

牛磺酸对血管紧张素 II 诱导的高血压的保护作用

沈烨娇, 陆 艳, 孙 伟, 孔祥清*

南京医科大学第一附属医院心血管内科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探究牛磺酸对血管紧张素 II 诱导的高血压是否有保护作用。方法:给小鼠皮下埋入血管紧张素 II 微量泵诱导小鼠高血压模型,通过小鼠血压测定、主动脉 HE 染色、Masson 染色等方法检测牛磺酸对高血压及其导致的血管重构作用;PCR 探究牛磺酸对血管纤维化的作用;Western blot 研究牛磺酸对血管紧张素 II 诱导的高血压性血管重构的分子机制的影响。结果:牛磺酸抑制血管紧张素 II 诱导的高血压及由此产生的血管重构,抑制 mRNA 水平纤维化标志物的表达,抑制血管紧张素 II 作用下 MAPK 通路的激活。结论:牛磺酸可能通过抑制 MAPK 通路的激活对血管紧张素 II 引起的高血压及由此产生的血管重构发挥保护作用。

[关键词] 牛磺酸;高血压;血管重构;血管紧张素 II

[中图分类号] R541.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)08-1017-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180801

Taurine protects against angiotensin II -induced hypertension.

Shen Yejiào, Lu Yan, Sun Wei, Kong Xiangqing*

Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To investigate if taurine has the protective effect on angiotensin II - induced hypertension. **Methods:** Angiotensin II osmotic mini-pumps were implanted to mice subcutaneously to induce hypertension. Caudal arterial pressure was tested, and Hematoxylin - eosin staining and Masson staining were performed to determine the effect of taurine on hypertension and hypertension induced vascular remodelling; the mRNA levels of fibrotic markers were determined by RT-PCR; Western blot was performed to investigate the effect of taurine on molecular mechanisms of angiotensin II - induced hypertension and hypertension induced vascular remodelling. **Results:** Taurine inhibited angiotensin II -induced hypertension and consequent vascular remodelling, reduced the mRNA levels of fibrotic markers, and inhibited the MAPK pathway during the process. **Conclusion:** Taurine could inhibit MAPK pathway to attenuate angiotensin II -induced hypertension and consequent vascular remodelling.

[Key words] taurine; hypertension; vascular remodelling; angiotensin II

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08):1017-1021, 1076]

高血压病是最常见的慢性心血管疾病,影响重要脏器如心、脑、肾的结构与功能,最终导致这些器官的功能衰竭。在高血压病及其并发症的发生发展过程中,血管重构伴随高血压病的始终,与其互为因果,形成一种恶性循环,亦与高血压的靶器官损害密切相关。目前普遍接受的血管重构概念是,即在高血压病程中与之伴随的血管结构和功能改

变^[1]。主要表现为血管壁增厚、壁腔比值增高、外周小动脉数量减少。早期干预血管重构对于阻止高血压血管损伤进展具有重要意义。

血管重塑是一个动态过程,包括血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)的增殖、迁移、凋亡,细胞外基质合成、降解、重排等一系列过程。VSMC病理性增殖是高血压病发生发展的主要病理生理过程之一,而体内多种生物活性物质通过各种信号传导途径参与了 VSMC 的增殖过程^[2]。抑制 VSMC 增殖是防治高血压病等血管重塑疾病的重要途径之一。

[基金项目] 国家自然科学基金(81570247, 81627802);江苏省自然科学基金(BK20141024)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: kongxq@njmu.edu.cn

牛磺酸(taurine)是机体一种内源性的抗氧化剂,具有多种生理功能如抗炎、抗氧化、心血管保护等^[3-5]。有报道发现牛磺酸具有抑制内皮凋亡的作用^[6],而其对高血压病理环境下的血管功能以及平滑肌细胞的作用目前尚不知晓,本研究将通过血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ, AngⅡ)造模诱导的小鼠高血压模型,探讨牛磺酸对其影响以及其潜在的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级雄性实验小鼠遗传背景为C57B/L,25 g左右,8周龄,购于南京医科大学动物实验中心。动物实验通过南京医科大学动物实验中心的伦理批准。

1.2 方法

1.2.1 AngⅡ诱导小鼠高血压模型的构建

通过给小鼠颈背部皮下埋入微型渗透泵(Model 2002, Alzet Osmotic Pumps公司,美国),按1 μg/(kg·min)持续泵入AngⅡ 2周,诱导小鼠高血压模型。牛磺酸粉末(T0625, Sigma-Aldrich公司,美国)用生理盐水溶解,按500 mg/(kg·d)给予小鼠腹腔注射。

