

[文章编号] 1007-3949(2007)15-01-0011-04

• 实验研究 •

半边莲生物碱抑制肾性高血压大鼠 内皮素 1 mRNA 和蛋白表达

张晓玲¹, 薛冰¹, 李莉¹, 陈融¹, 任冬梅², 李瑞峰¹, 胡维诚¹

(山东大学 1. 医学院; 2. 药学院, 山东省济南市 250012)

[关键词] 病理学与病理生理学; 半边莲生物碱; 内皮素 1; 肾性高血压; 原位杂交; 免疫组织化学染色; 放射免疫技术

[摘要] 目的 观察半边莲生物碱对肾性高血压大鼠内皮素 1 mRNA 表达、蛋白合成和释放的影响。方法 采用两肾一夹高血压大鼠模型, 随机分为高血压组、半边莲组、卡托普利组和假手术组。用原位杂交技术观察大鼠外周血白细胞内皮素 1 mRNA 的表达, 应用免疫组织化学染色计数大鼠主动脉内皮细胞铺片内皮素阳性细胞率(反映内皮素 1 蛋白的合成), 用放射免疫技术测定大鼠血浆内皮素的含量。结果 与假手术组比较, 高血压组外周血白细胞内皮素 1 mRNA 表达增强(34.64% ± 8.39% 比 9.34% ± 4.47%, $P < 0.05$), 动脉内皮细胞合成内皮素增多(7.42% ± 0.24% 比 1.58% ± 0.24%, $P < 0.05$), 血浆内皮素水平显著升高(221 ± 24 ng/L 比 138 ± 19 ng/L, $P < 0.05$)。应用半边莲生物碱 8 周后, 与高血压组比较, 内皮素 1 mRNA 表达(20.38% ± 11.31% 比 34.64% ± 8.39%, $P < 0.05$)、内皮素合成(3.53% ± 0.21% 比 7.42% ± 0.24%, $P < 0.05$)和血浆内皮素水平(191 ± 21 ng/L 比 221 ± 24 ng/L, $P < 0.05$)均受到显著抑制。结论 肾性高血压大鼠伴有内皮素表达增强, 半边莲生物碱能抑制内皮素基因的转录、蛋白合成及翻译, 对防治肾性高血压所致的血管病变具有一定作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Lobelia Chinensis Lour Alkaloids Inhibit Expression of Endothelin-1 mRNA and Protein in Renal Hypertensive Rats

ZHANG Xiaoling¹, XUE Bing¹, LI Li¹, CHEN Rong¹, REN Dong-Mei², LI Rui-Feng¹, and HU Wei-Cheng¹

(1. School of Medicine; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

[KEY WORDS] Lobelia Chinensis Lour Alkaloids; Endothelin; Renal Hypertension; In Situ Hybridization; Immunohistochemical Technique; Radioimmunoassay

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of the Lobelia Chinensis Lour Alkaloids(LCLA) on endothelin-1(ET-1) mRNA expression and endothelin synthesis and release in renal hypertensive rats (RHR). **Methods** The glodblatt renovascular hypertension model was induced in rats by two-kidney one clip method. After 4 weeks the rats were divided into 3 groups, including the hypertensive group, the captopril group and the LCLA group, while the control group was given sham operation. Using in situ hybridization to observe ET-1 mRNA expression in peripheral blood leucocytes. Using immunohistochemical technique to count positive rate of ET in "en face" preparations of arterial endothelium to reflect the synthesis of ET. Using radioimmunoassay to examine the level of ET in serum. **Results** Compared with the sham operation group, the positive rate of ET-1 mRNA in peripheral blood leucocytes (34.64% ± 8.39% vs 9.34% ± 4.47%, $P < 0.05$), the positive rate of ET in arterial endothelium (7.42% ± 0.24% vs 1.58% ± 0.24%, $P < 0.05$) and the plasma concentration of ET(221 ± 24 ng/L vs 138 ± 19 ng/L, $P < 0.05$) were increased significantly in hypertensive rats. After treating with LCLA for 8 w, compared with the hypertensive group, ET-1 mRNA expression (20.38% ± 11.31% vs 34.64% ± 8.39%, $P < 0.05$), endothelin (ET) synthesis (3.53% ± 0.21% vs 7.42% ± 0.24%, $P < 0.05$) and release(191 ± 21 ng/L vs 221 ± 24 ng/L, $P < 0.05$) were significantly inhibited.

