

前胡丙素对自发性高血压大鼠心肌受磷蛋白表达及磷酸化水平的影响

孙黎明¹,汪文杰²,陈开祥¹,周哲¹,王怡练¹

(¹连云港市第二人民医院暨蚌埠医学院附属连云港医院心血管内科,江苏 连云港 222006;²皖南医学院附属铜陵市人民医院重症医学科,安徽 铜陵 244000)

[摘要] 目的:探讨前胡丙素对自发性高血压大鼠(SHR)心肌重构的影响及可能机制。方法:SHR 20只,完全随机分为药物组[前胡丙素 20 mg/(kg·d)灌胃, $n = 10$],对照组($n = 10$),另设SD大鼠10只为正常组,干预8周,计算心脏质量指数及左室质量指数,光镜观察左心室心肌细胞形态和结构的变化,透射电镜观察心肌细胞超微结构及线粒体损伤情况,然后取左心室心肌制备匀浆,提取RNA,用半定量RT-PCR法测定受磷蛋白的基因表达水平,用液体闪烁计数法测定受磷蛋白的磷酸化水平。结果:与对照组比较,药物组用前胡丙素治疗8周后,心脏及左室质量指数明显下降($P < 0.05$),SHR心肌肥厚等病理改变明显改善,左心室心肌受磷蛋白mRNA表达上调($P < 0.05$),心肌受磷蛋白磷酸化水平增加($P < 0.05$),差异具有统计学意义。结论:前胡丙素有改善心肌重构作用,可能是通过上调SHR心肌肌浆网受磷蛋白表达及磷酸化水平而实现的。

[关键词] 前胡丙素;自发性高血压大鼠;受磷蛋白;磷酸化

[中图分类号] R544.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)04-467-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130409

Effects of praeruptorin C on the expression of phospholamban and its phosphorylation level in spontaneously hypertensive rats

Sun Liming¹, Wang Wenjie², Chen Kaixiang¹, Zhou Zhe¹, Wang Yilian¹

(¹Department of Cardiovascular Medicine, Second People's Hospital of Lianyungang City, Lianyungang 222006;

²Intensive Care Unit, People's Hospital of Tongling City Affiliated to Wannan Medical College, Tongling 244000, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the impact and possible mechanism of praeruptorin C on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats (SHR) and its possible mechanisms. **Methods:** Totally 20 SHR were randomly divided into the praeruptorin C group [praeruptorin C 20 mg/(kg·d) intragastric administrated, $n = 10$] and the untreated control group ($n = 10$), with 10 age matched Sprague Dawley rats as normal group. The rats of each group were intervened for 8 weeks. We calculated the heart quality mass index (HMI) and left ventricular mass index (LVMI). We observed the morphological and structural changes of cardiomyocytes with optical microscope, and then the injuries of cell ultrastructure and mitochondria with transmission electron microscope. Then, we made homogenate and extracted RNA taken from heart tissue. The gene expression levels of phospholamban were determined by the method of semiquantitative RT-PCR. The phosphorylation of PLB was counted by liquid scintillation. **Results:** Compared with the SHR control group, the LVMI and HMI of SHR treated with praeruptorin C for 8 weeks were decreased ($P < 0.05$), the cardiac hypertrophy were reversed, the levels of PLB mRNA expression and the phosphorylation of PLB of the rats in the praeruptorin C group were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** Praeruptorin C had a certain effect on reversing the cardiac hypertrophy. The possible mechanisms might be upregulating the gene expression of sarcoplasmic reticulum phospholamban and increasing the phosphorylation level.

