

[文章编号] 1007-3949(2010)18-04-0269-04

• 实验研究 •

## 高血压家族史人脐动脉平滑肌细胞离子泵及自分泌血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 和内皮素的变化

姜黔峰, 方宇, 商黔惠

(遵义医学院临床医学研究所, 遵义医学院附属医院心内科, 贵州省遵义市 563003)

[关键词] 腺苷三磷酸酶; 人脐动脉平滑肌细胞; 血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ ; 内皮素; 高血压家族史

[摘要] 目的 比较高血压家族史和无高血压家族史的人脐动脉平滑肌细胞  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性和亚单位 mRNA 表达的差异, 比较两者人脐动脉平滑肌细胞培养上清液中血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 和内皮素浓度的差异, 探讨高血压家族史人脐动脉平滑肌细胞离子泵变化及其自分泌血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 和内皮素的关系。方法 以  $\text{FH}^+$  的人脐动脉平滑肌细胞为研究对象, 以无高血压家族史的人脐动脉平滑肌细胞为对照, 分别用生化酶学方法和逆转录聚合酶链反应技术检测两组细胞膜  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性和质膜  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 1-subunit mRNA、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, PMCA) 亚型 1 (PMCA1) mRNA 相对表达量; 采用放射免疫法检测细胞培养上清液中血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 和内皮素的含量。结果 高血压家族史组人脐动脉平滑肌细胞膜  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性均高于无高血压家族史组 ( $P < 0.05$ ), 但两组 hUASC 质膜  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -subunit mRNA 表达和 PMCA1 mRNA 表达与无高血压家族史组无差异。高血压家族史组人脐动脉平滑肌细胞培养上清液中血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 、内皮素浓度与无高血压家族史组无差异。结论 有高血压家族史者脐动脉平滑肌细胞膜  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 活性增高并可能与其  $\alpha 1$ -Subunit PMCA1 mRNA 表达及自分泌血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 和内皮素无明显关系。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Changes of Ion Pumps and the Autocrine of Ang $\text{Ang}(\text{I})$ , ET in Human Umbilical Arterial Smooth Muscle Cells From the Neonates with Hypertension Family History

JIANG Qian-Feng FANG Yu and Shang Qian-Hui

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

[KEY WORDS] Adenosinetriphosphatase Human Umbilical Artery Smooth Muscle Cell Angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$  Endothelin Hypertension Family History

[ABSTRACT] **Aim** To compare the activities and mRNA expression levels of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in cultured human umbilical artery smooth muscle cells (hUASC) isolated from neonates with hypertensive family history ( $\text{FH}^+$ ) or without hypertensive family history ( $\text{FH}^-$ ), and to compare the concentration of angiotensin $\text{Ang}(\text{I})$  and endothelin (ET) in hUASCs supernatant and then explore the relationships between the ion pumps and autocrine Ang $\text{Ang}(\text{I})$ , ET in human umbilical artery smooth muscle cells from  $\text{FH}^+$ . **Methods** The ion pumps activities in cultured hUASC were detected by spectrophotography. The mRNA expression of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -subunit and plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoform 1 (PMCA1) in both  $\text{FH}^+$  and  $\text{FH}^-$  hUASC was measured by RT-PCR. Radioimmunoassay was used to determine the content of Ang $\text{Ang}(\text{I})$  and ET in supernatant of cultured hUASC. **Results** The activities of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase from  $\text{FH}^+$  hUASC were higher than those of  $\text{FH}^-$  group ( $P < 0.05$ ). But the mRNA expression of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -subunit and PMCA1 had no difference between  $\text{FH}^+$  and  $\text{FH}^-$ . There was no significant difference in Ang $\text{Ang}(\text{I})$ , ET concentration in the supernatant of the two group hUASC. **Conclusion** The activities of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase are increased in  $\text{FH}^+$  hUASC, which may not be related to the mRNA expression of  $\alpha 1$ -subunit PMCA1 and the autocrine of Ang $\text{Ang}(\text{I})$  and ET.

