分 类 号 ： R363 密 级 ： 公 开U D C： 610 编 号 ：201522011002



2011 级攻读博士学位研究Th毕业论文

高脂饮食对低氧环境大鼠主动脉内皮结构和功能的影响

Effect of high fat diet on aortic endothelial structure and function in hypoxic rats

指 导 教 师： 格日力教授学 Th 姓 名 ： 赵 艳 霞学科专业名称： 内科学研 究 方 向： 高原医学学院(系、部)： 医学院

论文起止时间： 2011.09— 2015.05

**Qinghai University Doctoral Dissertation**

**Effect of high fat diet on aortic endothelial structure and function in hypoxic rats**

**Supervisor: Ri-Li Ge Candidate: Yan-Xia Zhao**

**Academic Major Applied for: Internal Medicine Specific Major: High Altitude Medicine**

**College (Department): Qinghai University Medical college**

**May, 2015**



摘 要

**背景与目的**：随着经济发展和西部大开发的推进，国家对高原人群的健康日渐关注。心血管疾病作为全球的头号死因，是降低社会生产力，增加经济负担的首要疾病，也是影响我国高原人群健康的主要疾病。

血管内皮是许多心血管疾病及其危险因素作用的重要靶器官。血管内皮具有屏障作用；同时，血管内皮作为体内最大的内分泌系统可分泌多种物质维持血管正常结构和功能，其中一氧化氮（nitric oxide, NO）是临床评定内皮功能的重要指标。NO由一氧化氮合酶（nitric oxide synthase, NOS）催化其底物左旋精氨酸生成，具有扩张血管、抑制血小板的聚集与激活、抑制中性粒细胞与单核细胞对血管壁的浸润与吸附、抑制血管平滑肌细胞增殖和抗血栓形成，调节血管张力、维持血管稳态及血管内皮正常功能的心血管保护作用。高脂血症等危险因素可降低循环血中NO含量，引起血管内皮结构损伤和内皮依赖性舒张功能障碍，启动心血管疾病的发生与发展。NO亦是高原低氧适应与习服的重要指标。低氧适应或习服的高原世居者或移居者血浆内NO含量适应性的升高，可扩张血管，减小外周阻力，增加血流量，使组织的氧供增加，保持人体正常的功能，以代偿低氧的影响。伴随高原旅游业日益兴旺，低海拔地区人群前往高原地区的数量不断增加；加上慢性呼吸系统疾病的高发，不仅高原世居、移居、迁徙人群，而且更多的人受到低氧的影响。对于高原人群，低压低氧的自然环境是不可改变的因素，对机体组织器官的功能、代谢等产生着广泛的影响，且单纯慢性低氧即可引起高脂血症。同时，高原低温低氧的环境特点，也使得高原人群饮食习惯发生改变，高脂饮食现象普遍，增加了高原人群高脂血症的发生率。使得低氧环境人群暴露于高脂血症的威胁增多。

高脂血症可引起血管内皮功能障碍，启动心血管疾病的发生，是心血管疾病公认的危险因素。高脂饮食或高脂血症是否会引起或加重低氧环境机体的血管内皮损伤？高脂饮食或高脂血症对低氧环境机体（高原低氧环境人群或慢性缺氧性疾病如冠心病、慢性阻塞性肺部疾病等致体内低氧人群）是否亦为危险因素？目前尚无定论。本研究通过检测低氧及低氧联合高脂饮食不同时间点大鼠主动脉内皮型一氧化氮合酶（endothelial NOS, eNOS）mRNA及蛋白表达、

诱导型一氧化氮合酶（inducible NOS, iNOS）mRNA表达、血浆NO含量及离体主动脉血管环内皮依赖性舒张功能，以期明确高脂饮食对低氧环境大鼠主动脉内皮功能的影响及其过程与机制。

**方法：**将72只雄性清洁级SD大鼠（购于中国药科大学，南京，海拔10 m）随机分为三组：低氧（H）组、低氧联合高脂饮食（H+HFD）组与基线（BL）组，因为本研究的目的是探讨高脂饮食对低氧环境大鼠血管内皮功能的影响，而不是低氧与高脂饮食两个因素的交互作用，所以未设置常氧联合高脂饮食组。但为了观察低氧组的变化，将在南京常氧环境的大鼠作为BL组进行对照。BL组大鼠（8只）于南京即刻取材，其他两组大鼠运至西宁市（海拔2260 m），并即刻放入低压氧舱，模拟海拔5000 m的持续性低压低氧环境，H+HFD组大鼠灌服脂肪乳剂（10 ml/kg/d, 每日1次），H组大鼠灌服等体积的生理盐水，普通饮食。H组与H+HFD组分别于实验1、2、3、4周取材，每组每个取材时间点实验动物为8只。采用无创鼠尾血压检测仪检测大鼠血压及心率。腹腔注射乌拉坦麻醉大鼠，下腔静脉取血，取主动脉，并分离周围结缔组织，制备血管环，采用体外恒温组织浴槽及多导生理记录仪进行体外血管环实验，检测内皮依赖性血管舒张功能及非内皮依赖性血管舒张功能，同时检测NOS底物左旋精氨酸

（L-arginine, L-arg）或抑制剂Nω硝基L精氨酸甲酯（Nω-Nitro-L-Arginine Methyl Ester, L-NAME）对内皮依赖性血管舒张功能影响。用（全自动）血细胞分析仪测定全血血红蛋白（hemoglobin, HGB）浓度，HE染色主动脉病理切片，用光学显微镜观察主动脉结构变化，采用荧光实时定量PCR方法检测主动脉eNOS与iNOS的mRNA表达水平，用Western blot法检测各组大鼠主动脉eNOS蛋白表达水平，采用硝酸还原酶法检测血浆NO水平，分别用TBA法与WST-1法检测血浆丙二醛（malondialdehyde, MDA）含量及超氧化物歧化酶（superoxide

dismutase，SOD）活力。采用终点法和直接法检测血浆甘油三酯（triglyceride，

TG）、总胆固醇（total cholesterol, TCH）、高密度脂蛋白（high-density lipoprotein，

HDL）和低密度脂蛋白（low density lipoprotein, LDL）含量。

**结果**：从实验2周起，高脂饮食明显降低低氧大鼠心率，并使2周及4周血浆

TCH及LDL浓度明显升高(*P*<0.05)。低氧大鼠血浆NOx含量于整个实验进程中均明显高于BL组(*P*<0.05)，并逐渐降低。联合高脂饮食使低氧大鼠血浆NOx含量明显降低(*P*<0.05)。光学显微镜观察HE染色病理切片显示，H+HFD组大鼠呈早期、加重的主动脉内皮与平滑肌损伤。H组大鼠于低氧1、2周时，主动脉仅

表现为内皮细胞肿胀，平滑肌细胞轻度增生等较轻微的损伤，至4周时，表现局部内膜小片状脱落，平滑肌细胞局部胞浆空泡变。而H+HFD组大鼠于实验2周时即可见局部内膜片状脱落，平滑肌细胞细胞核变圆，局部胞浆空泡变，至实验3、4周出现局部内膜大片脱落，平滑肌细胞大量增生，细胞核变圆，胞浆空泡变，细胞排列紊乱等更严重的病变。高脂饮食明显降低低氧环境大鼠主动脉血管环对乙酰胆碱（acetylcholine, ACh）的内皮依赖性舒张功能，这种舒张可完全被NOS抑制剂L-NAME阻断，NOS底物L-arg可改善H+HFD组大鼠主动脉血管环的舒张功能，并抵消其与H组大鼠的区别。实时定量PCR结果显示，

H组大鼠主动脉eNOS mRNA表达均明显高于BL组(*P*<0.05). 高脂饮食明显降低低氧大鼠1周及2周eNOS mRNA表达水平(*P*<0.05). eNOS蛋白表达与eNOS

mRNA的变化趋势基本一致。与H组比较，H+HFD组大鼠1周、2周、3周的主动脉iNOS mRNA表达水平无明显变化(*P*> 0.05)。低氧大鼠从2周起，血浆

MDA含量明显高于BL组(*P*<0.05)。联合高脂饮食并未引起低氧大鼠血浆MDA含量的进一步增加，且4周时MDA含量明显降低。血浆SOD活力的变化与MDA含量变化趋势基本一致。

**结论**：1. 高脂饮食引起低氧环境大鼠主动脉内皮结构损伤及内皮依赖性血管舒张功能障碍。

2. 高脂饮食引起低氧环境大鼠主动脉内皮功能障碍的主要机制是高脂饮食钝化了低氧环境大鼠血浆NOx的代偿性升高。

3. 高脂饮食降低低氧环境大鼠主动脉eNOS mRNA与蛋白表达、降低血浆

L-arg活性是其钝化血浆NOx代偿性升高的主要原因。

4. 高脂饮食并未加重低氧环境大鼠的氧化-抗氧化系统失衡，可能不是引起血浆NOx含量降低及主动脉内皮功能障碍的主要原因。

**关键词**：低氧； 高脂饮食； 一氧化氮合酶； 一氧化氮； 超氧化物歧化酶； 丙二醛； 内皮依赖性舒张功能； 主动脉

**Abstract**

**Backgrounds and objectives**: With the development of the western area of China, the people's health in high altitude has been drawn more and more attention. Cardiovascular diseases as the leading cause of death in the world cause to the economic burden. Cardiovascular diseases are the main diseases affect people's health in plateau as well.

Vascular endothelium is an important target for cardiovascular disease and its risk factors. The vascular endothelium has barrier function. At the same time, vascular endothelium as the largest endocrine system of the body can secrete a variety of factors to keep the normal vascular structure and function, including nitric oxide (NO) which is an important index of clinical evaluation of endothelial function. NO is a gas produced by nitric oxide synthase (NOS) enzymes catalyzing substrate L-arginine. NO plays its cardiovascular protective roles such as vasodilatation, inhibition of platelet aggregation and activation, inhibition of neutrophils and monocytes infiltration and adsorption to vascular wall, inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation and resisting thrombosis, regulation vascular tone and maintaining steady state and vascular endothelial function. Hyperlipidemia and other cardiovascular risk factors can induce dysregulation of vascular structure and impairment of endothelium dependent vasorelaxation-vascular endothelial dysfunction (VED) by reducing the NO content in the blood circulation, and then make the occurrence and development of cardiovascular diseases. Moreover, NO is also a crucial factor for high altitude adaptation and acclimatization. The levels of circulating NO are increased in high altitude natives and migrants that being adaptation or acclimatization to hypoxia. Higher levels of plasma NO can maintain normal function of body to compensate the influence of hypoxia by dilating blood vessels, reducing the peripheral resistance, increasing blood flow and the oxygen delivery to tissues. Along with the high altitude tourism is booming, there are increasing number of visitors from low altitude to high altitude; Couple with the high

Incidence of chronic respiratory disease, not only high altitude natives, residents and migrants, but also more and more people are affected by hypoxia. For high altitude people, hypoxia is an irreversible factor of natural environment which has the extensive influence tissues and organs. Moreover, chronic hypoxia can cause hyperlipidemia. At the same time, the eating habit has changed-high fat diet being widespread because of the cold environment of high altitude, and thereby the incidence of hyperlipidemia is increasing in high altitude. The threat by hyperlipidemia for high altitude people is increasing.

Hyperlipidemia is a common risk factor for cardiovascular diseases, which can cause vascular endothelial dysfunction, and initiate the occurrence of cardiovascular disease. Whether a high fat diet or hyperlipidemia causes the vascular endothelial dysfunction in hypoxic settingIsahighfatdietorhyperlipidemiaariskfactorforhypoxicsetting(peopleinhighaltitudehypoxicenvironmentorchronichypoxicdiseasesuchascoronaryheartdisease, chronicobstructivepulmonarydisease) Itremains unclear. Therefore, our study investigate the effects ofhigh fat diet onvascular endothelial function inSDrat exposed tolong-term and continuous hypo baric hypoxia bytesting the levels ofendothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA and protein expression, induced nitric oxide synthase (iNOS) mRNA expression, plasma NOcontent and endothelium dependent relaxing function ofaortic vascular ring in vitro.

**Methods:** Male Sprague-Dawley (SD) rats (n=72) were purchased from China Pharmaceutical University in Nanjing. Rats were randomly divided into three groups: a hypoxia (H) group with regular chow, a combined hypoxia and high fat diet (H+HFD) group, and for comparison, rats maintained in normoxic environment (Nanjing, altitude of 10 meters), and regular chow conditions were set as baseline (BL) group. As the aim of our study was to investigate the effects of high fat diet on VED in SD rats of exposure to hypoxia, other than the interaction effect of hypoxia and high fat diet, so a group of combined normoxia and high fat diet wasn't set. The samples of BL group were collected in Nanjing right away. The rats of H+HFD group

And H group were transported to Xining and maintained in hypobaric hypoxic chamber in laboratory in Xining. The environment of altitude of 5000 meters was simulated by hypobaric hypoxic chamber. Rats were gavaged with fat emulsion (H+HFD group, 10 ml/kg/d) or equal volume of saline solution (H group) once daily for 4 weeks. The samples of rats in H group and H+HFD group were collected at 1,2,3,4 week (n=8, each group at each time point). A noninvasive rat tail blood pressure cuff was used to assessed blood pressure (BP) and heart rate (HR). The rats were anesthetized with urethane, and the venous blood was collected. The aortas were separated from the anaesthetized rats, and then cut into 5 mm length to make aortic rings. Aortic rings were mounted on constant temperature organ bath connected to an isometric tension transducer. Then measure endothelium-dependent relaxation responses and endothelium-independent relaxation responses. Meanwhile, the effects of L-arginine (L-arg; a NOS substrate) and Nω-Nitro-L-Arginine Methyl Ester (L-NAME; a NOS inhibitor) on endothelium-dependent relaxation responses to acetylcholine (ACh) were assessed. An automatic blood cell analyzer was used to test the hemoglobin (HGB) concentration. A light microscopy was used analyze the aortic sections stained with hematoxylin-eosin (HE). Western blotting was used to test the expression of eNOS protein and real-time PCR was used to test the expression of eNOS mRNA and iNOS mRNA. WST-1 methods, TBA methods and Nitrale reduetase method were used to test the plasma superoxide dismutase (SOD) activity, the content of malondialdehyde (MDA) and nitrates and nitrites (NOx, the stable metabolite of NO). End point method and direct method were used to test the plasma triglyceride (TG), total cholesterol (TCH), high density lipoprotein (HDL) and low density lipoprotein (LDL) levels.

**Results:** High fat diet significantly reduced the heart rates in hypoxia exposed rats from 2 week and increased the levels of plasma TCH and LDL at 2 week and 4 week (*P*<0.05). The plasma NOx levels in rats of H group were significantly higher than

That in rats of BL group (*P*<0.05), and then gradually decreased. In contrast, high fat diet significantly reduced the plasma NOx levels in hypoxia exposed rats (*P*<0.05). In rats exposed to hypoxia only, aortas were relatively normal at week 1 and at week 2 with mild endothelial cells (EC) swelling and hyperplasia, smooth muscle cells (SMC) proliferation. These changes became more severe with intima layer desquamation from the vascular wall, rounded EC nuclei and disarranged SMCs with oval nuclei by 4 weeks. In comparison, the aortas of the H+HFD group exhibited more significant changes than H group with rounded EC nuclei and intima layer desquamation at 2 week. These alterations became more severe phenotypically by week 3 and week 4 with intima layer desquamation, SMC proliferation, round nuclei and vacuolar degeneration. Aortic rings from the H+HFD group showed impaired endothelium dependent vasorelaxation by ACh stimulation. And the ACh-mediated vasorelaxation was fully inhibited in all groups when pre-incubated the rings with the NOS inhibitor L-NAME, Meanwhile, impairments in endothelium dependent vasorelaxation from the H+HFD group were rescued when pre-incubated the rings with the NOS substrate L-arginie, and offset its difference from H group. The eNOS mRNA and protein levels of aorta were significantly increasing in H group compared with BL group. However, this adaptive increasing response was significantly blunted during the first two weeks in H+HFD group compared to H group. The expression of iNOS mRNA was similar among hypoxia alone and H+HFD groups during the first 3 weeks of treatment. Hypoxia alone resulted in significantly higher plasma MDA content from 2 weeks. However, hypoxia plus HFD didn't increase the MDA content additionally and, MDA levels were significantly lower than that in hypoxia alone conditions by 4 weeks into treatment. The similar trends as MDA were showed in plasma levels of SOD activity.

**Conclusions**: 1. High fat diet caused earlier and more severe changes in aortic endothelial structures and impaired endothelium-dependent vasorelaxation responses in continuous hypoxia exposed rats.

2. High fat diet blunted adaptive increase in plasma NO in continuous hypoxia exposed rats is the main reason for vascular endothelial dysfunction.

3. A high fat diet reduce the expression of eNOS mRNA and protein in aorta and

The activity of L-arg in continuous hypoxia exposed rats may be account for the blunted increase in NO.

4. A high fat diet did not exacerbate imbalance of oxidative and antioxidative system in continuous hypoxia exposed rats, which may be not the main reason for NO decreasing and vascular endothelial dysfunction.

