

慢性应激刺激致高血压大鼠下丘脑肾上腺髓质素和降钙素受体样受体基因表达改变

李良^{1,2}, 李霞¹, 胡弼², 朱大年¹

(1. 复旦大学医学院生理与病理生理学系, 上海市 200032; 2. 南华大学医学院生理学教研室, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 生理学; 应激刺激致下丘脑肾上腺髓质素及受体基因表达改变; 高血压, 应激性; 肾上腺髓质素; 受体, 降钙素受体样; 下丘脑

[摘要] 为探讨慢性应激刺激致高血压过程中肾上腺髓质素及其特异性受体组件降钙素受体样受体在下丘脑的动态变化。将 48 只大鼠分为对照组(18 只)和应激组(30 只), 应激组给予噪声或噪声加足底电击刺激, 分别在刺激开始后的第 1、5、10 和第 15 天, 以及停止刺激后的第 5 和第 10 天, 处死动物, 分离下丘脑, 抽提总 RNA, 用逆转录聚合酶链反应检测肾上腺髓质素和降钙素受体样受体基因表达变化。结果发现, 与对照组比较, 肾上腺髓质素 mRNA 表达在应激刺激 10 天内逐渐上调(第 5 天 0.92 ± 0.04 比 0.99 ± 0.05 , $P < 0.05$; 第 10 天 1.26 ± 0.04 比 0.92 ± 0.04 , $P < 0.01$); 而后表达下调, 在应激刺激第 15 天仍高于对照组(1.00 ± 0.04 比 0.92 ± 0.04 , $P < 0.05$); 应激刺激结束后第 5 天表达弱于对照组, 但无统计学差异。降钙素受体样受体 mRNA 表达和肾上腺髓质素 mRNA 表达趋势大致相同。实验结果说明, 下丘脑中肾上腺髓质素及降钙素受体样受体 mRNA 表达在一定程度上与慢性应激所致血压升高变化过程一致, 提示其可能参与应激致高血压过程。

[中图分类号] R33

[文献标识码] A

The Dynamic Changes of Adrenomedullin and Its Specific Receptors mRNA Expression in the Stress-Induced-Hypertensive Rats

Li Liang^{1,2}, Li Xia¹, HU Bi², and ZHU Da-Nian¹

(1. Department of Physiology and Pathophysiology, Medical College, Fudan University, Shanghai 200032; 2. Department of Physiology, Medical College, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Stress; Hypertension; Adrenomedullin; Calcitonin Receptor Like; Receptor; Hypothalamus

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the dynamic changes of adrenomedullin and its specific receptors system-calcitonin receptor like receptor (CRLR) mRNA expression in the stress-induced-hypertensive rats. **Methods** Distribute 48 rats to control group with 18 of them and stress group with 30 of the total randomly. Inflict noise or noise with electric foot shock upon the stress group. Execute all the rats and then separate their hypothalamus to isolate the total RNA individually at stress 1, 5, 10 and 15 days and poststress 5 and 10 days. Determine the changes of adrenomedullin and calcitonin receptor-like receptor mRNA expression by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with control group at the same time point, ADM and CRLR mRNA expression in the hypothalamus upregulated within foot-shock and sound stress 10 days (stress 5 days: ADM mRNA expression 0.92 ± 0.04 vs 0.99 ± 0.05 , $P < 0.05$; stress 10 days: 1.26 ± 0.04 vs 0.92 ± 0.04 , $P < 0.01$, and then downregulated, but still kept at a high level at stress 15 days (1.00 ± 0.04 vs 0.92 ± 0.04 , $P < 0.05$) and poststress 5 days ($P > 0.05$). **Conclusion** According to the results described above, at the gene level, the expression of ADM and its specific receptor components CRLR mRNA had changed to some degree in the process of chronic stress-induced-hypertension, indicating that ADM and its specific receptor maybe involve in the stress-induced-hypertension.

