产生和 NO 释放(表 3)。

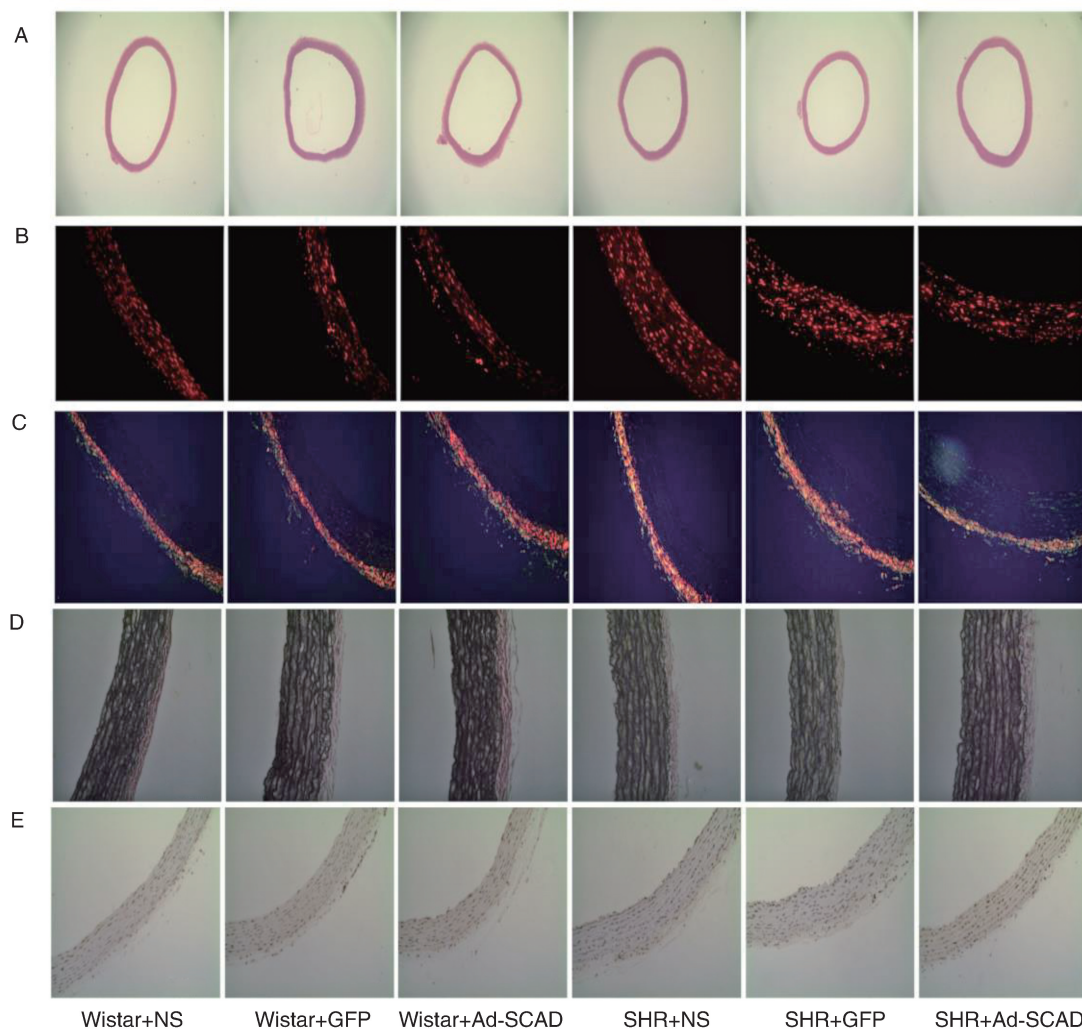


图 3. 各组大鼠血管重构相关指标的变化( $n=3$ ) A 为 HE 染色(40 $\times$ ),B 为 DHE 染色(200 $\times$ ),C 为天狼星红染色(200 $\times$ ),D 为 EVG 染色(400 $\times$ ),E 为 TUNEL 染色(200 $\times$ )。

Figure 3. Phenomena of vascular remodeling with adenovirus treatment in SHR( $n=3$ )