**Key word**: Hypoxia; High fat diet; Nitric oxide synthase; Nitric oxide superoxide dismutase malondialdehyde endothelium dependent relaxation responses; Aorta

目 录

[摘 要](#_Toc686310485) 2

**[Abstract](#_Toc686310486)** 3

[主要符号对照表](#_Toc686310487) 4

[第](#_Toc686310488)**[1](#_Toc686310488)**[章 前言](#_Toc686310488) 6

[第](#_Toc686310489)**[2](#_Toc686310489)**[章 材料与方法](#_Toc686310489) 7

**[2.1](#_Toc686310490)** [材料](#_Toc686310490) 7

[2.1.1 实验动物及分组](#_Toc686310491) 7

[2.1.2 主要试剂及配制](#_Toc686310492) 7

[2.1.3 主要仪器](#_Toc686310493) 9

[2.1.4 分析软件](#_Toc686310494) 10

**[2.2](#_Toc686310495)** [方法](#_Toc686310495) 10

[2.2.1 技术路线](#_Toc686310496) 10



[SD 大鼠](#_Toc686310496)

[H 组（n=32）](#_Toc686310496)



[H+HFD 组（n=32）](#_Toc686310496)

[2.2.2 检测体重、血压和心率](#_Toc686310497) 11

[2.2.3 血液及主动脉标本制备](#_Toc686310498) 11

[2.2.4 血红蛋白检测](#_Toc686310499) 11

[2.2.5 血脂检测](#_Toc686310500) 11

[2.2.6 血浆NOx水平测定](#_Toc686310501) 11

[2.2.7 主动脉标本制备与HE染色](#_Toc686310502) 12

[2.2.8 主动脉内皮依赖性舒张功能检测](#_Toc686310503) 13

[2.2.9 主动脉eNOS与iNOS mRNA水平检测](#_Toc686310504) 14

[2.2.10 主动脉eNOS蛋白水平检测](#_Toc686310505) 17

[2.2.11 血浆丙二醛、超氧化物歧化酶水平测定](#_Toc686310506) 20

[2.2.12 统计学分析](#_Toc686310507) 23

[第](#_Toc686310508)**[3](#_Toc686310508)**[章 实验结果](#_Toc686310508) 23

**[3.1](#_Toc686310509)** [各组大鼠一般状态](#_Toc686310509) 23

**[3.2](#_Toc686310510)** [各组大鼠血压、心率情况](#_Toc686310510) 24

**[3.3](#_Toc686310511)** [各组大鼠](#_Toc686310511)**[HGB](#_Toc686310511)**[变化比较](#_Toc686310511) 26

**[3.4](#_Toc686310512)** [各组大鼠血脂变化比较](#_Toc686310512) 27

**[3.5](#_Toc686310513)** [各组大鼠血浆](#_Toc686310513)**[NOx](#_Toc686310513)**[含量](#_Toc686310513) 27

**[3.6](#_Toc686310514)** [各组大鼠主动脉形态学变化](#_Toc686310514) 27

**[3.7](#_Toc686310515)** [各组大鼠主动脉内皮依赖性舒张功能比较](#_Toc686310515) 29

[3.7.1 各组大鼠主动脉血管环Phe收缩率比较](#_Toc686310516) 29

[3.7.2 各组大鼠主动脉血管环非内皮依赖性舒张功能比较](#_Toc686310517) 29

[3.7.3 各组大鼠主动脉血管环内皮依赖性舒张功能比较](#_Toc686310518) 29

**[3.8](#_Toc686310519)** [主动脉](#_Toc686310519)**[eNOS](#_Toc686310519)**[与](#_Toc686310519)**[iNOS mRNA](#_Toc686310519)**[表达水平](#_Toc686310519) 29

[3.8.1 主动脉总RNA质量](#_Toc686310520) 29

[3.8.2 基因的扩增效率](#_Toc686310521) 30

[3.8.3 基因的扩增曲线和溶解曲线](#_Toc686310522) 30

[3.8.4 主动脉eNOS mRNA表达结果](#_Toc686310523) 31

[3.8.5 主动脉iNOS mRNA表达结果](#_Toc686310524) 31

**[3.9](#_Toc686310525)** [主动脉](#_Toc686310525)**[eNOS](#_Toc686310525)**[蛋白表达结果](#_Toc686310525) 31

**[3.10](#_Toc686310526)** [血浆](#_Toc686310526)**[MDA](#_Toc686310526)**[及](#_Toc686310526)**[SOD](#_Toc686310526)**[水平检测结果](#_Toc686310526) 31

[第](#_Toc686310527)**[4](#_Toc686310527)**[章 讨论](#_Toc686310527) 32

[第](#_Toc686310528)**[5](#_Toc686310528)**[章 结论](#_Toc686310528) 32

[参考文献](#_Toc686310529) 33

[参考文献](#_Toc686310530) 36

[作者简历](#_Toc686310531) 36

# 主要符号对照表

|  |  |
| --- | --- |
| HFD | 高脂饮食(high fat diet) |
| VED | 血管内皮功能失调(vascular endothelial dysfunction) |
| EC | 内皮细胞(endothelial cell) |
| SMC | 平滑肌细胞(smooth muscle cell) |
| ROS | 活性氧(reactive oxygen species) |
| SOD | 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase) |
| MDA | 丙二醛(malondialdehyde) |
| HGB | 血红蛋白(hemoglobin) |
| TG | 甘油三酯(triglyceride) |
| TCH | 总胆固醇(total cholesterol) |
| LDL | 低密度脂蛋白(low density lipoprotein) |
| HDL | 高密度脂蛋白(high density lipoprotein) |
| BP | 血压(blood pressure) |
| SBP | 收缩压(systolic blood pressure) |
| DBP | 舒张压(diastolic blood pressure) |
| HR | 心率(heart rate) |
| NO | 一氧化氮(nitric oxide) |
| NOx | 一氧化氮代谢产物 |
| NOS | 一氧化氮合酶(nitric oxide synthase) |
| eNOS | 内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase) |
| iNOS | 诱导型一氧化氮合酶(induced nitric oxide synthase) |
| nNOS | 神经型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase) |
| RNA | 核糖核酸(ribonucleic acid) |
| rRNA | 核糖体核糖核酸(ribosomal ribonucleic acid) |
| mRNA | 信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid) |
| DNA | 脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid) |
| cDNA | 互补脱氧核糖核酸(complementary deoxyribonucleic acid) |

|  |  |
| --- | --- |
| RT PCR | 逆转录(reverse transcriptation)  聚合酶链式反应(polymerase chain reaction) |
| Ct | 循环阈值(cycle threshold) |
| Tm | 解链温度(melting temperature) |
| EDTA | 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid) |
| BL | 基线(base line) |
| H | 低氧(hypoxia) |
| Phe | 去氧肾上腺素(phenylephrine) |
| ACh | 乙酰胆碱(acetylcholine) |
| L-arg | 左旋精氨酸(L-arginine) |
| L-NAME | Nω硝基 L 精氨酸甲酯(Nω-Nitro-L-Arginine Methyl Ester) |
| SNP | 硝普钠(sodium nitroprusside) |
| K-H 液 | Krebs-Henseleit buffer |
| SD | Sprague-Dawley |
| HE | 苏木素-伊红染色(hematoxylin-eosin) |
| ONOO- | 过氧亚硝基阴离子 |
| ddH2O | 双蒸水 |
| PVDF | 聚偏二氟乙烯 |
| V | 伏特(volt) |
| L | 升(liter) |
| ml | 毫升(milliliter) |
| µl | 微升(microliter) |
| m | 米(meter) |
| cm | 厘米(centimeter) |
| mm | 毫米(millimeter) |
| nm | 纳米(nanometer) |
| kg | 千克(kilogram) |
| g | 克(gram) |
| mg | 毫克(milligram) |
| µg | 微克(microgram) |
| sec | 秒(second) |

|  |  |
| --- | --- |
| min | 分钟(minute) |
| h | 小时(hour) |
| d | 天(day) |
| rpm | 转/分(revolutions per minute) |

# 第**1**章 前言

随着经济发展和西部大开发的推进，国家对高原人群的健康日渐关注。心血管疾病作为全球的头号死因，是降低社会生产力，增加经济负担的首要疾病[1]，也是影响我国高原人群健康的主要疾病。因此合理、可持续的预防和控制心血管疾病倍受重视。

研究表明，血管内皮是许多心血管疾病及其危险因素作用的重要靶器官[2,3]。血管内皮由单层排列于血管内壁的内皮细胞构成，具有屏障作用；同时，血管内皮作为体内最大的内分泌系统可分泌一氧化氮（nitric oxide, NO）、内皮素、血管紧张素转换酶等生物活性物质，具有调节凝血、抗凝血动态平衡，调节血管舒缩状态及血管平滑肌细胞生长与增殖，调控血管形成和防止炎性细胞浸润等作用。在高血压、高血脂、胰岛素抵抗、吸烟等各种内外因素作用下，血管内皮细胞合成和释放多种血管活性物质和细胞因子间的平衡被打乱，导致内皮功能障碍，即血管内皮重构及血管内皮依赖性舒张功能障碍。血管内皮功能障碍主要表现为血管内皮屏障作用减弱；信息传递及分泌功能下降，自分泌舒血管物质能力降低，导致缩血管物质相对增多，引起血管张力变化；白细胞粘附及血小板聚集增强，抗凝血功能障碍，使抗血栓作用降低，出现高凝状态；血管内皮细胞激活，促进血管平滑肌细胞的增殖，诱发或加重动脉粥样硬化；内皮细胞粘附分子表达增多，造成血管内皮细胞的应激，进一步加重内皮功能紊乱，从而构成心血管疾病共同病理生理基础[4]。即血管内皮功能障碍是高血压、动脉粥样硬化等诸多心血管疾病的始动环节及促发因素，亦有预测心血管并发症及不良心血管事件的作用[5]。

NO是一种有多种生物学活性的细胞信号分子，具有扩张血管、抑制血小板的聚集与激活、抑制中性粒细胞与单核细胞对血管壁的浸润与吸附、抑制血管平滑肌细胞增殖和抗血栓形成的作用，可调节血管张力、维持血管稳态，在维持血管内皮正常功能中起着关键作用。对心血管系统正常的结构和功能有多重保护作用，是临床评定内皮功能的重要指标。NO含量降低，可引起血管内皮功能障碍，而通过补充其生成底物左旋精氨酸（L-arginine, L-arg）等改善NO含量，则有助于改善血管内皮功能[6,7]。NO亦是高原适应与习服的重要指标[8, 9]。低压

低氧的外界环境，使得高原人群血氧饱和度降低，血氧含量降低，低氧刺激肺血管收缩，肺血管阻力升高，进而引起有效循环血量减少，组织氧供减少，同时出现肺动脉压力升高，右心重构等低氧脱适应的急性、慢性高原病。但低氧适应或习服的高原世居者或移居者并未出现相应病变，主要因为其肺内、血浆及唾液等组织或体液内适应性的NO含量升高，通过扩张血管，减小外周阻力，增加血流量，以代偿低压低氧的影响，使组织的氧供增加，保持人体正常的功能[8, 10, 11]。

NO由一氧化氮合酶（nitric oxide synthase, NOS）催化其底物L-arg生成。已知NOS有三种亚型，即内皮型NOS（endothelial NOS, eNOS）、神经型NOS

（neuronal NOS, nNOS）及诱导型NOS（inducible NOS, iNOS）。表达于血管内皮细胞中的eNOS是NO最主要的来源。研究表明，eNOS来源的NO有血管保护作用。eNOS-/-小鼠或应用NOS抑制剂，阻止eNOS发挥作用，可引起NO含量减少，NO的血管保护作用减弱，出现中性粒细胞、血小板聚集，平滑肌细胞增殖，血管内皮的完整性破坏，内皮依赖性舒张功能障碍，血管张力异常等病理损伤，导致高血压、动脉粥样硬化等疾病的发生与进程加速[12-16]。而应用eNOS的底物或转基因使eNOS表达上调，可改善上述血管的病理损伤[17-19]。但是eNOS的表达量、eNOS磷酸化部位、eNOS与辅因子的平衡状态、底物的充足与否等均会影响NO的生成，若机体氧化应激损伤增加，或者eNOS的辅因子相对不足，则会引起eNOS脱偶联，即使其从同源二聚体变为单体，成为活性氧的来源，而不生成NO，可引起血管内皮的损伤。一般只有在细胞因子、炎症等应激因素作用下，iNOS可高表达。iNOS来源的NO，即由炎症等因素诱导的巨噬细胞或中性粒细胞等分泌的NO，可作用于靶细胞（如肿瘤细胞、病原微生物等），干扰其DNA，致使DNA链断裂或破碎，而产生有益作用。但其不仅对肿瘤细胞等靶细胞有毒性作用，还可损伤周围的健康细胞。iNOS来源的NO可与超氧阴离子反应生成过氧亚硝基阴离子（ONOO-），后者可加重eNOS的氧化损伤，减少

NO的生成与利用，诱导血管内皮损伤。而抑制iNOS的高表达，可改善内皮依赖性血管舒张功能[20, 21]。

NOS/NO信号通路异常是高脂血症引起血管内皮功能障碍的主要机制。研究表明，高脂血症可增加机体活性氧（reactive oxygen species, ROS）的产生，ROS可降低eNOS的表达，引起eNOS脱偶联，进而降低NO的产生。ROS还可直接清除NO，或氧化NO为过氧亚硝基阴离子，后者的氧化性更强，可以氧化eNOS

辅因子，使其数量减少或者出现功能障碍，从而引起更多eNOS 脱偶联，降低

NO的生成及生物利用率[22]。此外，高脂血症可通过诱导小窝蛋白，降低eNOS与质膜的解离，降低eNOS酶活性，减少NO的产生，进而减少了NO对血管内皮的保护性作用，引起血管内皮功能障碍[23]。同时，应用NOS的底物补充剂或抗氧化剂可增加NO的产生，改善血管内皮功能[22]。

严格监测和控制心血管疾病等慢性非传染性疾病的危险因素是世界卫生组织和国际慢性非传染性疾病联盟的主要防控措施和策略。其危险因素可分社会环境因素、中间（生物）危险因素和一般危险因素3类，其中生活行为因素如酗酒、吸烟、活动不足、高盐高脂高糖饮食等，以及由不良生活行为因素导致的生物学因素如高血压、高血脂、高血糖、超重与肥胖等均为可控因素，被视为病因预防的重要方面[24]。伴随高原旅游业日益兴旺，低海拔地区人群前往高原地区的数量不断增加；加上慢性呼吸系统疾病的高发，不仅高原世居、移居、迁徙人群，而且更多的人受到低氧的影响。对于高原人群，低压低氧的自然环境是不可改变的因素。研究表明，低压低氧对人体组织器官的功能、代谢等产生着广泛的影响，而且单纯慢性低氧即可引起高脂血症[25]。同时，高原低温的环境特点，也使得高原人饮食习惯发生改变，高脂饮食现象普遍，有研究显示高原人群高脂血症的发生率明显增加[26]。使得低氧环境人群暴露于高脂血症的威胁增多。

如前所述，高脂血症可引起血管内皮功能障碍，启动心血管疾病的发生，是心血管疾病公认的危险因素。高原人群高脂饮食现象普遍，高脂血症发生率较高，亦或慢性缺氧性疾病（如冠心病、慢性阻塞性肺部疾病等）致体内低氧，同时伴有高脂血症者，高脂饮食或高脂血症是否会引起或加重这些低氧环境机体的血管内皮损伤？高脂饮食或高脂血症对低氧环境机体是否亦是危险因素？目前尚无定论。本研究通过检测低氧及低氧联合高脂饮食不同时间点大鼠主动脉eNOS mRNA及蛋白表达、iNOS mRNA表达、血浆NO含量及离体主动脉血管环内皮依赖性舒张功能，以期明确高脂饮食对低氧环境大鼠主动脉内皮功能的影响及其过程与机制。

# 第**2**章 材料与方法

## **2.1** 材料

### 2.1.1 实验动物及分组

将72只6周龄左右，体重180～200g的雄性清洁级Sprague-Dawley（SD）大鼠（购于中国药科大学，南京市，海拔10 m）随机分为三组：低氧（H）组、低氧联合高脂饮食（H+HFD）组与基线（BL）组。因为本研究的目的是探讨高脂饮食对低氧环境大鼠血管内皮功能的影响，而不是低氧与高脂饮食两个因素的交互作用，所以未设置常氧联合高脂饮食组。但为了观察低氧组的变化，将在南京市常氧环境（海拔10 m；温度18～20℃）的大鼠作为BL组进行对照。BL组（8只）于南京市即刻取材，其他两组大鼠运至西宁市（海拔2260 m），并于到达西宁市之后即刻放入低压氧舱模拟持续性低压低氧环境（模拟海拔

5000 m；温度18～20 ℃）共4z周kq，H2+0H1F5D11组2大5鼠灌胃脂肪乳剂（10 ml/kg/d，

每日1次），H组大鼠灌胃等体积生理盐水，普通饮食。H组与H+HFD组分别于实验1、2、3、4周取材。以H 1w、H 2w、H 3w、H 4w分别表示H组1、2、

3、4周，以H+HFD 1w、H+HFD 2w、H+HFD 3w、H+HFD 4w分别表示H+HFD组1、2、3、4周。每组每个取材时间点实验动物为8只。本研究动物实验方案获青海大学医学院伦理委员会审核批准。

### 2.1.2 主要试剂及配制

#### 2.1.2.1 主要试剂

|  |  |
| --- | --- |
| 主要试剂 | 产地 |
| 去氧肾上腺素（phenylephrine, Phe） | Sigma 公司 |
| 乙酰胆碱（acetylcholine, ACh） | Sigma 公司 |
| 硝普钠（sodium nitroprusside, SNP） | Sigma 公司 |
| 左旋精氨酸（L-arginine, L-arg） | Sigma 公司 |
| N-硝基-L-精氨酸甲酯（Nω-Nitro-L-Arginine Methyl Ester, L-NAME） | |
|  | Sigma 公司 |
| PMSF | 碧云天公司 |
| RIPA 裂解液（强） | 碧云天公司 |
| BCA Protein Assay Kit | Pierce Chemical 公司 |
| SDS-PAGE 电泳液 | 碧云天公司 |
| zkq 20  SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 | 151125  碧云天公司 |
| Polyclonal rabbit eNOS 抗体 | Abcam 公司 |
| Polyclonal rabbit β-actin 抗体 | Abcam 公司 |
| HRP 标记的 goat anti rabbit 抗体 | Santa Cruz 公司 |
| ECL Western Blotting Kit | Pierce Chemical 公司 |
| 总 RNA 提取试剂盒 | 天跟生化科技有限公司 |
| RT reagent kit with gDNA Eraser | Takara 公司 |
| SYBR Select Master Mix | ABI 公司 |
| 血脂检测试剂盒 | 北京利德曼生化股份有限公司 |
| MDA 检测试剂盒 | 南京建成生物公司 |
| SOD 检测试剂盒 | 南京建成生物公司 |
| NO 检测试剂盒 | 南京建成生物公司 |

#### 2.1.2.2 主要试剂配制

脂肪乳剂制备[27]：取25 g猪油放入烧杯（200 ml）内，置于磁力搅拌器上，加热至100℃，加10 g胆固醇，溶化，再加1 g丙基硫氧嘧啶，然后加入25 g吐温80，搅匀，制成油相。将30 ml蒸馏水、20 ml丙二醇加入另一烧杯（200 ml）内，并加热至60℃，再加入2 g脱氧胆酸钠，充分搅拌，至完全溶解，即制成水相。将水相与油相充分混匀为脂肪乳剂。

Krebs-Henseleit buffe(r

K-H液）：NaC(l

118.29 mmol/L），KC(l

4.69 mmol/L)，

MgSO4(2.39 mmol/L)，KH2PO4(1.19 mmol/L)，NaHCO3(25 mmol/L)，CaCl2

（2.52 mmol/L），Glucose(12.11 mmol/L)，pH 7.4.

