

· 基础研究 ·

前胡丙素对自发性高血压大鼠血压及心肌受磷蛋白表达的影响*

汪文杰[#], 孙黎明

(蚌埠医学院附属连云港医院暨连云港市第二人民医院, 江苏连云港 222023)

摘要:目的 探讨前胡丙素对自发性高血压大鼠(SHR)血压的影响及可能机制。方法 选择 SHR 20 只, 随机分为药物组($n=10$), 对照组($n=10$), 另选 SD 大鼠 10 只为 SD 组。药物组给予前胡丙素 $20 \text{ mg/kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 其余对照组和 SD 组同等容积聚乙二醇 400 灌胃, 干预 8 周, 运用透射电镜观察心肌细胞超微结构及线粒体损伤情况, 并用半定量反转录 PCR(RT-PCR)法测定受磷蛋白(PLB)的基因表达水平。结果 治疗前药物组大鼠的收缩压 $[(184.3 \pm 19.7) \text{ mm Hg}]$ 与对照组 $[(183.3 \pm 17.2) \text{ mm Hg}]$ 接近, 与 SD 组相比明显升高, 差异有统计学意义, 治疗后药物组大鼠收缩压 $[(149.3 \pm 12.6) \text{ mm Hg}]$ 比对照组大鼠心肌 $[(201.0 \pm 11.0) \text{ mm Hg}]$ 低($P < 0.05$), 对照组 PLB 表达水平与 SD 组相比有明显的降低, 治疗后药物组大鼠心肌 PLB 的表达较对照组上调($P < 0.05$)。结论 前胡丙素有一定的降压作用, 可能是通过上调 SHR 心肌肌质网 PLB 的基因表达。

关键词: 大鼠, 近交 SHR; 高血压; 前胡丙素; 受磷蛋白

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.14.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)14-1392-02

Effects of praeruptorin C on blood pressure and expression of myocardial phospholamban in spontaneously hypertensive rats*

Wang Wenjie[#], Sun Liming

(Affiliated Lianyungang Hospital, Bengbu Medical College, Lianyungang, Jiangsu 222023, China)

Abstract: Objective To explore the impact and the possible mechanism of praeruptorin C (Pra-C) on blood pressure in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** 20 spontaneously hypertensive rats were randomly divided into the Pra-C group treated with Pra-C $20 \text{ mg}/(\text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$ by gastrogavage ($n=10$) and untreated control group ($n=10$). The untreated control group and 10 age matched Sprague Dawley rats as SD group received gastrogavage with same volume of polyethylene glycol. Each rat in various groups was intervened for 8 weeks. The lesions of ultrastructure and mitochondria were observed by transmission electron microscope. The gene expression levels of phospholamban (PLB) were determined by the method of semiquantitative RT-PCR. **Results** Before treatment, the systolic pressure of SHR in the Pra-C group was $(184.3 \pm 19.7) \text{ mm Hg}$, which was closed to $(183.3 \pm 17.2) \text{ mm Hg}$ in the control group, but significantly higher than that in the SD group. After treatment, the systolic pressure of SHR in the Pra-C group was $(149.3 \pm 12.6) \text{ mm Hg}$, which was obviously lower than $(201.0 \pm 11.0) \text{ mm Hg}$ in the control group ($P < 0.05$). Compared with the SD group, the expression of PLB in the control group was significantly reduced, but which after treatment in the Pra-C group was upregulated compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Pra-C has a certain hypotensive effect by upregulating the gene expression of myocardial sarcoplasmic reticulum PLB.

Key words: rats, inbred SHR; hypertension; praeruptorin; phospholamban

高血压是常见的心血管疾病, 随着病程的进展可导致靶器官(如心脏、肾脏、脑和血管)损害, 因此, 治疗高血压的同时如能逆转靶器官损害是高血压治疗药物的优势所在, 中药治疗高血压, 具有降压作用缓和、稳定、改善症状明显、安全性高、不良反应小、耐药性低等优点^[1]。有研究证实, 前胡丙素有一定降压作用^[2], 但前胡丙素对心室重构的影响及影响机制报道较少, 有待阐明。本研究探讨自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)高血压早期心肌肌质网中受磷蛋白(phospholamban, PLB)基因表达水平的变化以及中药前胡丙素对 SHR 心肌 PLB 表达的影响及可能机制, 现报道如下。

1 材料与方

1.1 药品与试剂 前胡丙素为白色粉末状, 由海灿生物科技有限公司提供, 4°C 避光保存, 临用前以聚乙二醇 400 配成 2% 浓度。反转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)试剂盒由 Fermentas 公司提供, 其余均为市售国产分析纯。

