

尾部悬吊对大鼠胸主动脉氧化应激水平的影响*

於进文 蔡越 王忠超 白云刚 刘焕 暴军香 马进[△]

(第四军医大学航空航天医学教育部重点实验室, 航空航天生理学教研室 陕西 西安 710032)

摘要 目的: 观察模拟失重大鼠胸主动脉氧化应激水平的影响, 探讨其可能机制。方法: 采用3周尾部悬吊大鼠模型模拟失重状态, 通过DHE荧光探针技术观察大鼠动脉血管超氧阴离子水平变化, 通过比色法测定大鼠动脉血管丙二醛(MDA)含量, 通过蛋白印记技术观察悬吊(SUS)大鼠和正常对照(CON)大鼠动脉血管NOX4、p22phox的表达变化。结果: 尾部悬吊3周后, SUS组大鼠胸主动脉超氧阴离子水平较CON组明显增高, SUS组(0.849±0.023 nmol/mg protein)大鼠MDA含量较CON组(0.575±0.054 nmol/mg protein)明显增加, SUS组大鼠胸主动脉的p22phox及NOX4蛋白表达均较CON组明显增强。结论: 模拟失重3周可使大鼠胸主动脉氧化应激水平明显增高, p22phox及NOX4蛋白表达明显增多, 结果提示, 尾部悬吊模拟失重状态下氧化应激水平增高可能与NADPH氧化酶表达增高有关。

关键词 模拟失重; 胸主动脉; 氧化应激; 大鼠

中图分类号: Q95-3 R852.22 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)09-1632-04

Effects of Hindlimb Unweighting on the Oxidative Stress of Thoracic Aorta in Rats*

YU Jin-wen, CAI Yue, WANG Zhong-chao, BAI Yun-gang, LIU Huan, BAO Jun-xiang, MA Jin[△]

(Key Laboratory of Aerospace Medicine Ministry of Education, Department of Aerospace Physiology,

The Fourth Military Medical University, Xi'an, China, 710032)

ABSTRACT Objective: To investigate the level of oxidative stress in tail suspended rats and the mechanism. **Methods:** 3-week tail suspended rats were adopted as the animal model of simulated microgravity. DHE fluorescent probe technique was applied to evaluate the level of superoxide anion. Colorimetry was taken to detect the MDA content. Western blot analysis was taken to compare the expression of NOX4 and p22phox between the SUS and CON groups. **Results:** Compared with CON, the level of superoxide anion enhanced significantly in SUS rats, while the content of MDA increased in SUS rats. The expression of both p22phox and NOX4 increased in SUS rats as a result of 3-week simulated microgravity. **Conclusion:** The level of oxidative stress in rats increased by 3-week simulated microgravity, and increased ROS level in tail suspended rats might associated with the enhanced expression of NADPH oxidase.

Key words: Simulated microgravity; Thoracic aorta; Oxidative stress; Rat

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R852.22 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)09-1632-04

前言

航天失重可导致航天人员返回地面后出现以立位耐力不良为主的多种症状^[1]。其发生机理涉及多重机制, 而近期的研究表明, 动脉系统的区域性重建可能在航天后立位耐力不良的发生中发挥重要作用^[2,3]。

活性氧簇(Reactive Oxygen Species, ROS)是氧化代谢的正常产物, 是重要的血管信号分子, 在血管功能调节中起着重要的作用。在高血压、动脉粥样硬化等病理状态下, ROS水平增高, 表达增强, 可导致动脉重塑和血管损伤^[4,5]。文献报道, RAS是ROS生成最重要的促进因素^[6]。本实验室前期的研究表明, 尾部悬吊大鼠局部肾素血管紧张素系统(L-RAS)活性增强^[7,8], 上述工作提示模拟失重条件下, ROS水平可能发生变化, 进而可能影响血管结构与功能的重建进程。ROS的生成途径较多,

