

AT1R 和 eNOS 在盐敏感性高血压发生中作用*

张娟¹, 白宝琴², 李莉¹, 殷丽天¹, 关丽¹, 杨建一¹

摘要:目的 探讨血管紧张素 II 1 型受体(AT1R)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)在盐敏感性高血压发生发展中的作用。方法 用乳鼠皮下注射辣椒辣素法建立模型。哺乳期后,大鼠随机分成 4 组:对照组、高盐组、辣椒辣素组、辣椒辣素+高盐组,喂养 4 周后处死大鼠,免疫组化检测大鼠腹主动脉 AT1R 和 eNOS 蛋白表达,反转录-聚合酶链式反应检测大鼠腹主动脉 AT1R 和 eNOS mRNA 表达。结果 与对照组比较,辣椒辣素组大鼠动脉 AT1R 蛋白表达量增加 0.70 倍($P < 0.01$),而动脉 eNOS 蛋白表达量降低 20.5% ($P < 0.05$),eNOS mRNA 的表达降低 0.80 倍($P < 0.05$);与对照组比较,辣椒辣素+高盐组大鼠动脉 AT1R 蛋白表达量增加 1.69 倍($P < 0.01$),AT1R mRNA 表达量提高 1.70 倍($P < 0.01$),而动脉 eNOS 蛋白表达量降低 60.2% ($P < 0.01$),eNOS mRNA 表达降低 2.52 倍($P < 0.01$)。结论 感觉神经损伤性盐敏感性高血压大鼠动脉 AT1R 表达升高,同时 eNOS 表达降低,AT1R 和 eNOS 表达水平的差异可能与盐敏感性高血压的形成有关。

关键词:盐敏感性高血压;血管紧张素 II 1 型受体(AT1R);内皮型一氧化氮合酶(eNOS);大鼠
中图分类号:R 33 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2014)07-0912-04 DOI:10.11847/zgggws2014-30-07-19

Effect of AT1R and eNOS on salt-sensitive hypertension in rats

ZHANG Juan*, BAI Bao-qin, LI Li, et al (* Department of Cell Biology and Genetics, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi Province 030001, China)

Abstract: Objective To explore the role of angiotensin II 1 receptor(AT1R)and endothelial nitric oxide synthase (eNOS)in the development of salt-sensitive hypertension. **Methods** Newborn male Wistar rats were given capsaicin subcutaneously to establish the model. After weaning period,the rats were divided into 4 groups and fed with different salt diets for 4 weeks;control of normal sodium diet(CON-NS),control of high sodium diet(CON-HS),capsaicin pretreatment plus normal sodium diet(CAP-NS),and capsaicin pretreatment plus high sodium diet(CAP-HS). The rats were killed after 4 weeks' treatment. Immunohistochemistry was performed to detect the expression of AT1R and eNOS proteins in the artery. The expression of AT1R and eNOS mRNA in the artery was determined by reverse transcription polymerase chain reaction. **Results** Compared with the CON-NS rats,the expression of AT1R protein in the artery was remarkably higher in the CAP-NS rats($P < 0.01$),while the expression of eNOS mRNA and protein in the artery were remarkably decreased in the CAP-NS rats($P < 0.05$). Compared with the CON-NS rats,the expression of AT1R mRNA and protein in the artery was remarkably higher in the CAP-HS rats($P < 0.01$),while the expression of eNOS mRNA and protein in the artery was remarkably decreased in the CAP-HS rats($P < 0.01$). **Conclusion** The expression of AT1R mRNA and protein increase,and the expression of eNOS mRNA and protein decrease in the artery of the salt-sensitive hypertensive rats induced by sensory denervation. The different expressions of AT1R and eNOS may be related with the pathogenesis of salt-sensitive hypertension.

