

43

助成番号 0043

神経性 nNOS 活性および脳室内 nNOS 特異的阻害剤投与による、食塩感受性高血圧自律神経調節異常の病態解析

助成研究者：西田 育弘 (防衛医科大学校 生理学第二講座)
 共同研究者：堀内 城司 (防衛医科大学校 生理学第二講座)
 晝間 恵 (防衛医科大学校 生理学第二講座)

一酸化窒素合成酵素 (NOS) は中枢神経系に広く分布し、これを阻害すると末梢交感神経活動に影響することから、神経性 NO の中枢神経機能に注目が集まった。しかしこの阻害効果は、圧受容器反射により強くマスク・修飾されるため、亢進するのか、抑制するのかさえ明確でなく、その機能は不明であった。一方、食塩感受性高血圧実験モデル動物である Dahl 食塩感受性 (S) ラットでは L-Arginine-Nitric Oxide 系に異常が認められ、神経性 NO 機能の異常が推測された。前回の平成11年度助成研究では、神経性 NOS (nNOS) 阻害剤である 7-nitroindazole (7NI) の全身投与により、高血圧 S ラットの緊張性交感神経活動、特に圧受容器反射性抑制がかかる前段階での交感神経活動が顕著 (約 2.8 倍) に亢進する、よって神経性 NO は交感神経を抑制的に調節する、などが示された。このことは高血圧 S ラットの脳内 nNOS 活性は亢進していることを意味する。しかし、7-NI は nNOS への特異性にかけること、阻害剤を全身投与したのでは交感神経を抑制する組織が特定できない、など、研究成果からの判断に限界が認められた。さらに、血管、心臓、腎臓など脳以外の臓器では NOS 活性が低下しているとの報告と矛盾する。これらを明確にするために、本研究では、nNOS に特異性の高い新たな阻害 (S-methyl-L-thiocitrulline, SMTC) を脳室内に投与し交感神経への影響を検討するとともに、脳内の nNOS 活性および酵素タンパク量を検討した。【方法】S 及び食塩抵抗性ラットに、正常食塩または高食塩食を4週間負荷した (4実験動物群)。負荷後断頭にて脳幹を摘出し、ホモジナイズした後 2' 5'-ADP-sepharose にて nNOS を部分精製・抽出した。nNOS 酵素活性は、トリチウム化 L-Arginine を用いたシトルリン法に従い充分量 nNOS 阻害剤の有無の較差にて測定した。酵素蛋白量は、抗 nNOS 抗体を用いた Western Blot 法で同定し ECL 化学発光法にて定量した。2群の S ラットには平成11年度助成研究と同様な方法で実験用カテーテルや電極を埋め込んだ。実験は、人工脳脊髄液 (100 μ l)、SMTC (50 nmole)、L-Arginine (1000 nmole) の各脳室内投与前後に、前回と同様な方法にて安静時腎交感神経活動 (resting RSNA) と圧受容器徐負荷時腎交感神経活動 (BR-unloaded RSNA) を測定した。【結果】高食塩食 S ラットの脳幹 (n=16) では、nNOS 活性が有意に高かった。同脳幹 (n=4) では、nNOS 酵素蛋白量も他群に比べ約 2.1 倍高かった。高食塩食 S ラットでは、SMTC の脳室内投与により resting RSNA は $24 \pm 3\%$ から $34 \pm 4\%$ へ、BR-unloaded RSNA は $100 \pm 2\%$ から $199 \pm 12\%$ へ、それぞれ増加した。続く L-Arginine 脳室内投与により、resting RSNA は $16 \pm 5\%$ へ、BR-unloaded RSNA は $78 \pm 13\%$ へそれぞれ低下した。【結論】食塩感受性高血圧ラットでは、脳幹部 nNOS 活性も酵素蛋白量も、いずれも正常血圧群より高値を示した。また、nNOS に特異性の高い阻害剤の脳室内投与にても、前回の助成研究で用いた 7-nitroindazole 全身投与と同方向性の結果を得た。これらの結果から、食塩感受性高血圧ラットでは、中枢神経における神経性 NO を介する交感神経抑制機構が非常に強く発達していることが示され、中枢神経における神経性 NO の交感神経抑制機能が同定された。

