

内源性气态 SO_2 对大鼠血管的舒张作用及其机制 IV: SO_2 对血压的调节与信号通路

李君灵¹, 孟紫强^{2*}

1. 山西财经大学体育学院, 太原 030006

2. 山西大学环境医学与毒理学研究所, 太原 030006

摘要: 为探讨内源性二氧化硫 (SO_2) 对动脉血压的影响及其信号转导通路, 采用大鼠颈动、静脉插管技术研究 SO_2 对动脉压调节作用, 通过离体血管环灌注试验观察 SO_2 对 NE 引起的主动脉血管环收缩作用的影响, 用生物化学方法与实时定量 RT-PCR 技术研究 SO_2 对离体血管一氧化氮 (NO) 生成、一氧化氮合酶 (NOS) 活性和基因表达的调节作用。结果表明: (1) 静脉注入 SO_2 (20 和 $60 \mu\text{mol kg}^{-1}$ 体重) 可立即引起大鼠动脉血压剂量依赖性显著下降, 而相同剂量的亚硫酸钠和亚硫酸氢钠混合液 (摩尔比为 3:1) 未见影响; (2) SO_2 对 NE 的缩血管功能有显著抑制作用, 使 NE 的量效曲线右移; (3) SO_2 能迅速促进内皮 NOS (eNOS) 的基因表达, 增强 eNOS 的活性, 但对诱导型 NOS (iNOS) 的活性未见影响; (4) SO_2 可迅速且显著增加主动脉组织的 NO 产量。此外, 我们以前的研究也指出, 低浓度 SO_2 可引起内皮细胞膜 BK_{Ca} 离子通道开放。由此结论: 内源性 SO_2 是一种血管活性因子, 对整体血压和血管张力具有调节作用; SO_2 对血管 $\text{BK}_{\text{Ca}} \rightarrow \text{eNOS} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{cGMP}$ 信号通路的上调可能是其主要的作机制。

关键词: 二氧化硫; 信号分子; 血管张力; 信号通路; 一氧化氮合酶

文章编号: 1673-5897(2011)6-195-05 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Vasorelaxant Effect of Endogenous Gaseous Sulfur Dioxide on Rat Aortic Rings and Its Mechanism IV: Blood Pressure Modulated by SO_2 and Signal Pathways

Li Junling, Meng Ziqiang*

1. School of Physical Education, Shanxi University of Finance and Economics, Taiyuan 030006, China

2. Institute of Environmental Medicine and Toxicology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Received 9 February 2011 accepted 27 March 2011

Abstract To explore effects of endogenous sulfur dioxide (SO_2) on arterial blood pressure of rat and its signal transduction mechanisms, rat arterial blood pressure and heart rate were measured with the carotid and jugular catheterization via MedLab bio-signal collection system. Effects of SO_2 on vasoconstriction induced by NE (Noradrenaline) were investigated using rat thoracic aortic ring perfusion technique. Effects of SO_2 on nitric oxide synthase (NOS) activity, endothelial NOS (eNOS) gene expression, nitric oxide (NO) biosynthesis in rat vascular tissues were studied with biochemical methods and real-time RT-PCR technique. Results are as follows: (1) The venous transfusion of SO_2 (20, $60 \mu\text{mol kg}^{-1}$ w.t.) lowered immediately blood pressure in a dose-dependent manner in rats. However, at same dosages solution of sodium sulfite and sodium bisulfite mixture (3:1 molar ratio), it could not cause any change.

收稿日期: 2011-02-09 录用日期: 2011-03-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 20677035, No. 20477023); 山西省自然科学基金项目 (No. 20031092)

作者简介: 李君灵 (1969-), 女, 博士; *通讯作者 (Corresponding author, E-mail: zqmeng@sxu.edu.cn)

(2) The vasoconstriction induced by NE was significantly depressed by SO_2 and the concentration effect curve was shifted to the right; (3) SO_2 could immediately potentiate expression of eNOS gene and increase activity of eNOS but did not induced NOS (NOS_i); (4) SO_2 enhanced immediately NO formation in aortic tissue. Furthermore our previous findings indicated that SO_2 at low concentrations could cause opening of BK_{Ca} on vascular endothelium cell membrane. It was concluded that SO_2 was a vasoactive factor might regulate vascular tone and blood pressure in vivo by the mechanisms which SO_2 upregulated BK_{Ca} → eNOS → NO → cGMP signal pathway.

