

硫化氢缓释剂 GYY4137 对自发性高血压大鼠胸主动脉舒张功能的影响及机制研究

马 妍, 谢利平, 季 勇*

(南京医科大学病理生理学系, 江苏 南京 211166)

[摘要] 目的:研究硫化氢缓释剂 GYY4137 对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)胸主动脉舒张功能的影响,并初步探讨其机制。方法:健康 12 周龄雄性 SHR 随机分为高血压对照组(SHR 组)和 GYY4137 组,雄性 12 周龄 WKY 大鼠为非高血压对照组(WKY 组)。GYY4137 组分别腹腔注射 10 mg/(kg·d)(GYY10 组)、25 mg/(kg·d)(GYY25 组)或 50 mg/(kg·d)(GYY50 组)的 GYY4137,SHR 组和 WKY 组给予等量生理盐水,连续 4 周,给药期间每周测定尾动脉收缩压。给药 4 周后观察各组大鼠胸主动脉舒张功能,通过 DHE 染色、丙二醛(MDA)和总抗氧化能力(T-AOC)测定评价胸主动脉氧化应激水平,Western blot 方法检测 PI3K 亚单位 p85 α 蛋白水平,Akt 及 eNOS 的磷酸化及总蛋白水平。结果:GYY4137 治疗后,胸主动脉内皮依赖性舒张功能明显改善,DHE 染色荧光强度减弱,MDA 含量降低,而 T-AOC 有所上升,p85 α 蛋白水平以及 Akt、eNOS 磷酸化水平增加。结论:GYY4137 可以改善 SHR 胸主动脉内皮依赖性舒张功能,其机制可能与抗氧化应激以及激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路有关。

[关键词] 硫化氢;自发性高血压大鼠;血管舒张;氧化应激;一氧化氮

[中图分类号] R972.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)05-549-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160508

Effects and mechanisms of slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 on vasodilation of thoracic aortic in spontaneously hypertensive rats

Ma Yan, Xie Liping, Ji Yong*

(Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 211166, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects and study the mechanisms of slow-releasing hydrogen sulfide donor GYY4137 on the vasodilation of thoracic aortic in spontaneously hypertensive rats (SHRs). **Methods:** Male SHRs at 12 weeks of age were randomly divided into 4 groups treated with different dosages of GYY4137: 0 (SHR group), 10 (GYY10 group), 25 (GYY25 group) or 50 (GYY50 group) mg/kg/day. GYY4137 was given by intraperitoneal injection once daily for 4 weeks. Age-matched normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats served as controls (WKY group). SHR and WKY control groups received the same volume of physiological saline. During treatment, systolic blood pressure (SBP) was measured by the tail-cuff method. After 4 weeks, vasodilation of thoracic aortic was measured. The degree of oxidative stress was evaluated by DHE staining, malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (T-AOC). The expression of p85 α , Akt, p-Akt (Ser473), eNOS and p-eNOS (Ser1177) was detected by western blot. **Results:** After treatment, GYY4137 improved endothelium-dependent vasodilation of thoracic aortic in SHRs, lessened the superoxide generation, decrease MDA level, enhanced T-AOC, and increased the protein level of p85 α and the phosphorylation of Akt and eNOS. **Conclusion:** GYY4137 improved endothelium-dependent vasodilation of SHRs, which may be associated with the suppression of oxidative stress and activation of PI3K/AKT/eNOS signal pathway.

[Key words] hydrogen sulfide; spontaneously hypertensive rat; vasodilatation; oxidative stress; nitric oxide

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(05): 549-553]

[基金项目] 国家自然科学基金(31371156)

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

高血压(hypertension)是临床上最常见的慢性病之一。随着高血压的发展,全身动脉常呈现出结构与功能的损伤、内膜增厚、内皮依赖性舒张功能下降等适应性变化,最终导致心、脑、肾等器官的病变,甚至发生心脑血管意外^[1],成为死亡的主要诱因之一^[2]。硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)作为继一氧化氮(nitric oxide, NO)和一氧化碳(carbonic oxide, CO)之后发现的第 3 种气体信号分子^[3],在心血管系统中发挥着调节血压保护心脏的作用。GY4137 作为一种新型 H₂S 缓释剂,能够更好地模拟生理情况下 H₂S 的释放^[4]。本次研究主要观察 H₂S 缓释剂 GYY4137 对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)胸主动脉舒张功能的影响并探讨可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