ACh母液：每取1 mg的ACh可配制10-2 mol/L母液1×10-3/181.66/10-2 L，然后将10-2 mol/L母液依次稀释10倍，配制浓度为10-3、10-4、10-5 mol/L的母液。实验时，依次加入（40、86.4、27.4、86.4、27.4、86.4、27.4、86.4）μl 的

（10-5、10-5、10-4、10-4、10-3、10-3、10-2、10-2）mol/L的母液到40 ml的浴槽中，即得到累计浓度为（10-8、10-7.5、10-7、10-6.5、10-6、10-5.5、10-5、10-4.5）mol/L的终浓度。

SNP母液：每取1 mg的SNzkPq可配2015110-12 2m5ol/L母液1×10-3/297.95/10-2 L，

母液浓度的稀释与实验时累计浓度的加样方法同ACh。

Phe母液：每取1 mg的Phe可配制浓度为10-3 mol/L母液1×10-3/203.67/10-3 L，取40μl母液加入到40 ml的浴槽中，得到10-6 mol/L的终浓度。

L-arg母液：每取1 mg的L-arg可配制浓度为1 mol/L母液1×10-3/174.20/1 L,

取40μl母液加入到40 ml的浴槽中，得到10-3 mol/L的终浓度。

L-NAME母液：每取1 mg的L-NAME可配制5×10-3 mol/L母液1×10-3/269.69/5×10-3 L, 取40μl母液加入到40 ml的浴槽中，得到5×10-6 mol/L的终浓度。

5×TBE电泳缓冲液：将20 ml 0.5 mmol/L的EDTA(pH值8.0)、54 g Tris、

27.5 g硼酸溶解在蒸馏水中，并定容至1 L。

琼脂糖胶（X%）：琼脂糖X g加入到100 ml的0.5×TBE电泳缓冲液中，再加EB（终浓度0.5μg/ml），加热熔化并铸胶。

1×TBST溶液：先配制10×TBS溶液（将24.2 g Tris、80 g NaCl溶解于

800 ml ddH2O中，调节pH值至7.6，加ddH2O定容至1000 ml）。取10×TBS

溶液100 ml、20%的Tween20 1 ml，加入ddH2O 900 ml，混匀即1×TBST溶液。

封闭液：取脱脂奶粉5 g，加到100 ml 1×TBST溶液中，充分混匀。

### 2.1.3 主要仪器

|  |  |
| --- | --- |
| 仪器 | 产地 |
| 低压氧舱（DYC-3000） | 贵州风雷航空机械有限公司 |
| 无创鼠尾血压检测仪（BP2010AUL） | 北京软隆科技有限责任公司 |
| 低温高速离心机（Centrifuge5417R） | Eppendorf，德国 |
| 血细胞分析仪（BC-2300） | 深圳迈瑞生物医疗电子有限公司 |
| 多导生理记录仪（MP150） | BIOPAC，美国 |
| 石蜡包埋切片机（RM2265） | Leica，德国 |
| 倒置显微镜（Olympus BX53F） | Olympus，日本 |
| 实时定量 PCR 仪（ABI7500） | ABI，美国 |
| 核酸蛋白检测仪（DU800） | BECAKMAN，德国 |
| 酶标仪（iMark/xMark） | Bio Rad，美国 |
| 水平电泳仪（DYY-III 稳压电泳仪） | 北京六一仪器厂 |
| 电动匀浆器（PRO200） zkq 2 | 15P1r1o2S5cientific，美国 |
| 凝胶（紫外）扫描成像仪 | Labworks，英国 |
| 超低温冰箱 | Thermo Forma725，美国 |
| 垂直电泳仪 | Bio Rad，美国 |
| 半干电转仪 | Bio Rad，美国 |
| 超纯水系统 | ELGA，英国 |
| 磁力加热搅拌器 | 江苏医疗器械 |
| PCR 扩增仪 | MJ Research PTC-250，美国 |

0

### 2.1.4 分析软件

SPSS17.0 Graphpad prism 5

Image J Primer Premier5.0

## **2.2** 方法

### 2.2.1

技术路线



SD 大鼠

H 组（n=32）



H+HFD 组（n=32）

BL 组（n=8）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 0 周 | | 1、2、3、4 周 | 1、2、3、4 周 | |
|  |  | | |  |

检测体重、血压和心率



zkq 20151125

收集标本

外周血

主动脉

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 血红蛋白 一氧化氮 血脂丙二醛 超氧化物歧化酶 | |  | 形态学 内皮依赖舒张功能  iNOS mRNA eNOS mRNA 及蛋白 | |
|  |  | | |  |

统计分析

### 2.2.2 检测体重、血压和心率



称取各组大鼠体重，并记录。采用无创鼠尾血压检测仪检测大鼠血压及心率。先将大鼠固定于恒温套桶内，充分露出尾部，将脉冲检测套管固定于鼠尾根部，让大鼠适应3-5 min，然后前后检测两次血压及心率，取两次平均值，并记录。

### 2.2.3 血液及主动脉标本制备

腹腔注射25%的乌拉坦（5 ml/kg）麻醉大鼠，将麻醉大鼠仰卧在手术板上，固定头部及四肢，剪开腹部的皮肤和肌肉，轻柔分离腹主动脉及下腔静脉，在下腔静脉抽取4 ml血液置于EDTAK2抗凝管中，待检测全血血红蛋白浓度后，将抗凝血于3000 r/min离心10 min，分离血浆，样本存放在-80℃冰箱备用。取血后，迅速剪开胸腔，分离胸主动脉，避免牵拉，剪取主动脉，置于氧气饱和的4℃预冷K-H液中，轻柔冲洗血液，用眼科镊小心分离主动脉周围组织，用眼科剪将其剪成若干5 mm的血管环，分别放入K-H液、4%多聚甲醛溶液及液氮中（之后将液氮内样本取出存放于-80℃冰箱内），用于主动脉内皮舒张功能的离体测定、组织形态观察及分子指标检测。

### 2.2.4 血红蛋白检测

于EDTAK2抗凝管中取20μl全血，加入血细胞检测的稀释液中，充分稀释，使用全自动血细胞分析仪测定静脉全血血红蛋白（hemoglobin, HGB）浓度，严格按仪器使用说明进行操作，检z测kq后收20集1数51据12.5

### 2.2.5 血脂检测

采用ADVIA1800（德国拜耳）进行血脂检测，用终点法测定血浆中总胆固醇（total cholesterol, TCH）及甘油三酯（triglyceride, TG）含量，用直接测定法测血浆中高密度脂蛋白（high density lipoprotein, HDL）和低密度脂蛋白（low density lipoprotein, LDL）含量。

### 2.2.6 血浆NOx水平测定

##### （1）测定原理：

采用硝酸还原酶法检测。NO的化学性质较活泼，在体内经代谢很快会转为亚硝酸盐（NO2-）和硝酸盐（NO3-），而NO2-又会进一步转化成NO3-，本方法用硝酸还原酶将NO3-特异性地还原为NO2-，再通过显色的深浅测定浓度高低，即以NO的代谢产物NOx（NO2-与NO3-）含量间接反映NO含量。

##### （2）试剂的组成与配制：

试剂一：液体6 ml×2瓶，保存于-20℃以下。使用前放室温或37℃水浴使其充分溶解后再用。

试剂二：液体6 ml×2瓶，保存于-20℃以下。使用前放室温或37℃水浴使其充分溶解后再用。

混合试剂配制的方法：按试剂一与试剂二1:1进行配制，配好后要充分混匀，待用，用多少即配多少，现用现配。

试剂三：液体12 ml×1瓶，室温保存。试剂四：液体6 ml×1瓶，室温保存。

试剂五：粉剂×1支，使用时加入90℃~100℃的热双蒸水20 ml，使其充分溶解，并避光保存。

试剂六：粉剂×1支，使用时加入双蒸水8 ml，避光并冷藏保存，若颜色变为深咖啡色则不可再用。

试剂七：液体8 ml×1瓶，室温保存。

显色剂配制的方法：需要多少配制多少，试剂五、试剂六与试剂七按照2.5: 1: 1的比例配制，避光保存。天冷时会有结晶析出，再次使用时应放100℃水浴，并反复摇动，充分溶解后可使用。

10 mmol/L标准品0.5 ml×1支，保存于-20℃以下。

100μmol/L标准应用液配制的方法：取标准品0.1 ml，加双蒸水稀释，定容

至10 ml（即100倍稀释），充分混匀，为100μmol/L的标准应用液。双蒸水40 ml×2瓶。

##### （3）操作步骤：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | 空白管 | 标准管 | 测定管 |
| 双蒸水（ml） | 0.1 |  |  |
| 100 μmol/L 标准应用液（ml） |  | 0.1 |  |
| 样本（ml） |  |  | 0.1 |
| 混合试剂（ml） | 0.4 | 0.4 | 0.4 |

充分混匀，于37℃准确水浴60 min。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 试剂三（ml） | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 试剂四（ml） | 0.1 | 0.1 | 0.1 |

旋涡充分混匀30 sec，于室温静置40 min，3500～4000 r/min离心10 min，取上清显色。

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 上清（ml） | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 显色剂（ml） | 0.6 | 0.6 | 0.6 |

混匀，并室温静置10 min，用蒸馏水调零，550 nm, 0.5 cm光径，检测各管的吸光度值。

##### （4）计算公式：

NO含量测定管吸光度-空白管吸光度标准品浓度样品测试前

（μmol/L）

标准管吸光度-空白管吸光度

(100μmol/L)

稀释倍数

### 2.2.7 主动脉标本制备与HE染色

主动脉标本制备：

（1）固定：将周围组织分离干净并剪取长度为5 mm的主动脉固定于4%中性多聚甲醛溶液中（24 h）。

（2）脱水：固定后组织依次用70%、80%、90%、95%的乙醇和无水乙醇脱水。

（3）透明：组织脱水后用二甲苯透明，以置换出乙醇（石蜡不溶解于乙醇，溶解于二甲苯）。

（4）浸蜡：把透明好的组织充分浸入到熔化的石蜡内（2 h左右），使石蜡充分浸入组织，同时替换出组织内的二甲苯。

（5）包埋：将浸蜡充分的组织块放入接有熔化石蜡的包埋盒中，压包埋盖，再接入石蜡，石蜡冷却凝固后，将包埋盒取下。

（6）切片：切片厚度3~4μm，将切片贴于普通干净的载玻片上。

（7）烤片：将载玻片放入70℃的烤片箱中，待蜡片干燥，并牢固贴附于载玻片后，大约3~4 h可取出。

苏木精—伊红（HE）染色：

（1）脱蜡：将切片依次放入二级二甲苯中，各15 min。

（2）梯度乙醇脱水：切片依次放入无水乙醇Ⅰ、无水乙醇Ⅱ、90%乙醇，各5 min，以去除二甲苯，之后放入蒸馏水浸洗1 min。

（3）苏木精染色：切片入苏木精浸染15 min，之后用自来水冲洗约15 min，

使得切片颜色发蓝。

（4）分化：用盐酸酒精液（含盐酸0.5%~1%的70%乙醇溶液）分化数秒，以脱去细胞质的着色，使得细胞核着色更鲜明。然后用自来水冲洗10 min。

（5）伊红染色：切片入伊红中浸染5~10 sec。

（6）乙醇脱水：切片依次入70%、80%、95%、95%、100%、100%的乙醇中，各1 min，以充分脱水。

（7）透明：切片依次入二级二甲苯中，各10 min。

（8）封片：将适量中性树胶滴加到切片组织上，盖上盖玻片，使得树胶布满于盖玻片。

（9）在光学显微镜下观察主动脉100×及400×的超微结构。

### 2.2.8 主动脉内皮依赖性舒张功能检测

#### 2.2.8.1 血管环体外灌流实验方法

取置于K-H液中分离剪好的胸主动脉血管环，用两根不锈钢挂钩轻柔穿过动脉环管腔，并水平悬挂于40 ml的浴槽中，一根挂钩固定于浴槽底部，另一根挂钩向上连接于张力换能器，张力换能器与多导生理记录仪（MP150）连接，后者通过与之相连的计算机软件呈现两根挂钩间血管环的张力变化的信号。浴槽内盛有40 ml的K-H液，持续通入混合气体（95% O2, 5% CO2），并保持浴槽内为37℃恒温。给予血管环1 g的静息张力，平衡约60 min，平衡过程中，每15 min更换浴槽内的液体为新鲜氧饱和的K-H液。

#### 2.2.8.2 血管环活性评价

血管环在体外环境-恒温浴槽中平衡60 min之后，正式实验前需对其活性进行评价。在浴槽中加入Phe（10−6 mol/L），检测血管环的收缩率，收缩率小于100%的血管环活性较差，要弃除。收缩率大于或等于100%的血管环活性较好，可用于后续实验。

（106 mol/L）Phe引发的张力变化值血管环收缩率（%）

静息张力

100%

#### 2.2.8.3 主动脉内皮依赖性舒张功能检测

向平衡于静息张力的血管环浴槽中加入Phe（10−6 mol/L），使血管环收缩，约13 min收缩达到平台，记录张力数值，随后每隔3 min依次加入累计浓度的

ACh（10−8~10−4.5），记录张力变化，为内皮依赖舒张反应。之后用K-H 液反复冲洗浴槽3次，并使血管环张力重新平衡至静息张力，进行后续实验。

#### 2.2.8.4 主动脉非内皮依赖性舒张功能检测

向平衡于静息张力的血管环浴槽中加入Phe（10−6 mol/L），使血管环收缩，当收缩达到平台（记录张力数值）后，每隔3 min 依次加入累计浓度的SNP

（10−8~10−4.5），记录张力变化，为非内皮依赖性舒张反应。之后用K-H液反复冲洗浴槽3次，并使血管环张力重新平衡至静息张力，进行后续实验。

#### 2.2.8.5 主动脉内皮依赖性舒张反应与NO关系的验证

血管环平衡于静息张力，向浴槽中加入NOS的底物L-arg（10−3 mol/L, 于

Phe之前15 min加入到浴槽中）或者NOS的抑制剂L-NAME(5×10−6 mol/L, 于

Phe之前20 min加入到浴槽中），然后加入Phe（10−6 mol/L）使血管收缩至平台，再加入累计浓度的ACh（10−8~10−4.5），记录张力变化。

血管环舒张率的计算公式：

血管环舒张率（%） 某浓度的ACh或SNP引发的张力变化值100%

（10-6 mol/L）Phe引发的张力变化值

### 2.2.9 主动脉eNOS与iNOS mRNA水平检测

#### 2.2.9.1 引物的合成

查阅相关文献，确定使用的eNOS[28]及β-actin[29]引物序列。采用引物设计软件Primer Premier5.0设计iNOS的引物序列，引物序列均送至Invitrogen公司合成，引物序列具体如下：

|  |  |
| --- | --- |
| 引物名称 | 引物序列 |
| ENOS rat-f | 5′- CTACCGGGACGAGGTACTGG -3′ |
| ENOS rat-r | 5′- GGAAAAGGCGGTGAGGACTT -3′ |
| INOS rat-f | 5′- TCTTTGCTTCTGTGCTAATG-3′ |
| INOS rat-r | 5′- CAGTAGTTGTTCCTCTTCCA-3′ |
| β-actin rat-f | 5′-AGTGTGACGTTGACATCCGT-3′ |
| β-actin rat-r | 5′-GACTCATCGTACTCCTGCTT-3′ |