Keywords: sulfur dioxide; gas transmitter; vascular tone; signal pathway; nitric oxide synthase

1 引言 (Introduction)

近年来, 我们的研究发现吸入二氧化硫 (SO_2) 或腹腔注入其衍生物亚硫酸钠和亚硫酸氢钠中性混合液 (摩尔比为 3:1) 可剂量依赖性地引起大鼠血压下降^[1], SO_2 在生理浓度范围内就可显著引起血管环舒张, 且远大于它的衍生物, 这表明 SO_2 是一种新型气体信号分子而其衍生物是其代谢失活产物^[2-3]; 同时也发现, SO_2 和一氧化氮 (NO) 对血管的舒张调节有协同作用, 因此设想 SO_2 和 NO 之间存在某种形式的“交叉对话” (cross-talks)^[4]。然而, 气态 SO_2 直接作用于整体动物的血管组织所引起的血压变化尚未见报道。本研究采用大鼠颈静脉插管注入 SO_2 的方法研究其对大鼠血压的作用, 利用生物化学和分子生物学技术探讨 SO_2 对血管 eNOS-NO-cGMP 信号通路的影响, 以揭示内源性 SO_2 信号分子作用的本质。

2 材料与方法 (Materials and methods)

2.1 主要试剂与仪器

主要试剂有 Brizo 试剂购自杭州博日公司, 禽白血病毒 (AMV) 反转录 (AMV-RTase) 试剂盒购自 TOYOBO (东洋纺) 生物公司; 热启动 Taq 酶、所用引物及探针均购自上海水源生物有限公司。其他试剂或溶剂均为分析纯。主要仪器为 U3010 紫外可见分光光度计 (HITACHI); 荧光实时定量 PCR 仪 (RotorGene 3000 Sydney Australia)。

2.2 主要溶液与实验动物

SO_2 生理盐水溶液的制备: 按照本室建立的方法制备^[4]。

KRB (pH 7.2) 缓冲液组成 (mmol L⁻¹): NaCl 118, KCl 4.7, CaCl₂ 2.0, MgSO₄ 1.2, KH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25 和 D 葡萄糖 10。

实验动物: 健康雄性 Wistar 大鼠, 清洁级, 购自河北省实验动物中心 (石家庄市), 体重 220—250 g。大鼠购入后在清洁级动物饲养室内适应性喂养

1 周, 自由进食和饮水, 饲养温度为 18—22 °C, 湿度为 50%—60%。本研究所有实验均按照有关实验动物保护方面的规定进行。

2.3 大鼠血压和心率的测定

大鼠被 2% 戊巴比妥钠腹腔注射 (50 mg kg⁻¹) 麻醉后, 剪开颈部皮肤肌肉, 游离出两侧血管, 把充满肝素生理盐水的聚乙烯细导管插入左侧颈动脉, 通过 YP200 型压力换能器与 MedLab-U4C501H 生物信号记录分析系统连接, 测定平均动脉压 (MBP) 和心率 (HR)。用另一只充满肝素生理盐水的聚乙烯导管插入右侧颈静脉以备给药。待血压稳定 30 min 后, 记录正常值, 静脉给予 SO_2 生理盐水溶液或其它药物, 记录血压和心率。给药后间隔 10 min 待血压恢复后, 再重复给药。

2.4 大鼠离体血管环张力实验

大鼠胸主动脉血管环的制备及血管环张力的检测采用本室建立的方法^[3]。在内皮完整的主动脉环孵育液中分别加入 SO_2 生理盐水溶液使 SO_2 终浓度为 300 和 1500 μmol L⁻¹ 并预孵育 10 min 后, 累加 NE 浓度依次至 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷ 和 10⁻⁶ mol L⁻¹, 对照组则加入相同体积生理盐水并孵育血管环相同时间。以对照组收缩率为 100%, 计算血管环的收缩百分率, 作 NE 浓度-血管收缩曲线, 以研究 SO_2 对 NE 收缩血管的影响。

