

## 褪黑素减轻吸烟大鼠颈动脉的氧化损伤

杨根欢, 汪岩, 廖鹏志, 贾玉龙\*

(首都医科大学附属北京天坛医院 血管外科, 北京 100070)

**摘要:**目的 探讨褪黑素能否减轻吸烟大鼠颈动脉的氧化损伤。方法 将20只大鼠随机分为对照组、吸烟组(建立大鼠吸烟模型)和褪黑素(5 mg/kg)干预组。7 d后取颈动脉, 荧光探针 2', 7'-DCFH-DA 检测颈动脉内活性氧(ROS)含量; Western blot 检测颈动脉内 NF- $\kappa$ B、eNOS、MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达。结果 吸烟能明显诱导大鼠颈动脉内 ROS 的增加( $P < 0.01$ ); 褪黑素干预组 ROS 含量明显回降( $P < 0.01$ ); 吸烟组颈动脉内 eNOS 的表达明显低于对照组( $P < 0.01$ ); 褪黑素干预组颈动脉内 eNOS 的表达明显回升( $P < 0.01$ ); 吸烟组颈动脉内的 NF- $\kappa$ B、MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达明显高于对照组( $P < 0.01$ ); 褪黑素干预组的 NF- $\kappa$ B、MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达明显回降( $P < 0.05$ )。结论 吸烟能明显诱导大鼠颈动脉内 ROS 的增多及氧化损伤, 褪黑素能通过 NF- $\kappa$ B 通路减轻吸烟大鼠颈动脉的氧化损伤。

**关键词:** 褪黑素; 吸烟; 氧化损伤; 颈动脉

中图分类号: R363 文献标志码: A

## Melatonin attenuates the oxidative injury of smoking rat carotid arteries

YANG Gen-huan, WANG Yan, LIAO Peng-zhi, JIA Yu-long\*

(Department of Vascular Surgery, Beijing Tian Tan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100070, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of melatonin on oxidative injury of rat carotid arteries after balloon injury. **Methods** Twenty male sprague-dawley rats were randomized into control, melatonin, smoking, and smoking plus melatonin. An established protocol of smoking was carried out. The carotid arteries were collected 7 days later. The average content of ROS was measured. And Western blot was used to detected the expression of NF- $\kappa$ B, MCP-1, VCAM-1 and ICAM-1. **Results** Smoking significantly induced the increase of ROS and the expression of NF- $\kappa$ B, MCP-1, VCAM-1 and ICAM-1 in rat carotid arteries. Moreover, cigarette smoke exposure inhibited the expression of eNOS. Melatonin minimized the effect resulted from smoking. **Conclusions** Melatonin may attenuate the the oxidative injury and the expression of inflammatory mediators in rat carotid arteries resulted from smoking.

**Key words:** melatonin; smoking; oxidative injury; carotid artery

吸烟是一严重危害人类健康的社会行为,目前中国人口中吸烟者所占比例较大。吸烟是导致动脉粥样硬化相关性疾病的重要原因之一,它能够引起冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑梗死及动脉硬化闭塞症等<sup>[1]</sup>。研究表明吸烟可以通过一系列复杂的机制引起血管内

皮的氧化损伤,进而导致心血管疾病的发生<sup>[2]</sup>。褪黑素在人体内广泛分布,是一高效的抗氧化剂,具有保护血管内皮细胞的作用<sup>[3]</sup>。本研究阐明了褪黑素能够降低吸烟大鼠颈动脉内的活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量,进而减轻其氧化损伤。

## 1 材料与方

### 1.1 动物及试剂

SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只,平均体质量 350 g [北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号: SCXK(京) 20120001];褪黑素(Sigma-Aldrich 公司);荧光探针 2',7'-DCFH-DA 试剂盒(Beyotime Institute of Biotechnology 公司);香烟(焦油 13 mg/支,尼古丁 1.2 mg/支);NF- $\kappa$ B 抗体、eNOS 抗体(CST 公司);MCP-1 抗体(Santa Cruz 公司);ICAM-1 抗体、VCAM-1 抗体(博士德生物工程有限公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 大鼠的分组和处理:将大鼠随机分为对照组(control)、吸烟组(smoking;每天定时置于香烟烟雾暴露装置中,每天共暴露于 10 支香烟烟雾中)和褪黑素(melatonin;皮下注射,5 mg/kg,每日 1 次)干预组,每组 5 只。

