

内皮素在自发性高血压大鼠心肌肥厚中的作用

项美香 吕俊升

(浙江医科大学附属第二医院心内科, 杭州 310009)

The Effect of Endothelin on Myocardial Hypertrophy in Spontaneously Hypertensive Rats

XIANG Mei-Xiang and LU Jun-Sheng

(Cardiovascular Department, The Second Affiliated Hospital, Zhejiang Medical University, Hangzhou 310009, China)

ABSTRACT

Aim To determine the effect of endothelin on high blood pressure and myocardial hypertrophy.

Methods We observed endothelin levels in plasma, and endothelin levels, gene expressions of endothelin and endothelin A receptor in left ventricle (LV) of 5, 14, 26 week-old spontaneously hypertensive rats (SHR) and age-matched normotensive Wistar Kyoto (WKY) rats with radioimmunoassay and Northern blot hybridization.

Results Plasma endothelin levels were not significantly different between SHR and WKY rats. LV endothelin concentration, endothelin, endothelin A receptor gene expressions increased only in 26 week-old SHR.

Conclusion Endothelin does not play an etiologic role in myocardial hypertrophy in SHR, but may play a role in the development of hypertension and the initiation of its complications.

KEY WORDS Hypertension; Endothelin; Myocardial hypertrophy; Spontaneously hypertensive rats

摘要 为了从整体水平进一步阐明内皮素在高血压心肌肥厚中的作用,本研究以同龄京都 wistar 大鼠为正常对照,观察了自发性高血压大鼠高血压发生前和发生后不同周龄血浆和左心室组织局部内皮素水平及

左心室组织局部内皮素和内皮素 A 型受体基因表达情况。结果发现,各周龄自发性高血压大鼠血浆内皮素水平均无显著增高,左心室组织局部内皮素水平仅在 26 周龄时有显著增高,左心室组织局部内皮素和内皮素 A 型受体基因表达也仅在 26 周龄时有显著增高。这些结果提示,内皮素并不通过其产生增加和内皮素 A 受体的介导而在自发性高血压大鼠心肌肥厚发生中起始动作用,但在自发性高血压大鼠高血压的发展和并发症的发生中可能起着一定的作用。

关键词 高血压; 内皮素; 心肌肥厚; 自发性高血压大鼠

高血压病是一种严重危害人类生命健康的最常见的疾病之一,其发病机制十分复杂。现在认为高血压病是一种多因素共同作用的疾病,但至今发病机制仍未阐明。众所周知,高血压引起的心肌肥厚是高血压病发生心血管并发症的一个独立危险因素,而内皮素(endothelin)是迄今所知体内最强的缩血管物质,又是一种有效的细胞生长促进因子,能促进培养的大鼠心肌细胞生长^[1]。自 1988 年发现内皮素以来^[2],就设想内皮素在高血压的发生和发展中起着一定的作用,但至今仍局限于培养的组织细胞水平。本研究企图从整体水平进一步阐明内皮素在自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)高血压心肌肥厚中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

各个周龄 SHR 和京都 Wistar (Tokyo Wistar, WKY)大鼠,由上海高血压研究所提供。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组 5、14、26 周龄 SHR 和 WKY 大鼠各一组,每组 10 只。

1.2.2 收缩压的测定 用尾动脉测压法测大鼠动脉收缩压,仪器为MRB-ⅡA电脑血压心率测定仪(上海高血压研究所)。

1.2.3 内皮素水平的测定 血浆和左心室组织局部内皮素的测定用均相竞争放射免疫法,按照药盒说明书进行操作(药盒购自北京东亚免疫技术研究所),组织蛋白含量的测定用考马斯亮兰法。

1.2.4 组织RNA的提取和Northern blot杂交

用异硫氰酸胍一酚一氯仿一步法^[3]提取左心室组织总RNA,RNA溶液用紫外分光光度计在260 nm和280 nm下测定光密度,确定其浓度和纯度。取等量RNA在65℃水浴中变性15 min,冰上骤冷5 min,用1%甲醛变性胶电泳分离28 S和18 S,判断RNA是否降解;若无降解,则用尼龙膜进行RNA Northern blot转膜(Stratagene 正压转膜装置,转膜压力为80 cm水柱,时间为2~2.5 h),尼龙膜80℃烤箱干烤2 h后密封保存。用随机引物法以 α -³²P dCTP标记小鼠内皮素和内皮素A受体cDNA探针,预杂交,杂交,洗膜,-70℃放射自显影7~10天,用 β -actin作内对照,标准X射线显影方法处理底片,X光底片经激光光密度显像仪扫描(Pharmacia),分析内皮素和内皮素A受体mRNA的相对表达量。