[收稿日期] 2009-11-22 [修回日期] 2010-03-12

[基金项目] 贵州省科学技术基金项目 [黔基合字 (2001) 3091, 遵义医学院硕士启动基金 [(2005) 037], 贵州省卫生厅基金项目 [省卫 (2006) 2号]

[作者简介] 姜黔峰, 硕士研究生, 副主任医师。研究方向为高血压发病机制, 联系电话为 15908524567 E-Mail 为 JQF1096@163.com。商黔惠, 硕士研究生, 教授。研究方向为高血压发病机制, 联系联系电话为 0852-8608778。方宇, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向为高血压发病机制。

原发性高血压 (essential hypertension, EH) 是多基因遗传与环境因素共同作用的结果, 20% ~ 40% 的血压差异是遗传因素决定的<sup>[1]</sup>, 原发性高血压患者的子女具有较高的高血压发生概率。现有研究已对有无高血压家族史青少年红细胞膜钙泵、钠泵活性及血浆中血管紧张素 $\text{Ang}(\text{I})$ 、内皮素水平进行了较广泛的研究和探讨<sup>[2-4]</sup>, 具有高血压家族史的子女在

血压未升高之前,已经出现红细胞膜钙泵、钠泵活性的降低和血浆血管紧张素 $\text{①}$ 、内皮素水平的升高,但对于人动脉血管平滑肌细胞钠泵、钙泵的改变,目前尚未见报道。由于心血管局部组织中存在有完整独立的RAS,在高血压的发生发展中起着比循环RAS更重要的作用,对于有高血压家族史子代动脉平滑肌细胞自分泌血管紧张素 $\text{①}$ 、内皮素的变化不甚清楚。因此,本研究通过比较有无高血压家族史初生婴儿脐动脉血管平滑肌细胞(human umbilical artery smooth muscle cells, hUASMC)膜钠泵、钙泵活性及其mRNA表达,同时比较两者hUASMC培养上清液中血管紧张素 $\text{①}$ (angiotensin $\text{①}$ , Ang $\text{①}$ )和内皮素(endothelin, ET)浓度的差异,进一步探讨有高血压家族史子代动脉血管平滑肌细胞离子泵的变化和血管平滑肌细胞自分泌血管活性物质水平变化及两者之间的相互关系,有助于了解原发性高血压的发病机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 对象与材料

选择本院产科有高血压阳性家族史( $\text{FH}^+$ )正常足月剖腹产胎儿脐动脉7例(均取得知情同意)作为研究组。同期随机选择无高血压家族史( $\text{FH}^-$ )正常足月剖腹产胎儿脐动脉7例作为对照组。高血压家族史的判定标准为产妇及其丈夫和双方的父母中任意一人患有原发性高血压<sup>[5]</sup>。超微量ATP酶测试盒购于南京建成生物工程研究所,Ang $\text{①}$ 、ET放射免疫分析试剂盒购于北京北方生物技术有限公司,RT-PCR试剂盒为Qiagen公司产品。

### 1.2 人脐动脉平滑肌细胞的培养及鉴定

采用文献[6]hUASMC培养方法,无菌取出脐带10~15 cm,分离脐动脉,拭去内皮细胞,留取血管中膜平滑肌层,剪成约0.5~1 mm<sup>2</sup>的小块,用含20%胎牛血清的DMEM培养液对hUASMC采用贴壁法进行原代培养,用含10%胎牛血清的DMEM培养液传代培养。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肌动蛋白单克隆抗体免疫组织化学方法进行鉴定。本实验所用细胞为生长良好的第4~6代细胞。

### 1.3 血管平滑肌细胞 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase及 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性的测定

用酶学比色法测定,根据ATPase可分解ATP成ADP和无机磷(Pi),测定Pi的量可判断酶活力的高低,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活性以每毫克总蛋白(mg protein)中ATPase每小时分解ATP产生的Pi( $\mu\text{mol}$ )的量表示( $\mu\text{mol Pi} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ )。反应产物用721型分光光度计在波长660 nm处,1 cm光径比色,最后计算反应后样品中的磷含量,即为ATPase活性。每组每例脐动脉选3瓶生长良好的细胞重复检测3次取平均值。