1.2.2 小鼠血压测量

根据容量压力记录法(VPR),使用美国肯特动物无创血压测量系统Coda无创测量小鼠尾动脉血压。自高血压造模开始,每3 d测1次血压监测其变化。

1.2.3 血管HE染色

2周造模结束后将小鼠处死,主动脉血管取材放入福尔马林固定液中固定,固定成功后置入包埋盒中流水冲洗30 min(去除固定液),用低至高浓度酒精脱水,再将组织块置于二甲苯中透明,浸蜡包埋。将包埋好的蜡块固定于切片机上,切成5~8 μm厚的薄片,最后用二甲苯脱蜡,酒精至水,苏木精水溶液、酒精伊红染色。

1.2.4 血管马松染色

小鼠处死后主动脉血管取材固定,石蜡包埋后切片,常规脱蜡至水。用配制好的Weigert铁苏木素染色5~10 min。酸性乙醇分化液分化,水洗。再用Masson蓝化液返蓝,水洗。蒸馏水洗1 min。丽春红品红染色液染色5~10 min。用配好的弱酸工作液洗1 min。磷钼酸溶液洗1~2 min。弱酸工作液洗1 min。直接入苯胺蓝染色液中染色1~2 min。弱酸工作液洗1 min。95%乙醇快速脱水。无水乙醇脱水3次,每次5~10 s。二甲苯透明3次,每次1~2 min。最后用中性树胶封固。

1.2.5 Western blot

小鼠主动脉血管组织蛋白按照Cytoplasmic Extraction Reagents(Thermo公司,美国)试剂盒说明书提取。组织裂解产物使用10%~15%的SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移到PVDF膜(Roche公司,瑞士)上,使用5%BSA溶液封闭,目标蛋白孵育一抗,后孵育相对应HRP耦联二抗(1:5 000稀释)。使用的一抗如下:GAPDH抗体(#5174),p-ERK抗体(#4370)、p-smad2/3抗体(#8828)、p-p38抗体(#4511)(Cell Signaling Technology公司,美国)。二抗为HRP标记的羊抗鼠二抗、羊抗兔二抗(Cell Signaling Technology公司,美国)。使用显影液(SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, Thermo公司,美国)反应1 min后,在ChemiDoc MP成像系统(Bio-Rad公司,美国)下曝光。使用Image Lab™软件对条带进行灰度分析。

1.2.6 实时荧光定量PCR

小鼠主动脉血管组织总RNA按照RNeasy RNA isolation kit(Qiagen公司,美国)提取,按照Prime-Script™ RT reagent Kit(TaKaRa公司,日本)进行逆转录。使用Prism 7900(ABI公司,美国)系统进行实时荧光定量PCR。用于实时反应检测的引物序列如下: GAPDH: 上游: 5' - AGGTCGGTGTGAACG-GATTTG-3'; 下游: 5' - TGTAGACCATGTAGTTGAG-GTCA-3'; TGF-β1: 上游: 5' - CTCCCGTGGCTTCTAG-TGC-3'; 下游: 5' - GCCTTAGTTTGGACAGGATCTG-3'; CTGF: 上游: 5' - GGGCCTCTTCTGCGATTTG-3'; 下游: 5' - ATCCAGGCAAGTGCATTGGTA-3'; Collagen I (Col1): 上游: 5' - GCTCCTCTTAGGGGCCACT-3'; 下游: 5' - CCACGTCTCACCATTGGGG-3'; Collagen III (Col3): 上游: 5' - GGGAAATGTCCTCTGCGATGAC-3'; 下游: 5' - GAAGGG-GATCTCGGGGTTG-3'(Invitrogen公司,美国)。

1.3 统计学方法

测量数据均表示为平均值±标准平均误差(SEM)。使用GraphPad Prism 6.0软件统计分析数据。两组数值采用T检验(Student's *t*-test)分析比较,四组数值采用单向方差分析(One-Way ANOVA)中的Bonferroni多重比较检验;*P*≤0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牛磺酸降低了AngⅡ诱导的小鼠高血压