健康 12 周龄雄性 SHR (北京维通利华实验动物技术有限公司)分为 4 组,每组 6 只,腹腔注射不同浓度的 H₂S 缓释剂 GYY4137 10 mg/(kg·d) (GY10 组)、25 mg/(kg·d) (GY25 组)、50 mg/(kg·d) (GY50 组)或生理盐水(SHR 组),另取 6 只正常血压的WKY 大鼠腹腔注射生理盐水作为正常对照组(WKY 组)。

GY4137(新加坡国立大学 Philip K.Moore 教授惠赠);BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce 公司,美国),预染标准蛋白质 Marker (Fermentas 公司,美国),p85 α 、Akt、p-Akt、eNOS、p-eNOS 抗体(Cell Signaling Technology 公司,美国), β -actin 抗体(Sigma-Aldrich 公司,美国),HRP-标记羊抗小鼠、兔 IgG(Santa Cruz Biotechnology 公司,美国);Super-signal ECL 发光试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司,美国);Visitech BP-2000 小动物无创血压分析系统(Visitech 公司,美国);血管张力仪(DMT 公司,丹麦);Dihydroethidium 活性氧荧光探针(DHE,杭州碧云天生物技术研究);TE2000 倒置荧光显微镜(Nikon 公司,日本);丙二醛(malondialdehyde, MDA)和总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)测定试剂盒(杭州碧云天生物技术研究);蛋白电泳系统(Biorad 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 尾动脉收缩压监测

大鼠装入合适的网套后置于固定台上,选择合适的尾套将动物尾部固定于探头正中,待动物安静

后采用 Visitech BP-2000 小动物无创血压分析系统监测并记录大鼠尾动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP),每只大鼠间隔 2 min 重复检测,共检测 5 次取平均值,实验前及实验期间每周测量 1 次。

1.2.2 离体胸主动脉环舒张功能测定

10%水合氯醛(350 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠后,迅速暴露其心脏,剪破右心耳,经左心室缓慢滴注 4℃预冷的 Krebs's 缓冲液以充分冲洗胸主动脉中的血液。小心快速分离胸主动脉并分为 2~3 mm/段,共取 4 段。血管张力仪的浴槽中加入 Krebs's 缓冲液 37℃预热,并持续通入 95%O₂ 和 5%CO₂ 的混合气。小心悬挂分离后血管于血管张力仪上。调节初始张力至 9.8 mN,每 20 min 更换 37℃预热的 Krebs's 缓冲液 1 次,平衡稳定 60 min。之后换 60 mmol/L KCl 预收缩 15 min,用 37℃预热的 Krebs's 缓冲液洗 3 次,平衡血管 30 min 后给予去甲肾上腺素(noradrenaline, NE)0.1 μ mol/L 刺激促使血管收缩,当血管收缩至峰值平台后,给予累积浓度(1 \times 10⁻⁹~1 \times 10⁻⁵ mol/L)的乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)或累积浓度(1 \times 10⁻¹⁰~1 \times 10⁻⁶ mol/L)的硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)进行舒张,记录各组主动脉张力值,计舒张反应。

1.2.3 胸主动脉 DHE 染色

小心分离并包埋大鼠胸主动脉后,将血管冰冻切片(5 μ m),玻片晾干后流动的 PBS 冲洗 2 min 后,放入预热 PBS(含 2 μ mol/L DHE),避光 37℃孵育 30 min 后用 PBS 清洗玻片,倒置荧光显微镜下观察血管图像。

1.2.4 胸主动脉 MDA 和 T-AOC 测定

取大鼠胸主动脉,按试剂盒操作说明测定 MDA 和 T-AOC 水平。

1.2.5 Western blot

提取大鼠胸主动脉蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,配置聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE),取 30 μ g 上述制备所得蛋白上样后电泳,湿转法转膜。将膜置入含 5%脱脂奶粉的 TBS-T 中室温封闭 2 h,一抗孵育,4℃过夜,TBS-T 漂洗 3 次后,二抗孵育,室温 2 h,再用 TBS-T 漂洗 3 次,用 ECL 显影液显影成像,并保存记录,用 Image J 凝胶图像处理系统分析目的条带光密度值。