Key words: salt-sensitive hypertension;angiotensin II 1 receptor;endothelial nitric oxide synthase;rat

盐敏感性高血压指由于相对高盐摄入所引起的血压升高^[1-4]。盐敏感性高血压的发生与多种因素相关,包括内分泌系统、肾素-血管紧张素-醛固酮系统、遗传、环境等。目前,已有许多学者和科学家在此领域进行了大量研究,但仍未完全揭示盐敏感性高血压的细胞及分子机制。本研究通过建立感觉神经损伤性盐敏感性高血压大鼠模型,观察肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)基因血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II 1 receptor, AT1R)和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)在模型大鼠动脉中表达

差异,探讨其在盐敏感性高血压发病机制中作用,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 40 只,由山西医科大学生理学系动物室提供并繁殖饲养,出生体重 8~9 g。饲养条件为(24±2)℃,相对湿度为(55±10)%。生产许可证号码:SCXK(晋)2009-0001,动物使用许可证号码:SYXK(晋)2009-0004。

* 基金项目:山西省自然科学基金(200811076-1)

作者单位:1. 山西医科大学基础医学院细胞生物与遗传学教研室,山西太原 030001; 2. 大同市第三人民医院

作者简介:张娟(1982-),女,山西太原人,讲师,硕士,研究方向:多基因病的分子遗传学。

通讯作者:杨建一, E-mail: jianiyang@163.com

数字出版日期:2014-6-5 17:13

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140605.1713.039.html>

1.2 试剂与仪器 辣椒辣素 (capsaicin, CAP) (美国 Sigma 公司); 苏木素 (上海润捷化学试剂有限公司); eNOS、AT1R 兔抗鼠多克隆抗体、免疫组化试剂盒 (武汉博士德生物技术有限公司); 反转录 - 聚合酶链式反应 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 试剂盒 (大连宝生物工程设备有限公司)。YD-202A 型石蜡切片机 (浙江金华市益迪医疗设备厂); PCR 扩增仪 (英国 Progene Techne 公司); DYY-7C 型电泳仪 (北京六一仪器厂); JY-SPCT 水平电泳槽 (北京君意东方电泳设备有限公司); Neofuge15R 台式高速冷冻离心机 (上海力申科学仪器有限公司); Tanon2500 凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); UV-2602 型紫外分光光度计 (上海尤尼柯仪器有限公司); BL-410 生物信号显示与处理系统 (成都泰盟电子有限公司)。

1.3 指标与方法

1.3.1 动物模型建立及分组 参照文献 [5] 建立模型, 新生雄性 Wistar 大鼠出生后第 1 ~ 2 d, 皮下一次性注射辣椒辣素 50 mg/kg (溶解在 5% 乙醇、5% 吐温 80 生理盐水中); 对照组皮下注射同体积溶液, 哺乳期 (4 周龄) 后, 大鼠随机分成 4 组, 每组 10 只; 对照组 (饲料中含 1% NaCl), 高盐组 (饲料中含 4% NaCl), 辣椒辣素组 (饲料中含 1% NaCl), 辣椒辣素 + 高盐组 (饲料中含 4% NaCl), 4 组大鼠分别饲养 4 周 (8 周龄) 后进行各项指标检测。

1.3.2 称重、测血压及取材 每周分别称体重, 用尾套法测量大鼠清醒时尾收缩压, 测 3 次取均值。标本取材参照汪新良等 [6] 方法, 用 20% 乌拉坦 5 mL/kg 腹腔注射麻醉, 用生理盐水灌注 10 min, 随后用含 0.1 mg/mL 硝普钠生理盐水灌注 5 min, 再用 1.5% 戊二醛磷酸缓冲液做初步灌注固定 (灌注速度每 100 g 体重 1 mL/min), 至主动脉变硬后, 取出腹主动脉, 3% 戊二醛缓冲液固定 24 h。仔细剥离血管周围结缔组织, 将剥离好血管分为 2 份, 1 份置

