

[文章编号] 1007-3949(2009)17-10-0815-04

• 实验研究 •

# 去甲肾上腺素和哌唑嗪对自发性高血压大鼠动脉平滑肌细胞膜 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性和 PMCA1 mRNA 表达的影响

姜黔峰<sup>1</sup>, 商黔惠<sup>1</sup>, 吴芹<sup>2</sup>, 巩亮<sup>1</sup>, 刘晓鹏<sup>3</sup>(1. 遵义医学院附属医院心内科 遵义医学院临床医学研究所, 2 贵州省基础药理重点实验室  
贵州省遵义市 563003 3 洛阳市中心医院急救中心, 河南省洛阳市 471000)[关键词]  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 血管平滑肌细胞; 去甲肾上腺素; 哌唑嗪; 自发性高血压大鼠

[摘要] 目的 观察去甲肾上腺素及其  $\alpha_1$  肾上腺素能受体拮抗剂哌唑嗪对自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性及 mRNA 表达的影响。方法 采用生化酶学法和逆转录聚合酶链反应技术观察不同浓度去甲肾上腺素和哌唑嗪对自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性和 mRNA 表达的影响。结果 与自发性高血压大鼠组比较,  $10^{-7}$  mol/L 去甲肾上腺素能减弱  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性 ( $P < 0.01$ ) 及 mRNA 的表达 ( $P < 0.01$ ),  $10^{-5}$  mol/L 和  $10^{-6}$  mol/L 哌唑嗪能减弱  $10^{-7}$  mol/L 去甲肾上腺素对  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性的抑制作用 ( $P < 0.05$ )。  $10^{-6}$  mol/L 哌唑嗪可抑制  $10^{-7}$  mol/L 去甲肾上腺素对 PMCA1 mRNA 表达的影响 ( $P < 0.05$ )。 单用哌唑嗪对  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性及 mRNA 表达水平无明显改变 ( $P > 0.05$ )。结论 去甲肾上腺素抑制自发性高血压大鼠  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性和下调 PMCA1 mRNA 表达, 可能是通过  $\alpha_1$  肾上腺素能受体途径介导基因转录的下调。哌唑嗪可通过阻断  $\alpha_1$  肾上腺素能受体途径抑制去甲肾上腺素对自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性和 PMCA1 mRNA 表达的影响。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

## Effect of Norepinephrine and Prazosin on $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Activity and mRNA Expression in Aortic Smooth Muscle Cells in Spontaneously Hypertensive Rats

JANG Qian-Feng<sup>1</sup>, SHANG Qian-Hui<sup>1</sup>, WU Qian<sup>2</sup>, GONG Liang<sup>1</sup>, and LIU Xiao-Peng<sup>3</sup>

(1. The Institute of Clinical Medical Research of Zunyi Medical College &amp; Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China; 2 Key Lab of Basic Pharmacology Guizhou province, Zunyi 563003, China; 3 Department of Emergency, Centre Hospital, Luoyang 471000, China)

[KEY WORDS]  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Vascular Smooth Muscle Cells, Norepinephrine, Prazosin, Spontaneously Hypertensive Rat

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effects of norepinephrine (NE) and  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonist prazosin on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and mRNA expression of PMCA1 in cultured thoracic aortic smooth muscle cells (ASMC) isolated from spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** ATPase activity in cultured ASMC was determined by spectrophotometry and mRNA expression of PMCA1 was measured by semiquantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The effects of different doses of NE and prazosin on ATPase activity and mRNA level of PMCA1 in ASMC were observed. **Results** NE ( $10^{-7}$  mol/L) significantly attenuated the ATPase activity ( $P < 0.01$ ) and mRNA expression of PMCA1 ( $P < 0.01$ ). Compared with SHR control,  $10^{-5}$  mol/L and  $10^{-6}$  mol/L prazosin attenuated the repressed effect of  $10^{-7}$  mol/L NE on  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity ( $P < 0.05$ ).  $10^{-6}$  mol/L prazosin could repress the effect of  $10^{-7}$  mol/L NE on mRNA expression of PMCA1 ( $P < 0.05$ ). The ATPase activity and mRNA expression of PMCA1 in ASMC had no alteration after intervened by prazosin ( $P > 0.05$ ). **Conclusions** NE can attenuate the ATPase activity and mRNA expression of PMCA1 which may be through the pathway of  $\alpha_1$ -AR and mediate the downregulation of genetic transcription. Prazosin can inhibit the effect of NE on attenuating the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity and mRNA expression of SHR ASMC through blocking the  $\alpha_1$ -AR pathway. Prazosin had no effect on the activity and mRNA expression of PMCA1.