选取8周雄性C57B/L小鼠通过皮下埋入AngⅡ

微量泵 14 d 的方法诱导小鼠高血压模型,同时采用 500 mg/(kg·d) 的剂量^[7]腹腔注射牛磺酸 14 d。每 3 d 测量 1 次小鼠尾动脉收缩压(systolic blood pressure, SBP)和舒张压(diastolic blood pressure, DBP),结果如图 1 所示,Ang II 造模组其血压在第 3 天时已显著增高,牛磺酸给药组在第 6 天时血压出现下降趋势,在第 12 天时与血管紧张素 II 造模组相比,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 牛磺酸改善了 Ang II 诱导的高血压性血管中膜肥厚

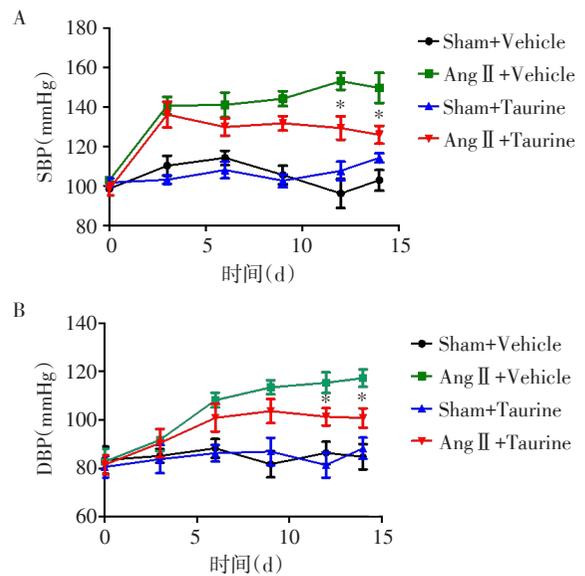
取小鼠胸主动脉段组织通过 HE 染色观察血管肥厚程度。血管肥厚主要表现为血管环面积增大,血管中膜厚度增厚,中膜厚度与管腔比增大。如图 2A 所示 Ang II 诱导后小鼠主动脉环面积增大,血管中膜厚度增加,中膜厚度与管腔比增大。牛磺酸给药组显著改善了主动脉血管环面积的增大,中膜厚度的增加以及中膜厚度与管腔比的增大。图 2B~D 为对这些指标的统计结果。

2.3 牛磺酸减轻血管胶原的沉积

取小鼠胸主动脉组织进行 Masson 染色,如图 3A 所示 Ang II + Vehicle 造模组胶原含量与 Sham + Vehicle 组相比显著增加,而 Ang II + Taurine 组其被染成蓝色的胶原成分与 Ang II + Vehicle 相比明显减少,胶原沉积情况得到改善,说明牛磺酸改善了 Ang II 诱导的高血压性血管重构。图 3B 为对胶原沉积的统计。

