

赖诺普利对自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞离子泵活性及其 mRNA 表达的影响

郭玉璜^{1,2}, 商黔惠¹, 吴芹³, 姜黔峰¹, 张贵海¹

(遵义医学院 1. 临床医学研究所 附属医院心内科, 3 药理学教研室 贵州省基础药理重点实验室, 贵州省遵义市 563003; 2 郴州市第三人民医院心内科)

[关键词] 腺苷三磷酸酶; 血管平滑肌细胞; 赖诺普利; 自发性高血压大鼠

[摘要] 目的 探讨赖诺普利对自发性高血压大鼠动脉血管平滑肌细胞钠泵、钙泵活性及钠泵 α_1 亚单位、钙泵亚型 1 mRNA 表达水平的影响。方法 以自发性高血压大鼠动脉血管平滑肌细胞为研究对象, 分为自发性高血压大鼠对照组、低剂量 (1×10^{-6} mol/L) 赖诺普利组和高剂量 (1×10^{-5} mol/L) 赖诺普利组, 另以 Wistar-Kyoto 大鼠 (WKY) 为对照; 分别用生化酶学方法和实时定量 PCR 检测细胞膜钠泵、钙泵活性和 mRNA 表达水平, 用放射免疫分析法检测细胞培养液血管紧张素 Ang^{II} 的含量。结果 与 WKY 对照组比较, 自发性高血压大鼠动脉血管平滑肌细胞膜钠泵、钙泵活性及钠泵 α_1 亚单位、钙泵亚型 1 mRNA 表达水平均降低 ($P < 0.01$)。赖诺普利能提高自发性高血压大鼠动脉血管平滑肌细胞膜钠泵、钙泵活性, 并能上调钠泵 α_1 亚单位和钙泵亚型 1 mRNA 的表达水平 ($P < 0.01$)。自发性高血压大鼠动脉血管平滑肌细胞培养液中血管紧张素 Ang^{II} 含量高于 WKY 对照组 ($P < 0.05$), 赖诺普利能降低其培养液中血管紧张素 Ang^{II} 含量 ($P < 0.05$)。结论 高血压大鼠动脉血管平滑肌细胞两种离子泵活性降低可能缘于它自身基因表达水平的下降, 赖诺普利通过阻断血管紧张素 Ang^{II} 而上调两种离子泵活性及基因表达。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effects of Lisinopril on the Activities and mRNA Expression of Ion Pumps in Aortic Smooth Muscle Cells from Spontaneously Hypertensive Rats

GUO Yu-Huang SHANG Qian-Hui WU Q in JIANG Qian-Feng and ZHANG Gui-Hai

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

[KEY WORDS] Adenosinetriphosphatase, Vascular Smooth Muscle Cells, Lisinopril, Spontaneously Hypertensive Rat

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of lisinopril on the activities of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase and mRNA expression levels of Na^+ , K^+ -ATPase α_1 -subunit and plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 1 (PMCA1) in cultured thoracic aorta vascular smooth muscle cells (ASMC) isolated from spontaneously hypertensive rats (SHR).

Methods ASMC were divided into four groups: Wistar-Kyoto (WKY) control, SHR control, Lisinopril (1×10^{-6}) intervened SHR group and lisinopril (1×10^{-5}) intervened SHR group. The activities of ion pumps were detected by spectrophotography and mRNA expression were measured by real time PCR. The content of angiotensin Ang^{II} in cells-cultured medium were detected by radioimmunoassay.

Results The activities of Na^+ , K^+ -ATPase, Ca^{2+} -ATPase and the mRNA expression levels of Na^+ , K^+ -ATPase α_1 -subunit and PMCA1 in ASMC from SHR were significantly lower than those from WKY control ($P < 0.01$). Lisinopril significantly increased the activities of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase and mRNA expression levels of Na^+ , K^+ -ATPase α_1 -subunit and PMCA1 in ASMC from SHR ($P < 0.01$). Ang^{II} content of culture medium in ASMC from SHR was significantly more than those from WKY control ($P < 0.05$), lisinopril attenuated Ang^{II} content of ASMC culture medium from SHR ($P < 0.05$).

