

## 间歇有氧运动上调自发性高血压大鼠血管肾上腺髓质素

李宏伟, 蓝蕊, 刘佩东

(赣南师范大学体育学院, 江西省赣州市 341000)

[关键词] 间歇有氧运动; 自发性高血压大鼠; 肾上腺髓质素; 肾上腺髓质素特异性受体

[摘要] 目的 研究间歇有氧运动(IAE)对自发性高血压大鼠(SHR)主动脉肾上腺髓质素(ADM)的影响,探讨运动降低血压的大血管因素及其机制。方法 SHR 30只,随机分为间歇有氧运动组(IAE组)和对照组。IAE组进行8周间歇跑台有氧运动。采用尾压法测血压,酶联免疫吸附法(ELISA)测运动前后血清中ADM的含量,免疫组织化学法显示SHR主动脉ADM的表达,蛋白质印迹实验检测主动脉ADM的特异性受体——受体活性修饰蛋白2(RAMP2)和降钙素受体样受体(CRLR)定量水平。结果 IAE组血压明显低于对照组( $P<0.05$ );IAE组血清中ADM的含量明显高于对照组( $P<0.05$ );主动脉ADM表达明显强于对照组( $P<0.05$ );主动脉RAMP2和CRLR定量均明显高于对照组( $P<0.05$ )。结论 间歇有氧运动可能通过增强血管ADM及其特异性受体表达使SHR大鼠血压下降。

[中图分类号] R87

[文献标识码] A

### Intermittent aerobic exercise up-regulated expression of adrenomedullin of spontaneous hypertensive rat's artery

LI Hong-Wei, LAN Rui, LIU Pei-Dong

(School of Sport, Gannan Normal University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

[KEY WORDS] Intermittent aerobic exercise; Spontaneous hypertensive rat; Adrenomedullin; Specific receptor of adrenomedullin

[ABSTRACT] **Aim** To probe the effect of Intermittent aerobic exercise on Adrenomedullin (ADM) secretion of artery of spontaneous hypertensive rat (SHR), and investigate the mechanism of artery of exercise in the prevention and treatment of hypertension. **Methods** 30 SHR are separated into two groups: intermittent exercise group (IAE Group) and control group. The IAE group performs 8 weeks intermittent treadmill exercise and their blood pressure are measured before and after exercise by tail pressure of SHR, serum ADM is detected by enzyme linked immunosorbent assay. ADM is expressed in artery by immunohistochemistry. Quantification of specific-receptor activity modifying protein (RAMP2) and calcitonin receptor like receptor (CRLR) in artery ADM are detected by Western blotting. **Results** Quantification of specific receptor ADM were significantly lower than control group ( $P<0.05$ ) and serum ADM in IAE group were significantly higher than control group ( $P<0.05$ ). The expression of ADM in artery was obviously stronger than control group. The quantity of RAMP2 and CRLR in artery were increased obviously ( $P<0.05$ ). **Conclusion** Intermittent aerobic exercise increases the expression of ADM in artery and their specific receptor RAMP2 and CRLR up regulation may be one of the mechanisms of lower SHR blood pressure.

高血压作用靶器官及其最终损害造成脏器衰竭的根源是血管的损害,从血管保护的角度防治高血压是目前防治高血压的研究热点。间歇有氧运动(intermittent aerobic exercise, IAE)对心血管的保护作用已经得到广泛的研究<sup>[1-2]</sup>,然而有关具体的运动方式及相关机制还没有阐明。前期研究显示,

间歇有氧运动有良好的心血管保护及降压作用<sup>[3-9]</sup>。间歇有氧运动可诱导肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)的产生和释放,ADM是重要的心脏内源性保护物质,本研究团队前期已经就其对心血管的保护作用进行了广泛的研究<sup>[3-5]</sup>。除此之外它还有降压作用:扩张冠状动脉,增加血流量;排