1.3 统计学方法

数值以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据分析用 STATA13.0 统计软件进行处理,组间比较采用单因素方差分析以及 SNK 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GYY4137 可降低 SHR 尾动脉收缩压

给药前, 各组 SHR 尾动脉收缩压均高于 WKY 组($P < 0.01$); 给予 GYY4137 后, GYY25 组和 GYY50 组尾动脉收缩压较 SHR 组显著下降($P < 0.01$), GYY10 组与 SHR 组相比没有明显变化($P > 0.05$, 图 1)。

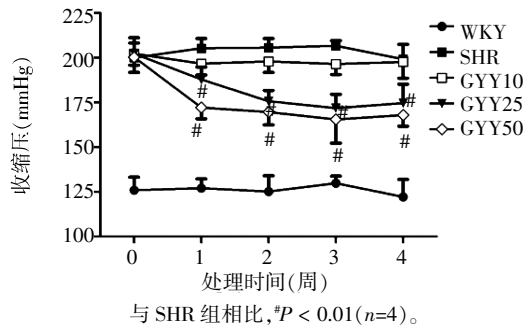


图 1 GYY4137 对 SHR 尾动脉收缩压的影响

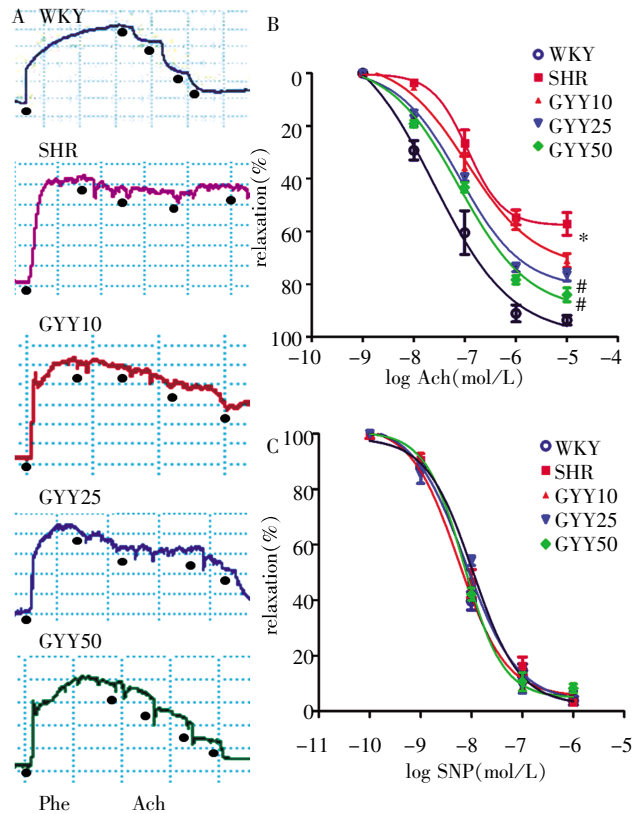
Figure 1 Effects of GYY4137 on tail artery systolic blood pressure of SHR

2.2 GYY4137 改善 SHR 胸主动脉内皮依赖性舒张功能

分离大鼠胸主动脉, 给予去甲肾上腺素刺激血管收缩至平台后给予不同浓度 Ach 检测血管舒张反应, 结果发现, 与 WKY 组相比, SHR 组中 Ach 介导的血管舒张反应性下降, 表明内皮依赖性舒张功能明显受损, GYY4137 处理后能明显改善上述舒张功能(图 2A、B), 但各组 SNP 介导的血管舒张反应无统计学差异(图 2C)。