Conclusions The expression of ET was increased in RHR. The LCLA can inhibit the expression of ET in the transcriptional and translational level which may be effective to the preventing and treatment of the renal hypertension.

研究证实, 半边莲生物碱(Lobelia Chinensis Lour

Alkaloids, LCLA) 能够减少高脂血症大鼠动脉内皮细胞内皮素 1(endothelin-1, ET-1) 的合成与释放, 减轻血管中膜平滑肌细胞的增殖^[1,2]。研究报道肾性高血压大鼠血浆内皮素含量显著高于正常大鼠^[3], 但该大鼠内皮素表达增强究竟是发生在翻译水平还是转录水平鲜有报道。本研究采用肾性高血压大鼠模型, 从转录和翻译水平上观察该模型内皮素表达

[收稿日期] 2006-09-04 [修回日期] 2007-01-03

[基金项目] 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(39730210); 山东省自然科学基金(Q2004C03)

[作者简介] 张晓玲, 硕士研究生, 研究方向为心血管病理生理学, E-mail 为 zhangxl2004072000@yahoo.com。通讯作者李瑞峰, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为心血管病理生理学, 联系电话为 0531-88382044, E-mail 为 ruifeng@sdu.edu.cn。

的变化,并探索 LCLA 对其内皮素基因和蛋白表达及血压的影响。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

半边莲生物碱由本校药学院天然药物化学教研室制备。半边莲产自广东省,将半边莲药材粉碎,粗粉置索氏提取器中,加入 5 倍量 95% 乙醇(含适量浓盐酸),水浴加热提取 2 h,过滤,滤液减压浓缩得流浸膏;流浸膏加适量热水混悬,冷却后用乙醚多次萃取,得到水溶液用浓氨水调 pH 值至 8~9 后乙醚多次萃取;乙醚液加入无水硫酸钠放置过夜,过滤,回收溶剂得黄色油状物,再加入 1 mol/L 盐酸将此油状物溶解,过滤、浓缩,于冰箱中静置过夜,析出 LCLA 结晶。将 LCLA 溶于二甲基亚砜(DMSO)中,然后用蒸馏水稀释,并配成浓度为 500 mg/L 溶液,DMSO 的最终浓度小于 0.01%。卡托普利(captopril)购于山东新华制药有限公司(批号 0111008)。

1.2 动物与分组

雄性 Wistar 大鼠 50 只,200~240 g,由山东省实验动物中心提供。随机取 10 只为假手术组(无菌切开腹壁,暴露肾脏,小心分离左肾动脉后缝合腹壁切口,正常饲养),其余 40 只大鼠应用两肾一夹法进行肾性高血压模型制备^[4]。剥离左侧肾动脉,用特制银夹(内径 0.2 mm)造成左侧肾动脉狭窄。术后 4 周,尾动脉血压 ≥ 140 mmHg 者选入,随机分为高血压组(9 只)、LCLA 组(8 只)和卡托普利组(8 只)。术后 4 周,高血压组和假手术组每日生理盐水 5 mL/kg 灌胃;LCLA 组每日 LCLA (500 mg/L) 5 mL/kg 灌胃;卡托普利组每日卡托普利 30 mg/kg 灌胃。

1.3 血压测定

应用尾袖法连接 RBP-1B 型大鼠血压计(中日友好临床医学研究所),测量给药前后清醒大鼠尾动脉收缩压的变化。测压时保持大鼠尾部温度适宜,以保持大鼠安静和尾动脉有搏动信号。