长期高度紧张应激是导致高血压等心血管疾病发病率上升的重要原因。在各种人工模拟环境应激因素的长期作用下, 动物处在持续的紧张应激状态, 出现血压持续升高, 导致心血管中枢调节功能失常, 形成应激性高血压。其中下丘脑中的多种神经递质如血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)、P 物质、去甲

肾上腺素 (noradrenaline, NA) 等的含量和其基因表达的变化参与了应激性高血压的发生发展^[1-3]。近年发现肾上腺髓质素 (adrenomedullin, ADM) 及其特异性受体组件降钙素受体样受体 (calcitonin receptor-like receptor, CRLR) 除外周器官组织^[4]外, 还广泛分布于自主神经调节中枢的相关核团, 其中在下丘脑呈高拷贝表达^[5]。在急性应激刺激使血压持续升高后下丘脑室旁核 (paraventricular nucleus, PVN) 的 ADM 表达下降^[6]; 微量注射或侧脑室给予 ADM 到正常大鼠下丘脑 PVN 可引起血压降低, 血浆中促肾

[收稿日期] 2004-05-11 **[修回日期]** 2004-05-21

[作者简介] 李良, 在职硕士研究生, 讲师。李霞, 博士研究生。胡弼, 教授, 硕士研究生导师。朱大年, 教授, 博士研究生导师, 本文通讯作者, 联系电话 021-54237405, E-mail 为 dozhu@shmu.edu.cn。

上腺皮质激素(paraventricular nucleus, ACTH)和糖皮质激素水平降低^[7,9];提示下丘脑 ADM 及 CRLR 变化可能与应激致血压升高有一定关联。本文通过观察慢性应激致高血压过程中 ADM 和 CRLR 表达的动态变化,初步探讨应激致血压升高对下丘脑 ADM 及 CRLR 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料及处理

微量快速柱式组织总 RNA 抽提试剂盒和 DEPC 为上海生物工程公司产品, M-MLV 购于美国 promage 公司, Oliger dT(18)、dNTP 和 PCR 引物为上海博亚生物公司产品, Taq 酶购于 MBI 公司, 琼脂糖购于 Spanish 公司, 3-N-吗啉基丙磺酸 MOPS 购于美国 GIBCO 公司;其他试剂来自上海试剂公司。

1.2 实验分组

体重 180~200 g 的雄性 SD 大鼠 48 只(中国科学院实验动物中心提供),每六只同笼饲养,维持每天 12 h 正常光照。随机分为对照组 18 只,体重 191.5 ± 6.2 g;应激组 30 只,体重 188.7 ± 6.3 g。在应激刺激第 1、5、10 和第 15 天,以及停止刺激后继续饲养的第 5 和第 10 天,应激组各处理 5 只,对照组各处理 3 只。

1.3 应激性高血压大鼠模型制备

采用复旦大学医学院生理学教研室自行研制的应激刺激系统(Electric shock system),每天在计算机控制下随机给予噪声(150~200 dB, 50 ms)或噪声加足底电击(方波 50~80 mV, 60 ms)刺激。每天 2 次,每次 2 h,连续 15 天。对照组动物在相同条件下饲养,不给予任何额外刺激。

1.4 尾套法测定大鼠尾动脉收缩压

在每天第二次应激结束后 2 h,尾套法测定清醒大鼠尾动脉收缩压,测定过程中将大鼠置于大鼠固定器中,加热使动物体温稳定于 38~40 °C 后,用记录仪监测记录。以三次平均值为测量值。

1.5 下丘脑组织总 RNA 的提取

在完成尾动脉血压测量后,断头处死大鼠,迅速在冰床上于无菌条件下在磷酸缓冲液中剥离下丘脑组织,用无菌锡纸包裹后置干冰桶中,或速冻后置 -80 °C 冰箱保存。然后用微量快速柱式组织总 RNA 抽提试剂盒 Trizol 法抽提总 RNA。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测下丘脑肾上腺髓质素和降钙素受体样受体基因表达

抽提的下丘脑总 RNA 样品 A260/280 比值均在

1.8~2.0 之间, MOPS 变性凝胶电泳分析 RNA 完整,提示 RNA 无降解。然后将抽提的下丘脑总 RNA 逆转录合成 cDNA。以 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)为内参照,进行半定量逆转录聚合酶链反应。ADM 上游引物为 5'-CCT GAT GTT ATT GGG TTC G-3', 下游引物为 5'-TGG CGG TAG CGT TTG ACT-3', 产物长 268 bp。CRLR 上游引物为 5'-CCG TCA CTC ATT GAT AGA-3', 下游引物为 5'-CCG ATA CGA CCT TAC TGC-3', 产物长 345 bp。GAPDH 上游引物为 5'-CCA CAG TCC ATG CCA TCA-3', 下游引物为 5'-CCA CCA CCC GTT GCT GTA-3', 产物长 451 bp。聚合酶链反应参数为:95 °C 预变性 5 min 后,94 °C 变性 40 s→55 °C 或 52 °C 退火 40 s→72 °C 延伸 40 s, ADM 经 29 个循环、CRLR 经 27 个循环后 72 °C 延伸 7 min。