8

助成番号 0043

脳内 nNOS 活性および脳室内 nNOS 特異的阻害剤投与による、食塩感受性高血圧自律神経調節異常の病態解析

助成研究者：西田 育弘 (防衛医科大学校 生理学第二講座)
 共同研究者：堀内 城司 (防衛医科大学校 生理学第二講座)
 晝間 恵 (防衛医科大学校 生理学第二講座)

1. 研究目的

昨年度の貴財団研究助成に支えられた、『食塩感受性高血圧にみられる神経性 NO による交換神経活動調節異常』の研究により、食塩感受性高血圧では i) 神経性一酸化窒素合成酵素 (nNOS) を抑制すると交換神経活動が増加する、なかでも、圧受容器反射性に抑制される前段階の交換神経活動はおよそ 3 倍にも増大する、ii) その交換神経活動の増大は高食塩負荷の影響が強いほどより増大している、という結果が、Dahl 食塩感受性ラットの無麻酔・無拘束実験で得られた。これは、脳内神経性 NO が交換神経活動調節の強力な新しい因子であること、高食塩負荷により脳内 nNOS が強力に誘導されること、そして、食塩感受性高血圧では高血圧を緩和するよう代償性に機能していることを示唆した(1)。

しかし、これらの結論を出すには、解決せねばならない問題が 3 点ある。

- i) 実験に使用した nNOS 阻害剤、7-nitroindazole は、その阻害剤としての nNOS に対する特異性に欠ける、という報告がなされている(2,3)。従って、nNOS に限らず、内皮型 NOS や誘導型 NOS による抑制の可能性もあるのではないか、という批判が免れない。
- ii) 阻害剤を全身投与したのではその標的臓器が特定出来ず、交換神経抑制に携わる組織が脳であるとは限定し難い。従って、交換神経抑制機構は脳内で生じているとは結論できない。
- iii) Dahl ラットの血管では内皮型 NOS(4、5)や誘導型 NOS(5)が、腎臓では nNOS(6)が、心臓では誘導型 NOS(5)が、それぞれ酵素の組織含有が低下していると報告がなされており、これらと完全に矛盾する。

こういった問題点を総合すると、昨年度の研究結果は、7-nitroindazole という薬剤でのみ発生する特殊な現象ではないか、との見方も可能である。

本研究の目的は、これらの問題点を解決するために、(i) 脳内 nNOS 活性および nNOS 酵素蛋白量を定量する、(ii) nNOS 機能を選択的に抑制する目的で、神経性 NOS への特異性に優れた新たな阻害剤、S-methyl-L-thiocitrullin (SMTC) (7,8,9) を用いる、(iii) 投与方法として脳室内投与方法を用いる、の 3 点を行い、昨年度助成研究で得られた仮説を証明することである。

2. 研究方法

実験は、脳内 nNOS 活性およびその酵素蛋白量の測定と、nNOS 特異的阻害剤である SMTC の脳室内投与による交換神経反応の測定、の 2 部からなる。

2.1 脳内 nNOS 活性・酵素蛋白量の測定

Dahl 食塩感受性(S)ラットに高食塩食(8% NaCl 含有、S 8%群、n = 20)または正常食塩食(0.4% NaCl 含有、S 0.4%群、n = 20)を、また Dahl 食塩抵抗性(R)ラットに高食塩食(R 8%群、n = 20)または正常食塩食(R 0.4%群、n = 20)を、それぞれ 8 週齢から 12 週齢に渡って 4 週間投与し、4 群の実験群を作成した。負荷終了