于冻存管中, 液氮保存, 准备行 RT-PCR 检测, 1 份用于免疫组化检测。

1.3.3 大鼠动脉 AT1R、eNOS 蛋白表达检测 采用免疫组化法, 操作步骤严格按试剂盒说明书进行。用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件分析大鼠动脉 AT1R 和 eNOS 表达水平, 以吸光度 (A) 值表示其相对含量。

1.3.4 大鼠动脉 AT1R、eNOS mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 法, 操作步骤严格按试剂盒说明书进行。从 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 的 nucleotide 中查得目的基因 (AT1R, transcript ID: NM_030985.4; eNOS, transcript ID: NM_021838.2), 用 Primer Premier 5.0 设计引物, 其中, AT1R 上游引物: 5'-GAGAGGATTCGTGGCTT-GAG-3', 下游引物 5'-TAAGTCAGCCAAGGCGAGAT-3'; eNOS 上游引物: 5'-TCGTTTCAGCCATACATC-3', 下游引物 5'-CAGCCACATCCTCAAGTA-3'。以 β -actin 作为内参 [7], 进行产物半定量分析, 比值表示其相对含量。

1.4 统计分析 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析, 组间差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较, 采用最小显著差法, 相关性采用 Pearson 相关分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重变化 各组大鼠实验前体重无差异, 在实验过程中, 各组大鼠体重均增长, 分组后第 4 周, 各组大鼠体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠收缩压变化 (表 1) 各组大鼠在分组时 (0 周) 鼠尾收缩压差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 分组后第 3、4 周, 与对照组比较, 辣椒辣素 + 高盐组大鼠鼠尾收缩压明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠鼠尾收缩压 (mmHg, $\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	分组后 (周)				
	0	1	2	3	4
对照组	87.90 ± 5.63	109.00 ± 6.76	118.00 ± 8.52	117.00 ± 10.30	117.50 ± 12.21
高盐组	87.70 ± 6.19	113.00 ± 7.46	123.10 ± 8.20	126.50 ± 8.54	128.00 ± 8.98
辣椒辣素组	88.00 ± 5.89	107.00 ± 7.32	115.60 ± 7.70	117.50 ± 8.23	116.50 ± 9.87
辣椒辣素 + 高盐组	89.50 ± 6.78	115.00 ± 7.09	128.00 ± 7.88	146.50 ± 9.97 ^a	155.00 ± 10.00 ^a

注: 与对照组比较, $a P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠 AT1R 和 eNOS 蛋白表达变化 (图 1) 与对照组比较, 辣椒辣素组和辣椒辣素 + 高盐组大鼠动脉 AT1R 蛋白相对表达量分别增加了 0.70 和 1.69 倍, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。与对照组比

较, 辣椒辣素组和辣椒辣素 + 高盐组大鼠动脉 eNOS 蛋白表达量分别降低了 20.5% 和 60.2% ($P < 0.05$)。相关性分析表明, 大鼠动脉 AT1R 蛋白表达与 eNOS 蛋白表达呈负相关 ($r = -0.899, P < 0.01$)。

