

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-04-0260-05

血管紧张素Ⅱ对正常和高血压大鼠主动脉平滑肌细胞腺苷三磷酸酶的影响

张贵海¹, 商黔惠¹, 姜黔峰¹, 万卫红²

(1. 遵义医学院临床医学研究所 附属医院心内科; 2. 贵州省细胞工程重点实验室, 贵州省遵义市 563003)

[关键词] 大鼠; 平滑肌细胞; 腺苷三磷酸酶; 血管紧张素Ⅱ; 高血压

[摘要] **目的** 探讨血管紧张素Ⅱ对正常血压 Wistar-Kyoto 大鼠和自发性高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞膜腺苷三磷酸酶 (Ca^{2+} -ATPase 和 Na^{+} , K^{+} -ATPase) 活性及基因表达的影响。**方法** 组织块种植法培养 14 周龄 Wistar-Kyoto 大鼠和自发性高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞, 分别加入含有 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L 血管紧张素Ⅱ培养液, 共同孵育 6 h、12 h 和 24 h。采用生化酶学方法和逆转录聚合酶链反应技术, 检测主动脉平滑肌细胞膜 Ca^{2+} -ATPase、 Na^{+} , K^{+} -ATPase 活性及其 mRNA 表达水平。**结果** 低、中浓度血管紧张素Ⅱ (1×10^{-9} 和 1×10^{-8} mol/L) 增加 Wistar-Kyoto 大鼠 Ca^{2+} -ATPase 活性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 与干预时间呈正相关 ($r = 0.340 \sim 0.725$), 24 h 达最大值, 且上调质膜 Ca^{2+} -ATPase 亚型 1 mRNA 表达 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 高浓度 (1×10^{-7} mol/L) 血管紧张素Ⅱ抑制 Ca^{2+} -ATPase 活性 ($P < 0.05$), 与干预时间呈负相关 ($r = -0.348$), 其 24 h 效应最强, 并下调质膜 Ca^{2+} -ATPase 亚型 1 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。3 种浓度血管紧张素Ⅱ均抑制自发性高血压大鼠 Ca^{2+} -ATPase 活性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 与干预时间呈负相关 ($r = -0.346 \sim -0.493 \sim -0.759$), 24 h 抑制最强, 并下调质膜 Ca^{2+} -ATPase 亚型 1 mRNA 表达 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。3 种浓度 (1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L) 血管紧张素Ⅱ依次在 24 h、12 h、6 h 显著增加 Wistar-Kyoto 大鼠 Na^{+} , K^{+} -ATPase 活性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 且剂量依赖性增加 24 h Na^{+} , K^{+} -ATPase 活性及上调 α_1 亚单位 mRNA 表达 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 与干预时间呈正相关 ($r = 0.425 \sim 0.645 \sim 0.767$)。低、中浓度血管紧张素Ⅱ对自发性高血压大鼠 Na^{+} , K^{+} -ATPase 活性及 α_1 亚单位 mRNA 表达均无影响 (均 $P > 0.05$); 高浓度血管紧张素Ⅱ则抑制 Na^{+} , K^{+} -ATPase 活性 ($P < 0.01$), 与干预时间呈负相关 ($r = -0.589$), 24 h 达最大效应, 且下调 α_1 亚单位 mRNA 表达 ($P < 0.05$)。**结论** 血管紧张素Ⅱ对正常血压大鼠主动脉平滑肌细胞膜 Ca^{2+} -ATPase 活性及质膜 Ca^{2+} -ATPase 亚型 1 mRNA 表达有双向作用, 并呈剂量依赖性激活 Na^{+} , K^{+} -ATPase 活性及 α_1 亚单位 mRNA 表达; 抑制高血压大鼠主动脉平滑肌细胞膜 Ca^{2+} -ATPase、 Na^{+} , K^{+} -ATPase 活性及 Ca^{2+} -ATPase 亚型 1、 α_1 亚单位 mRNA 表达。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Angiotensin Ⅱ on Adenosinetriphosphatases in Aortic Vascular Smooth Muscle Cells from Wistar-Kyoto Rats and Spontaneously Hypertensive Rats

