

慢性应激刺激致高血压大鼠下丘脑肾上腺髓质素特异性受体组件基因表达变化

李 良^{1,3}, 李 霞¹, 樊明欣¹, 王 锦¹, 汪 怡², 朱大年¹

(复旦大学上海医学院 1. 生理与病理生理学系, 2. 病理学教研室, 上海市 200032;

3. 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; 高血压; 肾上腺髓质素; 降钙素受体样受体; 受体活性修饰蛋白; 下丘脑

[摘要] 目的 探讨慢性应激致高血压过程中肾上腺髓质素特异性受体组件降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白 2 和受体活性修饰蛋白 3 在下丘脑的动态变化。方法 将 48 只大鼠分为对照组 (18 只) 和应激组 (30 只), 应激组给予噪声加足底电击刺激, 分别在刺激开始后的第 1、5、10 和第 15 d 以及停止刺激后的第 5 和第 10 d 处死动物, 分离下丘脑, 抽提总 RNA, 用逆转录聚合酶链式反应检测降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白 2 和受体活性修饰蛋白 3 的基因表达变化。结果 与对照组相比较, 应激组动物降钙素受体样受体基因表达 10 d 内逐渐上调 (1.236 ± 0.040 比 0.941 ± 0.041 , $P < 0.01$), 而后表达下调, 在应激第 15 d 明显低于对照组 (0.860 ± 0.041 比 0.938 ± 0.042 , $P < 0.05$)。受体活性修饰蛋白 2 mRNA 表达在应激第 1 和第 5 d 显著升高 (0.975 ± 0.023 比 0.880 ± 0.035 和 1.160 ± 0.045 比 0.897 ± 0.036 , $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 在第 5 d 达到高峰, 而后开始下调, 在应激第 15 d 和应激结束后 5 d 低于对照组 (0.670 ± 0.021 比 0.897 ± 0.041 , 0.719 ± 0.039 比 0.910 ± 0.032 , $P < 0.01$)。受体活性修饰蛋白 3 mRNA 表达在应激第 1 d 显著升高 (1.197 ± 0.053 比 0.870 ± 0.039 , $P < 0.01$), 而后开始逐渐下调, 在应激第 10、15 d 后开始明显低于对照组的表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。应激结束后 10 d 受体活性修饰蛋白 3 mRNA 表达水平仍低于对照组, 但无统计学差异。结论 慢性应激所致血压升高变化过程中伴随下丘脑中肾上腺髓质素特异性受体组件 mRNA 表达的不同时段特异性改变, 提示其可能参与应激致高血压过程。

[中图分类号] Q4

[文献标识码] A

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

LI Liang^{1,3}, LI Xia¹, FAN Ming Xing¹, WANG Jin¹, WANG Yi², and ZHU Da Nian¹

(1. Department of Physiology & Pathophysiology, 2. Department of Pathology, Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; 3. Department of Physiology, Medical College, Nanhua University, Hengyang 421001, China)

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

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the dynamic changes of adrenomedullin specific receptors components, calcitonin receptor-like receptor (CRLR), receptor activity modifying proteins 2 (RAMP2) and RAMP3 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. Noise with electric foot shock upon the stress group. Execute all the rats and separate their hypothalamus to isolate the total RNA individually at stress 1, 5, 10 and 15 d and poststress 5 and 10 d. Determine the changes of the adrenomedullin, CRLR and RAMP mRNA expression of by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Compared with control group at the same time point, CRLR mRNA expression in hypothalamus upregulated within foot-shock and sound stress 10 d (1.236 ± 0.040 vs 0.941 ± 0.041 , $P < 0.01$), then downregulated to a lower level at stress 15 d (0.860 ± 0.041 vs 0.938 ± 0.042 , $P < 0.05$); RAMP2 mRNA expression in hypothalamus upregulated to the highest lever at stress 5 d (1.160 ± 0.045 vs 0.897 ± 0.036 , $P < 0.01$), then downregulated to a lower lever at stress 15 d and poststress 5 d (0.670 ± 0.021 vs 0.897 ± 0.041 , 0.719 ± 0.039 vs 0.910 ± 0.032 , $P < 0.01$); However RAMP3 mRNA expression upregulated to the highest lever at stress 1 d (1.197 ± 0.053 vs 0.870 ± 0.039 , $P < 0.01$), then downregulated to a lower lever at 10, 15 d and poststress 5 d ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Even at poststress 10 d, the level of RAMP3 expression still lower than control group at the same time point, but no statistic significance. **Conclusion** According to the results described above, at the gene level, the expression of ADM specific receptor components CRLR, RAMP2 and RAMP3 mRNA had changed to some degree in the process of chronic stress-induced hypertension, indicating that ADM specific receptors maybe involve in the stress-induced hypertension.

