

## 哇巴因或心房钠尿肽对大鼠动脉平滑肌细胞分泌血管紧张素 II 的影响

吴泽兵, 商黔惠, 姜黔峰, 张贵海, 李成浩

(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] 高血压; 动脉平滑肌细胞; 血管紧张素 II; 哇巴因; 心房钠尿肽

[摘要] 目的 探讨哇巴因、心房钠尿肽(ANP)对 WKY 大鼠和自发性高血压大鼠动脉平滑肌细胞(ASMC)分泌血管紧张素 II(Ang II)的影响。方法 组织块种植法培养 4 只自发性高血压大鼠和 4 只 WKY 大鼠胸主动脉平滑肌细胞,用低、中、高三种浓度(分别为  $1 \times 10^{-9}$  mol/L、 $1 \times 10^{-8}$  mol/L、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L)哇巴因、ANP 干预两种大鼠 ASMC,放射免疫法测定干预前及干预后 24 h 培养液中 Ang II 水平。 $1 \times 10^{-7}$  mol/L 哇巴因、ANP 干预自发性高血压大鼠和 WKY 大鼠 ASMC,测定干预前及干预后 3 h、6 h、12 h、24 h 培养液中 Ang II 水平。结果 WKY 大鼠 Ang II 水平( $8.48 \pm 2.50$  pg/ $10^6$  cells)低于自发性高血压大鼠( $14.06 \pm 4.62$  pg/ $10^6$  cells),差异无统计学意义。哇巴因干预后,两种大鼠 Ang II 水平显著增加,WKY 大鼠在干预 12 h 达到峰值( $36.11 \pm 5.34$  pg/ $10^6$  cells),自发性高血压大鼠在干预 6 h 达到峰值( $39.31 \pm 3.61$  pg/ $10^6$  cells);随哇巴因浓度增高,两种大鼠 Ang II 水平呈浓度依赖性升高,在 WKY 大鼠升高更明显。ANP 干预后,两种大鼠 Ang II 水平迅速增加,WKY 大鼠在 3 h 达到峰值( $39.75 \pm 6.71$  pg/ $10^6$  cells),自发性高血压大鼠 Ang II 水平随时间延长进行性升高;随 ANP 浓度增高,WKY 大鼠 Ang II 水平升高幅度呈浓度依赖性降低,自发性高血压大鼠 Ang II 水平升高幅度呈浓度依赖性增高。结论 哇巴因、ANP 明显促进 WKY 大鼠和自发性高血压大鼠 ASMC 分泌 Ang II,哇巴因使自发性高血压大鼠 ASMC 分泌 Ang II 的高峰前移;ANP 促进自发性高血压大鼠 ASMC 分泌 Ang II 失常。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Effects of Ouabain or Atrial Natriuretic Peptide on Secreting Angiotensin II in Artery Smooth Muscle Cells

WU Ze-Bing, SHANG Qian-Hui, JIANG Qian-Feng, ZHANG Gui-Hai, and LI Cheng-Hao

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

[KEY WORDS] Hypertension; Artery Smooth Muscle Cell; Angiotensin II; Ouabain; Atrial Natriuretic Peptide

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of ouabain or atrial natriuretic peptide (ANP) on angiotensin II secreted by artery smooth muscle cells (ASMC) in WKY rats and spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods**

The thoracic ASMC isolated from SHR and WKY rats were cultured and interfered with different concentrations of ANP or ouabain ( $1 \times 10^{-9}$  mol/L,  $1 \times 10^{-8}$  mol/L and  $1 \times 10^{-7}$  mol/L) respectively. The levels of angiotensin II in culture-medium were measured by radioimmunoassay before and after 3, 6, 12, and 24 hours of using ouabain or ANP ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L).

**Results** Angiotensin II level in WKY rats was lower than that in SHR. After using ouabain, angiotensin II level of two kinds of rats was remarkably increased, but in WKY rats angiotensin II level reached the peak after 12 hours, while in SHR reached the peak after 6 hours. With the increasing concentration of ouabain, angiotensin II level in WKY rats was increased in a concentration-dependent manner, and in SHR increased in a concentration-independent manner.