表 2. SCAD 腺病毒治疗对高血压血管重构的影响( $n=3$ )

Table 2. The effect of Ad-SCAD treatment on vascular remodeling in hypertension( $n=3$ )

指标	Wistar+NS 组	Wistar+GFP 组	Wistar+Ad-SCAD 组	SHR+NS 组	SHR+GFP 组	SHR+Ad-SCAD 组
平均荧光强度	476.6 $\pm$ 68.6	435.1 $\pm$ 8.3	278.6 $\pm$ 44.6 <sup>a</sup>	863.4 $\pm$ 41.6 <sup>a</sup>	936.3 $\pm$ 164.7 <sup>a</sup>	487.8 $\pm$ 10.0 <sup>b</sup>
组织胶原(%)	2.594 $\pm$ 0.453	2.602 $\pm$ 0.235	2.674 $\pm$ 0.723	4.912 $\pm$ 0.305 <sup>a</sup>	6.428 $\pm$ 1.246 <sup>a</sup>	2.711 $\pm$ 0.660 <sup>b</sup>
血管弹性纤维(%)	8.967 $\pm$ 0.652	8.768 $\pm$ 1.120	8.639 $\pm$ 0.987	4.669 $\pm$ 1.008 <sup>a</sup>	5.385 $\pm$ 0.868 <sup>a</sup>	9.109 $\pm$ 0.825 <sup>b</sup>
凋亡(%)	1.529 $\pm$ 0.188	2.016 $\pm$ 0.216	1.330 $\pm$ 0.38682	3.536 $\pm$ 0.692 <sup>a</sup>	3.335 $\pm$ 0.114 <sup>a</sup>	1.822 $\pm$ 0.518 <sup>b</sup>
血管壁厚度/管腔直径	0.0721 $\pm$ 0.0118	0.0724 $\pm$ 0.0211	0.0609 $\pm$ 0.0068	0.1044 $\pm$ 0.0080 <sup>a</sup>	0.0960 $\pm$ 0.0085 <sup>a</sup>	0.0806 $\pm$ 0.0023 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.05$ , Wistar+NS 组相比; b 为  $P<0.05$ , 与 SHR+NS 组相比。

## 2.5 SCAD 重组腺病毒对大鼠主动脉细胞凋亡及氧化应激相关蛋白表达的影响

采用 Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3 的蛋白表达,结果发现,与 Wistar+NS 组相比,SHR 组大鼠主动脉的 cleaved

Caspase-3 和 Bax 蛋白表达明显增加, Bcl-2 蛋白表达明显降低;SHR 组经 SCAD 重组腺病毒给药 8 周后,cleaved Caspase-3 和 Bax 蛋白表达明显降低, Bcl-2 蛋白表达明显增加。SCAD 重组腺病毒给药 8 周后,能够激活 eNOS 的磷酸化水平,降低主动脉氧

化应激反应,使得 p-eNOS 蛋白表达相对增加,NOX-2 表达降低,NOX-4 表达增加。以上结果表明,

SCAD 能够减轻 SHR 主动脉中的氧化应激反应,减少主动脉中细胞凋亡现象(图 4)。

表 3. SCAD 腺病毒治疗对大鼠脂肪酸氧化代谢和 NO 生成的影响( $n=3$ )

Table 3. Effect of Ad-SCAD treatment on fatty acid oxidation and NO production in rats( $n=3$ )