1.2 实验动物 健康成年雄性 SHR 20 只和 SD 10 只, 12 周

龄, 体质量 $250 \sim 300 \text{ g}$, SHR 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(合格证: 京 2007-0001), SD 由蚌埠医学院实验动物中心提供(合格证: 苏 2006924)。选择 SHR 20 只, 随机分为药物组($n=10$)及对照组($n=10$), 药物组大鼠给予前胡丙素 $20 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃。SD 大鼠 10 只作为 SD 组。对照组及 SD 组大鼠用同等容积聚乙二醇 400 灌胃干预 8 周。

1.3 标本的制备 治疗前及治疗过程中每 2 周以尾容积法测量尾动脉收缩压, 每只重复测量 3 次, 取其平均值, 每次测定血压时间为上午 9~11 点。尔后行锤击头部处死, 开胸取出心脏, 以预冷生理盐水充分冲洗, 并用滤纸吸干后, 去除心耳和左、右心房组织, 剔除右心室, 称取左心室(不包括室间隔), 取心肌予 HE 染色后观察心肌细胞形态和结构的变化, 并运用透射电镜观察心肌细胞超微结构及线粒体损伤情况, 然后取心肌制备匀浆, 提取 RNA, 用半定量 RT-PCR 法测定 PLB 的基因表达水平。

1.4 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理。

* 基金项目: 连云港市重点人才课题(Zc229)。 # 现在皖南医学院铜陵市人民医院工作(邮政编码: 244000)。

表 1 前胡丙素对大鼠收缩压的影响($\bar{x} \pm s$, mm Hg)

组别	n	治疗前	2 周	4 周	6 周	8 周
药物组	10	184.3±19.7	179.1±16.8*#	173.7±15.9*#	163.4±15.8*#	149.3±12.6*#
对照组	10	183.3±17.2	188.5±12.3	194.8±9.9	198.3±9.5	201.0±11.0
SD 组	10	126.5±4.97	125.4±4.9	127.4±4.9	121.6±5.2	125.4±5.7

*: $P < 0.05$, 与同组治疗前比较; #: $P < 0.05$, 与同时段对照组比较。

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析组间差异, 组间两两对照采用 SNK-q 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

3 组大鼠干预前、后收缩压见表 1 和图 1, 大鼠心肌病理结构的影像见封 2 图 2、封 3 图 3。大鼠心肌中 PLB mRNA 的表达水平见图 4。

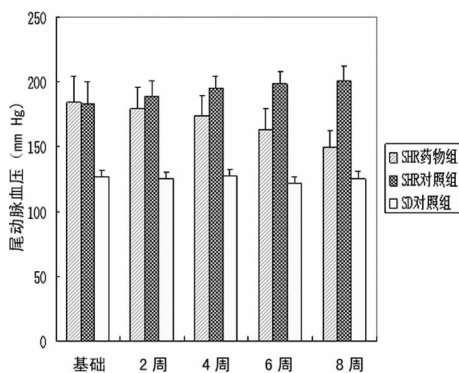


图 1 3 组大鼠血压比较柱形图

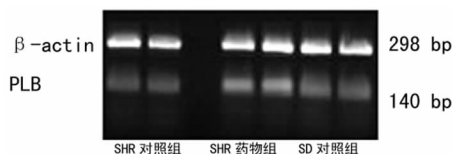


图 4 3 组大鼠干预前、后 PLB 的 mRNA 表达电泳图

3 讨 论

原发性高血压的病因和发病机制尚未完全阐明, 近年来, 随着神经内分泌学及分子生物学的发展, 许多研究已达到分子水平^[3-6], 中药治疗高血压, 具有降压作用缓和、稳定、改善症状明显、不良反应小等优点^[7]。中药前胡丙素是从伞形科植物白花前胡根中提取出的一种有效成分, 作为传统中药, 有很多生理和药理作用, 特别在心血管系统中具有降压和钙拮抗样作用。有研究表明, 可以拮抗多种原因引起的钙升高, 维持细胞钙稳态, 不仅有良好的降压作用, 而且可以改善心脏收缩与舒张功能, 对心脏有保护作用^[8-10]。饶曼人等^[11]研究显示, 长期使用前胡丙素可能通过增加血管内皮 NO 的浓度降低血压, 从而对肥厚心肌产生保护作用, 防止缺血及肥厚心肌细胞内钙升高。吴冬梅和李庆平^[12]研究表明, 在一次灌胃前胡丙素后血压即下降, 降压峰值在 6 h, 连续给药 8 周后降压效应比 4 周强, 而且持久, 说明该药无耐药性。前胡丙素改善血压可能和前胡丙素扩张了外周血管, 降低全血黏度有关, 对淤血症有不同程度的改善, 从而降低外周血管阻力, 达到降压作用, 前胡丙素的降压作用温和持久, 可见此药很有开发的價值。前胡丙素可能通过上调 PLB 的基因表达水平从而对 Ca^{2+} 浓度的调控蛋白肌质/内质网钙 ATP 酶 (sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA2a) 发挥着作用, 肌质网 PLB 是心肌肌质网膜上存在一种低相对分子质量的蛋白, 在接受磷酸基