後、ラットを断頭し脳幹を摘出し、生理食塩水で洗浄後液体窒素で凍結後、 -80°C にて保存した。

脳幹組織 nNOS 活性の測定： 凍結組織を、50mM HEPES, pH 7.7 緩衝液 (0.2 mM EDTA, 0.2mM EGTA, 5 μM BH₄, 0.1mM DTT, 0.2mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin を含有) の 25% W/V 量に入れ、 4°C にてテフロンガラスホモジナイザーにてホモジナイズした。このホモジネートを 15,000xg・15 分間で 2 回超遠心し、その上精液から 2' 5'-ADP Sepharose を用いた nNOS の部分精製・抽出を行った。抽出には 10mM NADPH 含有上記 HEPES 緩衝液を用いた。部分精製した nNOS 分画の蛋白量は、Bradford 法に従って測定した。nNOS 酵素活性の測定には、トリチウム化 L-Arginine (77 Ci/mmol) を用いたシトルリン法に従った。反応液には、10 μM L-Arginine, 100 μM NADPH, 0.2mM CaCl₂, 0.1 μM calmodulin, 10 μM BH₄, 1 μM FAD, 1 μM FMN 含有 50 mM HEPES, pH 7.4 を用い、 30°C ・5 分間の反応時間後冷却ストップ液 (10 mM sodium acetate, pH 5.5, 2mMEDTA, 0.2mM EGTA, 1mM citrulline) にて反応を止め、Dowex AG50W-X8 にて未反応基質を除去した後、酵素反応で形成されたトリチウム化 citrulline をシンチレーションカウンターにて計測した。組織酵素活性量は、カウンターによる計測値を Bradford 法で求めた蛋白量で除した、比活性値 (cpm/min/ μg) にて表示した。

脳幹組織 nNOS 酵素蛋白量の測定： 凍結組織を、5mM リン酸カリウム, pH 7.7 緩衝液 (0.25M sucrose, 1mM EDTA, 0.1mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin を含有) の 15% W/V 量に入れ、 4°C にてテフロンガラスホモジナイザーでホモジナイズした。ホモジネートを 15,000xg・15 分間で 2 回超遠心し、その上精液を測定に用いた。上精液に含まれる蛋白量は Lowry 法に従って測定した。nNOS 酵素蛋白量の測定には Western Blot 法を用いた。一次抗体にはラビット抗 nNOS 抗体を、二次抗体にはビオチン化した抗ラビット IgG 抗体を用いた。Hybond-ECL 膜上に残留したビオチンを Streptavidin-HRP と反応させた後、ECL 法にて蛍光化し、オートケミルミノグラフィ法にて映像化した。映像化されたバンドの濃度をデンシトメーターで定量し、NIH image program にて相対的光学的濃度として数値化 (無単位) で表示した。

2.2 SMTC 脳室内投与による交感神経反応の測定

Dahl 食塩感受性ラットに高食塩食 (8% NaCl 含有、S 8%群、n=5) または正常食塩食 (0.4% NaCl 含有、S 0.4%群、n=4) を、それぞれ 8 週齢から 12 週齢に渡って 4 週間投与し、2 群の実験群を作成した。

この食塩負荷期間中、ネンブータル麻酔下に開胸手術を無菌的に行い、下大静脈へ血管閉塞するためのオクルーダーを装着した、同時に脳固定装置を用い右側脳室に脳室内カテーテルを留置し頭蓋骨に固定した。実験 2 日前、再度ネンブータル麻酔下に、動静脈カテーテルおよび腎交感神経電極を埋め込み、各種カテーテルや電極の他端は皮下を通し、後頸部より出した。

実験当日、ラットを飼育ケージごとシールドボックス内に移し、ラットが安静化するのを待って意識下かつ無拘束下で以下の実験を行った。神経活動測定用電極は交感神経計測機に、動脈カテーテルは圧トランスデューサーに各々接続し、腎交感神経活動 (RSNA)、動脈圧 (AP)、平均動脈圧 (MAP)、瞬時心拍数 (HR) を測定した。これらのデータはアナログレコーダーに記録すると共に、デジタル変換し (サンプリング速度: 100Hz) コンピュータに記録した。安静時コントロールデータ

