

拉西地平对自发性高血压大鼠模型血管内皮的保护作用及机制分析

卞龙艳¹, 武玲², 朱慧¹

(1. 江苏医药职业学院, 江苏盐城 224005; 2. 江苏省盐城市妇幼保健医院护理部 224002)

[摘要] **目的** 探讨拉西地平对自发性高血压大鼠模型血管内皮功能的保护作用, 并分析其可能的作用机制。**方法** 选取 50 只 Wistar 大鼠为 WKY 组, 分为 WKY 对照组和 WKY 研究组, 每组 25 只; 50 只自发性高血压大鼠为 SHR 组, 分为 SHR 对照组和 SHR 研究组, 每组 25 只。WKY 研究组和 SHR 研究组大鼠给予拉西地平, WKY 对照组和 SHR 对照组大鼠给予等体积的生理盐水, 持续 8 周。各组大鼠分别于干预前后测量尾动脉收缩压。采用肠系膜上动脉血管舒张试验检测肠系膜动脉舒张度, Western blot 检测主动脉 Cx37 蛋白表达水平, 硝酸还原法检测血清 NO 水平, ELISA 检测血浆 ET 水平及血清 TNF- α 水平。**结果** SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠平均动脉压明显高于 WKY 研究组和 WKY 对照组 ($P < 0.05$); 与干预前比较, 干预后的 SHR 研究组大鼠平均动脉压明显降低, 且明显低于 SHR 对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与 WKY 研究组和 WKY 对照组相比较, SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠肠系膜上动脉舒张度、主动脉 Cx37 蛋白表达水平、血清 NO 水平明显降低 ($P < 0.05$), 而 SHR 研究组明显高于 SHR 对照组 ($P < 0.05$); 血浆 ET 水平、血清 TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.05$), 而 SHR 研究组明显低于 SHR 对照组 ($P < 0.05$)。**结论** 拉西地平能够改善血管内皮功能, 其可能通过调节血管舒张因子 NO、收缩因子 ET 的表达, 保证细胞间缝隙连接通讯正常, 抑制炎症反应, 从而保护血管内皮。

[关键词] 拉西地平; 大鼠, 近交 SHR; 内皮, 血管**[中图法分类号]** R285.5**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)06-0933-04**Protective effect and possible mechanism of lacidipine on vascular endothelium in spontaneously hypertensive rat model**BIAN Longyan¹, WU Ling², ZHU Hui¹

(1. Jiangsu Pharmaceutical Vocational College, Yancheng, Jiangsu 224005, China;

2. Department of Nursing Yancheng Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Yancheng, Jiangsu 224002, China)

[Abstract] **Objective** To discuss the protective effect and possible mechanism of lacidipine on vascular endothelium in spontaneously hypertensive rat model. **Methods** Fifty Wistar rats were selected as the WKY group and divided into the WKY control group and WKY research group, 25 cases in each group; fifty spontaneous hypertensive rats were selected as the SHR group and divided into the SHR control group and SHR research group, 25 cases in each group. The WKY research group and SHR research group were given lacidipine, and the WKY control group and SHR control group were given the same volume of normal saline solution for continuous 8 weeks. The systolic pressure of tail artery in each group was measured before and after intervention. The mesenteric artery diastolic degree was detected by adopting the mesenteric superior artery diastolic test, the aortic Cx37 protein expression level was detected by Western blot method, the serum NO level was detected by using the nitrate reduction method, the plasma ET and serum TNF- α levels were detected by using ELISA method. **Results** The mean arterial pressure in the SHR research group and SHR control group were significantly higher than that in the WKY research group and WKY control group ($P < 0.05$); compared with before intervention, the mean arterial pressure after intervention in the SHR research group was significantly decreased, moreover significantly lower than that in the SHR control group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the SKY research group and WKY control group, the diastolic degree of mesenteric superior artery, expression levels of aortic Cx37 protein and serum NO levels in the SHR research group and SHR control group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the SHR research group

was significantly higher than the SHR control group ($P < 0.05$); plasma ET level and serum TNF- α level were significantly increased ($P < 0.05$), while the SHR research group was significantly lower than the SHR control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Lacidipine can effectively reduce the mean arterial pressure in spontaneously hypertensive rats, and improve its endothelial function, ensure the normality of the intercellular gap junction communications possibly by adjusting the expression of vasodilatation factor NO and contraction factor ET, inhibit the inflammatory response, thus protect the vascular endothelial function.