[Key words] praeruptorin C; spontaneously hypertensive rats; phospholamban; phosphorylation

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 467-470]

[基金项目] 连云港市重点人才课题(Zc229)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: slmingzz@163.com

高血压病是危害人类健康的重要疾病,随着病情的发展可导致心、脑、肾等靶器官的损害,其中心脏重构是高血压引起的心脏结构和功能改变,主要

表现为左心室肥厚(LVH),LVH 是心血管疾病的独立危险因素。因此,降压药物在降压的同时如能逆转 LVH,保护靶器官被认为是高血压治疗的理想药物^[1]。中药前胡丙素有良好的降压作用,且降压平稳、不良反应小,但其对心室重构的影响及机制报道较少^[2]。本研究通过测定自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats,SHR)前胡丙素治疗前后心肌肌浆网中受磷蛋白基因表达以及其磷酸化水平的变化,探讨前胡丙素对 SHR 心室重构的影响及其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物

选择健康成年 SHR 20 只,SPF 级,雄性,12 周,体重 250~300 g,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);健康成年 Sprague Dawley (SD) 大鼠 10 只,SPF 级,雄性,12 周,体重 200~300 g,由扬州大学实验动物中心提供(合格证:2006924)。

1.1.2 药品与试剂

前胡丙素粉针剂(由海灿生物科技有限公司提供),4℃避光保存,临用前以聚乙二醇 400 配成 2% 浓度。RT-PCR 试剂盒由美国 Fermentas 公司提供, $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP 由美国 Amersham 公司提供,蛋白质预染 Marker 由美国 Fermentas 公司提供。其余均为市售国产分析纯级。

PCR 扩增仪由德国 Biometra 公司生产,核酸蛋白分析仪由美国 Nanodrop 公司生产,液体闪烁计数器由美国 BECKMAN 公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组与处理

随机将 20 只 SHR 分为药物组($n = 10$)和对照组($n = 10$),将 SD 大鼠 10 只设为正常组。药物组给予前胡丙素 20 mg/(kg·d)灌胃共 8 周,对照组及正常组分别给予每天同等容积的聚乙二醇 400 灌胃共 8 周。

1.2.2 运用光镜及透射电镜观察心肌结构改变

各组动物处理 8 周后锤击头部处死大鼠,即刻取出心脏,用预冷生理盐水液充分冲洗,并用滤纸吸干后电子天平称全心重量(HW);剪去心房组织,剔除右心室,称取左心室(不包括室间隔)重量(LVW)计算心脏质量指数(HMI)及左室质量指数(LVMI)。

每组随机选 3 个标本,取左心室中部心肌予 HE 染色后观察心肌细胞形态和结构的变化,并取

左心室中部心肌常规制样,运用透射电镜观察心肌细胞超微结构及线粒体损伤情况。

1.2.3 半定量 RT-PCR 法测定受磷蛋白的基因表达

取心肌制备匀浆,提取 RNA,用紫外分光光度计检测 RNA 的量和纯度,逆转录合成 cDNA,每个标本分别取 cDNA 进行目标基因与内参照基因 β -actin 的 PCR 反应,并同步扩增。然后进行 PCR 产物的检测和分析,用目的基因与内参照的 PCR 产物条带灰度之比反映目的基因相对表达水平。

1.2.4 液体闪烁计数法测定受磷蛋白的磷酸化水平

将心肌组织制作成匀浆,提取细胞胞质蛋白,加入 $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP 开始启动磷酸化反应,冲洗滤膜终止反应。用无水乙醇洗膜,置于以甲苯为溶剂的闪烁液中,用 BECKMAN 液体闪烁计数器测定 ^{32}P 放射活性及 ^{32}P 标记的磷酸掺入量。可获得样品的每分钟计数(cpm),根据 cpm 计算受磷蛋白磷酸化活性。

1.3 统计学方法

应用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处理。数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料采用单因素方差分析比较组间差异,组间两两比较采用 SNK- q 检验。以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 前胡丙素对大鼠心脏质量指数的影响

对照组 LVMI、HMI 较正常组明显升高;前胡丙素干预 8 周后,药物组 LVMI、HMI 较对照组明显下降(表 1)。

表 1 前胡丙素对大鼠心脏质量指数的影响

Table 1 Effects of praeruptorin C on HMI in SHR (mg/g, $\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	LVMI	HMI
药物组	2.11 \pm 0.30 [△]	3.17 \pm 0.17 [△]
对照组	2.63 \pm 0.18*	3.40 \pm 0.17*
正常组	1.95 \pm 0.18	2.45 \pm 0.24