1.7 聚合酶链反应产物半定量分析

扩增完毕后,PCR 产物上样于 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙啶),100 V 电压下电泳, Tanon 紫外光可见分析装置下拍照。采用 Tanon GIS2010 图像处理系统获得 GAPDH 和目的条带的平均积分光密度值,以目的条带与 GAPDH 比值来显示基因表达的相对变化。

1.6 统计学处理

所有实验数据采用 SPSS11.0 统计软件分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 慢性应激引起的血压动态变化

在接受应激刺激后,动物血压逐渐上升,应激刺激第 15 天达到高峰,收缩压为 156.3 ± 3.3 mm Hg,与对照组(114.0 ± 2.6 mm Hg)比较有显著性差异($P < 0.01$)。应激刺激停止后第 5 天大鼠血压仍继续在高水平,刺激停止后第 10 天开始下降,但仍明显高于对照组。说明应激性高血压模型制备成功(表 1, Table1)。

2.2 慢性应激过程中下丘脑肾上腺髓质素 mRNA 的动态变化

应激组 ADM mRNA 表达在应激刺激过程中逐渐上调,第 5 天明显高于对照组(0.92 ± 0.04 比 0.99 ± 0.05 , $P < 0.05$),第 10 天达峰值(1.26 ± 0.04 比 0.92 ± 0.04 , $P < 0.01$);而后表达下调,在应激第 15 天仍高于对照组(1.00 ± 0.04 比 0.92 ± 0.04 , $P < 0.05$);应激结束后 5 天表达水平虽仍高于对照组,但无统计学差异(图 1, Figure 1)。

表 1. 慢性应激过程中清醒状态下大鼠尾动脉收缩压($\bar{x} \pm s$, mm Hg)

Table 1. The effect of chronic stress on the systolic blood pressure in conscious rats with tail cuff method.

时 间	对照组	应激组
第 1 天	114.0 ± 2.6	129.3 ± 3.3
第 5 天	121.3 ± 5.2	145.4 ± 4.2
第 10 天	122.3 ± 4.6	148.9 ± 5.5
第 15 天	124.0 ± 6.8	156.3 ± 7.8
第 20 天	123.0 ± 7.1	161.1 ± 8.1
第 25 天	121.5 ± 5.8	152.1 ± 4.8

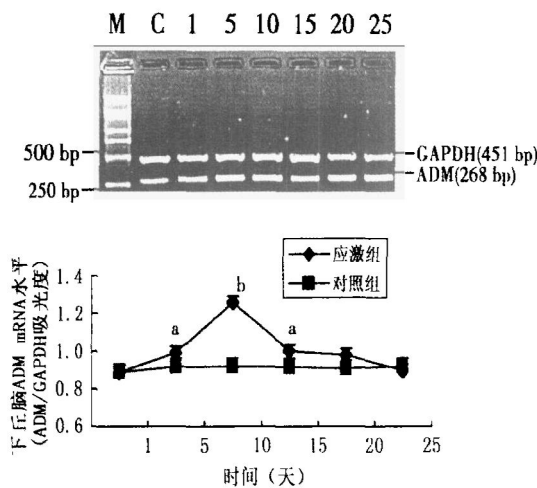


图 1. 应激高血压大鼠下丘脑肾上腺髓质素 mRNA 表达的变化($\bar{x} \pm s$) a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 1. Changes of ADM mRNA expression in hypothalamus of chronic stress-induced-hypertensive rats

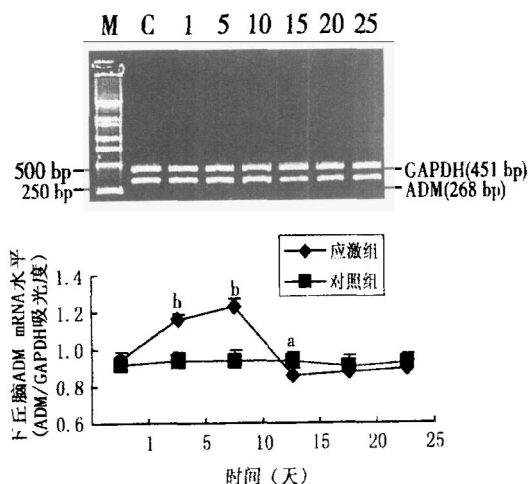


图 2. 应激高血压大鼠下丘脑 CRLR mRNA 表达的变化($\bar{x} \pm s$) a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

Figure 2. Changes of CRLR mRNA expression in hypothalamus of chronic stress-induced-hypertensive rats

