

阿托伐他汀对高血压大鼠动脉血压和血管平滑肌细胞离子泵活性的影响

葛长江, 吕树铮, 陈韵岱

(首都医科大学附属北京安贞医院心内科, 北京市 100029)

[关键词] 病理学与病理生理学; 阿托伐他汀; 高血压; 血管平滑肌; 离子泵

[摘要] 目的 探讨阿托伐他汀对自发性高血压大鼠的动脉血压及血管平滑肌细胞离子泵活性的影响。方法

选用 12 周龄自发性高血压大鼠 12 只, 随机分为阿托伐他汀治疗组(简称阿托伐他汀组, $n=6$)和蒸馏水组($n=6$), 并以正常血压大鼠作为对照组。阿托伐他汀组大鼠给以阿托伐他汀[50 mg/(kg·d)]加适量蒸馏水灌胃 12 周。观察给药前后大鼠尾动脉血压的变化, 测定大鼠血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇浓度, 以及胸主动脉平滑肌细胞 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活性。结果 阿托伐他汀组动脉血压显著低于蒸馏水组(161.8 ± 9.9 比 192.9 ± 10.4 , $P < 0.05$); 阿托伐他汀组大鼠胸主动脉平滑肌细胞 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活性明显高于蒸馏水组(5.20 ± 0.54 比 3.06 ± 0.42 , $P < 0.01$; 4.62 ± 0.35 比 2.98 ± 0.17 , $P < 0.05$), 略低于对照组, 而蒸馏水组则显著低于对照组(3.06 ± 0.42 比 5.92 ± 0.31 , $P < 0.01$; 2.98 ± 0.17 比 4.86 ± 0.26 , $P < 0.01$)。 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性、 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活性与血压呈显著负相关($r = -0.426$, $r = -0.359$, $P < 0.01$)。结论 长期应用阿托伐他汀可以显著降低自发性高血压大鼠血压。阿托伐他汀可能通过增高血管平滑肌细胞离子泵活性而影响血压形成的过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Atorvastatin on Aortic Blood Pressure and Ion Pump Activities of Vascular Smooth Muscle Cell in Spontaneously Hypertensive Rats

GE Chang-Jiang, LU Shu-Zheng, and CHEN Yur-Dai

(Department of Cardiology, Capital University of Medical Sciences, Beijing Anzhen Hospital, Beijing 100029, China)

[KEY WORDS] Atorvastatin; Hypertension; Vascular Smooth Muscle; Ion Pump

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the effects of atorvastatin on aortic blood pressure and ion pump activities of vascular smooth muscle cell in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** Twelve twelve-week-old SHR were randomized into atorvastatin treated group (ATV group, $n=6$) and distilled water group (DW group, $n=6$), and Wistar-Kyoto rats (WKY) as normal controls. Atorvastatin and appropriate amounts of distilled water were administered to ATV group for 12 weeks by gavage. Blood pressure of caudal artery was examined before and after treatment, serum titres of TC, TG, LDLC, activities of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ of thoracic aorta smooth muscle cell were measured. **Results** Blood pressure in ATV group was much lower than that in DW group (161.8 ± 9.9 vs 192.9 ± 10.4 , $P < 0.05$). Activities of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ of thoracic aorta smooth muscle cell were remarkably higher in both ATV group and WKY group than those in DW group (5.20 ± 0.54 vs 3.06 ± 0.42 , $P < 0.01$; 4.62 ± 0.35 vs 2.98 ± 0.17 , $P < 0.05$), (5.92 ± 0.31 vs 3.06 ± 0.42 , $P < 0.01$; 4.86 ± 0.26 vs 2.98 ± 0.17 , $P < 0.01$). Activities of $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ of thoracic aorta smooth muscle cell were negatively relative to blood pressure ($r = -0.426$, $r = -0.359$, $P < 0.01$). **Conclusion** Long-term administration of atorvastatin can effectively reduce blood pressure by elevating the ion pump activities of vascular smooth muscle cell.

