

网络出版时间: 2021-7-28 14:15 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210728.1014.005.html>

# L-半胱氨酸对慢性间歇性低氧大鼠血压和交感神经活动的影响

圣豪<sup>1</sup>, 丁扬<sup>2</sup>, 蒋倩<sup>1</sup>, 余孝海<sup>1</sup>, 王烈成<sup>1</sup>, 钟明奎<sup>1</sup>

**摘要** 目的 探讨 L-半胱氨酸(L-cys)增加内源性 H<sub>2</sub>S 对间歇性低氧引起的大鼠高血压的影响及机制。方法 将雄性 SD 大鼠随机分为正常氧(Control)组、慢性间歇性低氧(CIH)组、正常氧 L-cys 干预(Control + L-cys)组和慢性间歇性低氧 L-cys 干预(CIH + L-cys)组。CIH 组和 CIH + L-cys 组大鼠放入低氧仓进行间歇性低氧处理,每天 8 h,连续 15 d。L-cys 干预组每天给予 L-cys (10 mg/kg)灌胃。用无创套尾法测大鼠的尾动脉收缩压(SBP),PowerLab 数据采集分析处理系统在体记录大鼠肾交感神经活动(RSNA),ELISA 法测量血浆中去甲肾上腺素(NE)、H<sub>2</sub>S 含量和 CSE、CBS 活性。结果 与 Control 组相比,间歇性低氧 15 d 后,CIH 组大鼠 SBP、RSNA、血浆中 NE 水平较高,而血浆中 H<sub>2</sub>S 水平降低;应用 L-cys 可增加 CIH 大鼠血浆中 H<sub>2</sub>S 水平,显著抑制间歇性低氧引起的血压升高和交感神经活动过度激活。结论 L-cys 可能通过增加内源性 H<sub>2</sub>S 改善间歇性低氧引起的高血压。

**关键词** 间歇性低氧;高血压;交感神经活动;硫化氢

中图分类号 R 331.36

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1201-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.006

阻塞性睡眠呼吸暂停(obstructive sleep apnea, OSA)是一种累及多系统并造成多器官损害,严重威胁人类健康的常见睡眠呼吸障碍疾病。OSA 是多种心脑血管疾病的独立危险因素,对患者造成的伤害不可逆转,包括高血压、冠心病、心律失常、肺动脉高压等,与 OSA 关系最为密切的是高血压。OSA 的损伤机制和特点是间歇性低氧(intermittent hypoxia, IH)被认为是引起高血压等心脑血管疾病的最为

重要的因素<sup>[1-2]</sup>。交感神经的过度激活和血管内皮的过度损伤是造成高血压的重要因素<sup>[3]</sup>。硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)作为内源性信号分子在多个系统中均发挥重要的生物学作用。在心血管系统, H<sub>2</sub>S 在舒张血管、抑制血管重构和保护心肌等方面具有重要的生理作用,研究<sup>[4]</sup>表明内源性 H<sub>2</sub>S 和外源性 H<sub>2</sub>S 供体化合物对高血压、动脉粥样硬化、心肌肥厚、心力衰竭和缺血/再灌注损伤等心血管疾病发挥保护作用。该研究旨在探讨应用 H<sub>2</sub>S 前体 L-半胱氨酸(L-cysteine, L-cys)对 IH 所致的高血压大鼠的作用及其机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 40 只体质量为(230 ± 30)g 的雄性 SD 大鼠由济南鹏跃实验动物繁育有限公司[证书编号 SYXK(WAN)2017-006]提供,并在安徽医科大学动物设施中心饲养动物分笼饲养,动物饲养于 12 h 暗光循环标准条件下的实底聚丙烯笼子里,自由摄食和饮水,通风良好,温度(23 ± 2)℃,湿度(55 ± 5)%,光照时间 7:00 ~ 19:00。

**1.2 主要仪器及试剂** 测氧仪(CYS-1 型数字式测氧仪,上海精宏实验设备有限公司);PowerLab 8/30 数据采集分析处理系统(澳大利亚 AD Instruments 公司);无创血压测定分析系统(ALC-NIBP,上海奥尔科特公司);医用氧气(浓度 > 99.9%)、氮气(高纯氮气,浓度 > 99.99%)由合肥市医用氧气厂充装;L-半胱氨酸(L-cysteine, L-cys)购自美国 Sigma 公司。

