

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.10.020

论著 · 实验研究

硫化氢供体对动脉粥样硬化大鼠肾上腺髓质素及心钠素的影响

李薇 杜军保 金红芳

(北京大学第一医院儿科, 北京 100034)

【摘要】目的 内源性硫化氢(H_2S)作为心血管调节的新型气体信号分子,在动脉粥样硬化(AS)发生发展中发挥重要保护作用。本研究拟探讨 H_2S 供体对AS大鼠肾上腺髓质素(ADM)和心钠素(ANP)的影响。**方法** 雄性SD大鼠随机分为对照组、AS组和AS+NaHS组。AS组和AS+NaHS组大鼠给予连续3 d腹腔注射维生素 D_3 及高脂饲料连续喂养8周。AS+NaHS组大鼠腹腔注射 H_2S 供体NaHS。油红O染色法观察大鼠主动脉根部及冠状动脉斑块面积变化;敏感硫电极法测量血浆 H_2S 含量;放射免疫法检测血浆ADM及ANP含量。**结果** 与对照组相比,AS大鼠主动脉根部及冠状动脉可见明显AS斑块形成,血浆 H_2S 含量明显降低,ADM含量升高,ANP含量明显降低($P<0.01$)。给予NaHS干预8周后,AS大鼠的上述改变被逆转,表现为AS+NaHS组大鼠主动脉根部及冠状动脉AS斑块面积明显缩小,血浆 H_2S 含量明显升高,ADM含量明显降低,ANP含量显著升高($P<0.01$)。**结论** H_2S 对AS大鼠血管活性多肽ADM、ANP具有重要的调节作用。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(10): 1119-1123]

【关键词】 硫化氢;动脉粥样硬化;肾上腺髓质素;心钠素;大鼠

Effects of hydrogen sulfide donor on production of adrenomedullin and atrial natriuretic peptide in rats with atherosclerosis

LI Wei, DU Jun-Bao, JIN Hong-Fang. Department of Pediatrics, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China (Jin H-F, Email: jinhongfang51@126.com)

Abstract: Objective Endogenous hydrogen sulfide (H_2S), a novel gasotransmitter in cardiovascular regulation, plays an important protective role in the development and progression of atherosclerosis (AS). This study was designed to explore the effects of H_2S donor on the production of adrenomedullin (ADM) and atrial natriuretic peptide (ANP) in AS rats. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group ($n=10$), AS group ($n=10$), and AS+NaHS group ($n=10$). Rats in the AS and AS+NaHS groups were given 3-day intraperitoneal injections of vitamin D_3 and 8-week high-fat diet to induce AS, and the rats in the AS+NaHS group were intraperitoneally injected with H_2S donor NaHS. Oil red O staining was applied to detect changes in the areas of the atherosclerotic plaques in the aortic root and the coronary artery; sulfide-sensitive electrode method was used to measure the plasma concentration of H_2S . ADM and ANP levels in plasma were determined by radioimmunoassay. **Results** Compared with the control group, marked atherosclerotic plaques were observed in the aortic root and the coronary artery in AS rats. Moreover, plasma H_2S level decreased significantly, ADM level increased, and ANP level decreased significantly in AS rats ($P<0.01$). However, after the treatment with H_2S donor NaHS for 8 weeks, the above changes in AS rats were reversed, demonstrated by significantly reduced areas of the atherosclerotic plaques in both the aortic root and the coronary artery, significantly increased plasma H_2S level, significantly decreased plasma ADM level, and significantly increased plasma ANP level ($P<0.01$). **Conclusions** H_2S plays an important regulatory effect on vasoactive peptides ADM and ANP in AS rats.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(10): 1119-1123]

Key words: Hydrogen sulfide; Atherosclerosis; Adrenomedullin; Atrial natriuretic peptide; Rats

[收稿日期] 2015-01-27; [接受日期] 2015-04-18

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(31130030);北京市自然科学基金(7121014);教育部博士学科点专项科研基金(20130001120047)。

