

ADMA 在交感神经损毁自发性高血压大鼠中的作用

肖冰, 杨秀春, 鲁静朝, 王梦肖, 陈会强, 李玥, 郝杰, 靳雅琼, 刘凡

摘要 目的 探讨不对称二甲基精氨酸(ADMA)在交感神经损毁自发性高血压大鼠(SHR)中的作用。方法 利用化学交感神经切断术损毁SHR交感神经,分成交感神经损毁组和对照组,测量常温下鼠尾血压。采用代谢笼法收集大鼠6 h尿液,检测尿液去甲肾上腺素(NE)排泄量。HPLC法检测SHR大鼠心脏、肾脏及主动脉NE、血管中精氨酸、ADMA及对称二甲基精氨酸含量。比色法检测大鼠NO含量和NOS活性。结果 与对照组相比,交感神经损毁组尿NE排泄量及肾脏、心脏及主动脉NE含量均明显降低($P < 0.01$)。交感神经损毁组血压明显低于对照组($P < 0.01$)。与对照组相比,交感神经损毁组肾脏ADMA明显降低,NO含量及NOS明显升高($P < 0.05$)。结论 交感神经系统可能通过调控ADMA影响血压。

关键词 交感神经系统; 不对称二甲基精氨酸; 去甲肾上腺素; 自发性高血压大鼠; 一氧化氮

中图分类号 R 544

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)03-0382-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.011

不对称二甲基精氨酸(asymmetric dimethylarginine, ADMA)是内源性一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制物之一,能通过抑制一氧化氮(nitric oxide, NO)生成、增加内皮细胞与单核细胞黏附、干扰酶活性等多种机制损伤内皮细胞,从而引起高血压、冠心病等心血管事件的发生,是独立的心血管疾病的危险因素^[1-2]。

2010年, Sonmez et al^[3]对30例原发性高血压患者和30例健康对照人群进行的研究结果表明,ADMA水平与收缩压(systolic blood pressure, SBP)呈正相关性。2015年,有学者报道难治性高血压患者在肾交感神经射频消融术后,交感神经活性与两个主要的内皮甲基精氨酸,ADMA和对称二甲基精

氨酸(symmetric dimethylarginine, SDMA)明显相关^[4]。众所周知,NO在维持血管张力、调节血压方面发挥重要作用^[5],且交感神经系统在原发性高血压发病机制中扮演着重要作用^[6],然而,交感神经系统在ADMA中的作用仍然未知。因此,该研究以自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)为研究对象,观察交感神经损毁对SHR大鼠血压的影响以及心脏、肾脏及血管中精氨酸(L-Arginine, L-Arg)、ADMA、SDMA、NO及NOS的变化,以期探讨原发性高血压的发病机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 硫酸胍乙啶、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、ADMA、SDMA(美国Sigma公司); LC2010-AHT型高效液相色谱仪(日本岛津公司); 无创血压测量系统(西班牙Panlab NIBP System公司); TRIzol试剂(美国Invitrogen公司)。

1.2 化学交感神经切断术 新生SHR从出生后第7天开始皮下注射硫酸胍乙啶(50 mg/kg),连续21 d。对照组皮下注射0.9%生理盐水^[7-8]。

1.3 实验动物 健康新生雄性SHR大鼠随机分组确定为对照组和交感神经损毁组,每组5只,分别按上述方法注射0.9%生理盐水或硫酸胍乙啶。3周后断乳,给予自由饮食,分笼饲养,明暗周期为12:12,环境温度为24℃,待12周龄时将两组SHR大鼠置于24℃的代谢笼中收集尿液。

1.4 尿NE排泄量测定 采用代谢笼法收集每只大鼠常温下尿液,6 h后取出尿液,测量尿量,4℃、18 000 r/min离心5 min,吸取上清液1.5 ml,置于4℃冰箱中备用。采用高效液相色谱仪检测尿液中NE含量。

1.5 大鼠尾动脉无创性血压监测 在常温和冷应激下,分别使用Panlab NIBP System无创血压测量系统监测大鼠SBP和舒张压(diastolic blood pressure, DBP),每只大鼠测量5次,每次间隔3 min,取其平均值作为该大鼠的血压水平。