团后可促进 Ca^{2+} 的转运, 因此, 将其称为 PLB^[13-14], PLB 和 SERCA2a 是保障心功能正常极为重要的因素。陈开祥等^[15]研究提示, 前胡丙素可以提高缺氧再灌注损伤心肌细胞 PLB 基因和蛋白的表达水平, 而且可以明显上调 PLB 的磷酸化水平, 从而发挥对缺氧再灌注损伤心肌细胞的保护作用, 可能是作用于心肌细胞膜及肌质网钙泵, 通过抑制 Ca^{2+} 内流, 增加肌质网对 Ca^{2+} 的摄取, 解除冠状动脉痉挛, 降低后负荷而降低血压。本实验中发现, SHR 肌质网 PLB 基因表达较正常 SD 大鼠明显下调, 前胡丙素可能通过上调肌质网 PLB 基因表达调控了钙从而降低了血压, 但这些 SHR 左心室心肌 PLB mRNA 的表达水平和 SD 大鼠有相当大的差异, 似乎提示 SHR 心脏 PLB mRNA 的低表达现象不仅只由高血压本身造成, 其中可能还有独立于血压因素外的机制的参与。

总之, 前胡丙素降低血压可能具有多成分、多靶点、多途径共同起作用的特点, 具体的机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 朱林平, 曹旭焱. 心室重构中医药防治研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(8): 1430-1431.
- [2] 刘小叶, 王国贤. 白花前胡丙素的心血管药理作用研究进展[J]. 辽宁医学院学报, 2008, 29(6): 555-556.
- [3] Gergs U, Berndt, Buskase T, et al. On the role of junction in cardiac Ca^{2+} handling, contractility, and heart failure[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2007, 293(1): 728-734.
- [4] Primola-Gomes TN, Campos LA. Exercise capacity is related to calcium transients in ventricular cardiomyocytes [J]. Appl Physiol, 2009, 107(2): 593-598.
- [5] Sugita Y. Structural and functional relationships in Ca^{2+} -pump[J]. Seikagaku, 2008, 80(10): 917-924.
- [6] Yano M. Altered intracellular Ca^{2+} handling in heart failure[J]. Clin Invest, 2005, 115(3): 556-564.
- [7] 潘九英, 吴飞华, 金芝贵. 白花前胡有效成分药理作用研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(5): 64-65.
- [8] George CH, Lai FA. Developing new anti-arrhythmics: clues from the molecular basis of cardiac ryanodine receptor (RyR2) Ca^{2+} -release channel dysfunction [J]. Curr Pharm Des, 2007, 13(31): 3195-3211.
- [9] Meyer M. A recombinant antibody increases cardiac contractility by mimicing phospholamban phosphorylation [J]. FASEB J, 2004, 18(11): 1312-1314.
- [10] Oxenoid K. The structure of phospholamban pentamer reveals a channel-like architecture in membranes [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(31): 10870-10875.
- [11] 饶曼人, 刘宛斌, 张晓文. 预适应和前胡丙素对缺氧肥厚血管平滑肌胞内钙离子浓度及 NO 含量影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(2): 141-144. (下转第 1396 页)

心肌组织所释放的细胞因子或信号分子有明显不同,梗死心肌组织裂解液所模拟的心肌微环境具有促进 BMSCs 向心肌样细胞方向分化的作用^[9]。Monzen 等^[10]发现 BMSCs 移植于梗死心肌组织内或梗死边缘心肌组织内,能够分化为心肌细胞,并且能够与宿主心肌细胞建立细胞间连接。上述说明,BMSCs在适当的心肌微环境中可以诱导为有功能的心肌细胞前体,即心肌样细胞^[11]。

本研究用 BMP-2 成功诱导 BMSCs 分化为心肌样细胞。曾有报道 BMP-2 在体外无血清条件下能将胚胎干细胞诱导分化为心肌样细胞^[12],甚至诱导分化为搏动的心肌细胞^[2,12]。noggin 的分子结构和 BMP-2 相似,是 BMP-2 的一种特异性直接拮抗剂。有研究证实,过表达 BMP-2 拮抗剂 noggin 可阻断心肌转录因子和收缩蛋白的表达。本实验在梗死心肌裂解液中加入 noggin 拮抗 BMP-2,使梗死心肌裂解液无法发挥诱导作用^[14-15],说明 BMP-2 是梗死心肌裂解液中起重要诱导作用的成分之一。