[收稿日期] 2016-10-23

[修回日期] 2017-01-01

[作者简介] 李宏伟,博士,副教授,研究方向为运动医学,E-mail为lihongwei1969@126.com。

钠、抑制醛固酮等作用。间歇有氧运动降压的血管因素(血管保护作用)是否与 ADM 有关,目前尚未见文献报道。ADM 作为配体必须与相应的特异性受体结合才能发挥作用。研究表明,间歇有氧运动使 ADM 特异性受体——肾上腺髓质素受体活性修饰蛋白 2 (receptor activity modifying protein, RAMP2) 和降钙素受体样受体 (calcitonin receptor like receptor, CRLR) 的基因及蛋白表达均上调<sup>[6-9]</sup>。本研究在前期研究基础上,以自发性高血压大鼠 (spontaneous hypertensive rat, SHR) 为研究对象,继续探讨 ADM 的作用,试图阐明其在间歇有氧运动中的降压作用及机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型的建立

采用 SHR 36 只,随机分为间歇有氧运动组 (IAE 组,21 只) 和对照组 (15 只)。运动模型为 IAE 组 SHR 30 m/min 跑速,间歇 5 min,重复次数 3 次,总时间 60 min,总共 8 周负荷跑台训练<sup>[10-14]</sup>。对照组放在静止跑台同样时间。SHR 在运动开始的第 1 周及运动结束的第 8 周测定收缩压。

### 1.2 取材

运动前断尾取血 (-20℃) 保存。运动结束后,各组 SHR 按 1 mL/100 g 体重以 0.45% 戊巴比妥钠为麻醉剂腹腔注射,麻醉成功后,SHR 仰卧固定,打开腹腔,采取下腔静脉取血,取血液量为 5 mL,静置离心 5000 r/min,20 min,离心,取血清,保存 (-20℃)。开胸取主动脉,清洗,滤干,投液氮中,最后转入冰箱保存 (-80℃)。

### 1.3 收缩压测定

所有大鼠在运动开始的第 1 及第 8 周时测定收缩压:大鼠在 40℃ 左右预热 20 min,测定安静状态下尾压,间隔 5 min 再测 1 次,一共测定 3 次,取其平均值。

### 1.4 血清 ADM 的测定

应用美国 ADL 公司产羊抗鼠 ADM 酶联免疫试剂盒(血清),酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清 ADM 含量。测定方法:将特异性的抗体包被在聚苯乙烯微量滴定板孔的内壁上,加入标准品或检测样品后孵育,样本中的 ADM 即与固相膜上的抗体结合,洗去未结合的反应物,加入显色剂孵育,上酶标仪读每个反应孔的颜色。严格按照试剂盒操作,并按照 ADM 标准品反应后的吸光度与初始浓度公式测出 ADM 含量。ADM 标准品反应后的吸光度与初

始浓度具有线性关系,确定系数  $R^2$  达到 0.936,  $P < 0.05$ 。血清 ADM 标准曲线见图 1。

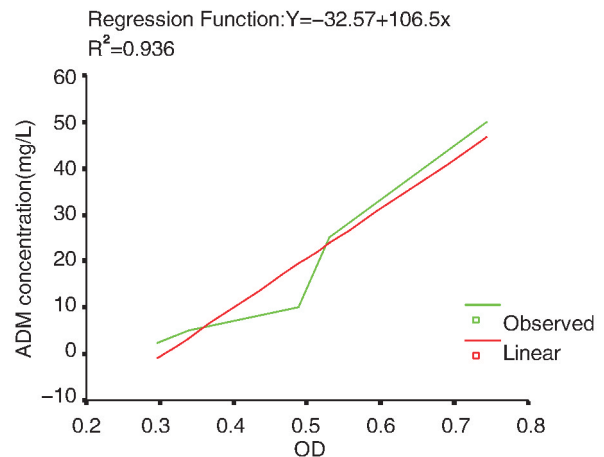


图 1. 血清 ADM 标准曲线

Figure 1. Standard curve of serum ADM

### 1.5 免疫组织化学实验

IAE 组和对照组 (各 15 只 SHR 大鼠,IAE 组淘汰 6 只运动状态差的 SHR 大鼠),运动后应用免疫组织化学方法检测主动脉 ADM 表达,以主动脉着色强度为阳性表达。并应用计算机图像扫描技术对心肌细胞及冠状动脉阳性表达进行半定量分析。方法:以 4% 多聚甲醛溶液固定心肌标本,石蜡切片。应用 SABC 免疫组织化学染色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司生产) 及 DAB (武汉博士德生物工程有限公司),按照试剂盒使用说明书使用操作说明操作使用。