[收稿日期] 2009-08-20 [修回日期] 2009-10-05

[基金项目] 贵州省 2002 年度科学技术基金重点资助项目 (3013); 贵州省优秀青年科技人才资助项目 (0316)

[作者简介] 姜黔峰, 副主任医师, 研究方向为高血压发病机制, E-mail 为 jiangqianfeng2006@163.com. 通讯作者商黔惠, 硕士研究生导师, 研究方向为高血压发病机制。吴芹, 高级实验师, 研究方向为心脑血管药理。

原发性高血压 (essential hypertension, EH) 是最常见的心血管疾病, 严重威胁着人类的身体健康, 目前认为遗传性或获得性细胞膜离子转运异常可造成血管阻力增加, 血压升高, 公认这是高血压的一种重要发病机制<sup>[1]</sup>, 细胞膜离子泵结构及功能的改变在

离子跨膜转运异常中起着主要作用,细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase(钙泵)是维持细胞内正常  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  浓度的重要转运系统。以往研究证明,高血压时细胞钙泵活性下降,认为与细胞膜遗传性缺陷有关<sup>[2]</sup>,近年发现还可能与高血压时多种血管活性物质(去甲肾上腺素等)的异常改变有关<sup>[3]</sup>。在高血压发病机制中,交感系统的激活是导致血压升高的另一个重要环节,作为交感神经递质的去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)及肾上腺素能受体(adrenergic receptor, AR)在高血压进程中起着极为重要的作用,其选择性  $\alpha_1$  受体阻滞剂哌唑嗪可特异性阻断去甲肾上腺素激动  $\alpha_1$ -AR,达到降压目的。本研究拟通过应用生化酶学法和 RT-PCR 技术观察在高血压时 NE 及其选择性  $\alpha_1$  受体阻滞剂对动脉平滑肌细胞(ASMC)膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性与其亚型(PMCA1) mRNA 表达的影响,从分子水平研究 EH 的发病机制提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

6周龄雄性 SHR 6只,体重  $173 \pm 19$  g 收缩压  $155.1 \pm 11.2$  mmHg 舒张压  $92.3 \pm 4.3$  mmHg 由上海市高血压研究所提供。NE 购于上海禾丰制药有限公司,哌唑嗪购于上海第六制药厂。ATP 酶试剂盒和考马斯亮兰蛋白测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所。RT-PCR 一步法试剂盒和 RNA 抽提试剂盒均为 Qiagen 公司产品。

### 1.2 大鼠胸主动脉平滑肌细胞的培养及鉴定

无菌操作下取出 6~8 周 SHR 胸主动脉,用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基对血管平滑肌细胞采用贴壁法进行原代培养,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基传代培养。将培养瓶内单层融合的细胞在倒置显微镜下观察并拍照,用平滑肌细胞特异性  $\alpha$ -肌动蛋白单克隆抗体免疫组织化学法进行鉴定。所用细胞为生长良好的第 6~8 代细胞。

### 1.3 分 组

传代细胞以  $2 \times 10^8$  个/L 的密度接种于培养瓶内,每瓶 2 mL 培养体积,培养 24~48 h 至细胞为 70%~90% 单层融合时,换为无血清的 DMEM 培养基继续培养 48 h 使细胞同步化,实验时再用无血清 DMEM 换液 1 次。实验分为 11 组,第 1 组为 SHR 组;第 2 组为 DMSO 对照组(哌唑嗪需溶于 DMSO 中),培养基中只加入与哌唑嗪等体积的 DMSO;第 3~5 组为 NE 组,培养液中分别加入不同剂