[Key words] lasidipine; rats, inbred SHR; endothelium, vascular

高血压作为一种常见的慢性病,是引发心脑血管疾病的主要因素,高血压的发病原因较复杂,是由多因素、多基因共同作用的结果^[1-3]。目前,关于高血压的发病机制尚未明确,其相关研究仍是热点,为了更好地探究其病理机制,动物模型成为一种必要的手段。SHR是一种自发性高血压大鼠模型,其血管出现舒张功能减退和重塑,与人类接近^[4]。血管内皮功能障碍是高血压发病的重要因素,高血压患者的血管内皮功能异常,进而引发其他脏器病变^[5]。肠系膜动脉舒张度能够反映血管的内皮功能状态^[6]。内皮素(endothelin, ET)作为一种强血管收缩剂,参与高血压的发生、发展^[7]。一氧化氮(nitric oxide, NO)作为一种血管内皮舒张因子,能够调节血管张力,维持血压稳定^[8]。间隙连接蛋白(connexin, Cx)是连接两个相邻细胞的主要组分,其能够维持血管壁细胞之间的正常信息交流,保障血管的同步舒缩,从而发挥其正常功能^[9]。血管炎症反应参与高血压的病理机制,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)作为一种炎症因子,能够促进平滑肌细胞增殖,造成血管收缩,血压升高^[10]。研究发现,拉西地平能够选择性的阻滞血管平滑肌的钙通道,扩张血管,降低血压^[11]。此外,拉西地平还具有抗氧化性,能够保护血管^[12]。本研究采用自发性高血压大鼠模型,探讨拉西地平对其血管内皮的保护作用,并分析其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取 20 周龄的 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 50 只为 WKY 组,20 周龄的雄性自发性高血压大鼠 50 只为 SHR 组,体质量(250 ± 10)g,购自北京维通利华有限责任公司。将 50 只 WKY 组大鼠分为两组,分别为 WKY 对照组和 WKY 研究组,每组 25 只。将 50 只 SHR 组大鼠分为两组,分别为 SHR 对照组和 SHR 研究组,每组 25 只。各组大鼠在种类、鼠龄和体质量方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

1.2 方法

1.2.1 造模 所有大鼠均在清洁级环境中标准饲料,恒温(21 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,恒湿(55 ± 5)%,人工光照每昼夜 12 h,适应饲养 1 周后开始实验。WKY 研究组和 SHR 研究组大鼠给予拉西地平(西班牙葛兰素威康

集团,批准文号:注册证号 H20140294)0.72 mg/kg 灌胃处理,WKY 对照组和 SHR 对照组大鼠给予等体积的生理盐水(氯化钠注射液,杭州民生药业有限公司,批准文号:国药准字 H33021575),每天 1 次,持续 8 周。

1.2.2 平均动脉压 干预前、干预后采用无创血压计 BP-98A/B 型在大鼠清醒状态下检测尾动脉收缩压,测量 3 次,取平均值。

1.2.3 肠系膜动脉舒张度 采用脱颈椎法将大鼠处死后,取其肠系膜动脉,置于 Krebs Henseleit(K-H)溶液中,并将其剪成 3 mm 左右的血管环。血管功能测定系统的 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温槽内持续充入 5% CO_2 和 95% O_2 的混合气体,将血管环一端固定在槽底,另一端连接张力换能器。在 K-H 溶液中加入 60 mmol/L KCl 进行预收缩,待血管拉力达到峰值后,加入 0.1 mmol/L 乙酰胆碱,比较各组大鼠肠系膜上动脉的舒张性,判断血管内皮功能。

1.2.4 主动脉 Cx37 蛋白表达水平 各组大鼠分别于干预后,采用脱颈椎法将大鼠处死取其主动脉,采用 Western blot 检测主动脉 Cx37 蛋白表达水平。将动脉置于 RIPA 缓冲液中,在冰上充分研磨,离心取上清液,进行 SDS-PAGE,然后将蛋白转移至硝酸纤维素膜,在含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中室温封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,二抗室温孵育 1 h, TBST 缓冲液清洗 3 次, ECL 反应 1 min, 曝光, 显影, 采用 BCA 法测定蛋白水平。

