

网络出版时间:2022-7-28 12:41 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220727.1757.019.html

SOD 拟似剂 Tempol 改善间歇性低氧小鼠主动脉舒张功能

蒋倩, 圣豪, 刘国莹, 余孝海, 钟明奎

摘要 目的 探索超氧化物歧化酶(SOD)拟似剂四甲基哌啶(Tempol)对间歇性低氧小鼠血管舒张功能的影响。方法

将雄性 C57 小鼠随机分为正常氧(Control)组、间歇性低氧(IH)组、间歇性低氧 Tempol 干预(IH + Tempol)组。IH 组和 IH + Tempol 组小鼠放入低氧仓进行间歇性低氧处理,每天 8 h,连续 4 周。IH + Tempol 组在间歇性低氧处理最后一周每天给予 Tempol(100 mg/kg)灌胃。离体血管张力测定系统检测血管的功能,荧光探针 - 二氢乙啶(DHE)染色法检测血管活性氧(ROS)含量,ELISA 法测量一氧化氮(NO)浓度。结果 与 Control 组相比,间歇性低氧 4 周后,IH 组小鼠胸主动脉对乙酰胆碱(ACh)引起的内皮依赖性舒张功能下降、心肌肥大,胸主动脉中 ROS 增加而 NO 水平降低;应用 Tempol 可使 IH 小鼠胸主动脉中 ROS 水平降低、NO 浓度增加,改善间歇性低氧引起的内皮依赖性舒张功能受损和心肌肥大。结论 Tempol 可能通过降低 ROS,增加 NO 的生物利用度,改善间歇性低氧引起的心血管功能障碍。

关键词 间歇性低氧;氧化应激;内皮功能障碍;Tempol

中图分类号 R 331.36

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1279-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.019

阻塞性睡眠呼吸暂停(obstructive sleep apnea, OSA)是影响 5% 普通人群和 18% 50 岁以上老年人群的常见疾病^[1-2]。OSA 的特点是睡眠期间反复呼吸暂停,导致间歇性低氧和睡眠片段化,是高血压、缺血性心脏病、动脉粥样硬化、冠心病、中风等心脑血管疾病的独立危险因素。间歇性低氧(intermittent hypoxia, IH)可通过氧化应激、一氧化氮利用不足、全身炎症反应、交感神经过度激活和内皮修复能力降低等途径导致血管内皮功能障碍,进而增加高血压等心脑血管疾病的发生风险^[3]。Tempol 是一种抗氧化剂^[4],作为 SOD 类似物,可以穿透细胞膜并

与细胞内和细胞外的氧自由基反应,通过清除 ROS 减少氧化应激保护血管内皮功能^[5-6]。该研究旨在探讨口服 Tempol 对 IH 引起的小鼠心血管损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 36 只雄性清洁级 C57 小鼠,体重(24 ± 3)g,由安徽长临河医药科技有限公司提供,合格证号[Scxk(皖)2017-001]。动物分笼饲养,自由摄食和饮水,通风良好,室温 18 ~ 25 ℃。

1.1.2 仪器 测氧仪(CYS-1 型,南京新飞分析仪器制造有限公司);DMT 620M 血管张力测定系统(丹麦 DMT 公司);倒置荧光显微镜,冰冻切片机(德国徕卡);全自动酶标仪(南京德铁实验设备有限公司)。

1.1.3 试剂 医用压缩氧气(浓度 > 99.9%)、压缩氮气(浓度 > 99.9%)由合肥众益化工产品有限公司充装;Dihydroethidium(DHE)、NO 测试盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Tempol、乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)、苯肾上腺素(phenylephrine, Phe)购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 IH 模型的制备和分组 小鼠在适应性饲养 1 周后进行实验,随机分成正常氧量组(Control)、间歇性低氧组(IH)、间歇性低氧 Tempol 干预组(IH + Tempol),每组 12 只。本研究采用 IH 诱导小鼠心血管损伤模型,通过氮气稀释原理,向低氧舱循环充入氮气和氧气,每一循环为 9 min,4 min 充入氮气,随之 5 min 充入氧气,由测氧仪监测间歇性低氧舱中的氧浓度,调节气体流量,使每一循环间歇性低氧舱内的最低氧浓度达到 6% 左右,持续时间为 45 s 左右,然后再逐渐恢复至 21%,间歇性低氧舱内氮气和氧气的转换通过定时电磁转换器来完成(图 1)。将 IH 组以及 IH + Tempol 组小鼠放进低氧仓内,进行每天 8 h 的间歇性低氧处理(9:00 am - 5:00 pm),连续 4 周。Control 组除不入箱内,其余均与

