

高血压大鼠心肌肌浆网膜流动性与 Ca^{2+} -ATP 酶活性的研究

陈 化^①周 平^②

(湖南医科大学 ①附属第二医院老年病科 410011 长沙, ②分析测试中心)

Research of Ca^{2+} -ATPase Activity and Membrane Fluidity of Sarcoplasmic Reticulum in Renovascular Hypertensive Rats

CHEN Hua and ZHOU Ping

(Department of Geriatrics, the Second Affiliated Hospital, Hunan Medical University, Changsha 410011, China)

ABSTRACT

Aim The changes of the membrane fluidity(MF) and Ca^{2+} -ATPase activity of the cardiac sarcoplasmic reticulum(SR) and relation between them were investigated in renovascular hypertensive rats and normotensive rats.

Methods Two-kidney, one-clip(2k1c)renovascular hypertension was produced in SD rats by constriction of the left renal artery with a silver clip. Thirty-two rats were randomly divided into four groups: animals made hypertensive for 6 weeks (H_6) and 10 weeks (H_{10}), respectively. And age-matched control rats (C_6 and C_{10}) underwent sham surgery. The membrane enriched with SR was isolated by a modified of Harigayas and Schwartz's method. The cardiac SR Ca^{2+} -ATPase activity and SR MF were determined by James' and fluorescent polarization methods, respectively. All values are $\bar{x} \pm s$ and were analyzed with an analysis of variance and a student's t test.

Results The cardiac SR Ca^{2+} -ATPase activity and MF in hypertensive rats seemed like a tendency to reduce to compared with those in normotensive groups. But it was no statistical difference between them. With age growing, the MF of cardiac SR in all rats showed a decline tendency, especially, in hypertensive groups (H_{10} vs H_6 , $P < 0.05$).

Conclusions The above results suggest that the change of Ca^{2+} -ATPase activity was as a same tendency as one of MF in the cardiac SR of hypertensive groups. The SR Ca^{2+} -transport function was no reduced significantly during 6 or 10 weeks when the hypertension continued. One of the reasons that cardiac SR MF dropped markedly during short period might be an influence of hypertension.

KEY WORDS Renovascular hypertension; Myocardial hypertrophy; Sarcoplasmic reticulum; Membrane fluidity; Ca^{2+} -ATPase; Rats

摘要 本文观察了高血压 6 周和 10 周两阶段组大鼠肥厚心肌肌浆网膜流动性的变化及其对肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶活性变化的影响。结果发现,高血压组 and 对照组膜流动性均随增龄下降,其中高血压 10 周肌浆网组较 6 周膜流动性下降更明显($P < 0.05$)。与相应对照组相比,肥厚心肌肌浆网膜流动性和 Ca^{2+} -ATP 酶活性均呈现下降趋势。提示心肌肌浆网膜流动性亦存在增龄性下降变化,血压增高可促使这种变化在短期内下降更明显。高血压的发生发展中,肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶活性呈现下降趋势可能与肌浆网膜流动性的下降有关。

关键词 肾血管性高血压; 心肌肥厚; 心肌肌浆网; 膜流动性; 大鼠; 钙—三磷酸腺苷酶

近年来,不少研究揭示,高血压所伴随的细胞离子代谢紊乱与生物膜流动性(membrane fluidity, MF)下降及相应离子泵功能异常有关^[1,2]。我们在前文^[3]已观察到高血压大鼠肥厚心肌存在钙离子代谢紊乱并初步探讨了其机理。本研究将继续探讨肥厚心肌肌浆网 MF 的变化及对 Ca^{2+} -ATP 酶活性的影响。

