

[文章编号] 1007-3949(2004)12-06-635-04

• 实验研究 •

降钙素基因相关肽在肾性高血压早期及培哌普利或哌唑嗪干预后的变化

叶峰¹, 秦旭平², 邓晟¹, 廖端芳², 李元建¹

(1. 中南大学药学院药理学系, 湖南省长沙市 410078; 2. 南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 药理学; 肾性高血压降钙素基因相关肽的变化; 逆转录聚合酶链反应; 肾性高血压; 降钙素基因相关肽; 培哌普利; 哌唑嗪

[摘要] 为了观察肾性高血压早期降钙素基因相关肽的变化及培哌普利或哌唑嗪降压机制与降钙素基因相关肽的关系, 建立两肾一夹高血压大鼠模型, 通过放射免疫法及逆转录聚合酶链反应观察血压升高早期血浆降钙素基因相关肽浓度及背根神经节降钙素基因相关肽 mRNA 表达的变化。结果发现, 在肾性高血压早期降钙素基因相关肽的浓度及 mRNA 表达明显升高, 培哌普利与哌唑嗪均能显著降低血压, 但降钙素基因相关肽的浓度及 mRNA 表达在两组中的表现有明显差异, 培哌普利能进一步升高血浆降钙素基因相关肽浓度和背根神经节 α 降钙素基因相关肽 mRNA 的表达, 而哌唑嗪却降低降钙素基因相关肽浓度及 mRNA 表达。结果提示, 肾性高血压早期, 大鼠体内降钙素基因相关肽血浆浓度及 mRNA 表达升高, 培哌普利促进降钙素基因相关肽的合成和释放, 可能介导其降压作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Changes of Calcitonin Gene-Related Peptide in Early Phase of Renohypertensive Rats and after Interfered with Perindopril or Prazosin

YE Feng¹, QIN Xu-Ping², DENG Sheng¹, LIAO Duarr Fang², and LI Yuarr Jian¹

(1. Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Central South University, Changsha 410078; 2. The Institute of Pharmacy and Pharmacology, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

[KEY WORDS] Renovascular Hypertension; Calcitonin Gene-Related Peptide; Perindopril; Prazosin; Angiotensin Ⅱ; Rats

[ABSTRACT] **Aim** To explore the response and depressor of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the early phase of the 2-kidney, 1-clip Goldblatt hypertensive rats (2K1C), and the changes of treatment with perindopril or prazosin in this phase.**Methods** The 2K1C hypertensive rats were developed by part clipping the left renal artery. The plasma concentration of angiotensin Ⅱ and CGRP were determined by radioimmunoassay. CGRP mRNA expression was determined by reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).**Results** The level of CGRP in plasma significantly increased compared with control groups ($P < 0.01$). Perindopril significantly decreased the blood pressure concomitantly with an increase in the plasma concentration of CGRP and the expression of CGRP mRNA in dorsal root ganglia (DRG) in the 2K1C Goldblatt rats. Prazosin caused a hypotensive effect compared with 2K1C rats.**Conclusions** These results suggest that the 2K1C Goldblatt model exhibits a compensatory increase of sensory nerve actions, and that the depressor effects of perindopril may be related to stimulation of the synthesis and release of CGRP in the 2K1C Goldblatt hypertensive rats.

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)为一个37个氨基酸组成的神经肽,是辣椒素敏感的感觉神经递质,广泛分布于心血管系统。CGRP具有强效舒血管作用,在调节血管外周阻力中起重要作用^[1]。原发性高血压患者和自发性高血压大鼠血浆CGRP浓度均降低^[2-4]。然而在其它高