1.6 大鼠组织NE、L-Arg、ADMA及SDMA含量测定 12周龄时,分别取对照组和交感神经损毁组

2017-11-17 接收

基金项目: 河北省医学科学研究课题(编号: 20130171); 河北省自然科学基金青年科学基金(编号: H2015206442); 河北省引进留学人员资助项目(课题)(编号: C201400335)

作者单位: 河北医科大学第二医院心内二科, 石家庄 050000

作者简介: 肖冰, 男, 博士研究生;

刘凡, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者: E-mail: liufantrail@163.com

SHR 大鼠肾脏, 心脏及主动脉组织, 称重后加入 HClO_4 , 放入玻璃匀浆管内, 冰浴下匀浆, 用微型漩涡混合仪混合 2 min。将匀浆液收集于离心管中, 4°C 下 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液于 4°C 下 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 置于 -80°C 低温冻存保持。采用高效液相色谱仪检测 SHR 大鼠肾脏, 心脏及主动脉组织组织中 NE、Arginine、ADMA 和 SDMA 含量。

1.7 肾脏 NO 含量和 NOS 活性的测定 切取肾脏剥离被膜后置于冰冷的生理盐水中, 剪成小碎块, 用生理盐水冰浴下制成组织匀浆后测定 NO 含量及 NOS 活性, 酶的活性采用比色法测定。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对符合正态分布和方差齐的资料, 采用两样本均数 t 检验, 若方差不齐则采用 Satterthwaite 近似 t 检验行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 化学交感神经切断术损毁交感神经的效果

常温下, 与对照组相比, 交感神经损毁组 SHR 大鼠尿 NE 排泄量显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 8.67, P < 0.01$, 见图 1A); 与对照组相比, 交感神经损毁组 SHR 大鼠肾脏、心脏及主动脉 NE 含量均明显降低, 差异有统计学意义 ($t = 19.32, 14.71, 5.93, P < 0.01$, 见图 1B)。结果提示交感神经功能明显受损。

2.2 两组 SHR 大鼠 SBP 和 DBP 的比较 对照组 SHR 大鼠 SBP 为 (24.1 ± 0.7) kPa, DBP 为 (19.8 ± 0.7) kPa, 交感神经损毁组 SHR 大鼠 SBP 为 (21.4 ± 0.8) kPa, DBP 为 (16.6 ± 0.4) kPa, 两组相比, 差异有统计学意义 ($t = 5.76, 9.02, P < 0.01$)。见图 2。

2.3 两组 SHR 大鼠 L-Arg、ADMA 和 SDMA 水平的变化 与对照组 SHR 大鼠比较, 交感神经损毁组 SHR 大鼠肾脏 ADMA 含量明显降低, 差异有统计学意义 ($t = 5.23, P < 0.01$, 见图 3A); 然而, 两组 SHR 大鼠心脏和主动脉 ADMA 含量差异无统计学意义。与对照组 SHR 大鼠比较, 交感神经损毁组 SHR 大鼠肾脏、心脏及主动脉 SDMA、L-Arg 含量差异均无统计学意义(图 3B、C)。

2.4 两组 SHR 大鼠肾脏 NO 含量和 NOS 活性

交感神经损毁组 SHR 大鼠和对照组 SHR 大鼠比较, 肾脏 NO 含量 (2.48 ± 0.34 vs 1.64 ± 0.23)

$\mu\text{mol/g. prot}$ 及 NOS 活性 (0.84 ± 0.20 vs 0.49 ± 0.16) U/mg. prot 显著升高, 差异有统计学意义 ($t = 4.58, 3.06, P < 0.05, P < 0.01$)。