其中线粒体呼吸链反应以及NOX家族的NADPH氧化作用被认为是最主要的途径^[9]。本实验采用DHE染色观察模拟失重下胸主动脉O₂⁻水平变化, 并观察血管MDA含量变化, 利用Western Blot观察NOX4、p22phox等蛋白的表达, 拟探讨模拟失重大鼠胸主动脉氧化应激水平的变化及其可能机制。

1 方法

1.1 实验动物与分组

雄性Sprague-Dawley大鼠20只(由第四军医大学实验动物中心提供), 在本实验室专门的动物室内适应饲养1周后, 按体重配为原则随机分为对照组(CON)、尾部悬吊模拟失重组(SUS), 每组10只。模拟失重大鼠按照我室改进的国际通用方法进行尾部悬吊3周^[10], 动物饲养与实验均遵照第四军医大学实验动物饲养和使用规定进行。

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(30971423)

作者简介: 於进文(1985-), 男, 硕士研究生, 主要研究方向: 重力与应用心血管生理学, Tel: 029-84774809, E-mail: yujinwen1985@163.com

[△]通讯作者: 马进, E-mail: jin-ma@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2011-12-07 接受日期: 2011-12-30)

1.2 仪器和试剂

BCA 蛋白定量盒、蛋白裂解液 M-PER(Pierce 美国) ,DHE (Invitrogen 美国) ,NOX4 一抗(Proteintech 美国) ,p22phox 一抗(Abcam 美国) ,ECL 发光液(Millipore 美国) ,荧光显微镜 (Olympus 日本) ,MDA 检测试剂盒(南京建成)。

1.3 标本取材

大鼠尾部悬吊 3 周后 ,取胸主动脉 ,在显微镜下去除周围结缔组织 ,截取 3mm 的血管环冰冻切片行 DHE 染色。领取部分血管用于 MDA 检测。其余动脉组织均于液氮中速冻 10 min 后置于 - 70 °C 冰箱保存。同时取大鼠后肢左侧比目鱼肌 称重。

1.4 DHE 法检测 O₂⁻ 水平

将预先分离好的血管环包埋于 Tissue-Tek O.C.T. 包埋液中 ,置于冰冻切片机中预冷 ,冰冻切片机切取 10 μm 的血管组织切片置于载玻片上 ,室温下晾干。PBS 冲洗切片 5 min 后用干液体 ,加入 DHE(10 μmol/L) ,37 °C 条件下避光孵育 30 min 后 ,荧光显微镜下观察并摄片。应用 Imagine J 软件进行图像分析。

1.5 MDA 含量测定

使用 MDA 检测试剂盒 ,按照说明书要求进行实验 ,简要步骤如下 :将血管组织置于生理盐水中匀浆 ,4 °C 离心(3 000 g, 10 min)后取上清液。蛋白定量后 ,分别取 100 μl 样本 ,加入 100 μl 试剂一、750 μl 试剂二、250 μl 试剂三 ,95 °C 加热 50 min ,冷却后离心(4 000 g, 10 min) ,分光光度计(532 nm)读取吸光度 ,运用公式计算血管 MDA 含量。

1.6 Western blot 免疫蛋白印记分析

将冻存的血管组织置于细胞裂解液中匀浆 ,4 °C 离心 (13000 g, 10 min) 后取上清液。蛋白定量后 ,采用 Invitrogen 4-12%SDS-PAGE 预制胶电泳 ,每泳道上样量 30 μg。电泳后使用 Invitrogen 半湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜 ,经 5%脱脂奶粉室温下封闭 1 h 后 ,加入抗 NOX4 p22phox 或者β-actin 一抗在 4 °C 下孵育过夜 ,洗膜后加入辣根过氧化物酶标记二抗室温下孵育 1 h ,随后使用 ECL 发光液进行发光显影 ,经凝胶成像系统扫描并分析。

1.7 统计学分析

所有数据均以 mean± SEM 表示。动物的体重、比目鱼肌重量、比目鱼肌与体重比值、NOX4、p22phox、β-actin 蛋白光密度容积值用单因素方差分析进行统计 ,以 P<0.05 作为具有统计学差异的检验水准。