[收稿日期] 2007-04-10 [修回日期] 2007-06-04

[基金项目] 国家自然科学基金(20055CB523306)资助; 湖南省教育厅科研项目(4-03-JY-03C416)资助

[作者简介] 李良, 女, 讲师, E-mail 为 toli liang@163.com。李霞, 女, 博士, 现为复旦大学附属华山医院神经内科博士后, 联系电话 13166100060, E-mail 为 lixiawuhai@yahoo.com.cn。通讯作者朱大年, 男, 教授, 博士研究生导师, 联系电话 021-54237405, E-mail 为 dnzhu@shmu.edu.cn。

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)广泛分布于中枢相关核团,其中在下丘脑呈高拷贝表达^[1,2]。文献[3-5]报道,侧脑室给予ADM后下丘脑即刻及早基因 α -fos表达明显增加,并且室旁核(paraventricular nucleus, PVN)中一氧化氮和促肾上腺皮质激素释放激素能神经元大量激活,同时伴大鼠血压下降、血浆中促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)和糖皮质激素水平明显降低,提示下丘脑可能是ADM在生理状态下发挥中枢心血管调节作用的一个重要部位。Shan等^[6]和Khan等^[7]对急性束缚应激后中枢ADM基因表达和水平变化的研究表明,急性束缚应激2 h仅引起下丘脑PVN中ADM基因表达和旁下丘脑核中ADM水平的明显下降。我们在前期实验中^[8,9]发现,慢性足底电击结合噪声应激15 d引起血压持续升高后,下丘脑ADM mRNA表达明显升高,提示不同的应激刺激以及应激时间长短可能引起下丘脑ADM表达变化不同,ADM在不同的病理状态下可能发挥不同的病理生理作用。Stachniak等^[2]报道,使用去氧肾上腺素使血压持续升高6 h后下丘脑PVN中ADM的特异性受体组件受体活性修饰蛋白2(receptor activity modifying proteins 2, RAMP2)表达明显下降,提示下丘脑ADM特异性受体可能参与了血压调节。本文通过观察慢性应激致高血压过程中ADM特异性受体组件CRLR、RAMP2和RAMP3 mRNA表达的动态变化,初步探讨应激致血压升高对下丘脑ADM特异性受体表达的影响,从而为了解ADM在高血压发生发展中的病理生理作用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

微量快速柱式组织总RNA抽提试剂盒(上海生工公司);M-MLV(美国promega公司);Oliger dI(18)和dNTP(上海博亚公司);DEPC(上海生工公司);Taq酶(MBI公司);琼脂糖(Spanish公司);3-N-吗啉基丙磺酸MOPS(美国GIBCO公司);PCR引物(由上海博亚生物公司合成);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(中科院实验动物中心提供),每6只同笼饲养,维持每天12小时正常光照。随机分为对照组(18只,体重 191.5 ± 6.2 g)和应激组(30只,体重 188.7 ± 6.3 g):两组