### 1.6 Western blot 实验

应用免疫印迹法检测 IAE 组运动后和对照组 (各 15 只 SHR 大鼠) 主动脉 ADM 的特异性受体的定量。方法:主动脉裂解液进行 SDS-PAGE 电泳,恒压转膜,BPS 封闭,分别加入 1:1 500 羊抗 RAMP2 和 1:2 000 羊抗 CRLR 室温孵育 150 min (羊多克隆 RAMP2 及 CRLR 抗体购于美国 Santa Cruz 公司)。Western blot 测总蛋白中  $\beta$ -actin 表达,取电泳后获得的 SDS-PAGE 胶按湿转法要求进行转膜。按照 Marker 指示,图像用 Bandscan 灰度值分析;RAMP2 及 CRLR 相对表达量以其特异性结合条带灰度值与 Actin 条带的灰度值比值显示。

### 1.7 统计学处理

实验数据采用 SPSS16.0 软件处理,所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用两样本均数  $t$  检验,运动前后比较采用配对  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统

计学意义。

## 2 结果

### 2.1 间歇有氧运动使 SHR 血压下降

IAE 组和对照组在运动前收缩压 (SBP) 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); IAE 组 SBP 在运动后下降 ( $P<0.05$ ), 而对照组 SBP 在 8 周后上升 ( $P<0.05$ , 表 1)。

表 1. 两组大鼠体质量、收缩压及血清 ADM 比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1. Comparison of body mass, systolic blood pressure and serum ADM levels in the two groups ( $\bar{x}\pm s$ )

分组	状态	体质量 (g)	收缩压 (mmHg)	ADM ( $\mu\text{g}$ )
IAE 组	运动前	26.3 $\pm$ 2.4	167 $\pm$ 12	2.805 $\pm$ 0.605
	运动后	28.3 $\pm$ 2.7	153 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	3.286 $\pm$ 0.699 <sup>a</sup>
	实验前	27.3 $\pm$ 2.0	168 $\pm$ 11	2.791 $\pm$ 0.645
对照组	实验后	29.2 $\pm$ 2.2	174 $\pm$ 14 <sup>b</sup>	2.789 $\pm$ 0.654 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与 IAE 组运动前比较; b 为  $P<0.05$ , 与 IAE 组运动后比较。

### 2.2 间歇有氧运动使血清 ADM 含量升高

IAE 组运动后, 血清中 ADM 浓度明显高于 IAE 组运动前及对照组, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ; 表 1)。

### 2.3 间歇有氧运动使主动脉 ADM 表达增强

由表 2 和图 2 所示, 间歇有氧运动后 ADM 在主动脉表达明显增强, 与对照组比较 ADM 棕黄、浓染, 增强表达主要分布于主动脉内皮层和平滑肌层。计算机图像半定量分析主动脉阳性表达面积及平均光密度值 IAE 组都明显高于对照组 ( $P<0.05$ )。提示, 间歇有氧运动使主动脉内皮细胞和平滑肌细胞分泌 ADM 增强, 增多的 ADM 可通过自分泌、旁分泌和远距离分泌的形式影响动脉血压。

表 2. 两组大鼠主动脉免疫组织化学染色图像分析 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2. Immunohistochemical staining of aorta in rats of the two groups ( $\bar{x}\pm s$ )

分组	视野数	主动脉阳性面积 ( $\mu\text{m}^2$ )	主动脉平均光密度 (MOD)
对照组	25	428.21 $\pm$ 127.08	1878.87 $\pm$ 310.88
IAE 组	25	489.61 $\pm$ 137.28 <sup>a</sup>	2674.78 $\pm$ 326.78 <sup>a</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与对照组比较。