ZHANG Gui-Hai, SHANG Qian-Hui, JIANG Qian-Feng, and WAN Wei-Hong

(Institute of Clinical Medicine, Zunyi Medical College, Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

[KEY WORDS] Rat, Smooth Muscle Cell, Adenosinetriphosphatases, Angiotensin Ⅱ, Hypertension

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of angiotensin Ⅱ on the activities of Ca^{2+} -ATPase, Na^{+} , K^{+} -ATPase and mRNA expression levels of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 1 (PMCA1) and Na^{+} , K^{+} -ATPase α_1 -subunit in cultured thoracic aortic vascular smooth muscle cells (ASMC) from Wistar-Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** ASMC isolated from 14-week-old male Wistar-Kyoto rats and SHR were cultured and treated with different concentrations (1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} mol/L) of Angiotensin Ⅱ. The activities of Ca^{2+} -ATPase, Na^{+} , K^{+} -ATPase were measured by biochemistry and enzymology. RT-PCR assay was employed to determine the relative levels of PMCA1 and Na^{+} , K^{+} -ATPase α_1 -subunit mRNA in ASMC. **Results** Low and moderate concentration (1×10^{-9} , 1×10^{-8} mol/L) of angiotensin Ⅱ significantly increased the activity of Ca^{2+} -ATPase in ASMC from Wistar-Kyoto rats ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), and the activity of Ca^{2+} -ATPase was positively correlated with the intervention time of angiotensin Ⅱ ($r = 0.340 \sim 0.725$), reached the maximum at 24 hours, up-regulated PMCA1 mRNA level at the same time ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); while high concentration (1×10^{-7} mol/L) angiotensin Ⅱ inhibited Ca^{2+} -ATPase activity ($P < 0.05$), and the

[收稿日期] 2009-12-07

[修回日期] 2010-03-20

[基金项目] 贵州省科学技术基金重点项目和贵州省优秀科技教育人才省长专项资金 [(2002) 3013 (2005) 239]

[作者简介] 张贵海, 硕士, 讲师, 研究方向为高血压发病机制, E-mail 为 zghzhuha@yahoo.com.cn; 通讯作者商黔惠, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为高血压发病机制, E-mail 为 qianhuishang@hotmail.com.

activity of Ca^{2+} -ATPase was negatively correlated with the intervention time ($r = -0.348$), reached the greatest effect at 24 hours and simultaneously down-regulated PMCA1 mRNA level ($P < 0.05$). Angiotensin II (1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} mol/L) decreased significantly the activity of Ca^{2+} -ATPase in ASMC from SHR ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), and the Ca^{2+} -ATPase activity was negatively correlated with the intervention time ($r = -0.346 \sim -0.493 \sim -0.759$), had the strongest effect at 24 hours and simultaneously attenuated PMCA1 mRNA level. Three concentration of angiotensin II (1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} mol/L) stimulated the activity of Na^{+} , K^{+} -ATPase in ASMC from Wistar-Kyoto rats in turn at 24 hours, 12 hours, 6 hours ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), and increased the activity of Na^{+} , K^{+} -ATPase with α_1 -subunit mRNA expression promoted in a dose-dependent manner at 24 hours ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), which was positively correlated with the intervention time of angiotensin II ($r = 0.425$, 0.645 , 0.767). Angiotensin II (1×10^{-9} , 1×10^{-8} mol/L) did not affect the activity of Na^{+} , K^{+} -ATPase in SHR (all $P > 0.05$), while angiotensin II (1×10^{-7} mol/L) significantly suppressed the activity of Na^{+} , K^{+} -ATPase, which was negatively correlated with the intervention time of angiotensin II ($r = -0.589$), and reached maximum effect on the expression of Na^{+} , K^{+} -ATPase α_1 -subunit mRNA at 24 hours ($P < 0.05$). **Conclusion** In Wistar-Kyoto rats, angiotensin II has biphasic effects on Ca^{2+} -ATPase activity, PMCA1 mRNA expression and activates Na^{+} , K^{+} -ATPase activity and α_1 subunit mRNA expression in a dose-dependent manner in ASMC. Whereas in SHR, angiotensin II inhibits Ca^{2+} -ATPase activity and PMCA1 mRNA expression, and only high dose of angiotensin II suppresses Na^{+} , K^{+} -ATPase activity and α_1 subunit mRNA expression in ASMC.