1.3 统计分析方法

测定结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两个样本均数间的比较采用t检验, $P<0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 血压和心肌肥厚程度

以同龄WKY大鼠为正常对照,5周龄SHR血压无显著升高,14和26周龄SHR血压均显著增高(表1,Table 1);左心室重(left ventricular weight, LVW)与体重(body weight, BW)比指数反映左心室心肌肥厚程度,右心室重(right ventricular weight, RVW)与体重比指数反映右心室心肌肥厚程度。LVW(mg)/BW(g)在SHR 5周龄时无显著增高,而在14和26周龄均有显著增高(表2, Table 2);但各个周龄SHR RVW(mg)/BW(g)均无显著差异(表3, Table 3);说明SHR心肌肥厚是左心室心肌肥厚。

2.2 血浆和左心室组织局部内皮素水平

为了探讨内皮素在SHR高血压和心肌肥

厚的作用,本研究观察了SHR高血压发生前和发生后血浆、左心室组织局部内皮素水平,发现各个周龄的SHR血浆内皮素水平均无显著增高,左心室组织局部内皮素水平仅在26周龄时有显著增高(表4与表5, Table 4 and 5)。

Table 1. Blood pressure of SHR and WKY in various ages ($\bar{x}\pm s$, kPa).

Groups	5 Weeks	14 Weeks	26 Weeks
WKY	14.11 $\pm$ 0.43	14.68 $\pm$ 0.68	14.60 $\pm$ 0.63
SHR	15.19 $\pm$ 0.53	25.39 $\pm$ 1.77 ^b	27.00 $\pm$ 1.41 ^b

b: $P<0.01$, compared with age-matched WKY rats.

Table 2. LVW/BW of SHR and WKY in various ages.

Groups	5 Weeks	14 Weeks	26 Weeks
WKY	2.86 $\pm$ 0.10	2.63 $\pm$ 0.13	2.58 $\pm$ 0.18
SHR	2.98 $\pm$ 0.09	3.30 $\pm$ 0.13 ^b	3.54 $\pm$ 0.12 ^b

b: $P<0.01$, compared with age-matched WKY rats.

Table 3. RVW/BW of SHR and WKY in various rats.

Groups	14 Weeks	26 Weeks
WKY	0.73 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.12
SHR	0.75 $\pm$ 0.07	0.78 $\pm$ 0.06

Table 4. Plasma endothelin levels(ng/L).

Groups	5 Weeks	14 Weeks	26 Weeks
WKY	155 $\pm$ 24	211 $\pm$ 24 ^a	193 $\pm$ 24
SHR	158 $\pm$ 28	216 $\pm$ 14 ^a	198 $\pm$ 17

a: $P<0.05$, compared with 5-week-old SHR or WKY rats.

Table 5. Left ventricular endothelin concentration (ng/g).

Groups	5 Weeks	14 Weeks	26 Weeks
WKY	42 $\pm$ 7	53 $\pm$ 6 ^a	55 $\pm$ 7
SHR	43 $\pm$ 8	54 $\pm$ 7 ^a	69 $\pm$ 6 ^d

a: $P<0.05$ compared with 5-week-old SHR or WKY rats.

d: $P<0.05$ compared with age-matched WKY rats.

2.3 左心室组织局部内皮素和内皮素 A 型受体基因表达情况

为了进一步阐明内皮素在 SHR 心肌肥厚中的作用,本研究分析了左心室组织局部内皮素,内皮素 A 受体基因表达情况,发现内皮素,

内皮素 A 受体基因表达仅在 SHR 26 周龄时有显著升高,分别增高 90% 和 80%(表 6, Table 6)。

Table 6. Endothelin(ET) and endothelin A receptor(ETAR) gene expressions in left ventricular tissue.

Groups	ET(%)			ETAR(%)		
	5 Weeks	14 Weeks	26 Weeks	5 Weeks	14 Weeks	26 Weeks
WKY	5.68	12.79	20.78	24.99	14.54	7.81
SHR	5.80	15.46	39.49	25.76	12.87	14.03

3 讨论

内皮素是迄今所知体内最强的缩血管物质,是一种有效的细胞生长促进因子,能促进培养的大鼠心肌细胞增长,所以认为内皮素在高血压和心肌肥厚中起着一定的作用,但其作用仍不清楚。在各种高血压动物模型和人类原发性高血压病人中,研究发现血浆内皮素水平可表现为增高或降低,但绝大多数的研究发现血浆内皮素水平无显著差异^[4~9]。本研究应用 SHR 模型,以 WKY 大鼠为正常对照,发现高血压发生前和发生后各周龄 SHR 血浆内皮素水平均无显著增高,提示循环内皮素在 SHR 高血压的发生和维持中不起重要作用。