血压动物模型辣椒素敏感的感觉神经活性表现有代偿性增加,如去氧皮质醇加盐高血压模型、肾次全切除术加盐大鼠高血压模型,背根神经节中CGRP mRNA的表达及血浆CGRP水平均升高^[5-9]。两肾一夹(2K1C, Golblatt)大鼠模型是研究肾性高血压经典的实验模型,其早期血浆血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)显著升高,对血压的升高起主要作用;而慢性阶段血浆Ang Ⅱ趋于正常,血压的维持主要与神经系统有关^[10,11]。故我们观察了中长期肾性高血压CGRP的变化^[12]。文献[2]报道Ang Ⅱ可抑制CGRP能神经功能。而2K1C高血压早期CGRP是否

[收稿日期] 2003-12-08 [修回日期] 2004-08-27

[基金项目] 国家973基础研究重点资助项目(G2000056905)和国家自然科学基金(30070870)资助

[作者简介] 叶峰,硕士研究生,研究方向为血管活性肽对心血管的作用,E-mail为yf0441@hotmail.com。廖端芳,教授,博士研究生导师,E-mail为dliao@hotmail.com,为本文通讯作者。李元建,教授,博士研究生导师,研究方向为心血管药理。

发生变化尚未见报道。本文以肾血管性高血压大鼠模型早期为研究对象,探讨辣椒素敏感的感觉神经在此高血压模型中的变化,以及培哌普利和哌唑嗪的降压作用是否与促进 CGRP 合成与释放有关。

1 材料和方法

1.1 仪器、试剂及药物

PE-9600 型 PCR 仪(美国 PE 公司)。鼠尾测压仪 HX-1 型(中南大学湘雅医学院)。BL-New Century 生物机能实验系统(成都泰盟科技公司生产)。培哌普利(法国施维雅制药公司);哌唑嗪(Sigma 公司);CGRP 和 Ang Ⅱ检测试剂盒(北京东亚免疫研究所);引物(大连 Takara 公司);Trizol(美国 Gibco 公司);逆转录聚合酶链反应(reversetranscription-polymerase chain reaction, RT-PCR)试剂盒(MBI 公司)。

1.2 实验动物及肾性高血压模型的建立

健康雄性 SD 大鼠 50 只,体重 220~250 g,由中南大学湘雅医学院实验动物学部提供。实验性喂养一周,鼠尾测压仪测定基础血压。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 60 mg/kg 麻醉后,从腹部左侧切口,分离左侧肾动脉,用直径为 0.3 mm 的银夹夹住肾动脉使其狭窄后放回腹腔,恢复原位,关闭腹腔。假手术组实行相同的手术程序而不结扎肾动脉。术后 3 天,尾动脉测定收缩压,连续观察血压的变化。

1.3 实验动物分组与给药

肾性高血压大鼠随机分为给药组和非给药组,给药组在术后 2 周通过饮水分别给予培哌普利 [3 mg/(kg·d)] 或哌唑嗪 [5 mg/(kg·d)],连续给药 7 天。非给药组大鼠正常饮食作为平行观察血压的变化。假手术组随机分为给药组和非给药组,给药组给药剂量同肾性高血压给药组。每组动物数均为 6 只。

1.4 血管紧张素 Ⅱ浓度的测定

颈动脉取血 2 mL,于 4℃、3 000 r/min 离心 10 min,取血浆于 -80℃ 保存备用。采用放射免疫法测定血浆 Ang Ⅱ浓度。

1.5 血浆降钙素基因相关肽浓度的测定

颈动脉取血 2 mL,置于含 10% Na₂EDTA、抑肽酶的试管中,于 4℃、3 000 r/min 离心 15 min,取血浆于 -80℃ 保存备用。采用放射免疫法测定血浆 CGRP 浓度。