## 1.3 方法

**1.3.1 间歇性低氧模型的制备及分组** 所有实验大鼠均提前 1 周进行适应性饲养,随机分为正常氧(Control)组、慢性间歇性低氧(CIH)组、正常氧 L-cys 干预(Control + L-cys)组和慢性间歇性低氧 L-cys 干预(CIH + L-cys)组,每组 10 只。参照课题组前期实验<sup>[4]</sup>将 CIH 组和 CIH + L-cys 组大鼠放入低氧仓内,通过氮气稀释的原理,使低氧仓内的氧气浓度降为环境浓度的 21%,并通过氮气和氧气控制仓内的氧气浓度。充入氮气 4 min,使低氧仓的最低氧

2021-05-13 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、KJ2010A176);安徽医科大学校科研基金(编号:2019xkj009)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学生理学教研室,合肥 230032

<sup>2</sup>岳阳职业技术学院,岳阳 414000

作者简介:圣豪,男,硕士研究生;

王烈成,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wanglic-heng@ahmu.edu.cn;

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

气浓度达到 6% 并保持 40 s, 然后充入氧气 5 min, 以重新充氧至 21%, 并维持整个循环 9 min。低氧仓的氧气浓度由氧气探头监控, 开关时间由计时电路控制。进行间歇性低氧处理, 每天 8 h(9:00 am ~ 5:00 pm), 连续 15 d。对照组除了不放入低氧仓, 其他处理与模型组相同。

**1.3.2 评价肾交感神经活动(renal sympathetic activity, RSNA)** 腹腔注射乌拉坦(800 mg/kg)和  $\alpha$ -氯醛糖(40 mg/kg)混合麻醉, 从大鼠腰腹部行竖行切口暴露肾脏等组织, 用眼科剪刀和镊子小心游离出肾交感神经, 装上事先准备好的电极来引导 RSNA, 经数据分析系统分析后, 记录数据并应用专业的数据分析系统分析处理 RSNA, 通过 RSNA 基础值占最大值的比例来评价 RSNA 的水平。

**1.3.3 血浆中 H<sub>2</sub>S、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、胱硫醚  $\beta$ -合酶(cystathionine  $\beta$ -synthase, CBS)和胱硫醚  $\gamma$ -裂解酶(cystathionine  $\gamma$ -lyase, CSE)检测** 大鼠腹腔完全麻醉后, 腹主动脉取血 4 ~ 5 ml, 肝素抗凝, 离心 10 min(3 000 r/min), 取上清液, -80℃ 保存。采用 GENMED 比色法测定血浆中 H<sub>2</sub>S 的水平, ELISA 法检测 NE 水平和 CBS、CSE 活性。

**1.4 统计学处理** 实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计分析(Graphpad Prism)采用 *t* 检验和单因素方差分析(ANOVA), *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 L-cys 对慢性间歇性低氧对大鼠血浆中 H<sub>2</sub>S 水平的影响** 与 Control 组相比, 间歇性低氧 15 d 后, CIH 组大鼠血浆中 H<sub>2</sub>S 含量 [ $F_{(3, 19)} = 9.975, P < 0.01$ ]显著降低; 与 CIH 组相比, 口服 L-cys 可显著增加大鼠血浆中 H<sub>2</sub>S 含量 [ $F_{(3, 19)} = 9.975, P < 0.05$ ], 而 L-cys 对正常大鼠血浆中 H<sub>2</sub>S 含量有升高趋势, 但没有显著差异; 4 组大鼠血浆中 CBS 和 CSE 活性没有显著差异。见表 1。

表 1 慢性间歇性低氧对大鼠血浆中 H<sub>2</sub>S 含量、CBS 和 CSE 活性的影响(*n* = 6,  $\bar{x} \pm s, \mu\text{mol/L}$ )

组别	H <sub>2</sub> S( $\mu\text{mol/L}$ )	CBS(U/L)	CSE(U/L)
Control	52.9 ± 2.8	10.0 ± 1.8	20.0 ± 2.2
Control + L-cys	58.8 ± 3.5	11.8 ± 1.6	22.5 ± 2.8
CIH	34.6 ± 3.5**	9.2 ± 1.0	21.1 ± 2.7
CIH + L-cys	49.1 ± 3.2 <sup>#</sup>	9.9 ± 1.6	21.9 ± 2.2