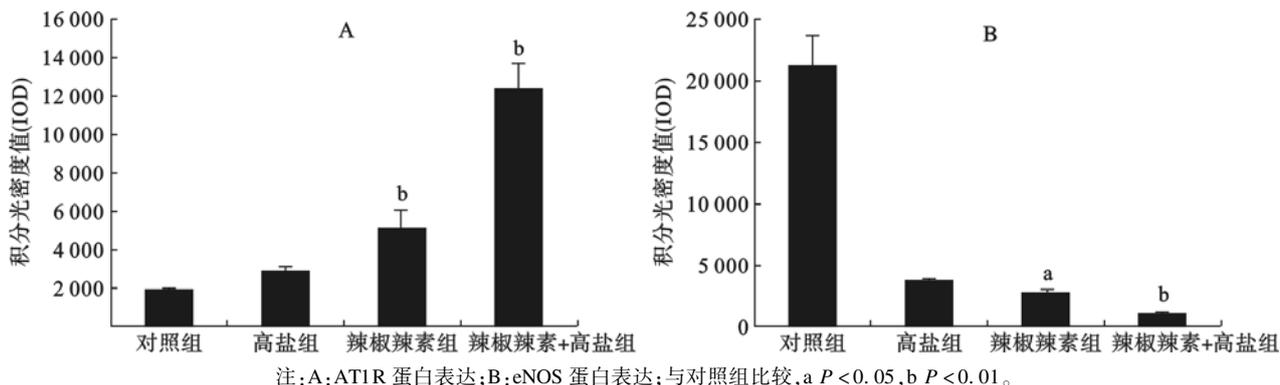


图 1 各组大鼠动脉 AT1R 和 eNOS 蛋白表达

2.4 大鼠动脉 AT1R 和 eNOS mRNA 表达变化(图 2) 辣椒辣素 + 高盐组 AT1R mRNA(464 bp, 图 2A) 表达量比对照组高 1.70 倍 ($P < 0.01$)。与对照组比较, 辣椒辣素 + 高盐组和辣椒辣素组 eNOS mRNA

(470 bp, 图 2B) 表达量分别降低了 2.52 和 0.80 倍 ($P < 0.05$)。相关性分析结果表明, 大鼠动脉 AT1R mRNA 表达与 eNOS mRNA 表达呈负相关 ($r = -0.967, P < 0.01$)。

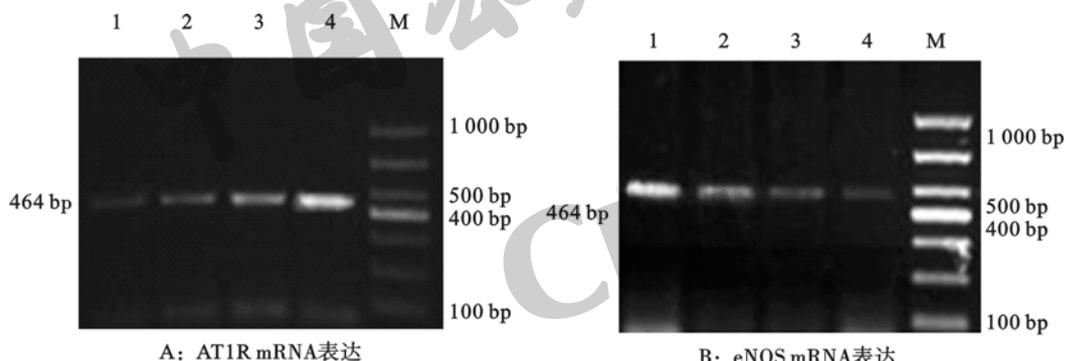


图 2 各组大鼠动脉 AT1R 和 eNOS mRNA 表达电泳图

3 讨论

RAS 是人类及哺乳动物体内一种重要的激素调节系统, 对心血管系统发育、电解质和体液平衡、血压调节起着重要的作用^[8]。血管紧张素 II 是 RAS 的主要效应分子, 血管紧张素 II 的大多数生理效应通过 AT1R 完成^[9]。AT1R 的激活促进血压的升高和高血压终末器官的损害^[10]。本研究结果显示, 与对照组比较, 辣椒辣素 + 高盐组(感觉神经损伤性盐敏感性高血压)大鼠动脉 AT1R mRNA 和蛋白表达均升高。与 Georg 等^[11]研究结果一致。

一氧化氮(nitric oxide, NO)是心血管系统内皮功能舒张的一种重要调节因子, 研究认为, eNOS 异常可影响血浆中 NO 水平^[12]。本研究结果表明, 与对照组大鼠比较, 感觉神经损伤性盐敏感性高血压大鼠动脉 eNOS 在 mRNA 和蛋白表达明显降低。研究表明, 在 Dahl 盐敏感性高血压大鼠中, 4% NaCl 饮食 10 周, 动脉 eNOS 的活性明显下调以及 NO 的生物利用度受损^[13]。使用药物阻止动脉 eNOS 下调对终末器官的损伤具有保护作用, 血管 eNOS 表达下调与动脉血压的升高及心血管疾病的发生密切相关。