After using ANP, the level of angiotensin II of two kinds of rats was significantly increased, but in WKY rats reached the

[收稿日期] 2012-03-06

[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基金 [(2002)3013, (2005)239]

[作者简介] 吴泽兵, 硕士, 主治医师, 研究方向为高血压病的发病机制, 现工作单位是安徽省合肥市第一人民医院干部病房, E-mail 为 wuzebing@sina.com。通讯作者商黔惠, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为高血压病的发病机制, E-mail 为 qianhui-shang@hotmail.com。

peak after 3 hours, and in SHR increased in a time-dependent manner. With the increase of concentration of ANP, the level of angiotensin II went down in WKY rats, whereas went up in SHR. **Conclusions** Ouabain or ANP can promote the secretion of angiotensin II of ASMC in both WKY rats and SHR, and the secretion peak of angiotensin II induced by ouabain is in advance in SHR. The secretion of Angiotensin II induced by ANP is significantly abnormal in SHR.

高血压是最常见的心血管疾病,其发病机制尚未完全阐明,目前认为,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)激活,动脉血管平滑肌细胞(artery smooth muscle cells, ASMC)合成和分泌的血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)可通过自分泌等方式对血压和 ASMC 增殖有重要的调节作用<sup>[1,2]</sup>。哇巴因是一种具有洋地黄活性的内分泌激素,具有升高血压、激活 RAS、促进血管平滑肌细胞增殖等作用。心房钠尿肽(atrial natriuretic peptide, ANP)是一种小分子肽类物质,不仅存在于心脏,也可由 ASMC 合成和分泌,它具有扩血管、抗 ASMC 增殖作用<sup>[3,4]</sup>。但哇巴因、ANP 对培养的 WKY 大鼠和自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)的 ASMC 分泌 Ang II 的调节作用研究甚少。本研究旨在探讨外源性哇巴因、ANP 对 WKY 大鼠和 SHR 的 ASMC 分泌 Ang II 的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

12 周龄雄性 SHR 和 WKY 大鼠各 4 只(上海市高血压研究所提供);胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶、哇巴因(美国 Sigma 公司);ANP(美国 AnaSpec 公司)。Ang II 放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所);GC-2010 $\gamma$  放射免疫计数器(科大创新股份有限公司中佳分公司)。

### 1.2 细胞培养及干预方法

SHR 和 WKY 大鼠以 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉,断头处死,取胸主动脉中膜,用贴块法分离、培养 ASMC,并传代 ASMC,用平滑肌细胞特异性  $\alpha$ -肌动蛋白单克隆抗体免疫细胞化学法进行鉴定。本研究测定所用细胞为生长良好的第 6~8 代细胞,分别加入  $1 \times 10^{-7}$  mol/L 哇巴因和 ANP 干预 3 h、6 h、12 h 及 24 h,以未经哇巴因、ANP 干预为对照;分别加入哇巴因、ANP 至终浓度  $1 \times 10^{-9}$  mol/L、 $1 \times 10^{-8}$  mol/L、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L,以无血清培养 24 h 的细胞培养液作为对照组。实验经遵义医学院动物伦理委员会批准。

### 1.3 血压及 Ang II 水平检测

采用 BESN-II 多通道动物无创测压仪监测大鼠

尾动脉收缩压。采用放射免疫法检测 ASMC 培养液中 Ang II 水平,按试剂盒内说明书的操作程序进行。8 瓶细胞重复检测 8 次,每次测定 3 次取平均值。

### 1.4 统计学方法

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组内数据采用重复测量资料的方差分析,组间数据采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 SHR 和 WKY 大鼠血压比较

SHR 尾动脉收缩压( $177.9 \pm 6.4$  mmHg)明显高于 WKY 大鼠( $114.7 \pm 8.0$  mmHg),差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

### 2.2 哇巴因干预大鼠 ASMC 不同时间后 Ang II 水平比较

SHR Ang II 水平( $14.06 \pm 4.62$  pg/ $10^6$  cells)与 WKY 大鼠( $8.48 \pm 2.50$  pg/ $10^6$  cells)比较有升高趋势( $P = 0.078$ )。 $1 \times 10^{-7}$  mol/L 哇巴因干预后, WKY 大鼠 Ang II 水平显著增加( $P < 0.01$ ),随时间延长,Ang II 水平逐渐增加,12 h 达到峰值,随后降低;SHR Ang II 水平较干预前显著增加( $P < 0.01$ ),随时间延长,Ang II 水平迅速升高,6 h 达到峰值,随后渐降低(图 1)。