[作者简介] 李薇,女,博士,医师。现工作单位:中日友好医院儿科,邮编:100029。

[通信作者] 金红芳,女,研究员。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种以脂质沉积、斑块形成、动脉管腔狭窄为特征的慢性炎症病理改变, 其发病机制仍未完全阐明。文献报道 AS 可发生于儿童时期^[1-2]。近年研究发现, 硫化氢 (hydrogen sulfide, H₂S) 能够在心血管组织中主要经胱硫醚-γ-裂解酶 (cystathionine-γ-lyase, CSE) 代谢生成, 被认为是心血管系统的新型气体信号分子^[3-4], 本课题组前期研究发现在 AS 的发病过程中存在 CSE/H₂S 通路的紊乱, 而 H₂S 能够通过抑制 ICAM-1 的表达发挥抗 AS 作用^[5], H₂S 在 AS 中的保护效应也日益受到广泛关注^[6-7], 越来越多的研究指出 H₂S 对 AS 具有潜在的治疗效应^[8-9]。肾上腺髓质素 (adrenomedullin, ADM) 和心钠素 (atrial natriuretic peptide, ANP) 均为重要的血管活性多肽, 对维持心血管系统稳态具有重要作用, 是参与 AS 发生发展的重要分子标志物之一。但是作为气体信号分子的 H₂S 对 AS 发生发展过程中血管活性肽 ADM 及 ANP 的表达是否产生影响, 目前尚不清楚。NaHS 在体内能够转化生成 H₂S, 作为 H₂S 供体是研究内源性 H₂S 生物学效应公认的工具药, 在本研究中以 NaHS 作为 H₂S 供体, 在 AS 大鼠模型中研究 H₂S 对 ADM 及 ANP 表达的调节作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型的建立、标本取材

雄性 SD 大鼠 (购自北京大学第一医院动物实验中心) 30 只, 体重 200~220 g, 随机分为 3 组: 对照组、AS 组和 AS+NaHS 组 ($n=10$)。AS 组和 AS+NaHS 组大鼠按每只 700 000 U/kg 的总剂量腹腔注射维生素 D₃, 分 3 d 给药, 随后给予高脂饲料 (2% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、0.2% 丙基硫氧嘧啶、10% 猪油、5% 白糖和 82.3% 基础饲料) 连续喂养 8 周^[10]。三组大鼠常规饲养条件相同。AS+NaHS 组大鼠腹腔注射 H₂S 供体 NaHS (每日 56 μmol/kg, 共 8 周), 对照组和 AS 组大鼠每日腹腔内注射相同剂量的生理盐水。

高脂喂养 8 周后, 应用 20% 乌拉坦 (10 mL/kg) 腹腔注射对大鼠进行麻醉, 经腹主动脉取血, 分离血浆, 用于 H₂S 含量及 ADM、ANP 浓度的测定, 分别分离主动脉近心端组织约 0.5 cm² 及冠状动脉

起始部连同心肌组织约 0.3 cm² 大小, 用于主动脉和冠状动脉粥样硬化病变的评估。

1.2 主动脉和冠状动脉 AS 病变的评估

取分离的主动脉近心端组织及冠状动脉起始部连同心肌组织, 应用 4% 多聚甲醛固定 8 h, 去离子水冲洗后浸泡至 20% 蔗糖溶液中, 待 OCT 包埋, 制备冰冻切片。将主动脉根部及冠状动脉起始部组织冰冻切片进行油红 O 染色, 莱卡图像分析系统对油红 O 染色阳性的粥样硬化病变面积进行分析。病变面积百分比计算方法是主动脉根部 (或冠状动脉) 油红 O 染色阳性的面积除以主动脉内膜和中膜总面积 (或冠状动脉总面积)。

1.3 血浆 H₂S 含量的测定

动脉取血在 4℃ 条件下, 3 000 转/min 离心 10 min 分离血浆, 用敏感硫电极法 (PXS-270, 上海) 测定血浆中的 H₂S 含量。取 0.5 mL 的血浆及标准溶液分别与等体积抗氧化液充分混合后, 将敏感硫电极与参比电极同时浸入, 待读数稳定后记录, 根据 S²⁻ 溶液的标准曲线计算出血浆中 H₂S 的含量。