2022-05-08 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81070066);安徽省教育厅自然科学基金重点项目(编号:KJ2018A0174);安徽医科大学校科研基金(编号:2019xkj009)

作者单位:安徽医科大学生理学教研室,合肥 230032

作者简介:蒋倩,女,硕士研究生;

钟明奎,男,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: mingkuizhong@ahmu.edu.cn

IH 组进行相同处理。在间歇性低氧处理 3 周之后, IH + Tempol 组连续 1 周每天使用 Tempol (100 mg/kg) 给予灌胃处理, 而 Control 组和 IH 组则灌注相同体积 0.9% 生理盐水。实验第 4 周末, 处死小鼠, 进行血管离体实验。

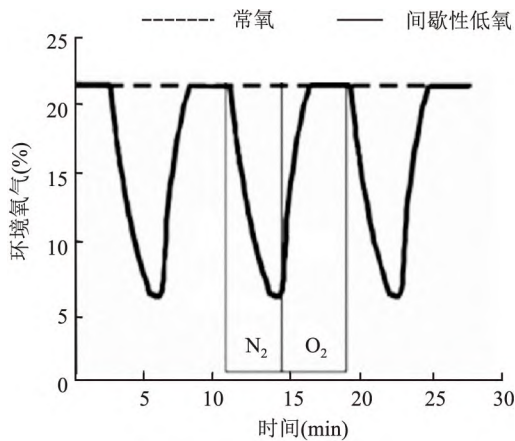


图1 间断性低氧舱内氧含量的变换模式

1.2.2 心脏重量指标测定 实验模型制备完成后, 首先进行小鼠体质量测量, 随即用 10% 水合氯醛 (0.05 ml/10 g) 腹腔注射麻醉。将麻醉小鼠固定, 准备成套眼科剪与镊子打开小鼠胸腔, 将心肺等器官充分暴露, 随即将还在跳动的心脏迅速摘取, 剥离多余结缔组织等, 随后置于冰冷生理盐水中, 轻轻冲洗, 挤压多余血水, 用吸水纸将心脏中多余水分吸除, 称重后立即进行称重后液氮存放, 计算心重指数为心脏重量/体质量 (mg/g); 将小鼠胫骨完整分离出, 取出测量长度, 计算心脏重量/胫骨长度 (mg/cm) 的比值。

1.2.3 离体血管张力检测 利用 CO₂ 吸入法麻醉并处死小鼠, 采用上述方法摘取小鼠心脏后, 紧贴小鼠脊柱, 取出完整胸主动脉, 操作需动作快速轻柔, 对血管无牵拉。将血管放置在预先接通混合氧 (95% O₂ 和 5% CO₂) 的 Krebs 溶液中, 借助显微镜, 将包裹在血管周围多余脂肪和结缔组织以及其他杂质从外壁上小心清除, 使其达到干净透明状态。然后将胸主动脉分别截断为 2 cm 左右。手持眼科镊, 将血管环固定在 Myograph 张力器两端, 浴槽中持续通入混合氧, 预置 5 ml 的 Krebs 液, 全程保持 pH 值 7.4, 温度 37 °C。待血管稳定后, 再给予 2 mN 的前负荷, 缓慢拉伸血管环, 并利用 Powerlab 系统记录血管张力的变化。待平衡 30 min 后, 加入高钾溶液刺激血管, 每次 60 mmol/L, 2 次/15 min。血管达到最

大收缩时, 吸出高钾溶液, 随后用 Krebs 液洗脱残留药物, 3 次/15 min。随后加入 3 μmol/L Phe 刺激血管预收缩, 在收缩达到稳定峰值时, 加入 ACh (10⁻⁸ ~ 10^{-5.5} mol/L) 或 SNP (10⁻⁹ ~ 10⁻⁵ mol/L), 检测血管内皮依赖性与内皮非依赖性舒张功能。ACh 可激动血管内皮细胞 M3 亚型, 促进内皮依赖性舒张因子 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) 之一 NO 的释放, 从而引起邻近平滑肌细胞松弛, 促使血管内皮依赖性舒张; SNP 致使平滑肌松弛, 在血管平滑肌内代谢产生 NO, 引起血管非内皮依赖性舒张。