与 Control 组比较: \*\* *P* < 0.01; 与 CIH 组比较: <sup>#</sup>*P* < 0.05

**2.2 L-cys 对 CIH 大鼠血压的影响** 从 IH 第 5 天

开始, CIH 大鼠尾动脉 SBP 比间歇性低氧前升高; 与 Control 组相比, 间歇性低氧 15 d 后, CIH 组大鼠血压显著升高 [ $F_{(3, 39)} = 233.1, P < 0.05$ ]。口服 H<sub>2</sub>S 前体 L-cys, 对于正常大鼠血压没有影响; L-cys 可抑制间歇性低氧引起的升压作用(*P* < 0.01), 但不能使慢性间歇性低氧大鼠的血压完全恢复正常(*P* < 0.01), 见图 1。

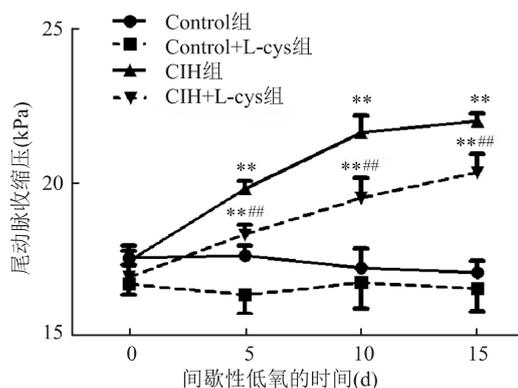


图 1 L-半胱氨酸对大鼠血压的影响

与 Control 组比较: \*\* *P* < 0.01; 与 CIH 组比较: <sup>#</sup>*P* < 0.01

**2.3 L-cys 对 CIH 大鼠交感神经活动的影响** 与 Control 组相比, 间歇性低氧 15 d 后, CIH 组大鼠 RSNA [ $F_{(3, 19)} = 21.92, P < 0.01$ ]和血浆中 NE 含量 [ $F_{(3, 62)} = 63.02, P < 0.01$ ]显著升高。口服 L-cys, 对于正常大鼠 RSNA 和血浆 NE 水平没有影响; L-cys 可抑制间歇性低氧引起的 RSNA [CIH 组 vs CIH + L-cys 组:  $F_{(3, 19)} = 21.92, P < 0.05$ ]和 NE [CIH 组 vs CIH + L-cys 组:  $F_{(3, 62)} = 63.02, P < 0.05$ ]增加的作用, 但不能使 CIH 大鼠的 RSNA [Control 组 vs CIH + L-cys 组:  $F_{(3, 62)} = 63.02, P < 0.01$ ]完全恢复正常(图 2)。

## 3 讨论

本研究显示间歇性低氧可引起大鼠动脉血压、交感神经活动和血浆 NE 水平显著增加, 血浆 H<sub>2</sub>S 水平降低, 提示间歇性低氧引起的高血压可能与体内的 H<sub>2</sub>S 水平下降有关; 应用 H<sub>2</sub>S 前体 L-cys, 增加内源性 H<sub>2</sub>S 水平可抑制间歇性低氧所致的血压升高和交感神经活动过度激活。

间歇性低氧是 OSA 的主要病理生理学特点和损伤机制, 其特点是: ①低氧程度严重, 最低动脉血氧饱和度可降至 20% 或更低; ②血氧饱和度一天之内会经历巨大的变化, 其幅度之大高于 30% 低于 70%。人体对低氧条件的反应包括两个过程: 损害

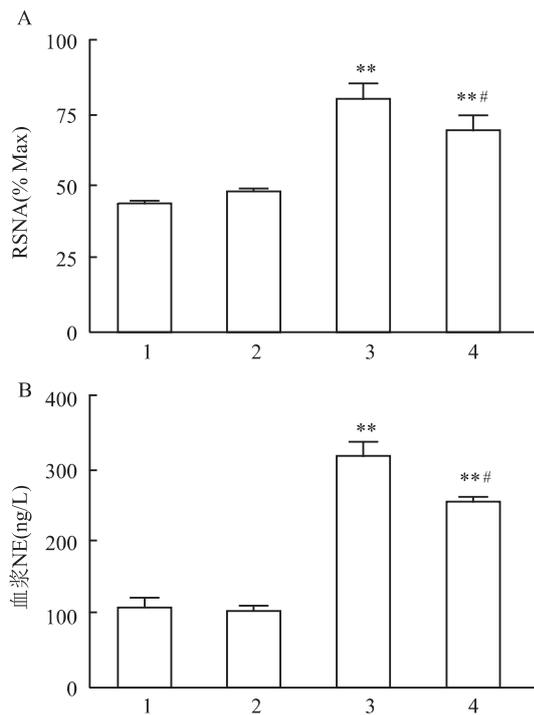


图2 L-半胱氨酸对大鼠交感神经活动的影响

A: RSNA; B: 血浆 NE 水平; 1: Control 组; 2: Control + L-cys 组; 3: CIH 组; 4: CIH + L-cys 组; 与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 CIH 组比较: #  $P < 0.05$