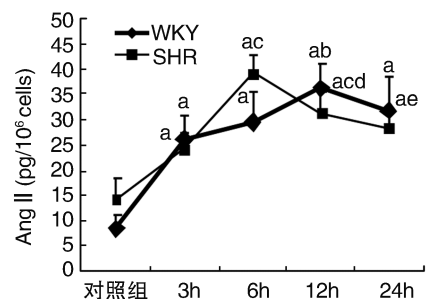


图 1. 哇巴因干预大鼠 ASMC 不同时间对 Ang II 的影响 ( $n = 8$ ) a 为  $P < 0.01$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与 3 h 组相比; d 为  $P < 0.05$ , 与 6 h 组相比; e 为  $P < 0.01$ , 与 12 h 组相比。

Figure 1. Effects of ouabain on release of Ang II at different time in ASMC of rats

### 2.3 不同浓度哇巴因对大鼠 ASMC 分泌 Ang II 的影响

哇巴因干预 24 h 后, WKY 大鼠 Ang II 水平呈浓

度依赖性升高,SHR Ang II 水平显著升高,不同浓度哇巴因对 ASMC 分泌 Ang II 无显著性差异(图 2)。

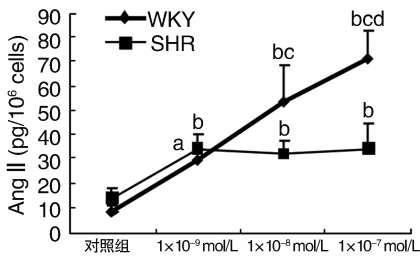


图 2. 不同浓度哇巴因对大鼠 ASMC Ang II 的影响 ( $n=8$ )  
a 为  $P < 0.05$ , b 为  $P < 0.01$ , 与对照组相比; c 为  $P < 0.01$ , 与  $1 \times 10^{-9}$  mol/L 组相比; d 为  $P < 0.05$ , 与  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 组相比。

Figure 2. Effects of ouabain on release of Ang II at different concentration in ASMC of rats

#### 2.4 ANP 干预大鼠 ASMC 不同时间后 Ang II 水平比较

$1 \times 10^{-7}$  mol/L ANP 干预后, WKY 大鼠 Ang II 水平迅速增加 ( $P < 0.01$ ), 并在 3 h 达到峰值, 随时间延长, Ang II 水平逐渐降低; SHR Ang II 水平较干预前显著增加 ( $P < 0.01$ ), 随时间延长, Ang II 水平仍有升高趋势(图 3)。

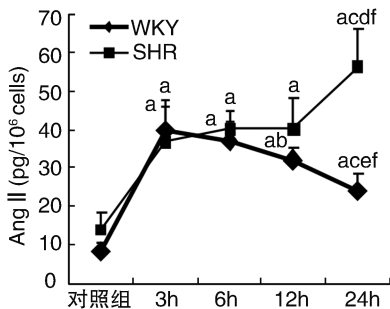


图 3. ANP 干预大鼠 ASMC 不同时间对 Ang II 的影响 ( $n=8$ )  
a 为  $P < 0.01$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与 3 h 组相比; d 为  $P < 0.05$ , e 为  $P < 0.01$ , 与 6 h 组相比; f 为  $P < 0.01$ , 与 12 h 组相比。

Figure 3. Effects of ANP on release of Ang II at different time in ASMC of rats

#### 2.5 不同浓度 ANP 对大鼠 ASMC 分泌 Ang II 的影响

ANP 干预 24 h 后, WKY 大鼠 ASMC 分泌 Ang II 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 不同浓度 ANP 对 ASMC 分泌 Ang II 无显著性差异 ( $P > 0.05$ ); ANP 干预 24 h 后, SHR Ang II 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 且呈浓度依赖性增高趋势(图 4)。