1.2.4 胸主动脉中 NO 测定 取剥离干净的胸主动脉加入裂解液, 使用低温超声裂解仪裂解组织, 离心取上清液; 使用裂解液将 1 mol/L 的 NaNO₂ 稀释成 1、10、20、40、60、80、100 μmol/L 的标准品; 配制 1 mol/L 的 NaNO₂, 参考说明书的操作步骤操作, 用全自动酶标仪测量出吸光度 (optical density, OD) 值。

1.2.5 胸主动脉中活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 测定 将剥离干净的胸主动脉用 OTC 包埋, 冰盒静置后放入液氮, 最后置 -80 °C 冰箱保存。使用冰冻切片机将包埋好的血管切成 5 μm 的病理切片。将 DHE ROS 荧光探测液 (5 μmol/L) 与标本常温避光孵育 5 ~ 20 min。DHE 在超氧化物生成处被氧化成为氧化乙锭, 与 DNA 相结合之后, 可被激发出红色的荧光, 通过荧光显微镜观察荧光的强度, 并 ImageJ 软件计算血管内 ROS 含量。

1.3 统计学处理 用 Graphpad Prism8 软件作图和数据统计分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 多个影响因素多组间的比较用双因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tempol 对 IH 小鼠主动脉舒张功能的影响

离体血管张力检测结果显示: 3 组小鼠胸主动脉内皮依赖性舒张功能存在明显差异 [$F_{(2,15)} = 27.54, P < 0.001$] (图 2A)。与 Control 组相比, IH 4 周后, Phe 预收缩的胸主动脉环对 ACh 引起的内皮依赖性舒张显著降低 ($P < 0.001$); 口服 SOD 类似物 tempol 可改善 IH 引起的内皮依赖性舒张功能 ($P < 0.001$), 但不能完全恢复正常内皮依赖性舒张水平。3 组间 Phe 预收缩的胸主动脉环对 SNP 引起的内皮非依赖性舒张差异无统计学意义 (图 2B)。提示 IH 可能是通过影响内皮细胞而不是平滑肌细胞

引起血管舒张功能的改变。

2.2 Tempol 对 IH 小鼠主动脉中 ROS 与 NO 含量的影响 图 3A-C 依次为 Control 组、IH 组、IH + Tempol 组小鼠胸主动脉 DHE 荧光染色后显示 ROS 分布与浓度。荧光亮度与 ROS 含量正相关,亮度越强,ROS 含量越多。分析结果显示:与 Control 组相比,IH 组小鼠胸主动脉中 ROS 荧光强度显著升高 ($P < 0.001$),口服 Tempol 可降低 IH 小鼠胸主动脉中 ROS 水平 ($P < 0.001$),但不能恢复到正常水平 ($P < 0.001$) (图 3D)。提示 Tempol 作为超氧阴离子清除剂可通过减少血管中活性氧的产生或者清除活性氧来发挥保护心血管的作用。NO 测定结果显示:与 Control 组相比,IH 组小鼠胸主动脉中 NO 含量降低 ($P < 0.001$),口服 Tempol 后,可以提高 IH 小鼠胸主动脉中的 NO 含量 ($P < 0.01$),但不能恢复到正常水平 ($P < 0.001$) (图 3E)。提示 Tempol 可能是通过减少活性氧的产生,提高 NO 生物利用率来减少血管内皮功能损伤,从而发挥心血管保护作用。

2.3 Tempol 对 IH 小鼠体质量和心脏重量的影响

与 Control 组相比,间歇性低氧 4 周后,IH 组小鼠体质量显著降低 [$F_{(2,21)} = 15.28, P < 0.001$],而心脏重量/体质量比值 [$F_{(2,21)} = 19.16, P < 0.001$]和心脏重量/胫骨长度比值 [$F_{(2,21)} = 12.08, P < 0.001$]显著增加,提示间歇性低氧小鼠出现心肌肥大。口服 Tempol 后,与 IH 组比较,IH + Tempol 组小鼠的体质量明显增加 ($P < 0.01$),心脏重量/体质量比值 ($P < 0.01$) 和心脏重量/胫骨长度比值 ($P < 0.01$) 明显下降,提示 Tempol 可抑制 IH 小鼠心肌肥大。见表 1。

表 1 Tempol 对间歇性低氧小鼠体质量和心脏重量的影响 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	体质量 (g)	心脏重量/体质量 (mg/g)	心脏重量/胫骨长度 (mg/cm)
Control	25.55 ± 0.78	4.16 ± 0.37	53.40 ± 4.79
IH	21.17 ± 2.32 ***	5.93 ± 0.92 ***	68.88 ± 8.24 ***
IH + Tempol	24.22 ± 1.39 ##	4.51 ± 0.35 ##	58.38 ± 4.84 ##