### 1.4 总RNA的提取和 $\alpha 1$ -subunit和PMCA1基因的相对定量

采用异硫氰酸胍-硅,凝胶体膜技术提取细胞总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的纯度,琼脂糖凝胶电泳显示RNA完整性好。RT-PCR反应 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -subunit扩增引物:上游5'-TCT TCC TCA TCG GTA TCA TCG TAG C-3',下游5'-GGA CAG AGC AAG CCA GGT AGC-3',扩增片段长度为302 bp。  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase异构体1(plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, PMCA1)扩增引物:上游5'-GCC CAG CAC TAA AGA AAG CAG ATG-3',下游5'-CCA TAA GGT TTC CGA AGC AAG AGA G-3',扩增片段长度349 bp。内参 $\beta$ -actin引物上游5'-GAC AGG ATG CAG AAG GAG ATT ACT-3',下游5'-TGA TCC ACA TCT GCT GGA AGG T-3',扩增片段长度142 bp。均由上海生工生物工程公司合成。反应条件为:逆转录50℃ 30 min,预变性95℃ 15 min,变性94℃ 30 s,退火55℃ 30 s,延伸72℃ 1 min,循环30次,后延伸72℃ 10 min。反应结束后取扩增产物7.5  $\mu\text{L}$ 进行2%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。

### 1.5 细胞培养液中血管紧张素 $\text{①}$ 和内皮素浓度的测定

收集各组细胞培养液1 mL,加入装有酶抑制剂的Eppendorf管中,离心取上清,用Ang $\text{①}$ 及ET放射免疫分析试剂盒测定。

### 1.6 统计学处理

所得数据均用SPSS 11.5统计学软件进行录入和分析处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较用 $t$ 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 有无高血压家族史脐动脉血管平滑肌细胞ATPase活性比较

高血压家族史阳性组人脐动脉平滑肌细胞 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ -ATPase和 $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性均高于高血压

家族史阴性组, 差异有显著性 ( $P < 0.05$ , 表 1)。

表 1 有无高血压家庭中脐动脉血管平滑肌细胞  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ ,  $\mu\text{molPi} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mgpro}^{-1}$ )

分 组	钠泵	钙泵
无高血压家族史组	$4.02 \pm 0.46$	$3.70 \pm 0.67$
有高血压家族史组	$5.14 \pm 0.64^a$	$4.78 \pm 1.01^a$

a为  $P < 0.05$  与无高血压家族史组比较。

2.2 有无高血压家族史脐动脉血管平滑肌细胞 ATPase mRNA 表达的比较

$\text{FH}^-$  与  $\text{FH}^+$  组血管平滑肌细胞  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -subunit 及 PMCA1 mRNA 的表达水平差异无显著性 ( $P > 0.05$ , 图 1 和表 2)

表 2 有无高血压家族史脐动脉血管平滑肌细胞 ATPase mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ )

分 组	$\alpha 1$ -subunit/ $\beta$ -actin	PMCA1/ $\beta$ -actin
无高血压家族组	$0.78 \pm 0.19$	$0.39 \pm 0.11$
有高血压家族史组	$0.85 \pm 0.07$	$0.44 \pm 0.11$

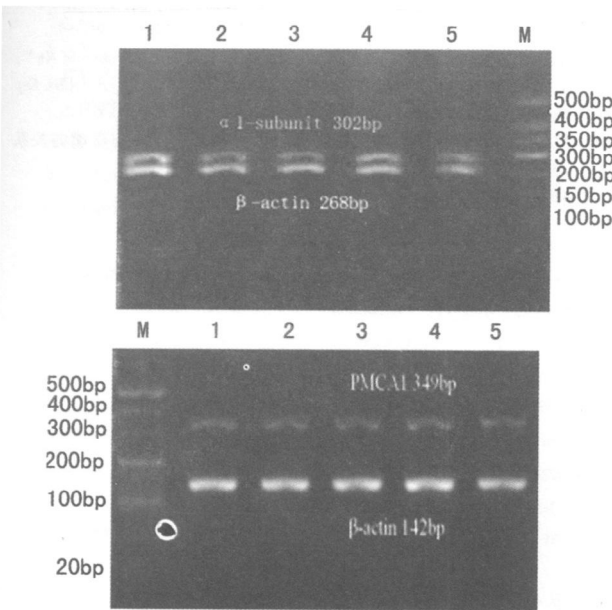


图 1  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -subunit 及 PMCA1 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图 上图为  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha 1$ -subunit 下图为 PMCA1; M 为 mark, 1~3 为有高血压家族史组; 4~5 为无高血压家族史组。