1 动物和方法

1.1 动物模型及分组

32 只健康雌性 SD 大鼠(本校动物中心提供)体重 175 ± 14 g, 随机分为高血压组和对照组(各 16 只)。采用自制圆孔内径为 0.30 mm 的脑银夹缩窄大鼠左肾动脉, 建立二肾一夹肾血管性高血压大鼠心肌肥厚模型。同龄假手术组(除不上银夹外, 其余手术步骤同高血压组)作为对照。手术前后每周测体重及清醒状态尾动脉血压(尾套检压计 Buffington 101A, ISA)。术后三周内动脉收缩压 ≥ 20 kPa 者视为高血压。实验分两阶段进行, 即术后 6 周高血压和对照组大鼠各 8 只, 术后 10 周高血压和对照组各 8 只。

1.2 心肌肌浆网膜制备及 Ca^{2+} -ATP 酶活性测定

各实验均按前文^[3]已报道方法进行。Lowry 法测肌浆网膜蛋白含量。

1.3 心肌肌浆网膜流动性测定

参照聂氏^[4]的方法, 以 DPH(Sigma)为荧光探针。取新制备的心肌肌浆网膜 2 ml(膜蛋白浓度 500 mg/L)加入临时配制的 2×10^{-6} mol/L DPH 液 2 ml 中(pH 7.4), 37℃温育 30 min, 离心 4 000 r/min, 用 PBS 洗涤一次, 最后悬浮在 4 ml PBS 液中, 测荧光偏振度 P。滤光片 390 nm, 激发波长 360 nm, 发射波长 430 nm, 日立 850 型荧光分光光度计检测, 由公式 $\eta = \frac{2P}{0.46-P}$ 求

得平均微粘度($\bar{\eta}$)。

1.4 统计学处理

采用 *t* 检验和方差分析。

2 结果

2.1 高血压的产生及心肌重量变化

术前大鼠收缩压 14.8 ± 0.4 kPa ($n=32$), 术后 2~3 周血压进行性升高。术后 6 周和 10 周时, 高血压组(6 周和 10 周)收缩压、左心室重量和左心室重量与体重之比均明显高于相应对照组(Table 1, $P<0.01$)。提示肾血管性高血压大鼠心肌肥厚模型已经建立。

2.2 心肌肌浆网膜流动性

心肌肌浆网 MF 测定结果如 Table 2 所示。方差分析显示两阶段高血压组和相应对照组间有统计学差异($P<0.05$), 而两两比较 *t* 检验, 同阶段高血压组与对照组平均微粘度($\bar{\eta}$)均无显著差异($P>0.05$); 对照组 10 周和 6 周之间亦无显著差异, 高血压 10 周组较 6 周组呈现显著统计学差异($P<0.05$)。

Table 1. General characteristics of control and hypertensive rats ($\bar{x} \pm s$).

Groups	n	SBP(kPa)	LVW(mg)	LVW/BW(mg/g)
control				
6 weeks	8	15.6 ± 0.5	668 ± 26	2.21 ± 0.09
10 weeks	8	16.1 ± 0.4	777 ± 15	2.31 ± 0.07
hypertensive				
6 weeks	8	$25.6 \pm 1.2^*$	$868 \pm 25^*$	$3.11 \pm 0.14^*$
10 weeks	7	$26.4 \pm 0.8^*$	$1\ 098 \pm 13^*$	$3.64 \pm 0.12^*$

SBP: systolic blood pressure; LVW: left ventricular weight; BW: body weight. *: vs corresponding control groups, $P<0.01$.

Table 2. Cardiac SR membrane fluorescent polarization and $\bar{\eta}$ in experimental rats ($\bar{x} \pm s$).

Groups	6 weeks			10 weeks		
	n	FP	$\bar{\eta}$	n	FP	$\bar{\eta}$
control	8	0.22 ± 0.02	1.74 ± 0.26	8	0.23 ± 0.03	2.05 ± 0.60
HT	8	0.23 ± 0.02	1.89 ± 0.28	7	0.26 ± 0.03	$2.63 \pm 0.64^*$

HT: hypertension; FP: fluorescent polarization, $\bar{\eta}$: mean microviscosity. *: compared with 6 weeks, $P<0.05$.