2.3 慢性应激过程中下丘脑降钙素受体样受体 mRNA 的动态变化

与对照组相比,应激组 CRLR mRNA 在应激刺激后逐渐上调,第 5 天(1.16 ± 0.04 比 0.94 ± 0.04 , $P < 0.01$)和第 10 天(1.24 ± 0.04 比 0.94 ± 0.04 , $P < 0.01$)显著升高;然后开始降低,第 15 天低于对照组(0.86 ± 0.04 比 0.94 ± 0.04 , $P < 0.05$);应激结束后第 5 和第 10 天仍稍低于对照组,但无统计学意义(图 2, Figure 2)。

3 讨论

本研究所采用的应激高血压大鼠模型,可较好地模拟人类的长期精神紧张状态^[10,11],且尚处于功能性改变阶段,血管壁对交感冲动或生物活性物质的敏感性没有发生改变^[12],因此其高血压的形成主要与自主神经系统和内分泌系统功能紊乱有关。

肾上腺髓质素(ADM)可通过和降钙素基因相关肽(calcitonin gene related protein, CGRP)受体或 ADM 特异性受体结合发挥作用。其中特异性受体由 CRLR 和受体活性调节蛋白(receptor activity modifying protein, RAMP)共同形成^[13]。CRLR 与 RAMP2 和 RAMP3 共同表达均可生成 ADM 受体表型,而和 RAMP1 共结合生成功能性的 CGRP 受体。单独的 RAMP 无 ADM 和 CGRP 受体功能,但细胞表面表达功能性的 CRLR 必需有 RAMP 参与^[14],CRLR 在其作用下发生末端糖基化改变,从而具有结合不同配体的能力,形成不同受体表型^[15]。本研究结果显示 ADM 和 CRLR 在下丘脑均呈高拷贝表达,提示 ADM 在下丘脑的生物学作用可能通过 CRLR 发挥作用。但此过程中 CRLR 在 RAMP 修饰下主要表现为何种受体,ADM 以与哪种受体结合为主,结合后作用机制如何等有待于对下丘脑内三种 RAMP 的 mRNA 表达进行研究后才能进一步明确。

原发性高血压患者血浆 ADM 水平随病情加重逐渐升高,且经钙拮抗剂治疗控制血压后无显著改变^[16,17]。说明高血压患者血浆 ADM 水平升高可能与交感神经活性增高有关。高血压时 ADM 的过度合成释放可能对抗血压进一步升高,是参与体内血压自身调节的保护机制之一。

对于中枢源性 ADM 及 CRLR 在应激致高血压时的变化及其病理生理意义,目前尚缺乏充分研究。本研究初步表明在慢性应激致高血压过程中,ADM 及 CRLR 在下丘脑的基因表达呈现动态变化。其中 ADM 的表达在应激刺激第五天即明显升高,在应激

第十天达到高峰,以后逐渐下调。应激初期 ADM 的表达变化与 Shan 等^[9]和 Khan 等^[18]采用急性应激高血压模型的原位杂交法观察结果相反。此差异或许与应激刺激的方式、刺激时间以及检测手段敏感性有关。在应激后期即血压明显升高后,ADM 表达变化也与 Stachniak 等^[15]报道相反,后者的药物性应激高血压大鼠中枢 ADM 表达无明显变化,这可能主要与去氧肾上腺素主要通过收缩外周阻力血管、而慢性应激致高血压则主要通过自主神经调节中枢神经递质改变、神经元活动异常导致交感输出增加从而升高血压有关。因此 ADM 作为一种激素和中枢神经递质或调质,可能在不同高血压类型动物的不同部位表达变化不同。

慢性应激致血压升高过程中 ADM 表达增加,可能是机体维持血压平衡及内环境稳态的一种调节机制。因为侧脑室给予 ADM 后血浆 ACTH 和糖皮质激素下降 55% ~ 58%,下丘脑 PVN 和视上核 c-fos 基因表达以及一氧化氮(nitric oxide, NO)含量增加,而 NO 在下丘脑主要是下位投射神经元的一种抑制性递质,可以抑制下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA 轴),使心血管基本中枢——延髓头端腹外侧区的神经元活动减弱,交感神经紧张性下降。直接微量注射 ADM 到下丘脑可以引起明显的降低血压作用^[13,14]。