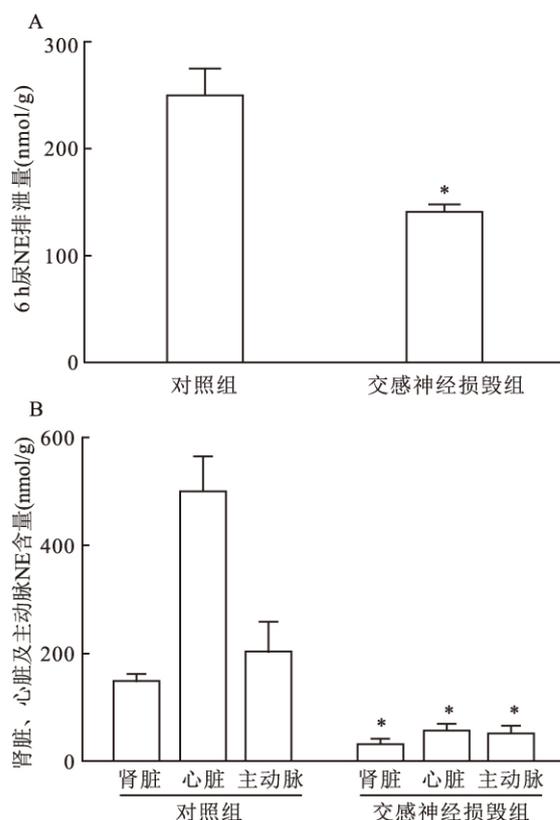


图 1 常温下两组 SHR 大鼠尿及组织去甲肾上腺素情况
A: 6 h 尿 NE 排泄量; B: 肾脏、心脏及主动脉去甲肾上腺素含量; 与对照组比较: * $P < 0.01$

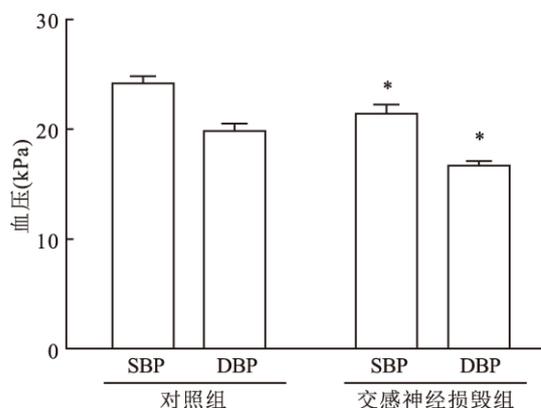


图 2 常温下两组 SHR 大鼠收缩压及舒张压情况
与对照组比较: * $P < 0.01$

3 讨论

原发性高血压为多基因遗传疾病, 其发病涉及多个机制, 其中交感神经系统和内皮功能障碍是其

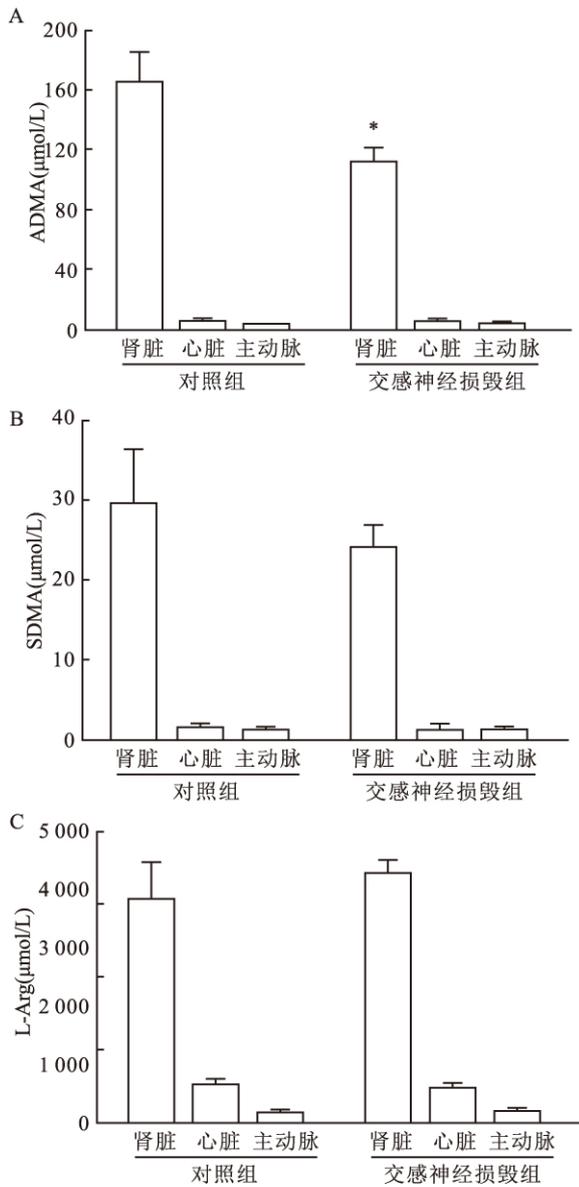


图3 常温下两组 SHR 大鼠 ADMA、SDMA 和 L-Arg 水平情况
 A: 肾脏、心脏及主动脉 ADMA 含量; B: 肾脏、心脏及主动脉 SDMA 含量; C: 肾脏、心脏及主动脉 L-Arg 含量; 与对照组比较: * $P < 0.01$