量的 NE(终浓度为  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  和  $10^{-5}$  mol/L)作用 24 h<sup>[4,5]</sup>;第 6~8 组为不同剂量的哌唑嗪组,在培养液中分别加入不同剂量的哌唑嗪(终浓度为  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  和  $10^{-5}$  mol/L)作用 24 h<sup>[3,4]</sup>;第 9~11 组为不同剂量的哌唑嗪加 NE 组,在培养液中先分别加入不同剂量的哌唑嗪(终浓度为  $10^{-7}$ 、 $10^{-6}$  和  $10^{-5}$  mol/L),30 min 后再加入终浓度为  $10^{-7}$  mol/L NE 共同孵育 24 h。

### 1.4 总 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性测定

用酶学比色法测定,根据 ATPase 分解 ATP 生成 ADP 和无机磷,测定无机磷的量判断酶活力高低。试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,严格按试剂盒说明书操作。ATPase 活性 = (测定管 OD 值 - 对照管 OD 值) / 标准管 OD 值  $\times$  标准管磷含量  $\times$  反应体系中样品稀释倍数  $\times$  6 / 匀浆蛋白浓度。

### 1.5 RNA 提取及逆转录聚合酶链反应

提取细胞总 RNA,紫外分光光度计上分别测定其 260 nm 和 280 nm 的 OD 值确定 RNA 纯度,琼脂糖凝胶电泳显示 RNA 完整性好。PMCA1 扩增引物上游 5'-GGC GAC TTT GGC ATC ACA CT-3',下游 5'-TTT CAA CTT GGT GCA AAT TCC A-3',扩增片段长度 120 bp 内参  $\beta$ -actin 引物上游 5'-TGG GTC CAG AAG GAC TCC TAT G-3',下游 5'-CAG GCA GCT CAT AGC TCT TCT-3',扩增片段长度 590 bp 均由上海生工生物工程公司合成。反应体系组成:5  $\times$  Buffer 10.0  $\mu$ L, dNTP mix 2.0  $\mu$ L, Enzyme Mix 2.0  $\mu$ L, Template RNA 0.5  $\mu$ g, Rnasein 0.2  $\mu$ L,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha_1$ -subunit primer 2.0  $\mu$ L,  $\beta$ -actin primer 1.0  $\mu$ L, 加 Free-RNase water 至 50  $\mu$ L,放入 PCR 循环仪中扩增。反应条件为:50 $^{\circ}$ C 逆转录 30 min,95 $^{\circ}$ C 预变性 15 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 30 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后取扩增产物 5  $\mu$ L 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,在全自动凝胶成像分析系统上观察结果并拍照。

### 1.6 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析。两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 平滑肌细胞的鉴定

培养 5~7 天,可见少量细胞从植块边缘游出;

第 10~12 天时, 细胞生长旺盛, 交织成网状; 第 18~20 天, 组织块被推掉, 相邻生长晕不断扩大, 彼此融合, 细胞密集、平行排列, 形成“峰谷样”结构, 此时即可传代。α-actin 单克隆抗体免疫组织化学鉴定结果显示免疫反应产物呈棕黄色, 胞核清晰可见, 阳性血管平滑肌细胞达 95% 以上。

2.2 不同浓度去甲肾上腺素和哌唑嗪对 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性及 PMCA1 mRNA 表达的影响

10<sup>-7</sup> mol/L NE 可明显抑制 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性 (P < 0.01) 和下调 PMCA1 mRNA 的表达 (P < 0.01), 哌唑嗪对 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性及 PMCA1 mRNA 的表达无明显影响 (P > 0.05 图 1)。