1.6 总 RNA 的提取和背根神经节降钙素基因相关肽 mRNA 表达的测定

迅速切取大鼠脊柱两侧胸腰段背根神经节,按

Trizol 试剂操作说明提取总 RNA,溶于无 RNA 酶污染的灭菌水中,确定 RNA 的完整性以及浓度和纯度。采用 RT-PCR 测定 mRNA 的表达,20 μL 逆转录体系中含总 RNA 3 μg、oligo (dT) 0.1 g、Rnase 抑制剂 20 u、逆转录酶 5 u。阴性对照除不含逆转录酶或 RNA 模板外,其余同上述反应。α-CGRP 序列长度 318 bp,上游引物 5'-AAGTTCTCCCTTTCCCTGGT-3',下游引物 5'-GGTGGGCACAAAGTTGTCT-3';β-CGRP 序列长度 264 bp,上游引物 5'-TCAGCTTTGGAGAG-CAGCCT-3',下游引物 5'-GGTGGGCACAAAGT-TGTCT-3';β-actin 序列长度 422 bp,上游引物 5'-GAGACCTCAACACCCCAGCC-3',下游引物 5'-TCGGGGCATCGGAACCGCTCA-3'。从逆转录产物中取 5 μL 用来扩增。扩增条件为 94℃ 变性 30 s → 58℃ 复性 30 s → 72℃ 延伸 45 s。CGRP(α 和 β) 和 β-actin 扩增循环数分别为 28 和 25。取等体积 PCR 产物于 1.7% 含溴乙啶的琼脂糖凝胶中电泳。紫外摄影结果以 CGRP 与 β-actin 区带的吸光度比值表示,并将正常组的比值定为 100%。

1.7 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间总变异用 ANOVA 检验,组间差异采用非配对性 *t* 检验。

2 结果

2.1 血压的变化

手术前,各组大鼠体重和基础血压无明显差异。肾动脉结扎术后,收缩压持续显著升高,并维持在稳定的高血压水平,平均动脉压也明显升高。正常组和假手术组大鼠收缩压无明显变化。肾性高血压组给予培哌普利或哌唑嗪治疗能显著降低收缩压和平均动脉压,给药治疗一周后血压达到正常水平;假手术组给予培哌普利或哌唑嗪治疗收缩压和平均动脉压维持在正常水平(表 1, Table 1)。

2.2 血浆血管紧张素 Ⅱ的变化

肾性高血压组与正常组和假手术组相比血浆 Ang Ⅱ水平明显升高。肾性高血压组给予培哌普利治疗后血浆 Ang Ⅱ水平显著降低($P < 0.01$),而哌唑嗪治疗后,Ang Ⅱ水平却无降低(表 2, Table 2)。

2.3 血浆降钙素基因相关肽的浓度

与正常组和假手术组相比,肾性高血压组血浆 CGRP 浓度明显升高。培哌普利治疗后血浆 CGRP 浓度显著升高,而哌唑嗪治疗后血浆 CGRP 浓度降低(表 2, Table 2)。

表 1. 培哚普利或哌唑嗪对大鼠收缩压和平均动脉压的影响

Table 1. Effect of perindopril or prazosin on systolic arterial pressure and mean arterial pressure in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, mm Hg)

分 组	收缩压			平均动脉压		
	手术前	手术后		手术前	手术后	
		给药前	给药后		给药前	给药后
正常组	110.2 ± 12.6	118.0 ± 13.6	112.4 ± 17.0	91.2 ± 18.7	92.8 ± 20.1	90.6 ± 16.1
假手术组	110.6 ± 9.7	111.8 ± 12.9	107.7 ± 10.5	90.3 ± 16.3	98.4 ± 13.1	88.7 ± 14.6
假手术+ 哌唑嗪组	108.8 ± 8.5	109.8 ± 9.2	102.1 ± 11.4	89.6 ± 9.5	90.2 ± 9.2	84.6 ± 9.0
假手术+ 培哚普利组	107.0 ± 5.6	108.5 ± 6.1	93.5 ± 14.6	93.0 ± 10.2	95.0 ± 8.7	80.1 ± 13.9
高血压组	109.4 ± 10.6	147.7 ± 16.5 ^a	148.0 ± 8.1	83.9 ± 6.8	130.4 ± 18.3 ^a	116.2 ± 8.0
高血压+ 哌唑嗪组	115.5 ± 10.0	145.6 ± 19.2 ^a	104.8 ± 21.0 ^b	98.8 ± 15.1	122.3 ± 9.1 ^a	92.8 ± 20.1 ^b
高血压+ 培哚普利组	109.0 ± 9.2	150.0 ± 6.1 ^a	98.5 ± 21.3 ^b	85.0 ± 9.5	132.0 ± 20.4 ^a	80.2 ± 21.3 ^b