1.4 血浆 ADM 及 ANP 浓度的测定

动脉血予 EDTA 和抑肽酶抗凝, 4℃ 条件下, 3 000 转/min, 离心 10 min, 取上清得到血浆。血浆 ADM 及 ANP 含量的测定应用放射免疫试剂盒 (解放军总医院放射免疫所, 北京, 中国)。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计学分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠主动脉根部及冠状动脉 AS 斑块的面积分析

各组大鼠主动脉根部 AS 斑块面积比较差异有统计学意义 ($F=155.62$, $P < 0.001$)。对照组大鼠主动脉根部无粥样硬化斑块形成, AS 组大鼠主动脉根部出现明显的 AS 斑块 ($12.2\% \pm 2.8\%$, $P < 0.01$); AS+NaHS 组大鼠主动脉根部粥样硬化斑块面积较 AS 组显著缩小 ($1.5\% \pm 0.9\%$, $P < 0.01$), 与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 1~2。

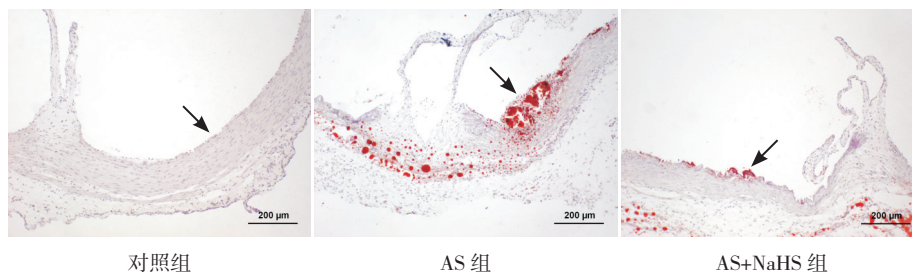


图 1 各组大鼠主动脉根部粥样硬化斑块比较（油红 O 染色， $\times 100$ ） 对照组大鼠主动脉根部无粥样硬化斑块形成（箭头所示）；AS 组大鼠主动脉根部出现明显的粥样硬化斑块（箭头所示）；AS+NaHS 组大鼠主动脉根部粥样硬化斑块面积较 AS 组显著缩小（箭头所示）。

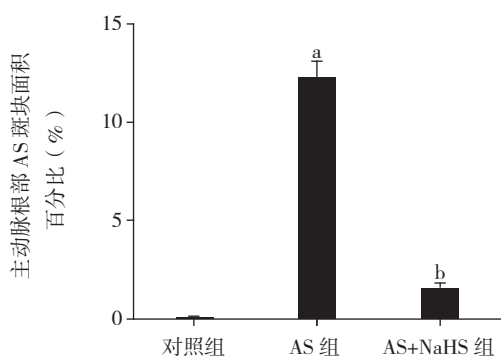


图 2 各组大鼠主动脉根部 AS 斑块面积比较 ($n=10$)
a 示与对照组比较, $P<0.01$; b 示与 AS 组比较, $P<0.01$ 。

各组大鼠冠状动脉 AS 斑块面积比较差异有统计学意义 ($F=144.89$, $P<0.001$)。对照组大鼠冠状动脉无粥样硬化斑块形成, AS 组大鼠冠状动脉出现明显的 AS 斑块 ($20.5\% \pm 4.8\%$, $P<0.01$)；AS+NaHS 组大鼠冠状动脉 AS 斑块面积较 AS 组显著缩小 ($P<0.01$)，但仍大于对照组 ($P<0.01$)。见图 3~4。