1.2.5 血浆 ET、血清 NO 及 TNF- α 水平 各组大鼠分别于干预后处死前采用腹主动脉取血法,每只大鼠分别采集 3 支试管的血液标本 5 mL,1 支试管加入抗凝剂混匀,4 $^{\circ}\text{C}$,3 500 r/min 离心 10 min,取上清;另 2 支试管,常温静置 20 min 后,以 3 000 r/min 离心 5 min,取上清,均转移至新试管待测,采用 ELISA 检测 ET、TNF- α 水平,硝酸还原法检测 NO 水平,试剂盒均购于美国 IBL 公司,严格按照说明书进行操作。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠平均动脉压比较 干预前后,WKY 研

究组和 WKY 对照组大鼠平均动脉压比较,差异无统计学意义($P>0.05$);SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠平均动脉压明显高于 WKY 研究组和 WKY 对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与干预前比较,干预后的 SHR 研究组大鼠平均动脉压明显降低,且明显低于 SHR 对照组,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠平均动脉压比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	收缩压(mm Hg)		t	P
		干预前	干预后		
SHR 研究组	25	191.3±9.9	171.4±8.2	7.740	0.000
SHR 对照组	25	191.6±9.7	194.5±9.8	1.052	0.149
WKY 研究组	25	135.0±5.8	135.0±5.7	0.000	1.000
WKY 对照组	25	136.0±5.7	134.0±5.5	1.262	0.213

2.2 各组大鼠肠系膜上动脉舒张度比较 WKY 研究组和 WKY 对照组大鼠肠系膜上动脉舒张度分别为(92.14±5.71)%、(91.34±5.67)%,差异无统计学意义($P>0.05$)。与 WKY 研究组和 WKY 对照组相比较,SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠肠系膜上动脉舒张度(63.72±4.31)%、(36.48±6.53)%明显降低($P<0.05$),而 SHR 研究组明显高于 SHR 对照组($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠主动脉 Cx37 蛋白表达水平比较 WKY 研究组和 WKY 对照组大鼠主动脉 Cx37 蛋白表达水平 0.98±0.09、1.02±0.08,差异无统计学意义($P>0.05$)。与 WKY 研究组和 WKY 对照组相比较,SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠主动脉 Cx37 蛋白表达水平 0.74±0.07、0.58±0.06 明显降低($P<0.05$),而 SHR 研究组明显高于 SHR 对照组($P<0.05$),见图 1。

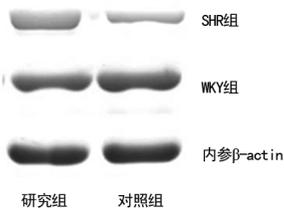


图 1 各组大鼠主动脉 Cx37 蛋白表达水平

表 2 各组大鼠血浆 ET、血清 NO 及 TNF- α 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	ET (pg/mL)	NO (μ mol/g)	TNF- α (μ mol/g)
SHR 研究组	25	2.16±0.82	0.62±0.05	92.05±18.24
SHR 对照组	25	3.85±1.04	0.41±0.07	152.42±34.87
WKY 研究组	25	1.67±0.49	0.75±0.06	43.42±19.73
WKY 对照组	25	1.64±0.53	0.77±0.04	45.32±21.06

2.4 各组大鼠血浆 ET、血清 NO 及 TNF- α 水平比

较 WKY 研究组和 WKY 对照组大鼠血浆 ET、血清 NO 及 TNF- α 水平,差异无统计学意义($P>0.05$)。与 WKY 研究组和 WKY 对照组比较,SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠血浆 ET 水平、血清 TNF- α 水平明显升高($P<0.05$),而 SHR 研究组明显低于 SHR 对照组($P<0.05$);SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠血清 NO 水平明显降低($P<0.05$),而 SHR 研究组明显高于 SHR 对照组($P<0.05$),见表 2。