#### 2.2.9.2 主动脉组织总RNA的提取

采用天跟生化科技有限公司提供的总RNA提取试剂盒（离心柱型）提取主动脉组织总RNA，操作步骤严格按试剂盒说明进行。

使用前，按照试剂瓶上标签的指示量向去蛋白液RD、漂洗液RW中入无水乙醇，并混匀。

（1）样品处理：每取50 mg的组织加入500μl的裂解液RZ，用电动匀浆机进行匀浆，样本的体积不能超过总裂解液RZ体积的十分之一。

（2）将匀浆好的样本在15~30℃放置5 min，使核酸蛋白复合物能够完全的分离。

（3）12000 rpm 4℃离心5 min，然后取上清，转入到新的无RNase的离心管中。

（4）加入200μl的氯仿，将离心管盖盖好，剧烈震荡15 sec，然后室温放

置3 min。

（5）12000 rpm 4℃离心10 min，离心后样品将分为三层：黄色的为有机相，无色的和中间层为水相，RNA则主要在水相中。水相体积约占所用的裂解液RZ试剂体积的50%。将水相转移至新管中。

（6）向上一步转移至新管的水相中，缓慢的加入0.5倍体积的无水乙醇，充分混匀（可能出现沉淀），将得到的沉淀和溶液一起转入一个吸附柱CR3中。12000 rpm 4℃离心30 sec，若不能一次将全部混合物和溶液加入到吸附柱CR3中，可以分两次转入，12000 rpm 4℃离心30 sec，弃掉收集管中的废液。

（7）加入500μl的去蛋白液RD至吸附柱CR3中，12000 rpm 4℃离心30 sec，弃掉收集管中的废液。

（8）加入600μl的漂洗液RW至吸附柱CR3中，室温静置2 min, 12000 rpm 4℃离心30 sec，弃掉收集管中的废液。

（9）重复步骤（8）。

（10）将吸附柱CR3放入2 ml的收集管中，12000 rpm 4℃离心2 min，去除残余的漂洗液。离心后，将吸附柱CR3在室温下放置片刻，或者放在超净工作台上，并通风片刻，充分晾干。

（11）把吸附柱CR3转入到新的离心管中，加入30~100μl的RNase-Free ddH2O，于室温放置2 min, 12000 rpm 4℃离心2 min。

取部分用于RNA浓度及质量测定，剩余部分置于-80℃保存备用。

#### 2.2.9.3 主动脉组织总RNA浓度及质量测定

##### （1）紫外分光光度法检测总RNA的浓度及质量

取1μl总RNA样品，加入到99μl RNase-free ddH2O中（稀释100倍），充分混匀，用核酸蛋白检测仪（紫外分光光度法）检测总RNA浓度，同时测定测定A260和A280。检测前，先用RNase-free ddH2O进行背景校正。

##### （2）琼脂糖凝胶电泳成像检测总RNA的质量

首先配制1%的琼脂糖凝胶：取琼脂糖1.0 g加入到100 ml的0.5×TBE溶液中，放入微波炉，加热至完全融化。待温度稍低加入8µl溴化乙锭，混匀，适量倒入制胶槽中，插好梳子。凝固后取出，放入电泳槽内。

取混有标记物的RNA样本适量，加入到电泳槽内制备好的琼脂糖凝胶的加样孔中，在110 V的电压下电泳约30 min，待电泳结束，用凝胶成像系统在紫外线下看凝胶成像情况，并记录。

#### 2.2.9.4 cDNA第一链的逆转录合成

以提取的总RNA做为模板，采用RT reagent kit with gDNA Eraser（Takara公司）完成cDNA第一链的逆转录合成，严格按试剂盒说明进行操作。具体的操作步骤如下：

（1）基因组DNA除去反应

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| 5×gDNA Eraser Buffer | 2 µl |
| GDNA Eraser | 1 µl |
| Total RNA | 1 µg |
| RNase Free dH2O | Up to 10 µl |

放入PCR扩增仪内，设置42℃2 min，然后置于4℃。

（2）反转录反应。反应液的配制在冰上进行。

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 使用量 |
| 5×Primescript○R Buffer 2 | 4 µl |
| Primescript○R RT Enzyme MixⅠ | 1 µl |
| RT Primer Mix | 1 µl |
| （1）的反应液 | 10 µl |
| RNase Free dH2O | Up to 20 µl |

放入PCR扩增仪内，设置37℃15 min，85℃15sec，然后置于4℃。待反应结束后，将cDNA放于–20℃保存。

#### 2.2.9.5 目的基因和内参基因的扩增效率判断

（1）以cDNA样本的原浓度为初始浓度，依次稀释2倍，共6个浓度。以梯度稀释的cDNA为模板，按照下表配制目的基因（eNOS、iNOS）与内参基因

（β-actin）的实时定量PCR反应体系：

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分 | 使用量 |
| SYBR○R Select Master Mix | 10 µl |
| cDNA | 2 µl |
| Primer F | 0.4 µl |
| Primer R | 0.4 µl |
| RNase Free dH2O | 7.2 µl |
| Total Volumn | 20 µl |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Step | Temperature | Duration | Cycles |
| UDG Activation | 50℃ | 2 min | Hold |
| AmpliTaq○R DNA Polymerase,  Up Activation | 95℃ | 2 min | Hold |
| Denature | 95℃ | 15 sec | 40 |
| Anneal/Extend | 60℃ | 60 sec |

（2）将加好样本的PCR 96孔板放入ABI7500荧光实时定量PCR仪中，设定实时定量PCR扩增条件如下：

（3）上述反应结束后，可获取不同梯度浓度cDNA的目的基因与内参基因的Ct值，以及目的基因与内参基因的标准曲线与扩增效率，根据获取数据选择用于正式实验的cDNA浓度，以优化反应体系，并使得目的基因与内参基因扩增效率一致。

#### 2.2.9.6 荧光实时定量PCR检测主动脉eNOS与iNOS mRNA表达水平

##### （1）建立荧光实时定量PCR的反应体系

以上述步骤选取的最适宜cDNA 浓度为模板，依据SYBR○R Select Master

|  |  |
| --- | --- |
| 反应组分 | 使用量 |
| SYBR○R Select Master Mix | 10 µl |
| cDNA | 2 µl |
| Primer F | 0.4 µl |
| Primer R | 0.4 µl |
| RNase Free dH2O | 7.2 µl |
| Total Volumn | 20 µl |

Mix试剂盒（ABI公司）说明书进行操作，建立反应体系如下（每个样本每个基因设置3个复孔）：

##### （2）用封口膜将加好样本的96孔板密封压好，震荡，充分混匀，用低温

离心机于3000 r/min离心5 min，使反应液落于管底，并将气泡去除干净。

##### （3）将PCR 96孔板放入ABI7500荧光实时定量PCR仪中，设定实时定量

PCR扩增条件如下：

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Step | Temperature | Duration | Cycles |
| UDG Activation | 50℃ | 2 min | Hold |
| AmpliTaq○R DNA Polymerase,  Up Activation | 95℃ | 2 min | Hold |
| Denature | 95℃ | 15 sec | 40 |
| Anneal/Extend | 60℃ | 60 sec |

##### （4）反应结束可获取所有检测样本的溶解曲线、扩增曲线，以及目的基因和内参基因的Ct值。用2-△△Ct方法进行计算（eNOS与iNOS为目的基因，β-actin为内参基因）。

### 2.2.10 主动脉eNOS蛋白水平检测

#### 2.2.10.1 总蛋白提取

（1）于-20℃冰箱内取出RIPA裂解液，融解，取适量，加入PMSF，使PMSF

终浓度为1 mmol/L。

（2）于-80℃冰箱内取出冻存的主动脉组织样本，放入EP管（U型）中，加入RIPA裂解液（按每50 mg组织加入500µl RIPA裂解液），用电动匀浆器在冰上匀浆。

（3）将匀浆后的EP管放入低温离心机内，13000 r/min 4℃离心10 min。

（4）取上清放入一个新EP管中，然后放在冰上分装。除其中一份用于蛋白浓度测定之外，其余分装EP管中均加入适量的5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液，90℃变性10 min，冷却后离心，放置-80℃冰箱保存。

#### 2.2.10.2 蛋白定量

采用Pierce BCA的蛋白定量试剂盒进行总蛋白定量，严格依据试剂盒说明进行操作。

##### （1）将蛋白样品用1×PBS稀释10倍。

##### （2）根据试剂盒说明制备标准品：

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  |  |  |  |  |
|  | Vial | Volume of Diluent | Volume and BSA | Final BSA concentration |  |
|  | A | 0 µl | 300 µl | 2000 µg/ml |  |
|  | B | 125 µl | 375 µl | 1500 µg/ml |  |
|  | C | 325 µl | 325 µl | 1000 µg/ml |  |
|  | D | 175 µl | 175 µl of Vial B dilution | 750 µg/ml |  |
|  | E | 325 µl | 325 µl of Vial C dilution | 500 µg/ml |  |
|  | F | 325 µl | 325 µl of Vial E dilution | 250 µg/ml |  |
|  | G | 325 µl | 325 µl of Vial F dilution | 125 µg/ml |  |
|  | H | 40 µl | 100 µl of Vial G dilution | 25 µg/ml |  |
|  | I | 40 µl | 0 | 0 µg/ml=Blank |  |

##### （3）工作液配制：计算工作液的用量，按照反应液A与反应液B 1:50的比例混合配制而成。

##### （4）在96孔板内每孔加稀释的蛋白样本或标准品10µl，然后每孔加200µl

工作液，于37℃避光孵育30 min。

##### （5）将96孔板放在酶标仪上，于562 nm吸光度检测吸光度值，根据获取的标准曲线计算蛋白浓度。

#### 2.2.10.3 Western-blot法检测主动脉eNOS蛋白表达水平

（1）根据SDS-PAGE凝胶配制的说明（碧云天），配制5%积层胶和10%分离胶：

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | 5%浓缩胶（2 ml） | 10%分离胶（5 ml） |
| H2O | 1.4 ml | 1.3 ml |
| 30%丙烯酰胺溶液 | 0.33 ml | 1.7 ml |
| 1M Tris | (PH6.8)0.25 ml | （PH8.8）1.9 ml |
| 10%SDS | 0.02 ml | 0.05 ml |
| 10%APS | 0.02 ml | 0.05 ml |
| TEMED | 0.002 ml | 0.002 ml |

先配制分离胶，将其加入制胶板内，上层加水压30 min，待分离胶凝固，

将水倒净，然后加入现配制的浓缩胶，插入梳子，待其凝固后将胶板放入装有电泳液的垂直电泳槽内，拔掉梳子。

（2）加样：用微量移液器分别向每泳道加入含有蛋白上样缓冲液的蛋白样本80µg 。

（3）电泳：加样后，设置电泳仪，先80 V电泳30 min，再调解电压至110

V电泳，观察样本电泳至离凝胶底线约1 cm时停止电泳。

（4）转印：电泳结束之后，从胶板中将胶取出，切除上层的浓缩胶，将分离胶放于电转缓冲液（4℃预冷）中，平衡约5 min。准备与凝胶大小适宜的PVDF膜和厚滤纸，PVDF膜用甲醛激活后放入预冷电转缓冲液中，平衡5 min。依次将厚滤纸、凝胶、PVDF膜、厚滤纸放置于Bio-Rad半干电转仪上，轻轻去除气泡，用10 V恒压电转50 min。

（5）洗膜：电转后，将PVDF膜取出，放入装有1×TBS液的培养皿中，在摇床上漂洗5 min。

（6）封闭：将PVDF膜取出，用5%脱脂奶粉在室温下封闭2小时。

（7）一抗孵育：根据目的蛋白与内参蛋白的分子量大小，以及Marker显示的分子量标志，剪开PVDF膜，并装入杂交袋内，分别加入封闭液稀释的一抗

（兔抗eNOS, 1:250;兔抗β-actin, 1:1000），尽量将气泡排除干净，用封口机将杂交袋封口，并于4℃过夜。

（8）洗膜：取出PVDF膜，用1×TBST液漂洗，每次6 min，共洗10次。

（9）二抗孵育：将PVDF膜取出，放于杂交袋内，加辣根过氧化物酶标记的二抗（羊抗兔1: 6000），尽量将气泡排除干净，用封口机将杂交袋封口，室温下孵育1小时。

（10）洗膜：取出PVDF膜，反复用1×TBST液漂洗，每次6 min，共洗

10次。

（11）发光：在光线较暗环境中，用保鲜膜平铺在暗盒中。将化学发光（ECL）试剂盒中A、B液等体积适量混合，将PVDF膜（正面朝上）放入混合液中，用移液器将混合液加到PVDF膜上，使其充分接触，以激发荧光。

（12）压片：将PVDF膜放入暗盒中，用保鲜膜覆盖固定好之后，在暗室内将胶片压于PVDF膜上，并封闭暗盒，根据荧光的强度确定曝光时间。

（13）在暗室内取出胶片，放入显影液内1 min，用自来水清洗之后，放入

定影液中定影40 sec。

（14）取出胶片至暗室外，待胶片晾干后，扫描胶片，并用Image J软件分析蛋白条带，计算其表达量。

### 2.2.11 血浆丙二醛、超氧化物歧化酶水平测定

#### 2.2.11.1 TBA比色法测定血浆丙二醛含量

##### （1）丙二醛测试原理：

脂质过氧化降解产物丙二醛（malondialdehyde, MDA）与硫代巴比妥酸

（TBA）可缩合，并形成红色的产物，此产物最大吸收峰在532nm处。

##### （2）所需仪器设备：

分光光度计，离心机，恒温水浴箱。

##### （3）试剂盒的组成与配制：

试剂一：液体20 ml×1瓶，室温保存。（天冷时会发生凝固，每次测试之前适当用水浴加温，以加速溶解，至透明时方可应用）。

试剂二：液体12 ml×1瓶，使用时每瓶加入340 ml双蒸水，混匀，于4℃冷藏。

试剂三：粉剂×1支，使用时将粉剂加到90℃～100℃热双蒸水60 ml中，

（在溶解的过程中，可以适当加热），充分溶解后，加双蒸水补足至60 ml，

再加冰醋酸60 ml，充分混匀，并避光冷藏。

标准品：10 nmol/ml四乙氧基丙烷5 ml×1瓶，于4℃冷藏。

##### （4）操作步骤：

将血浆样本用生理盐水稀释10倍，并加样。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 空白管 | 标准管 | 测定管 | 对照管 |
| 10 nmoL/ml 标准品（ml） |  | 0.1 |  |  |
| 无水乙醇（ml） | 0.1 |  |  |  |
| 测试血浆 |  |  | 0.1 | 0.1 |
| 试剂一（ml） | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |

摇动几下试管架，混匀。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 试剂二（ml） | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 试剂三（ml） | 1.0 | 1.0 | 1.0 |  |
| 50％冰醋酸（ml） |  |  |  | 1.0 |

置于旋涡混匀器上，混匀，用保鲜薄膜将试管口扎紧，并用针头刺破一小孔，95℃水浴80分钟，取出后用流水冷却，然后于3500～4000 r/min离心10 min，取上清0.2 ml，在532 nm处，1 cm光径，用双蒸水调零，检测各管的吸光度值。

##### （5）计算公式：

血浆中MDA含量测定OD值-对照OD值标准品浓度样本测试前

（nmol/ml）标准OD值-空白OD值（10nmol/ml） 稀释倍数

#### 2.2.11.2 WST-1法测定血浆超氧化物歧化酶活力

##### （1）超氧化物歧化酶测试原理：

WST-1可与黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase）催化产生的超氧化物阴离子发生反应，产生水溶性的甲臜染料，该反应可被超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）所抑制。因此，对WST-1产物进行比色分析可计算SOD酶活力。

##### （2）所需仪器设备：

酶标仪（450 nm波长）、96孔板、微量移液器、恒温孵育箱。

##### （3）试剂组成与配制：

试剂一：缓冲液，30 ml×1瓶，2-8℃保存。

试剂二：底物储备液，0.15 ml×1支，2-8℃保存。

底物应用液配制：底物储备液与缓冲液按1: 200比例混匀配制为底物应用液。

试剂三：酶贮备液，0.3 ml×1支，2-8℃保存。试剂四：酶稀释液，4 ml×1瓶，2-8℃保存。

酶工作液配制：酶贮备液与酶稀释液按1: 10比例混匀，配制为酶工作液。

##### （4）操作步骤：

将血浆样本用生理盐水稀释10倍，并加样。

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 对照孔 | 对照空白孔 | 测定孔 | 测定空白孔 |
| 待测样本（μl） |  |  | 20 | 20 |
| 双蒸水（μl） | 20 | 20 |  |  |
| 酶工作液（μl） | 20 |  | 20 |  |
| 酶稀释液（μl） |  | 20 |  | 20 |
| 底物应用液（μl） | 200 | 200 | 200 | 200 |

充分混匀，于37℃孵育20 min，在酶标仪450 nm处读数。

##### （5）计算公式

①SOD抑制率的计算公式

（ -

A对照 A

SOD抑制率（%）

）（-

A测定- A

）

100%

对照空白

（A对照- A

）

对照空白

测定空白 

②SOD活力的计算公式

SOD活力SOD抑制率50%反应体系

（

0.24ml）样本测试前

（U/ml）

稀释倍数

0.02ml

稀释倍数

### 2.2.12 统计学分析

实验数据采用统计软件SPSS 17.0分析处理。首先进行正态性检验，资料为正态分布，数据用均数±标准差（*x*±*s*）表示，采用单因素方差分析进行多组间比较，采用LSD检验进行两两比较，检验水准α=0.05。

# 第**3**章 实验结果

## **3.1** 各组大鼠一般状态

实验前，BL组、H组与H+HFD组大鼠的体重及周龄无明显差异(*P*﹥0.05)，通过均衡性检验，可用于实验。实验中，BL组与H组大鼠一般状态良好，而

H+HFD组大鼠一般状态稍差，活动减少，体重低于H组大鼠(*P*<0.05)[（表3. 1](#_bookmark23)）。

表 3. 1 各组大鼠体重变化比较（*x*±*s*）

Table 3.1 The changes of body weight in rats of all groups

| Groups | n | Body weight (g) |
| --- | --- | --- |
| BL | 8 | 185.75±15.22 |
| H1 | 8 | 198.45±13.06 |
| H2 | 8 | 210.96±19.01 \* |
| H3 | 8 | 230.81±22.19 \* |
| H4 | 8 | 253.80±16.99 \* |
| H+HFD1 | 8 | 187.03±16.63 |
| H+HFD2 | 8 | 191.30±13.08 △ |
| H+HFD3 | 8 | 187.46±21.42 △ |
| H+HFD4 | 8 | 196.98±13.18 △ |

注：\*与BL组比较*P*<0.05，△与同周次的H组比较*P*<0.05.