a: $P < 0.01$, 与正常组或假手术组比较; b: $P < 0.01$, 与肾性高血压组比较。

表 2. 培哚普利或哌唑嗪对大鼠血浆血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 和降钙素基因相关肽浓度的影响Table 2. Effect of perindopril or prazosin on plasma concentrations of Ang I and CGRP in rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$, $\mu\text{g/L}$)

分 组	血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$	降钙素基因相关肽
正常组	73.6 ± 12.2	48.3 ± 15.3
假手术组	74.8 ± 13.4	51.6 ± 13.9
假手术+ 哌唑嗪组	77.6 ± 18.5	50.0 ± 23.8
假手术+ 培哚普利组	59.0 ± 10.8	52.0 ± 22.1
高血压组	109.6 ± 16.6 ^a	94.1 ± 18.7 ^a
高血压+ 哌唑嗪组	107.8 ± 8.7	70.0 ± 17.1 ^b
高血压+ 培哚普利组	64.0 ± 10.2 ^b	121.0 ± 22.1 ^{cd}

a: $P < 0.01$, 与正常组和假手术组比较; b: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$, 与高血压组比较; d: $P < 0.01$, 与高血压+ 哌唑嗪组比较。

2.4 降钙素基因相关肽 mRNA 的表达

与正常组相比, 肾性高血压组脊髓背根神经节 α -CGRP mRNA 的表达增加($P < 0.05$), 培哚普利治疗能明显增加 β -CGRP mRNA 的表达, 而哌唑嗪治疗则明显降低其表达($P < 0.05$; 表 3, Table 3)。琼脂糖电泳结果见图 1 (Figure 1)。

3 讨论

降钙素基因相关肽(CGRP)为目前已知的舒血管作用最强的物质, 包括 α 、 β 两种亚型。我们的研究表明主要是 β -CGRP作用于心血管系统^[13, 14]。含CGRP的初级感觉神经元胞体位于背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)中, CGRP神经纤维广泛分布于血管组织, 对血压的调节起重要作用。有报道 α -CGRP基因敲除小鼠基础血压升高^[15]; 新生鼠用辣椒素破坏辣椒素敏感的感觉神经(CGRP能神经)

表 3. 培哚普利或哌唑嗪对大鼠背根神经节降钙素基因相关肽 mRNA 表达的影响

Table 3. Effect of perindopril or prazosin on the expression of CGRP mRNA in DRG ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

分 组	α -降钙素基因相关肽 mRNA	β -降钙素基因相关肽 mRNA
正常组	100.0 ± 8.0	100.0 ± 6.0
假手术组	101.0 ± 7.6	102.0 ± 5.2
假手术+ 哌唑嗪组	101.5 ± 8.4	99.0 ± 6.0
假手术+ 培哚普利组	101.6 ± 9.4	106.0 ± 5.6
高血压组	120.0 ± 9.8 ^a	103.1 ± 4.5
高血压+ 哌唑嗪组	107.0 ± 11.6 ^b	101.0 ± 6.2
高血压+ 培哚普利组	125.0 ± 11.2 ^{bc}	107.0 ± 6.2

a: $P < 0.05$, 与正常组和假手术组比较; b: $P < 0.05$, 与高血压组比较; c: $P < 0.01$, 与高血压+ 哌唑嗪组比较。

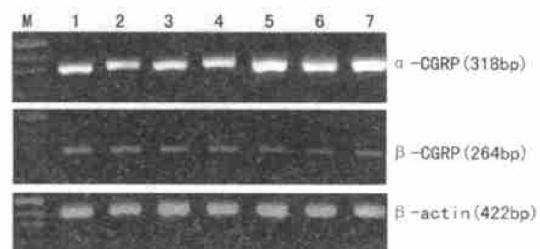


图 1. 背根神经节降钙素基因相关肽 mRNA 电泳图 M 为 PUC 19 DNA/Msp iv(Hpa I); 1 为正常组; 2 为假手术组; 3 为假手术+ 哌唑嗪组; 4 为假手术+ 培哚普利组; 5 为高血压组; 6 为高血压+ 哌唑嗪组; 7 为高血压+ 培哚普利组。