2 结果

2.1 实验动物一般情况

实验期间两组动物生长良好 ,体重均持续增长 ,实验结束时悬吊组大鼠体重略低于对照组 ,但实验前后动物体重在两组间均无显著差异。与 CON 组大鼠相比 ,SUS 组大鼠比目鱼肌重量、比目鱼肌与体重比值均明显降低 (P<0.01)(表 1)。

2.2 DHE 检测 O₂⁻ 水平

与 CON 组相比 ,SUS 组大鼠胸主动脉的红色荧光明显增强 ,超氧阴离子(O₂⁻)水平明显增高。

表 1 对照组与悬吊组大鼠体重及比目鱼肌湿重变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Alterations in body weight and wet weight of soleus of CON and SUS rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

	Body weight(g)		Wet weight of soleus	
	Initial	Final	Absolute(mg)	Ratio(mg/g BW)
CON	255.4± 4.3	378.5± 3.9	147.4± 6.0	0.40± 0.00
SUS	258.1± 6.2	367.3± 6.7	70.6± 5.4*	0.20± 0.01*

Note:* P<0.01 compared with CON group

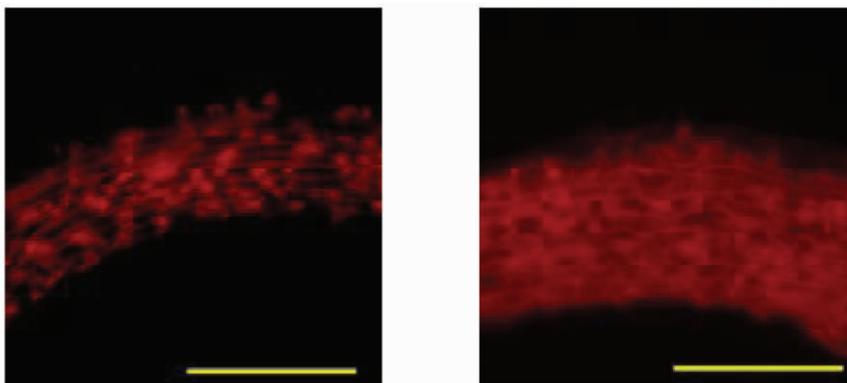


图 1 对照组与悬吊组大鼠胸主动脉超氧阴离子(O₂⁻)水平(标尺 25μm)A: CON;B: SUS

Fig.1 Fluorescence photographs of rat thoracic aorta from CON and SUS group(scale bar = 25μm)

2.3 MDA 含量测定

与 CON 组 (0.575± 0.054 nmol/mg protein) 相比 ,SUS 组 (0.849± 0.023 nmol/mg protein)大鼠胸主动脉的 MDA 含量明显增高(P<0.01)。

2.4 动脉血管 NOX4、p22phox 蛋白表达

与 CON 组相比 ,SUS 组胸主动脉的 p22phox 蛋白(图 2) 及 NOX4 蛋白(图 3)表达明显增高(P<0.05)。

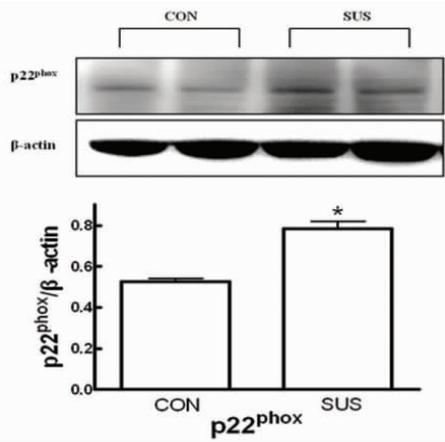


图2 对照组与悬吊组大鼠胸主动脉 p22phox 蛋白表达
($\bar{x} \pm s, n=10$) * P<0.05

Fig.2 Expression of p22phox in thoracic aorta from CON and SUS groups
($\bar{x} \pm s, n=10$) * P<0.05 ,compared