又各分为6个小组,应激组每小组5只,对照组每小组3只;分别在应激刺激第1、5、10和第15 d以及应激15 d后停止刺激继续饲养的第5和第10 d处死。

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动物噪声(150~200 dB, 50 ms)或噪声加足底电击(方波50~80 mV, 60 ms)刺激。试验组动物连续15 d每天应激刺激2次,每次2 h。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,测定时将大鼠置于大鼠固定器中,加热使动物体温稳定于38~40℃后,从记录仪监测、记录尾动脉收缩压。以三次的平均值为准。

1.5 下丘脑组织取材方法

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磷酸缓冲液中剥离出大脑,按照相应的解剖标志切取下丘脑组织,用无菌锡纸包裹后置干冰桶中以待即时抽提RNA,或速冻后置-80℃冰箱保存。

1.6 逆转录聚合酶链反应检测下丘脑肾上腺髓质素特异性受体组件基因表达

用微量快速柱式组织总RNA抽提试剂盒Trizol法抽提下丘脑总RNA,逆转录合成cDNA。RNA样品OD₂₆₀/OD₂₈₀比值均在1.8~2.0之间。MOPS变性凝胶电泳分析RNA的完整性提示RNA无降解。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。CRLR上游引物为5'-CGG TCA CTG ATT GAT AGA-3',下游引物为5'-CCG ATA CGA CCT TAC TGC-3'; RAMP2上游引物为5'-AAG GGA AGA TGG AGG ACT A-3',下游引物为5'-GTA GGG AAA GGA GCA ATG C-3'; RAMP3上游引物为5'-CIT TGC CGA AAT GAT GC-3',下游引物为5'-CGA CTG GCA CCG ATA CCG A-3'; 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'。GAPDH、CRLR、RAMP2和RAMP3扩增产物长度分别为451 bp、345 bp、320 bp和275 bp。聚合酶链反应参数为:95℃预变性5 min后,94℃变性40 s \rightarrow 52~56℃退火40 s \rightarrow 72℃延伸40 s,共26~29个循环后72℃再延伸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。

1.8 统计学处理

实验数据采用 SPSS11.0 统计软件分析。数据表示为 $\bar{x} \pm s$, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为统计学有显著差异。

2 结果

2.1 慢性应激引起的血压动态变化

在接受足底电击和噪声应激后, 动物血压逐渐上升, 应激第 15 d 达到高峰, 收缩压为 156.3 ± 3.3 mmHg, 与对照组第 15 d 的动物血压 (114.0 ± 2.6 mmHg) 有显著性差异 ($P < 0.01$)。应激停止后 5 d 大鼠血压仍继续升高, 停止刺激 10 d 后开始下降, 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)。

2.2 降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白 2 和 3 mRNA 表达的动态变化

图 1 为检测两组 CRLR、RAMP2 和 RAMP3 mRNA 表达的电泳图, 检测结果见表 2。与对照组相比较, 应激组动物 CRLR mRNA 水平在应激刺激后逐渐上调, 第 5 和第 10 d 显著升高(均 $P < 0.01$)。在应激刺激第 15 d 低于对照组 ($P < 0.05$), 应激结束后 5、10 d CRLR mRNA 水平仍稍低于对照组, 但无统计学意义; RAMP2 mRNA 表达在应激第 1 和第 5 d 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 在第 5 d 达到高峰。而后开始下调, 在应激第 15 d 和应激结束后 5 d 低于对照组, 差异有显著性(均为 $P < 0.01$);

表 2. 大鼠下丘脑降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白 2 和受体活性修饰蛋白 3 mRNA 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

时间	CRLR		RAMP2		RAMP3	
	对照组	应激组	对照组	应激组	对照组	应激组
第 1 d	0.920 ±	0.945 ±	0.880 ± 0.035	0.975 ± 0.023 ^a	0.870 ± 0.090	1.197 ± 0.053 ^b
第 5 d	0.938 ± 0.037	1.160 ± 0.040 ^b	0.897 ± 0.036	1.160 ± 0.045 ^b	0.852 ± 0.056	1.060 ± 0.043
第 10 d	0.941 ± 0.041	1.236 ± 0.040 ^b	0.867 ± 0.076	0.860 ± 0.035	0.878 ± 0.045	0.760 ± 0.067 ^a
第 15 d	0.937 ± 0.042	0.860 ± 0.041 ^a	0.897 ± 0.041	0.670 ± 0.021 ^b	0.840 ± 0.045	0.650 ± 0.056 ^b
第 20 d	0.910 ± 0.054	0.880 ± 0.087	0.910 ± 0.032	0.719 ± 0.039 ^b	0.830 ± 0.076	0.729 ± 0.087
第 25 d	0.929 ± 0.039	0.899 ± 0.069	0.897 ± 0.056	0.879 ± 0.056	0.901 ± 0.086	0.809 ± 0.072