を記録した後、下大静脈閉塞用オクルーダー・カテーテルに生食入りのシリンジを接続し、シリンジ・ポンプでゆっくり注入して動脈圧をランプ状に低下させた。これにより、動脈圧および右心房圧を下げ、圧受容器からの信号を微小にし、圧受容器反射性交感神経抑制を解除した時の RSNA (BR-unloaded RSNA) を計測した。静脈カテーテルにはフェニレフリン (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を接続し、動脈圧上昇により RSNA のゼロレベルを確認した。血圧と心拍数も同時に記録した。これらの操作を、コントロール期、人工脳脊髄液脳室内投与 (aCSF、100 μl を 2 分間でゆっくり注入) 後、nNOS 特異的阻害剤である SMTC の脳室内投与 (シグマ社、50 nmole を 100 μl aCSF に溶解、2 分間でゆっくり注入) 後、および SMTC 作用をブロックする目的で L-Arginine の脳室内投与 (1000 nmole を 100 μl aCSF に溶解、2 分間でゆっくり注入) 後、のそれぞれに行った。

RSNA はコントロールフェーズの BR-unloaded RSNA 値を 100% として、各ラット毎に相対値 (%) で表示した。また、各測定値は平均値 \pm 標準誤差で表示した。統計には、1 変数を 4 群間、または脳室内投与薬剤の種類 (3 種類) 間で比較する時には one-way ANOVA および Fisher's PLSD を、1 変数を 2 群間で比較する時には unpaired t-test を、それぞれ用いた。

3. 研究結果

3.1 脳内 nNOS 活性・酵素蛋白量

脳幹部組織から nNOS を部分精製しその比活性を 4 群間で比較すると、S8% 群の脳幹部 nNOS 活性 (2753 \pm 207 cpm/min/ μg) が他群 (S0.4% 群は 2157 \pm 127 cpm/min/ μg 、R8% 群は 2277 \pm 35 cpm/min/ μg 、R0.4% 群は 2174 \pm 102 cpm/min/ μg) に比して有意に高値を示した (Fig. 1)。

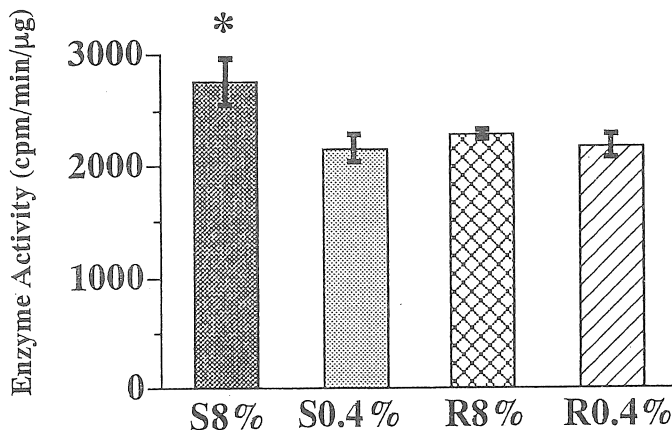


Fig. 1. Brain stem nNOS activity in the S8%, S0.4%, R8% and R0.4% rat-groups. $n=16$ for each group. *, $p<0.05$ between the 4 rat-groups.

脳幹部組織中の nNOS 酵素蛋白量は、S8% 群ラットでは 1622 \pm 122、S0.4% 群で

は 769 ± 26 、R8%群では 647 ± 117 、R0.4%群では 747 ± 94 と、S8%群ラットが圧倒的に高値を示した (Fig. 2)。

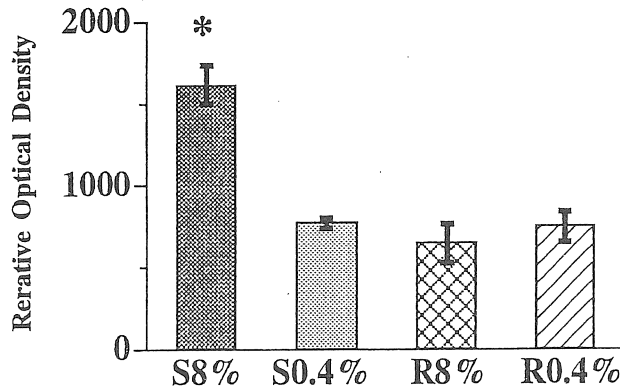


Fig. 2. Brain nNOS protein abundance in the S8%, S0.4%, R8% and R0.4%rat-groups. $n=4$ for each group. *, $p<0.05$ between the 4 groups.