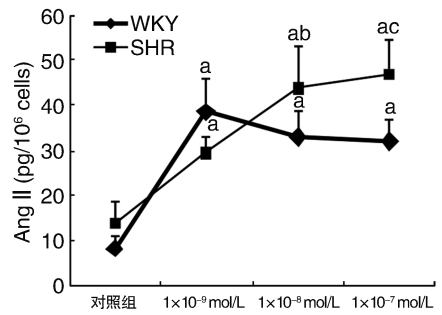


图 4. 不同浓度 ANP 对大鼠 ASMC Ang II 的影响 ( $n=8$ )  
a 为  $P < 0.01$ , 与对照组相比; b 为  $P < 0.05$ , c 为  $P < 0.01$ , 与  $1 \times 10^{-9}$  mol/L 组相比。

Figure 4. Effects of ANP on release of Ang II at different concentration in ASMC of rats

### 3 讨论

大量研究表明, Ang II、哇巴因、ANP 与高血压有着密切的关系, 生理情况下, 其处于一种动态的功能抗衡, 以维持血管张力的相对稳定, 但高血压时, ASMC 作为血管活性物质的释放源兼靶细胞, 在介导病变进展过程中有着重要作用<sup>[5-7]</sup>。Ang II 是一种多功能血管活性物质, 是 RAS 的各种生理和病理功能的主要发挥者。本研究证实 WKY 大鼠和 SHR 的 ASMC 能分泌 Ang II, 而且 SHR 的 ASMC 分泌 Ang II 较 WKY 大鼠有升高趋势, 由此推测, 高血压时血压升高可能与大鼠 ASMC 分泌 Ang II 有关。

研究证实, 经静脉、皮下、脑室内注入哇巴因均可使非高血压大鼠的血压升高并维持在较高水平, 其促进血压升高机制是通过升高 Ang II 实现; 给大鼠注射抗哇巴因抗体后, 其血浆肾素、Ang II 及醛固酮水平降低, 这些结果提示在哇巴因导致血压升高的过程中 RAS 起着重要作用<sup>[8-10]</sup>。郭宁等<sup>[10,11]</sup>发现, 哇巴因升高血浆 Ang II 水平, 促进大鼠肾皮质分泌 Ang II, 但对心肌分泌 Ang II 无明显影响。本研究发现, 哇巴因能促进 WKY 大鼠 ASMC 分泌 Ang II, 随着哇巴因浓度升高, ASMC 分泌 Ang II 进行性升高; 而且随哇巴因干预时间的延长, Ang II 分泌进一步升高, 12 h 达到高峰, 随后缓慢降低, 提示非高血压状态下哇巴因能促进血管 ASMC 分泌 Ang II, 而且具有量效和时效关系。但在 SHR, 哇巴因促进 ASMC 分泌 Ang II 的高峰提前至 6 h, 而且不同浓度哇巴因对 Ang II 水平无显著影响, 提示高血压状态下, 短时间内(6 h 内)哇巴因能促进 ASMC 释放 Ang II, 但随着时间延长至 24 h, 哇巴因促进 ASMC 释放 Ang II 并不明显, 这可能是导致血管平

滑肌局部舒缩功能紊乱的因素之一。

研究表明, ANP受体是一种单次跨膜蛋白, 细胞外结构域有 ANP结合位点, 细胞内结构域有鸟苷酸环化酶催化位点, 通过血管壁平滑肌细胞中的 ANP受体介导, ANP的结合会激活鸟苷酸环化酶产生第二信使 cGMP, cGMP同蛋白激酶 G结合并使之活化, 被激活的蛋白激酶 G能够使一些靶蛋白磷酸化, 诱导血管壁中的平滑肌细胞松弛, 血管平滑肌舒张, 起到扩张动脉和静脉的作用<sup>[12,13]</sup>; 可抑制肾素和醛固酮的分泌, Ang II水平下降<sup>[14]</sup>, 减少钠的重吸收; ANP松弛血管平滑肌, 降低血压, 并可对抗去甲肾上腺素和 Ang II所致的缩血管效应, 减轻心脏的前后负荷; RAS激活会促进 ANP释放<sup>[15]</sup>。油红文等<sup>[16]</sup>研究表明, ANP在高血压大鼠心室肌肥厚的早期就有活跃的表达, 当 Ang II被激活时, 抗增殖的 ANP的合成也平行地增加。本研究表明, 在 WKY大鼠, ANP促进 Ang II分泌, 但不同浓度 ANP对 Ang II分泌无明显影响, 随着时间延长, Ang II分泌在 3 h即达到高峰, 随后缓慢降低。提示在正常情况下, ANP使 ASMC分泌 Ang II升高, 使 ANP与 Ang II的分泌达到相对平衡, 维持血管平滑肌正常的舒缩功能和血压; 在 SHR, 随着 ANP浓度增加, ASMC分泌 Ang II也进一步增加, 在 24 h内, 随 ANP作用时间延长, Ang II水平逐渐增加。提示高血压时, ASMC对 ANP的反应已经失去正常分泌规律, 而且 Ang II进一步增加, 通过自分泌作用, 可能导致血管平滑肌本身不断增殖, 这一结果也支持既往的临床研究<sup>[17]</sup>, 原发性高血压患者血浆 Ang II、ANP水平均升高。由于本研究哇巴因、ANP干预时间、干预浓度有限, 对于非高血压及高血压时 ASMC多种血管活性物质的自分泌及其调控机制目前仍不能阐明, 有待我们今后进一步深入研究。