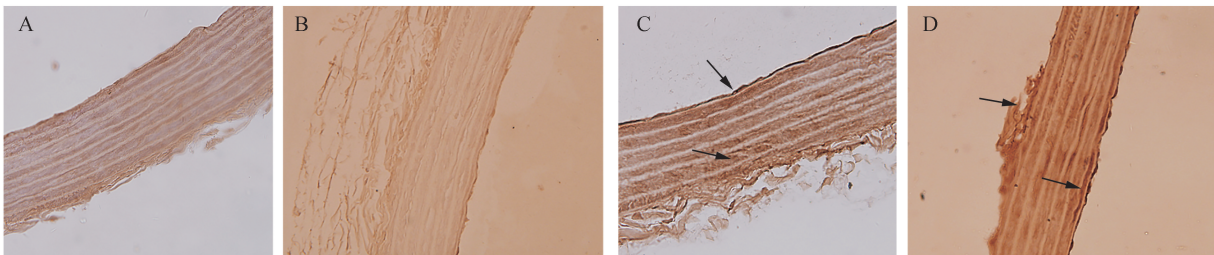


图 2. 两组主动脉 ADM 表达 ( $\times 400$ ) A、B 为对照组; C、D 为运动后 ADM 在主动脉表达情况, 可见 ADM 棕黄、浓染, 增强表达分布于主动脉内皮层和平滑肌层中。→ 为 ADM 表达部位。

Figure 2. ADM expression of aorta in the two groups ( $\times 400$ )

### 2.4 间歇有氧运动上调主动脉 ADM 特异性受体 CRLR 及 RAMP2

图 3 可见 3 kDa 以上均有蛋白条带分布, 主要集中在 3 kDa 以上的蛋白, 1 kDa 以下的蛋白丰度较低。所得的图像用 BandsScan 软件进行灰度值分析, RAMP2 及 CRLR 蛋白相对表达量以其特异性结合条带灰度值与 Actin 结合条带的灰度值比值表示, 结果见表 1。由图 3 和图 4 可知, 间歇有氧运动使 ADM 的特异性受体 CRLR 及 RAMP2 表达上调 ( $P<0.01$ ), ADM 正是通过上调其特异性受体而发挥降压作用。

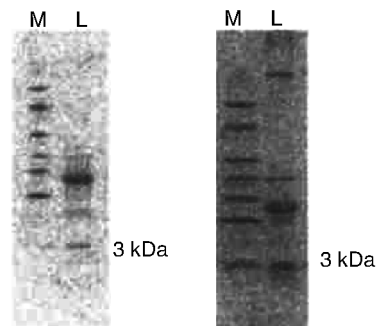


图 3. Western blot 实验分析各组 CRLR 和 RAMP2 水平

左为对照组, 右为 IAE 组运动后。M 为 RAMP2, L 为 CRLR。

Figure 3. Western blot analysis of CRLR and RAMP2

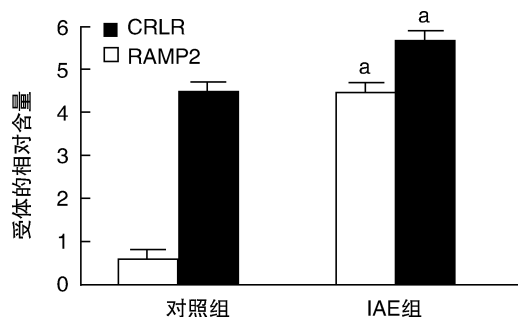


图 4. 两组大鼠 CRLR 及 RAMP2 水平的比较 a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