2.3 有无高血压家族史脐动脉血管平滑肌细胞培养液中血管紧张素  $\text{Ang}$  和内皮素的浓度的比较

$\text{FH}^-$  与  $\text{FH}^+$  组血管平滑肌细胞培养上清液中  $\text{Ang}$  和 ET 浓度差异均无显著性 ( $P > 0.05$ , 表 3)。

表 3 两组脐动脉血管平滑肌细胞培养上清液中血管紧张素  $\text{Ang}$  和内皮素的浓度的比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 7$ ,  $\text{ng/L}$ )

分 组	血管紧张素 $\text{Ang}$	内皮素
无高血压家族组	$53.94 \pm 5.58$	$32.11 \pm 6.49$
有高血压家族史组	$50.01 \pm 5.43$	$30.21 \pm 5.17$

3 讨论

动脉平滑肌细胞膜离子转运异常及动脉平滑肌局部 RAS 系统的激活与高血压密切相关<sup>[7,8]</sup>。钠泵 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase)、质膜钙泵 (plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, PMCA) 是动脉平滑肌细胞膜上维持细胞内正常  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$  浓度的重要转运系统, 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cells, VSMC) 主要表达钠泵  $\alpha 1$  亚单位<sup>[9]</sup> 及 PMCA1 亚单位<sup>[10]</sup>, 钠泵、钙泵活性降低可导致细胞内钠、钙离子浓度升高, 血管收缩反应性增强和平滑肌细胞增生与肥大, 血管阻力增高, 血压升高。

已知遗传因素在高血压的发病中起着重要作用, 高血压家族史与高血压发病关系密切<sup>[11]</sup>。既往有研究表明, 有高血压家族史青少年多项心血管危险因素均高于无高血压家族史组<sup>[5]</sup>, 谭晖等<sup>[2]</sup>发现高血压家族史阳性的青少年红细胞膜钠泵和钙泵活性比无高血压家族史的对照组低, 其认为钠泵、钙泵活性受抑可能是与遗传有关, 本研究通过对高血压家族史子代 hUASMC 钠泵、钙泵活性的测定, 发现有高血压家族史组 hUASMC 的钠泵和钙泵活性较无高血压家族史组高, 与其结果不一, 其原因可能是不同组织体内、体外实验或不同年龄阶段细胞钠泵、钙泵活性改变均可不一致<sup>[12-14]</sup>, 本研究选择的研究对象为足月胎儿脐动脉, 酶活性升高可能系代偿性增高, 但随着细胞内  $\text{Na}^+$  和  $\text{Ca}^{2+}$  浓度持续增加, 钠泵、钙泵活性可逐渐由亢进转为抑制, 最终出现钠泵和钙泵活性减弱<sup>[15]</sup>。在本研究中未观察到有高血压家族史组 hUASMC 钠泵  $\alpha 1$ -subunit 和钙泵 PMCA1 mRNA 表达与离子泵活性的改变同步, 故我们推测有高血压家族史动脉平滑肌细胞离子泵活性的异常改变可能先于 mRNA 的表达。

在高血压的发生中, 血管活性物质如血管紧张素  $\text{Ang}$ 、内皮素的异常分泌均是血压升高的重要因素, 二者主要通过旁分泌及自分泌产生, 其中内皮素主要来自内皮细胞的合成及释放。高血压患者血浆  $\text{Ang}$  和 ET 水平明显高于正常人<sup>[16]</sup>, 高血压家族史单亲组、双亲组青少年血浆的一氧化氮、血浆肾素