中重要的两种^[9]。交感神经系统是内皮功能的基本调节因子,其功能障碍可能影响 NO 的合成,而 NO 在维持血管张力和调节血压方面起到重要作用。ADMA 是内源性 NOS 抑制剂,能通过竞争性结合 NOS 的活化部位影响 NO 的生成,引起内皮功能障碍。但是,ADMA 与交感神经系统之间的关系仍然未知。

实验结果表明交感神经损毁 SHR 大鼠肾脏 NE 含量明显低于对照组,而肾脏 ADMA 含量明显高于对照组;与此同时,交感神经损毁 SHR 大鼠心脏及

主动脉 NE 含量明显低于对照组,而心脏及主动脉 ADMA 含量却未见明显异常,表明交感神经系统对 ADMA 的作用主要体现在肾脏。交感神经损毁组 SHR 大鼠肾脏 NO 含量及 NOS 活性较对照组 SHR 大鼠明显增加,而 SBP 和 DBP 明显降低,表明交感神经活性降低可能引起 ADMA 释放减少,NOS 活性增加,NO 合成升高,从而影响血压。但是,根据目前的研究,ADMA 与交感神经系统之间的关系(例如:ADMA 可能导致交感神经活性增高或交感神经活性增高可能导致 ADMA 增高)依然尚不清楚。首先,交感神经活性增高可能引起 ADMA 释放增加。Hijmering et al^[10] 研究报道,在健康人中,交感神经激活明显降低血管内皮依赖性血管舒张。其次,ADMA 可通过抑制 NOS 使 NO 合成减少可能导致 NE 释放增加,引起交感神经活性增高。Schwarz et al^[11] 研究发现,NO 抑制大鼠心脏交感神经末梢 NE 释放。Costa et al^[12] 报道了单甲基精氨酸抑制 NO 合成引起人骨骼肌 NE 释放增加。因此,ADMA 和交感神经系统的关联机制不一定是排他性的。

ADMA 是在蛋白精氨酸甲基转移酶(protein arginine methyltransferases, PRMT) 的催化下,以 S-腺苷甲硫氨酸为甲基供体,使蛋白质多肽链中的 L-精氨酸残基甲基化水解释放而来,包括 ADMA 和 SDMA, PRMT1 催化生成 ADMA,而 PRMT2 催化生成 SDMA^[13]。大部分的 SDMA 经肾脏排出体外,而 ADMA 只有少部分通过肾脏排出。80% 的 ADMA 在甲基精氨酸二甲胺水解酶和丙氨酸乙醛酸转氨酶 2 的作用下代谢^[4,14]。交感神经损毁 SHR 中 ADMA 升高,究竟是 PRMT1 表达增强或是甲基精氨酸二甲胺水解酶和丙氨酸乙醛酸转氨酶 2 表达降低或是肾脏肌酐清除率降低所致,这些都是值得进一步探讨的问题。

Speer et al^[15] 报道了 SDMA 可能通过调节高密度脂蛋白胆固醇分子等多种机制干扰内皮功能,且 SDMA 可能与交感神经系统相关,所以实验中观察了 SDMA 与交感神经系统的关系,结果提示与对照组 SHR 大鼠比较,交感神经损毁组 SHR 大鼠肾脏、心脏及主动脉 SDMA 含量均未见明显差异。