血管存在独立的肾素-血管紧张素系统^[1,2],其效应激素血管紧张素 II (angiotensin II , Ang II)以旁分泌-自分泌机制参与血管功能和结构的调节。细胞内钙离子浓度的变化是触发细胞增殖相关信号转导的始动因素及高血压发病的关键环节。 Ca^{2+} -ATPase和 Na^{+} , K^{+} -ATPase则是调节细胞内钙离子浓度的重要转运系统。在高血压病程中,心肌组织、动脉血管组织及动脉平滑肌细胞培养液中Ang II 含量显著增高^[3,5],动脉平滑肌细胞膜 Na^{+} , K^{+} -ATPase和 Ca^{2+} -ATPase活性也发生改变^[6]。目前,关于Ang II 对 Na^{+} , K^{+} -ATPase和 Ca^{2+} -ATPase的作用报道不一。有资料显示,Ang II 能抑制兔心肌细胞 Na^{+} , K^{+} -ATPase活性^[7],增加SD大鼠动脉平滑肌细胞 Na^{+} , K^{+} -ATPase活性及其 α_1 亚单位mRNA表达水平^[8,9],上调10周龄自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)血管平滑肌细胞质膜 Ca^{2+} -ATPase亚型1(plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 1, PMCA1)及肌浆网钙泵mRNA表达水平^[10]。本研究旨在探讨Ang II 对正常血压Wistar-Kyoto(WKY)大鼠和SHR动脉平滑肌细胞膜腺苷三磷酸酶(adenosine triphosphatases, ATPase)活性及基因表达的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料

14周龄雄性WKY大鼠和SHR各5只,由上海市高血压研究所提供(合格证书:医动字第0237-2, 2237-1)。DMEM购自美国Gibco公司,Ang II 购自美国Sigma公司, Ca^{2+} -ATPase, Na^{+} , K^{+} -ATPase试剂盒购自南京建成生物工程研究所,总RNA抽提试剂盒和一步法逆转录聚合酶链反应(one-step RT-PCR)试剂盒购自德国Qiagen公司。其他化学试剂

为国产分析纯。

1.2 主动脉平滑肌细胞培养与鉴定

采用组织块种植法培养细胞^[6],置入37℃、90%湿度、5% CO_2 孵箱进行原代和传代培养。倒置相差显微镜观察细胞生长情况,采用 α -肌动蛋白单克隆抗体免疫细胞化学法鉴定细胞^[6]。

1.3 实验分组

选用6~8代生长良好的WKY大鼠、SHR胸主动脉血管平滑肌细胞作实验材料,用去血清的DMEM培养液继续培养24 h,细胞同步化后进行实验。实验分WKY组、SHR组及Ang II 组(WKY和SHR分别加入含 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L Ang II 的培养液,共同孵育6 h、12 h和24 h)。

1.4 主动脉平滑肌细胞腺苷三磷酸酶活性测定

用匀浆介质制备成 10^9 /L的细胞悬液,超声粉碎仪粉碎细胞,显微镜下观察细胞呈不规则的细小碎片。用考马斯亮兰法测定匀浆蛋白的浓度。ATPase活性用酶学比色法测定,其活性以每毫克总蛋白中ATPase每小时分解ATP产生磷的量表示 [$\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$]。