与正常组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,[△] $P < 0.05$ 。

2.2 前胡丙素对大鼠心肌病理结构的影响

光镜观察显示:对照组心肌细胞较正常组大鼠明显肥大、排列紊乱。前胡丙素治疗 8 周后,药物组心肌细胞排列较规整,心肌细胞肥大明显减轻,细胞核大小均一,胞浆染色较均匀(图 1)。透射电镜显示:对照组的部 分心肌细胞线粒体明显肿胀,部分肌纤维断裂溶解,内有大小不等的空泡区形成。前胡丙素治疗 8 周后药物组心肌细胞肌丝排列紊乱现象明显减轻,线粒体破坏的程度、间质纤维化明显改善,心肌细胞核膜完整,横纹可见(图 2)。

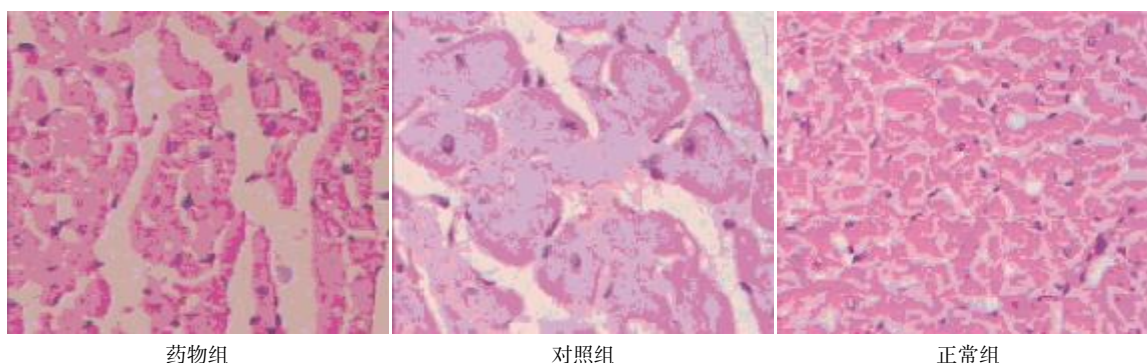


图 1 大鼠左室肌细胞病理结构光镜观察(HE,×100)

Figure 1 The morphological changes of left ventricular cardiomyocytes observed by optical microscope (HE,×100)

2.3 大鼠心肌中受磷蛋白 mRNA 的表达水平

实时定量 RT-PCR 检测受磷蛋白的 mRNA 表达水平,与正常组相比,对照组受磷蛋白 mRNA 表

达下降 15.2%,前胡丙素组治疗 8 周后,与正常组比较,药物组受磷蛋白 mRNA 表达升高 15.7%,与对照组比,升高 28.5%($P < 0.05$,图 3)。

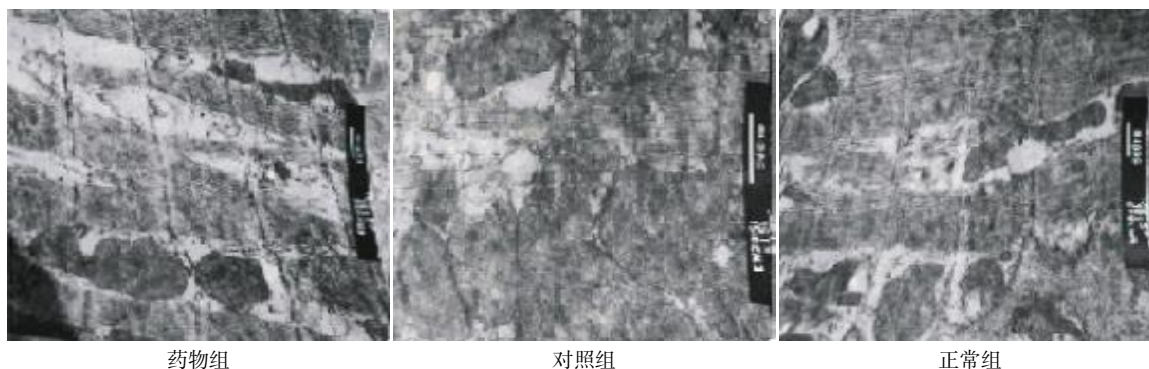


图 2 大鼠左室肌细胞病理结构透射电镜观察(×1 500)