高血压的发病过程涉及血管结构的改变和血管反应性的异常增高, 前者主要表现为血管平滑肌细胞肥大、增殖及结缔组织含量增加, 后者则表现为血

管对各种缩血管物质反应性的明显增高。 Ca^{2+} 内环境的改变参与了高血压病的发生发展过程, 且与 Ca^{2+} 转运密切相关的细胞膜离子泵活性存在异常改变^[1]。国外研究表明他汀类药物如阿托伐他汀具有抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移、促进血管平滑肌细胞凋亡及改善内皮功能等多向性效应^[2]。在高血压血管重塑的过程中, 阿托伐他汀对血压和血管平滑肌细胞离子泵活性的影响, 目前尚不清楚。我们应用自发性高血压大鼠模型以探讨阿托伐他汀对动

[收稿日期] 2005-07-25

[修回日期] 2006-05-16

[作者简介] 葛长江, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管内科, 联系电话 010-64456473, E-mail 为 cjl1116@163.com。吕树铮, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向是冠心病介入治疗。陈韵岱, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向是冠心病介入治疗。

脉血压的影响及其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

阿托伐他汀(atorvastatin, ATV; 商品名立普妥)由大连辉瑞制药有限公司惠赠,批号 15837001; Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;牛血清白蛋白和考马斯亮蓝 G-250 购自上海生物工程有限公司;血脂检测试剂盒购自日本第一化学公司。低温冷冻离心机(Sigma 公司,德国);紫外分光光度计(上海第三仪器厂产);电子天平(Sartorius 公司,德国);恒温循环水浴箱(Heto 公司,丹麦);超低温冰箱(SANYO 公司,日本);HX-⑥大鼠血压心率测定仪(湖南医科大学心血管生理实验室研制)。

1.2 实验动物及分组处理

选择 12 周龄健康雄性自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR) 12 只,体重 200.0 ± 1.6 g,随机分为蒸馏水(distilled water, DW)组和 ATV 组,每组 6 只。同周龄和体重的健康雄性 Wistar Kyoto 大鼠 6 只作为正常血压对照组。上述大鼠均购自第二军医大学药理学教研室。

所有大鼠都普通颗粒饲料喂养,自由饮水。其中 ATV 组大鼠给以 $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ ATV 加适量蒸馏水灌胃,DW 组和对照组每天同时用等量蒸馏水灌胃。实验 12 周。

1.3 大鼠尾动脉收缩压的测量

用 HX-⑥大鼠血压心率测定仪测量给药前和给药 12 周后大鼠安静、清醒状态尾动脉收缩压,每只大鼠连续测量 3 次,取均值。

1.4 取材和处理

实验结束时,所有大鼠用 2% 戊巴比妥钠($45 \text{ mg}/\text{kg}$)腹腔注射麻醉后,快速切开颈部,小心取出胸主动脉约 2 cm 投入 Hank 氏液中,迅速抽取 Hank 氏液约 5 mL 将血管内的血液冲洗干净,一部分血管将外膜剥离掉,在低温条件下加入匀浆介质($\text{pH} 7.5$, 250 mmol/L 蔗糖, 5 mmol/L Tris-HCl),在匀浆器制成 2% 的组织匀浆待测。

1.5 血脂测定

将 2 mL 动脉血静置后, $2 \text{ kr}/\text{min}$ 离心 5 min,分离血清,然后用日立 7600 全自动生物化学分析仪以酶比色测定法检测血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)及高密度脂蛋白胆固醇(high density lipid cholesterol, HDLC)。

1.6 血管平滑肌组织 ATP 酶活性测定

用 Bradford 法测定组织匀浆悬液中的蛋白含量。按照试剂盒说明书,以比色定磷法检测血管平滑肌组织 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶的活性。以每小时每克蛋白分解 ATP 产生 1 mmol 无机磷的量为 ATP 酶活性单位[即 $\text{mmol}/(\text{g} \cdot \text{h})$]。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差别显著性采用 t 检验和方差分析。以上统计处理均采用 SPSS 软件。