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

3 讨论

本研究采用的是复旦大学医学院生理教研室多

RAMP3 mRNA 表达在应激第 1 d 显著升高 ($P < 0.01$), 而后开始逐渐下调, 在应激第 10、15 d 以及应激结束后 5 d 明显低于对照组的表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。应激结束后 10 d RAMP3 mRNA 表达水平仍低于对照组, 但无统计学差异。

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

时 间	对照组	应激组
第 1 d	114.0 ± 2.6	129.3 ± 3.3
第 5 d	121.3 ± 5.2	145.4 ± 4.2 ^a
第 10 d	122.3 ± 4.5	148.9 ± 5.5 ^b
第 15 d	124.0 ± 6.8	156.3 ± 7.8 ^b
第 20 d	123.0 ± 7.1	161.1 ± 8.1 ^b
第 25 d	121.5 ± 5.8	152.1 ± 4.8 ^b

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

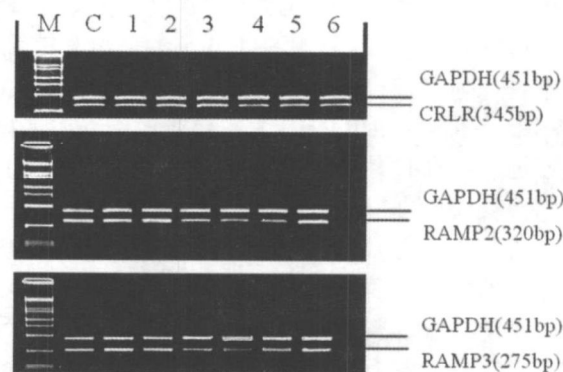


图 1. 检测降钙素受体样受体、受体活性修饰蛋白 2 和 3 mRNA 表达的电泳图 M 为 DNA 分子 Marker; C 为对照组, 1-6 泳道分别为应激第 1、5、10、15 d 以及应激第 15 d 后分别饲养 5 d 和 10 d 的应激组。

年来建立的慢性足底电击结合噪声应激致高血压大鼠模型, 该模型经多年的实验研究证实可较好地模

拟人类的长期精神紧张状态^[10,11],病理状态改变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,下丘脑 ADM 及其受体变化是否参与其中尚无实验证明。

文献[13]报道,ADM 在中枢,尤其是延髓的心血管调节作用可能通过和降钙素基因相关肽(calcitonin gene related protein, CGRP)受体或 ADM 特异性受体来实现。其中特异性受体由 CRLR 和 RAMP 共同形成。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,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^[14]。本研究结果显示 ADM 特异性受体组件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 ADM 特异性受体发挥作用,但是以 CRLR/RAMP2 还是 CALR/RAMP3 为主要受体则尚不明确,尚需进一步通过使用不同受体亚型拮抗剂与 ADM 共同微量注射进行正常动物整体实验来证实。

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^[4]报道应用去氧肾上腺素使血压升高的同时,下丘脑 PVN 投射到下位脑干和脊髓的背外侧小细胞 RAMP2 表达下调,提示 RAMP2 可能通过与 CRLR 结合参与 ADM 对自主神经活动的调节。