1.5 细胞总RNA提取及mRNA表达检测

采用异硫氰酸胍硅胶凝胶体膜技术提取细胞RNA,一步法逆转录聚合酶链反应检测主动脉平滑肌细胞膜 Na^{+} , K^{+} -ATPase α_1 亚单位、PMCA1 mRNA表达,严格按照试剂盒说明书操作。 Na^{+} , K^{+} -ATPase α_1 亚单位上游引物5'-AAG GAC GCC TTT CAG AAT GCC T-3',下游引物5'-TGA CCA TGA TGA CCT TAA TCC-3'; PMCA1上游引物5'-GGC GAC TTT GGC ATC ACA CT-3',下游引物5'-TTT CAA CTT GGT GCA AAT TCC A-3';内参 β -actin上游引物5'-TGG GTC CAG AAG GAC TCC TAT G-3',下游引物5'-CAG GCA GCT CAT AGC TCT

TCT-3'。片段大小分别为 247 bp、120 bp 和 590 bp。反应条件为 50℃ 逆转录 30 min, 95℃ 预变性 15 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环 35 次, 后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 用英国 SYNGENE 公司全自动凝胶成像分析系统测定电泳条带吸光度值, 以 β -actin 吸光度作为内对照。ATPase 的 PCR 扩增条带吸光度值与同泳道 β -actin 扩增条带吸光度值的比值, 即为 Na^+ , K^+ -ATPase α_1 亚单位和 PMCA1 mRNA 的相对表达水平。

1.6 统计学方法

实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 全部资料的整理、分析均用 SPSS 13.0 统计软件进行。3 种不同浓度 AngⅡ对 WKY 组、SHR 组主动脉平滑肌细胞干预前、后比较均采用单因素方差分析, 同一浓度不同时间的比较采用 Spearman 相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血管紧张素Ⅱ对两种大鼠 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响

低、中浓度 AngⅡ(1×10^{-9} 和 1×10^{-8} mol/L) 显著增加 WKY 大鼠 Ca^{2+} -ATPase 活性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 与干预时间呈正相关 ($r = 0.340 \sim 0.725$, $P < 0.05$), 低浓度 AngⅡ在 24 h 才增加 Ca^{2+} -ATPase 活性 ($P < 0.05$), 中浓度 AngⅡ在 6 h 即有增加 ($P < 0.05$), 24 h 达最大值 ($P < 0.01$); 高浓度 AngⅡ则抑制 WKY 大鼠 Ca^{2+} -ATPase 活性 ($P < 0.05$), 与干预时间呈负相关 ($r = -0.348 \sim -0.759$, $P < 0.05$), 12 h 开始有显著抑制 ($P < 0.05$), 24 h 抑制最强 ($P < 0.01$)。3 种浓度 AngⅡ均显著抑制 SHR 组 Ca^{2+} -ATPase 活性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 并与干预时间呈负相关 ($r = -0.346 \sim -0.759$, $P < 0.05$), 6 h 即有抑制 ($P < 0.05$), 24 h 效应最强 ($P < 0.01$; 表 1)。

表 1. 血管紧张素Ⅱ对两种大鼠 Ca^{2+} -ATPase 活性的影响 [$\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$, $n = 9$]

分 组	AngⅡ浓度	0 h	6 h	12 h	24 h
WKY 组	1×10^{-9} mol/L	4.69 \pm 0.54	4.94 \pm 0.55	5.07 \pm 0.70	5.29 \pm 0.58 ^a
	1×10^{-8} mol/L	4.44 \pm 0.50	4.94 \pm 0.56 ^a	5.34 \pm 0.44 ^b	5.84 \pm 0.53 ^{bcd}
	1×10^{-7} mol/L	4.64 \pm 0.55	4.13 \pm 0.59 ^c	3.90 \pm 0.43 ^{de}	4.02 \pm 0.73 ^{efg}
SHR 组	1×10^{-9} mol/L	3.29 \pm 0.69	2.67 \pm 0.57 ^a	2.69 \pm 0.50 ^a	2.47 \pm 0.64 ^b
	1×10^{-8} mol/L	3.57 \pm 0.67	2.98 \pm 0.58 ^a	2.83 \pm 0.59 ^a	2.53 \pm 0.59 ^b
	1×10^{-7} mol/L	3.15 \pm 0.52	2.53 \pm 0.43 ^a	2.36 \pm 0.62 ^b	1.45 \pm 0.59 ^{bcd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与本组同浓度 0 h 比较; c 为 $P < 0.01$, 与本组同浓度 6 h 比较; d 为 $P < 0.05$, e 为 $P < 0.01$, 与本组同浓度 12 h 比较; f 为 $P < 0.01$, 与本组同时间 1×10^{-9} mol/L 比较; g 为 $P < 0.01$, 与本组同时间 1×10^{-8} mol/L 比较。