2.3 GYY4137 减轻 SHR 胸主动脉氧化应激水平

大鼠胸主动脉组织冰冻切片应用 DHE 荧光染料孵育后结果显示, 与 WKY 组相比, SHR 组心肌组织红色荧光强度明显增强, GYY4137 给药 4 周后荧

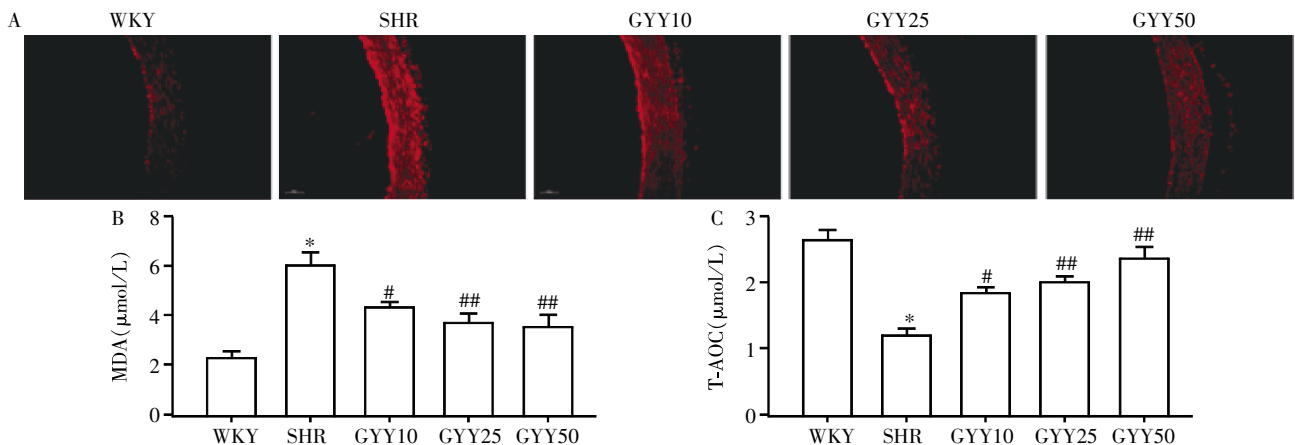


A: Ach 介导的胸主动脉舒张电生理图; B: Ach 介导的胸主动脉舒张统计图; C: SNP 介导的胸主动脉舒张统计图。与 WKY 组相比, * $P < 0.01$; 与 SHR 组相比, # $P < 0.01$ ($n=5$)。

图 2 GYY4137 对 SHR 胸主动脉舒张功能的影响

Figure 2 Effects of GYY4137 on vascular relaxation in thoracic aortic of SHR

光强度明显减弱, 表明 GYY4137 能有效减轻 SHR 胸主动脉中氧化应激水平(图 3A)。进一步检测胸主动脉组织中 MDA、T-AOC 发现, 相对于 WKY 组, SHR 组 MDA 含量明显增高, T-AOC 下降($P < 0.01$); GYY4137 给药 4 周后大鼠胸主动脉 MDA 含量降低, 而 T-AOC 有所上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 图 3B、C)。



A: 胸主动脉 DHE 染色; B: MDA 水平; C: T-AOC 水平。与 WKY 组相比, * $P < 0.01$; 与 SHR 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ ($n=6$)。