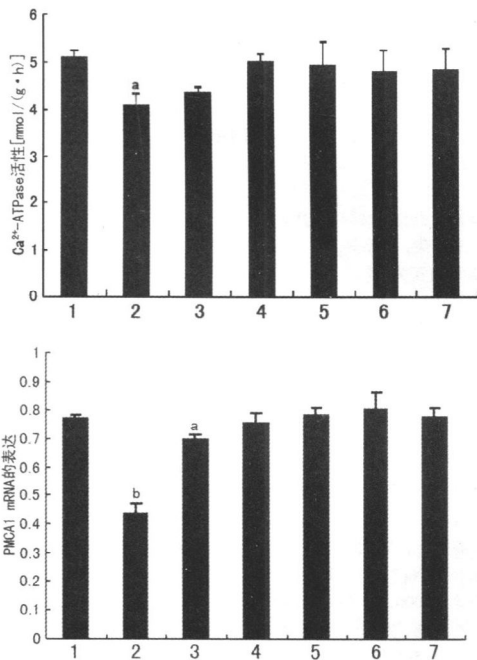


图 1 不同浓度 NE 和哌唑嗪对 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性及 PMCA1 mRNA 表达的影响 (n = 5) 1 为 SHR 组, 2 为 10<sup>-7</sup> mol/L NE 组, 3 为 10<sup>-6</sup> mol/L NE 组, 4 为 10<sup>-5</sup> mol/L NE 组, 5 为 10<sup>-7</sup> mol/L 哌唑嗪组, 6 为 10<sup>-6</sup> mol/L 哌唑嗪组, 7 为 10<sup>-5</sup> mol/L 哌唑嗪组。a 为 P < 0.05, b 为 P < 0.01, 与 SHR 组比较。

2.3 不同剂量哌唑嗪对经去甲肾上腺素作用的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性及 PMCA1 mRNA 表达的影响

10<sup>-5</sup> 和 10<sup>-6</sup> mol/L 哌唑嗪可减弱 NE 对 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性的抑制作用 (P < 0.05), 10<sup>-7</sup> mol/L 哌唑嗪对 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性无影响。

10<sup>-6</sup> mol/L 哌唑嗪可抑制 NE 对 PMCA1 mRNA 表达的影响 (P < 0.05), 10<sup>-5</sup> 和 10<sup>-7</sup> mol/L 哌唑嗪对 PMCA1 mRNA 的表达无明显影响 (P > 0.05 图 2

和 3)。

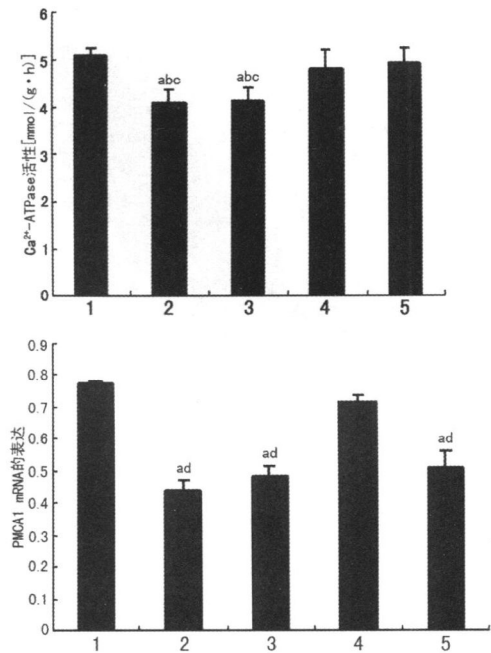


图 2 不同浓度哌唑嗪对经 NE 作用的 Ca<sup>2+</sup>-ATPase 活性及 PMCA1 mRNA 表达的影响 (n = 5) 1 为 SHR 组, 2 为 10<sup>-7</sup> mol/L NE 组, 3 为 10<sup>-7</sup> mol/L 哌唑嗪 + 10<sup>-7</sup> mol/L NE 组, 4 为 10<sup>-6</sup> mol/L 哌唑嗪 + 10<sup>-7</sup> mol/L NE 组, 5 为 10<sup>-5</sup> mol/L 哌唑嗪 + 10<sup>-7</sup> mol/L NE 组。a 为 P < 0.01, 与 SHR 组比较; b 为 P < 0.05, c 为 P < 0.01, 与 10<sup>-6</sup> mol/L 哌唑嗪 + 10<sup>-7</sup> mol/L NE 比较; d 为 P < 0.01, 与 10<sup>-5</sup> mol/L 哌唑嗪 + 10<sup>-7</sup> mol/L NE 组比较。