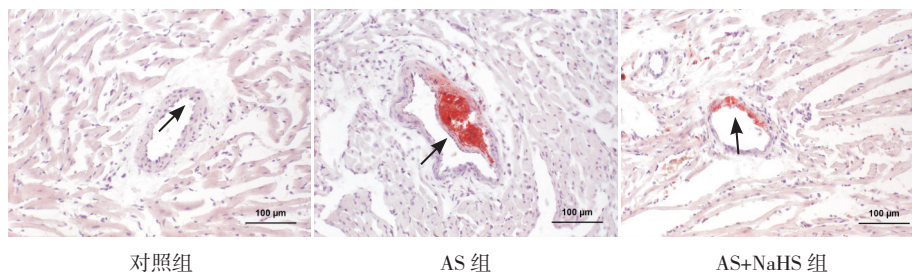


图 3 各组大鼠冠状动脉 AS 斑块比较（油红 O 染色， $\times 200$ ） 对照组大鼠冠状动脉无明显 AS 斑块形成（箭头所示）；AS 组大鼠冠状动脉形成明显的 AS 斑块（箭头所示）；AS+NaHS 组大鼠冠状动脉 AS 斑块面积显著缩小（箭头所示）。

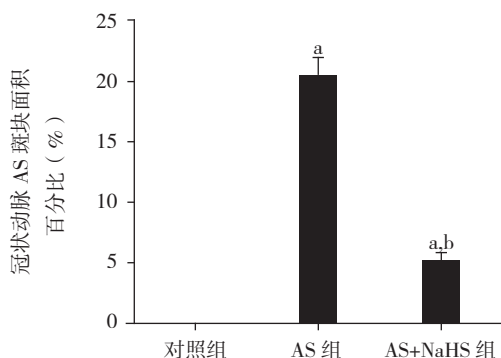


图 4 各组大鼠冠状动脉 AS 斑块面积比较 ($n=10$)
a 示与对照组比较, $P<0.01$; b 示与 AS 组比较, $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠血浆 H_2S 、ADM 和 ANP 测定结果

各组大鼠血浆 H_2S 、ADM 和 ANP 含量比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)。与对照组比较, AS 组大鼠血浆 H_2S 和 ANP 含量明显降低, 而 ADM 含量明显升高 ($P<0.01$)；给予 NaHS 后, AS 大鼠血浆 H_2S 和 ANP 含量显著升高, ADM 含量明显下降 ($P<0.01$)。AS+NaHS 组大鼠与对照组比较, 血浆 H_2S 升高 ($P<0.05$)，ANP 及 ADM 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血浆 H₂S、ADM、ANP 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	H ₂ S(μmol/L)	ADM(pg/mL)	ANP(pg/mL)
对照组	10	27.4 ± 1.6	53 ± 10	138 ± 42
AS 组	10	21.9 ± 3.0 ^a	74 ± 16 ^a	82 ± 25 ^a
AS+NaHS 组	10	32.3 ± 6.3 ^{b,c}	58 ± 10 ^c	132 ± 22 ^c
F 值		16.058	7.721	10.009
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注: a 示与对照组比较, $P < 0.01$; b 示与对照组比较, $P < 0.05$; c 示与 AS 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

AS 是众多心血管疾病共同的病理基础, 阐明其发病机制是心血管领域的研究热点和难点。H₂S 作为一种新型内源性气体信号分子, 具有广泛的心血管生物学特性, 并参与 AS 的发生发展^[5-7]。研究表明高脂饮食小鼠肝组织 CSE 表达减少, H₂S 生成明显不足^[11], 内源性 H₂S 生成减少可显著促进 AS 的形成^[12], 而过表达 CSE 基因或给予 H₂S 供体均能够明显抑制 AS 的形成^[13-14]; 临床研究发现, 北京地区血脂紊乱儿童的 H₂S 水平与血脂成分异常具有明确的相关性^[15], 血浆 H₂S 水平在成人心血管疾病患者中也发生着不同程度的改变^[16]。本研究以大剂量维生素 D 及高脂饮食喂养构建大鼠 AS 模型, 发现 AS 大鼠主动脉根部和冠状动脉出现明显的 AS 斑块, 而应用 H₂S 供体 NaHS 干预后, AS 斑块面积显著减小, 提示 H₂S 能够显著地抑制 AS 斑块形成。分析其原因, 可能与 H₂S 可通过维持内皮功能稳态、抑制血管平滑肌细胞增殖、调节炎症反应和抑制氧化应激等途径来拮抗 AS 的形成有关^[17-20]。