与 Control 组比较:*** $P < 0.001$;与 IH 组比较:## $P < 0.01$

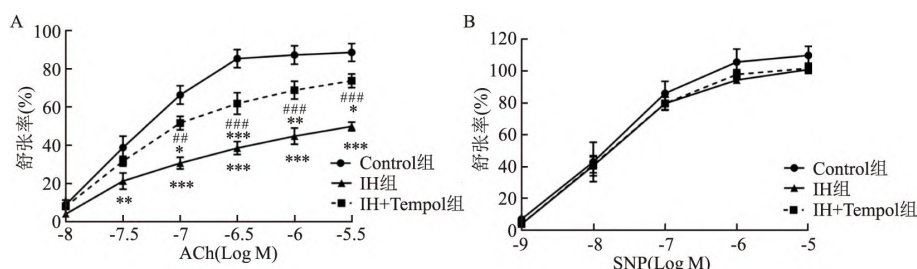


图 2 Tempol 对 IH 小鼠主动脉内皮依赖性舒张功能的影响

A:不同浓度 ACh 诱导的胸主动脉内皮依赖性舒张变化情况;B:不同浓度 SNP 诱导的胸主动脉舒张;与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$;与 IH 组比较:## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

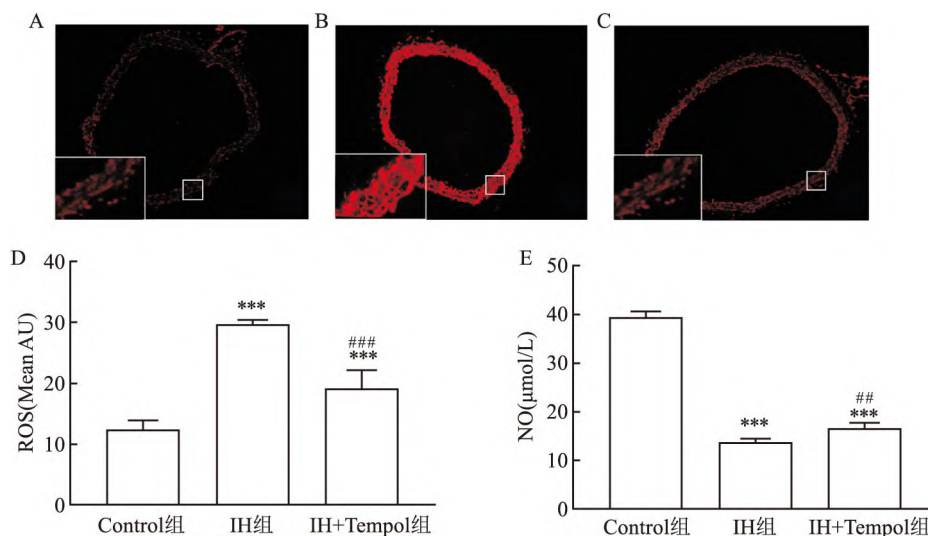


图 3 小鼠主动脉 ROS 和 NO 含量 SP × 400

A:Control 组 DHE 荧光染色示 ROS;B:IH 组荧光染色示 ROS;C:IH + Tempol 组 DHE 荧光染色示 ROS;D:DHE 染色量化分析结果统计图;E:小鼠胸主动脉 NO 含量统计图;与 Control 组比较:*** $P < 0.001$;与 IH 组比较:## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

3 讨论

本研究显示经 IH 处理 4 周,可引起小鼠胸主动脉对 ACh 引起的内皮依赖性舒张功能下降、心肌肥大,胸主动脉中 ROS 增加而 NO 水平降低,提示 IH 引起的心血管功能障碍可能与氧化应激增加使 NO 的生物利用度下降有关;口服 SOD 类似物 Tempol,使 IH 小鼠胸主动脉中 ROS 水平降低、NO 浓度增加,改善 IH 引起的内皮依赖性舒张功能和心肌肥大。