2.5 大鼠主动脉片的孵育与 NO、NOS 测定

大鼠主动脉片的孵育与染毒: 本实验主要操作如下, 用戊巴比妥钠 (30 mg kg⁻¹) 麻醉大鼠后, 开胸并迅速取出全长主动脉, 小心去除外膜组织, 将主动脉纵向平均分成两部分 (分别作为对照组和 SO_2 孵育组), 再制成 2 mm 宽的薄片, 置于含 1 mL KRB 的 24 孔板中, 以 95% O₂—5% CO₂ 持续饱和, 37 °C 恒温振荡孵育。实验组加入不同浓度的 SO_2 生理盐水, 对照组加入同体积生理盐水。孵育结束时, 立即收集组织和孵育液, 置于 -80 °C 保存, 用于分析测定 NO 产量和 NOS 活性。

主动脉 NO 和 NOS 测定: 血管组织、孵育液的

NO 含量和 NOS 活性分别采用一氧化氮 (NO)试剂盒和一氧化氮合酶 (NOS)试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 测定, 实验步骤严格按操作说明书操作。

2.6 eNOS 基因表达的分析

大鼠主动脉环的孵育与染毒: 随机将 12 只雄性大鼠等分为对照组和 SO_2 组, 其全长主动脉的分离和孵育方法基本同上, 所不同的是在本实验中把主动脉制备成长约 2 mm 宽的血管环而不是血管片。孵育结束时, 立即将血管组织置于液氮内保存, 用于 mRNA 的提取和分析。

实时定量 RT-PCR 总 RNA 的提取采用 Brizol 提取, 最后溶于二乙基焦磷酸胺 (DEPC) 水中。以 OD260 和 OD280 值计算 RNA 的浓度及纯度, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分析 RNA 的完整性。cDNA 的合成以 oligo dT 为引物, 采用 AMV-RTase 催化合成 cDNA 第一链, 产物存于 -80°C 冰箱备用。TaqMan PCR 所用引物和探针序列见表 1。反应体积为 20 μL , 其中含 1 μL cDNA, 2 μL PCR buffer, 0.2 mmol L^{-1} dNTPs, 3.5 mmol L^{-1} MgCl_2 , 上下游引物各 0.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 探针 0.2 $\mu\text{mol L}^{-1}$, 及 1 U TaqDNA 聚合酶。采用 RotorGene 3000 荧光实时定量 PCR 仪扩增测量循环条件, 反应条件为: 95°C 预变性 3 min, 后, 94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 30 s, 均扩增 40 个循环周期。探针标记为荧光基团 (FAM) 和淬灭基团 (TAMRA), 在 72°C 延伸步骤中采集荧光信号。用已知浓度的基因组 DNA 进行梯度稀释, 制作 PCR 扩增标准曲线。采用 RotorGene 3000 6.0 软件定量分析实验结果, 所有实验重复 3 次, 取其平均值, 结果以目的基因 eNOS 与 GAPDH 基因表达的比值来表示。 eNOS 和 GAPDH PCR 扩增产物大小分别为

表 1 荧光定量 PCR 所用引物和探针序列
Table 1 Primer and probe sequences used in real time RT-PCR

基因	基因编号	序列
GAPDH	NM_017008	Forward Primer 5'-ATGTATCCGTGTGTGATCTGAC-3'
		Reverse Primer 5'-CCTGCTTACACCTTCTTG-3'
	TaqMan probe	5'-FAM-TGCCGCTGGAGAAACCTGCCA-TAMRA-3'
eNOS	NM_021838	Forward Primer 5'-GATCCTGGCAGCCCTAAGAC-3'
		Reverse Primer 5'-TGTCCTCGTGTAGCGTTG-3'
	TaqMan probe	5'-FAM-CCGCAGCAGCCGATGACG-TAMRA-3'

238 bp 和 85 bp 均经溴化乙啶染色的琼脂糖胶显影所证实。

2.7 蛋白浓度测定

蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法, 用 BSA 做标准曲线。

2.8 统计学处理

实验结果以 $\bar{X} \pm \text{SD}$ 表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件包进行单因素方差分析 (ANOVA)。成对实验结果的比较则采用成对 t test 方法检验差异的显著性。