Figure 4. Comparison of CRLR and RAMP2 between the two groups

### 3 讨论

研究表明, 血压的调节主要牵涉以下机制: ①通过强心作用—降低血压(中心机制); ②通过舒张血管作用—降低血压(外周机制); ③通过内分泌调节作用—减低血浆肾素—血管紧张素—醛固酮系统的血管收缩及降低水钠潴留作用—降低血压(内分泌机制)<sup>[15]</sup>; ④长期运动使得某些影响高血压的危险因素高血脂、高血液粘滞度和高体重的因素降低—降血压作用(长期机制)<sup>[16]</sup>。那么, 是否有一种物质有此作用呢? 间歇有氧运动降低血压的机制可能就与此种物质有关? ADM 是由 52 个氨基酸组成的多肽, 心肌细胞和血管内皮细胞能产生和分泌该物质<sup>[3-5]</sup>。ADM 的第一个作用强心—降低血压(中心机制), 本课题组前期已经进行了深入的研究, 即以间歇有氧运动方式, 跑台速度 30 m/min(相当于 75%  $VO_{2max}$ ), 运动 15 min, 休息 5 min(3:1), 重复 3 次, 持续时间为 60 min, 共 8 周。这样的间歇有氧运动方式使 ADM 在心肌和冠状血管生成和表达增多, 对心脏产生了强心作用。本次继续重复这样的运动方式, 探讨这样的运动方式是否也能对大血管产生影响。本研究结果发现, SHR 间歇有氧运动 8 周后, SBP 明显下降( $P < 0.05$ ), 血清 ADM 明显升高( $P < 0.05$ ), 主动脉 ADM 表达增强( $P < 0.05$ ), 其特异性受体表达上调( $P < 0.05$ ), 显示 3:1(运动:休息)的间歇有氧运动, 强度中等, 时间 1 h, 坚持 2 个月, 对血管 ADM 也产生同样的效果, 显示该运动方式对血管产生良好的影响(血压下降)。

有关 ADM 在外周组织的分布, 多是应用放射免疫和 Northern blot 杂交的方法证明的。本研究应用免疫组织化学的方法发现, 不仅在大鼠的心脏中存在 ADM 的免疫阳性颗粒, 在主动脉也有 ADM 免

疫阳性颗粒存在, 在主动脉 ADM 主要分布于平滑肌细胞和内皮细胞, 在成纤维细胞也有少量 ADM 免疫阳性颗粒分布。因此, 本研究和国外实验室的结果均提示, ADM 不仅是肾上腺髓质和血管内皮细胞合成分泌的一种循环激素, 它也是由血管内皮细胞、平滑肌细胞和心肌细胞分泌的一种局部激素, 它可能以自分泌、旁分泌和胞内分泌的方式发挥其调节心血管功能的作用。有研究表明, 间歇有氧运动是一种效率比较高的运动形式, 即便是在较低的负荷量运动时, 间歇有氧运动时也可产生与传统的持续有氧运动一样的骨骼肌代谢方面的适应性变化及降压效果。

本研究结果及前期的研究表明, 间歇有氧运动使 ADM 在心肌、冠状血管和主动脉表达增高, 提示, 心肌细胞、冠状血管内皮细胞和主动脉内皮细胞及平滑肌细胞可分泌 ADM, 通过自分泌、旁分泌和远距离的自我反馈和调节作用可以直接增强心肌细胞收缩力, 扩张冠状动脉, 降低冠脉血管阻力, 对心肌细胞及血管产生保护作用并降低血压(中央机制), 同时通过舒张主动脉降低血压(外周机制)。其次, 血液中 ADM 增加表明, 心肌细胞和冠状血管内皮细胞分泌的 ADM 可以入血, 借助远距离分泌调节外周血管, 通过使外周血管的内皮细胞内 NO 增多, 而产生骨骼肌、肺动脉及肾动脉的外周舒张血管, 总的外周阻力下降和降压(外周机制)—待研究。再次, 外周血液中 ADM 增加通过减低血浆肾素—血管紧张素—醛固酮系统的血管收缩和水钠潴留作用而达到降压的效果—待研究。最后, ADM 是否还有促进脂肪分解, 抑制脂肪合成? 也还需要进一步的研究。ADM 对心血管的调节作用通过信号转导完成, ADM 与 7 次跨膜结构的 G-蛋白偶联受体-CRLR(RAMP2) 结合则为特异性 ADM 受体(RAMP2/CRLR)。ADM 受体活化后主要通过升高 cAMP 浓度, 以及激活血管内皮细胞内磷脂酶 C 活性发挥作用。本课题组以往研究 ADM 对心脏的保护作用说明间歇有氧运动促使心肌细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞合成和释放 ADM 作用于心肌局部, 同时通过上调 RAMP2 和 CRLR 的 mRNA 和蛋白表达, 实现信号转导而完成心肌细胞保护作用。对 SHR 血压的影响是否也是这样呢?