## **3.2** 各组大鼠血压、心率情况

在整个实验过程中，BL组、H组与H+HFD组大鼠的收缩压（Systolic Blood

Pressure，SBP）、舒张压（Diastolic Blood Pressure, DBP）均无显著差异(*P*﹥0.05)。与BL组大鼠比较，H 组大鼠于低氧1周时，心率（heart rate, HR）降低(*P*<0.05)，

低氧2周到4周则与BL组大鼠HR无明显差别(*P*﹥0.05)；与H组大鼠比较，

H+HFD组大鼠从实验2周至4周心率明显降低(*P*<0.05)[（表3. 2](#_bookmark25)）。

表 3. 2 各组大鼠血压、心率比较（*x*±*s*）

Table 3.2 The changes of blood pressure and heart rate in rats of all groups

| Groups | n | SBP (mmHg) | DBP (mmHg) | HR (times/min) |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| BL | 8 | 120.56±13.44 | 93.63±11.84 | 479.38±25.35 |
| H1 | 8 | 115.75±6.34 | 92.31±7.73 | 422.44±33.53 \* |
| H2 | 8 | 118.63±11.90 | 89.38±7.01 | 426.63±63.13 |
| H3 | 8 | 117.44±6.81 | 90.81±7.29 | 472.31±37.69 |
| H4 | 8 | 122.13±5.08 | 95.06±5.41 | 465.69±22.95 |
| H+HFD1 | 8 | 115.75±8.75 | 87.56±7.59 | 409.81±54.58 \* |
| H+HFD2 | 8 | 112.19±9.49 | 88.25±8.57 | 371.69±35.36 \*△ |
| H+HFD3 | 8 | 108.75±10.23 | 85.13±16.44 | 366.81±74.71 \*△ |
| H+HFD4 | 8 | 114.63±15.63 | 89.38±16.47 | 325.25±57.04 \*△ |

注：\*与BL组比较*P*<0.05，△与同周次的H组比较*P*<0.05.

## **3.3** 各组大鼠**HGB**变化比较

与BL组大鼠比较，H组大鼠1-4周HGB浓度均升高(*P*<0.05)，说明于低压氧舱模拟低压低氧（海拔5000 m）建造持续性重度低氧的大鼠模型成功，可用于本实验研究。H+HFD组大鼠HGB浓度与H组相对应时间点比较，无明显变化（*P*﹥0.05）[（表3. 3](#_bookmark27)）。

表 3. 3 各组大鼠HGB变化比较（*x*±*s*）

Table 3.3 The changes of HGB in rats of all groups

| Groups | n | HGB (g/L) |
| --- | --- | --- |
| BL | 8 | 144.63±13.13 |
| H1 | 8 | 203.25±24. 37 \* |
| H2 | 8 | 180.75±30.93 \* |
| H3 | 8 | 184.88±38.99 \* |
| H4 | 8 | 225.88±45.26 \* |
| H+HFD1 | 8 | 175.00±30.16 \* |
| H+HFD2 | 8 | 175.13±13.64 \* |
| H+HFD3 | 8 | 182.75±25.47 \* |
| H+HFD4 | 8 | 196.88±34.11 \* |

注：\*与BL组比较*P*<0.05.

## **3.4** 各组大鼠血脂变化比较

血脂检测结果显示，与BL组比较，低氧2周大鼠血浆HDL浓度明显降低

（*P*<0.05），至低氧4周则进一步降低（*P*<0.05）。高脂饮食使得低氧大鼠2周及4周血浆TCH及LDL浓度明显升高(*P*<0.05)。4周时血浆LDL浓度较2周时进一步升高（*P*<0.05）。各组大鼠血浆TG浓度无明显差异(*P*﹥0.05)[（图3. 1](#_bookmark29)）。



图 3. 1 各组大鼠血脂变化比较（*x*±*s*）

Fig 3.1 Changes of blood lipid in rats of all groups. Values represent means±SD (n=8. \**P*<

0.05 vs. BL group, △*P*<0.05 vs. H group of same week, ▲*P*<0.05 vs. 2w of same group).

## **3.5** 各组大鼠血浆**NOx**含量

血浆NOx的检测结果显示，与BL组比较，低氧大鼠血浆NOx含量于整个实验进程中均明显升高(*P*<0.05)，并随着实验进程（1-4周）逐渐降低。联合高脂饮食使低氧大鼠血浆NOx含量明显降低（*P*<0.05），钝化了单纯低氧使得血浆NOx[代偿性升高的表现（图3. 2](#_bookmark31)）。



图 3. 2 各组大鼠血浆NOx含量比较（*x*±*s*）

Fig 3.2 The levels of plasma metabolic nitrates and nitrites (NOx) in rats of all groups. Values represent means±SD (n=8. \**P*<0.05 vs. BL group, △*P*<0.05 vs. H group of same week).

## **3.6** 各组大鼠主动脉形态学变化

用光学显微镜观察HE[染色大鼠主动脉形态学变化（图3. 3](#_bookmark33), [图3. 4](#_bookmark34)）。 BL组大鼠主动脉未见明显改变，内膜完整、光滑，内皮细胞（endothelial cell，

EC）结构正常，平滑肌细胞（smooth muscle cell, SMC）结构及形态正常。

H组大鼠主动脉形态变化：1周，可见EC明显增生，肿胀，SMC轻度增生，未见明显排列紊乱，局部胞浆轻度疏松。2周，EC轻度肿胀，SMC轻度增生，排列未见明显紊乱，局部胞浆轻度疏松。3周，EC肿胀，细胞核变圆，局部内膜脱落，SMC增生，细胞核变椭圆，局部胞浆疏松，细胞轻度排列紊乱。4周，

EC肿胀，细胞核变圆，出现局部内膜小片状脱落，SMC增生，细胞核变椭圆，局部胞浆空泡变，轻度排列紊乱。

H+HFD组大鼠主动脉形态变化：1周，EC肿胀，细胞核变圆，SMC增生，肿胀，细胞轻度排列紊乱，细胞核肿胀，胞浆明显疏松，未见明显空泡变。2周，

EC肿胀，局部内膜片状脱落，SMC明显增生，细胞排列紊乱，细胞核变圆，局部胞浆疏松以及空泡变。3周，EC肿胀，局部内膜大片脱落，SMC明显增生，

细胞核变圆，胞浆空泡变明显，细胞排列紊乱。4周，EC肿胀，局部内膜大片脱落，SMC大量增生，细胞核变圆，胞浆空泡变，细胞排列紊乱。

H组大鼠于低氧1、2周时，主动脉仅表现为EC肿胀，SMC轻度增生等较轻微的损伤，至4周时，表现局部内膜小片状脱落，SMC局部胞浆空泡变。而

H+HFD组大鼠于实验2周时即可见局部内膜片状脱落，SMC细胞核变圆，局部胞浆空泡变，至实验3、4周出现更严重的病变-局部内膜大片脱落，SMC大量增生，细胞核变圆，胞浆空泡变，细胞排列紊乱。与H组比较，H+HFD组大鼠表现为早期、加重的主动脉病理改变。



BL 100×



H 1w 100×H+HFD 1w 100×



H 2w 100×H+HFD 2w 100×



H 3w 100×H+HFD 3w 100×



H 4w 100×H+HFD 4w 100×

图 3. 3 光学显微镜观察HE染色主动脉形态（100×）

Fig 3.3 Light microscopic images of the HE stained aortic sections of rats（100×）



BL 400×



H 1w 400×H+HFD 1w 400×



H 2w 400×H+HFD 2w 400×



H 3w 400×H+HFD 3w 400×



H 4w 400×H+HFD 4w 400×

图 3. 4 光学显微镜观察HE染色主动脉形态（400×）

Fig 3.4 Light microscopic images of the HE stained aortic sections of rats(400×)

## **3.7** 各组大鼠主动脉内皮依赖性舒张功能比较

### 3.7.1 各组大鼠主动脉血管环Phe收缩率比较

血管环对Phe的收缩反应结果显示，BL组、H组1周及H+HFD组1周的主动血管环对Phe的收缩率无显著差异(*P*﹥0.05)。相对于BL组，低氧2、3周大鼠血管环对Phe的收缩率明显升高(*P*<0.05)，至4周恢复至BL组水平。而

H+HFD组大鼠从2周开始血管环对Phe的收缩率逐渐降低，明显低于同时间点

H组的数值(*P*<0.05)，且达到最大收缩张力的持续时间明显变短。因此，内皮依赖性舒张实验仅在1周的时间点完成，2-4周的时间点因血管环对Phe的收缩率

有明显差异，以及H+HFD组2-4周大鼠血管环收缩平台期变短，未进行内皮依[赖性舒张实验（图3. 5](#_bookmark37)）。



图 3. 5 各组大鼠主动脉血管环对Phe收缩率比较（*x*±*s*）

Fig 3.5 Aortic ring contraction percentage to Phe (10-6 mol/L), Values represent means±SD (n=6, \**P*<0.05 vs. BL group, △*P*<0.05 vs. H group of same week).

### 3.7.2 各组大鼠主动脉血管环非内皮依赖性舒张功能比较

血管环对SNP的非内皮依赖性舒张功能检测结果显示，BL组、H组1周及H+HFD组1周的主动血管环对累计浓度SNP (10-8 -10-4.5 mol/L)的舒张反应无显著差异(*P*﹥0.05)，证明进行血管实验各组大鼠主动脉平滑肌对NO（SNP为NO[的供体）的舒张反应无差异，可以进行内皮依赖性舒张功能检测（图3. 6](#_bookmark39)）。



图 3. 6 各组大鼠主动脉血管环对SNP (10-8 -10-4.5 mol/L)非内皮依赖性舒张功能比较

（*x*±*s*）

Fig 3.6 Endothelium-independent relaxation response to SNP (n=6, 10-8 -10-4.5 mol/L) of aortic rings in all group rats, Values represent means±SD (n=6).

### 3.7.3 各组大鼠主动脉血管环内皮依赖性舒张功能比较

血管环对ACh的内皮依赖性舒张功能检测结果显示，与BL组比较，低氧1周大鼠主动脉血管环的对ACh的舒张功能无明显改变(*P*﹥0.05)，而H+HFD组1周大鼠血管环对ACh的舒张功能明显受损，舒张率低于相同浓度ACh的BL组及H组相应数值(*P*<0.05)；NOS阻断剂L-NAME可完全抑制各组大鼠血管环对

ACh的舒张反应[（图3. 7](#_bookmark41)）。L-arg（NOS的底物）可使H+HFD组1周大鼠血管环对ACh的舒张功能恢复至BL水平，与未用L-arg孵育的H+HFD组1周大鼠血管环对ACh的舒张功能有明显差异(*P*<0.05)（[图3. 8](#_bookmark42)）。



图 3. 7 有或无L-NAME孵育的各组大鼠主动脉血管环对ACh的内皮依赖性舒张功能比较（*x*±*s*）

Fig 3.7 Endothelium-dependent relaxation response of aortic rings to ACh with or without L-NAME. Values represent means±SD (n=6, \**P*<0.05 vs. BL group, △*P*<0.05 vs. H group of same concentration of ACh).



图 3. 8 有或无L-arg孵育的各组大鼠主动脉血管环对ACh的内皮依赖性舒张功能比较

（*x*±*s*）

Fig 3.8 Endothelium-dependent relaxation response to ACh of aortic rings with L-arginie, Values represent means±SD (n=6, \**P*<0.05 vs. BL group, △*P*<0.05 vs. H group of same concentration of ACh, ▲*P*<0.05 vs. H+HFD+L-arg).

## **3.8** 主动脉**eNOS**与**iNOS mRNA**表达水平

### 3.8.1 主动脉总RNA质量

采用离心柱型总RNA提取试剂盒提取主动脉组织总RNA，用紫外分光光度法检测提取总RNA的A260与A280比值在1.8~1.9之间。凝胶成像系统显示提取总RNA琼脂糖凝胶电泳的18S与28S两条rRNA条带清晰，提示提取的总RNA[质量较好，可用于后续逆转录实验（图3. 9](#_bookmark45)）。



图 3. 9 大鼠主动脉总RNA电泳图

Fig 3.9 Electrophoresis of aortic total RNA of rats

### 3.8.2 基因的扩增效率

为检测目的基因与内参基因的扩增效率，以cDNA样本的原浓度以及依次2倍稀释的样本为模板，进行实时定量PCR反应，制作标准曲线。eNOS与β-actin的标准曲线结果显示，eNOS和β-actin的扩增效率之差小于5%（分别为114.797%和118.635%），且R2值均大于0.99[（图3. 10](#_bookmark47)）。另外，iNOS与β-actin的标准曲线结果显示，iNOS 和β-actin 的扩增效率之差小于5%（分别为110.9%和

111.499%），且R2值均大于0.99[（图3. 11](#_bookmark48)）。即目的基因与内参基因的扩增效率一致，可以运用2-△△Ct的方法进行数据分析。



图 3. 10 eNOS与β-actin的标准曲线

Fig 3.10 The standard curve of eNOS andβ-actin



图 3. 11 iNOS与β-actin的标准曲线

Fig 3.11 The standard curve of iNOS andβ-actin

### 3.8.3 基因的扩增曲线和溶解曲线

实时定量PCR的结果显示，目的基因eNOS、iNOS及内参基因β-actin的扩[增曲线及溶解曲线呈单一峰，无杂峰（图3. 12](#_bookmark50)-[图3. 17](#_bookmark51)），说明所检测基因引物的特异性好，且基因的扩增效果较好。



图 3. 12 eNOS的扩增曲线

Fig 3.12 Real-time PCR amplification plot of eNOS



图 3. 13 iNOS的扩增曲线

Fig 3.13 Real-time PCR amplification plot of iNOS



图 3. 14 β-actin的扩增曲线

Fig 3.14 Real-time PCR amplification plot ofβ-actin



图 3. 15 eNOS的溶解曲线

Fig 3.15 Real-time PCR melt curve of eNOS



图 3. 16 iNOS的溶解曲线

Fig 3.16 Real-time PCR melt curve of iNOS



图 3. 17 β-actin的溶解曲线

Fig 3.17 Real-time PCR melt curve ofβ-actin

### 3.8.4 主动脉eNOS mRNA表达结果

实时定量PCR结果显示，相对于BL组，H组大鼠主动脉eNOS mRNA表达均明显升高(*P*<0.05)。相对于H组，H+HFD组大鼠1周及2周eNOS mRNA表达水平明显降低（*P*<0.05），即联合高脂饮食钝化了低氧大鼠1周及2周eNOS

mRNA[表达水平的适应性增高（图3. 18](#_bookmark53)）。



图 3. 18 各组大鼠主动脉eNOS mRNA表达水平（*x*±s ）

Fig 3.18 Expression levels of aortic eNOS mRNA in rats of all groups. Values represent mean±SD (n=5 animals/group. \**P*<0.05 vs. BL group, △*P*<0.05 vs. H group of the same week).

### 3.8.5 主动脉iNOS mRNA表达结果

实时定量PCR结果显示，相对于BL组，低氧1周、2周大鼠主动脉iNOS

mRNA表达水平无明显变化(*P*> 0.05)，低氧3周、4周iNOS mRNA表达水平明显升高（*P*<0.05）. 与H组比较，H+HFD组大鼠1周、2周、3周的主动脉iNOS

mRNA 表达水平无明显变化(*P*> 0.05)，4 周iNOS mRNA 表达水平明显升高

（*P*<0.05）（[图3. 19](#_bookmark55)）。



图 3. 19 各组大鼠主动脉iNOS mRNA表达水平（*x*±s ）

Fig 3.19 Expression levels of aortic iNOS mRNA in rats of all groups. Values represent mean±SD (n=5 animals/group. \**P*<0.05 vs. BL group, △*P*<0.05 vs. H group of the same week).