OSA 是多种心脑血管疾病的独立危险因素,是患者致残和死亡的主要原因,IH 是 OSA 的主要病理生理学特点和损伤机制,被认为是引起心脑血管疾病的最为重要的因素^[7]。反复 IH 可引起氧化应激和 ROS 增加,而 ROS 可作为信号分子在 OSA 引起的并发症中起着重要的作用,抑制 ROS 对心血管具有重要的保护作用^[8]。ROS 是氧在生物体内通过单电子还原产生化学性质活泼的物质,包括超氧阴离子($\cdot O^{-2}$)、羟自由基($\cdot OH$)和过氧化氢(H_2O_2)等。细胞内的 ROS 来源于氧化酶催化的代谢产物和线粒体电子传递链,涉及 ROS 代谢的酶有 NAD(P)H 氧化酶(NOX)、黄嘌呤氧化酶、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)等。超氧化物会氧化生物分子,与 NO 的反应促进过氧亚硝酸盐的形成,减少 NO 的生物利用度。而在 SOD 的作用下 CAT 酶和谷胱甘肽过氧化物酶则可将过氧化氢转化为水和氧气,在 ROS 的代谢中发挥了重要作用。Tempol 是一种可透膜的金属非依赖性 SOD 拟似物,可以减轻自由基引起的损伤,提高 NO 的生物利用度,在氧化应激的动物模型中发挥有益的作用^[9]。本研究中,Tempol 可抑制 IH 小鼠主动脉中 ROS 水平,提高 NO 浓度,显著改善 IH 小鼠血管内皮依赖性舒张功能和心肌肥大。Troncos et al^[10]也发现,Tempol 可明显降低间歇性低氧模型大鼠的血压、血浆内皮素和血管内 ROS 水平,提示 ROS 在 IH 诱发的心血管疾病中起着重要作用。

血管内皮细胞是连续覆盖于血管腔表面的单层上皮细胞,是多种血管活性物质的产生和作用部位,在维持血管张力、参与管壁炎症修复、调节血管生长以及调控血小板聚集和凝血功能等方面起着重要作用。内皮细胞可通过产生的 NO,促进局部血管舒张,抑制血小板聚集、单核细胞黏附和血管平滑肌增殖来维持血管正常的形态和功能。内皮功能障碍被认为是心血管疾病发展过程中最早可检测到的和可

能被逆转的异常之一。内皮功能障碍通常指的是内皮依赖性血管舒张功能受损,与 NO 生物利用度降低有关;而非内皮依赖性血管舒张功能受损,则表示与血管壁中的平滑肌功能障碍有关的进一步的结构损伤。慢性 IH 可通过氧化应激、一氧化氮利用不足、全身炎症反应、交感神经过度激活和内皮修复能力降低等途径导致血管内皮功能障碍能,进而增加高血压等心血管疾病的发生风险,可能是引起间歇性小鼠心肌肥大的机制之一。本研究显示,IH 小鼠胸主动脉对 ACh 引起的内皮依赖性舒张功能下降,而对 SNP 引起的非内皮依赖性舒张功能正常,提示血管内皮功能受损可能是 IH 引起心血管疾病的重要原因之一,具体机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Young T, Palta M, Dempsey J, et al. The occurrence of sleep-disordered breathing among middle-aged adults[J]. N Engl J Med, 1993, 328(17): 1230-5.
- [2] Santilli M, Manciocchi E, D'Addazio G, et al. Prevalence of obstructive sleep apnea syndrome: A single-center retrospective study[J]. Int J Environ Res Public Health, 2021,18(19): 10277.
- [3] Javaheri S, Barbe F, Campos-Rodriguez F, et al. Sleep apnea: types, mechanisms, and clinical cardiovascular consequences[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 69(7): 841-58.
- [4] 唐志强,范一菲,汪金丽,等. 室旁核中血管紧张素 II 通过活性氧介导慢性间歇性低氧大鼠的升压作用[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(4): 472-6.
- [5] Shateri H, Ranjbar A, Kheiripour N, et al. Tempol improves oxidant/antioxidant parameters in testicular tissues of diabetic rats[J]. Life Sci, 2019, 221: 65-71.
- [6] Costa C A, Amaral T A, Carvalho L C, et al. Antioxidant treatment with tempol and apocynin prevents endothelial dysfunction and development of renovascular hypertension[J]. Am J Hypertens, 2009, 22(12): 1242-9.
- [7] Bangash A, Wajid F, Poolacherla R, et al. Obstructive sleep apnea and hypertension: A review of the relationship and pathogenic association[J]. Cureus, 2020, 12(5): e8241.
- [8] Prabhakar N R, Kumar G K, Nanduri J, et al. ROS signaling in systemic and cellular responses to chronic intermittent hypoxia[J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(9): 1397-403.
- [9] Nunes D V, Costa C A, De Bem G F, et al. Tempol, a superoxide dismutase-mimetic drug, prevents chronic ischemic renal injury in two-kidney, one-clip hypertensive rats[J]. Clin Exp Hypertens, 2018, 40(8): 721-9.
- [10] Troncos C M B, da Silva A Q, Allahdadi K J, et al. Reactive oxygen species contribute to sleep apnea-induced hypertension in rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(5): H2971-6.