3 讨论

高血压是常见的慢性病,也是心脑血管疾病的主要危险因素。高血压的发病机制和发病因素较复杂,血管内皮功能障碍是引发高血压的主要因素。血管内皮是介于血液和血管壁之间的一道屏障,其能够维持血管壁结构,参与免疫反应,介导炎症反应,调节血管平滑肌细胞生长^[13]。研究报道 SHR 机体内普遍存在内皮功能障碍,血管舒张功能失衡引发血压升高,而持续的血压升高又导致血管内皮功能障碍,二者是相互促进的恶性循环^[14]。由于高血压患者均存在血管内皮功能损伤,改善患者的血管内皮功能是防治高血压病情发展的重要环节。拉西地平一方面作为一种二氢吡啶类钙通道阻滞剂,能够选择性阻滞血管平滑肌的钙通道,扩张血管,降低血压;另一方面具有抗氧化性,能够降低氧化应激反应对血管内皮的损伤作用,二者共同发挥保护血管的作用。

本研究结果显示,与干预前相比较,干预后的 SHR 研究组大鼠平均动脉压明显降低,且低于 SHR 对照组($P<0.05$)。说明拉西地平能够有效降低自发性高血压大鼠的平均动脉压。由于拉西地平具有高度的血管选择性,从而发挥强力降压作用。

动脉舒张度反映血管的弹性功能,高血压患者的动脉弹性随着血压的升高而减退^[15]。造成这一现象的原因可能是高血压引起脉压增加,进而造成大动脉僵硬增加,导致血管壁所受压力增大,血管内皮受损,促进动脉粥样硬化形成。本研究结果显示,与 WKY 研究组和 WKY 对照组比较,SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠肠系膜上动脉舒张度明显降低($P<0.05$),而 SHR 研究组明显高于 SHR 对照组($P<0.05$)。说明自发性高血压大鼠的血管内皮功能受损,而采用拉西地平干预后,这种受损状态得到改善。拉西地平的作用机制可能为通过调节血管活性物质,作用于钙通道,扩张动脉,减低血管阻力,降低血压,另外,其具有抗氧化性,能够降低氧化应激反应,减少血管内皮的过氧化损伤,避免血压升高和血管内皮功能障碍的恶性循环。

血管发挥正常的功能需要血管同步舒缩,而这依赖于血管壁细胞之间通讯系统的完整性。血管紧张度升高是引发心脑血管疾病的关键,表现为细胞间的

电化学信息交流异常。文献报道高血压的发生、发展与间隙连接蛋白的异常有关^[16]。本研究结果显示,与 WKY 研究组和 WKY 对照组比较,SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠主动脉 Cx37 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$),而 SHR 研究组明显高于 SHR 对照组($P < 0.05$)。说明自发性高血压大鼠的血管壁细胞间缝隙连接的通讯异常,而采用拉西地平干预后,这种通讯状态得到改善。推测高血压可能降低 Cx37 蛋白表达水平,从而使细胞间缝隙连接的通讯异常,造成血管内皮功能紊乱,加重高血压,而采用拉西地平干预后,由于其能够降低血压,改善血管内皮功能障碍,促进细胞间缝隙连接的正常通讯。

血管内皮通过分泌多种血管活性物质,例如血管舒张和收缩、氧化和抗氧化、炎症和抗炎等因子,维持血管内环境和血管内皮功能的稳定。研究发现在高血压病理状态下,血压持续升高会刺激血管内皮细胞,从而造成血管内皮功能障碍,引起 ET 水平升高,NO 水平降低,导致血管收缩作用增强,舒张作用减弱,促进钙离子内流,氧化应激反应增加,血管平滑肌细胞增殖,血压进一步升高^[17]。研究报道,在高血压的发生、发展过程中,炎症反应起着重要作用,TNF- α 、IL-6 等因子的持续高水平表达可进一步加重血管内皮损伤。本研究结果显示,与 WKY 研究组和 WKY 对照组比较,SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠血浆 ET、TNF- α 水平明显升高($P < 0.05$),而 SHR 研究组明显低于 SHR 对照组($P < 0.05$);SHR 研究组和 SHR 对照组大鼠血清 NO 水平明显降低($P < 0.05$),而 SHR 研究组明显高于 SHR 对照组($P < 0.05$)。说明自发性高血压大鼠的血管内皮损伤,而采用拉西地平干预后,血管内皮功能得到改善。推测高血压可能造成内皮细胞受损,从而引起 ET 水平升高,NO 水平降低,氧化应激反应增加,导致血管舒缩功能失衡,血管内皮功能障碍,血压升高。采用拉西地平干预后,由于其能够降低血压,避免血管内皮功能损伤加重,此外还能够促进细胞间缝隙连接的正常通讯,进而调节 ET、NO 等因子的表达水平,促进血管内皮功能恢复,同时其具有抗氧化性,能够抑制炎症反应,减少生成氧化产物,改善血管内皮功能损伤。