3.2 安静時循環および交感神経活動データ

2 実験動物群における安静時データを Table 1 に示す。安静時平均動脈圧 (MAP) は、S 8%群のみで高値を示した。心拍数 (HR) や安静時腎交感神経活動 (resting RSNA) には、2 群間に差を認めなかった。

Table 1. Resting levels of MAP, HR and %RSNA in the control phase of each of Dahl salt-sensitive rats fed 0.4% NaCl diet (S0.4%) and those fed 8% NaCl diet (S8%).

	MAP (mmHg)	HR (bpm)	resting RSNA (%)
S 0.4% 群	99 ± 6	350 ± 27	20.8 ± 4.5
S 8% 群	$154 \pm 3^*$	323 ± 32	24.4 ± 2.6

*, $p<0.05$ between the S 0.4% and S 8% groups (Unpaired t-test). MAP, mean arterial pressure. HR, heart rate. RSNA, renal sympathetic nerve activity.

3.3 S0.4%ラット群における、脳室内 aCSF、SMTC、L-Arginine 投与の影響

Fig. 3 は、正常血圧群 S0.4%ラットの脳室内に、vehicle である aCSF、nNOS 特異的阻害剤である SMTC、そして、その効果を抑制する L-Arginine をそれぞれ投与後、10分以内の変化を示した。S0.4%ラット群では、SMTCを脳室内に投与すると、圧受容器負荷解除時 RSNA は $133 \pm 11\%$ の増加が見られたが、安静時 RSNA および MAP には変化が見られなかった。SMTC につづいて投与した大量の L-Arginine では、MAP に変化は見られなかったが安静時 RSNA と圧受容器負荷解除時 RSNA の両者と

もに有意な抑制が見られた。

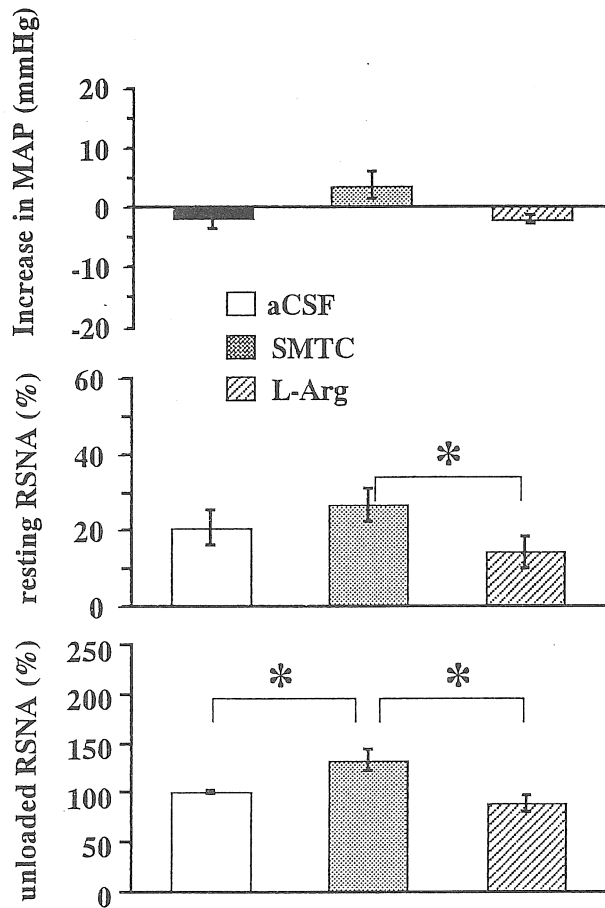


Fig. 3. Effects of artificial CSF (aCSF), nNOS inhibitor (SMTC) and L-arginine (L-Arg) on MAP, resting RSNA and baro-unloaded RSNA of Dahl salt-sensitive normotensive rats ($n=4$). *, $p<0.05$ (One-way ANOVA, Fisher's PLSD).