综上所述,通过化学交感神经切断术损毁交感神经,SHR 大鼠肾脏 ADMA 含量明显降低,NOS 活性及 NO 含量明显增加,血压明显增加,表明交感神经系统可能通过调控 ADMA 影响血压,但交感神经系统与 ADMA 之间的作用机制尚不清楚,仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Tain Y L, Huang L T. Restoration of asymmetric dimethylarginine-nitric oxide balance to prevent the development of hypertension [J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(7): 11773–82.
- [2] Wilcox C S. Asymmetric dimethylarginine and reactive oxygen species: unwelcome twin visitors to the cardiovascular and kidney disease tables [J]. *Hypertension*, 2012, 59(2): 375–81.
- [3] Sonmez A, Celebi G, Erdem G, et al. Plasma apelin and ADMA Levels in patients with essential hypertension [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2010, 32(3): 179–83.
- [4] Grassi G, Seravalle G, Trevisan F Q, et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginine and sympathetic nerve traffic after renal denervation in patients with resistant hypertension [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015, 10(9): 1560–7.
- [5] 刘忠玉, 李辰, 黄榕, 等. 超敏C反应蛋白与维吾尔族老年单纯收缩期高血压患者血管内皮功能的相关性 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(3): 338–42.
- [6] 邹坤, 李艳, 王烈成, 等. 室旁核中活性氧在高血压大鼠交感神经活动过度增强中的作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(7): 753–7.
- [7] Bareis D L, Morgan R E, Lau C, et al. Maturation of sympathetic neurotransmission in the rat heart. IV. Effects guanethidine-induced sympathectomy on neonatal development of synaptic vesicles, synaptic terminal function and heart growth [J]. *Dev Neurosci*, 1981, 4(1): 15–24.
- [8] 刘延青. 胍乙啶交感神经阻滞治疗复杂性局部疼痛综合征 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2004, 10(1): 13–4.
- [9] Ramchandra R, Barrett C J, Malpas S C. Nitric oxide and sympathetic nerve activity in the control of blood pressure [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005, 32(5–6): 440–6.
- [10] Hijmering M L, Stroes E S, Olijhoek J, et al. Sympathetic activation markedly reduces endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 39(4): 683–8.
- [11] Schwarz P, Diem R, Dun N J, et al. Endogenous and exogenous nitric oxide inhibits norepinephrine release from rat heartsympathetic nerves [J]. *Circ Res*, 1995, 77(4): 841–8.
- [12] Costa F, Christensen N J, Farley G, et al. NO modulates norepinephrine release in human skeletal muscle: implications for neural preconditioning [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001, 280(5): R1494–8.
- [13] Boger R H, Sydow K, Borlak J, et al. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases [J]. *Circ Res*, 2000, 87(2): 99–105.
- [14] 呼晓雷, 周继朋, 陈小平. AGXT2 与 ADMA 代谢及心脑血管疾病的研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(5): 601–5.
- [15] Speer T, Rohrer L, Blyszczuk P, et al. Abnormal high-density lipoprotein induces endothelial dysfunction *via* activation of Toll-like-receptor-2 [J]. *Immunity*, 2013, 38(4): 754–68.

Effect of ADMA in sympathectomized spontaneously hypertensive rat

Xiao Bing, Yang Xiuchun, Lu Jingchao, et al

(Dept of Cardiology, The Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000)

Abstract Objective To explore the role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in sympathectomized spontaneously hypertensive rat (SHR). **Methods** SHR pups were pharmacologically sympathectomized to investigate the role of sympathetic activity on ADMA. Systolic and diastolic blood pressure was monitored by tail-cuff method. Urine norepinephrine (NE) excretion of 6 hours collected using metabolic cages was detected. The levels of L-Arginine, ADMA, symmetric dimethylarginine and NE were evaluated in kidneys, heart and aorta in SHR by HPLC. No content and NOS activity in SHR kidney were determined by colorimetry. **Results** Neonatal chemical sympathectomy elicited a marked reduction of urinary NE excretion and NE contents in kidneys, heart and aorta and in the sympathectomized SHR compared with the sympathetically-intact SHR ($P < 0.01$). Sympathectomy resulted in a reduction of systolic blood pressure and diastolic blood pressure in 12 week old SHR compared with the sympathetically-intact SHR ($P < 0.01$). The sympathectomized SHR had a significant lower renal ADMA content than the sympathetically-intact SHR, moreover, the levels of NO content and NOS activity increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Sympathetic nerve system may regulate blood pressure by ADMA.

Key words sympathetic nerve system; ADMA; NE; SHR; NO