

## 硫化氢抑制局部肾素水平影响动脉粥样硬化的研究

周红<sup>1</sup>, 刘弈彤<sup>2</sup>, 梁小燕<sup>3</sup>, 戚晓红<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学基础医学实验教学示范中心, 江苏 南京 210029; <sup>2</sup>新加坡国立大学药理学系, 新加坡 117597; <sup>3</sup>南京医科大学病理生理学系, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的: 观察硫化氢(H<sub>2</sub>S)是否通过抑制局部肾素活性影响动脉粥样硬化(AS)。方法: 用高脂饲料结合维生素D3的方法建立大鼠动脉粥样硬化模型, 治疗组给予腹腔注射硫化氢钠(NaHS)56 μmol/(kg·d), 共计12周。用HE、油红O染色观察血管病理变化和脂质浸润, 放免法检测血浆及组织肾素活性, 免疫组化法观察血管局部肾素的表达。结果: 模型组血浆总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平明显升高, 血浆和动脉组织H<sub>2</sub>S水平显著降低, 动脉组织肾素水平明显增高。NaHS组血脂和血浆H<sub>2</sub>S水平有所改善, 动脉组织肾素水平降低, AS斑块和脂质浸润减少。结论: 局部肾素在AS中发挥重要作用, H<sub>2</sub>S能通过抑制动脉局部肾素表达产生抗AS作用。

**[关键词]** 动脉粥样硬化; 硫化氢; 肾素; 肾素-血管紧张素系统

**[中图分类号]** R543

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)09-1208-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20130907

## Hydrogen sulfide prevents atherosclerosis development via inhibition of local renin in the aortic tissue in the high fat treated rats

Zhou Hong<sup>1</sup>, Liu Yitong<sup>2</sup>, Liang Xiaoyan<sup>3</sup>, Qi Xiaohong<sup>3\*</sup>

(<sup>1</sup>Laboratory Center for Basic Medical Sciences, NJMU, Nanjing 210029, China; <sup>2</sup>Department of Pharmacology, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore 117597, Singapore; <sup>3</sup>Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate whether hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) can prevent atherosclerotic development via suppression of local renin activity. **Methods:** Rats in atherosclerotic model group (MG) were fed with high fat diet. H<sub>2</sub>S treatment were performed with NaHS 56 μmol/(kg·d) i.p. for 12 weeks. Aorta morphological changes were observed by HE and oil red O staining. The renin activity in plasma and tissue was detected by radio-immunity and the renin express in tissue was observed by immunostaining. **Results:** Endogenous H<sub>2</sub>S level in both plasma and aortic tissue was significantly decreased in MG, but the renin level was obviously increased in the aortic tissue. Exogenous application of NaHS prevented the elevated levels of serum lipids including total cholesterol, triglyceride, high-density lipoprotein-cholesterol, and low-density lipoprotein-cholesterol, and decreased the renin level in aortic tissue. Histology staining showed that NaHS treatment attenuated plaque formation and decreased lipid infiltration and accumulation in the plaque area in high fat treated rats. **Conclusion:** These data suggest that local renin is important in the AS development. Exogenous NaHS supplementation significantly prevents escalation of tissue renin expression. Hence, the present study presents a novel mechanism for the protective effect of H<sub>2</sub>S on atherosclerotic progression via inhibition of local renin expression in the aortic tissues.