#### 【参考文献】

- [1] Tierney PF, Chattergoon NN, Louey S, et al. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin II stimulated proliferation in fetal cardiomyocytes [J]. *J Physiol*, 2010, 588: 2 879-889.
- [2] 商黔惠, 马淑玉. 高血压患者血浆内源性洋地黄物质与去甲肾上腺素及淋巴细胞离子转运[J]. *高血压杂志*, 1996, 4: 46-48.
- [3] 吴泽兵, 商黔惠, 姜黔峰, 等. 哇巴因和血管紧张素 II 对大鼠动脉平滑肌细胞分泌心钠素的影响[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2009, 11: 55-57.

- [4] Cheung WJ, Kent MA, El-Shahat E, et al. Central and peripheral renin-angiotensin systems in ouabain-induced hypertension[J]. *Am J Physiol*, 2006, 291: H 624-630.
- [5] Kim S, Iwao H. Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases [J]. *Pharmacol Rev*, 2000, 52: 11-34.
- [6] 温进坤, 韩梅. 血管平滑肌细胞[M]. 北京: 科学出版社, 2005, 191-236.
- [7] 姜黔峰, 方宇, 商黔惠. 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 II 和内皮素的变化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2010, 18: 269-272.
- [8] Sarzani R, Marcucci P, Salvi F, et al. Angiotensin II stimulates and atrial natriuretic peptide inhibits human visceral adipocyte growth [J]. *Int J Obes*, 2008, 32: 259-267.
- [9] Siman FDM, Stefanon I, Vassallo DV, et al. A low concentration of ouabain (0.18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) enhances hypertension in spontaneously hypertensive rats by inhibiting the  $\text{Na}^+$  pump and activating the renin-angiotensin system[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2010, 43: 767-776.
- [10] 郭宁, 姜馨, 艾文婷, 等. 哇巴因对血管紧张素 II 及其 1 型和 2 型受体 mRNA 在肾脏中表达的影响[J]. *中国分子心脏病学杂志*, 2009, 9: 305-309.
- [11] 郭宁, 姜馨, 吕卓人, 等. 哇巴因对血管紧张素 II 及其 1 型和 2 型受体 mRNA 在心肌中表达的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2005, 26: 526-529.
- [12] Huang BS, Leenen FHH. Sympathoexcitatory and pressor responses to increased brain sodium and ouabain are mediated via brain Ang II [J]. *Am J Physiol*, 1996, 270: H 275-280.
- [13] Wang TJ, Larson MG, Levy D, et al. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels[J]. *Circulation*, 2004, 109: 594-600.
- [14] 常鹏, 余静, 张缤. 心钠素对慢性充血性心力衰竭患者血浆脑钠素、血管紧张素 II 的影响[J]. *兰州医学院学报*, 2004, 30: 40-41.
- [15] 李翠兰, 戴爱明. 血管紧张素 II 受体拮抗剂对充血性心力衰竭患者血浆内皮素和心钠素水平的影响[J]. *医学临床研究*, 2008, 25: 883-884.
- [16] 油红文, 陈曦, 刘国仗. 血管活性肽对心脏细胞肥大与增殖的调节作用[J]. *中华高血压杂志*, 2006, 14: 692-694.
- [17] 商黔惠, 王丕荣, 李正非. 高血压病患者细胞环核苷酸与循环血管活性物质的关系[J]. *高血压杂志*, 1999, 7 (4): 329-331.

(此文编辑 文玉珊)