Figure 1. The electrophoresis conclusions of CGRP mRNA in DRG

后,高盐可诱发高血压^[16];鞘内注射辣椒素(耗竭脊髓内CGRP)加剧肾包裹性高血压的发展^[17]。本研究发现2K1C大鼠血浆CGRP浓度和DRG中 α -CGRP表达明显增高。CGRP的升高可能是机体对血压升高的一种代偿性反应^[1]。

肾素-血管紧张素系统在维持机体血压方面起重要作用。在肾血管结扎后4周内,血压升高主要通过激活肾素-血管紧张素系统,生成Ang II维持血管张力、影响体内水电解质平衡实现^[12]。另外,Ang II也可增强血管对交感神经递质或其他缩血管物质的敏感性。本研究结果发现,肾性高血压大鼠血浆Ang II明显增高,培哌普利或哌唑嗪干预后血压明显降低,但血浆Ang II变化却不同,前者血浆Ang II明显降低,而后者与高血压组相比却没有改变。两药干预后,血浆CGRP浓度和DRG中 α -CGRP表达也存在差异,血浆CGRP浓度和DRG中 α -CGRP表达在培哌普利干预组显著增加,而在哌唑嗪干预组却降低, β -CGRP的表达在两组均无明显变化。给予哌唑嗪或培哌普利干预后大鼠Ang II和CGRP的不同变化可能是由于这两种降压药的不同作用机制所致。哌唑嗪通过阻断肾上腺素 α_1 受体,舒张血管平滑肌产生降压作用并取消了由于血压升高引起的CGRP代偿性升高,也可能是由于哌唑嗪阻断肾上腺素 α_1 受体后,去甲肾上腺素作用于感觉神经突触前膜 α_2 去甲肾上腺素受体,抑制CGRP释放^[18]。培哌普利为血管紧张素转换酶抑制剂,降压作用主要通过减少Ang II生成和减少缓激肽的降解等途径。Kawasaki等^[2,19]研究发现,Ang II可抑制自发性高血压大鼠肠系膜感觉神经末梢CGRP的释放。本研究也发现培哌普利干预后导致CGRP水平增高,推测与抑制全身和局部Ang II的形成以及促进CGRP的合成和释放有关,这种作用只与 α -CGRP有关。

目前认为,CGRP与其他血管活性物质(如去甲肾上腺素、Ang II)存在着相互作用,共同调节外周血管阻力,如Ang II可通过突触前Ang II受体抑制CGRP能神经功能,CGRP可通过突触后机制抑制肾上腺素能神经引起的血管收缩^[2,18,19],在高血压发病中,形成了血管活性肽的网络调节。肾性高血压大鼠早期血压升高的主要原因是Ang II升高,伴有 α -CGRP代偿性合成与释放增加。培哌普利通过抑制Ang II生成,促进 α -CGRP合成与释放,可能是部分

介导其降压作用的机制之一。

[参考文献]