和适应 相比较而言 持续低氧的损害要比间歇性低氧对人体的损害更低,且人体更难以适应间歇性低氧<sup>[6]</sup>。为了研究间歇性低氧与大鼠血压升高的关系,Tamisier et al<sup>[7]</sup>模拟 OSA 患者缺氧模式建立了间歇低氧实验模型,给志愿者循环吸入低氧气体(氧浓度 13% 持续 15 s,每 2 min 一次循环),每天 8 h 持续 28 d 28 d 后志愿者平均动脉压显著升高,停止吸入低氧气体后,血压仍可持续升高。Fletcher et al<sup>[8]</sup>首先制作了可实施间歇低氧环境的实验舱,从动物整体和系统水平证实了间歇低氧确可诱发大鼠高血压。本实验采用的间歇性低氧模式为 9 min 发生一次低氧,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,连续低氧 15 d,大鼠血压出现升高。

大量的研究<sup>[9]</sup>表明,高血压患者的主要特征之一是交感神经的过度激活,在高血压疾病整个发展过程中都起着重要的作用。本研究显示 IH 可引起大鼠 RSNA 和血浆中 NE 显著升高,提示交感神经的过度激活可能是 IH 引起高血压的发病机制之一。间歇性低氧会导致氧分压降低和二氧化碳潴留,从而刺激中枢和外周化学感受器导致交感神经兴奋性

增加<sup>[10-11]</sup>。有研究<sup>[12]</sup>表明,OSA 患者外周压力感受器的敏感程度与 OSA 的严重程度密切相关,表明 IH 能够同时刺激化学感受器兴奋和影响压力感受器的功能,从而共同参与睡眠期间交感神经的过度激活。交感神经活性过度增强,会导致外周脉管系统的血管收缩,从而引起血压上升,这些由于交感神经活性过度增强机体应激产生的反应会更进一步使血压升高。

内源性  $H_2S$  由 L-cys 通过以下 3 种关键酶合成,分别是: CBS、CSE 和 3-巯基丙酮酸硫转移酶(3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, 3-MST)。  $H_2S$  在舒张血管、抑制血管重构和保护心肌等方面具有重要的生理作用,并且与多种心血管疾病相关<sup>[13]</sup>。L-cys 在体内有许多代谢途径:不但可以通过氧化还原途径分解为半胱亚磺酸,随后半胱亚磺酸在酶的作用下代谢为牛磺酸(Tau)和  $CO_2$  或丙酮酸盐和无机硫( $H_2S$ );也可发生脱硫反应,产生丙酮酸盐和过硫化物。除了形成代谢物 Tau 外,所有 L-cys 分解代谢的路径中 L-cys 的碳链转化为丙酮酸,巯基转化为无机硫( $H_2S$ )<sup>[14]</sup>。前期实验表明 IH 可引起大鼠血浆中  $H_2S$  含量降低,口服 L-cys 可显著抑制 IH 引起的血压升高和交感神经过度激活,提示 L-cys 可增加大鼠体内  $H_2S$  的含量,而  $H_2S$  可以降低交感神经的过度激活<sup>[15]</sup>,从而降低 IH 所致大鼠的高血压。

本研究的创新之处通过建立间歇性低氧动物模型,将整体和分子水平的研究有机的结合起来,综合应用心血管生理学、药理学、组织化学、分子生物学等多种技术方法解决问题。本研究的局限之处在于没有开展细胞方面的实验与动物实验相互验证。预计下一步通过细胞实验与动物实验相结合来验证 L-cys 增加内源性  $H_2S$  对间歇性低氧引起的大鼠高血压的影响及机制。

## 参考文献

- 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.
- White D P. Advanced concepts in the pathophysiology of obstructive sleep apnea[J]. Adv Otorhinolaryngol, 2017, 80: 7-16.
- Zhou J P, Lin Y N, Li N, et al. Angiotensin-(1-7) rescues chronic intermittent hypoxia-aggravated transforming growth factor-beta-mediated airway remodeling in murine and cellular models of asthma[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2020, 375(2): 268-75.
- Beltowski J. Synthesis, metabolism, and signaling mechanisms of hydrogen sulfide: an overview[J]. Methods Mol Biol, 2019, 2007: 1-8.