2.4 牛磺酸抑制纤维化相关指标的 mRNA 水平

提取小鼠胸主动脉组织 RNA,通过 real-time



A: 收缩压测量; B: 舒张压测量。与 Ang II + Vehicle 相比, * $P < 0.05$ 。

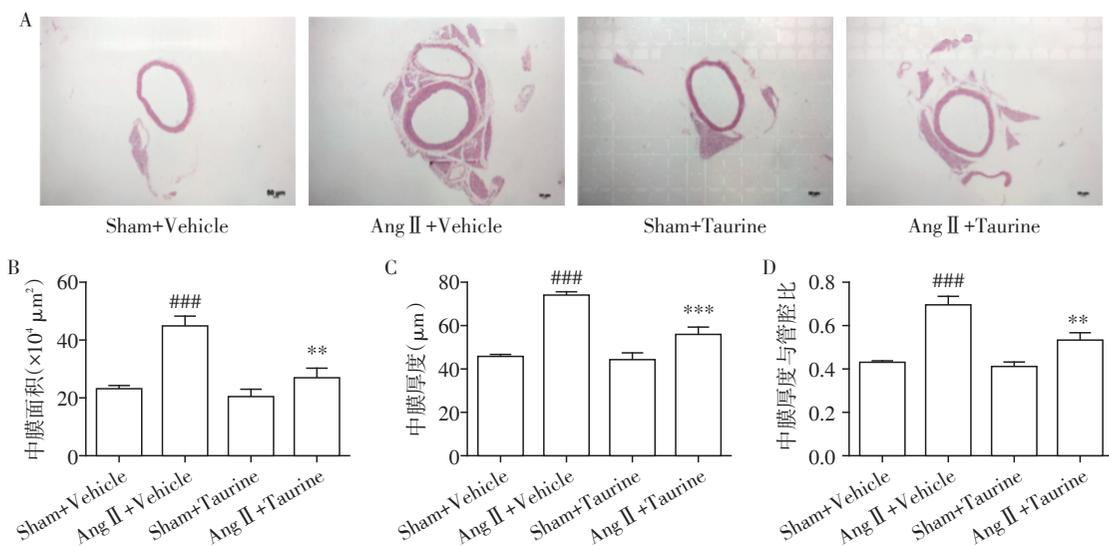
图 1 牛磺酸降低了 Ang II 诱导的血压增高

Figure 1 Taurine suppresses Ang II -induced hypertension

PCR 的方法检测纤维化相关指标的表达水平。如图 4 所示 Ang II 显著诱导了纤维化相关指标 TGF- β 1、CTGF、Col1 和 Col3 的 mRNA 表达,牛磺酸治疗组其纤维化相关指标均明显下降,改善了 Ang II 所引起的血管纤维化。

2.5 牛磺酸治疗可以抑制 MAPK 通路的激活

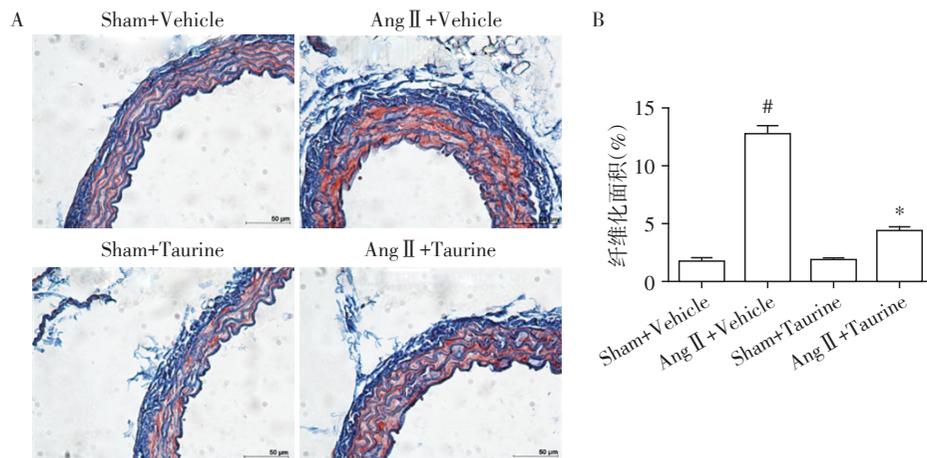
大量研究报道,Ang II 可通过蛋白激酶 C-丝裂原激活蛋白激酶(PKC-MAPK)级联反应介导 VSMC 增殖和分化,还可以通过活性氧-丝裂原激活蛋白激酶



A: 胸主动脉 HE 染色; B: 血管中膜面积统计; C: 血管厚度统计; D: 血管中膜厚度管腔比。与 Sham+Vehicle 组相比, ### $P < 0.001$; 与 Ang II + Vehicle 相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 2 牛磺酸改善高血压性血管肥厚

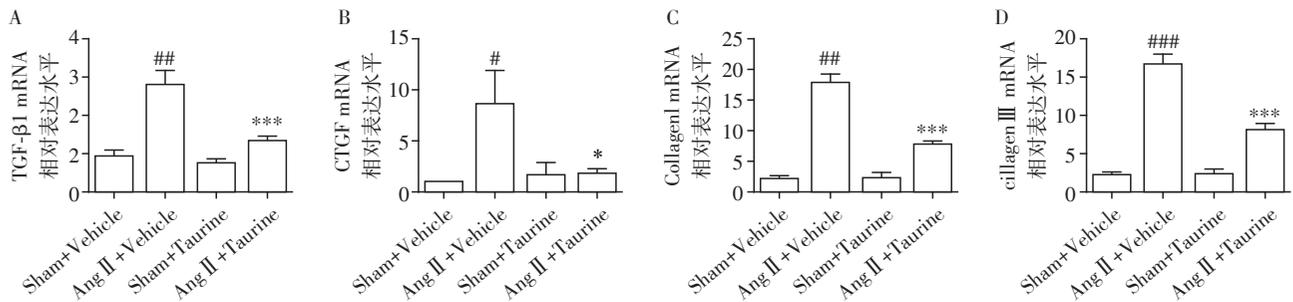
Figure 2 Taurine improves hypertension induced vascular hypertrophy