Conclusion The decreased activities of Na^+ , K^+ -ATPase and Ca^{2+} -ATPase may be related to their lower expression of the mRNA in ASMC from SHR. The lisinopril may increase the activities of two ion pumps and upregulate the mRNA expression of Na^+ , K^+ -ATPase α_1 -subunit and PMCA1 in ASMC from SHR through blocking the generation of Ang^{II} .

[收稿日期] 2010-04-19 [修回日期] 2010-06-12

[基金项目] 贵州省科学技术基金重点项目和贵州省优秀青年科技人才基金项目 (2002) 3013 (2003) 03161

[作者简介] 郭玉璜, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为高血压。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和药物干预。吴芹, 高级实验师, 研究方向为心血管药理学。

细胞膜离子转运异常为原发性高血压 (essential hypertension, EH) 的发病机制之一, 其中 Na^+ , K^+ -ATPase (简称钠泵) 和 Ca^{2+} -ATPase (简称钙泵) 是维持细胞内正常 Na^+ 、 Ca^{2+} 浓度的重要转运系统。已有研究表明, 原发性高血压患者和高血压动物存在细胞内 Na^+ 、 Ca^{2+} 代谢紊乱, 与钠泵和钙泵活性降

低有关。高血压时细胞膜离子泵活性降低的原因,可能与血管紧张素 Ang^{II} (angiotensin Ang^{II})等血管活性物质的异常改变有关^[1]。血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin-converting enzyme inhibitor ACEI)能够提高高血压患者血细胞和实验动物心肌细胞膜钠泵和钙泵活性^[2-4],但机制尚不十分清楚。赖诺普利(lisinopril Lisi)是一种含羧基活性型ACEI,本研究选用赖诺普利干预自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat SHR)胸主动脉血管平滑肌细胞(aortic vascular smooth muscle cells, ASMC),旨在探讨赖诺普利对ASMC膜钠泵和钙泵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SHR及Wistar-Kyoto(WKY)大鼠各5只,体重 208 ± 22 g,由上海市高血压研究所提供(合格证书:医动字第2237-1, 0237-2号)。赖诺普利(纯度 $\geq 99\%$)购自上海五洲药业股份有限公司;ATP酶测试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;RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒和 β -actin免疫组织化学检测试剂盒购于北京中山生物技术有限公司;Ang Ang^{II} 放射免疫分析试剂盒购于北京北方生物技术研究所。

1.2 大鼠动脉血管平滑肌细胞的培养及鉴定^[5]

采用组织块贴壁法培养大鼠ASMC,平滑肌细胞特异性 β -actin单克隆抗体免疫组织化学法进行鉴定。生长良好的第6~8代细胞用于实验。

1.3 动脉血管平滑肌细胞同步化鉴定

采用去血清的达尔伯克氏(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)培养液继续培养ASMC 24 h,使细胞周期调整在 G_0 - G_1 期,用流式细胞仪测定细胞同步化(图1)。细胞同步化率为 $95\% \pm 2\%$ (SHR组 $n=4$)。

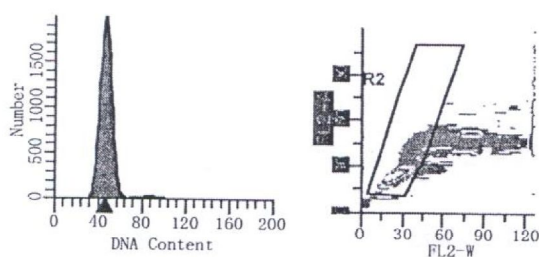


图1 流式细胞仪检测血管平滑肌细胞同步化的原始记录图

1.4 实验分组

实验分WKY对照组、SHR对照组、低剂量赖诺普利组和高剂量赖诺普利组(分别用 1×10^{-6} mol/L、 1×10^{-5} mol/L赖诺普利干预SHR ASMC)。