本研究采用 BMP-2、梗死心肌裂解液模拟的生物微环境成功诱导 BMSCs 分化为心肌样细胞,且发现在梗死心肌裂解液模拟的生物微环境中,BMP-2 是不可缺少的重要组成部分。但是,在心肌样细胞生长的微环境中除 BMP-2 外,还有哪些必不可少的细胞因子或信号分子? 这些细胞因子或信号分子调控分化的路径、机制及心肌样细胞生长的最佳体外微环境等还需进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Hughes S. Cardiac stem cell[J]. J Pathol,2002,197(4):468-478.
- [2] 陈志东,李建美. 骨髓间充质干细胞诱导为心肌样细胞的诱导剂概况[J]. 心血管病进展,2010,31(2):295-297.
- [3] Behfar A,Zingman LV,Hodgson DM, et al. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart[J]. FASEB J,2002,16(12):1558-1566.
- [4] Izumi M,Fujio Y,Kunisada K, et al. Bone morphogenetic protein-inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway[J]. J Biol Chem,2001,276(33):31133-31141.
- [5] 赵金超,顾春虎,王云雅,等. 梗死心肌组织裂解液对鼠骨髓间充质干细胞诱导分化作用的体外研究[J]. 中国医药生物技术,2007,2(6):411-415.
- [6] Monzen K,Shiojima I,Hiroi Y, et al. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4[J]. Mol Cell Biol,1999,10(9):7096-7105.
- [7] Rangappa S, Entwistle JW, Wechsler AS, et al. Cardiomyocyte mediated contact programs human mesenchymal stem cells to express cardiogenic phenotype[J]. J Thorac Cardiovasc Surg,2003,126(1):124-132.
- [8] 苑媛,吕安林,陈丹,等. 血管紧张素 II 诱导人骨髓间充质干细胞分化为心肌样细胞[J]. 心脏杂志,2006,18(3):258-261.
- [9] Moscoso I,Centeno A,Lopez E, et al. Differentiation in vitro of primary and immortalized porcine mesenchymal stem cells into cardiomyocytes for cell transplantation[J]. Transplant Proc,2005,37(1):481-482.
- [10] Monzen K,Nagai R,Komuro I. A role for bone morphogenetic protein signaling in cardiomyocyte differentiation[J]. TCM,2002,12(6):263-269.
- [11] Degeorge BR,Rosenberg M,Eckstein V. BMP-2 and FGF-2 synergistically facilitate adoption of a cardiac phenotype in somatic bone marrow c-kit⁺/Sca-1⁺ stem cells[J]. Clin Transl Sci,2008,1(2):116-125.
- [12] Kim YY,Ku SY,Liu HC, et al. Cryopreservation of human embryonic stem cells derived-cardiomyocytes induced by BMP-2 in serum-free condition[J]. Reprod Sci,2011,18(3):252-260.
- [13] Tan YZH,Wang HJ. Lineage commitment and differentiation of cardiac stem cells and their regulating mechanism[J]. Biomed Eng Foreign Med Sci,2004,27(1):37-41.
- [14] 王新艳,谭玉珍,王海杰,等. Smad 信号通路在骨髓源性心肌干细胞向心肌分化中的作用[J]. 解剖学报,2006,37(5):525-529.
- [15] Hao J,Ju H,Zhao S, et al. Elevation of expression of smads 2,3, and 4, decorin and TGF-beta in the chronic phase of myocardial infarct scar healing[J]. J Mol Cell Cardiol,1999,31(6):667-678.

(收稿日期:2012-01-02 修回日期:2012-03-02)

(上接第 1933 页)

- [12] 吴冬梅,李庆平. 前胡丙素对肾型高血压大鼠血压及尾动脉反应性的影响[J]. 中国药理学通报,1997,13(3):242-243.
- [13] Tupling AR. The decay phase of Ca²⁺ transients in skeletal muscle: regulation and physiology[J]. Appl Physiol Nutr Metab,2009,34(3):373-376.
- [14] Jia LG. Hypertrophy, increased ejection fraction, and re-

duced Na-K-ATPase activity in phospholemman deficient mice[J]. Am J Physiol,2005,288(4):H1982-1988.

- [15] 陈开祥,祝宝华,刘晨,等. 缺氧预适应和前胡丙素预处理对心肌受磷蛋白磷酸化水平的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志,2008,3(3):210-213.

(收稿日期:2011-12-28 修回日期:2012-02-09)