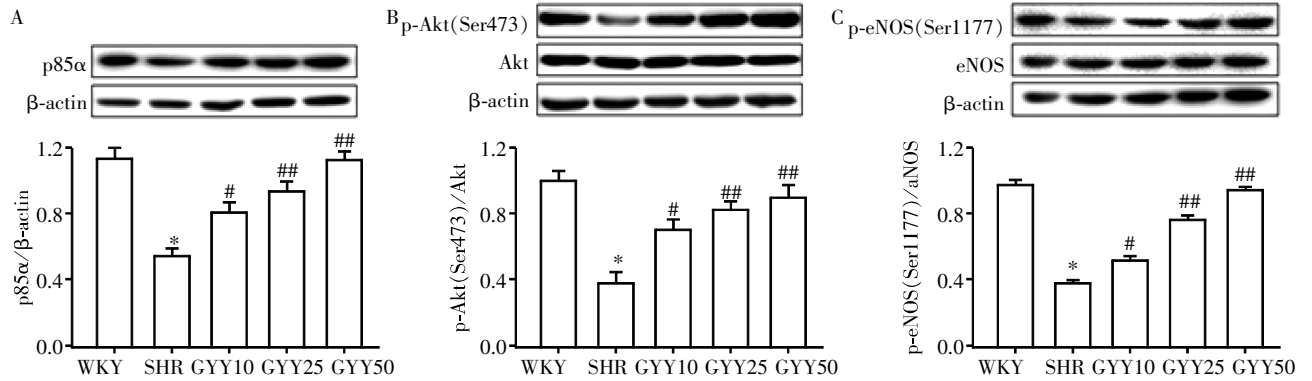
图 3 GYY4137 对 SHR 胸主动脉氧化应激的影响

Figure 3 Effects of GYY4137 on oxidative stress in thoracic aortic of SHR

2.4 GYY4137 可增加 SHR 胸主动脉 PI3K 亚单位 p85 α 蛋白表达,上调 Akt 和 eNOS 磷酸化水平

提取胸主动脉蛋白后,Western blot 检测结果发现,与 WKY 组相比,SHR 组胸主动脉 PI3K 亚单位 p85 α 蛋白水平以及 Akt(Ser473)、eNOS(Ser1177)磷

酸化水平明显降低($P < 0.01$,图 4);与 SHR 组比较,给予 GYY4137 处理后,p85 α 蛋白水平以及 Akt(Ser473)、eNOS(Ser1177)磷酸化水平显著上升($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。以上结果表明,在 SHR 胸主动脉上,GYY4137 可激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路。



A: Western blot 检测 PI3K 亚单位 p85 α 蛋白水平;B: Western blot 检测 Akt 蛋白水平;C: Western blot 检测 eNOS 蛋白水平。与 WKY 组相比, * $P < 0.01$;与 SHR 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ ($n=4$)。

图 4 GYY4137 对 SHR 胸主动脉 p85 α 、Akt 和 eNOS 蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of GYY4137 on p85 α , Akt and eNOS expression in thoracic aortic of SHR

3 讨论

长期以来, H₂S 一直被认为是一种有毒气体。近年来, 随着研究的深入, H₂S 逐渐成为继 NO 和 CO 之后的第 3 种内源性气体信号分子, 对心肌纤维化、缺血再灌注损伤、动脉粥样硬化等多种疾病发挥保护作用^[5-7]。本实验结果显示 GYY4137 处理后可增强 SHR 内皮依赖性舒张功能, 保护血管内皮功能。同时我们发现, 中高剂量的 GYY4137 可以显著降低 SHR 血压。既往研究发现 H₂S 对肺动脉高压、肾血管性高血压、妊娠性高血压等多种高血压具有降压作用^[8-10], 与本实验结果一致。值得注意的是, 低剂量 GYY4137 虽然对 SHR 血压无明显作用, 但仍显著增强内皮依赖性舒张功能, 提示 GYY4137 保护胸主动脉内皮功能可能与血压非依赖性机制有关。

氧化应激是指机体在受到刺激时体内氧自由基产生过多而导致氧化还原失调, 最终引起组织、细胞的损伤^[11]。研究发现, 在内毒素诱导的急性肺损伤小鼠模型中, H₂S 可以通过抑制全身炎症反应发挥肺保护作用^[12]; 在庆大霉素诱导大鼠肾损伤模型中, H₂S 可以通过抗氧化和抗炎作用发挥肾保护作用^[13]; 在 H₂O₂ 诱导的胃损伤模型中, H₂S 可以通过抑制胃黏膜上皮细胞凋亡发挥胃保护作用。但也有学者表明, 外源性 H₂S 可以激活 NF- κ B, 促进炎症介质的转录、合成, 最终加重氧化应激^[14]。本实验发

现, GYY4137 可抑制 SHR 胸主动脉氧化应激, 一方面可减少过量氧自由基对 NO 产生的拮抗作用, 另一方面可直接抑制活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 对胸主动脉的损伤, 这可能是 GYY4137 改善胸主动脉舒张功能的重要机制之一。