3 讨论

细胞膜离子转运异常与高血压密切相关, 钙泵是动脉平滑肌细胞膜上维持细胞内正常 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 浓度的重要转运系统, 钙泵活性降低可导致细胞内钠、钙离子浓度升高, 膜电位降低, 激活平滑肌细胞兴奋-收缩耦联, 使血管收缩反应性增强和平滑肌细胞增殖与肥大, 血管阻力增高, 升高血压<sup>[5]</sup>。1996 年有学者把以钙泵、钠泵为主的离子泵功能异常引起的疾病称为泵疾病<sup>[6]</sup>。钙泵主要有位于细胞膜上的质膜钙泵 (PMCA) 和位于内质网上的内质网钙泵 (SERCA), 通过对钙泵基因独立位点的选择性剪切转录可将钙泵分为 PMCA1、PMCA2、PMCA3、PMCA4 及 SERCA1、SERCA2、SERCA3。以前钙泵的研究模型主要是红细胞, 对血管平滑肌细胞质膜钙泵研究较少。我们以往的研究表明, 原发性高血压病患者红细胞及其他组织细胞均存在膜离子转运异常及膜钙泵、钠泵活性改变, 且多数研究者认为继发于

膜功能缺陷的细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度增高是导致血管

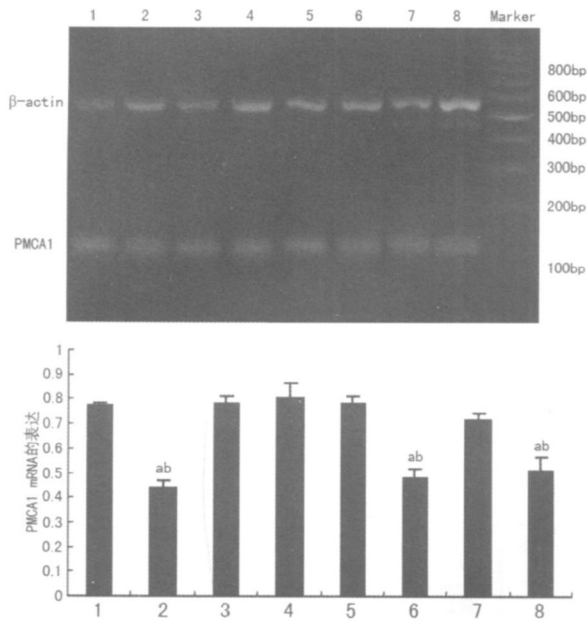


图 3 RT-PCR 产物琼脂凝胶电泳图 1 为 SHR 组, 2 为  $10^{-7}$  mol/L NE, 3 为  $10^{-7}$  mol/L 哌唑嗪, 4 为  $10^{-6}$  mol/L 哌唑嗪, 5 为  $10^{-5}$  mol/L 哌唑嗪, 6 为  $10^{-7}$  mol/L 哌唑嗪 +  $10^{-7}$  mol/L NE, 7 为  $10^{-6}$  mol/L 哌唑嗪 +  $10^{-7}$  mol/L NE, 8 为  $10^{-5}$  mol/L 哌唑嗪 +  $10^{-7}$  mol/L NE。a 为  $P < 0.01$  与 SHR 组比较; b 为  $P < 0.01$  与  $10^{-6}$  mol/L 哌唑嗪 +  $10^{-7}$  mol/L NE 组比较。

平滑肌收缩性改变、动脉血压升高的主要机制<sup>[1, 4, 7]</sup>。PMCA 对于维持胞浆内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度稳定虽然不像 SERCA 那样迅速, 仅起一种灵活的微调作用, 但被认为是将  $\text{Ca}^{2+}$  泵出细胞外的最主要的转运系统。人和鼠的血管平滑肌细胞主要表达 PMCA1, 它是质膜钙泵的管理亚单位<sup>[8]</sup>。