2.2 血管紧张素Ⅱ对两种大鼠 Na^+ , K^+ -ATPase 活性的影响

3 种浓度 AngⅡ均能增加 WKY 组 Na^+ , K^+ -ATPase 活性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 与干预时间呈正相关 ($r = 0.425 \sim 0.767$, $P < 0.01$), 低浓度 AngⅡ仅在 24 h 才显著增加 Na^+ , K^+ -ATPase 活性 ($P < 0.05$), 中浓度 AngⅡ却在 12 h 显著增加 Na^+ , K^+ -ATPase 活性 ($P < 0.01$), 而高度浓度 AngⅡ在 6 h 即显著增加 Na^+ , K^+ -ATPase 活性 ($P < 0.01$), 均在 24 h 达最大值 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。低、中浓度 AngⅡ对 SHR 组 Na^+ , K^+ -ATPase 活性均无影响 (均 $P > 0.05$), 仅高浓度 AngⅡ抑制 Na^+ , K^+ -ATPase 活性 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 与干预时间呈负相关 ($r = -0.589$, $P < 0.01$), 12 h 始有抑制 ($P < 0.05$), 24 h 达最大效应 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 12

h 与 24 h 间差异无显著性 (表 2)。

2.3 血管紧张素Ⅱ对两种大鼠腺苷三磷酸酶亚单位 mRNA 表达的影响

上述结果提示, 3 种浓度 AngⅡ对 WKY 大鼠、SHR Ca^{2+} -ATPase 和 Na^+ , K^+ -ATPase 活性的效应均在 24 h 最强, 故仅比较作用 24 h Ca^{2+} -ATPase、 Na^+ , K^+ -ATPase 亚单位 mRNA 表达水平变化。结果发现, 低、中浓度 AngⅡ(1×10^{-9} 和 1×10^{-8} mol/L) 上调 WKY 组 PMCA1 mRNA 表达 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 高浓度 AngⅡ却下调 WKY 组 PMCA1 mRNA 表达 ($P < 0.05$); 而 3 种浓度 AngⅡ均显著下调 SHR 组 PMCA1 mRNA 表达 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。AngⅡ(1×10^{-9} , 1×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L) 可剂量依赖性上调 WKY 组 Na^+ , K^+ -ATPase α_1 亚单位 mRNA 表达 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 低、中浓度

AngⅡ对 SHR 组 Na^+ , K^+ -ATPase α_1 亚单位 mRNA 表达无影响 (均 $P > 0.05$), 高浓度 ($1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$) AngⅡ却显著下调 SHR 组 Na^+ , K^+ -ATPase α_1 亚单位 mRNA 表达 ($P < 0.05$, 表 3、图 1 和图 2)。

表 2 血管紧张素Ⅱ对两种大鼠 Na^+ , K^+ -ATPase 活性的影响 [$\bar{x} \pm s$, $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$, $n = 9$]