血管活性多肽是由心血管系统合成和分泌的小分子活性物质, 对 AS 相关心血管疾病的诊断治疗发挥重要作用^[21]。ADM 是一种由 52 个氨基酸组成的血管活性肽, 广泛分布于机体的各种组织和器官中, 并对心血管系统具有重要的调节作用。研究认为, AS 的危险因素能够促使血浆 ADM 升高, 补充 ADM 能够缓解 apoE^{-/-} 小鼠主动脉 AS 的发展^[22], 此作用可能与其改善内皮功能、抑制血管平滑肌细胞的增殖和迁移、影响动脉硬化斑块发展早期血流动力学的改变有关^[23-24]。本研究发现, AS 组大鼠血浆 ADM 含量明显增高, 考虑与机体在病理损伤过程中反应性激活保护性因子 ADM 生成有关;

而给予 NaHS 能够降低血浆 ADM 含量, 可能是因为随着体内 H₂S 含量回升, 可改善内皮功能及调节血管平滑肌的增殖, AS 的损伤程度明显减轻。

ANP 是由 126 个氨基酸组成的多肽, 是由心房肌细胞产生和分泌的一种多肽激素, 其通过与受体结合, 引起 cGMP 水平升高, 发挥有效的利尿、利钠、舒张血管的作用, 进而维持水盐平衡及血压的稳定, 对心血管系统具有十分重要的调节作用^[25]。研究认为, ANP 能够降低内皮细胞渗透性, 调节细胞凋亡, 抑制平滑肌细胞增殖和迁移和氧化应激^[26-29]。本研究发现 AS 组大鼠血浆 ANP 含量明显下降; 而给予 NaHS 能够使血浆 H₂S 水平接近正常, 同时升高血浆 ANP 的含量, 提示 NaHS 可通过提高血浆 ANP 来拮抗 AS 形成。

综上, 本研究发现, 应用 H₂S 供体 NaHS 可以抑制 AS 大鼠主动脉和冠状动脉 AS 斑块的形成和发展, 其对 ADM 及 ANP 具有一定的调节作用, 虽然其具体作用环节及详细机制尚待进一步研究, 但此研究为 AS 为模型的疾病状态下气体信号分子与心血管活性物质之间的相互关系的研究提供了研究基础。

[参 考 文 献]

- [1] Herouvi D, Karanasios E, Karayianni C, et al. Cardiovascular disease in childhood: the role of obesity[J]. Eur J Pediatr, 2013, 172(6): 721-732.
- [2] Berenson GS, Srinivasan SR, Bao W, et al. Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults[J]. N Engl J Med, 1998, 338(23): 1650-1656.
- [3] Yu XH, Cui LB, Wu K, et al. Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent[J]. Clin Chim Acta, 2014, 437: 78-87.
- [4] 王新宝, 金红芳, 杜军保. 新型气体信号分子硫化氢在心血管疾病中的意义[J]. 中国当代儿科杂志, 2009, 11(9): 790-793.
- [5] Wang Y, Zhao X, Jin H, et al. Role of hydrogen sulfide in the development of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29(2): 173-179.
- [6] Mani S, Untereiner A, Wu L, et al. Hydrogen sulfide and the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 20(5): 805-817.
- [7] Qiao W, Chaoshu T, Hongfang J, et al. Endogenous hydrogen sulfide is involved in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(2): 182-186.
- [8] Xu S, Liu Z, Liu P. Targeting hydrogen sulfide as a promising therapeutic strategy for atherosclerosis[J]. Int J Cardiol, 2014,