3 结果与分析 (Results and analysis)

3.1 SO_2 对大鼠血压和心率的影响

静脉注射 SO_2 生理盐水溶液使 SO_2 达到 20 和 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量后, 大鼠平均动脉血压 (MBP) 很快下降, 在 30 s 内降至最低, 即分别从 (115 ± 6) mm Hg 降至 (105 ± 4) mm Hg ($n=3$, $P<0.01$) 和从 (109 ± 7) mm Hg 降至 (83 ± 5) mm Hg ($n=3$, $P<0.01$), 给药后 5-10 min 血压恢复正常 (图 1A)。在此期间心率 (HR) 改变无统计学意义 (326 ± 23 , $P>0.05$)。而静脉注射同样浓度的亚硫酸钠和亚硫酸氢钠混合液 (摩尔比为 3:1) 未引起血压和心率改变, 静脉注射同样体积的生理盐水也未引起血压和心率改变 (数据未显示)。

3.2 SO_2 对 NE 收缩血管的抑制作用

从图 1B 可知, 以 300 和 1 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SO_2 预处理 10 min 均对 NE 收缩血管的功能有显著抑制作用, 使 NE 引起的血管收缩曲线呈剂量依赖性右移。

3.3 SO_2 对大鼠主动脉组织 NO 含量的影响

图 2C 和图 2D 表明, SO_2 处理血管组织 10 min 可引起血管组织和孵育液中 NO 含量显著增加, 但 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SO_2 组比 1 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ SO_2 组的增加更大。

3.4 SO_2 对大鼠主动脉 NOS 活性的影响

图 2A 指出, SO_2 (300 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 孵育 10 min 血管总 NOS (NOS 活性和 eNOS 的活性显著增高, 而 NOS 的活性无显著变化。

3.5 SO_2 对大鼠主动脉 eNOS mRNA 表达的影响

不同浓度的 SO_2 (300 和 1 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) 分别孵育 10 min 后, 大鼠血管组织中 eNOS mRNA (238 bp) 表达升高, 分别为对照组的 1.29 倍和 1.31 倍 (图 2B)。