**[Key words]** atherosclerosis; hydrogen sulfide; renin; renin angiotensin system

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1208-1213]

**[基金项目]** 江苏高校优势学科建设工程资助项目  
(JX10131801070, JX10131801095)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: qxh@njmu.edu.cn

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是严重危害人类健康的一大类疾病, 是世界范围的主要死亡原因。研究显示, 肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)不仅存在于循环中, 而且存在

于许多组织包括心血管中,通过自分泌和旁分泌发挥作用<sup>[1]</sup>。进一步研究显示,RAS通过多种途径影响AS的病程<sup>[2-4]</sup>。硫化氢(hydrogen sulphide, H<sub>2</sub>S)作为第3种气体信号分子,具有抗炎<sup>[5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>作用,能抑制细胞黏附分子的表达<sup>[7]</sup>,阻止巨噬细胞转化为泡沫细胞<sup>[8]</sup>,抑制氧化型低密度脂蛋白的表达<sup>[9]</sup>。因此,H<sub>2</sub>S被认为具有潜在的抗AS作用。然而,H<sub>2</sub>S抗AS作用是否与影响RAS活性有关还不清楚。本课题通过建立大鼠AS模型,研究H<sub>2</sub>S对肾素的影响,探讨其抗AS的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康SD大鼠24只,SPF级,雄性,体重(180±10)g(江苏省实验动物中心)。随机分为3组:模型组(MG)、硫化氢治疗组(NaHS)和对照组(CG),每组8只。实验前,将动物置于实验环境适应3d。室温(24±2)℃,每日光照与黑暗时间各12h,动物自由取食和水。

NaHS、油红O、对苯二胺硫酸盐(Sigma公司,美国);胆固醇、胆酸钠、丙基硫氧嘧啶(上海蓝季科技发展有限公司);维生素D<sub>3</sub>(VitD<sub>3</sub>,批号:090903,上海通用药业股份有限公司);碘<sup>[125I]</sup>血管紧张素I放射免疫分析药盒(北京北方生物技术研究所);兔源抗肾素抗体(Anaspec公司,美国),即用型组化二抗MaxVision、DAB显色液(福建迈新);其余试剂均为分析纯。

Leica石蜡、冰冻切片,日立7600-020全自动生化分析仪,Nikon光学显微镜,美国SONICS超声粉碎仪,国产752型紫外分光光度计。

### 1.2 方法

采用高脂饲料加VitD<sub>3</sub>方法复制大鼠动脉粥样硬化模型。模型组给予高脂饲料(标准饲料配方中加入2%胆固醇、0.5%胆酸钠、5%猪油、5%白糖、0.2%丙基硫氧嘧啶),同时于喂养前和喂养后第3、6、9周腹腔注射VitD<sub>3</sub>(3×10<sup>5</sup>U/kg)各1次,连续喂养12周。治疗组除予高脂饲料及VitD<sub>3</sub>外,每日腹腔注射NaHS 56 μmol/kg。对照组给予常规饲料,对照组及模型组每日腹腔注射生理盐水。连续给药12周。

#### 1.2.1 血脂检测

各组于喂养前眼眶取血;12周后,麻醉后颈总动脉插管取血,静置4h后离心,3000 r/min,10 min,取上清分装,以备检测血脂、血H<sub>2</sub>S。用日立全自动生

化分析仪检测血总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)。

#### 1.2.2 血浆和血管组织肾素含量检测

颈总动脉插管取血1 ml,放入预先已加入血管紧张素转化酶抑制剂的抗凝管中,混匀后置4℃ 1~2 h,2500 r/min,离心7 min,分离血浆。血管组织肾素检测样本为血管匀浆后的上清液(制备方法见下)。每个样品均取双份。送南京医科大学第一附属医院用放免分析仪检测血浆和血管肾素含量。酶抑制剂抗凝管的准备:1.5 ml EP管中顺序加入10 μl EDTA、5 μl 二巯基丙醇和10 μl 8-羟基喹啉硫酸盐混匀置4℃备用。

#### 1.2.3 血管组织匀浆液的制备

分离整个胸主动脉、腹主动脉至髂动脉分叉处。自主动脉根部起切下两段1 cm长的血管,分别用作石蜡切片和冰冻切片。剩余血管组织称重,加入冷PBS液,在冰面上剪碎并超声粉碎,制备成10%浓度的组织液,4℃离心,10000 r/min,10 min,取上清-80℃保存备用。