在慢性应激致高血压过程中,我们前期的实验研究^[9]发现 ADM 和 CRLR 的 mRNA 表达在应激第 5 和第 10 d 后表达明显上调,而后骤降到正常水平以下。在此基础上本研究观察到:ADM 特异性受体组件 CRLR 在应激 5、10 d 后表达明显上调,而后骤降到正常水平以下;而 RAMP2 mRNA 表达在应激第 1、5 d 显著升高,在第 5 d 达到高峰,而后开始下调,在应激第 15 d 和应激结束后 5 d 低于对照组;RAMP3 mRNA 表达在应激第 1 d 显著升高,而后开始逐渐下调,在应激第 10 和第 15 d 后开始明显低于对照组的表达水平。应激结束后 10 d RAMP3 mRNA 表达水平仍低于对照组,但无统计学差异。

这些结果提示:在应激初期(应激第 1 d),下丘脑 CRLR/RAMP2 和 CRLR/RAMP3 基因表达均明显

上调,与我们^[8,9]以往观察到的应激早期下丘脑 ADM 和 CRLR 表达明显上调相一致,说明下丘脑在急性应激中的中枢血管调节作用可能通过 CRLR/RAMP2 和 CRLR/RAMP3 两个受体亚型发挥作用。随着足底电击结合噪声应激时间的延长,CRLR/RAMP2 和 CRLR/RAMP3 的表达在不同时段出现不同的变化趋势,但总体均为表达逐渐下调,而同时 ADM 表达虽有所下调,但仍高于对照组^[8,9],因此在应激后期 ADM 在下丘脑的中枢心血管及参与应激反应的作用,或许是通过 ADM 受体以外的途径发挥作用,但这一推断尚需药理学与生物化学方面的进一步实验证明。

[参考文献]

- [1] Oliver KR, Kane SA, Salvatore CA, Oliver KR, Kane SA, Salvatore CA, Mallee JJ, Kinsey AM, Koblan KS et al. Cloning characterization and central nervous system distribution of receptor activity modifying proteins in the rats [J]. *Eur J Neurosci*, 2001, **14**: 618-628.
- [2] Stachniak TJ, Krukoff TL. Receptor activity modifying protein 2 distribution in the rat central nervous system and regulation by changes in blood pressure [J]. *J Neuroendocrinol*, 2003, **15** (9): 840-850.
- [3] Smith PM, Ferguson AV. Adrenomedullin acts in the rat paraventricular nucleus to decrease blood pressure [J]. *J Neuroendocrinol*, 2001, **13** (5): 467-471.
- [4] Xu Y, Krukoff T. Decrease in arterial pressure induced by adrenomedullin in the hypothalamic paraventricular nucleus is mediated by nitric oxide and GABA [J]. *Regul Pept*, 2004, **119** (1-2): 21-30.
- [5] Shan J, Krukoff TL. Intracerebroventricular adrenomedullin stimulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, the sympathetic nervous system and production of hypothalamic nitric oxide [J]. *J Neuroendocrinol*, 2001, **13** (11): 975-984.
- [6] Shan J, Krukoff TL. Distribution of preproadrenomedullin mRNA in the rat central nervous system and its modulation by physiological stressors [J]. *J Comp Neurol*, 2001, **432** (1): 88-100.
- [7] Khan S, Michaud D, Moody TW. Effects of acute restraint stress on endogenous adrenomedullin levels [J]. *Neuroreport*, 1999, **10**: 829-833.
- [8] Li X, Li L, Cao YX, Qian Y, Zhu DN. Dynamic changes of adrenomedullin and its receptor components mRNA expressions in brain stem and hypothalamus-pituitary-adrenal grand axis of stress-induced hypertensive rats [J]. *Acta Physiol Sin*, 2004, **56** (6): 723-729.
- [9] 李良,李霞,胡弼,朱大年.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[J].*中国动脉硬化杂志*, 2004, **12** (3): 317-320.
- [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[J].*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[J].*中国神经科学杂志*, 1997, **4** (4): 161-165.
- [12] 林善铤,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[J].*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 [J]. *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) [J]. *Microsc Res Tech*, 2002, **57** (1): 14-22.

(此文编辑 胡必利)