本研究表明, 间歇有氧运动的降血压机制可能为, 间歇有氧运动的刺激启动了 SHR 主动脉 CRLR 和 RAMP2 的表达, ADM 在主动脉的局部及血液外周增高, ADM(配体)与 RAMP2 和 CRLR(特异性受体)结合, 通过升高 cAMP 或激活血管内皮细胞内

磷脂酶 C 或通过细胞外信号调节激酶 PI3K/Akt 的受体后信号转导产生降压作用。关于运动引起主动脉内皮细胞分泌 ADM, 国内外尚没有报道。本研究研究的运动强度和运动方式引起了主动脉 ADM 分泌的变化表明, 大动脉也可能作为运动引起 ADM 分泌的主要部位, 外周降压作用与 ADM 的变化有关。关于运动对主动脉 ADM 的影响还需进一步研究, 更进一步研究可能揭示运动预防动脉硬化的 ADM 调节机制。

间歇有氧运动使 SHR 的血压下降, 其降压的机制可能是通过增强血管 ADM 及其特异性受体表达而使 SHR 大鼠血压下降。

#### [参考文献]

- [1] Yuyun MF, Narayan HK, Quinn PA, et al. Prognostic value of human mature adrenomedullin in patients with acute myocardial infarction[J]. *Am J Cardiol*, 2015, 115(7): 986-991.
- [2] Vigué B, Leblanc PE, Moati F, et al. Mid-regional pro-adrenomedullin(MR-proADM), a marker of positive fluid balance in critically ill patients: results of the ENVOL study[J]. *Crit Care*, 2016, 20(1): 363.
- [3] Kiris I, Kapan S, Narin C, et al. Relationship between site of myocardial infarction, left ventricular function and cytokine levels in patients undergoing coronary artery surgery [J]. *Cardiovasc J Afr*, 2016, 27(5): 299-306.
- [4] Li M, Hong LI, Liao M, et al. Expression and clinical significance of focal adhesion kinase and adrenomedullin in epithelial ovarian cancer [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2): 1 003-007.
- [5] Nascimento RA, Mendes G, Possomato-Vieira JS. Metalloproteinase inhibition protects against reductions in circulating adrenomedullin during lead-induced acute hypertension[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 116(6): 508-515.
- [6] 李宏伟, 潘珊珊. 短期和长期间歇运动对大鼠心肌和冠状血管肾上腺髓质素的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2009, 28(4): 395-397.
- [7] 李宏伟, 潘珊珊. 肾上腺髓质素在运动预适应诱导心肌细胞保护中的作用[J]. *上海体育学院学报*, 2009, 33(6): 45-49.
- [8] 李宏伟. 间歇运动对肾上腺髓质素特异性受体基因表达的影响[J]. *体育学刊*, 2010, 17(10): 105-108.
- [9] 李宏伟. 间歇运动对肾上腺髓质素特异性受体 RAMP2 及 CRLR 的影响[J]. *西安体育学院学报*, 2011, 28(2): 208-212.
- [10] Domench RJ, Macho P, Schwarze H, et al. Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 55(3): 561-566.
- [11] Hoshida S, Yamashita N. Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2002, 40(4): 826-831.
- [12] Paraskevaidis IA, Iliodotis EK, Mavrogeni S, et al. Repeated exercise stress testing identifies early and late preconditioning [J]. *Int J Cardiol*, 2005, 98(2): 221-226.
- [13] Ding YH, Young CN, Luan X, et al. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion [J]. *Acta Neuropathol*, 2005, 109(3): 74-84.
- [14] Ding YH, Mrizek M, Lai Q, et al. Exercise preconditioning reduces brain damage and inhibits TNF-alpha receptor expression after hypoxia/reoxygenation: an in vivo and in vitro study[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2006, 3(4): 263-271.
- [15] Mukoyama M, Nagae T, Yokoi H, et al. Renal actions and renoprotective role of adrenomedullin [J]. *Nippon Rinsho*, 2014, 62 (Suppl 9): 237-241.
- [16] Andersen MJ, Bro-Jeppesen J. Relationships between biomarkers and left ventricular filling pressures at rest and during exercise in patients after myocardial infarction [J]. *J Card Fail*, 2014, 20(12): 959-967.

(此文编辑 朱雯霞)