1.4 外周血白细胞内皮素 1 mRNA 表达的检测

用药 8 周,严格无菌操作,尾端断尾取血 0.5 mL,肝素抗凝,0.1% 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水处理无菌 EP 管,室温静置 2 h,取上层富含白细胞血浆 0.1 mL,置 EP 管中,加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 3 h,4 000 r/min 离心 5 min,弃上清;0.05 mol/L PBS 1 mL 洗涤沉淀 2 min,4 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 3 次;0.05 mol/L PBS 0.2 mL 混匀沉淀,吸取白细胞混悬液 20 μ L,涂片,37 $^{\circ}$ C

干燥过夜,按本室设计原位杂交流程操作^[5],计数 3~5 个高倍视野中的白细胞总数和杂交阳性白细胞数,计算内皮素 1 mRNA 阳性细胞率。探针由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.5 主动脉内皮细胞内皮素水平的检测

用药 8 周,大鼠腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠(35 mg/kg 体重),采用本实验室主动脉内皮细胞铺片法^[1]:于左颈总动脉插管,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液配制的 4% 多聚甲醛(pH7.2)恒压(100 mmHg)灌注,持续 10 min,剥离出主动脉置于上述固定液内 1 h。沿纵轴剖开血管,按顺序切成 1 cm 左右长度的动脉段,内皮面朝上用钢针固定于特氟隆片上。缓冲液冲洗 3 次,3% 过氧化氢孵育 5 min,滴加一抗(兔抗内皮素血清,武汉博士德生物工程有限公司),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜;滴加二抗(生物素标记羊抗兔 IgG),孵育 30 min,过氧化酶标记的链霉卵白素孵育 60 min,缓冲液冲洗,DAB 显色 30 min,4% 多聚甲醛过夜。经 35%~100% 酒精系列脱水后,将标本内膜面朝下压贴在火棉胶片上。放入 35% 酒精内 1 h 后,剥离动脉外膜和中膜,将保留在火棉胶片上的内膜标本反转压贴在明胶片上,置中性缓冲固定液内 1~2 天,再用醇/醚溶液溶解火棉胶,便得到一层腔面朝上的内皮细胞铺片。苏木素复染,酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。光学显微镜下计算内皮细胞内皮素阳性细胞率。

1.6 血浆内皮素活性的测定

分别在用药前和用药后 8 周,用乙醚麻醉大鼠后断鼠尾取血,放射免疫法测定血浆内皮素的含量^[1]。放射免疫药盒由 301 医院科技开发中心放射免疫所提供。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行两组间的 *t* 检验和多组间的方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠尾动脉血压的变化

给药前,高血压组、LCLA 组及卡托普利组血压均明显高于假手术组。用药后高血压组血压继续升高,用药 4 周和 8 周后明显高于用药前($P < 0.05$, $P < 0.01$);LCLA 组用药后血压未发生明显变化,但明显低于高血压组($P < 0.05$, $P < 0.01$);用药 4 周和 8 周后,卡托普利组血压明显低于用药前及高血压组($P < 0.05$, $P < 0.01$)(表 1)。

表 1. 各组大鼠尾动脉血压的比较 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

分 组	用药前	用药后 1 w	用药后 4 w	用药后 8 w
假手术组	116 ± 5	115 ± 6 ^d	115 ± 5 ^d	112 ± 3 ^d
高血压组	151 ± 13	160 ± 13	168 ± 20 ^a	177 ± 11 ^b
LCLA 组	154 ± 4	146 ± 3	152 ± 9 ^c	151 ± 11 ^d
卡托普利组	156 ± 14	142 ± 3 ^a	122 ± 10 ^{bd}	122 ± 3 ^{bd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与同组用药前比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与高血压组比较。

2.2 各组大鼠外周血白细胞内皮素 1 mRNA 表达的比较

用药前, 高血压组外周血白细胞内皮素 1 mRNA 表达明显高于假手术组(29.32% ± 5.47% 比 8.61% ± 1.49%, $P < 0.05$)。用药 8 周时, LCLA 组、卡托普利组和假手术组外周血白细胞内皮素 1 mRNA 表达