(下转第 1288 页)

were adopted to characterize exosomes. Meanwhile, exosomes particles concentration was detected by nano-flow cytometry. Exosomes with different storage time were added to plasma, then the effects on the plasma prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT) were detected by the automatic coagulation analyzer. Expression of coagulation factor VII on exosomes from platelet stored for different time were tested by Western blot. Exosomes samples of D 0, D 5 were incubated with fresh whole blood, respectively. Then the coagulation indexes of each samples were detected by Thromboelastography test (TEG). **Results** Test showed the presence of TSG 101, CD 9, which were exosome specific markers. And the exosomes showed a double-layer membrane and cup-like structure. Moreover, the particle size distribution of exosomes was mainly between 60 ~ 80 nm. The concentration of exosomes stored for D 0, D 3, and D 5 were $(13.86 \pm 7.93) \times 10^{12}$, $(23.69 \pm 12.80) \times 10^{12}$, $(45.81 \pm 25.87) \times 10^{12}$ particles/L, respectively. Compared with D 0, the concentration of exosomes stored for D 3 and D 5 increased significantly ($P < 0.01$), with 1.8 times and 4.0 times, respectively. Compared with the control group, PT in the D 0 and D 5 exosomes group could be decreased by $[(0.16 \pm 0.15) \text{ s}, P < 0.01]$ and $[(0.36 \pm 0.18) \text{ s}, P < 0.001]$, APTT could be decreased by $[(1.11 \pm 1.21) \text{ s}, P < 0.05]$ and $[(2.10 \pm 1.14) \text{ s}, P < 0.001]$, respectively. Semi-quantitative analysis of coagulation factor VII was performed by Western blot and it showed statistically differences in coagulation factor VII concentration ($P < 0.05$). TEG test showed that the coagulation time R value of control group, exosomes of D 0 and D 5 were $(5.46 \pm 0.90) \text{ min}$, $(5.00 \pm 0.67) \text{ min}$, $(4.38 \pm 1.00) \text{ min}$, respectively, indicating that exosomes had procoagulant activity ($P < 0.05$). **Conclusion** With the prolongation of storage time, the particles concentration of exosomes in manual platelets continuously increased and the blood procoagulant function of exosomes is significantly enhanced, platelet-derived exosomes during storage may be involved in the procoagulant process through the coagulation factor VII.

Key words platelet; exosomes; coagulation; coagulation factor VII

(上接第 1282 页)

SOD mimetic Tempol improves aortic vasodilation function in mice exposed to intermittent hypoxia

Jiang Qian, Sheng Hao, Liu Guoying, Yu Xiaohai, Zhong Mingkui

(Dept of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To investigate the effect of superoxide dismutase (SOD) mimetic 4-Hydroxy-TEMPO (Tempol) on aortic vasodilation function in mice exposed to intermittent hypoxia. **Methods** Male C57 mice were randomly divided into normal oxygen (Control) group, intermittent hypoxia (IH) and IH + Tempol group. The mice in IH and IH + Tempol group were exposed to 4-weeks intermittent hypoxia, 8 h daily. In IH + Tempol treatment group, the mice were given Tempol (100 mg/kg) each day by the oral administration in the last week of intermittent hypoxia. The isolated thoracic aorta reactivity was studied using wire myography, the content of reactive oxygen species (ROS) was detected by dihydroethidium (DHE) staining, the concentration of nitric oxide (NO) was measured by ELISA kits. **Results** Compared with Control group, the endothelium-dependent vasodilation of thoracic aorta induced by acetylcholine (ACh) significantly decreased and cardiac hypertrophy, the level of aortic ROS significantly increased, the concentration of aortic NO was significantly reduced in the IH group mice. Treatment with Tempol could significantly improve the aortic endothelium-dependent vasodilation dysfunction and cardiac hypertrophy, and significantly inhibited the increase of ROS and decrease of NO in the thoracic aorta induced by intermittent hypoxia. **Conclusion** Tempol can improve intermittent hypoxia induced-cardiovascular dysfunction in mice by reducing ROS and increasing the bioavailability of NO.

Key words intermittent hypoxia; oxidative stress; endothelial dysfunction; Tempol