- [1] Li YJ, Peng J. The cardioprotection of calcitonin gene-related peptide-mediated preconditioning. *Eur J Pharmacol*, 2002, **442** (3): 173-177
- [2] Kawasaki H, Takenaga M, Araki H, Futagami K, Gomita Y. Angiotensin II inhibits neurotransmission of calcitonin gene-related peptide-containing vasodilator nerves in mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, **284**: 508-515
- [3] Kawasaki H. Effects of chronic administration of antihypertensive drugs on vasodilation mediated by calcitonin gene-related peptide-containing vasodilator nerves in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1992, **19**: 569-573
- [4] Tang JA, Xu D, Yuan XQ, Meng ZH, Cheng FR, Chen MZ, et al. Calcitonin gene-related peptide in the pathogenesis and treatment of hypertension. *Chin Med J*, 1989, **102**: 897-901
- [5] Supowit SC, Gururaj A, Ramana CV, Westlund KN, DiPette DJ. Enhanced neuronal expression of calcitonin gene-related peptide in mineralocorticoid-salt hypertension. *Hypertension*, 1995, **25**: 1333-1338
- [6] Supowit SC, Zhao H, Hallman DM, DiPette DJ. Calcitonin gene-related peptides is a depressor of deoxycorticosterone-salt hypertension in the rat. *Hypertension*, 1997, **29**: 945-950
- [7] Supowit SC, Zhao H, Hallman DM, DiPette DJ. Calcitonin gene-related peptides is a depressor in subtotal nephrectomy hypertension in the rat. *Hypertension*, 1998, **31**: 391-396
- [8] 秦旭平, 廖端芳, 李元建. 血管平滑肌细胞增殖及其调控. *中国动脉硬化杂志*, 2001, **9** (5): 450-454
- [9] Katki KA, Supowit SC, DiPette DJ. Role of calcitonin gene-related peptide and substance P in Dahl-salt hypertension. *Hypertension*, 2001, **38**: 679-682
- [10] Kagiyama S, Varela A, Phillips MI, Galli SM. Antisense inhibition of brain renin-angiotensin system decreased blood pressure in chronic 2-kidney, 1-clip hypertensive rats. *Hypertension*, 2001, **3** (2): 371-375
- [11] 秦旭平, 叶峰, 廖端芳, 朱炳阳, 李元建. 肾性高血压大鼠血浆中降钙素基因相关肽与血管紧张素 II 浓度及肾素活性的变化. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (6): 469-472
- [12] Qin XP, Ye F, Liao DF, Li YJ. Involvement of calcitonin gene-related peptide in the depressor effects of losartan and perindopril in rats. *Eur J Pharmacol*, 2003, **464** (1): 63-67
- [13] Deng PY, Ye F, Zhu HQ, Cai WJ, Deng HW, Li YJ. An increase in the synthesis and release of calcitonin gene-related peptide in two-kidney, one-clip hypertensive rats. *Regul Pept*, 2003, **114** (2-3): 175-182
- [14] Hu CP, Peng J, Xiao L, Ye F, Deng HW, Li YJ. Effect of age on alpha-calcitonin gene-related peptide-mediated delayed cardioprotection induced by intestinal preconditioning in rats. *Regul Pept*, 2002, **107** (1-3): 137-143
- [15] Ganula PR, Zhao H, Supowit SC, Wimalawansa SI, DiPette DJ, Westlund KN. Increased blood pressure in alpha-calcitonin gene-related peptide/calcitonin gene knockout mice. *Hypertension*, 2000, **35** (1): 470-475
- [16] Wang DH, Li J, Qiu J. Salt-sensitive hypertension induced by sensory denervation: introduction of a new model. *Hypertension*, 1998, **32** (4): 649-653
- [17] Burg M, Zahm DS, Knuepfer MM. Intrathecal capsaicin enhances one-kidney renal wrap hypertension in the rat. *J Auton Nerv Syst*, 1994, **50** (2): 189-199
- [18] Kawasaki H, Nuki C, Saito A, Takasaki K. Adrenergic modulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve-mediated vasodilation in the rat mesenteric resistance vessel. *Brain Research*, 1990, **506**: 287-290
- [19] Kawasaki H, Okazaki M, Nakatsuma A, Mimaki Y, Araki H, Gomita Y. Long-term treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor restores reduced calcitonin gene-related peptide-containing vasodilator nerve function in mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Jpn J Pharmacol*, 1999, **79** (2): 221-229

(此文编辑 文玉珊)