3.4 S8%ラット群における、脳室内 aCSF、SMTC、L-Arginine 投与の影響

Fig. 4 は、食塩感受性高血圧である S8%ラットの脳室内にそれぞれ aCSF、SMTC、L-Arginine を投与後、10分以内に生じた各測定値の変化を示した。nNOS 特異的阻害剤を脳室内に投与すると、平均血圧の上昇とともに安静時 RSNA も上昇した。このとき、圧受容器反射性抑制の前段階の緊張性 RSNA は $199 \pm 12\%$ と約 2 倍もの著大な増加を示した。即ち、脳内の nNOS を阻害すると、交感神経活動が自律神経中枢性に亢進し、血圧が上昇する。これが圧受容器反射性に延髄で交感神経活動を抑制する。このネガティブ・フィードバックが安定し終わった状態で、血圧も末梢交

感神経活動も vehicle (aCSF) 投与時より増加したことを意味する。SMTC 脳室内投与後、大量の L-Arginine を脳室内投与すると、平均血圧、安静時 RSNA および圧受容器負荷除去時 RSNA のいずれも vehicle 投与時より低下した。

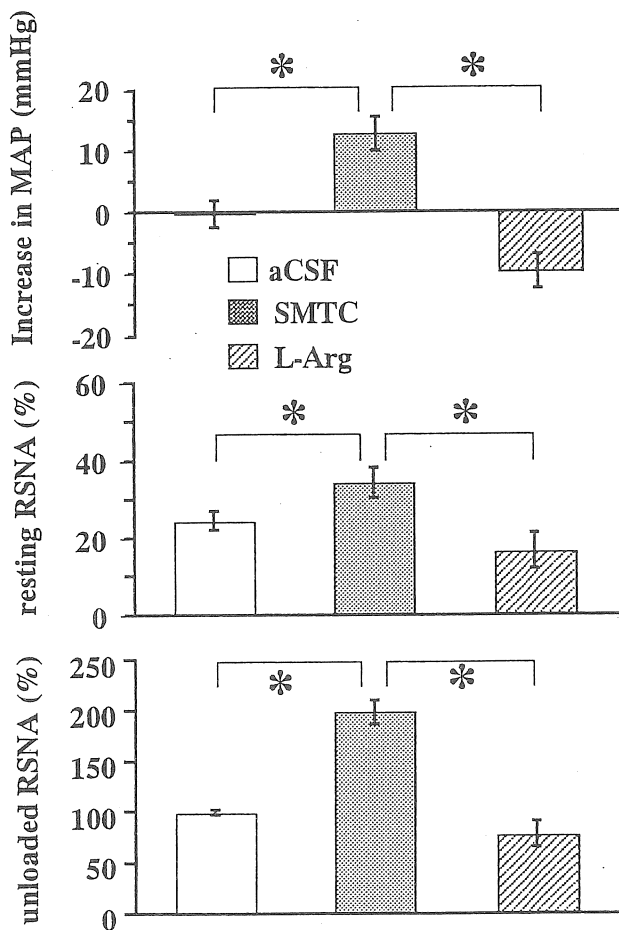


Fig. 4. Effects of artificial CSF (aCSF), nNOS inhibitor (SMTC) and L-arginine (L-Arg) on MAP, resting RSNA and baro-unloaded RSNA of Dahl salt-sensitive hypertensive rats (n=5). *, $p < 0.05$ (One-way ANOVA, Fisher's PLSD).