2 结果

2.1 各组大鼠尾动脉收缩压的比较

给药前,ATV 组和 DW 组大鼠收缩压无差别,但均显著高于对照组。给药 12 周后,DW 组大鼠尾动脉收缩压仍持续升高,与给药前相比,差异有显著性($P < 0.05$)明显高于对照组(表 1),而 ATV 组大鼠收缩压并不升高,与 DW 组相比,差异有显著性统计学意义。

表 1. 各组大鼠收缩压的测定结果比较(mm Hg , $\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	给药前	给药 12 周后
对照组	6	110.9 ± 6.3	120.1 ± 7.5
DW 组	6	167.5 ± 5.4^a	192.9 ± 10.4^{bc}
ATV 组	6	168.7 ± 6.0^a	161.8 ± 9.9^{ac}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与 DW 组比较; e 为 $P < 0.05$, 与给药前比较。

2.2 各组大鼠血清总胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇含量的变化

实验结束时 ATV 组血清 TC、TG 及 HDLC 含量显著低于 DW 组和对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$, 表 2)。

表 2. 各组大鼠血清总胆固醇、甘油三酯和高密度脂蛋白胆固醇含量的比较(mmol/L , $\bar{x} \pm s$)

分 组	<i>n</i>	TC	TG	HDL-C
对照组	6	1.49 ± 0.38	1.09 ± 1.46	0.82 ± 0.23
DW 组	6	1.53 ± 0.22	1.08 ± 1.55	0.79 ± 0.13
ATV 组	6	1.03 ± 0.16^{bd}	0.71 ± 0.19^{bd}	0.62 ± 0.14^{ac}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 DW 组比较。

2.3 各组大鼠血管平滑肌细胞离子泵活性的变化

自发性高血压大鼠(SHR)血管平滑肌细胞 Na^+ - K^+ -ATP 酶和 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性均明显降

低,经阿托伐他汀治疗后有不同程度的恢复(表 3)。

表 3. 各组大鼠血管平滑肌细胞离子泵活性的比较

分 组	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶活性 [mmol/(g·h)]	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶活性 [mmol/(g·h)]
对照组	5.92 ± 0.31	4.86 ± 0.26
DW 组	3.06 ± 0.42 ^b	2.98 ± 0.17 ^b
ATV 组	5.20 ± 0.54 ^{ad}	4.62 ± 0.35 ^{ac}

a 为 $P > 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与 DW 组比较。

2.4 自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞离子泵活性与血压的关系

Na⁺-K⁺-ATP 酶活性和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性与血压呈显著负相关($r = -0.426$ 和 $r = -0.359$, $P < 0.01$)。

3 讨论

血管平滑肌细胞内 Ca²⁺ 的稳定对于血管平滑肌的舒缩功能起着重要的调节作用。细胞内 Ca²⁺ 稳态的维持又受到细胞离子泵的调控,如胞内 Ca²⁺ 外流主要通过 Na⁺-Ca²⁺ 交换和膜上 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶即钙泵,而前者离子交换所需的能量主要来自 Na⁺-K⁺-ATP 酶建立的胞内外 Na⁺ 梯度。当 ATP 酶激活时,漏流入细胞或兴奋时进入细胞内的 Ca²⁺ 得以清除^[3]。然而当离子泵活性发生异常改变时,必然引致细胞内 Ca²⁺ 稳态失衡。已知高血压病不仅是血液动力学异常疾病,同时也是代谢性疾病,常伴有多种物质和离子泵活性的异常改变,高血压的发病与细胞膜离子转运缺陷密切相关。在高血压的发生发展过程中,多种细胞膜如红细胞膜、血管平滑肌细胞膜等均出现遗传性缺陷,表现在细胞膜的稳定性下降,对单价及双价阳离子的转运功能异常^[4]。