#### 1.2.4 血浆和血管组织H<sub>2</sub>S含量的检测

血浆和血管组织H<sub>2</sub>S含量的检测采用亚甲基蓝比色法:在10 ml离心管中顺序加入1%乙酸锌0.5 ml、待测血浆或组织上清0.1 ml、对苯二胺硫酸盐0.5 ml、三氯化铁0.5 ml,室温静置50 min后加入10%三氯醋酸1 ml、去离子水2.4 ml,3500 r/min离心,10 min,分光光度计测量波长670 nm处的吸光度。用NaHS溶液代替H<sub>2</sub>S溶液制作标准曲线,方法:去离子水精确配制500 μmol/L的NaHS溶液,倍比稀释为250.00、125.00、62.50、31.25 μmol/L,余步骤同前,测试波长670 nm处吸光度,制定标准曲线。

#### 1.2.5 组织学染色

HE染色:石蜡切片4 μm,脱蜡至水,常规HE染色,光学显微镜观察。油红O染色:冰冻切片10 μm,将切片捞于24孔板中,加入油红O工作液,避光染色60 min,60%异丙醇分化数秒,水洗,贴于载玻片上,苏木素染5~10 s,1%盐水酒精分化1~2 s,自来水洗10 min,风干后明胶甘油封片。Image J软件分析血管斑块面积与血管壁面积之比(%)。

#### 1.2.6 免疫组化

石蜡切片脱蜡至水,0.01 mol/L柠檬酸抗原修复液微波修复15 min,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20 min阻断内源性过氧化物酶,PBS洗3次×5 min,10%FBS封闭1 h后,加

一抗 Rabbit anti-Renin polyclonal antibody(1 : 400) 4℃过夜,PBS洗3次,二抗室温孵育15 min,DAB显色,苏木素复染,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS11.5 软件处理,数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血脂检测

血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 含量在喂养前各组之间无显著性变化;喂养后 12 周,模型组血清 TC 和 LDL-C 与对照组比较显著升高 ( $P < 0.01$ )、HDL-C 升高 ( $P < 0.05$ )、TG 无变化。NaHS 治疗组与模型组比较,血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 含量均降低

( $P < 0.05$ );但仍然比对照组高,且差异显著 ( $P < 0.01$ ,表 1)。

### 2.2 血浆及血管 H<sub>2</sub>S 水平

血浆中,NaHS 治疗组 H<sub>2</sub>S 水平最高,与对照组及模型组比较差异均显著 ( $P < 0.01$ );模型组 H<sub>2</sub>S 水平最低,与对照组比较有差异 ( $P < 0.05$ )。血管组织中,同样为模型组最低,与对照组比较差异显著 ( $P < 0.01$ ),与 NaHS 治疗组比较有差异 ( $P < 0.01$ );NaHS 治疗组 H<sub>2</sub>S 水平较对照组低,有差异 ( $P < 0.05$ ,表 2)。

### 2.3 血浆及血管肾素水平

血浆中,对照组肾素含量最高,与治疗组比较差异显著 ( $P < 0.01$ );NaHS 治疗组血浆肾素水平最低,与模型组比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。动脉中,模型组肾素水平最高,与对照组差异显著 ( $P < 0.01$ );NaHS 治疗组血管肾素水平较模型组降低,两者比较差异显著 ( $P < 0.01$ ,表 2)。

表 1 血脂水平变化

Table 1 The change of lipids in serum

(mmol/L,  $\bar{x} \pm s, n=8$ )

	0 周			12 周		
	对照组	模型组	治疗组	对照组	模型组	治疗组
TC	2.08 ± 0.23	2.02 ± 0.38	2.01 ± 0.35	2.03 ± 0.49	8.49 ± 3.84**	6.20 ± 3.21***
TG	1.02 ± 0.28	1.00 ± 0.24	0.97 ± 0.24	1.17 ± 0.50	1.38 ± 0.96	0.47 ± 0.22***
HDL-C	1.18 ± 0.19	1.15 ± 0.16	1.18 ± 0.19	1.12 ± 0.13	1.88 ± 0.68*	1.44 ± 0.28***
LDL-C	0.56 ± 0.09	0.54 ± 0.15	0.57 ± 0.13	0.55 ± 0.09	5.73 ± 2.91**	3.63 ± 2.92***