A:小鼠胸主动脉masson染色;B:对纤维化面积的统计。与Sham+Vehicle组相比,[#] $P < 0.001$;与Ang II+Vehicle相比,^{*} $P < 0.001$ 。

图3 牛磺酸改善高血压性血管纤维化

Figure 3 Taurine inhibits hypertension-induced vascular fibrosis



A: TGF-β1 mRNA 表达水平;B: CTGF mRNA 表达水平;C: Col1 mRNA 表达水平;D: Col3 mRNA 表达水平。与Sham+Vehicle组相比,^{*} $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$,^{###} $P < 0.001$;与Ang II+Vehicle相比,^{*} $P < 0.05$,^{***} $P < 0.001$ 。

图4 牛磺酸降低纤维化相关指标表达

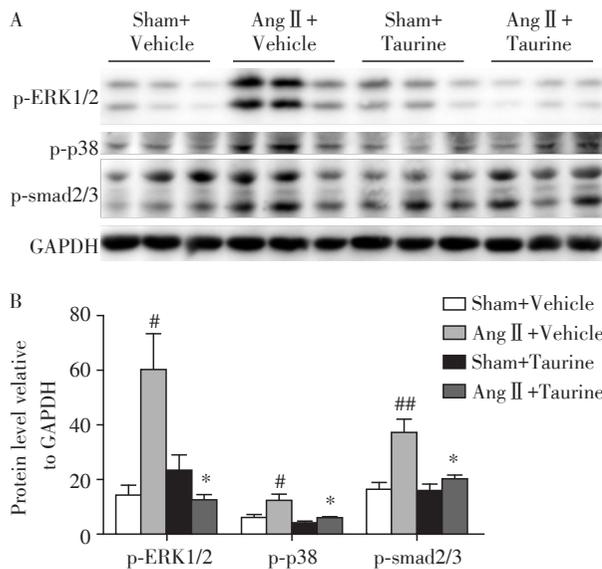
Figure 4 Taurine reduces the expression of fibrotic markers

酶(ROS/MAPK)系统促进 VSMC 增殖^[8]。上述机制中,MAPK 是核心通路之一,MAPK 家族是细胞内信号蛋白网络中的重要一员,因此我们收取小鼠胸主动脉组织进行 Western blot 实验。如图 5A 所示 Ang II 显著激活了 ERK1/2 以及 p38 的磷酸化,牛磺酸给药组抑制了这种激活作用,降低了 p-ERK1/2 以及 p-p38 的表达水平。同时检测了纤维化通路中的关键分子 smad2/3 的磷酸化程度,牛磺酸给药组同样抑制了 Ang II 刺激对纤维化通路的激活作用。图 5B 为对 Western blot 的统计结果。

3 讨论

随着社会经济的发展和人口老龄化,高血压患病率逐年增高。长期高血压引起的心、脑、肾等靶器官的损害,是导致各种心血管并发症的重要因素。而高血压的发生发展及靶器官的损害都与血管重构密不可分。高血压造成血管重构的可能机

制有多种,有因为血压升高对动脉壁造成的高牵引力引起的内皮细胞异常,从而使内皮分泌的一氧化氮减少,内皮素分泌增多引起的血管收缩血管重构。有因为体内氧化应激失衡,从而导致氧自由基产生过多,不断聚集引起组织损伤,最终影响血管的结构与功能^[9]。此外,高血压状态下过度激活的肾素血管紧张素系统也参与了血管重构^[10]。RAS 系统包括两个轴,即血管紧张素转化酶受体轴(ACE-Ang II-AT1)和血管紧张素转化酶2受体轴(ACE2-Ang-(1-7)-Mas)。前者通过 Ang II 发挥血管收缩促增殖和促炎作用,后者通过 Ang-(1-7)拮抗 Ang II 的作用。Ang II 信号的级联传导 MAPK 通路为其下游的核心通路,MAPK 家族是细胞内信号蛋白网络中的重要组成部分,也是多种胞外信号向核内传递的共同途径^[11]。MAPK 信号转导通路遵循着保守的 3 级激酶级联传递模式:由细胞外刺激通过细胞膜上的受体激活 MAPK 激酶激酶(MAPK kinase kinase,