明显高于高血压组($P < 0.05$); LCLA 组与假手术组之间、卡托普利组与假手术组之间差异均有显著性($P < 0.05$); LCLA 组和卡托普利组之间差异无显著性($P > 0.05$) (表 2 和图 1)。

表 2. 用药 8 周时各组大鼠外周血白细胞内皮素 1 mRNA 阳性细胞率及内皮细胞内皮素阳性率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	内皮素 1 mRNA 阳性细胞率	内皮素阳性细胞率
假手术组	9.34% ± 4.47% ^b	1.58% ± 0.24%
高血压组	34.64% ± 8.39% ^a	7.42% ± 0.24% ^a
LCLA 组	20.38% ± 11.31% ^{ab}	3.53% ± 0.21% ^{ab}
卡托普利组	19.95% ± 5.37% ^{ab}	4.48% ± 0.19% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高血压组比较。

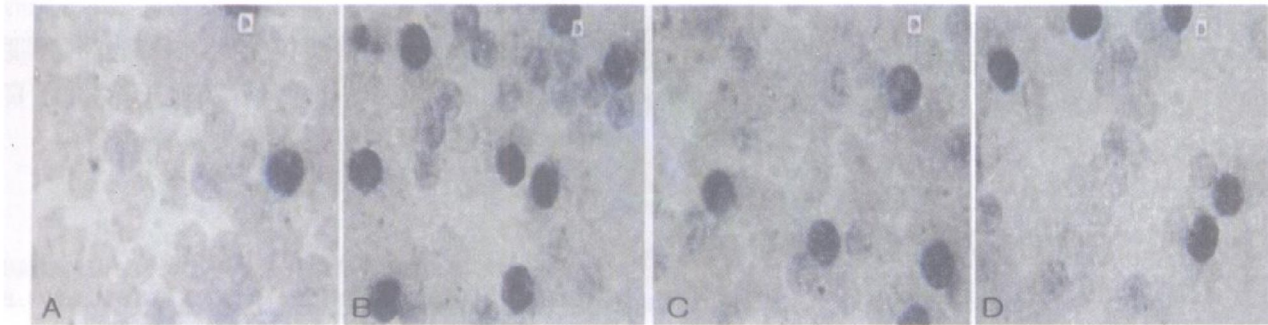


图 1. 各组大鼠外周血白细胞内皮素 1 mRNA 表达的比较 ($\times 1000$) 胞浆内深蓝色为内皮素 1 mRNA 杂交信号。A 为假手术组, B 为对照组, C 为 LCLA 组, D 为卡托普利组。

2.3 各组大鼠主动脉内皮细胞内皮素阳性细胞率的比较

假手术组内皮素阳性细胞率较低; 高血压组内

皮素阳性细胞率显著增高($P < 0.05$); LCLA 组内皮素阳性细胞率与高血压组以及卡托普利组比较明显降低($P < 0.05$) (表 2 和图 2)。

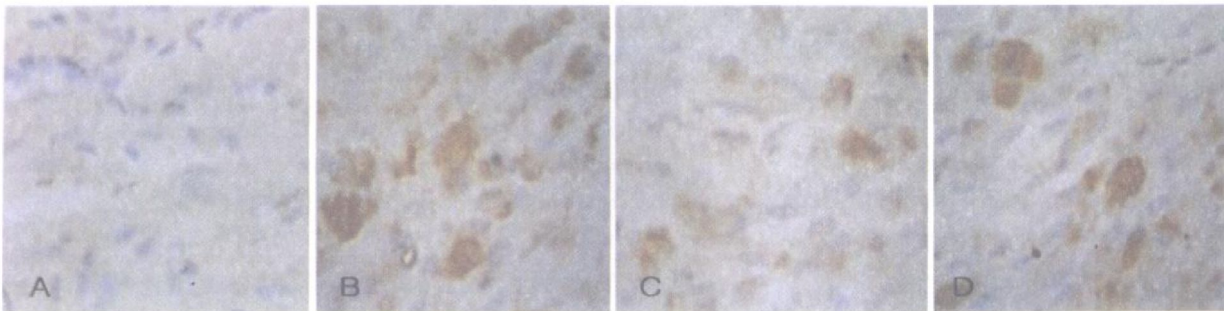


图 2. 各组大鼠主动脉内皮细胞内皮素阳性细胞率的比较 ($\times 400$) 胞浆内棕黄色为内皮素阳性信号。A 为假手术组, B 为对照组, C 为 LCLA 组, D 为卡托普利组。