活性、血管紧张素 $\text{①}$ 、内皮素均高于对照组<sup>[3 17]</sup>,目前对于Ang II ET与钠泵、钙泵的相互关系的研究观点不一,较多学者认为在不同的组织,不同的年龄阶段,血管活性物质对离子泵的作用不同<sup>[18 19]</sup>。本研究结果发现人脐动脉平滑肌细胞自分泌Ang $\text{①}$  ET与有无高血压家族史无明显相关,可能是由于本研究取材来源于胎儿脐动脉平滑肌,局部RAS尚未激活,内皮源性收缩因子(Ang $\text{①}$  ET)早期的自分泌处于稳态<sup>[20]</sup>,同时也可能与HUASMC体外培养时去掉了脐动脉内皮有关。通过本研究发现,有高血压家族史者脐动脉平滑肌细胞膜 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase活性升高,是否提示有高血压遗传背景的新生儿可能已有动脉平滑肌离子泵活性的异常?尚需深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Laragh JH, Brenner BM. Hypertension: pathophysiology, diagnosis and management [M]. New York: Raven Press, 1990: 81-100.
- [2] 谭晖,王文英,沈惟堂,等. 有无高血压家族史的正常青少年红细胞膜钙和钠泵活性的研究[J]. 中华儿科杂志, 1997, 35(10): 530-531.
- [3] 刘华,傅增洋. 血管活性物质在有原发性高血压家族史的健康子女中的变化情况[J]. 中国综合临床, 2006, 22(5): 389-391.
- [4] 陈以绚,隋秀芳,刘华,等. 有高血压家族史的健康子代血浆血管紧张素 $\text{①}$ 、内皮素及一氧化氮水平的研究[J]. 中国心血管病研究杂志, 2005, 3(5): 339-341.
- [5] 刘博伟,尹福在,马春明,等. 有高血压家族史血压正常的青少年心血管危险因素分析[J]. 中华高血压杂志, 2008, 16(5): 441-444.
- [6] 姜黔峰,商黔惠,巩亮,等. 人脐动脉平滑肌细胞培养方法的探讨[J]. 遵义医学院学报, 2005, 28: 119-122.
- [7] 孙宁玲,徐成斌. 今日高血压[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 47-60.
- [8] 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(5): 379-384.
- [9] Ikeda U, Takahashi M, Okada K, et al. Regulation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase gene expression by angiotensin II in vascular smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol*, 1994, 267: H1295-302.
- [10] 姜黔峰,商黔惠,吴芹,等. 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[J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(10): 815-819.
- [11] 黄广勇,顾东风,吴锡桂,等. 父母高血压史对子女高血压患病率及血压水平的影响[J]. 高血压杂志, 2002, 10: 274-277.
- [12] Torliska K, Grochowalska A, Kupcz J, et al. In vivo and in vitro effects of hyperglycemia on  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent ATPases activity in brain synaptosomes of aging rats [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2006, 57(7): 145-158.
- [13] Mishima T, Yamada T, Sakamoto M, et al. Time course of changes in in-vitro sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -handling and  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase activity during repetitive contractions [J]. *Pflugers Arch*, 2008, 456(3): 601-609.
- [14] Rao MR, Sun L, Zhang XW. Effect of praeuptonum caumarin on cardiac mass, myocardial  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity in renovascular hypertensive rats [J]. *Yao Xue Xue Bao*, 2002, 23(6): 401-404.
- [15] 杨霆,胡作英,曹衡,等. 缬沙坦和苯那普利对自发性高血压大鼠心肌钠泵和钙泵的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2001, 6(4): 353-355.
- [16] 王勇,张亚光. 高血压病患者血浆内皮素与降钙素基因相关肽变化的意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15: 986-987.
- [17] 刘兰,张波,高俊岭,等. 有高血压家族史的健康子代血浆中降钙素相关肽、血管紧张素及内皮素水平[J]. 中华高血压杂志, 2006, 14(9): 727-729.
- [18] Petzold GC, Einhaupl KM, Dimagli U, et al. Ischemia triggered by spreading neuronal activation is induced by endothelin-1 and hemoglobin in the subarachnoid space [J]. *Ann Neurol*, 2003, 54(5): 591-598.
- [19] Shah S, Hussain T. Enhanced angiotensin II-induced activation of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in the proximal tubules of obese Zucker rats [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2006, 28(1): 29-40.
- [20] 陈祥新,傅国胜. 血管紧张素 $\text{①}$ 及其受体与血管内皮功能的关系[J]. 临床心血管病杂志, 2003, 19(11): 698-700.

(此文编辑 李玲玲)