- [5] 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.
- [6] Beaudin A E, Waltz X, Hanly P J, et al. Impact of obstructive sleep apnoea and intermittent hypoxia on cardiovascular and cerebrovascular regulation[J]. *Exp Physiol*, 2017, 102(7): 743–63.
- [7] Tamisier R, Gilmartin G S, Launois S H, et al. A new model of chronic intermittent hypoxia in humans: effect on ventilation, sleep, and blood pressure[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2009, 107(1): 17–24.
- [8] Fletcher E C, Lesske J, Qian W, et al. Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats[J]. *Hypertension*, 1992, 19(6 Pt 1): 555–61.
- [9] Weiss J W, Tamisier R, Liu Y. Sympathoexcitation and arterial hypertension associated with obstructive sleep apnea and cyclic intermittent hypoxia[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2015, 119(12): 1449–54.
- [10] Ahmad M, Makati D, Akbar S. Review of and updates on hypertension in obstructive sleep apnea[J]. *Int J Hypertens*, 2017, 2017: 1848375.
- [11] Lai C J, Yang C C, Hsu Y Y, et al. Enhanced sympathetic outflow and decreased baroreflex sensitivity are associated with intermittent hypoxia-induced systemic hypertension in conscious rats[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2006, 100(6): 1974–82.
- [12] Arnaud C, Bochaton T, Pépin J L, et al. Obstructive sleep apnoea and cardiovascular consequences: Pathophysiological mechanisms[J]. *Arch Cardiovasc Dis*, 2020, 113(5): 350–8.
- [13] Zhang L, Wang Y, Li Y, et al. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S)-releasing compounds: therapeutic potential in cardiovascular diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1066.
- [14] Yin J, Ren W, Yang G, et al. L-Cysteine metabolism and its nutritional implications[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, 60(1): 134–46.
- [15] Shi Z, Xu L, Xie H, et al. Attenuation of intermittent hypoxia-induced apoptosis and fibrosis in pulmonary tissues *via* suppression of ER stress activation[J]. *BMC Pulm Med*, 2020, 20(1): 92.

## Effects of L-cysteine on blood pressure and sympathetic nerve activity in rats with chronic intermittent hypoxia

Sheng Hao<sup>1</sup>, Ding Yang<sup>2</sup>, Jiang Qian<sup>1</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032;

<sup>2</sup>Yueyang Vocational and Technical College, Yueyang 414000)

**Abstract Objective** To investigate the effect and mechanism of L-cysteine (L-cys) increasing endogenous H<sub>2</sub>S on hypertension induced by intermittent hypoxia in rats. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal oxygen (Control) group, chronic intermittent hypoxia (CIH) group, Control + L-cys group and CIH + L-cys group. The rats in CIH group and CIH + L-cys group were exposed to 15 d intermittent hypoxia, 8 h daily. In L-cys treatment group, the rats were given L-cys (10 mg/kg) each day by the oral administration. Noninvasive measurement of tail artery systolic blood pressure (SBP) was measured by the tail cuff system. The renal sympathetic nerve activity (RSNA) renal sympathetic nerve activity (RSNA) were recorded *in vivo* on a PowerLab data acquisition system. The plasma concentrations of norepinephrine (NE) and H<sub>2</sub>S, activity of cystathionine-β-synthase (CBS) and cystathionine-γ-lyase (CSE) were measured by ELISA kits. **Results** Systolic blood pressure of tail artery significantly increased after CIH exposure, but did not change after normoxia exposure. RSNA and plasma concentrations of NE were also significantly higher in CIH rats than in control rats. The plasma level of H<sub>2</sub>S in CIH rats were significantly decreased than those in control rats. L-cys increased the level of H<sub>2</sub>S of CIH rats, and significantly inhibited the increase of blood pressure and excessive activation of sympathetic nerve activity induced by intermittent hypoxia. **Conclusion** L-cys can improve intermittent hypoxia induced-hypertension in rats by increasing endogenous H<sub>2</sub>S.

**Key words** intermittent hypoxia; hypertension; sympathetic nerve activity; hydrogen sulfide