本研究结果显示, AT1R 在 mRNA 和蛋白水平的表达均与 eNOS 的表达呈负相关, 进一步证实了 AT1R 和 eNOS 的平衡对于高血压的发生发展至关重要。提示 AT1R 和 eNOS 相互作用可能是感觉神经损伤性盐敏感性高血压的发生机制之一。

参考文献

- [1] Becks E, Kesseis AG, Kroon AA, et al. Genetic predisposition to salt-sensitivity: a systematic review [J]. Hypertensions, 2004, 22(7): 1243 - 1249.
- [2] Hurwitz S, Fisher ND, Ferri C, et al. Controlled analysis of blood pressure sensitivity to sodium intake: interactions with hypertension type [J]. Hypertens, 2003, 21(5): 951 - 959.
- [3] Weinberger MH. Sodium and blood pressure 2003 [J]. Curr Opin Cardiol, 2004, 19(4): 353 - 356.
- [4] 王曼, 牟建军, 陈恩让, 等. 血压盐敏感性及相关因素家庭聚集性分析 [J]. 中国公共卫生, 2007, 23(1): 38 - 39.
- [5] Wang DH, Wu W, Lookingland KJ, et al. Degeneration of capsaicin-sensitive sensory nerves leads to increased salt sensitivity through enhancement of sympathoexcitatory response [J]. Hypertension, 2001, 37(10): 440 - 443.
- [6] 汪新良, 何兆初, 曾昭华, 等. 安体舒通对感觉神经损伤性盐敏感性高血压大鼠血管重构及 RAAS 的影响 [J]. 中国心血管病研究杂志, 2006, 4(10): 773 - 776.
- [7] Ortiz PA, Garvin JL. Cardiovascular and renal control in NOS-deficient mouse models [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp

- Physiol, 2003, 284(3):R628-R638.
- [8] 崔慧慧, 李莉, 杨建一, 等. 感觉神经损伤性盐敏感性高血压大鼠心肾 ACE 和 ACE2 的表达[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(8):38-43.
- [9] Crowley SD, Tharoux PL, Audoly LP, et al. Exploring type I angiotensin (AT1) receptor functions through gene targeting [J]. Acta Physiol Scand, 2004, 181(4):561-570.
- [10] Crowley SD, Gurley SB, Herrera MJ, et al. Angiotensin II causes hypertension and cardiac hypertrophy through its receptors in the kidney [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(47):17985-17990.
- [11] Georg N, Kerstin S, Jorg R, et al. Salt induces vascular AT1 receptor overexpression *in vitro* and *in vivo* [J]. Hypertension, 1998, 31(6):1272-1277.
- [12] 张强, 唐斌, 何芳, 等. 原发性高血压与 eNOS 基因多态性相关性分析[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(2):145-148.
- [13] Zhou MS, Jaimés EA, Raij L. Atorvastatin prevents end-organ injury in salt-sensitive hypertension: role of eNOS and oxidant stress [J]. Hypertension, 2004, 44(6):186-190.

收稿日期:2013-04-22

(解学魁编辑 张翠校对)