目前有关 ADM 特异性受体在应激和高血压中变化的研究较少,仅 Stachniak 等^[16]报道应用去氧肾上腺素使血压升高时,下丘脑 PVN 投射到下位脑干和脊髓的背中侧小细胞 RAMP2 表达下调,此表达变化可能会通过 CRLR 影响 ADM 对自主神经活动的调节。本研究观察到:在慢性应激致高血压过程中,CRLR 在应激刺激第 5 和第 10 天后表达明显上调,而后骤降到正常水平以下。这些结果提示:在应激初期,下丘脑 CRLR 表达随着 ADM 表达升高相应增加,因此在应激后血压升高时 ADM 可能主要通过其特异性受体发挥作用;而在应激后期血压明显升高同时 CRLR 表达出现下调,ADM 可能通过其他受体发挥作用。其中机制及其具体病理生理意义不明,

有待进一步实验研究。

【参考文献】

- [1] 连晓媛,陈奇,张均田. 应激与中枢神经递质及 HPA 轴功能调节. 国外医学生理病理分册, 1998, 18 (4): 371-372
- [2] Maier T, Dai WJ, Csikos T, Jirikowski GF, Unger T, Culman J. Oxytocin pathways mediate the cardiovascular and behavior response to substance P in rat brain. *Hypertension*, 1998, 1 (1Pt2): 480-486
- [3] Lu LM, Li HY, Wang R, Yao T. Effect of stressful stimulations on hypothalamic vasopressin mRNA level of rats. *Acta Physiol Sin*, 1997, 49 (5): 594-598
- [4] 齐永芬,牛大地,王述姮,卜定方,石颜荣,高霖,等. 钙心肌细胞肾上腺髓质素和受体活性修饰蛋白 2 mRNA 含量的变化. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (5): 375-378
- [5] Oliver KR, Kane SA, Salvatore CA, Oliver KR, Kane SA, Salvatore CA, et al. Cloning characterization and central nervous system distribution of receptor activity modifying proteins in the rats. *Eur J Neurosci*, 2001, 14: 618-628
- [6] Stachniak TJ, Krukoff TL. Receptor activity modifying protein 2 distribution in the rat central nervous system and regulation by changes in blood pressure. *J Neuroendocrinol*, 2003, 15 (9): 840-850
- [7] Smith PM, Ferguson AV. Adrenomedullin acts in the rat paraventricular nucleus to decrease blood pressure. *J Neuroendocrinol*, 2001, 13 (5): 467-471
- [8] Xu Y, Krukoff T. Decrease in arterial pressure induced by adrenomedullin in the hypothalamic paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and GABA. *Regul Pept*, 2004, 119 (1-2): 21-30
- [9] Shan J, Krukoff TL. Intracerebroventricular adrenomedullin stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, the sympathetic nervous system and production of hypothalamic nitric oxide. *J Neuroendocrinol*, 2001, 13 (11): 975-984
- [10] 陆利民,汪军,姚泰. 血管紧张素 II 在紧张应激引起大鼠血压升高中的作用. 生理学报, 2000, 52 (5): 371-374
- [11] 朱大年,李鹏. 应激性高血压大鼠血浆和延髓头端腹外侧区脑匀浆中去甲肾上腺素含量的改变. 中国神经科学杂志, 1997, 4 (4): 161-165
- [12] 林善敏,邹文泉,陈靖,李鹏. 肾脏和肾神经在应激、钠盐所致高血压中的作用. 生理学报, 1999, 51 (1): 7-13
- [13] Kennedy SP, Sun D, Oleynek J, Hoth CF, Kong J, Hill RJ. Expression of the rat adrenomedullin receptor or a putative human adrenomedullin receptor does not correlate with adrenomedullin binding or functional response. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 244 (27): 832-837
- [14] Born W, Muff R, Fischer JA. Functional interaction of G protein coupled receptors of the adrenomedullin peptide family with accessory receptor activity modifying proteins (RAMP). *Microw Res Tech*, 2002, 57 (1): 14-22
- [15] 蒋立新,孙宁玲,唐朝枢. 原发性高血压患者血浆肾上腺髓质素、内皮素 1 的改变. 中国循环杂志, 1999, 14 (6): 352-354
- [16] Kuwasako K, Kitamura K, Onitsuka H, Uemura T, Nagashi Y, Kato J, et al. Rat RAMP domains involved in adrenomedullin binding specificity. *FEBS Letters*, 2002, 519 (1-3): 113-116
- [17] 凌文革,尹瑞兴. 肾上腺髓质素与高血压关系的研究进展. 心血管病学进展, 2000, 21 (2): 91-95
- [18] Khan S, Michaud D, Moody TW, Anisman H, Merali Z. Effects of acute restraint stress on endogenous adrenomedullin levels. *Neuroreport*, 1999, 10: 2829-833

(此文编辑 胡必利)