与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,\*\*\* $P < 0.05$ 。

表 2 血浆和动脉 H<sub>2</sub>S 与肾素水平

Table 2 The H<sub>2</sub>S and renin levels in blood plasma and aorta

( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

级别	H <sub>2</sub> S(μmol/L)		肾素[ng(ml·h)]	
	血浆	动脉	血浆	动脉
对照组	46.32 ± 3.46	54.04 ± 4.55	2.78 ± 1.42	2.63 ± 0.72
模型组	38.71 ± 2.59*	23.81 ± 9.45**	1.83 ± 0.42	5.44 ± 0.89**
治疗组	66.65 ± 7.66***	44.84 ± 8.09***	0.28 ± 0.33***	4.05 ± 0.46***

与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,\*\*\* $P < 0.01$ 。

### 2.4 主动脉 HE 染色

光镜下观察主动脉 HE 染色显示:对照组主动脉壁各层结构正常,内膜光滑,中膜弹力纤维正常,未见粥样硬化斑块。模型组在 12 周时可见典型的 AS 病理改变,表现为形成 AS 斑块,斑块内有片状或点状钙化,并有泡沫细胞积聚和炎性细胞浸润,内膜下大量平滑肌细胞增生。而同时给予 56 μmol/(kg·d) NaHS 处理后,病变有不同程度改善:2/3 大鼠主动脉管壁未见增厚,血管层次结构清晰,内膜完整,中膜平滑肌细胞未见明显增生

(图 1)。

### 2.5 主动脉油红 O 染色

油红 O 染色显示对照组血管壁内膜几乎无着色,说明无脂质浸润;模型组动脉粥样斑块处呈大片红色,脂质浸润明显;治疗组血管内膜只有少许红色,说明脂质浸润不明显(图 2)。模型组红色区域面积占血管面积比与对照组比较明显增大 [(24.94 ± 5.49)% vs (0.76 ± 1.12)%],差异显著 ( $P < 0.01$ );治疗组 [(4.85 ± 1.39)%]较模型组明显减少,差异显著 ( $P < 0.01$ )。