本研究结果发现, DW 组 SHR 平滑肌细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性均显著低于对照组, Na⁺-K⁺-ATP 酶活性降低使得细胞内外 Na⁺ 浓度梯度降低,细胞内经 Na⁺-Ca²⁺ 交换的 Ca²⁺ 排出减少,导致细胞内 Ca²⁺ 增多,而钙泵活性降低则造成细胞内 Ca²⁺ 超载,从而促进了高血压病的发病过程。

高血压状态下,由于血管持续高应力作用导致血管内皮功能障碍,加之长期血管痉挛所致的内皮缺血缺氧以及氧自由基产生增加,使得血管舒缩功能障碍、血管平滑肌细胞生长失调等,是高血压血管重塑发生发展的重要因素^[5]。高血压时血管结构的

改变主要表现为血管平滑肌细胞增殖、肥大及结缔组织含量增加等,造成血管壁增厚,特别是中层肥厚,血管壁与腔之间的比例明显加大,血流阻力和血管反应性增加^[3,6]。高血压时血管平滑肌细胞、内皮细胞、基质成分以及血小板和单核/巨噬细胞通过旁分泌-自分泌机制产生多种生物活性物质调节自身生长,从而在高血压血管壁肥厚的病程中发挥重要作用。

甲羟戊酸(mevalonate)是 3 羟基-3 甲基戊二酰辅酶 A(HMG-CoA)还原酶作用的产物,是所有类异戊二烯(isoprenoid)的前体。甲羟戊酸通路的产物有胆固醇、泛醌、异戊二烯(isoprene)、焦磷酸法尼酯(farnesyl pyrophosphate)及焦磷酸香叶酯(geranyl pyrophosphate)等。研究表明细胞生长和甲羟戊酸通路密切相关,中间的类异戊二烯是多种调节蛋白翻译后修饰的一个重要因子^[7]。甲羟戊酸的代谢产物如胆固醇等参与 DNA 的合成和细胞生长,而且是细胞生长和增殖所必需的^[8]。他汀类(statins)药物是近十几年开发的 HMG-CoA 还原酶抑制剂,近期临床实验和基础研究表明:他汀类药物不但具有降低血浆胆固醇的主要作用,而且还涉及不依赖于其降血脂特性的非调脂多向性效应^[12]如抑制血管平滑肌细胞增殖与迁移、促进血管平滑肌细胞凋亡、改善内皮功能、抗炎症反应及抑制血小板聚集等。最近 Tesfamariam 等^[9]研究发现,阿托伐他汀可以减少体外培养雄性 SD 大鼠主动脉平滑肌细胞内游离 Ca²⁺ 浓度,而且显著抑制苯福林或血管紧张素 Ⅱ诱导的血管收缩过程,但上述作用可为甲羟戊酸所逆转。作者认为阿托伐他汀可能通过增高肌浆网 Ca²⁺-ATP 酶、血浆膜 Ca²⁺-ATP 酶的活性和或 Na⁺-Ca²⁺ 交换而使细胞内 Ca²⁺ 浓度降低。

本研究结果显示,阿托伐他汀能够增高血管平滑肌细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性,显著降低 SHR 的动脉血压,提示两者之间存在密切相关性。阿托伐他汀可能通过影响血管平滑肌细胞膜离子泵活性以调节细胞内 Ca²⁺ 稳态,从而起到稳定血压的作用。可能的机制为:其一,抑制血管平滑肌细胞增殖肥大、迁移及促进细胞凋亡,从而逆转血管重塑过程中细胞生长和细胞凋亡间的失衡状态^[10];其二,逆转血管内皮功能失调,恢复一氧化氮(nitric oxide, NO)/血管紧张素 Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)/内皮素 1 的平衡,改善内皮功能。阿托伐他汀通过激活牛内皮细胞 NO 合酶(nitric oxide synthase, NOS)使内皮 NO 释放显著增加,减少超氧化物(O²⁻)的产生^[11]。Wassmann 等^[12]研究发现,阿托伐他汀