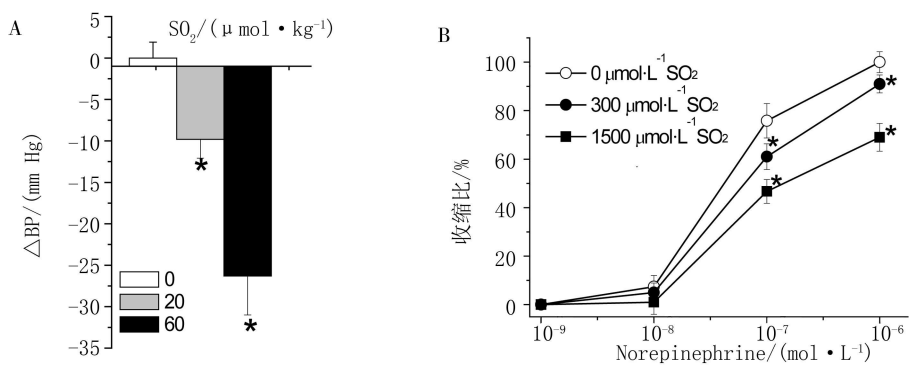


图 1 SO_2 对大鼠血压及血管张力的影响

A 静脉注射 SO_2 对大鼠动脉血压 (BP)的影响; B SO_2 对 NE引起血管环收缩的抑制作用。与对照组比: * $P < 0.05$ $n=6$

Fig 1 Effects of SO_2 on blood pressure and vascular tension in rats

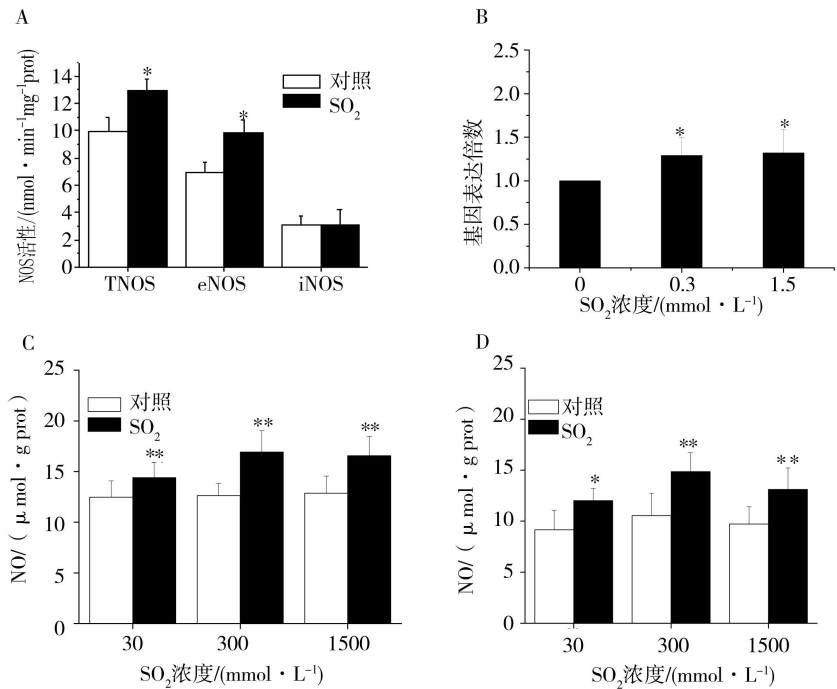


图 2 SO_2 对大鼠血管组织细胞 NO/NOS信号通路的上调作用

A SO_2 对 NOS活性的影响; B SO_2 对 eNOS mRNA表达的影响;

C SO_2 对血管组织 NO含量的影响; D SO_2 对孵育液 NO含量的影响。与对照组比: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ $n=6$

Fig 2 Upregulating effects of SO_2 on the NO/NOS signal pathway in rat vascular cells

4 讨论 (Discussion)

在上世纪 80 年代发现, 常见气体污染物 NO 可以由血管内皮细胞内的 L-精氨酸经 NOS 催化合成, NO 可弥散到邻近的平滑肌细胞, 激活鸟苷酸环化酶 (AC), 使细胞内 cGMP 增加, 从而导致细胞内 Ca^{2+} 浓度下降, 引起血管舒张, 动脉血压降低。研究

发现, 大气常见气体污染物 SO_2 也是血管内皮细胞可以产生的内源性气体分子^[2]。本室前期研究发现, SO_2 可使血管舒张, 且低浓度 SO_2 引起的舒张作用是内皮依赖性的, 与 BK_{Ca} 钙通道和 NO/cGMP 信号途径等机制有关, 而高浓度 SO_2 的舒张血管的作用是非内皮依赖性的, 其作用机制与 K_{ATP} 和 L 型钙离子通道等有关。 SO_2 是一种新型气体信号分子,

而其衍生物亚硫酸盐和亚硫酸氢盐中性混合物只是其失活产物, 后者的作用不能等同于 SO_2 的作用;^[2-4-5] 同时也发现, 在血管舒张作用中 SO_2 和 NO 有显著的协同作用^[4]。

为了进一步证明 SO_2 对心血管功能调节的信号分子作用, 本文研究了 SO_2 与其衍生物对血压调节的差异及 SO_2 对血管组织 NOS 基因表达和 NO 生物合成的作用。结果发现, 静脉注射低浓度 SO_2 ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 就可立即引起大鼠血压显著下降, 而静脉注射亚硫酸钠和亚硫酸氢钠混合液 (摩尔比为 3:1, $60 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$) 未见引起任何改变。结果也发现, 低浓度 SO_2 对 NE 收缩血管的功能有显著抑制作用, 而亚硫酸钠和亚硫酸氢钠混合液只有在高浓度下才产生抑制作用。这些结果进一步证明, 内源性 SO_2 是能够对心血管功能起调节作用的新型信号分子, 而其衍生物只是其代谢失活产物。

文献报道, eNOS 是血管内皮细胞 NO 生物合成的主要限速酶。本研究结果指出, SO_2 能显著提高 eNOS 的活性, 而对 NOS 的活性没有显著影响; SO_2 能显著促进 NO 的产生, 使 NO 在血液和血管组织中的水平显著增加。这些结果为生理相关或低浓度 SO_2 引起的血管舒张作用部分地被 eNOS-NO-cGMP 信号通路所介导的观点提供了直接证明^[4]。