1.2.2 大鼠颈动脉中 ROS 含量的检测:7 d 后将各组大鼠颈动脉取出,马上用无菌 0.9% 氯化钠溶液冲洗干净。将颈动脉置入内皮细胞培养基稀释的 2',7'-DCFH-DA(1:3 000)中,37 °C、5%的 CO<sub>2</sub> 中孵育 20 min。将颈动脉用无血清的培养基冲洗 3 次后,置入盛有培养基的培养皿中。于小动物活体成像系统(IVIS Spectrum Imaging System)中定量检测其荧光强度并拍照。

1.2.3 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B、eNOS、MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 蛋白的表达:将 600  $\mu$ L 的 SDS 组织裂解液加入保存于液氮中的大鼠颈动脉,于研钵中研磨成匀浆。常规方法进行组织蛋白的提取及蛋白浓度的测定。将总量为 20  $\mu$ g 的蛋白上样,于 120 V 恒压下电泳约 90 min,320 mA 恒流下进行转膜,室温下用 5% 的脱脂牛奶封闭 60 min,4 °C 下一抗孵育 12 h(NF- $\kappa$ B 1:2 000;eNOS 1:2 000;MCP-1 1:2 000;ICAM-1 1:500;VCAM-1 1:500),TBST 洗膜 3 次后于室温下行二抗(1:5 000)孵育 1 h,用辣根过氧化物酶化学发光法检测目标蛋白的表达。用 Alpha EaseFC system 软件(Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA)分析 Western blot 的实验结果,测量出目标蛋白以及内参的吸光度值,将其比值进行统计分析。

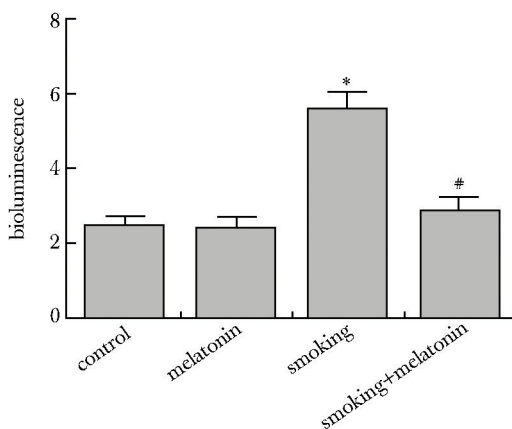
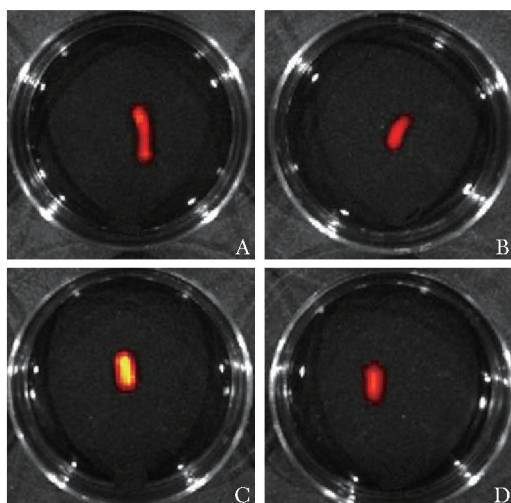
### 1.3 统计学分析

应用 SPSS17.0 统计软件进行统计学分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两样本均数间的比较应用 *t* 检验,多样本均数间的比较应用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 各组实验大鼠的颈动脉内 ROS 的含量

吸烟组大鼠颈动脉内 ROS 含量显著高于对照组( $P<0.01$ ),褪黑素干预组大鼠颈动脉内 ROS 含量显著回降( $P<0.01$ )(图 1)。



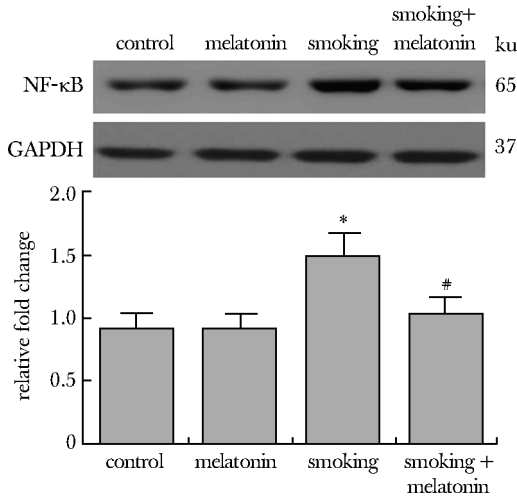
A. control; B. melatonin; C. smoking; D. smoking+melatonin; \* $P<0.01$  compared with melatonin or control; # $P<0.01$  compared with smoking