4. 考察

食塩感受性高血圧ラットでは、脳幹組織内 nNOS 比活性および nNOS 酵素蛋白量ともに食塩抵抗性ラットおよび食塩感受性正常血圧ラットより高値を示した。nNOS の酵素活性は S-S 結合で形成される 2 両体となつてはじめて活性化酵素として働く。本研究で用いた酵素活性は比活性として求めたものであることから、食塩感受性高血圧ラットの脳幹部では nNOS の酵素量が多いだけでなく、活性化率も高い可能性が示された。Dahl 食塩感受性高血圧ラットの血管および腎臓では NOS 活性が

低下しているという Hayakawa ら (4) や Ikeda ら (6) の報告から、脳内 nNOS 活性も低下しているのではないかと、という仮説は本研究結果から否定されたと考えられる。

nNOS に特異性の高い S-methyl-L-thiocitrulline (SMTC) を、全身投与量 (10mg/kg) (9) の約 1000 分の 1 を脳室内に投与したところ、食塩感受性高血圧ラットの安静時 RSNA が上昇し、同時に血圧も上昇した。圧受容器反射性抑制を一時的に除去した緊張性腎交感神経活動はおよそ 2 倍もの増加が見られた。これら阻害剤による作用は、大量の L-Arginine によって打ち消されたことから、SMTC による作用は nNOS を介する反応であることが確認された。食塩感受性ラットの正常血圧群でも、脳室内 SMTC 投与に対して圧受容器反射性抑制除去時緊張性腎交感神経活動は量的には少ないながらも高血圧群と同方向の反応を示した。今回得られたこのような結果は、nNOS に特異性の高い新たな阻害剤を、全身に影響しないと思われる微量を脳室内に投与しても、昨年度の全身投与研究と同様な結果が得られたことを示す。従って、交感神経活動を抑制する組織は脳であろうと臓器の特定がなされ、7-nitroindazole 薬剤の特異な作用ではなく、nNOS の選択的阻害による神経性 NO の機能を示している、と考えられる。

以上、脳組織内酵素活性の成績、nNOS 特異的阻害剤の脳室内投与の成績から、食塩感受性高血圧ラットでは、脳内 nNOS が強力に誘導され、これによって産生される NO が交感神経活動を抑制的に調節している、と考えられる。また、高血圧を来していない正常血圧の食塩感受性ラットや食塩抵抗性ラットでも、圧受容器反射抑制がかかる前段階の交感神経活動を nNOS が抑制していることから、正常ラットでも脳内 nNOS による NO は交感神経系を抑制的に制御している可能性が伺える。

5. 今後の課題

今回の研究では、脳組織 nNOS 活性は脳幹しか調べられなかった。交感神経系を制御する神経核は、少なくとも間脳や小脳にも認められる。これらの組織 nNOS 活性は調べられていない。

一方、このような摘出組織を用いた酵素活性の測定は、摘出した組織全体の組織量で希釈された平均的酵素活性が得られるのみで、機能している部位または神経核の特定は不可能である。今後は、免疫組織染色法やアンチセンス・プローブによる In situ hybridization 法にて機能神経核を特定したいと考えている。

また、脳内の NO 性交感神経制御系の存在が新たに明らかになりつつあることから、今後電気生理学的に、交感神経系を制御する新しい制御系として NO 神経回路網を明らかにする必要性が生じてきたと思われる。正常状態でも機能しているが、これまでのデータでは、食塩感受性高血圧モデルで顕著に増幅されていることから、食塩感受性高血圧モデルが解明の「道具」として用いられると思われる。

さらに、食塩感受性高血圧では、どういうメカニズムで、これほどまでに NO 性交感神経抑制機能が増幅されるのであろうか？これまでの数少ないデータからは、食塩負荷が関与しているように思われるので、経口的高食塩負荷と脳内制御系の増幅との間をつなぐメカニズムがありそうである。或いは、成長過程で正常血圧から高血圧へ生物学的に移行する時期、いわゆる高血圧への『Critical Period』と関係している可能性もある。これらについては、先ず成長過程と脳内 nNOS 活性との関係を調べてみようと考えている。