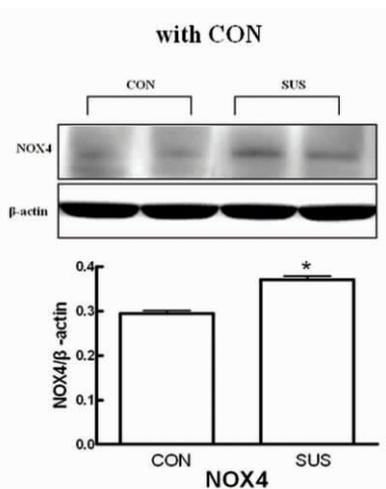


图3 对照组与悬吊组大鼠胸主动脉 NOX4 蛋白表达
($\bar{x} \pm s, n=10$) * P<0.05

Fig.3 Expression of NOX4 in thoracic aorta from CON and SUS rats
($\bar{x} \pm s, n=10$) * P<0.05, compared with CON

3 讨论

本研究通过荧光 DHE 法检测了模拟失重 3 周大鼠胸主动脉超氧阴离子水平变化,通过比色法测定丙二醛(MDA)含量的变化,通过 Western Blot 观察了模拟失重大鼠胸主动脉 NADPH 氧化酶 NOX4 和 p22phox 表达的影响。结果表明 3 周模拟失重使大鼠胸主动脉超氧阴离子水平明显增高,MDA 含量增加 p22phox 及 NOX4 蛋白表达明显增高。

目前检测组织中 O₂⁻ 的方法包括化学发光法、荧光分析法、酶学分析法和电子顺磁共振(EPR)。其中荧光分析法最常用的是 DHE,DHE 进入细胞后与 O₂⁻ 反应生成溴化乙锭,后者与细胞中的 DNA 及 RNA 结合产生红色荧光。具有特异性强,保存时间长等优点,因此被认为是检测细胞或者组织 O₂⁻ 水平的金标准。本工作通过 DHE 染色发现,模拟失重状态下,胸主动脉的 O₂⁻ 的水平较对照组明显增高。

组织内过量的 ROS 能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质发生过氧化作用,形成脂质过氧化物,如丙二醛

(MDA),脂质过氧化物通过链式反应能够放大 ROS 的作用。因此,ROS 水平增加会导致 MDA 含量增加,MDA 的含量可反映体内脂质过氧化程度和氧化应激水平。本工作通过 MDA 含量检测发现,模拟失重状态下,胸主动脉的氧化应激水平较对照组明显增高。

ROS 在血管结构与功能的调控中起着重要的作用。机体 ROS 水平的失衡将会导致机体发生结构及功能的异常。已有研究工作表明,ROS 与高血压、动脉粥样硬化、糖尿病、炎症、肥胖等疾病都有着紧密联系^[1]。尤其是在对高血压以及动脉粥样硬化的研究中发现,ROS 作为信号分子,ROS 水平的增高诱发血管炎症的发生,促进细胞的增殖与凋亡,进一步影响血管的结构与功能^[12-14]。Tuday 及 Gao F 的工作表明,模拟失重可导致胸主动脉中膜增厚,平滑肌细胞层数增加^[15,16]。结合本工作结果提示,ROS 在模拟失重条件所致胸主动脉血管结构与功能的重建中可能发挥重要作用。

几乎所有的血管组织在氧化酶的作用下都会产生 ROS,目前常见的产生途径主要包括 NADPH 氧化酶(NOX) 线粒体的呼吸链反应,黄嘌呤氧化酶(XO),一氧化氮合成酶(NOS)等,目前的研究表明,NOX 是动脉血管 ROS 重要的来源^[4,17]。在大鼠动脉血管内皮细胞、平滑肌细胞以及外膜中,NOX4 是特异性表达相对比较高的亚型之一,而 p22phox 作为一种膜蛋白,能够促进 O₂⁻ 的生成以及氧化酶的活性的增强^[18]。本实验结果表明,SUS 组 p22phox 以及 NOX4 的表达较 CON 组明显增高,提示在模拟失重状态下,NOX 系统在氧化应激的产生过程中发挥主要的作用。此外血管氧化应激的主要来源除了 NADPH 系统外,细胞线粒体电子漏,XO、NOS 在氧化应激产生中亦可能起着一定作用^[19,20],同时 NADPH 氧化酶介导的氧化应激产生过程中,各个亚型对氧化应激的产生影响不一,其他亚型诸如 NOX2 也可能在其中发挥一定的作用^[21]。