分 组	AngⅡ浓度	0 h	6 h	12 h	24 h
WKY 组	$1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$	5.35 ± 0.97	5.68 ± 0.86	6.05 ± 0.90	6.45 ± 0.97^a
	$1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$	5.63 ± 1.08	6.22 ± 0.93	6.93 ± 0.95^b	7.70 ± 0.92^{bdf}
	$1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$	5.43 ± 1.10	6.57 ± 0.75^a	7.16 ± 1.14^{bf}	8.70 ± 0.92^{bdegh}
SHR 组	$1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$	4.34 ± 0.76	4.15 ± 0.69	4.29 ± 0.59	4.23 ± 0.70
	$1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$	4.42 ± 0.70	4.18 ± 0.70	3.96 ± 0.76	3.94 ± 0.55
	$1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$	4.19 ± 0.69	3.73 ± 0.52	3.35 ± 0.72^{ag}	2.90 ± 0.80^{bcgi}

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与本组同浓度 0 h 比较; c为 $P < 0.05$, d为 $P < 0.01$, 与本组同浓度 6 h 比较; e为 $P < 0.01$, 与本组同浓度 12 h 比较; f为 $P < 0.05$, g为 $P < 0.01$, 与本组同时间 $1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 比较; h为 $P < 0.05$, i为 $P < 0.01$, 与本组同时间 $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 比较。

表 3 血管紧张素Ⅱ作用 24 h 对两种大鼠腺苷三磷酸酶亚单位 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

AngⅡ浓度 (mol/L)	WKY 组		SHR 组	
	PMCA1	α_1 亚单位	PMCA1	α_1 亚单位
0(干预前)	0.547 ± 0.045	0.704 ± 0.116	0.193 ± 0.030	0.524 ± 0.025
1×10^{-9}	0.613 ± 0.037^{ac}	1.025 ± 0.213^a	0.140 ± 0.017^a	0.507 ± 0.047
1×10^{-8}	0.678 ± 0.042^{bc}	1.762 ± 0.137^{bc}	0.143 ± 0.021^a	0.457 ± 0.083
1×10^{-7}	0.402 ± 0.01^{ade}	2.083 ± 0.116^{bde}	0.093 ± 0.017^{bce}	0.393 ± 0.015^a

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与本组干预前比; c为 $P < 0.05$, d为 $P < 0.01$, 与本组 $1 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 比; e为 $P < 0.05$, 与本组 $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ 比。

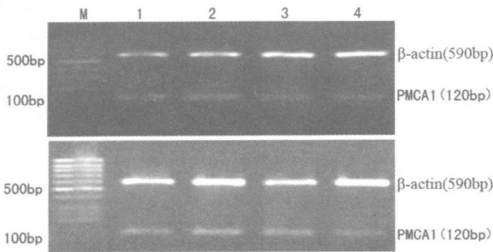


图 1 血管紧张素Ⅱ干预大鼠质膜 Ca^{2+} -ATPase 亚型 1 PCR 产物电泳图 M 为 Marker 1 为对照组, 2~4 依次为 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 和 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ AngⅡ 上图为 SHR, 下图为 WKY。

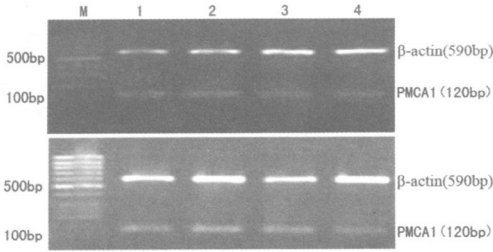


图 2 血管紧张素Ⅱ干预大鼠 Na^+ , K^+ -ATPase α_1 亚单位 PCR 产物电泳图 M 为 Marker 1 为对照组, 2~4 依次为 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 和 $1 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ AngⅡ 上图为 SHR, 下图为 WKY。

3 讨论

已知小动脉平滑肌细胞收缩和增殖是高血压发生的病理基础, 血管平滑肌细胞增殖与内源性 AngⅡ含量及细胞内钙离子浓度升高有关。本课题组曾发现, 8 周龄 SHR 动脉平滑肌细胞出现钙超载, 质膜 Na^+ , K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase 活性下降及其基因表达下调^[6], 14 周龄 SHR 血管平滑肌细胞膜 Ca^{2+} -ATPase, Na^+ , K^+ -ATPase 活性及其 mRNA 表达均较正常血压 WKY 大鼠显著下降^[5]。那么, AngⅡ对上述两种大鼠主动脉平滑肌细胞膜 Ca^{2+} -ATPase, Na^+ , K^+ -ATPase 的效应值得进一步研究。