## **3.9** 主动脉**eNOS**蛋白表达结果

用Western blot法检测各组大鼠主动脉eNOS蛋白的表达，结果显示，相对于BL组，H组大鼠主动脉eNOS蛋白表达均明显升高(*P*<0.05)。相对于H组，

H+HFD组大鼠2周eNOS蛋白表达水平明显降低(*P*<0.05)，结果与eNOS mRNA

[的变化趋势基本一致（图3. 20](#_bookmark57)）。



图 3. 20 各组大鼠主动脉eNOS蛋白表达水平（*x*±s ）

Fig 3.20 Expression levels of aortic eNOS protein in rats of all groups. Values represent mean±SD (n=5 animals/group. \**P*<0.05 vs. BL group, △*P*<0.05 vs. H group of the same week).

## **3.10** 血浆**MDA**及**SOD**水平检测结果

血浆MDA含量检测（WST-1法）结果显示，与BL组比较，低氧大鼠从2周起至4周，血浆MDA含量明显升高(*P*<0.05)。与H组比较，H+HFD组1至3周大鼠血浆MDA含量无明显变化（*P*> 0.05），而4周大鼠血浆MDA含量明显降低(*P*<0.05)[（图3. 21](#_bookmark59) A)。血浆SOD活力检测（TBA比色法）结果显示，与BL组比较，低氧大鼠（除2周外）血浆SOD活力明显升高(*P*<0.05)。与H组比较，

H+HFD组血浆SOD活力变化与MDA[含量变化趋势一致（图3. 21](#_bookmark59) B）。



图 3. 21 各组大鼠血浆MDA及SOD水平变化（*x*±s ）

Fig 3.21 The levels of plasma MDA and SOD in rats of all groups. Values represent means

±SD (n=8. \**P*<0.05 vs. BL group, △*P*<0.05 vs. H group of same week).

# 第**4**章 讨论

本研究旨在探讨高脂饮食对持续性低氧大鼠主动脉内皮功能的影响及其可能机制。结果显示：相对于单纯低氧，H+HFD大鼠出现严重的主动脉内皮结构的损伤，而且这种结构损伤出现时间较早。与病理变化相一致，H+HFD损伤大鼠主动脉血管环对ACh的内皮依赖性舒张功能。H+HFD大鼠的主动脉内皮功能障碍与NOS/NO的失调有关，高脂饮食钝化了低氧环境大鼠主动脉eNOS mRNA与蛋白表达的代偿性升高，同时降低了NOS底物L-arg的生物活性，因此抑制了NO的代偿升高。

1980年Furchgott与Zawadzki在Nature上发表文章，证实其发现血管内皮分泌一种因子可引起血管对ACh产生舒张效应[30]，后来这种因子被证实为NO，并逐渐完善对NO多种心血管保护作用的认识。NO通过扩张血管、抑制血管平滑肌细胞增殖、抑制血小板的聚集及炎性细胞对血管壁的粘附等作用，维持血管结构和功能的稳态，是临床评定内皮功能的重要指标。此外，NO对低压低氧环境机体有诸多保护作用，是高原适应与习服的重要指标[7, 8]。研究表明，肺组织、血浆等组织或体液内，尤其是血浆内高水平的NO是高原藏族人、印第安人、低氧暴露的低海拔人群低氧适应与习服的重要因素，适度高水平的NO保证血管的适度扩张，减小外周阻力，增加循环血流量及氧气的传递，以代偿外界低压低氧的环境限制而引起的血氧饱和度及血氧含量的降低。而NO未出现适应性增高的高原秘鲁人及低氧暴露的低海拔人群，则会引起肺水肿、肺动脉高压及右心重构等高原脱适应的急、慢性高原病[8,10,11,31]。本研究中，与BL组大鼠比较，单纯低氧大鼠血浆NOx含量（NO的代谢产物NOx，间接反应NO的含量）代偿性升高，并从1周到4周逐渐降低，保护其血管内皮结构与功能，至低氧后

期（4周）出现主动脉内膜小片状脱落，平滑肌细胞局部胞浆空泡变的损伤。而联合高脂饮食，使低氧大鼠血浆NOx的代偿性升高作用消失，H+HFD大鼠失去了NO的保护作用，引起提前出现的、加重的主动脉内皮及平滑肌的损伤。即于实验2周时即可见局部内膜片状脱落，平滑肌细胞细胞核变圆，局部胞浆空泡变等相当于单纯低氧4周的病理损伤，至实验3、4周出现局部内膜大片脱落，平滑肌细胞大量增生，细胞核变圆，胞浆空泡变，细胞排列紊乱等更严重的病变。

与主动脉内皮结构损伤相一致，高脂饮食引起低氧环境大鼠主动脉内皮依赖性血管舒张功能障碍（实验早期-1周）。即H+HFD大鼠主动脉血管环对ACh的舒张率明显低于单纯低氧大鼠。ACh诱导的内皮依赖性血管舒张功能由NO、前列环素及内皮源性的超极化因子等内皮源性舒张因子调节，因物种、器官及血管的不同，具体发挥作用的舒张因子会有所不同[32,33]。本研究中，ACh诱导的主动脉血管环的舒张完全被NOS阻滞剂L-NAME所阻断，说明ACh诱导的大鼠主动脉血管环的内皮依赖性舒张完全由NO介导，与Balarini等人的研究结果一致[34]。即高脂饮食降低低氧大鼠血浆NOx含量，引起其主动脉内皮依赖性舒张功能障碍。

NO由NOS作用于底物L-arg而生成。研究表明，尽管细胞内L-arg的浓度常使eNOS处于饱和状态，但当L-arg相对缺乏、存在L-arg抑制剂或其活性降低时，可影响NO的产生，进而损伤血管内皮依赖性舒张功能[17,35,36]。补充底物L-arg可增加NO的含量，改善血管内皮功能[37, 38]。本研究中，用NOS底物L-arg提前孵育主动脉血管环，可改善H+HFD组大鼠主动脉血管环对ACh的内皮依赖性舒张反应，消除其与H组大鼠的主动脉舒张率的差别。表明高脂饮食引起低氧环境大鼠主动脉内皮依赖性舒张功能障碍与L-arg生物活性的损伤有关。L-arg生物活性降低，进而降低NO的生成，导致主动脉内皮舒张功能障碍。

NO的产生及血管内皮舒张功能与NOS的表达密切相关。持续表达于血管内皮细胞的eNOS是内源性NO的主要来源，且多认为eNOS来源性的NO为心血管有益因子[39]。研究表明，eNOS-/-小鼠或使用eNOS抑制剂可阻断或减少eNOS来源NO的生成，表现血管内膜屏障作用减弱，通透性增加；内皮依赖舒张功能减弱，血压升高；血小板聚集，血栓形成；中性粒细胞浸润等血管损伤[40-42]。转基因上调eNOS的表达，可增加NO的生成，改善血管内皮功能[43, 44]。急性适度低氧通过短暂的增加细胞内钙离子浓度激活eNOS，增加NO的产生，而低氧

2周后，血管壁eNOS表达的升高是保持NO生成增加的主要原因[45, 46]。炎症、低氧等刺激可诱导iNOS表达升高，增加NO的产生。尽管对iNOS来源的NO看法不一，但多数研究认为iNOS来源的NO除作用于引起炎症反应的病原微生物等靶细胞，使靶细胞DNA链断裂或破碎，发挥抗炎作用以外，还可损伤周围健康细胞而产生损害反应。而且，iNOS来源的NO可与超氧阴离子反应生成氧化性较强的ONOO-，后者可氧化eNOS，使其脱偶联，减少NO的生成，诱导血管损伤。抑制iNOS高表达，可改善内皮依赖性血管舒张功能[20, 21]。因此本研

究采用荧光real-time PCR及western blot方法分别检测主动脉eNOS、iNOS mRNA及eNOS蛋白表达水平。结果显示，与BL大鼠比较，低氧大鼠主动脉eNOS mRNA及蛋白表达水平明显升高，即低氧刺激主动脉eNOS代偿性升高，增加NO的生成，以适应低氧环境，与以往研究结果一致[47, 48]。高脂饮食明显降低低氧大鼠1、2周的eNOS表达水平，降低eNOS来源NO的生成，引起血管内皮损伤。而低氧1、2周大鼠iNOS mRNA表达与BL大鼠相比无明显变化，3、

4周明显升高。高脂饮食使低氧大鼠1-3周iNOS mRNA表达无明显变化，4周时表达明显升高。由此可推断，高脂饮食降低低氧环境大鼠主动脉eNOS表达可能是其钝化NO代偿性升高的主要原因。

氧化应激损伤是影响NO含量的常见因素。研究表明，低氧或高脂血症可增加机体ROS的产生，破坏机体氧化-抗氧化系统平衡，主要表现为可清除自由基的SOD活力下降，而脂质过氧化的代谢产物MDA含量增多。ROS通过氧化

DNA、脂肪及蛋白质等大分子物质，损伤细胞内外成分，增加氧化应激损伤，减少NO的生成与生物利用。增加的ROS可氧化eNOS辅因子致其脱偶联，使eNOS不再产生NO，而是生成超氧阴离子，成为ROS的来源，进一步加重eNOS脱偶联，降低其功能，减少NO的生成。此外，超氧阴离子与NO反应生成ONOO-的速率大于与SOD反应而被清除的速率，因而，当超氧阴离子增多时，可直接与NO反应而清除细胞内外的NO. SOD可清除超氧阴离子等活性氧成分而稳定

NO的活性[49-51]。适当补充SOD或其他抗氧化物可增加NO活性及含量，进而改善血管内皮功能[52, 53]。本研究中，低氧增加大鼠血浆MDA含量，但未降低血浆SOD活力。而联合高脂因素并未使MDA含量进一步增加及SOD活力降低，除实验4周时，高脂饮食使低氧大鼠SOD活力降低，但同时MDA含量亦降低。因此，氧化应激损伤可能不是本研究中高脂饮食降低低氧大鼠血浆NO含量及引起血管内皮功能异常的原因。

血浆TCH与LDL水平的升高可能是高脂饮食降低低氧大鼠血浆NO水平的另一因素。有研究表明，氧化型LDL可影响eNOS从小窝蛋白解离，进而影响其活性，降低NO的产生[54, 55]。同时高胆固醇血症可引起eNOS脱偶联，影响

NO的产生和生物利用[22]。此外，HDL可通过（B类1型）清道夫受体的调节而激活eNOS，促进NO的产生[56, 57]。本研究中，单纯慢性低氧可引起血浆HDL降低，联合高脂饮食使低氧大鼠血浆HDL未进一步降低，但明显升高血浆TCH与LDL水平，可能与血浆NO水平降低有关。高脂血症对低氧环境机体eNOS/NO

影响的确切机制尚不清楚，有待进一步的研究。

研究表明，低氧升高HGB浓度有利于NO的存储及产生。低氧使机体游离铁含量升高，游离铁可促进NO以亚硝铁化合物形式存储，亦可绑定NO于HGB血红素和硫醇基[58, 59]。本研究中，高脂饮食未降低低氧大鼠血浆HGB水平，可能不是引起NO含量降低的原因。

低氧引起机体血流动力学的代偿反应包括增加心输出量及降低外周血管阻力[60]。本研究结果提示，高脂饮食可能通过以下几方面干扰低氧环境大鼠血流动力学的代偿反应：首先，高脂饮食明显降低低氧环境大鼠心率，心率是影响心输出量最主要的因素；其次，高脂饮食降低低氧环境大鼠血浆NO的代偿性升高，NO是低氧环境下血管阻力的重要调节因子，降低NO水平引起内皮依赖性舒张功能障碍；同时，高脂饮食逐渐加重低氧环境大鼠主动脉内皮及平滑肌细胞损伤，均可降低低氧环境下大鼠血管的顺应性。高脂饮食可能因此影响低氧环境大鼠增加血流和氧传递的代偿反应[8]。

综上所述，高脂饮食可钝化持续性低压低氧大鼠主动脉eNOS mRNA及蛋白表达的代偿性升高，降低eNOS底物L-arg的生物活性，进而钝化血浆NOx的代偿性升高，引起主动脉内皮功能障碍。即高脂饮食亦是低氧环境机体独立的危险因素，应予以预防和治疗，保护低氧环境机体健康。这对于饮食习惯改变的高原人群及疾病引起体内低氧的人群的健康和疾病防治有一定的指导意义。但由于实验动物和人体间存在一定的差异，故本研究结果并不完全代表高脂饮食对低氧环境人体的影响，应在下一步的研究中进一步完善明确。

# 第**5**章 结论

通过研究高脂饮食对低氧环境大鼠主动脉内皮结构和功能影响及相关机制，我们得出结论如下：

1. 高脂饮食引起低氧环境大鼠主动脉内皮结构损伤及内皮依赖性血管舒张功能障碍。

2. 高脂饮食引起低氧环境大鼠主动脉内皮功能障碍的主要机制是高脂饮食钝化了低氧环境大鼠血浆NOx的代偿性升高。

3. 高脂饮食降低低氧环境大鼠主动脉eNOS mRNA与蛋白表达、降低血浆

L-arg活性是其钝化血浆NOx代偿性升高的主要原因。

4. 高脂饮食并未加重低氧环境大鼠的氧化-抗氧化系统失衡，可能不是引起血浆NOx含量降低及主动脉功能障碍的主要原因。

参考文献

[1] World Health organization. Global status report on noncommunicable diseases 2014[R]. Geneva: World Health organization, 2014.

[2] Sitia S, Tomasoni L, Atzeni F et al. From endothelial dysfunction to atherosclerosis[J]. Autoimmunity reviews, 2010, 9: 830-4.

[3] Schulz E, Gori T, Munzel T. Oxidative stress and endothelial dysfunction in hypertension[J]. Hypertension research: official journal of the Japanese Society of Hypertension, 2011, 34: 665-73.

[4] Quyyumi AA. Prognostic value of endothelial function[J]. The American journal of cardiology, 2003, 91: 19H-24H.

[5] Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Vizioli L, Muscari A. Relationships among hyperuricemia, endothelial dysfunction and cardiovascular disease: molecular mechanisms and clinical implications[J]. Journal of cardiology, 2012, 59: 235-42.

[6] Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function [J]. Eur Heart J, 2012, 33: 829-837.

[7] Vanhoutte PM. How We Learned to Say NO[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2009, 29: 1156-60.

[8] Beall CM, Laskowski D, Erzurum SC. Nitric oxide in adaptation to altitude[J]. Free radical biology & medicine, 2012, 52: 1123-1134.

[9] Janocha AJ, Koch CD, Tiso M et al. Nitric oxide during altitude acclimatization[J]. The New England journal of medicine, 2011, 365: 1942-1944.

[10] Erzurum SC, Ghosh S, Janocha AJ et al. Higher blood flow and circulating NO products offset high-altitude hypoxia among Tibetans[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104: 17593-17598.

[11] Hoit BD, Dalton ND, Erzurum SC, Laskowski D, Strohl KP, Beall CM. Nitric oxide and cardiopulmonary hemodynamics in Tibetan highlanders[J]. Journal of applied physiology (Bethesda, Md: 1985), 2005, 99: 1796-1801.

[12] Huang PL. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency[J]. Journal of the American Society of Nephrology: JASN, 2000, 11 Suppl 16: S120-3.

[13] Shesely EG, Maeda N, Kim HS et al. Elevated blood pressures in mice lacking endothelial nitric oxide synthase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996, 93: 13176-81.

[14] Fagan KA, McMurtry I, Rodman DM. Nitric oxide synthase in pulmonary hypertension: lessons from knockout mice[J]. Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca,

2000,49:539-48.

[15] Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, 88: 4651-5.

[16] Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87: 5193-7.

[17] Adams MR, McCredie R, Jessup W, Robinson J, Sullivan D, Celermajer DS. Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilatation and reduces monocyte adhesion to endothelial cells in young men with coronary artery disease[J]. Atherosclerosis, 1997, 129: 261-9.

[18] Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K, Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine[J]. Lancet, 1991, 338: 1546-50.

[19] Alexander MY, Brosnan MJ, Hamilton CA et al. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves nitric oxide-dependent endothelial function in a hypertensive rat model[J]. Cardiovascular research, 1999, 43: 798-807.

[20] Kessler P, Bauersachs J, Busse R, Schini-Kerth VB. Inhibition of inducible nitric oxide synthase restores endothelium-dependent relaxations in proinflammatory mediator-induced blood vessels[J]. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 1997, 17: 1746-55.

[21] Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM et al. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors[J]. Science (New York, NY), 1991, 254: 1001-3.

[22] Gielis JF, Lin JY, Wingler K, Van Schil PE, Schmidt HH, Moens AL. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders[J]. Free radical biology & medicine, 2011, 50: 765-776.

[23] Grayson TH, Chadha PS, Bertrand PP et al. Increased caveolae density and caveolin-1 expression accompany impaired NO-mediated vasorelaxation in diet-induced obesity[J]. Histochemistry and cell biology, 2013, 139: 309-321.

[24] 秦江梅. 中国慢性病及相关危险因素流行趋势、面临问题及对策[J]. 中国公共卫生, 2014, 01: 1-4.

[25] Savransky V, Nanayakkara A, Li J et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis[J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2007, 175: 1290-1297.

[26] Sherpa LY, Deji, Stigum H et al. Lipid profile and its association with risk factors for coronary heart disease in the highlanders of Lhasa, Tibet[J]. High altitude medicine & biology, 2011, 12: 57-63.