综合本实验结果,模拟失重可导致大鼠胸主动脉血管氧化应激水平增高,NADPH 氧化酶的变化与 ROS 生成有关。但其具体作用机制还有待进一步探研究,氧化应激在失重状态下对心血管系统的影响亦需进一步的大量工作以阐明。

参考文献(References)

- [1] Convertino VA, Cooke WH. Evaluation of cardiovascular risks of spaceflight does not support the NASA bioastronautics critical path roadmap[J]. Aviat Space Environ Med, 2005, 76(9): 869-876
- [2] Delp MD. Arterial adaptations in microgravity contribute to orthostatic tolerance[J]. J Appl Physiol, 2007, 102(3): 836
- [3] Danzi S, Klein I. Thyroid hormone-regulated cardiac gene expression and cardiovascular disease[J]. Thyroid, 2002, 12(6): 467-472
- [4] Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease[J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49(5): 687-706
- [5] Csanyi G, Taylor WR, Pagan PJ. NOX and inflammation in the vascular adventitia[J]. Free Radic Biol Med, 2009, 47(9): 1254-1266
- [6] Ungvari Z, Wolin MS, Csiszar A. Mechanosensitive production of reactive oxygen species in endothelial and smooth muscle cells: role in microvascular remodeling[J]. Antioxid Redox Signal, 2006, 8(7-8): 1121-1129
- [7] Bao JX, Zhang LF, Ma J. Angiotensinogen and AT1R expression in cerebral and femoral arteries during hindlimb unloading in rats [J].

- Aviat Space Environ Med, 2007, 78(9): 852-858
- [8] Zhang LF. Vascular adaptation to microgravity [J]. J Appl Physiol, 2004, 97(4): 1584-1585
- [9] Ungvari Z. High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase C-dependent activation of NAD (P) H oxidase[J]. Circulation, 2003, 108(10): 1253-1258
- [10] Ren XL. Nitric oxide synthase activity in the abdominal aorta of rats is decreased after 4 weeks of simulated microgravity [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38(10): 683-687
- [11] Hopps E. A novel component of the metabolic syndrome: the oxidative stress[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010, 20(1): 72-77
- [12] Zhu XY. Role of oxidative stress in remodeling of the myocardial microcirculation in hypertension [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(8): 1746-1752
- [13] Abdilla N. Impact of the components of metabolic syndrome on oxidative stress and enzymatic antioxidant activity in essential hypertension[J]. J Hum Hypertens, 2007, 21(1): 68-75
- [14] Furukawa S. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome[J]. J Clin Invest, 2004, 114(12): 1752-1761
- [15] Taday EC. Simulated microgravity-induced aortic remodeling [J]. J Appl Physiol, 2009, 106(6): 2002-2008
- [16] Gao F. Regional specificity of adaptation change in large elastic arteries of simulated microgravity rats[J]. Acta Physiol Hung, 2009, 96(2): 167-187
- [17] Taye A. Effect of apocynin on NADPH oxidase-mediated oxidative stress-LOX-1-eNOS pathway in human endothelial cells exposed to high glucose[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 627(1-3): 42-48
- [18] Szasz T. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function, and disease [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2007, 232(1): 27-37
- [19] Harrison R. Physiological roles of xanthine oxidoreductase [J]. Drug Metab Rev, 2004, 36(2): 363-375
- [20] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly [J]. Am J Physiol, 1996, 271(5): C1424-1437
- [21] Rueckschloss U. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2002, 22(11): 1845-1851

·重要信息·

《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红¹ 戴薇薇²

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版(ISBN 978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一部分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校7名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人13名作为国内编委,还包括国内外共40名专家参与编写。

全书共计130余万字,收录图片378幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分10章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分7章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价260元,全国各大书店有售。