高血压时心血管局部肾素-血管紧张素系统处于激活状态, 常表现为肾性高血压大鼠心肌组织^[3]、SHR 动脉血管组织^[4]、动脉平滑肌细胞培养液中 AngⅡ含量增高等^[5]。有资料显示, AngⅡ能抑制兔心肌细胞 Na^+ , K^+ -ATPase 活性^[7], 增加 SD 大鼠主动脉平滑肌细胞 Na^+ , K^+ -ATPase 活性及其 α_1 亚单位 mRNA 表达水平^[8,9], 上调 10 周龄 SHR 血管平滑肌细胞 PMCA1 及肌浆网钙泵 (SERCA2) mRNA 表达^[10]。本研究发现, 低、中浓度 (1×10^{-9} 和 $1 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$) AngⅡ能增加 WKY 大鼠 Ca^{2+} -

ATPase活性,并与干预时间正相关,6 h即有增加,24 h达最大值,且上调24 h PMCA1 mRNA表达;高浓度 Ang II 仅在24 h显著抑制WKY组 Ca^{2+} -ATPase活性及下调PMCA1 mRNA表达;3种浓度 Ang II 均能显著抑制SHR主动脉平滑肌细胞膜 Ca^{2+} -ATPase活性,且与干预时间负相关,6 h开始抑制,24 h效应最强,并下调24 h PMCA1 mRNA表达。提示 Ang II 对两种大鼠 Ca^{2+} -ATPase活性的激活或抑制可能与 Ca^{2+} -ATPase短期及长期调节机制有关, Ca^{2+} -ATPase活性效应在24 h最强可能与上调或下调PMCA1 mRNA表达有关。已知质膜 Ca^{2+} -ATPase是血管平滑肌细胞主动向外排 Ca^{2+} 的唯一途径,其活性下降可影响细胞主动向外排 Ca^{2+} 的能力。Ang II 抑制SHR主动脉平滑肌细胞膜 Ca^{2+} -ATPase活性,可能与高血压发病有关。低、中浓度 Ang II 增加WKY大鼠 Ca^{2+} -ATPase活性,可能是WKY大鼠对抗细胞内钙离子浓度增加的代偿机制之一。高浓度 Ang II 抑制WKY大鼠 Ca^{2+} -ATPase活性,可能系WKY大鼠的失代偿反应。基础研究显示,血管平滑肌细胞 Na^+ , K^+ -ATPase活性调节包括短期和长期调节机制^[11],短期调节在数分钟至数小时内完成,包括 Na^+ 和 Ca^{2+} 浓度增加、磷酸化/去磷酸化、亚单位在质膜的转位和对 Na^+ 的亲合力增加等,而长期调节机制在数小时至数天内完成,依赖其酶基因的转录、翻译的改变和蛋白质的变性、修饰等。本研究同时发现,3种浓度血管紧张素 II 均能增加WKY大鼠 Na^+ , K^+ -ATPase活性,且与血管紧张素 II 浓度及干预时间正相关,低浓度 Ang II 在24 h才显著增加 Na^+ , K^+ -ATPase活性,中浓度 Ang II 却在12 h显著增加 Na^+ , K^+ -ATPase活性,而高浓度 Ang II 在6 h即显著增加 Na^+ , K^+ -ATPase活性,各组均在24 h达最大效应,并呈剂量依赖性上调24 h Na^+ , K^+ -ATPase α_1 亚单位 mRNA表达水平,与 Ikeda等^[9]研究的 Ang II 呈剂量依赖性增加SD大鼠 Na^+ , K^+ -ATPase基因表达结果一致;低、中浓度 Ang II 对SHR Na^+ , K^+ -ATPase活性及 α_1 亚单位 mRNA表达无影响,高浓度 Ang II 抑制SHR主动脉平滑肌细胞膜 Na^+ , K^+ -ATPase活性,与干预时间负相关,24 h抑制最强,并下调 α_1 亚单位 mRNA表达水平,提示不同浓度 Ang II 及干预时间对两种大鼠 Na^+ , K^+ -ATPase活性有不同影响,可能与两种大鼠血管平滑肌细胞内源性 Ang II 含量及代偿机制不同有关^[15],3个作用时间的 Na^+ , K^+ -ATPase活性变