[27] Zhao LY, Huang W, Yuan QX et al. Hypolipidaemic effects and mechanisms of the main component of Opuntia dillenii Haw. polysaccharides in high-fat emulsion-induced hyperlipidaemic rats[J]. Food chemistry, 2012, 134: 964-971.

[28] Simic B, Hermann M, Shaw SG, Bigler L. Torcetrapib impairs endothelial function in hypertension[J]. Eur Heart J, 2012, 33: 1615-1624.

[29] Majhi CR, Khan S, Leo MD, Manimaran A, Sankar P, Sarkar SN. Effects of acetaminophen on reactive oxygen species and nitric oxide redox signaling in kidney of arsenic-exposed rats[J]. Food and chemical toxicology, 2011, 49: 974-982.

[30] Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine[J]. Nature, 1980, 288: 373-6.

[31]] Manukhina EB, Malyshev IY, Smirin BV, Mashina SY, Saltykova VA, Vanin AF. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia[J]. Nitric oxide, 1999, 3: 393-401.

[32] Garland CJ, Plane F, Kemp BK, Cocks TM. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone[J]. Trends in pharmacological sciences, 1995, 16: 23-30.

[3] 3] Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology[J]. Pharmacological reviews, 1991, 43: 109-142.

[34] Balarini CM, Leal MA, Gomes IB et al. Sildenafil restores endothelial function in the apolipoprotein E knockout mouse[J]. Journal of translational medicine, 2013, 11: 3.

[35] Raghavan SA, Dikshit M. Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine[J]. Pharmacological research, 2004, 49: 397-414.

[36]] Stoclet JC. The L-arginine-NO pathway and cyclic GMP in the vessel wall[J]. Zeitschrift fur Kardiologie, 1991, 80 Suppl 7: 87-90.

[37] Kamada Y, Nagaretani H, Tamura S et al. Vascular endothelial dysfunction resulting from L-arginine deficiency in a patient with lysinuric protein intolerance[J]. The Journal of clinical investigation, 2001, 108: 717-24.

[3] 8] Goumas G, Tentolouris C, Tousoulis D, Stefanadis C, Toutouzas P. Therapeutic modification of the L-arginine-eNOS pathway in cardiovascular diseases[J]. Atherosclerosis, 2001, 154: 255-67.

[39] Kurowska EM. Nitric oxide therapies in vascular diseases[J]. Current pharmaceutical design, 2002, 8: 155-166.

[40] Huang PL, Huang Z, Mashimo H et al. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase[J]. Nature, 1995, 377: 239-42.

[41]] Duplain H, Burcelin R, Sartori C et al. Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase[J]. Circulation, 2001, 104: 342-5.

[42] Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98: 2604-9.

[4] 3] Ooboshi H, Ibayashi S, Heistad DD, Fujishima M. Adenovirus-mediated gene transfer to cerebral circulation[J]. Mechanisms of ageing and development, 2000, 116: 95-101.

[44] Abunasra HJ, Smolenski RT, Morrison K et al. Efficacy of adenoviral gene transfer with manganese superoxide dismutase and endothelial nitric oxide synthase in reducing ischemia and reperfusion injury[J]. European journal of cardio-thoracic surgery, 2001, 20: 153-8.

[45] Hampl V, Cornfield DN, Cowan NJ, Archer SL. Hypoxia potentiates nitric oxide synthesis and transiently increases cytosolic calcium levels in pulmonary artery endothelial cells[J]. The European respiratory journal, 1995, 8: 515-22.

[46] Xue C, Rengasamy A, Le Cras TD, Koberna PA, Dailey GC, Johns RA. Distribution of NOS in normoxic vs. hypoxic rat lung: upregulation of NOS by chronic hypoxia[J]. The American journal of physiology, 1994, 267: L667-78.

[47] Ferreiro CR, Chagas AC, Carvalho MH et al. Influence of hypoxia on nitric oxide synthase activity and gene expression in children with congenital heart disease: a novel pathophysiological adaptive mechanism[J]. Circulation, 2001, 103: 2272-6.

[48] Hoffmann A, Gloe T, Pohl U. Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism[J]. Journal of cellular physiology, 2001, 188: 33-44.

[49] Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress[J]. Circulation research, 2000, 87: 840-4.

[50] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly[J]. The American journal of physiology, 1996, 271: C1424-37.

[51] Karbach S, Wenzel P, Waisman A, Munzel T, Daiber A. eNOS uncoupling in cardiovascular diseases--the role of oxidative stress and inflammation[J]. Current pharmaceutical design, 2014, 20: 3579-94.

[52] Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits[J]. Circulation research, 1991, 69: 1293-300.

[53] Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Magagna A, Salvetti A. Vitamin C Improves Endothelium-Dependent Vasodilation by Restoring Nitric Oxide Activity in Essential Hypertension[J]. Circulation, 1998, 97: 2222-2229.

[54] Blair A, Shaul PW, Yuhanna IS, Conrad PA, Smart EJ. Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation[J]. The Journal of biological chemistry, 1999, 274: 32512-32519.

[55] Hermida N, Balligand JL. Low-density lipoprotein-cholesterol-induced endothelial dysfunction and oxidative stress: the role of statins[J]. Antioxidants & redox signaling, 2014, 20: 1216-37.

[56] Mineo C, Shaul PW. HDL stimulation of endothelial nitric oxide synthase: a novel

Mechanism of HDL action[J]. Trends in cardiovascular medicine,2003,13:226-31.

[57] Shaul PW. Endothelial nitric oxide synthase, caveolae and the development of atherosclerosis[J]. The Journal of physiology, 2003, 547: 21-33.

[58] Simpson RJ. Effect of hypoxic exposure on iron absorption in heterozygous hypotransferrinaemic mice[J]. Annals of hematology, 1992, 65: 260-4.

[59] Vanin AF, Malenkova IV, Serezhenkov VA. Iron catalyzes both decomposition and synthesis of S-nitrosothiols: optical and electron paramagnetic resonance studies[J]. Nitric oxide, 1997, 1: 191-203.

[60] Blitzer ML, Loh E, Roddy MA, Stamler JS, Creager MA. Endothelium-derived nitric oxide regulates systemic and pulmonary vascular resistance during acute hypoxia in humans[J]. Journal of the American College of Cardiology, 1996, 28: 591-596.

致 **谢**

博士的学习即将结束，回首这段时光飞逝却不乏艰辛的旅程，感慨良多。感谢这段旅程的领路人—我尊敬的导师格日力教授。感谢导师给予的先进的实验平台，使课题的实施有了可靠的依托；感谢导师给予的丰富的学术交流机会，使学生拓宽视野，激发灵感；感谢导师认真、勤勉的做事做人理念，熏染学生提高个人修养；感谢您在这段旅程中不断的指导、关心、鼓励和支持。纵是千里马尚需伯乐，导师的帮助使我受益匪浅，亦指引我在未来的生活工作中更好的努力！

能顺利的完成博士学习，还要感谢中医系的领导和各位老师的支持和帮助，让我能有充分的时间和精力完成课题研究。感谢病理教研室李菊英老师在观察病理切片上给予的热心帮助，感谢高原医学中心杨应忠老师、马兰老师、芦殿香老师、白振中老师在实验上给予的悉心指导，感谢高原医学中心靳国恩老师、杨全宇老师、嘎琴老师在低压氧舱实验中的辛苦支持，感谢学生张长荣和李振在大鼠灌胃时的帮助，感谢王海洁、王亚平、李玉红、盖祥云的温暖陪伴。感谢Matthew Rondina在文章撰写时无私的帮助！感谢研究生院刁维红、姚芳等老师在研究生学习过程中给予的帮助！

感谢我的家人，无论是昼夜奋战疲惫的我、还是收获喜悦欢快的我，都因为有家人的温暖相守相扶而倍感幸福，更顺利的完成学习。

感谢这段旅程中不断遇到的困难，是你们让我更好的成长；感谢自己让自己变的更好！

**第6章文献综述**

**内皮型一氧化氮合酶脱偶联在心血管疾病中的致病作用**

**摘要：**二聚体结构的内皮型一氧化氮合酶（eNOS）氧化L-精氨酸生成一氧化氮

（NO），后者对心血管系统具有保护作用。血管内氧化还原反应失衡导致eNOS脱偶联，脱偶联的eNOS产生超氧化物而不是NO，导致内皮功能损伤，进而引起多种心血管疾病的发生和进展。深入了解eNOS脱偶联与心血管疾病的关系，对预防和治疗心血管疾病具有重要意义！

**关键词 ：**内皮型一氧化氮合酶；脱偶联；心血管疾病；一氧化氮

**Pathogenic effect of eNOS uncoupling in cardiac vascular disorders**

**Abstrct** The homodimeric endothelial nitric oxide synthase (eNOS) oxidizes L-arginine to nitric oxide (NO), the latter has a protective effect on cardiovascular system. However, a disturbed vascular redox balance results in eNOS uncoupling. Uncoupled eNOS generates superoxide rather than NO, which cause endothelial dysfunction, resulting in the occurrence and progress of cardiovascular disorders. Insight into the eNOS coupling relationship with cardiovascular disease, have important sense to prevention and treatment of cardiovascular diseases.

**Keyword** eNOS; Uncoupling; Cardiovascular diseases; NO

目前已发现的一氧化氮合酶（NOS）有3种同工酶，分别是神经型NOS(nNOS

或NOS-I），诱导型NOS(iNOS或NOS-II)和内皮型NOS(eNOS或NOS-III). eNOS

主要表达于血管内皮细胞，在心肌细胞、气道上皮细胞、肾脏管状细胞和其他器官也有表达[1]。心血管系统的正常功能有赖于eNOS的保护。eNOS催化L-精氨酸产生NO，NO通过扩张血管、抑制血小板聚集、抑制平滑肌细胞增殖、减少白细胞粘附实现维持血管稳态、调节血压、抗炎及预防动脉粥样硬化的作

用[2]。血管内氧化还原反应失衡导致eNOS脱偶联，脱偶联的eNOS产生超氧化物（O2—）而不是NO，导致内皮功能损伤，进而引起多种心血管疾病的发生和发展。深入了解eNOS脱偶联与心血管疾病的关系，对预防和治疗心血管疾病具有重要意义！

1内皮型一氧化氮合酶分子结构和功能调节

eNOS是一种结合辅因子的同源二聚体，这种结构是其催化L-精氨酸和活性氧（O2）产生L-瓜氨酸和NO所必需的。每个eNOS亚基有两个结构区，即氧化区和还原区。N-端为氧化区，含有四氢生物蝶呤（BH4）、L-精氨酸和血红素的结合位点。连接eNOS两个亚基的是锌指结构，由锌离子（Zn2+）和每个亚基的两个半胱氨酸残基构成。C-端为还原区，含有与黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）、黄素单核苷酸（FMN）和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NADPH）结合的位点。每个亚基氧化NADPH为NADP+产生电子，电子被传递到氧化区的血红素[3]。氧化区和还原区的连接处为钙调蛋白（CaM）结合的区域，当结合两分子的CaM时，激活eNOS，将电子的传递给L-精氨酸，生成NO。

翻译后经十四烷酰化和棕榈酰化修饰的eNOS与小窝蛋白-1（caveolin-1）结合，使得eNOS定位于质膜小窝，即质膜的凹陷处，此时eNOS处于失活状态。刺激因素通过Ca2+激活CaM并与eNOS结合，促使eNOS从caveolin-1上解离并从小窝转位到胞浆，转位后的eNOS功能上调。eNOS不同氨基酸位点的磷酸化作用不同。磷酸化丝氨酸(Ser) 1177是改变酶对Ca2+敏感性及产生过氧化物和

NO比例的关键位点，磷酸腺苷活化蛋白激酶（AMPK）直接磷酸化Ser1177可增强热休克蛋白90（HSP90）与eNOS的结合，进而提高eNOS的活性，促进

NO的产生。磷酸化CaM结合区域的苏氨酸（Thr）495位点，通过抑制CaM 与

eNOS结合而抑制eNOS的激活。另外，磷酸化FMN结合区域的Ser633位点可以增加Ser1177磷酸化及Ca2+激活的eNOS的活性。磷酸化Ser114和Ser615的功能尚存在争议[3]。

BH4和L-精氨酸是eNOS重要的辅因子，BH4能保持血红素结合位点功能正常；增加eNOS与L-精氨酸结合力；稳定eNOS二聚体的结构与活性。另外，

BH4具有较强还原性，可清除活性氧（ROS）和过氧化亚硝基[4]。锌指结构也能够保证BH4结合位点的完整性，另外，小窝内的L-瓜氨酸可以转变为L-精氨酸循环再利用，以保证eNOS底物的充足，并稳定其二聚体结构[5]。

2脱偶联的内皮型一氧化氮合酶

eNOS脱偶联即改变了酶的四级结构，eNOS不再是同源二聚体结构，而是单体结构，通过SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳可见eNOS二聚体减少，单体与二聚体的比值增加[6]。脱偶联的eNOS产生O2—而不是NO，以产生的O2—为中心会使损伤效应不断放大，O2—氧化NO为氧化性更强的ONOO—，进而氧化eNOS的辅因子使其数量减少或功能障碍，导致更多的eNOS脱偶联，产生更多的O2

—，降低NO的生成和生物利用度，损伤血管内皮，进而引起心血管疾病的发生和进展。eNOS脱偶联的因素主要包括：BH4或L-精氨酸含量不足，锌指结构破坏，氧化应激损伤。其中氧化应激损伤与eNOS脱偶联的关系结合在以下几点中叙述。

2.1四氢生物蝶呤与内皮型一氧化氮合酶脱偶联

BH4是稳定eNOS活性的重要辅因子。BH4合成方式有两种，即从头合成和补救合成。从头合成是以三磷酸鸟苷（GTP）为原料，在鸟苷三磷酸环化水解酶1（GTPCH1）和墨蝶呤还原酶（SR）的作用下合成BH4. GTPCH1是该反应中的限速酶，因为BH4合成的调节通过改变转录水平来实现，所以BH4的合成很大程度依赖于GTPCH1的表达。某些炎性因子可以增加转录水平，比如肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、白介素-1（IL-1）、干扰素-γ及脂多糖（LPS）。GTPCH1连同caveolin-1与eNOS定位在细胞小窝，它能连续的提供BH4。在哺乳动物中，补救合成主要通过二氢叶酸还原酶(DHFR)和二氢生物蝶呤还原酶(DHPR)实现。

DHFR主要激活叶酸为5-甲基四氢叶酸，同时可以将BH2还原为BH4. DHPR

可以将醌式BH2还原为BH4[4]。

BH4不足时，eNOS脱偶联，因而失去正常产生NO的能力而产生超氧化物。产生的超氧化物会氧化剩余的BH4为BH2，导致血管中BH4含量减少，而BH2含量增多，BH2又是BH4的拮抗剂，这将会增加eNOS脱偶联，进一步增多活性氧（ROS）的产生和NO的减少。同时，超氧化物会与生成的NO反应，生成

ONOO—[7]。另外，增加酶的活性，比如NADPH氧化酶、黄嘌呤氧化酶等的活性增加会触发超氧化物自由基生成的级联反应，其中连续生成的过氧硝酸基

ONOO—氧化BH4为BH3，增加eNOS脱偶联，进而产生更多的自由基。过氧亚硝酸基会不可逆的使其他蛋白的酪氨酸残基硝化，使其磷酸化受损及酶的功能紊乱[8]。

若只增加eNOS的表达而没有平行的增加BH4，即相对的BH4不足，会因辅因子与酶的比例失衡而导致eNOS脱偶联[9]。所以保持eNOS与BH4的比例平衡

对偶联很重要，有研究表明降低BH4水平可激活核转录因子-E2-相关因子，降低人内皮细胞eNOS蛋白水平，故保持eNOS与BH4的比例平衡，使eNOS处于偶联状态，因而降低了ROS的生成[10]。在保持eNOS: BH4比值恒定的情况下，增加细胞内BH2浓度将明显的增加eNOS依赖的超氧化物的生成，因此，eNOS脱偶联不单纯取决于eNOS: BH4比值，还与细胞内BH4: BH2比值有关系。Crabtree等研究显示鼠科动物内皮细胞中含有大量的DHFR，若用甲氨蝶呤降低该酶的活性，或基因敲除DHFR，导致BH4氧化为BH2，继而eNOS脱偶联。DHFR可将

BH2还原再生为BH4，如此保持较好的BH4: BH2比值来稳定eNOS的偶联状态，尤其在BH4和BH2较少的情况下[11]。

2.2 L-精氨酸与内皮型一氧化氮合酶脱偶联

L-精氨酸在保持eNOS偶联中的必要作用尚存在争议。因为血浆L-精氨酸浓度是在体激活eNOS所需浓度的30倍[11]。另外，L-精氨酸自身可以被细胞循环再利用。精氨酸酶增加细胞内L-精氨酸的分解，引起局限的、亚细胞的L-精氨酸含量降低。因此，内皮细胞表达的精氨酸酶可与eNOS竞争其底物，降低

eNOS的作用。eNOS的抑制剂非对称性二甲基精氨酸（ADMA）直接抑制eNOS，同时也抑制内皮细胞摄取L-精氨酸。因此，降低L-精氨酸与ADMA比值可降低

eNOS产生的NO。有研究显示，在人动脉和静脉中，血清ADMA水平与eNOS偶联水平呈明显的负相关。此外，增加血浆ADMA浓度与血管氧化压力及内皮功能失调的发生有关[12]。如此，改变ADMA而不是L-精氨酸可触发eNOS脱偶联。而另有研究表明在BH4不足时，ADMA可使eNOS脱偶联，增加ROS产生，但是在L-精氨酸充足时不会出现这样的结果[13]。ADMA升高与L-精氨酸不足均可使eNOS脱偶联而增加ROS的产生，所以在生理情况下，ADMA可能与eNOS脱偶联无关。