PI3K/Akt 通路作为一条经典信号通路广泛参与到调控物质代谢、维持周期运行、调节基因表达等活动中。在海马神经元中, H₂S 可以通过激活 PI3K/Akt 通路调节细胞的增殖、分化、迁移以及凋亡等^[15]。在肝脏纤维化的进程中, H₂S 可以激活 PI3K/Akt 通路, 促进肝星状细胞的增殖抑制其凋亡^[16]。在 ApoE^{-/-} 的小鼠模型中, H₂S 可以通过激活 PI3K/Akt/eNOS 通路改善内皮细胞功能, 对抗动脉粥样硬化形成^[17]。本研究亦发现, GYY4137 可上调 PI3K 亚单位 p85 α 蛋白水平, 增加 AKT 和 eNOS 的磷酸化, 进而增加胸主动脉内源性 NO 的生成, 改善内皮依赖性舒张功能。

综上所述, H₂S 缓释剂 GYY4137 能够有效降低 SHR 高血压水平、改善 SHR 胸主动脉内皮依赖性舒张功能, 其机制可能与抑制氧化应激和激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路有关。

[参考文献]

[1] 蔡诗昆, 刘正霞, 周萍, 等. 雌二醇对血管紧张素 II 诱导的高血压心肌肥厚小鼠 T 淋巴细胞的影响[J]. 南京

- 医科学学报(自然科学版),2015,35(2):149-154
- [2] Zhong M F, Shen W L, Wang J, et al. Paradoxical effects of streptozotocin-induced diabetes on endothelial dysfunction in stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. *J Physiol*, 2011, 589(21):5153-5165
- [3] Wang RUI. Two's company, three's a crowd; can H₂S be the third endogenous gaseous transmitter? [J]. *FASEB J*, 2002, 16(13):1792-1798
- [4] Li L, Whiteman M, Guan YY, et al. Characterization of a novel, water-soluble hydrogen sulfide-releasing molecule (GYY4137) new insights into the biology of hydrogen sulfide [J]. *Circulation*, 2008, 117(18):2351-2360
- [5] Givvimani S, Munjal C, Gargoum R, et al. Hydrogen sulfide mitigates transition from compensatory hypertrophy to heart failure [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2011, 110(4):1093-1100
- [6] Dongó E, Hornyák I, Benkő Z, et al. The cardioprotective potential of hydrogen sulfide in myocardial ischemia/reperfusion injury (Review) [J]. *Acta Physiol Hung*, 2011, 98(4):369-381
- [7] Mani S, Untereiner A, Wu L, et al. Hydrogen sulfide and the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(5):805-817
- [8] Wang N C, Chicco A, Banthia S, et al. Persistent sympathetic excitation long after submaximal exercise in subjects with and without coronary artery disease [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 301(3):H912-H920
- [9] Lu M, Liu Y H, Goh H S, et al. Hydrogen sulfide inhibits plasma renin activity [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(6):993-1002
- [10] Meng G, Ma Y, Xie L, et al. Emerging role of hydrogen sulfide in hypertension and related cardiovascular diseases [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(23):5501-5511
- [11] Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer; how are they linked? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(11):1603-1616
- [12] Tokuda K, Kida K, Marutani E, et al. Inhaled hydrogen sulfide prevents endotoxin-induced systemic inflammation and improves survival by altering sulfide metabolism in mice [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(1):11-21
- [13] Otunctemur A, Ozbek E, Dursun M, et al. Protective effect of hydrogen sulfide on gentamicin-induced renal injury [J]. *Ren Fail*, 2014, 36(6):925-931
- [14] Linden DR, Levitt MD, Farrugia G, et al. Endogenous production of H₂S in the gastrointestinal tract; still in search of a physiologic function [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(9):1135-1146
- [15] Shao JL, Wan XH, Chen Y, et al. H₂S protects hippocampal neurons from anoxia-reoxygenation through cAMP-mediated PI3K/Akt/p70S6K cell-survival signaling pathways [J]. *J Mol Neurosci*, 2011, 43(3):453-460
- [16] Sancho-Bru P, Juez E, Moreno M, et al. Hepatocarcinoma cells stimulate the growth, migration and expression of pro-angiogenic genes in human hepatic stellate cells [J]. *Liver Int*, 2010, 30(1):31-41
- [17] 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

[收稿日期] 2016-02-17

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%, (2~6)×10³ 或 2×10³~6×10³, 30~40 km。