分组	血清游离脂肪酸含量 ( $\mu\text{mol/L}$ )	组织游离脂肪酸含量 ( $\text{nmol/g}$ )	ATP 含量 ( $\mu\text{mol/g}$ )	组织 NO 含量 ( $\mu\text{mol/g}$ )
Wistar+NS 组	313.8 $\pm$ 87.5	6.35 $\pm$ 1.22	0.05315 $\pm$ 0.00998	63.58 $\pm$ 4.17
Wistar+GFP 组	343.8 $\pm$ 34.6	6.61 $\pm$ 1.72	0.06160 $\pm$ 0.01133	56.70 $\pm$ 4.82
Wistar+Ad-SCAD 组	263.8 $\pm$ 25.0	3.27 $\pm$ 0.63 <sup>a</sup>	0.07956 $\pm$ 0.00572 <sup>a</sup>	73.02 $\pm$ 8.25 <sup>a</sup>
SHR+NS 组	388.8 $\pm$ 75.0 <sup>a</sup>	9.86 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	0.03519 $\pm$ 0.00577 <sup>a</sup>	26.41 $\pm$ 7.08 <sup>a</sup>
SHR+GFP 组	382.9 $\pm$ 17.0 <sup>a</sup>	11.55 $\pm$ 0.67 <sup>a</sup>	0.03822 $\pm$ 0.00540 <sup>a</sup>	29.31 $\pm$ 6.40 <sup>a</sup>
SHR+Ad-SCAD 组	251.3 $\pm$ 12.5 <sup>b</sup>	4.41 $\pm$ 1.35 <sup>b</sup>	0.05679 $\pm$ 0.00655 <sup>b</sup>	46.54 $\pm$ 10.59 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.05$ , Wistar+NS 组相比; b 为  $P<0.05$ , 与 SHR+NS 组相比。