1.5 腺苷三磷酸酶活性的测定

腺苷三磷酸酶(adenosinetriphosphatase ATPase)活性以每毫克总蛋白中ATPase每小时分解ATP产生磷的量表示[$\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$]。操作严格按试剂盒说明书进行。

1.6 实时定量PCR测动脉血管平滑肌细胞膜钠泵 α_1 亚单位和钙泵亚型1 mRNA的表达

按照说明书提取RNA并纯化,紫外分光光度法检测RNA纯度, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在1.8~2.2之间认为纯度符合要求。根据Genebank数据库中钠泵 α_1 亚单位、钙泵亚型1(PMCA1)和 β -actin的基因序列,由TaKaRa公司设计并合成引物。钠泵 α_1 亚单位上游引物5'-GCC TCA ACA TTC CAG TGA ACC A-3',下游引物为5'-CTT AGC AAA GAC AAT CTC CGT GTG-3';钙泵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'-GGA GAT TAC TGC CCT GGC TCC TA-3',下游引物5'-GAC TCA TCG TAC TCC TGC TTG CTG-3';片段大小分别为137 bp、120 bp和150 bp。将650 ng的RNA逆转录成cDNA,反应条件为25℃ 10 min, 42℃ 30 min, 95℃ 2 min。最后采用SBRY supermix(BioLabs公司产品)进行PCR扩增,扩增条件为95℃ 8.5 min进入循环;95℃ 15 s, 55.2℃ (57.9/60.2℃) 20 s循环40次。以Ct值为统计参数依次计算下列数据:(1) $C_{t\text{平均}} = (C_{t1} + C_{t2})/2$ (重复管);(2) $dCt = C_{t\text{平均}} - \text{中间值}$; (3)基因的表达 $= 2^{-(dCt)}$; (4)以目的基因的表达/内参基因的表达计算出钠泵 α_1 亚单位及PMCA1 mRNA表达的相对量。

1.7 细胞培养液血管紧张素 Ang^{II} 含量的测定

收集各组细胞培养液1 mL,加入装有酶抑制剂(0.30 mol/L依地酸 10 μL , 0.32 mol/L二巯基丙醇 5 μL , 0.34 mol/L 8-羟基喹啉硫酸盐 10 μL)的Eppendorf管中,离心(4℃、3 000 r/min \times 5 min),取上清,用Ang Ang^{II} 放射免疫分析试剂盒测定。

1.8 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,全部资料的整理、分析均用SPSS 12.0统计软件进行。两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析和LSD-t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠动脉血管平滑肌细胞的培养及鉴定

原代细胞培养至第 18 天, 组织块被推掉, 相邻生长晕汇集成片, 开始传代培养。传代后约 3 天, 细胞交织成网状, 传代后约 5 天, 细胞铺满培养瓶底, 平行排列呈“峰、谷”样结构特征(图 2)。β-actin 单克隆抗体免疫细胞化学鉴定结果显示胞浆着色, 胞核清晰可见, 阳性 ASMC 达 95% 以上(图 2)。



图 2 大鼠主动脉血管平滑肌细胞的鉴定 左为动脉血管平滑肌细胞呈“峰、谷”样生长状态 ($\times 50$); 右为动脉血管平滑肌细胞 β-actin 免疫组织化学染色结果 (S-P 法, $\times 100$)

2.2 赖诺普利对自发性高血压大鼠动脉血管平滑肌细胞膜钠泵和钙泵活性的影响

与 WKY 对照组比较, SHR ASMC 膜离子泵活性降低。与 SHR 对照组比较, 赖诺普利干预后能增加钠泵和钙泵活性 ($P < 0.01$); 两个不同浓度的赖诺普利组之间差异无显著性 ($P > 0.05$ 表 1)。