Figure 2 The ultrastructure of left ventricular cardiomyocytes observed by transmission electron microscope(×1 500)

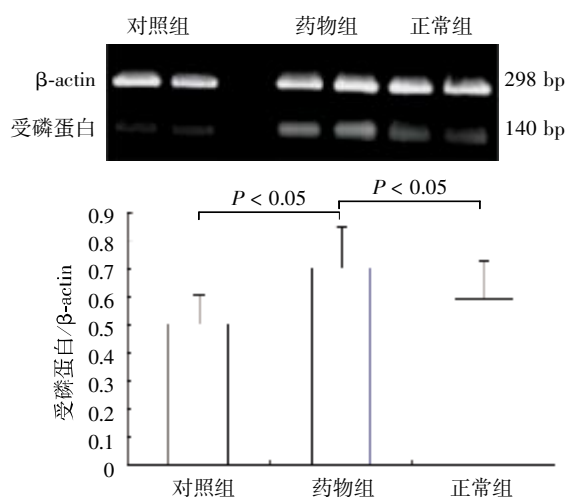


图 3 前胡丙素治疗对大鼠心肌受磷蛋白蛋白表达的影响
Figure 3 Effects of praeruptorin C on expression of phospholamban in SHR

2.4 3 组大鼠心肌受磷蛋白磷酸化水平的比较

前胡丙素治疗 8 周后, 药物组心肌磷酸化受磷

蛋白表达的计数率及其与参照物蛋白计数率的比值明显高于对照组($P < 0.05$),表明前胡丙素能够增加 SHR 心肌受磷蛋白磷酸化水平(表 2)。

3 讨论

高血压主要危害在于其对重要脏器靶器官的损害,心脏重构是长期高血压的必然结果,左室肥厚是心脏重构的重要表现。预防和逆转高血压患者的左室肥厚,保护靶器官,对于其心血管疾病的防治具有重要意义。血压升高是引起左室肥厚的重要因

表 2 前胡丙素对大鼠心肌中受磷蛋白磷酸化水平的影响
Table 2 Effects of praeruptorin C on the phosphorylation of phospholamban in SHR (n=10, $\bar{x} \pm s$)

级别	每分钟计数	计数率比值
药物组	1 516 ± 116* [△]	4.32 ± 0.32* [△]
对照组	1 434 ± 97	2.07 ± 0.14
正常组	1 259 ± 140	1.35 ± 0.16

与正常组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较,[△] $P < 0.05$ 。

素,但并不是惟一原因,更不是必然因果关系,除血流动力学机制外,还有其他因素参与。尽管许多学者在高血压引起心脏重构的研究方面做了大量工作,但是到目前为止高血压心脏重构的发生机制、早期诊断及治疗措施仍不太明了^[3]。

高血压的治疗是长期的过程,使用中药干预高血压病的优势在于降压缓和、平稳,而且没有明显的不良反应。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,对机体具有多种生理和药理作用。国内外一些研究提示前胡丙素不仅有良好的降压作用,而且可以保持心肌细胞内钙离子的稳定,拮抗心肌细胞内的钙超载,从而保护心脏,减少心肌损伤,改善心脏收缩与舒张功能^[4]。据文献报道^[5]:长期使用前胡丙素可能通过增加血管内皮一氧化氮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。本实验以自发性高血压大鼠为研究对象,通过前胡丙素进行药物干预,观察心肌肥大及其病理改变,比较受磷蛋白的表达及其磷酸化水平,从分子水平探讨前胡丙素治疗高血压及改善心肌重构的可能机制,为临床应用提供理论依据。本研究结果表明,前胡丙素治疗 8 周后,前胡丙素治疗组较 SHR 对照组 LVMI、HMI 明显下降($P < 0.05$),而且通过光镜和透射电镜观察前胡丙素治疗后 SHR 心肌肥厚等病理改变明显改善,提示前胡丙素不仅降压还能有效改善 SHR 心肌重构,减轻左心室肥厚,与文献报道^[6]相符。