2.3锌指结构与内皮型一氧化氮合酶脱偶联

锌指结构由一个Zn2+与来自eNOS每个亚基的两个半胱氨酸残基构成，位于

eNOS的氧化区，等距于每个亚基的血红素，能保持BH4结合位点的完整性。锌指结构突变会阻止Zn2+、BH4、L-精氨酸的结合，使eNOS失活，提示锌指结构稳定二聚体对酶的活化非常重要。分离的eNOS暴露在过氧亚硝基环境下，过度产生的NO和O2—相互反应，氧化锌指结构，导致eNOS脱偶联。Chen等认为BH4稳定二聚体不需要Zn的参与，因为尽管过氧亚硝基处理失去Zn2+的结合，降低eNOS的活性，但是用Zn的螯合物孵化并未改变eNOS的活性[7]。

3 eNOS脱偶联对心血管系统的影响

高血压与心力衰竭：eNOS基因表达影响小鼠的血管张力，因此成为血压调节的重要因素，eNOS基因缺失引起高血压，而eNOS基因过表达则降低血压。高血压大鼠存在eNOS脱偶联，逆转eNOS脱偶联为二聚体的eNOS，可增加大鼠主动脉NO生物活性，降低自发性高血压大鼠的血压[14]。对于高血压患者，少量连续口服BH4制剂可降低收缩压、平均动脉压，改善内皮功能和氧化压力[15]。另有研究证实eNOS脱偶联在压力超负荷诱导的心室重构模型中起关键作用，eNOS脱偶联可引起心肌肥厚和纤维化，降低心肌收缩力，引起心力衰竭。经口给予BH4可抑制eNOS脱偶联，增加NO产生，并减少ROS的产生，可预防或逆转心室肥厚、纤维化，改善心功能[16]。需要解释的是因为eNOS−/−小鼠没有eNOS，也就没有脱偶联的eNOS及其依赖的超氧化物产生，所以eNOS−/−小鼠在压力超负荷情况下心肌肥厚、扩张和纤维化均较轻[17]。

糖尿病：eNOS脱偶联与糖尿病的关系密切，既往实验研究有一矛盾的现象，即在链脲霉素诱导糖尿病模型动物血管eNOS的mRNA及蛋白表达是上调的，而NO没有相应的增加，且同时存在内皮功能障碍。在糖尿病模型动物中eNOS脱偶联的发现可以合理解释这一矛盾。高血糖可增加O2—的产生，进而增加ADMA的生成，ADMA抑制L-精氨酸的作用，导致eNOS脱偶联，NO生成减少，超氧化物生成增多，增加血管氧化压力，降低NO的生物利用，导致糖尿病血管内皮功能失调[18]。另外糖尿病增加的氧化压力也可过多的氧化BH4为BH2，使BH4缺乏，引起eNOS脱偶联，血管修复能力降低，进而加重糖尿病内皮损伤，补充BH4可改善内皮依赖性血管舒张障碍[19]。动物实验证明BH4不足还可能与内皮GTPCH1表达下调及降解加速有关，在链脲霉素诱导的2型糖尿病模型小鼠中，AMPK的减少导致26S蛋白酶体的活性异常，引起GTPCH的降解加速。临床治疗糖尿病常用药物二甲双胍即是通过上调AMPK来抑制26S蛋白酶体对GTPCH的降解保持eNOS活性，从而改善血管功能，降低2型糖尿病患者的死亡率[20]。

动脉粥样硬化：eNOS脱偶联是动脉粥样硬化（AS）的重要机制之一。eNOS脱偶联降低NO的产生，减少其对血管的保护作用，既往实验证明eNOS基因敲除或使用其抑制剂可加速实验动物AS的形成；另外eNOS脱偶联生产超氧化物，增加氧化压力，促进AS的形成。用低密度脂蛋白（LDL）孵育内皮细胞或在体高脂血症，可直接增加内皮细胞氧化压力，也可激活内皮的血管紧张素Ⅱ，后

者提高NADPH氧化酶表达，二者均可引起BH4氧化，也减少DHFR对BH4的循环利用，导致eNOS脱偶联，使得NO产生减少，氧化压力增加，损伤血管内皮，促进AS的形成与进展[21]。Antoniades[22]等用冠状动脉疾病（CAD）患者做搭桥手术的大隐静脉和肠系膜动脉研究，发现血浆生物喋呤水平与血管的生物喋呤水平呈负相关；血管BH4与血管ROS呈负相关，与eNOS偶联及NO调节的血管功能呈正相关；血浆BH4同样与血管损伤程度和C反应蛋白（CRP）水平正相关。另外，促炎因子和GTPCH1单体的特异性也与eNOS脱偶联有关。促炎因子可明显的增加血浆生物喋呤的水平，却不能增加内皮中生物喋呤的水平，使eNOS脱偶联，引起内皮功能失调。患者特异的GTPCH1单体决定血浆及血管中BH4的水平，GTPCH1单体被3个单核苷酸多态性位点决定，启动子区域的rs8007267G/A，内含子1 的rs3783641A/T 和3′端未翻译区的

rs10483639C/G。特异的GTPCH1单体与eNOS脱偶联，增加血管超氧化物生成及降低内皮功能有关，是AS独立的影响因素[23]。

缺血性心脏病：氧化压力在心肌梗死（MI）后心肌重塑的细胞水平上起关键作用。既往研究提示，在转基因小鼠中，eNOS过表达的小鼠，MI后心肌重塑的程度减轻，而eNOS−/−小鼠则重塑加重[24]。NO可增加MI后血管生成，减少纤维化的生成。eNOS部分通过减轻心肌细胞肥大而减轻MI后左室功能失调及重塑。研究证实MI模型大鼠梗死后心肌重塑还与非梗死心肌的超氧化物形成有关，Yaoita[25]等报道用冠状动脉结扎的方法建立大鼠心肌缺血模型，补充BH4可增加eNOS活性，降低心肌中性粒细胞活性，保护炎症浸润心肌的内皮细胞和心肌细胞，这主要归功于eNOS改善冠状动脉内皮功能，由此改善心肌灌注。所以补充BH4以调整eNOS偶联可作为治疗心肌缺血性损伤的治疗方法，该方法可改善冠状动脉灌注及减轻心肌重塑来保护心脏功能。另外，eNOS二聚体与单体的比值可以提示MI后eNOS脱偶联的发生，补充外源性BH4后eNOS二聚体与单体的比值上升，eNOS脱偶联减轻。大剂量口服补充BH4可改善缺血再灌注损伤对内皮功能的影响[26]。

心血管老化：衰老引起的eNOS脱偶联及NO的生物利用降低可能是导致内皮依赖血管舒张功能降低及血压升高的原因。研究发现老龄大鼠骨骼肌阻力动脉

BH4水平及生物利用降低，可能引起eNOS脱偶联，进而导致内皮依赖血管舒张功能降低，超氧化物产生增多[27]。补充BH4或其底物墨蝶岭可使eNOS复偶联，增加NO的产生，进而改善老龄小鼠内皮功能[28]。Sindler[29]等发现运动训练可通

过平衡NO与ROS的产生预防衰老导致的BH4丢失并改善NO的生物利用度，从而改善eNOS脱偶联引起的内皮功能损伤。

eNOS脱偶联在心血管疾病的发生和发展中起重要作用，因此针对eNOS脱偶联和（或）其触发因素的对策可能是预防和治疗冠心病、心力衰竭、动脉粥样硬化、糖尿病及高血压等心血管疾病的有效手段，如阻断ROS的产生，补充BH4，补充叶酸以使BH2再循环为BH4，补充L-精氨酸等。

参考文献

[1] Kazuhiro Sase, Thomas Michel. [Expression and Regulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase](https://vpnt.lzu.edu.cn/prx/000/http/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1050173896001211). Trends in Cardiovascular Medicine, 1997, 7: 28~37.

[2] Vanhoutte PM. How we learned to say NO. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29: 1156~1160.

[[3] Bird IM](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Bird%20IM%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21824899). Endothelial nitric oxide synthase activation and nitric oxide function: new light through old windows. [J Endocrinol,](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824899#%23) 2011, 210: 239~241.

[4]. [Werner ER](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Werner%20ER%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21867484), [Blau N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Blau%20N%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21867484), [Thöny B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Th%C3%B6ny%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=21867484). Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology**.** Biochem J, 2011, 438: 397~414.

[5] Solomonson LP, Flam BR, Pendleton LC, et al. The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. J Exp Biol, 2003, 206: 2083~2087.

[6] Paige JS, Jaffrey SR. Pharmacologic manipulation of nitric oxide signaling: targeting NOS

Dimerization and protein-protein interactions. Curr Top Med Chem, 2007,7:97-114. 7 Chen W, Druhan LJ, Chen CA, et al. Peroxynitrite induces destruction of the

Tetrahydrobiopterin and heme in endothelial nitric oxide synthase: transition from reversible to irreversible enzyme inhibition. Biochemistry, 2010,49:3129~3137.

[8] Harry Ischiropoulos. [Protein tyrosine nitration—An update](http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003986108005031). [Arch Biochem Biophys](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19007743), 2009, 484: 117~121.

[9] Bendall JK, Alp NJ, Warrick N, et al. Stoichiometric relationships between endothelial tetrahydrobiopterin, endothelial NO synthase(eNOS) activity, and eNOS coupling in vivo: insights from transgenic mice with endothelial-targeted

GTP cyclohydrolase 1 and eNOS overexpression. Circ Res, 2005,97:864~871.

[10] Heiss EH, Schachner D, Werner ER, et al. Active NF-E2-related factor (Nrf2) contributes to keep endothelial NO synthase (eNOS) in the coupled state: role of reactive oxygen species (ROS), eNOS, and heme oxygenase (HO-1) levels. J Biol Chem, 2009, 284: 31579~31586.

[11] Crabtree MJ, Tatham AL, Hale AB, et al. Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling: relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways. J Biol Chem, 2009, 284: 28128~28136.

[12] Antoniades C, Shirodaria C, Leeson P, et al. Association of plasma asymmetrical dimethylarginine (ADMA) with elevated vascular superoxide production and endothelial nitric oxide synthase uncoupling: implications for endothelial function in human atherosclerosis. Eur Heart J, 2009, 30: 1142~1150.

[13] Druhan LJ, Forbes SP, Pope AJ, et al. Regulation of eNOS-derived superoxide by endogenous methylarginines. Biochemistry, 2008, 47: 7256~7263.

[14] Moens AL, Takimoto E, Tocchetti CG, et al. Reversal of cardiac hypertrophy andﬁbrosis from pressure overload by tetrahydrobiopterin: efﬁcacy of recoupling nitric oxide synthase as a therapeutic strategy. Circulation, 2008, 117: 2626~2636.

[15] Porkert M, Sher S, Reddy U, et al. Tetrahydrobiopterin: a novel antihypertensive therapy. J Hum Hypertens, 2008, 22: 401~407.

[16] Takimoto E, Champion HC, Li M, et al. Oxidant stress from nitric oxide synthase-3 uncoupling stimulates cardiac pathologic remodeling from chronic pressure load. J Clin Invest, 2005, 115: 1221~1231.

[17] Li H, Witte K, August M, Brausch I, et al. Reversal of endothelial nitric oxide synthase uncoupling and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase expression lowers blood pressure in hypertensive rats. J Am Coll Cardiol, 2006, 47: 2536~2544.

[18] King DE, Player M, Everett CJ. The impact of pioglitazone on ADMA and oxidative stress markers in patients with type 2 diabetes. Prim Care Diabetes, 2012, 6: 157~161.

[19] Starr A, Hussein D, Nandi M. The regulation of vascular tetrahydrobiopterin

Bioavailability. Vascul Pharmacol, 2013, 58:219~230.

[20] Wang S, Xu J, Song P, et al. In vivo activation of AMP-activated protein kinase attenuates diabetes-enhanced degradation of GTP cyclohydrolase I. Diabetes, 2009, 58: 1893~1901.

[21] Li H, Förstermann U. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. Curr Opin Pharmacol, 2013, 13: 161~167.

[22] Antoniades C, Shirodaria C, Crabtree M, et al. Altered plasma versus vascular biopterins in human atherosclerosis reveal relationships between endothelial nitric oxide synthase coupling, endothelial function, and inﬂammation. Circulation, 2007, 116: 2851~2859.

[23] Antoniades C, Shirodaria C, Van AT, et al. GCH1 haplotype determines vascular and plasma biopterin availability in coronary artery disease effects on vascular superoxide production and endothelial function. J Am Coll Cardiol, 2008, 52: 158~165.

[24] Jones SP, Greer JJ, van HR, et al. Endothelial nitric oxide synthase overexpression attenuates congestive heart failure in mice. Proc. Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 4891~4896.

[25] Yaoita H, Yoshinari K, Maehara K, et al. Different effects of a high-cholesterol diet on ischemic cardiac dysfunction and remodeling induced by coronary stenosis and coronary occlusion. J Am Coll Cardiol, 2005, 45: 2078~2087.

[26] Mayahi L, Heales S, Owen D, et al. (6R) -5, 6, 7, 8-tetrahydro-L-biopterin and its stereoisomer prevent ischemia reperfusion injury in human forearm. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27: 1334~1339.

[27] Delp M. D, Behnke BJ, Spier SA, et al. Ageing diminishes endothelium-dependent vasodilatation and tetrahydrobiopterin content in rat skeletal muscle arterioles. J Physiol, 2008, 586: 1161~1168.

[28] Yang YM, Huang A, Kaley G, et al. eNOS uncoupling and endothelial dysfunction in aged vessels. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 297: H1829~1836.

[29] Sindler AL, Delp MD, Reyes R, et al. Effects of ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles. J Physiol, 2009, 587: 3885~3897.

# 作者简历

一、基本情况

姓名：赵艳霞出生日期：1980年12月25日性别：女籍贯：黑龙江省安达市

民族：汉政治面貌：中共党员

最后学历：硕士研究生毕业院校：黑龙江中医药大学二、学习工作经历

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 2000.09-2005.07 | 黑龙江中医药大学 | 学士 |
| 2005.09-2008.07 | 黑龙江中医药大学 | 硕士 |
| 2008.08-2009.12 | 青海大学医学院 | 助教 |
| 2009.12-2010.02 | 青海大学医学院 | 讲师 |
| 2010.03-2010.08 | 黑龙江中医药大学 | 进修 |
| 2010.09-至今 | 青海大学医学院 | 讲师 |
| 2011.09-至今  教学工作 | 青海大学医学院 | 攻读博士研究生 |

承担《社区急救》与《社区康复》两门课程的主讲工作，攻读博士学位以来共讲授800余课时。

社会活动

2011年7月参加教育部科技委生物与医学学部2011年全委会

2011年8月参加第二届亚太地区高原医学研究会议

2011年8月参加第七届全国医学生物化学与分子生物学大会

2011年10月参加第二十二届长城国际心脏病学会议

2014年1月参与青海大学医学院高原医学研究中心与美国加州大学合作课题—高原低氧运动的研究

2014年8月参加康复治疗新技术新进展培训班三、发表论文

[1] **Zhao YX**, Tang F, Ga Q, Wuren T, Wang YP, Rondina MT, et al. High fat diet exacerbates vascular endothelial dysfunction in rats exposed to continuous hypobaric hypoxia. Biochemical and biophysical research communications.2015,457(3): 485-91.

[2]赵艳霞，格日力.内皮型一氧化氮合酶脱偶联在心血管疾病中的致病作用.中国

循环杂志,2014,04:315-318.

[3]赵艳霞，李玉红，王亚平，杨应忠，马兰，格日力. 高脂饮食对慢性低氧大鼠肺组织eNOS/NO的影响.中国应用生理学杂志，2014, 04: 377-380

[4]赵艳霞，李玉红，王亚平，杨应忠，马兰，格日力.低氧联合高脂饮食对SD大鼠心肌内皮型一氧化氮合酶/一氧化氮的影响.中国循环杂志，2014, 09: 723-727.

[5]赵艳霞，张广梅，赵协慧，格日力.高脂饮食对模拟低氧环境SD 大鼠肺组织

eNOS/NO的影响.青海医学院学报,2014,01:8-12.

[6] Wang Y, Zhou WD, Yang YZ, Ma L, **Zhao YX**, et al. Telomeres are elongated in rats exposed to moderate altitude. Journal of physiological anthropology 2014;33:19.

[7] Ma L, Shao X, Wang Y, Yang Y, Bai Z, **Zhao Y**, et al. Molecular cloning, characterization and expression of myoglobin in Tibetan antelope (Pantholops hodgsonii), a species with hypoxic tolerance. Gene 2014;533:532-7.

[8]王亚平，杨应忠，马兰，赵艳霞，格日力.不同海拔高度对大鼠外周血白细胞端粒

长度的影响.生理学报,2013,65:540-546.

[9]杨应忠，王亚平，杜洋，赵艳霞，祁玉娟，马兰.高原肺水肿患者EPASl基因外显子测序研究.青海医学院学报，2013, 34: 220-228.