2.3 心肌肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶活性

各组心肌肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶活性均受氯化钙浓度($[\text{CaCl}_2]$)的影响,如 Figure 所示各组 Ca^{2+} -ATP 酶活性峰值几乎均出现在 $[\text{CaCl}_2]=80 \mu\text{mol/L}$ 附近。术后 6 周时,高血

压组酶活性曲线位于对照组之上;手术后 10 周时,高血压组酶活性曲线与相应对照组比较呈下降趋势,但各组间酶活性相对应点值比较无统计学差异($P>0.05$)。

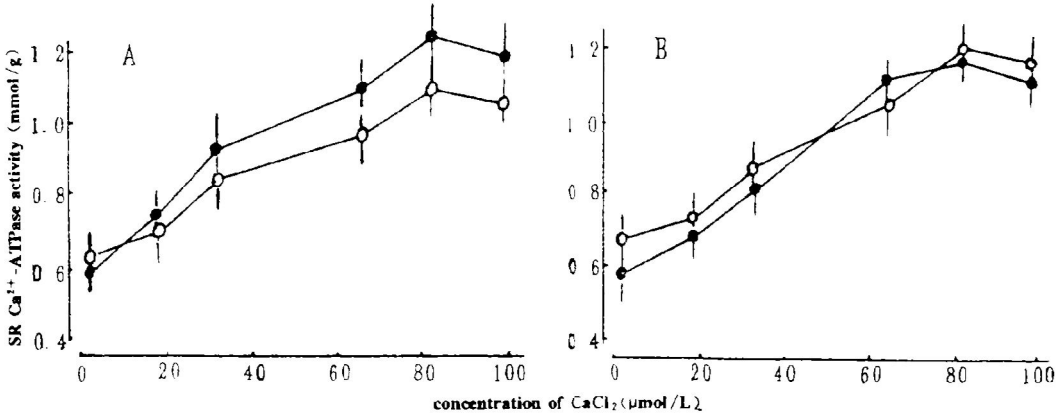


Figure. Cardiac SR Ca^{2+} -ATP activity in control(○) and hypertension(●) across varying concentrations of CaCl_2 . A: for 6 weeks; B: for 10 weeks.

3 讨论

研究表明,生物膜的流动性是生物膜的重要特征,结合在生物膜上的许多酶活性均受 MF 的影响^[5,6]。因此,研究 MF 的变化有助于加深对生物膜功能及其与疾病关系的了解。本研究继前文^[3]基础上探讨了肌浆网 MF 变化,结果显示高血压产生后 6~10 周,心肌出现不同程度肥厚,其肌浆网 MF 与同时期对照组相比呈下降趋势, Ca^{2+} -ATP 酶活性变化是先高后低的趋势,与肌浆网 MF 的变化一致。在短时间(4 周)肌浆网 MF 随增龄下降的变化不明显,但在高血压病理因素影响下,肌浆网 MF 的下降速度加快。细胞膜流动性呈增龄性下降已为人们熟知,其机理可能为老化过程中,生物膜中氧化与抗氧化的作用失控,使自由基及过氧化物堆积,导致膜蛋白交联,使磷脂的不对称性分布破坏,脂质过氧化而出现脂肪断裂或交联;生物膜 J-S-去饱和酶活力下降,膜内饱和脂肪酸含量增加,这些因素均可致 MF 逐年下降。高血压患者除了上述增龄性变化影响外,生物膜