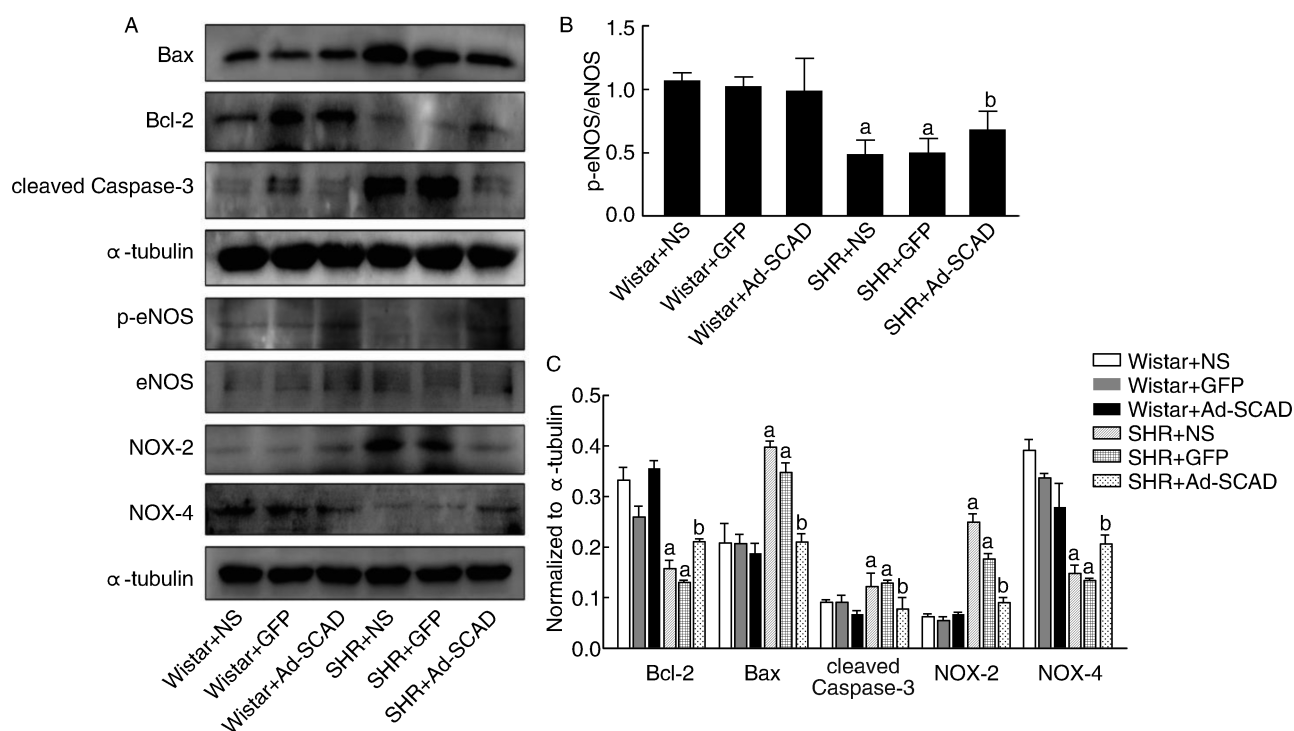


图 4. 各组大鼠主动脉细胞凋亡相关蛋白表达及氧化应激情况( $n=3$ ) A 为蛋白免疫印迹图; B 为相对于 eNOS, 目的蛋白 p-eNOS (ser1177) 表达量; C 为相对于内参  $\alpha$ -tubulin, 目的蛋白的表达量。a 为  $P<0.05$ , Wistar+NS 组相比; b 为  $P<0.05$ , 与 SHR+NS 组相比。

Figure 4. Expression of apoptosis-related proteins and oxidative stress in aorta of every group( $n=3$ )

### 3 讨论

近年来,中国的心血管疾病患病率处于持续上升阶段,心血管疾病的死亡率占比最高,超过 40% 的中国人死于心血管疾病,而高血压的治疗率和血压控制率仍不容乐观<sup>[6]</sup>。如何逆转血管重构,减轻高血压导致的靶器官损伤,成为高血压研究领域迫切需要解决的问题。

血管重构是血管对管腔内压力、流量的变化及血

管壁损伤的结构适应性改变。血管重构的过程分为 4 个环节:信号的感受、信号的转导、调节因子的释放和血管结构的变化<sup>[1]</sup>。高血压时,剪切力的变化、血管壁张力的变化及血液中的 AngII、炎症因子、脂蛋白等因素作为信号被血管内皮细胞感受后,通过多种信号分子传递途径传导到其它的效应器和感受器,引起调节血管因子的释放,进而导致血管结构和功能的变化,如血管管壁增厚及内径变小、血管阻力增大、血管的反应性增加、血管的顺应性降低<sup>[7]</sup>。

NO 是维持血管基本张力的重要调节剂<sup>[8-10]</sup>。在生理条件下,血管内皮细胞释放 NO 以保证血管的舒张功能。基础的 NO 释放对维持血流动力学的自身平衡起重要作用。高血压状态下,ROS(NO 灭活剂)生成增加、NO 合成受损,这些改变可引起血管内皮功能损伤,血管痉挛性收缩,血管壁僵硬,血管阻力升高,从而进一步加剧高血压的进程<sup>[11-14]</sup>。

大量研究证实,脂肪酸氧化代谢紊乱、内源性脂肪酸的过度累积、ROS 大量产生是引起血管内皮功能障碍的主要原因<sup>[15-17]</sup>。高浓度的游离脂肪酸能破坏血管功能的平衡,刺激血管组织中 ROS 增多,使氧化应激反应性增高,从而使血管重构进程加快。线粒体维持着 ROS 的产生和消除平衡。生理性的 ROS 调节线粒体膜的通透性,促进细胞增殖;ROS 过度积累不能被有效清除时,会促进细胞凋亡,对细胞结构造成损伤<sup>[16]</sup>。有研究表明,游离脂肪酸沉积会导致进入线粒体的游离脂肪酸不能及时被代谢,导致线粒体膜电位改变,影响线粒体的电子传递链,使线粒体功能紊乱,ROS 平衡被打破<sup>[17]</sup>。

SCAD 参与脂肪酸代谢,在线粒体中发挥重要作用。本研究发现,与 Wistar 大鼠相比,SHR 出现了显著的高血压和血管重构。给予 SCAD 重组腺病毒治疗 8 周后的 SHR,其血压明显降低,血管腔直径增大,血管内膜增生性脱落现象改善,中膜厚度减小,血管弹性纤维恢复正常,外膜胶原沉积明显减少,表明 SCAD 过表达具有显著降低 SHR 血压、改善血管重构的作用。与 Wistar 大鼠相比,SHR 血清和主动脉中的 ATP 合成减少,游离脂肪酸含量显著增高,ROS 生成增加,NO 合成减少,细胞凋亡增加。在给予 SCAD 重组腺病毒治疗 8 周后,SHR 主动脉中 ATP 合成增加,游离脂肪酸和 ROS 含量显著减少,促凋亡蛋白 Bax 表达明显下调,促凋亡蛋白 Caspase-3 剪切体明显下调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显增加,凋亡细胞明显减少。此外,SCAD 过表达显著提高了 eNOS 的磷酸化水平,使主动脉中 NO 合成增加。以上结果表明,SCAD 重组腺病毒治疗通过增强脂肪酸  $\beta$  氧化能力,有效地减少高血压引起的内源性游离脂肪酸堆积,从而减少 ROS 的产生,增加 NO 合成,改善氧化应激引起的主动脉损伤,减少细胞凋亡,达到改善 SHR 高血压及血管重构的作用。