图 1 各组实验大鼠的颈动脉内活性氧的含量

Fig 1 Content of ROS in the carotid artery of various groups( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

## 2.2 各组实验大鼠的颈动脉内 NF- $\kappa$ B 的表达情况

吸烟组大鼠的颈动脉内 NF- $\kappa$ B 表达显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 褪黑素干预组颈动脉内 NF- $\kappa$ B 表达显著回降 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。



\* $P < 0.01$  compared with melatonin or control group;

# $P < 0.05$  compared with smoking group

图 2 各组实验大鼠的颈动脉内 NF- $\kappa$ B 的表达

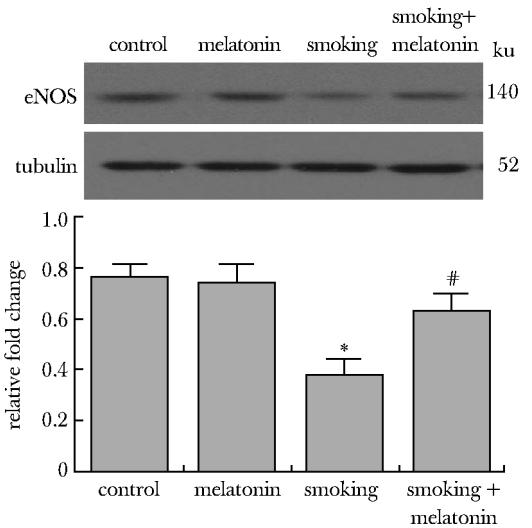
Fig 2 Expression of NF- $\kappa$ B in the carotid artery of various groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

## 2.3 各组实验大鼠的颈动脉内 eNOS 的表达情况

吸烟组大鼠的颈动脉内 eNOS 表达显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 褪黑素干预组颈动脉内 eNOS 表达显著回升 ( $P < 0.01$ ) (图 3)。

## 2.4 各组实验大鼠的颈动脉内 MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达情况

吸烟组大鼠颈动脉内的 MCP-1、VCAM-1 和



\* $P < 0.01$  compared with melatonin or control; # $P < 0.01$  compared with smoking

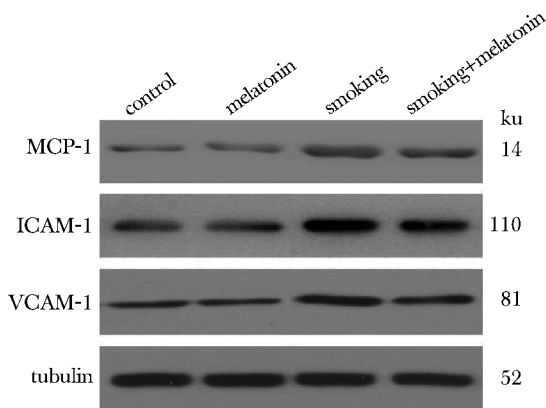
图 3 各组实验大鼠的颈动脉内 eNOS 的表达

Fig 3 Expression of eNOS in the carotid artery of various groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

ICAM-1 表达显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 褪黑素干预组颈动脉内 MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 表达显著回降 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。

## 3 讨论

吸烟是引起血管损伤最重要的原因之一。香烟烟雾中包含 5 000 多种有毒有害的化学物质, 比如一氧化碳、氮氧化物、活性氧和羟基化合物等<sup>[4]</sup>。从物理性状上讲, 香烟烟雾可以分为气体性的香烟烟雾和颗粒性的香烟烟雾<sup>[5]</sup>。研究发现, 水溶性的



\* $P < 0.01$  compared with melatonin or control; # $P < 0.05$  compared with smoking

图 4 各组实验大鼠的颈动脉内 MCP-1、ICAM-1、VCAM-1 的表达

Fig 4 Expression of MCP-1, ICAM-1 and VCAM-1 in the carotid artery of various groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

毒性物质在香烟烟雾中占很大的比例,这些毒性物质能够通过肺的气体交换而进入人体的血液循环中,从而损伤人体的组织和细胞,而氧化损伤便是其中非常重要的一种<sup>[6]</sup>。有研究表明,吸烟可以降低人体的抗氧化能力,吸烟者血浆中的抗氧化物质明显低于非吸烟者<sup>[7]</sup>。抗氧化剂维生素 C 能够明显改善吸烟者的血管内皮功能<sup>[8]</sup>。褪黑素能够被人体内的很多组织器官合成和分泌,它的分子质量小且脂溶性高,可以自由通过细胞膜而到达几乎所有的细胞和亚细胞结构<sup>[9]</sup>。研究发现褪黑素在细胞中能够发挥重要的抗氧化和抗感染作用,在多种血管疾病中具有重要的保护作用<sup>[10]</sup>。