脂组成中的胆固醇和磷脂的含量改变,胆固醇或胆固醇与磷脂比值增高亦可使 MF 下降。因此,不难理解增龄因素的影响加之高血压的干预,是导致肌浆网 MF 在短期内明显下降的原因。生物膜流动性变化必然影响膜上酶的活性。Giraud 等^[5]观察到, Na^+ - K^+ ATP 酶活性与 MF,特别是膜内层流动性呈正相关。Thomas 等^[6]研究发现,肌浆网的 MF 是通过调节酶蛋白的运动而影响酶活性的,而 Ca^{2+} -ATP 酶蛋白的旋转运动与 Ca^{2+} 主动转运的限速步骤相关,认为 MF 的变化实际上可直接影响 Ca^{2+} 的主动跨膜转运。据此,我们认为肾血管性高血压大鼠肥厚心肌肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶活性和肌浆网 MF 变化趋势的一致性,可推测酶活性下降与肌浆网 MF 下降有关。

参考文献

- 1 Pagnan A, Corrocher R, Ambrosio G, et al. Effects of an olive-oil-rich diet on erythrocyte lipid composition and cation transport system. *Clin Sci*, 1989, **76**: 87~89.
- 2 唐发宽, 王亚真, 王思让. 膜脂流动性与心血管疾病. *心血管病学进展*, 1995, **16**(6): 363~366.

- 3 陈化, 李云霞. 肥厚及肥厚逆转心肌钙过荷与肌浆网功能的研究. 湖南医科大学学报, 1995, 20(4): 311~314.
 - 4 聂松青, 薄惠卿, 林克椿. 蜂王精对大鼠红细胞膜流动性影响. 北京医学院学报, 1983, 15(4): 249~252.
 - 5 Giraud F, Claret M, Bruckdorfer KR. The effect of membrane-fluidizing agents on sodium-pump activity in erythrocytes. *Biochem Soc Trans*, 1980, 8(1): 32~35.
 - 6 Thomas CS, Diana JB, David DT. Lipid fluidity directly modulates the overall protein rotational mobility of the Ca^{2+} -ATPase in sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1988, 263(19): 9 178~181.
 - 7 Roy D, Pathak DN, Singh R. Effects of Chlorpromazine on the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the various regions of aging rat brain. *J Neurochem*, 1984, 42: 628~630.
 - 8 周枚, 陈璇, 刘伊丽, 等. 高血压和冠心病患者红细胞膜的脂质过氧化速率的观察. 中国循环杂志, 1987, 8(4): 488~490.
- (1996-06-28 收到, 1996-11-20 修回)

名词术语的汉英对照及缩写(Ⅰ)

月桂酸二乙酰胺	lauric diethamide, LDE
白细胞刺激因子	leucocyte stimulating factor, LSF
白细胞抑制因子	leucocyte inhibiting factor, LIF
迟发性变态反应	delayed allergy, DA
表皮生长因子	epidermal growth factor, EGF
表皮生长因子受体	epidermal growth factor receptor, EGFR
标记基因	marker gene
标记抗原	labelled antigen
有效不应期	effective refractory period, ERP
有丝分裂控制蛋白	mitotic-control protein, MCP
有丝分裂间期细胞	intermitotic cell, IMC
有效毛细血管血流量	effective capillary flow, ECF
有效滤过压	effective filtration pressure, EFP
原位杂交	hybridization in situ
原癌基因	proto-oncogene
原发性高血压	essential hypertension, EH
原发性高胆固醇血症	essential hypercholesterolemia, EHC
原肌球蛋白	protomyosinose, PMS
原胶原赖氨酸羟化酶	procollagen lysine hydroxylase, pCLHOase
丝氨酸乙酰基转移酶	serine acetyl transferase, SATase
丝氨酸转乙酰酶	serine transacetylase, STAase
纤维蛋白溶酶原	plasminogen, Pg
纤维蛋白原	fibrinogen, Fg
纤维细胞干扰素	fiblaferon
纤维母细胞干扰素	fibroblast interferon, FIFN
荧光偏振	fluorescent polarization, FP
荧光免疫分析	fluorescent immunoassay, FIA
荧光亲和色谱法	fluorescent affinity chromatography, FACG
荧光相关光谱术	fluorescent correlation spectroscopy, FCS