表 1 动脉血管平滑肌细胞膜钠泵和钙泵活性 [$\bar{x} \pm s$, $n = 6$ $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot \text{mg})$]

分 组	钠泵活性	钙泵活性
WKY 对照组	10.88 ± 1.32	7.00 ± 0.99
SHR 对照组	6.73 ± 0.87^a	5.22 ± 0.73^a
低剂量赖诺普利组	10.27 ± 0.90^c	6.33 ± 0.78^b
高剂量赖诺普利组	10.79 ± 0.26^c	6.45 ± 1.28^b

a 为 $P < 0.01$, 与 WKY 对照组比较; b 为 $P < 0.05$, c 为 $P < 0.01$, 与 SHR 对照组比较。

2.3 赖诺普利对自发性高血压大鼠动脉血管平滑肌细胞膜钠泵 α_1 亚单位、钙泵亚型 1 mRNA 表达的影响

与 WKY 对照组比较, SHR ASMC 中钠泵 α_1 亚单位及 PMCA1 mRNA 的表达水平均明显降低 ($P < 0.01$)。不同浓度赖诺普利干预后, 均能使钠泵 α_1 亚单位及 PMCA1 mRNA 的表达水平上调 ($P <$

0.01); 但两个浓度的赖诺普利组之间差异无显著性 ($P > 0.05$ 表 2)。

表 2 赖诺普利对动脉血管平滑肌细胞膜钠泵 α_1 亚单位和钙泵亚型 1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

分 组	钠泵 α_1 亚单位	PMCA1
WKY 对照组	1.023 ± 0.040	1.087 ± 0.040
SHR 对照组	0.440 ± 0.052^a	0.687 ± 0.121^a
低剂量赖诺普利组	1.000 ± 0.070^b	1.090 ± 0.087^b
高剂量赖诺普利组	0.953 ± 0.040^b	1.017 ± 0.040^b

a 为 $P < 0.01$, 与 WKY 对照组比; b 为 $P < 0.01$, 与 SHR 对照组比。

2.4 赖诺普利对自发性高血压大鼠动脉血管平滑肌细胞培养液中血管紧张素 $\text{Ang} \text{II}$ 浓度的影响

与 WKY 对照组 ($45.22 \pm 4.94 \text{ pg}/10^5 \text{ cell}$) 相比, SHR ASMC 培养液中 $\text{Ang} \text{II}$ 浓度升高 ($52.31 \pm 4.42 \text{ pg}/10^5 \text{ cell}$, $P < 0.05$)。与 SHR 对照组相比, 不同浓度 (1×10^{-6} 、 $1 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$) 赖诺普利组 ASMC 培养液中 $\text{Ang} \text{II}$ 浓度降低 (分别为 47.84 ± 3.88 和 $47.39 \pm 2.75 \text{ pg}/10^5 \text{ cell}$, $P < 0.05$)。但高、低剂量赖诺普利组之间 $\text{Ang} \text{II}$ 浓度差异无显著性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

原发性高血压最基本的病理特征是小动脉收缩和增生, 使外周血管阻力增高, 而小动脉血管平滑肌细胞内 Ca^{2+} 和 Na^+ 浓度升高是导致这一病理改变的关键环节。这与细胞膜钠泵和钙泵活性异常有关^[6-8]。细胞膜钠泵活性降低, 细胞内高 Na^+ 使细胞膜部分去极化, 血管反应性增强, 以及启动 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换增加 Ca^{2+} 内流^[9,10]; 钙泵活性降低减少了细胞内 Ca^{2+} 的主动外排, 结果导致细胞内高钙, 而细胞内 Ca^{2+} 升高是引起血压升高的直接原因。已证明原发性高血压患者血细胞膜钠泵和钙泵活性降低^[1,11], 我们以往的动物实验发现 8 周龄 SHR ASMC 膜离子泵功能及其转录水平的异常导致细胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[12]。本研究观察到 14 周龄 SHR ASMC 膜钠泵和钙泵活性受抑, 与其 mRNA 表达水平降低相一致。提示钠泵和钙泵活性受抑和基因表达异常参与原发性高血压的病理生理机制。

肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的激活参与高血压的发病机制。其中 $\text{Ang} \text{II}$ 作用于 ASMC 的 $\text{Ang} \text{II}$ 1 型受体 ($\text{angiotensin II type 1 receptor AT}_1\text{R}$), 直接收缩血管, 而且还能

促进儿茶酚胺和醛固酮的释放,增强血管收缩和增加血容量,使血压升高。近年来,机体局部组织能产生 Ang $\text{\textcircled{E}}$ 逐渐被揭示^[13],它对高血压的发生和发展发挥重要作用。ACEI通过阻止 Ang $\text{\textcircled{E}}$ 的生成与上述作用的产生,以缓解和防治高血压。研究发现 ACEI及 AT $\text{\textsubscript{1}}$ R拮抗剂(angiotensin $\text{\textcircled{E}}$ type 1 receptor antagonist AT $\text{\textsubscript{1}}$ RA)对钠泵和钙泵活性具有明显的改善作用^[4 14 15],卡托普利、依那普利等 ACEI和 AT $\text{\textsubscript{1}}$ R类药物能显著增加原发性高血压患者红细胞、血小板细胞膜钠泵和钙泵活性及实验动物 ASMC和心肌细胞钠泵的活性。本实验观察到,赖诺普利能提高 SHR ASMC膜钠泵和钙泵活性,并且能上调 SHR ASMC膜钠泵 α_1 亚单位及钙泵 PMCA1 mRNA 的表达,这提示赖诺普利可能通过上调 SHR ASMC膜钠泵和钙泵 mRNA 表达水平来调节其活性。

关于 ACEI和 AT $\text{\textsubscript{1}}$ RA改善钠泵和钙泵的作用机制尚不完全清楚。动物实验研究显示^[16 17],Ang $\text{\textcircled{E}}$ 对视网膜细胞、肾上腺球状带细胞和肾基底膜钠泵具有抑制作用,降低肺动脉 ASMC膜钙泵活性,导致细胞内 Na $^{+}$ 、Ca $^{2+}$ 浓度升高。Ang $\text{\textcircled{E}}$ 主要通过旁分泌、自分泌、胞内分泌作为局部激素发挥作用。心血管局部组织中存在有完整独立的 RAS在高血压等心血管疾病的发生、发展中起着比循环 RAS更重要的作用。SHR局部 RAS处于激活状态,表现为血管壁上 ACE及 Ang $\text{\textcircled{E}}$ 活性明显增加,ASMC培养液中 Ang $\text{\textcircled{E}}$ 含量显著增高,ASMC对 Ang $\text{\textcircled{E}}$ 的反应性增强^[18 19]。本实验观察到 SHR ASMC所分泌 Ang $\text{\textcircled{E}}$ 的含量高于 WKY 对照组,SHR ASMC的钠泵和钙泵活性及其 mRNA 表达水平明显低于 WKY 对照组,赖诺普利使 SHR ASMC分泌的 Ang $\text{\textcircled{E}}$ 减少,并能部分逆转 SHR ASMC的钠泵和钙泵活性降低及其 mRNA 表达水平的下调。这提示赖诺普利上调离子泵活性及其 mRNA 表达水平可能部分与阻断血管局部组织 Ang $\text{\textcircled{E}}$ 有关。

[参考文献]