2.4 各组大鼠血浆内皮素浓度的比较

用药前, 高血压组、LCLA 组及卡托普利组血浆内皮素含量均显著高于假手术组($P < 0.05$)。用药 8 周后, LCLA 组血浆内皮素浓度显著低于高血压组

和卡托普利组($P < 0.05$), 但高于假手术组($P < 0.05$); 卡托普利组血浆内皮素含量高于假手术组, 与高血压组比较差异无显著性($P > 0.05$) (表 3)。

表 3. 各组大鼠血浆内皮素含量的比较 ($\bar{x} \pm s$, ng/L)

分 组	用药前	用药后 8 w
假手术组	134.6 ± 25.6	138.5 ± 18.6
高血压组	174.2 ± 35.6 ^a	220.9 ± 24.4 ^a
LCLA 组	167.3 ± 27.5 ^a	191.1 ± 20.8 ^{abc}
卡托普利组	179.4 ± 24.8 ^a	210.4 ± 9.9 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高血压组比较; c 为 $P < 0.05$, 与用药前 LCLA 组比较。

3 讨论

肾性高血压指各种肾脏疾患及肾动脉或其主要分支狭窄所致的高血压, 主要分为容量依赖性高血压和肾素依赖性高血压两类。由肾实质性病变致肾脏排泄钠、水功能障碍, 造成水、钠潴留, 可引起容量依赖性高血压。肾动脉狭窄或少数肾实质病变的患者, 由于肾脏缺血导致肾素-血管紧张素-醛固酮系统激活, 则引起肾素依赖性高血压。本研究采用的两肾一夹肾性高血压大鼠, 为一接近肾素依赖性高血压的动物模型。

有研究显示, 肾性高血压大鼠除肾素-血管紧张素系统激活外, 血浆内皮素含量升高^[3], 提示内皮素参与了肾性高血压的发病过程。肾素-血管紧张素系统中的主要缩血管效应分子-血管紧张素 $\text{Ang} \text{ (I)} \text{ (Ang II)}$ 与内皮素均为强效缩血管物质, 且二者缩血管的生物效应还可能存在协同作用。Rajagopalan 等^[6] 研究发现, 内皮素可促进血浆中 $\text{Ang} \text{ (I)}$ 转变为 $\text{Ang} \text{ (II)}$ 。内皮素也能促进内皮细胞中内皮素 1 的基因表达和蛋白释放。

内皮素与自然界存在的某些生物毒素(例如蛇毒、蝎毒和蜂毒)有一定亲缘关系^[7]。蝥毒素(sarafotoxin, SRTX) 是从蛇毒中提取的一种毒素, 可分为 SRTX-a (S6a)、SRTX-b (S6b)、SRTX-c (S6c) 和 Btx (S6c) 4 个亚型。对内皮素的 4 种亚型进行氨基酸序列分析发现, 所有这些异构肽均包括 21 个氨基酸, 其一级结构具有明显的同源性, 至少有 60% ~ 80% 氨基酸同源, 而且有相同的 C-末端。研究证实^[8], 内皮素的 C-末端特别是 Trp21、两个二硫键、氨基和羧基端以及 Asp8 和 Glu10 的羧基组对它的生物学活性起重要的作用, 构成了 SRTX 和内皮素表面的“共同和基本”的生物活性位点。SRTX 和内皮素构成一组同源性异构肽家族, 竞争性结合相同的 G 蛋白偶联受体, 通过 1, 4, 5-三磷酸肌醇 (IP_3) 和 Ca^{2+} 钙调蛋白激酶途径, 引发各类生物学效应^[9]。因此, 从抗蛇毒中药中探寻防治动脉粥样硬化和高血压等内皮素相关性疾病的方法是可行的^[10]。