内皮素是一种局部的自分泌和旁分泌因子,且以非腔面的方式分泌,故组织局部内皮素水平更能反映内皮素在高血压中的作用,本研究发现左心室组织局部内皮素水平仅在 26 周龄时有显著增高,这似乎提示了内皮素在 SHR 心肌肥厚的发生中不起始动作用。但在一些高血压大鼠模型如 DOCA-盐高血压大鼠或 DOCA 盐 SHR 中发现血压升高和心血管肥厚发生时,心脏和血管组织局部内皮素水平增高,且组织局部内皮素水平与心肌肥厚的发生相关^[10]。这可能与内皮素在 DOCA 盐高血压模型和在遗传性高血压大鼠模型中的作用不同有关。那么左心室组织局部内皮素水平无显著增高是否由于组织局部内皮素的降解加快所致?

内皮素在细胞内合成后无细胞内储存囊

泡,并以连续分泌的方式分泌,故内皮素的合成和释放的调节主要在转录水平;本研究发现左心室组织局部内皮素基因表达仅在 26 周龄时有显著增高,这与组织局部的内皮素水平相一致。最近有学者研究也发现 17 周龄 SHR 左心室心肌组织和主动脉、肠系膜动脉内皮素水平和内皮素基因表达均无显著增高^[11],说明 SHR 左心室组织局部放射免疫测定的生物活性内皮素水平无显著增高并非由于组织局部内皮素降解加快所致。

内皮素必须与相应的亚型受体结合激活细胞内信息传递系统而发挥其生理和病理作用。目前根据与各种内皮素异构肽亲和力的不同,可将内皮素受体分为 A、B 和 C 三个亚型,内皮素与内皮素 A 受体结合可引起血管收缩和细胞增殖,体外实验发现 SHR 培养的主动脉平滑肌细胞内皮素 A 受体基因表达增加^[12],说明内皮素 A 型受体可能在 SHR 高血压中起着一定的作用,而本研究发现说明内皮素 A 受体在 SHR 心肌肥厚中可能不起重要作用,不是始动因子,至于内皮素在 SHR 心肌肥厚中的作用是否通过内皮素另两型受体如 B 受体的下调等而发挥作用,这有待于进一步的研究。

参考文献

- 1 Masaki T, Yanagisawa M, Goto K. Physiology and Pharmacology of endothelins. *Med Res Rev*, 1992, 12: 391.
- 2 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel

- potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cell. *Nature*, 1988, **332**: 411.
- 3 Chomczynski, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, **162**: 156.
- 4 Suzuki N, Miyauchi T, Tomobe Y, et al. Plasma concentration of endothelin-1 in spontaneously hypertensive rats and DOCA-salt hypertensive rats. *Biophys Res Commun*, 1990, **167**: 941.
- 5 Khno M, Ysumari K, Murakawa KI, et al. Plasma immunoreactive endothelin in essential hypertension. *Am J Med*, 1990, **88**: 614.
- 6 Davenport AP, Ashby MJ, Easton PM, et al. A sensitive radioimmunoassay measuring endothelin-like immunoreactivity in human plasma: Comparison of levels in patients with essential hypertension and normotensive control subjects. *Clin Sci*, 1990, **78**: 261.
- 7 Shichiri M, Hirate Y, Ando K, et al. Plasma endothelin levels in hypertension and chronic renal failure. *Hypertension*, 1990, **15**: 496.
- 8 Schiffrin EL, Thibault G. Plasma endothelin in human essential hypertension. *Am J Hypertens*, 1991, **4**: 303.
- 9 Kohno M, Murakawa KI, Horio T, et al. Plasma immunoreactive endothelin-1 in experimental malignant hypertension. *Hypertension*, 1991, **18**: 93.
- 10 Matsumura Y, et al. Involvement of endothelin-1 in deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension and cardiovascular hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995, **26** (Suppl 3): S456.
- 11 Lariviere R, Sventek P, Schiffrin EC. Expression of endothelin-1 gene in blood vessels of adult spontaneously hypertensive rats. *Life Sci*, 1995, **56**: 1 889.
- 12 张晨晖, 李倩红, 周虹, 等. 自发性高血压大鼠内皮素 A 型受体基因的表达. 北京医科大学学报, 1994, **26**(增刊): 33.
- (1997-09-29 收到, 1998-01-24 修回)