- [1] 商黔惠,王丕荣,李琮辉,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: 340

- [2] Samuel YB, Ruby UN, Maren UK, et al. Low-dose ramipril treatment improves relaxation and calcium cycling after established cardiac hypertrophy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001 280: 1 029-038
- [3] 曹衡,柯永胜,胡作英,等. SHR心肌细胞离子泵活性与血压及左心室肥厚的相关性研究[J]. 中国病理生理杂志,2000 16: 1 231
- [4] 商黔惠,王丕荣,李正非,等. 依那普利对老年高血压病患者血管活性物质和细胞离子转运的影响[J]. 临床内科杂志,2001 18: 379-384
- [5] 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 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): 815-818
- [6] Benkwitz C, Oberdorf MS, Neyes L, et al. Combined SSCP and heteroduplex analysis of the human plasma membrane isoform 1 in patients with essential hypertension [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 1999 261: 515-520
- [7] Meyer LH, Becker A, Kramer HJ, et al. Inhibitors of Na $^{+}$ -K $^{+}$ -ATPase in human urine: effects of ouabain-like factors and of vanadium-diascorbate on calcium mobilization in rat vascular smooth muscle cells: comparison with the effects of ouabain, angiotensin $\text{\textcircled{E}}$ and arginine-vasopressin [J]. *Am J Hypertens* 2000 13 (4 Pt 1): 364-369
- [8] Jaitovich A, Bertorello AM. Salt, Na $^{+}$, K $^{+}$ -ATPase and hypertension [J]. *Life Sci* 2010 86 (3-4): 73-78
- [9] Matchkov VV, Gustafsson H, Rahman A, et al. Interaction between Na $^{+}$ /K $^{+}$ -pump and Na $^{+}$ /Ca $^{2+}$ -exchanger modulates intercellular communication [J]. *Circ Res* 2007 100 (7): 1 026-035
- [10] Wells IC, Blotky AJ. Coexisting independent sodium-sensitive and sodium-insensitive mechanisms of genetic hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR) [J]. *Can J Physiol Pharmacol* 2001 79 (9): 779-784
- [11] 陈颜芳,杨和平,韩启德,等. 胰岛素抵抗高血压大鼠血管舒张功能异常的机制[J]. 高血压杂志,1999 7 (2): 183
- [12] 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
- [13] 余毅,吴可贵. 坎地沙坦对盐负荷高血压大鼠肾脏肾素-血管紧张素系统的影响[J]. 中国药理学通报,2007 23 (6): 785-789
- [14] Kalliovalkama J, Kahonen M, Tolvanen JP, et al. Arterial responses in vitro and plasma digoxin immunoreactivity after losartan and enalapril treatments in experimental hypertension [J]. *Pharmacol Toxicol* 2000 86 (1): 36-43
- [15] Shao QM, Ren B, Elinban VJ, et al. Modification of sarcolemmal Na $^{+}$, K $^{+}$ -ATPase and Na $^{+}$ /Ca $^{2+}$ exchanger expression in heart failure by blockade of renin-angiotensin system [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 288: 2 637-646
- [16] Yüngst DR, Davis J, Schiebinger R, et al. Inhibitors of tyrosine phosphatases block angiotensin $\text{\textcircled{E}}$ inhibition of Na $^{+}$ pump [J]. *Eur J Pharmacol* 2000 406 (1): 49-52
- [17] 胡德辉,马传桃. 低氧、血管紧张素 $\text{\textcircled{E}}$ 对肺内小动脉平滑肌细胞膜 Ca $^{2+}$ -ATPase活力的影响[J]. 中国应用生理学杂志,1998 14 (14): 317
- [18] Babadzhan VD. Hemodynamics and cell membrane effects of angiotensin $\text{\textcircled{E}}$ receptor antagonists in treatment of hypertension [J]. *Lik Sprava* 2003 (2): 20-24
- [19] 王向宇,吴可贵,晋学庆,等. 自发性高血压大鼠主动脉平滑肌细胞异常增殖和自身肾素-血管紧张素系统的关系[J]. 中国动脉硬化杂志,1997 5 (3): 212-216

(此文编辑 许雪梅)