本研究发现, 高血压大鼠于肾动脉狭窄 4 周时动脉血压明显升高, 至狭窄 12 周时动脉血压进一步升高, 同时内皮素 1 mRNA 及内皮素表达均较假手术组明显增强, 提示内皮素增加是其高血压形成和维持的参与因素。应用半边莲生物碱 8 周, 体内内皮素 1 mRNA 表达、蛋白合成和释放均显著低于高血压组 ($P < 0.05$), 显示半边莲生物碱能明显抑制该肾性高血压大鼠的内皮素表达。尽管半边莲生物碱不能有效降低大鼠的动脉血压, 但与高血压组比较却能有效地抑制大鼠血压的继续升高。肾素-血管紧张素系统的激活可能参与本肾性高血压大鼠的发病^[11], 半边莲生物碱的降压作用不如卡托普利明显的结果也说明了这一点。本实验提示, 内皮素表达增强参与了肾性高血压的发病过程, 应用半边莲生物碱能拮抗内皮素的合成与释放, 对肾性高血压病程的进展有缓解作用, 可能对阻止高血压造成的血管内皮损伤及血管重塑和控制肾性高血压的程度等有一定辅助治疗作用, 为肾性高血压等心血管疾病的治疗提供了新的实验依据。

[参考文献]

- [1] 杜艳芝, 闫晓梅, 胡维诚, 刘玉梅, 张宝华, 李莉, 等. 清热解毒液对高脂血症大鼠内皮素影响的研究[J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15 (12): 134-137.
- [2] 李瑞峰, 温海涛, 李莉, 陈融, 任冬梅, 胡维诚, 等. 半边莲不同组分对动脉内皮细胞内皮素及内皮源型一氧化氮合酶代谢影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, 10 (1): 19-22.
- [3] 吴秀香, 马克玲, 李淑云, 王国秋, 庄晓艳. 内皮素、降钙素基因相关肽在肾性高血压大鼠的动态变化[J]. 中国心血管杂志, 2005, 6 (3): 181-182.
- [4] Quaschnig T, Hofer B, Ruhl S, Kraemer-Guth A, Tilgner J, Wanner C, et al. Vasoepitaxin inhibition normalizes blood pressure and restores endothelial function in renovascular hypertension [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2006, 29 (6): 351-359.
- [5] 李瑞峰, 郭成浩, 陈融, 李莉, 王建丽, 胡维成, 等. 链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠外周白细胞 iNOS mRNA 表达的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17 (12): 1240-242.
- [6] Rajagopalan S, Laursen JB, Borthayre A, Kurz S, Keiser J, Haleen S, et al. Role for endothelin-1 in angiotensin II-mediated hypertension [J]. *Hypertension*, 1997, 30 (pt1): 29-34.
- [7] Sokolovsky M. Structure-function relationships of endothelins, sarafotoxins, and their receptor subtypes [J]. *J Neurochem*, 1992, 59 (3): 809-821.
- [8] Ducancel F, Matre V, Dupont C, Lajeunesse E, Wollberg Z, Bdlolah A, et al. Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding precursors of sarafotoxins. Evidence for an unusual "rosary-type" organization [J]. *J Biological Chemistry*, 1993, 268 (5): 3052-055.
- [9] Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF. Endothelin receptor and calcium signaling [J]. *FASEB J*, 1995, 9: 196-204.
- [10] 王婧婧, 范秀珍, 刘尚明, 魏欣冰, 任冬梅, 陈融, 等. 半边莲生物碱抑制内皮素诱导的大鼠动脉平滑肌细胞增殖[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006, 14 (2): 107-110.
- [11] Prieto I, Hemoso F, Gasparo M, Vargas F, Alba F, Segarra AB, et al. Angiotensinase activities in the kidney of renovascular hypertensive rats [J]. *Peptides*, 2003, 24 (5): 755-760.

(此文编辑 朱雯霞)