本实验结果也表明, SO_2 对 eNOS 的基因表达有显著刺激效应, 因而 SO_2 不仅可以提高 eNOS 的活性, 而且可以提高 eNOS 的数量, 从而为 SO_2 上调 eNOS-NO-cGMP 信号通路的生物学本质提供了直接证据。

研究表明, 二氧化硫易溶于水, 更易溶于有机溶剂, 因此 SO_2 生物合成后既可通过水相系统在细胞间扩散, 又可像 NO 那样通过脂相系统在细胞之间扩散, 从而发挥其信号分子的作用^[6]。我们的研究也发现, 低浓度 SO_2 可引起内皮细胞膜 BK_{Ca} 离子通道开放^[3], 从而导致细胞外液 Ca^{2+} 进入内皮细胞内, 激活 eNOS 增加 NO 的产量, 故其信号途径与作用可归纳为: SO_2 (内皮产生) $\rightarrow \text{BK}_{\text{Ca}} \rightarrow \text{eNOS} \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{cGMP} \rightarrow$ 舒张血管和降低血压。此外, SO_2 也可能通过直接或间接作用使 eNOS 基因表达上调, 导致 eNOS 的活性增强、酶数量增多, 从而使血管组织中的 NO 在短时间和较长时间内均处于提高水平^[7]。

本室研究指出, 高浓度 SO_2 对主动脉组织具有更强的舒张作用, 是 SO_2 直接作用于血管平滑肌 L

型钙通道和 K_{ATP} 通道而引起血管舒张, 其受血管内皮的影响很小^[5]。另外, 高浓度 SO_2 对 eNOS 活性的调节作用反而比低浓度 SO_2 要弱, 这可能是由于高浓度 SO_2 对血管已呈现有毒性作用之故。

通讯作者简介: 孟紫强 (1939—) 男, 教授, 博士生导师。从事二氧化硫及其衍生物毒理学和生理学作用研究 20 余年, 近年来也从事沙尘天气包括沙尘暴与健康的研究。研究方向: 环境医学与毒理学。

参考文献:

- [1] Meng Z Q, Geng H, Bai J L, et al. Blood pressure of rats lowered by sulfur dioxide and its derivatives [J]. *Inhalation Toxicology* 2003 15(9): 951-959
- [2] Meng Z Q, Li J L, Zhang Q X, et al. Vasodilator effect of gaseous sulfur dioxide and regulation of its level by ACh in rat vascular tissues [J]. *Inhalation Toxicology* 2009 21(14): 1223-1228
- [3] 孟紫强, 张海飞. 二氧化硫衍生物对大鼠离体主动脉血管环的舒张作用 [J]. *应用与环境生物学报*, 2005 11(1): 64-66
Meng Z Q, Zhang H F. Vasodilatory effect of sulfur dioxide derivatives on isolated aortic rings of rat [J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology* 2005 11(1): 64-66 (in Chinese)
- [4] Li J L, Meng Z Q. The role of sulfur dioxide as an endogenous gaseous vasoactive factor in synergy with nitric oxide [J]. *Nitric Oxide* 2009 20(3): 166-174
- [5] Zhang Q X, Meng Z Q. The vasodilator mechanism of sulfur dioxide on isolated aortic rings of rats. Involvement of the K^+ and Ca^{2+} channels [J]. *European Journal of Pharmacology* 2009 602(1): 117-123
- [6] 孟紫强, 郭掌珍. SO_2 在水和有机溶剂中的化学形态及其脂/水分配系数: SO_2 生理学研究新模式 [J]. *生态毒理学*, 2009 4(1): 75-80
Meng Z Q, Guo Z Z. Chemical status of sulfur dioxide in water and organic solvents and its lipid/water partition coefficient: A new model for physiological study of sulfur dioxide [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology* 2009 4(1): 75-80 (in Chinese)
- [7] Li J L, Li R J, Meng Z Q. Sulfur dioxide upregulates the aortic nitric oxide pathway in rats [J]. *European Journal of Pharmacology* 2010 645(1-3): 143-150