6. 文献

1. Nishida Y, Chen QH, Tandai-Hiruma M, Terada S, Horiuchi J. Neuronal nitric oxide strongly suppresses sympathetic outflow in high-salt Dahl rats. *J. Hypertension* 19 (3): 627-634, 2001.
2. Babbedge RC, Bland-Ward PA, Hart SL, Moore PK. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitroindazole and related substituted indazole. *Br J Pharmacol* 110: 225-228, 1993.
3. Zagvazdin Y, Sancesario G, Wang YX, Share L, Fitzgerald MEC, Reiner A. Evidence from its cardiovascular effects that 7-nitroindazole may inhibit endothelial nitric oxide synthase in vivo. *Eur J Pharmacol* 303: 61-69, 1996.
4. Hayakawa H, Raiji L. The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension* 96: 235-241, 1997.
5. Ni Z, Oveisi F, Varizi ND. Nitric oxide synthase isotype expression in salt-sensitive and salt resistance Dahl rats. *Hypertension* 34: 552-557, 1999.
6. Ikeda Y, Saito K, Kim J-II, Yokoyama M. Nitric Oxide synthase isoform activities in kidney of Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 26: 1030-1034, 1995.
7. Furfine ES, Harmon MF, Paith JE, *et al.* Potent and selective inhibition of human nitric oxide synthases: Selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase by S-methyl-L-thiocitrulline and S-ethyl-L-thiocitrulline. *J Biol Chem* 269 (43): 26677-26683, 1994.
8. Joly GA, Narayanan K, Griffith OW, Kilbourn RG. Characterization of the effects of two new arginine / citrulline analogues on constitutive and inducible nitric oxide synthases in rat aorta. *Br J Pharmacol* 115: 491-497, 1995.
9. Gozal D, Torres JE, Gozal YM, Littwin SM. Effect of nitric oxide synthase inhibition on cardiorespiratory responses in the conscious rat. *J Appl Physiol* 81 (5): 2068-2077, 1996.

Brain-tissue nNOS activity and Effects of Intracerebroventricular Infusion of nNOS Inhibitor
on Sympathetic Outflow in Dahl Salt Hypertensive Rats.

Yasuhiro Nishida, Jouji Horiuchi, Megumi Tandai-Hiruma

¹National Defense Medical College, Department of Physiology,

Summary

We have demonstrated that intraperitoneal administration of 7-nitroindazole (7-NI), an inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (nNOS), markedly increases tonic sympathetic outflow in Dahl salt-sensitive (DS) hypertensive rats. This result suggests that a neuronal NO-mediated suppressive mechanism to the sympathetic system might be developed and enhanced in the brain of DS hypertensive rats. However, there are three major limitations. First, 7-NI may lack selectivity to nNOS. Second, because 7-NI was administered systemically to the brain and not locally, the exact target organ of the inhibitor could not be determined. Third, the tissue concentration or activity of NOS in the vessels of DS hypertensive rats has been reported to be less than normal. To overcome these limitations, we measured brain-tissue nNOS activity and concentration, and examined the effects of intracerebroventricular (icv) administration of a specific nNOS inhibitor, S-methyl-thiocitrulline (SMTC), on renal sympathetic nerve activity (RSNA) in Dahl rats.

Methods and Results: DS and Dahl salt-resistant (DR) rats were fed a regular salt (0.4% NaCl) or a high salt (8% NaCl) diet for 4 weeks. After the sodium load, the brain stem nNOS activity was determined by the citrulline method. The concentration of nNOS was analyzed by Western Blot with anti-nNOS antibody and by the enhanced chemiluminescence method. The DS hypertensive rats showed significant increases in nNOS activity and protein abundance of the brain stem. Using conscious rats instrumented chronically, RSNA was measured in both baroreceptor (BR)-loaded and -unloaded states, before and after icv administrations of artificial cerebrospinal fluid (aCSF, 100 μ l), SMTC (50 nmole) and L-Arginine (1000 nmole). The BR unload was performed by decreasing arterial pressure with occlusion of the inferior vena cava. The icv administration of SMTC increased both resting and BR-unloaded RSNA concomitant with an increase in MAP in the DS hypertensive rats. The increases were suppressed by the sequential icv administration of L-Arginine.

Conclusion: Neuronal NO may suppress tonic sympathetic discharge, generated before baroreflex-mediated inhibition in DS rats. The neuronal NO-mediated suppression mechanism may be markedly enhanced in salt-induced hypertension.