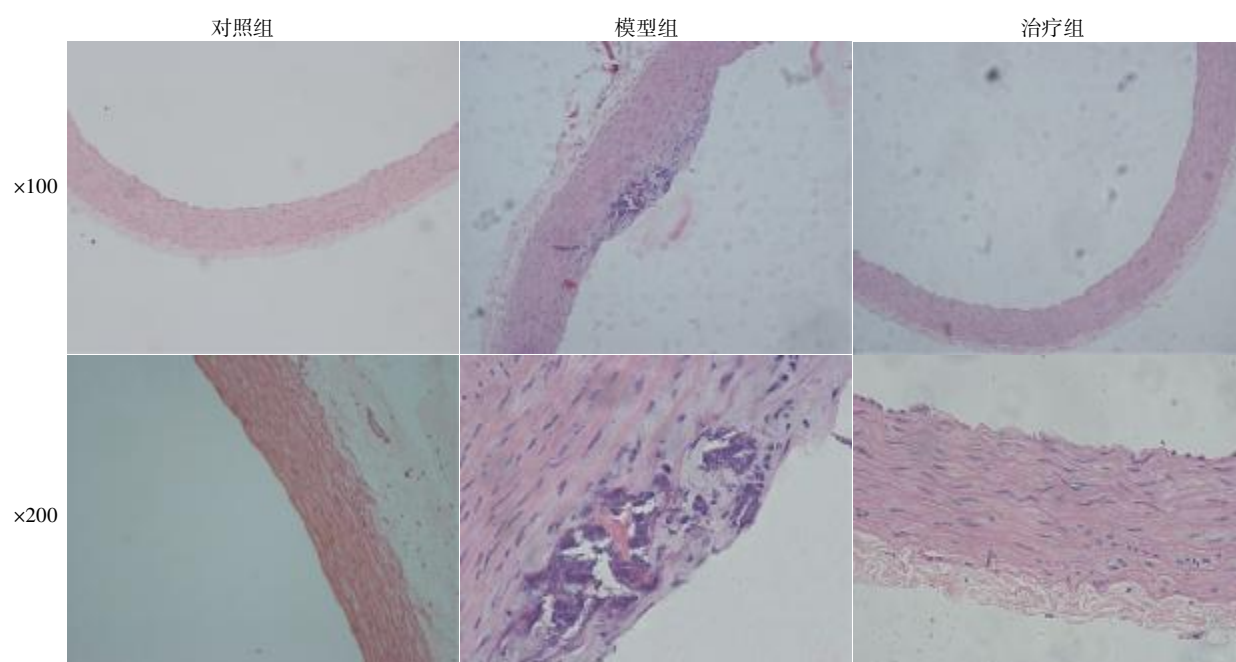


图 1 各组动脉 HE 染色

Figure 1 Aorta HE staining of all groups

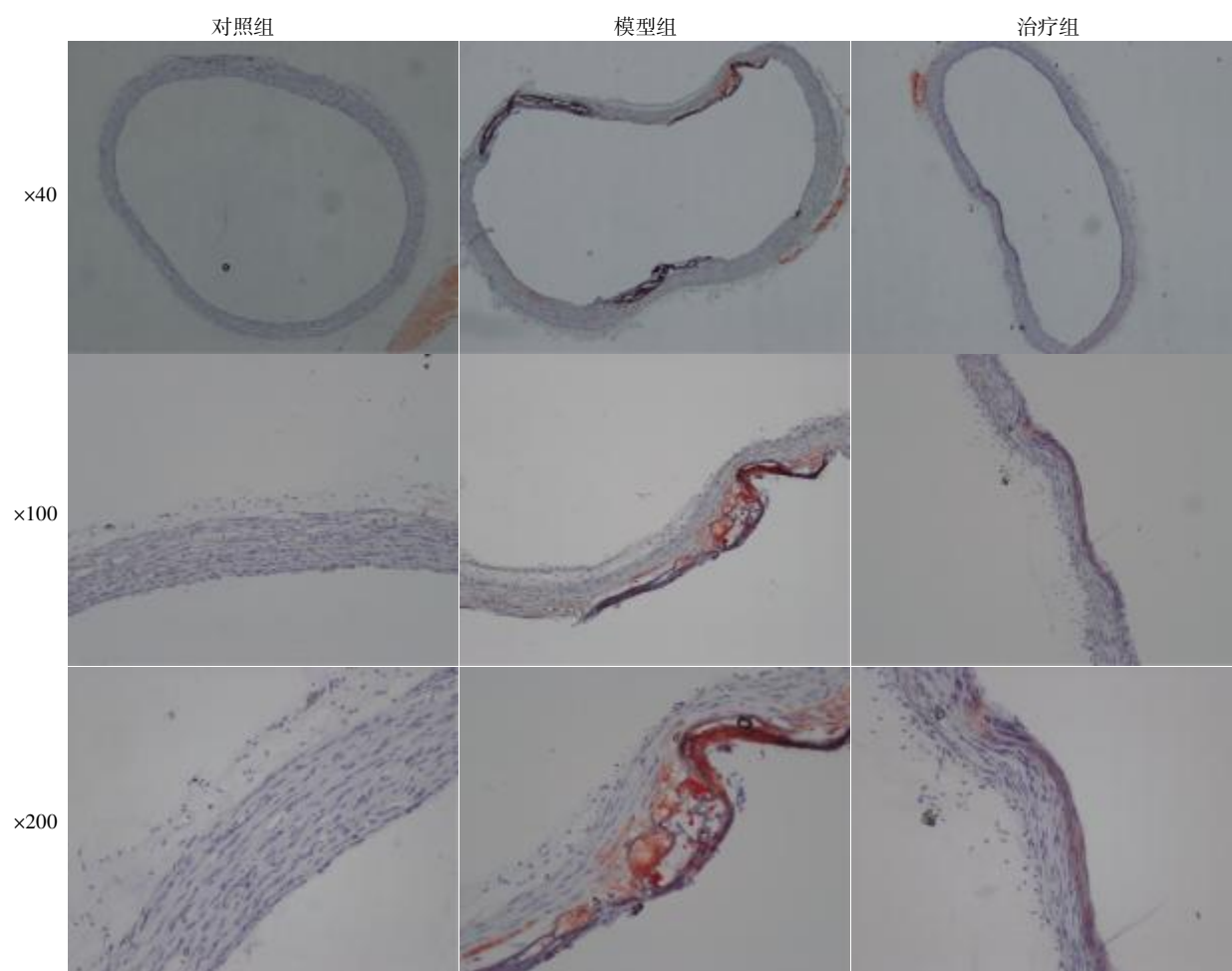


图 2 各组动脉油红 O 染色

Figure 2 Oil red O staining of all groups

### 2.6 免疫组化

主动脉免疫组化结果显示,模型组在斑块处可见明显肾素表达,而对照组及治疗组无表达(图3)。

### 3 讨论

本研究采用喂养高脂饲料和注射 VitD<sub>3</sub> 建立

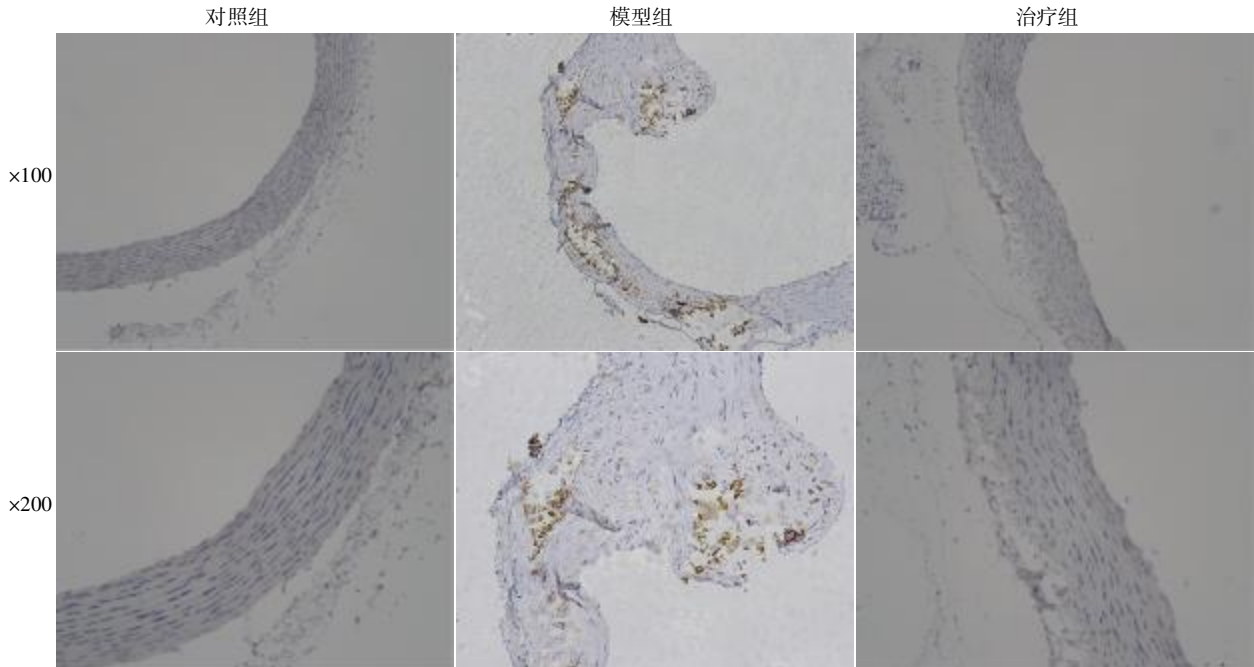


图3 各组动脉肾素表达

Figure 3 Aorta IHC of renin express

AS 疾病模型。结果显示,模型组血浆 TC 和 LDL-C 水平较对照组明显升高,表明模型大鼠更容易出现动脉粥样硬化病变。HE 和油红 O 染色显示模型组动脉粥样硬化斑块形成和脂质浸润,进一步证实模型制备成功。H<sub>2</sub>S 外源性给药后提高了血浆和主动脉 H<sub>2</sub>S 水平,预防或者减轻了高脂饮食对血脂的影响和血管壁脂质的沉积,改善了主动脉病理改变。本实验结果清楚地表明,H<sub>2</sub>S 可以用来治疗 AS。