- 172(2): 313-317.
- [9] Lynn EG, Austin RC. Hydrogen sulfide in the pathogenesis of atherosclerosis and its therapeutic potential[J]. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 2011, 4(1): 97-108.
- [10] Huang ZY, Yang PY, Almofti MR, et al. Comparative analysis of the proteome of left ventricular heart of arteriosclerosis in rat[J]. *Life Sci*, 2004, 75(26): 3103-3115.
- [11] Peh MT, Anwar AB, Ng DS, et al. Effect of feeding a high fat diet on hydrogen sulfide (H₂S) metabolism in the mouse[J]. *Nitric Oxide*, 2014, 41: 138-145.
- [12] Mani S, Li H, Untereiner A, et al. Decreased endogenous production of hydrogen sulfide accelerates atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2013, 127(25): 2523-2534.
- [13] Cheung SH, Kwok WK, To KF, et al. Anti-atherogenic effect of hydrogen sulfide by over-expression of cystathionine gamma-lyase (CSE) gene[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113038.
- [14] Liu Z, Han Y, Li L, et al. The hydrogen sulfide donor, GYY4137, exhibits anti-atherosclerotic activity in high fat fed apolipoprotein E-/- mice[J]. *Br J Pharmacol*, 2013, 169(8): 1795-1809.
- [15] 刘颖, 米杰, 丁亚光, 等. 北京地区部分儿童血脂现状调查及气体分子硫化氢在血脂紊乱中的变化 [J]. *北京大学学报 (医学版)*, 2006, 38(2): 146-150.
- [16] Peter EA, Shen X, Shah SH, et al. Plasma free H₂S levels are elevated in patients with cardiovascular disease[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(5): e000387.
- [17] Altaany Z, Moccia F, Munaron L, et al. Hydrogen sulfide and endothelial dysfunction: relationship with nitric oxide[J]. *Curr Med Chem*, 2014, 21(32): 3646-3661.
- [18] Baskar R, Sparatore A, Del Soldato P, et al. Effect of S-diclofenac, a novel hydrogen sulfide releasing derivative inhibit rat vascular smooth muscle cell proliferation[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 594(1-3): 1-8.
- [19] Wang XH, Wang F, You SJ, et al. Dysregulation of cystathionine γ-lyase (CSE)/hydrogen sulfide pathway contributes to ox-LDL-induced inflammation in macrophage[J]. *Cell Signal*, 2013, 25(11): 2255-2262.
- [20] Wen YD, Wang H, Kho SH, et al. Hydrogen sulfide protects HUVECs against hydrogen peroxide induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e53147.
- [21] Watanabe T, Sato K, Itoh F, et al. Emerging roles for vasoactive peptides in diagnostic and therapeutic strategies against atherosclerotic cardiovascular diseases[J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2013, 14(6): 472-480.
- [22] Pan CS, Zhang J, Yu F, et al. Adrenomedullin ameliorates the development of atherosclerosis in apoE-/- mice[J]. *Peptides*, 2010, 31(6): 1150-1158.
- [23] Nakayama M, Takahashi K, Murakami O, et al. Adrenomedullin in monocytes and macrophages: possible involvement of macrophage-derived adrenomedullin in atherogenesis[J]. *Clin Sci (Lond)*, 1999, 97(2): 247-251.
- [24] Gottsäter M, Ford LB, Ostling G, et al. Adrenomedullin is a marker of carotid plaques and intima-media thickness as well as brachial pulse pressure[J]. *J Hypertens*, 2013, 31(10): 1959-1965.
- [25] De Vito P. Atrial natriuretic peptide: an old hormone or a new cytokine[J]? *Peptides*, 2014, 58: 108-116.
- [26] Ichiki T1, Izumi R, Cataliotti A, et al. Endothelial permeability in vitro and in vivo: protective actions of ANP and omapatrilat in experimental atherosclerosis[J]. *Peptides*, 2013, 48: 21-26.
- [27] Larifla L, Déprez I, Pham I, et al. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and migration in vitro and neointimal hyperplasia in vivo by adenoviral-mediated atrial natriuretic peptide delivery[J]. *J Gene Med*, 2012, 14(7): 459-467.
- [28] Gao P, Huang L. New insights into the role of natriuretic peptides in the regulation of apoptosis in cardiovascular system [J]. *Saudi Med J*, 2009, 30(5): 595-604.
- [29] De Vito P, Incerpi S, Pedersen JZ, et al. Atrial natriuretic peptide and oxidative stress[J]. *Peptides*, 2010, 31(7): 1412-1419.

(本文编辑: 王庆红)