A: Western blot 检测 MAPK 通路激活情况; B: p-ERK1/2、p-p38、p-smad2/3 统计结果。与 Sham+Vehicle 组相比, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01; 与 Ang II+Vehicle 组相比, ^{*}*P* < 0.05。

图5 牛磺酸抑制 MAPK 通路的激活

Figure 5 Taurine inhibits the activation of MAPK pathway

MAPKKK),再由活化的 MAPKKK 激活 MAPK 激酶 (MAPK kinase, MAPKK),最后由 MAPKK 激活 MAPK,活化的 MAPK 可以转移至细胞核内,使其底物磷酸化,再作用于相应靶基因的上游启动元件,从而调控基因的转录速度及表达水平。在 MAPK 家族中,ERK1/2 是最经典的通路,而 Ang II 是 ERK1/2 磷酸化的敏感激活剂。p38MAPK 是丝裂原活化蛋白激酶家族中的重要成员之一,主要有 p38 α 、p38 β 1/2、p38 γ 和 p38 δ 四种亚型。

牛磺酸化学名为 β -氨基乙磺酸,是一种含硫的非蛋白氨基酸,在体内以游离状态存在,1827年首次从公牛胆汁中分离出来,故又名牛黄酸、牛胆酸、牛胆碱、牛胆素。牛磺酸在细胞中发挥多种功能,包括调节氧化应激、改善糖脂代谢、免疫调节、调节细胞质钙水平、抗炎、稳定细胞膜等^[12]。本研究采用 Ang II 微量泵导入法诱导小鼠高血压模型,同时给予牛磺酸治疗,结果提示牛磺酸可以有效降低鼠尾收缩压和舒张压,减轻血管肥大程度,改善血管纤维含量。通过 Real-time PCR 的方法检测纤维化指标的 mRNA 表达情况显示牛磺酸处理组显著降低了 TGF- β 1、CTGF、Col1 和 Col3 的 mRNA 表达,改善了纤维化水平。采用 Western blot 方法检测提示牛磺酸这一作用可能是通过抑制了 MAPK 通路的激活实现的。

ERK1/2 作为最经典的 MAPK 通路,各种生物活性因子刺激 VSMC 增殖的效应主要是由 ERK1/2 介导。ERK1/2 磷酸化激活后,进一步诱导下游靶点如 c-myc 等活化,从而促进 VSMC 增殖^[13]。同时,Ang II 与其受体 AT1R 结合能激活 p38 MAPK 通路,进一步活化 NF- κ B 等转录因子,调控炎症因子的表达,介导炎症反应,并促进 ROS 的表达,加重内皮损伤,进而引起血管内皮功能不全及心血管重构的发生^[14]。本实验发现牛磺酸可以抑制 Ang II 诱导的 ERK1/2 以及 p38 分子磷酸化,说明其极有可能通过以上机制,抑制了下游 c-myc、NF- κ B 等相关靶基因的活化,最终抑制了 VSMC 增殖以及相关炎症反应的发生发展,减轻了高血压诱导的血管重构等损伤。而研究表明,TGF- β 1/Smads 信号转导通路在高血压病等心血管疾病的发病过程中起重要作用。TGF- β 1 是已知最重要的致纤维化细胞因子之一,与其受体结合激活 Smad2、3 进入细胞核内,共同调节相关靶基因的转录,促进平滑肌细胞、成纤维细胞增生、肥大并刺激大量胶原纤维的产生从而促进血管纤维化^[15]。本实验发现牛磺酸能抑制 Ang II 诱导的 TGF- β 1 的 mRNA 表达,同时抑制了 Smad2/3 分子的磷酸化程度,说明其可能通过抑制 TGF- β 1/Smads 信号转导通路从而抑制了下游促纤维化靶基因的转录激活,最终抑制了成纤维细胞等的增生及胶原纤维的大量产生,保护了血管纤维化。高血压血管重构是一个复杂的多种机制互相影响的调控过程,牛磺酸的具体作用还有待进一步研究。本研究为临床发现高血压新的治疗思路提供了实验数据,为牛磺酸的临床运用提供了理论支持。

[参考文献]