本实验结果显示,模型组血浆和主动脉 H<sub>2</sub>S 水平显著减少,这与以前发表的文献结果<sup>[7,10-11]</sup>一致。这可能是由于在动脉粥样硬化动物胱硫醚 γ-分解酶(CSE)mRNA 和酶活性下降<sup>[10-11]</sup>。有趣的是,在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠,主动脉 CSE mRNA 表达明显高于野生型,因此推测,在载脂蛋白 E 基因敲除小鼠,低水平硫化氢反馈性引起 CSE 表达上调<sup>[7]</sup>。

肾素是 RAS 级联的限制酶,可以通过多种机制影响动脉粥样硬化的进展,包括收缩血管,促使血管平滑肌细胞迁移、增殖和肥大,增加细胞外基质的形成,促进血栓素 A<sub>2</sub> 释放,增加基质金属蛋白酶的生成,释放炎症介质如白细胞介素-6 等<sup>[3-4,12-13]</sup>。除了

典型的循环 RAS,许多组织包括心血管具有局部 RAS<sup>[14]</sup>可通过自分泌、旁分泌发挥作用<sup>[15]</sup>。在本研究中发现,肾素在模型组动脉粥样硬化斑块中表达增加、主动脉组织中局部肾素活性增高,并且这种局部肾素水平的增高不太可能来自于循环系统,因为模型组血浆肾素水平并没有升高。这一结果证实了 Overturf 等<sup>[16]</sup>的报道,即 AS 的发生并不与血浆肾素水平增高相关。另外,Slaby 等<sup>[17]</sup>观察到 AS 患者和正常人血浆肾素活性并没有明显差异。提示局部肾素水平的高低与 AS 关系更为密切。

Lu 等<sup>[18-19]</sup>报道,H<sub>2</sub>S 通过抑制腺苷酸环化酶和刺激磷酸二酯酶,调节 cAMP 水平而减少肾脏和肾球旁细胞的肾素分泌和表达,抑制肾素活性。在这项研究中证明,硫化氢同样也可以抑制 AS 局部升高的肾素活性,这表明 H<sub>2</sub>S 可能抑制主动脉局部肾素释放。血管组织局部 RAS 轴的存在已经有据可查,事实上,主动脉的各个组成部分,包括血管平滑肌细胞<sup>[20]</sup>、内皮细胞<sup>[21]</sup>、巨噬细胞<sup>[22]</sup>和肥大细胞<sup>[23]</sup>,都可以表达肾素。因此,H<sub>2</sub>S 是通过抑制肾素的合成还是抑制了肾素从这些细胞中的释放,以及在 AS 中 H<sub>2</sub>S 对血管组织肾素的影响是否也与 cAMP 有