综上所述,SCAD 与高血压血管重构有着密切的联系,SCAD 重组腺病毒在治疗高血压血管重构中发挥着重要的作用,这为高血压及血管重构的防治提供了一种新方法,为新药研发提供了一个新靶点。然而,SCAD 过表达改善高血压及血管重构的

作用机制,还有待进一步深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Lee RM, Dickhout JG, Sandow SL. Vascular structural and functional changes: their association with causality in hypertension: models, remodeling and relevance [J]. *Hypertens Res*, 2017, 40(4): 311-323.
- [2] 李璐含, 仇红刚. 高血压血液微循环功能障碍及其机制研究进展 [J]. *微循环学杂志*, 2019, 29(3): 64-68.
- [3] Ikeda Y, Okamura-Ikeda K, Tanaka K. Spectroscopic analysis of the interaction of rat liver short chain, medium chain and long chain acyl-CoA dehydrogenases with acyl-CoA substrates [J]. *Biochemistry*, 1985, 24(25): 7192-7199.
- [4] Huang J, Xu L, Zhou S, et al. Changes in short-chain acyl-coa dehydrogenase during rat cardiac development and stress [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(7): 1672-1688.
- [5] 李忠洪, 舒朝辉, 廖英勤, 等. 短链酰基辅酶 A 脱氢酶在高血压血管重构中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(2): 251-257.
- [6] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(3): 209-220.
- [7] Geng J, Zhao Z, Yang L, et al. Protein kinase D was involved in vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2019, 41(4): 299-306.
- [8] Kraehling JR, Sessa WC. Contemporary approaches to modulating the nitric oxide-cGMP pathway in cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2017, 120(7): 1174-1182.
- [9] Konukoglu D, Uzun H. Endothelial dysfunction and hypertension [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 956: 511-540.
- [10] 李苗, 王丽丽, 常冰梅. 血管内皮细胞功能损伤机制的研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(8): 730-736.
- [11] Olsen RK, Cornelius N, Gregersen N. Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism [J]. *J Inher Metab Dis*, 2015, 38(4): 703-719.
- [12] Yang G, Chu PL, Rump LC, et al. ACE2 and the homolog collectrin in the modulation of nitric oxide and oxidative stress in blood pressure homeostasis and vascular injury [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26(12): 645-659.
- [13] Mancia G, Hall JE. Introduction to a compendium on the pathophysiology and treatment of hypertension [J]. *Circ Res*, 2019, 124(7): 967-968.
- [14] Santos-Parker JR, Strahler TR, Bassett CJ, et al. Curcumin supplementation improves vascular endothelial function in healthy middle-aged and older adults by increasing nitric oxide bioavailability and reducing oxidative stress [J]. *Aging*, 2017, 9(1): 187-208.
- [15] Ghosh A, Gao L, Thakur A, et al. Role of free fatty acids in endothelial dysfunction [J]. *J Biomed Sci*, 2017, 24(1): 50.
- [16] Schoors S, Bruning U, Missiaen R, et al. Fatty acid carbon is essential for dNTP synthesis in endothelial cells [J]. *Nature*, 2015, 520(7546): 192-197.
- [17] Rogers GW, Nadanaciva S, Swiss R, et al. Assessment of fatty acid beta oxidation in cells and isolated mitochondria [J]. *Curr Protoc Toxicol*, 2014, 60: 1-19.

(此文编辑 许雪梅)