化也与其短期及长期调节机制有关,作用24 h Na^+ , K^+ -ATPase活性改变可能是通过基因转录机制完成。 Na^+ , K^+ -ATPase活性下降可致细胞内外 Na^+ 浓度梯度降低,胞内 Ca^{2+} 经 Na^+ - Ca^{2+} 交换排出减少,致细胞内钙离子浓度增加。Ang II 增加WKY大鼠 Na^+ , K^+ -ATPase活性可能系WKY大鼠对抗细胞内钙离子浓度升高的另一代偿机制。

综上所述,Ang II 对正常血压和高血压大鼠 Ca^{2+} -ATPase、 Na^+ , K^+ -ATPase活性及其亚单位 mRNA表达的不同效应与其浓度及干预时间有关。Ang II 对正常血压大鼠主动脉平滑肌细胞膜 Ca^{2+} -ATPase活性及质膜 Ca^{2+} -ATPase亚型1 mRNA表达有双向作用,并呈剂量依赖性激活 Na^+ , K^+ -ATPase活性及 α_1 亚单位 mRNA表达。Ang II 抑制高血压大鼠主动脉平滑肌细胞膜 Ca^{2+} -ATPase、 Na^+ , K^+ -ATPase活性及 Ca^{2+} -ATPase亚型1、 α_1 亚单位 mRNA表达。

[参考文献]

- [1] Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation [J]. *Endocrine Rev*, 2003, 24: 261-271.
- [2] Brewster UC, Perazella MA. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease [J]. *Am J Med*, 2004, 116: 263-272.
- [3] 袁萍, 商黔惠, 吴芹, 等. 厄贝沙坦对肾性高血压大鼠左心室肥厚心肌腺苷三磷酸酶和钙调神经磷酸酶的影响 [J]. *中华高血压杂志*, 2009, 17: 238-242.
- [4] 王安才, 曹衡, 汪俊元, 等. 阿托伐他汀对自发性高血压大鼠去外膜颈动脉内膜增生的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2006, 10: 862-866.
- [5] 张贵海, 商黔惠, 姜黔峰, 等. 心钠素对高血压大鼠动脉平滑肌细胞离子泵活性和基因表达的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2009, 40: 2862-866.
- [6] 商黔惠, 刘晓鹏, 方宁, 等. 高血压大鼠动脉平滑肌细胞钙超载与腺苷三磷酸酶 [J]. *高血压杂志*, 2006, 14: 379-384.
- [7] White CN, Fietze GA, Chia-Chi LIU, et al. Angiotensin II inhibits the Na^+ - K^+ pump via PKC-dependent activation of NADPH oxidase [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2009, 296: C693-C700.
- [8] Isenovic ER, Jacobs DB, Kedes MH, et al. Angiotensin II regulation of the Na^+ pump involves the phosphatidylinositol-3 kinase and p42/44 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells [J]. *Endocrinology*, 2004, 145: 1151-160.
- [9] Ikeda U, Takahashi M, Okada K, et al. Regulation of Na^+ - K^+ -ATPase gene expression by angiotensin II in vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol*, 1994, 267: H1295-302.
- [10] Monteith GR, Kable EP, Kuo TH, et al. Elevated plasma membrane and sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} pump mRNA levels in cultured aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 230: 344-346.
- [11] Aydemir-Koksoy A, Allen JC. Regulation of Na^+ pump expression by vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, 280: H1869-874.

(此文编辑 许雪梅)