· 实验研究 ·

白藜芦醇和能量限制对大鼠肝脂肪变性影响*

刘天娥, 赵健亚, 陈刚, 王晓珂

摘要:目的 探讨白藜芦醇(RSV)和能量限制(CR)对高脂高糖膳食诱导性肥胖大鼠肝脏脂肪变性作用。方法 将40只SD大鼠随机分成模型组与对照组,分别以高脂高糖和基础饲料饲养8周,建立肥胖大鼠模型,8周末从模型组选出大于对照组平均体重+1.96倍标准差的肥胖大鼠随机分成肥胖组、白藜芦醇(250 mg/kg)及能量限制(60%/d)组,连续12周,于20周末观察大鼠肝脏脂肪变性改善状况。结果 20周末,肥胖组、白藜芦醇组、能量限制组和对照组大鼠平均体重分别为(759.30±16.75)、(689.30±8.55)、(586.10±11.35)和(598.00±9.8)g,肥胖组高于对照组($P<0.01$),白藜芦醇、能量限制组均低于肥胖组($P<0.05$);总能量摄入量以肥胖组最高,能量限制组最低;肥胖组、白藜芦醇组、能量限制组大鼠肝脏 Sirt1、PGC-1 α mRNA 表达分别为[(0.42±0.04)、(0.79±0.16)、(0.88±0.06)]和[(0.67±0.19)、(1.26±0.34)、(2.35±0.37)],与肥胖组比较,白藜芦醇组、能量限制组大鼠肝脏 Sirt1、PGC-1 α mRNA 表达升高($P<0.01$);肥胖组大鼠肝细胞内脂质空泡大量蓄积,白藜芦醇、能量限制组大鼠肝脂肪变性均相对较轻。结论 白藜芦醇可模拟能量限制作用,减少肝细胞脂肪变性,其机制可能与上调 Sirt1 和 PGC-1 α 的 mRNA 表达、提高线粒体脂肪酸 β 氧化作用有关。

关键词:高脂高糖膳食;肥胖;白藜芦醇;能量限制;脂肪变性

中图分类号:R 151.41 文献标志码:A 文章编号:1001-0580(2014)07-0915-03 DOI:10.11847/zgggws2014-30-07-20

Resveratrol and calorie restriction improve hepatic steatosis in obese rats

LIU Tian-e, ZHAO Jian-ya, CHEN Gang, et al (Department of Environmental Health, Institute of Public Health, Nantong University, Nantong, Jiangsu Province 226019, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of resveratrol (RSV) and caloric restriction (CR) on hepatic steatosis in obese rats fed with high fat/sugar diet. **Methods** Forty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into a model and a control group and fed with high-fat/sugar and basic diet for 8 weeks. The obese rats with the average weight of 1.96 times standard deviation of the control group were picked out from the model group at the end of 8th week and then were randomly divided into obese, RSV (250 mg/kg) and CR (60%/d) groups. The improvements of hepatic steatosis of the rats were observed at the end of 20th week. **Results** At the end of 20th week, the mean body weight of rats in obese, RSV CR and control groups were 759.30±16.75, 689.30±8.55, 586.10±11.35, and 598.00±9.8 g, respectively, and the mean body weight of the obese group was higher than that of the control group ($P<0.01$) and that of RSV and CR group were lower than that of the obese group ($P<0.05$). Total energy intake in obese group was the highest, and that of the CR group was the lowest. The liver silent information regulator 1 (Sirt1), peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator 1 α (PGC-1 α) mRNA expression in obese, RSV, and CR groups were 0.42±0.04, 0.79±0.16, 0.88±0.06, and 0.67±0.19, 1.26±0.34, 2.35±0.37, respectively, and those in RSV and CR groups were higher than those of the obese group ($P<0.01$). The vacuolar accumulation was observed in liver cell of obese rats rats, and the rats in RSV and CR groups had relatively mild hepatic steatosis. **Conclusion** Resveratrol can simulate the energy restriction to reduce hepatic steatosis, and the mechanism may be related to the increased Sirt1 and PGC-1 α mRNA expression and fatty acid β -oxidation function.

Key words: high fat/sugar diet; obesity; resveratrol; calorie restriction; steatosis

* 基金项目:国家自然科学基金(21277078)

作者单位:南通大学公共卫生学院环境卫生学教研室,江苏 南通 226019

作者简介:刘天娥(1988-),女,湖南邵东人,硕士在读,研究方向:环境卫生学。

通讯作者:王晓珂, E-mail: wxkel11@hotmail.com

数字出版日期:2014-6-5 17:11

数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140605.1711.038.html