综上所述,拉西地平能够有效降低自发性高血压大鼠的平均动脉压,保护血管内皮,其可能通过以下几个方面:能够选择性阻滞血管平滑肌的钙通道,扩张血管,降低血压;能够调节 Cx37 蛋白表达水平,促进细胞间缝隙连接通讯正常,进而调节血管舒张、收缩因子(NO、ET)的表达,维持正常血压,避免内皮细胞功能损伤加重;具有抗氧化性,降低氧化应激反应,抑制炎症反应,减轻血管内皮的损伤。

参考文献

[1] 刘姿,罗彩月. 妊娠期高血压疾病发病的相关影响因素分

析[J]. 中国妇幼保健,2015,30(32):5548-5550.

- [2] 车晓宁,阮彩莲. 不同级别高血压患者胰岛素抵抗、血脂联素水平的相关性[J]. 中国老年学杂志,2016,36(3):711-712.
- [3] 胡丽华,黄晓,蔡华秀,等. 江西省城乡居民高血压患病现状调查及影响因素分析[J]. 中华高血压杂志,2017,25(2):169-175.
- [4] 李正欢,张晓云. 高血压动物模型应用概况与研究进展[J]. 中华高血压杂志,2017,25(8):727-732.
- [5] 魏淑琴,樊金焱,刘玉玲,等. 青岛市正常高值血压及高血压人群现况和全身血管损伤情况[J]. 中国老年学杂志,2017,37(16):4108-4110.
- [6] 栗源,可燕,蒋嘉焯,等. 天麻钩藤饮对自发性高血压大鼠血管功能及肾脏蛋白表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2015,35(4):481-487.
- [7] LEMKENS P, SPIJKERS L J, MEENS M J, et al. Dual NEP/ECE inhibition improves endothelial function in mesenteric resistance arteries of 32-week-old SHR[J]. Hypert Res,2017,40(8):738-745.
- [8] CHIBIREVA M D, AFLYATUMOVA G N, MATVEVA V, et al. Nitrogen oxide, endothelin-1, and serotonin in the blood of immature spontaneously hypertensive rats[J]. Bull Exp Biol Med,2017,162(3):310-312.
- [9] 赵钊好,王斌. 血管相关疾病中缝隙连接的研究进展[J]. 医学信息,2017,30(11):12-14.
- [10] 阮承超,高平进. 免疫与炎症参与高血压发生发展的机制探讨[J]. 中华高血压杂志,2017,25(4):319-321.
- [11] 范沪韵,张慧敏,杨丽睿,等. 拉西地平分散片与苯磺酸氨氯地平治疗老年轻、中度原发性高血压的对比研究[J]. 中国循环杂志,2017,32(z1):215.
- [12] 潘伟健,郭颖秀,姚达安. 拉西地平与硝苯地平治疗高血压的疗效对比观察[J]. 北方药学,2017,14(8):51-52.
- [13] 肖艳,陈明. 血管内皮功能检测[J]. 中华高血压杂志,2016,24(9):883-887.
- [14] 周锐. 高血压患者血清肝细胞生长因子的表达及与血管内皮功能的关系[J]. 中国老年学杂志,2017,37(9):2181-2182.
- [15] 马少雯,柳俊,梁润和,等. 药物治疗对高血压及高血压并发冠心病患者肱动脉内皮依赖性舒张功能的影响[J]. 岭南心血管病杂志,2017,23(2):197-200,214.
- [16] 牛俊红,张静,周永安. 间隙连接蛋白 40 基因多态性与原发性高血压病的相关性研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2014,12(5):548-550.
- [17] LI X, DAI Y N, YAN S J, et al. Resveratrol lowers blood pressure in spontaneously hypertensive rats via calcium-dependent endothelial NO production[J]. Clin Exp Hypertens,2016,38(3):287-293.

(收稿日期:2018-10-21 修回日期:2018-12-11)