已知在高血压的主要发病机制中, 交感神经系统活性亢进及肾素-血管紧张素-醛固酮系统亢进, 可引起交感神经末梢突触前膜释放 NE 增多, NE 可通过直接激动血管  $\alpha_1$ -AR 和  $G_q/11$ -PLC 信号转导通路介导动脉平滑肌收缩反应, 从而影响血压。同时 Thomas 等<sup>[9]</sup> 研究也表明, 儿茶酚胺也可通过  $\alpha_1$ -AR 与血管紧张素  $\text{①}$  型受体 (AT1R) 之间的相互作用来影响血压。在血压升高的进程中, 交感系统的激活及细胞膜离子转运异常均起着重要的作用, 但二者是否存有内在的联系, 肾上腺素能受体及其受体激动剂与 ATPase 是何联系, 对 ATPase mRNA 表达是何影响, 目前国内外研究甚少。本研究结果发

现, 低剂量 NE 能抑制 SHR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性和下调 PMCA1 mRNA 表达, 其作用可能与 NE 激动  $\alpha_1$ -AR 使 cAMP 水平减低, 进而抑制 PKA、PKC 介导的通路有关<sup>[10]</sup>; 另一方面可能与 NE 刺激使 SHR 活性 CaM 减少及通过  $G_9/11$ -PLL 通路激活 PKC 有关<sup>[11]</sup>。本研究中, 哌唑嗪可减弱和阻断 NE 对 SHR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性及 PMCA1 mRNA 表达的影响, 由此可推测, NE 对钙泵的影响可能是通过  $\alpha_1$ -AR 受体途径介导, 也可能通过其与 AT1R 相互作用途径介导 PMCA1 基因转录的下调, 但本研究未观察到此影响存在剂量依赖现象, 是否与本研究观察样本较少有关, 均需更多实验结果支持。本研究还观察到 NE 对 SHR 血管平滑肌细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性及其 mRNA 的表达的影响呈同步改变,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性的变化可能受基因转录水平的调节, 但他们相互之间是否存在必然联系, 有待进一步证实。

#### [参考文献]

- [1] 商黔惠, 王丕荣, 李宗辉, 等. 多种血管活性物质与细胞膜离子转运与高血压的相互关系 [J]. 中华心血管病杂志, 1998, 26 (5): 340-342
- [2] Mizuno H, Ikeda M, Harada M, et al. Sustained contraction to angiotensin II and impaired  $\text{Ca}^{2+}$ -sequestration in the smooth muscle of stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. Am J Hypertens, 1999, 12 (6): 590-595
- [3] Xu H, Fink GD, Galligan JJ. Increased sympathetic vasoconstriction and reactivity to norepinephrine in mesenteric veins in anesthetized DOCA-salt hypertensive rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293: H160-H168
- [4] 姜黔峰, 商黔惠, 吴芹, 等. 去甲肾上腺素与哌唑嗪对高血压大鼠动脉平滑肌细胞  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase 活性及 mRNA 表达的影响 [J]. 中华高血压杂志, 2006, 14 (11): 899-902
- [5] 商黔惠, 刘晓鹏, 方宁, 等. 高血压大鼠动脉平滑肌钙超载与腺苷三磷酸酶 [J]. 高血压杂志, 2006, 5: 381-382
- [6] 陈维, 章茂顺, 王家良, 等. 槲皮素及异鼠李素对去甲肾上腺素促人血管平滑肌细胞增殖的抑制作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (6): 749-752
- [7] Laski ME, Kurtzman NA. The renal adenosine functional integration and clinical significance [J]. Miner Electrolyte Metab, 1996, 22 (5-6): 410-422
- [8] Touyz RM, Mihic FJ, Reinach SG. Platelet and erythrocyte  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and cell membrane adenosine triphosphatase activity in essential hypertension in blacks [J]. J Hypertens, 1992, 10: 571
- [9] Thomas P, Danilo Guerin, Ernesto Carafoli. Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  pump [J]. J Biol Chem, 1995, 270 (20): 12184-12190
- [10] Reja V, Goodchild AK, Pilowsky PM. Catecholamine-related gene expression correlates with blood pressures in SHR [J]. Hypertension, 2002, 40: 342
- [11] Beach RE, DuBose TD Jr. Adrenergic regulation of ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ )-ATPase activity in proximal tubules of spontaneously hypertensive rats [J]. Kidney Int, 1990, 38 (3): 402-408

(此文编辑 文玉珊)