关,还需要进一步研究。

总之,本研究发现, H<sub>2</sub>S 能够抑制肾素活性,防止动脉粥样硬化的进展,这可能成为治疗 AS 的潜在机制。

[参考文献]

- [1] Mackins CJ, Kano S, Seyedi N, et al. Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(4):1063-1070
- [2] Durante A, Peretto G, Laricchia A, et al. Role of the renin-angiotensin-aldosterone system in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18 (7):981-1004
- [3] Lu H, Balakrishnan A, Howatt DA, et al. Comparative effects of different modes of renin angiotensin system inhibition on hypercholesterolaemia-induced atherosclerosis [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(6):2000-2008
- [4] Sata M, Fukuda D. Crucial role of renin-angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *J Med Invest*, 2010, 57(1-2):12-25
- [5] Hu LF, Wong PT, Moore PK, et al. Hydrogen sulfide attenuates lipopolysaccharide induced inflammation by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in microglia[J]. *J Neurochem*, 2007, 100(4):1121-1128
- [6] Lu M, Hu LF, Hu G, et al. Hydrogen sulfide protects astrocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced neural injury via enhancing glutamate uptake [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(12):1705-1713
- [7] 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
- [8] Zhao ZZ, Wang Z, Li GH, et al. Hydrogen sulfide inhibits macrophage-derived foam cell formation [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2011, 236(2):169-176
- [9] Jeney V, Komódi E, Nagy E, et al. Suppression of hemin-mediated oxidation of low-density lipoprotein and subsequent endothelial reactions by hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46(5):616-623
- [10] Meng QH, Yang G, Yang W, et al. Protective effect of hydrogen sulfide on balloon injury induced neointima hyperplasia in rat carotid arteries [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170(4):1406-1414
- [11] Wu SY, Pan CS, Geng B, et al. Hydrogen sulfide ameliorates vascular calcification induced by vitamin D<sub>3</sub> plus nicotine in rats [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(3):299-306
- [12] Grote K, Drexler H, Schieffer B. Renin-angiotensin system and atherosclerosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(4):770-773
- [13] Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(5):2515-2520
- [14] Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems[J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(3):747-803
- [15] Mackins CJ, Kano S, Seyedi N, et al. Cardiac mast cell-derived renin promotes local angiotensin formation, norepinephrine release, and arrhythmias in ischemia/reperfusion[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(4):1063-1070
- [16] Overturf ML, Aschenbrenner C, Druilhet RE, et al. Renin as a risk factor for atherogenesis. Effects of hypercholesterolemia and two-kidney-one-clip hypertension in the rabbit[J]. *Atherosclerosis*, 1981, 38(1-2):97-119
- [17] Slaby A, Hofman O, Reisenauer R, et al. Plasma renin activity in men with relation to the presence of schaeemic heart disease[J]. *Atherosclerosis*, 1977, 27(1):41-48
- [18] Lu M, Liu YH, Goh HS, et al. Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(6):993-1002
- [19] Lu M, Liu YH, Ho CY, et al. Hydrogen sulfide regulates cAMP homeostasis and renin degranulation in As4.1 and rat renin-rich kidney cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012, 302(1):C59-66
- [20] Corry DB, Eslami P, Yamamoto K, et al. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system[J]. *J Hypertens*, 2008, 26(2):269-275
- [21] Xiao F, Puddefoot JR, Vinson GP. The expression of renin and the formation of angiotensin II in bovine aortic endothelial cells[J]. *J Endocrinol*, 2000, 164(2):207-214
- [22] Daugherty A, Rateri DL, Lu H, et al. Hypercholesterolemia stimulates angiotensin peptide synthesis and contributes to atherosclerosis through the AT1A receptor[J]. *Circulation*, 2004, 110(25):3849-3857
- [23] Swedenborg J, Mayranpaa MI, Kovanen PT. Mast cells: important players in the orchestrated pathogenesis of abdominal aortic aneurysms [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(4):734-740

[收稿日期] 2013-04-19