本研究中,给予实验大鼠香烟烟雾暴露后,其颈动脉内的活性氧显著增多,而注射褪黑素后颈动脉内的活性氧明显减少。这表明香烟烟雾能够对血管造成氧化损伤。进一步的结果显示,香烟烟雾能够诱导实验大鼠颈动脉内的 NF- $\kappa$ B、MCP-1、VCAM-1 和

ICAM-1 蛋白的表达,而应用褪黑素后这些蛋白的表达水平显著降低。这说明 NF- $\kappa$ B、MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 参与了吸烟引起血管氧化损伤的过程。目前已有研究表明 NF- $\kappa$ B、MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 作为重要的细胞因子不但介入炎症反应,而且是细胞氧化损伤过程中的关键参与者<sup>[4,11]</sup>,这与本研究的结果相符。而 NF- $\kappa$ B 作为核心炎症因子则可以诱导 MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达<sup>[12]</sup>。结合本研究结果,可以推测褪黑素能够通过抑制 NF- $\kappa$ B、MCP-1、VCAM-1 和 ICAM-1 的表达进而减轻吸烟引起的大鼠颈动脉的氧化损伤。同时本实验尚对血管内源性的保护因子 eNOS 进行了研究,发现吸烟能够明显抑制 eNOS 的表达,而应用褪黑素则可使 eNOS 回升。已有研究表明,在心血管疾病的氧化应激的病理生理过程中,eNOS 能够发挥重要的保护作用<sup>[13]</sup>。综上,本研究提示褪黑素在减轻吸烟引起的血管氧化损伤方面具有潜在的临床应用价值。

## 参考文献:

- [1] Kohashi K, Nakagomi A, Morisawa T, *et al.* Effect of smoking status on monocyte tissue factor activity, carotid atherosclerosis and long-term prognosis in metabolic syndrome[J]. *Circ J*, 2018, 82: 1418-1427.
- [2] Wang Z, Wang D, Wang Y. Cigarette smoking and adipose tissue: the emerging role in progression of atherosclerosis[J]. *Inflamm*, 2017, 2017: 3102737. doi: 10.1155/2017/3102737.
- [3] Zhao D, Yu Y, Shen Y, *et al.* Melatonin synthesis and function: evolutionary history in animals and plants[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10:249-256.
- [4] Thielen A, Klus H, Muller L. Tobacco smoke: unraveling a controversial subject [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2008, 60: 141-156.
- [5] Pryor WA, Stone K, Zang LY, *et al.* Fractionation of aqueous cigarette tar extracts: fractions that contain the tar radical cause DNA damage[J]. *Chem Res Toxicol*, 1998, 11: 441-448.
- [6] Orosz Z, Csiszar A, Labinskyy N, *et al.* Cigarette smoke-induced proinflammatory alterations in the endothelial phenotype: role of NAD(P)H oxidase activation[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292: 130-139.
- [7] Karademirci M, Kutlu R, Kilinc I. Relationship between smoking and total antioxidant status, total oxidant status, oxidative stress index, vit C, vit E [J]. *Clin Respir J*, 2018, 12: 2006-2012.
- [8] Heitzer T, Just H, Munzel T. Antioxidant vitamin C improves endothelial dysfunction in chronic smokers [J]. *Circulation*, 1996, 94: 6-9.
- [9] Menendez-Pelaez A, Reiter RJ. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization[J]. *J Pineal Res*, 1993, 15: 59-69.
- [10] Hung MW, Kravtsov GM, Lau CF, *et al.* Melatonin ameliorates endothelial dysfunction, vascular inflammation, and systemic hypertension in rats with chronic intermittent hypoxia[J]. *J Pineal Res*, 2013, 55: 247-256.
- [11] Bowie A, O'Neill LA. Oxidative stress and nuclear factor-kappaB activation: a reassessment of the evidence in the light of recent discoveries[J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 59: 13-23.
- [12] Yang GH, Li YC, Wang ZQ, *et al.* Protective effect of melatonin on cigarette smoke-induced restenosis in rat carotid arteries after balloon injury[J]. *J Pineal Res*, 2014, 57: 451-458.
- [13] Rochette L, Lorin J, Zeller M, *et al.* Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 140: 239-257.