- [1] Heagerty AM, Aslkaer C, Bund SJ, et al. Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodeling and growth[J]. Hypertension, 1993, 21(4): 391-397
- [2] Harvey A, Montezano AC, Lopes RA, et al. Vascular fibrosis in aging and hypertension: molecular mechanisms and clinical implications [J]. Can J Cardiol, 2016, 32(5): 659-668
- [3] Shimada K, Jong CJ, Takahashi K, et al. Role of ROS production and turnover in the antioxidant activity of taurine [J]. Adv Exp Med Biol, 2015, 803: 581-596
- [4] Abdel-Moneim AM, Al-Kahtani MA, El-Kersh MA, et al. Free radical-scavenging, anti-inflammatory/anti-fibrotic and hepatoprotective actions of taurine and silymarin against CCl4 induced rat liver damage [J]. PLoS One,

(下转第 1076 页)

- the organogenesis of the thyroid, lung, ventral forebrain, and pituitary [J]. *Genes & Development*, 1996, 10(1): 60-69
- [21] Minoo P, Hamdan H, Bu D, et al. TTF-1 regulates lung epithelial morphogenesis [J]. *Developmental Biology*, 1995, 172(2): 694-698
- [22] Kim JG, Son YJ, Yun CH, et al. Thyroid transcription factor-1 facilitates cerebrospinal fluid formation by regulating aquaporin-1 synthesis in the brain [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(20): 14923-14931
- [23] Herriges MJ, Tischfield DJ, Cui Z, et al. The Nkx2-1 gene duplex buffers Nkx2.1 expression to maintain lung development and homeostasis [J]. *Genes & Development*, 2017, 31(9): 889-903
- [24] Glasser SW, Witt TL, Senft AP, et al. Surfactant protein C-deficient mice are susceptible to respiratory syncytial virus infection [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2009, 297(1): L64-L72
- [25] Hou A, Fu J, Yang H, et al. Hyperoxia stimulates the trans-differentiation of type II alveolar epithelial cells in newborn rats [J]. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2015, 308(9): L861-L872
- [26] Ablimit A, Hasan B, Lu W, et al. Changes in water channel aquaporin 1 and aquaporin 5 in the small airways and the alveoli in a rat asthma model [J]. *Micron*, 2013, 45(1): 68-73
- [27] Vassiliou AG, Maniatis NA, Orfanos SE, et al. Induced expression and functional effects of aquaporin-1 in human leukocytes in sepsis [J]. *Critical Care*, 2013, 17(5): R199
- [28] Zhang H, Fang J, Wu Y, et al. Mesenchymal stem cells protect against neonatal rat hyperoxic lung injury [J]. *Expert opinion on biological therapy*, 2013, 13(6): 817-829
- [收稿日期] 2017-09-27

(上接第 1021 页)

- 2015, 10(12): e0144509
- [5] Shiohira S, Komatsu M, Okazaki M, et al. Effect of taurine on hemodiafiltration in patients with chronic heart failure [J]. *Ther Apher Dial*, 2016, 20(1): 20-26
- [6] Wu QD, Wang JH, Fennessy F, et al. Taurine prevents high-glucose-induced human vascular endothelial cell apoptosis [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(6 Pt 1): C1229-1238
- [7] 剑白, 漓肖, 永韩, 等. 牛磺酸对肝纤维化模型小鼠肝组织超氧化物歧化酶和丙二醛的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(27): 4379-4383
- [8] Burtenshaw D, Hakimjavadi R, Redmond EM, et al. Nox, reactive oxygen species and regulation of vascular cell fate [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2017, 6(4): 90
- [9] Nguyen Dinh Cat A, Montezano AC, Burger D, et al. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(10): 1110-1120
- [10] van Thiel BS, van der Pluijm I, Te RL, et al. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 763(Pt A): 3-14
- [11] Bluthgen N, Legewie S. Systems analysis of MAPK signal transduction [J]. *Essays Biochem*, 2008, 45: 95-107
- [12] Ashkani-Esfahani S, Zarifi F, Asgari Q, et al. Taurine improves the wound healing process in cutaneous leishmaniasis in mice model, based on stereological parameters [J]. *Adv Biomed Res*, 2014, 3: 204
- [13] Luo X, Liu J, Zhou H, et al. Apelin/APJ system: A critical regulator of vascular smooth muscle cell [J]. *J Cell Physiol*, 2017
- [14] Trovati M, Doronzo G, Barale C, et al. Leptin and vascular smooth muscle cells [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(4): 625-634
- [15] Kamato D, Burch ML, Piva TJ, et al. Transforming growth factor-beta signalling: role and consequences of Smad linker region phosphorylation [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(10): 2017-2024
- [收稿日期] 2017-12-27