心肌细胞胞浆 Ca^{2+} 是心肌细胞兴奋—收缩偶联的关键因素,胞浆 Ca^{2+} 浓度的调控对心肌生理活动极为重要,研究表明心肌细胞肌浆网 Ca^{2+} 的调控蛋白肌质/内质网钙 ATP 酶 (SERCA2a) 是影响胞浆 Ca^{2+} 浓度的主要因素,而其 SERCA2a 活性又受肌浆网受磷蛋白的调控,因此受磷蛋白对调控细胞内 Ca^{2+} 浓度有着极其重要的作用。肌浆网受磷蛋白是心肌肌浆网膜上存在的一种低分子量蛋白,去磷酸化的受磷蛋白对 SERCA2a 活性起抑制作用,在接受磷酸基团后即磷酸化可促进 Ca^{2+} 的转运,维持细胞内钙的平衡^[7],因此受磷蛋白及其磷酸化是维护心肌细胞功能极为重要的因素。有文献研究结果表明:前胡丙素预处理不仅可以上调缺血心肌细胞受磷蛋白基因的表达,而且可以明显增加受磷蛋白的磷酸化水平,从而发挥对缺氧再灌注损伤心肌细胞的保护作用,其机制可能是前胡丙素作用于心肌细胞膜

及肌浆网钙泵,通过减少细胞 Ca^{2+} 内流,增加肌浆网对 Ca^{2+} 的摄取,抑制心肌细胞的钙超载,而发挥保护作用^[8]。本研究结果提示:SHR 对照组心脏肌浆网受磷蛋白基因表达及其磷酸化水平较正常 SD 大鼠明显下调($P < 0.05$),前胡丙素干预 8 周后,前胡丙素治疗组较 SHR 对照组心脏肌浆网受磷蛋白基因表达及其磷酸化水平上调($P < 0.05$),同时逆转了 SHR 左心室肥厚,表明传统中药前胡丙素在降压的同时,可能通过上调心肌受磷蛋白的基因表达及其磷酸化水平而对 Ca^{2+} 浓度的调控蛋白 SERCA2a 发挥着作用,维持细胞内 Ca^{2+} 的稳定,阻断血管紧张素对心肌蛋白的刺激作用,减少心肌细胞的肥大和间质增生,从而改善心肌重构,维护心脏正常的收缩舒张功能^[4-5]。

当然,高血压的发生发展、心室重构的发生机制是复杂的、多因素的,前胡丙素作为抗高血压药物保护靶器官也可能是通过多种途径共同作用的结果,因此进行深入研究,对探讨其降压和改善心肌重构的作用机制及衡量其临床应用价值具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Aksoy I, Deinum J. Does masked hypertension exist in healthy volunteers and apparently well-controlled hypertensive patients[J]. *Neth J Med*, 2006, 64: 78-83
- [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] Zhang WH, Fu SB. Involvement of calcium-sensing receptor in ischemia/reperfusion-induced apoptosis in rat cardiomyocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 347(4): 872
- [4] 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
- [5] 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 含量的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2001, 15(2): 141-144
- [6] 汪文杰, 孙黎明. 前胡丙素对自发性高血压大鼠心室重构的影响[J]. *中国老年医学杂志*, 2011, 19(31): 3734-3735
- [7] Tupling AR. The decay phase of Ca^{2+} transients in skeletal muscle: regulation and physiology [J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2009, 34(3): 373-376
- [8] 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] 2012-09-25