使卡巴胆碱诱导的 SHR 主动脉舒张功能增强而显著降低了 Ang Ⅱ诱导的血管收缩。同时显著减少了主动脉血管紧张素Ⅰ受体 mRNA 及 NAD(P)H 氧化酶关键性亚单位 p22 phox mRNA 的表达。并使活性氧的产量明显降低而血管壁内皮细胞 NOS 的活性和 mRNA 的表达显著上调;其三,稳定细胞膜、改善血管平滑肌细胞内 Ca^{2+} 内环境及离子转运功能,抑制血管平滑肌细胞收缩与生长,使血管反应性趋于正常。最近报道辛伐他汀可以显著增高心肌细胞肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶活性和蛋白表达^[13],减少高血压左心室肥厚过程中细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的过度升高,改善 Ca^{2+} 内环境而减少细胞凋亡,抑制左心室肥厚的过程。该研究提示 statins 药物可能有改善血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 稳态和稳定血压的作用,

总之,长期应用阿托伐他汀可以显著降低血压。阿托伐他汀可能通过增高血管平滑肌细胞离子泵活性而影响血压形成的过程。

[参考文献]

- [1] Neusser M, Golinski P, Zhu Z, Zidek W, Tepel M. Thapsigargin insensitive calcium pools in vascular smooth muscle cells [J]. *Clin Exp Hypertens*, 1999, **21** (4): 395-405
- [2] Bellosa S, Ferri N, Arnaboldi L, Bernini F, Paoletti R, Corsini A. Pleiotropic effects of statins in atherosclerosis and diabetes [J]. *Diab Care*, 2000, **23**

(Suppl 2B): 72-78

- [3] 韩启德,文允镒. 血管生物学[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1997; 92-93
- [4] 朱树森,符云峰,卢振敏. 肥胖儿童红细胞钙镁水平及 ATP 酶活性与高血压关系的探讨[J]. 中国实用儿科杂志, 2001, **16** (3): 148-150
- [5] 张建,华琦. 高血压与血管内皮功能损伤. 高血压病个体化治疗[M]. 北京:人民教育出版社, 2001; 130-136
- [6] Dzau VJ, Gibbons GH, Morishita R, Pratt RE. New perspectives in hypertension research. Potentials of vascular biology [J]. *Hypertension*, 1994, **23** (6 Pt 2): 1 132-140
- [7] Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273** (37): 24 266-271
- [8] Corsini A, Pazzucconi F, Arnaboldi L, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R. Direct effects of statins on the vascular wall [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1998, **31** (5): 773-778
- [9] Tesfamariam B, Frohlich BH, Gregg RE. Differential effects of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin on Ca^{2+} release and vascular reactivity [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999, **34** (1): 95-101
- [10] Ge CJ, Hu SJ, Wu YS, Chen NY. Effects of atorvastatin on vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Zhejiang Univ Sci*, 2003, **4** (5): 612-615
- [11] Dobrucki LW, Kalinowski L, Dobrucki IT. Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium [J]. *Med Sci Monit*, 2001, **7** (4): 622-627
- [12] Wassmann S, Laufs U, Baumer AT, Muller K, Ahlborn K, Linz W, et al. HMG-CoA reductase inhibitors improve endothelial dysfunction in normcholesterolemic hypertension via reduced production of reactive oxygen species [J]. *Hypertension*, 2001, **37** (6): 1 450-457
- [13] Zheng X, Hu SJ. Effects of simvastatin on cardiac performance and expression of sarcoplasmic reticular calcium regulatory proteins in rat heart [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, **26** (6): 696-704

(此文编辑 胡必利)