文章编号:1000-5404(2006)03-0231-04

论著

幼年大鼠交感神经损伤后血管紧张素受体功能及表达的变化

史惠卿,何凤慈 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所药剂科,重庆 400042)

提 要: 目的 观察交感神经损毁对大鼠血管紧张素受体的功能与表达水平的影响。**方法** 6-羟多巴胺(6-hydroxydopamine, 6-OHDA)损毁新生雄性Wistar大鼠的交感神经末梢,11周后检测下列指标:①血管紧张素Ⅱ(angiotensin Ⅱ, AngⅡ)升血压和缩血管的作用,②心肌AngⅡ1型受体(angiotensin Ⅱ type 1 receptor, AT_1R)与[^{3}H]-AngⅡ的亲和力,③血管平滑肌AT_1R mRNA的表达水平。**结果** 幼年损毁大鼠交感神经,大鼠成年后AngⅡ引起的升血压和缩血管作用显著增强,血管平滑肌AT_1R mRNA表达水平升高,心肌AT_1R饱和曲线明显上升,受体数量(B_{max})增加,亲和指数(K_D)未发生明显变化。**结论** 幼年损毁大鼠交感神经,可使血管平滑肌AT_1R表达增强,进而导致AngⅡ引起的升高血压和收缩血管作用显著增强,这可能是幼年损毁交感神经后大鼠维持正常血压心率的重要原因之一。

关键词: 血管紧张素Ⅱ;AngⅡ1型受体;交感神经损毁
中图法分类号: R-332; R335; R544.102 **文献标识码**: A

Changes of function and expression level of angiotensin Ⅱ type 1 receptor after sympathectomy in juvenile rats

SHI Hui-qing, HE Feng-ci (Department of Pharmacy, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the effects of sympathectomy on the function and the expression level of angiotensin Ⅱ type 1 receptor (AT_1R). **Methods** Newborn male Wistar rats' sympathetic nerve was destroyed by 6-hydroxydopamine (6-OHDA), and then following parameters were observed after 11 weeks: pressor and vasoconstrictive effects of AngⅡ, the affinity of [^{3}H]-AngⅡ to AT_1R in myocardium, the level of mRNA expression of AT_1R in vessel smooth muscle. **Results** The pressor and vasoconstrictive effects induced by AngⅡ and the mRNA expression of AT_1R in vessel smooth muscle enhanced substantially in adult rats who had been performed sympathectomy at juvenile period. There was also an enhancement in B_{max} of AT_1R in myocardium of the rats performed with sympathectomy, while no change occurred in K_D. **Conclusion** In rats performed with sympathectomy, the expression level of AT_1R rises remarkably. The pressor and vasoconstrictive effects induced by AngⅡ enhance consequently. These might be the reasons that blood pressure and heart rate do not reduce after sympathectomy.

Key words: angiotensin Ⅱ; angiotensin Ⅱ type 1 receptor; sympathectomy

血压的调节是极为复杂的生理过程,在众多的神经体液调节机制中,交感神经系统与肾素-血管紧张素系统(RAS系统)发挥着重要作用,因而成为研究高血压发病机制及治疗方法的热门靶点,二者的相互作用不仅在维持正常生理功能的过程中发挥重要作用,其平衡失调在疾病发生的病理生理过程中亦具有重要意义。探讨RAS系统与交感神经系统之间的相互作用,对于进一步研究高血压的发病机制具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性新生Wistar大鼠及健康哺乳母鼠,由大坪医院野战外科研究所动物中心提供。从新生鼠中选出8~10只雄性大鼠为一窝,体质量4~6 g,配以第2或3产次的母鼠哺乳。

1.2 试剂

6-OHDA、酪胺、AngⅡ(Sigma公司),AngⅡ放射免疫分析药盒(北京福瑞生物工程公司),[^{3}H]-AngⅡ(中国原子能研究院),Tripure分离试剂盒(德国BM公司),AT_1R引物(350 bp,上游5′-CCA GCG TCA GTT TCA ACC-3′,下游5′-TAG GGC CTT CCA AAT AAG AGT A-3′,上海Songon)GAPDH引物(465

作者简介:史惠卿(1973-),女,山西省太原市人,硕士,主管药师,主要从事心血管药理方面的研究。电话:(028)86570439
通讯作者:何凤慈,电话:(023)68752181
收稿日期:2005-04-18;修回日期:2005-09-05

bp,上游5′-GCG CCT GGT CAC CAG GGC GGC TT-3′,下游5′-TTC CGA AGT GGT CGT GGA TGA CCT-3′,上海 Songon),逆转录 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司)。

1.3 化学性交感神经切断术(chemical sympathectomy)[1]

雄性新生大鼠随机分为对照组(V 组)和交感神经损毁组(OH 组),自出生第2天开始腹腔注射6-羟多巴胺(6-hydroxydopamine,6-OHDA) 100 mg·kg^{-1}·d^{-1},连续6 d。对照组腹腔注射等体积0.1%维生素 C(vitamin C,VitC)生理盐水。

1.4 酪胺反应实验考察交感神经损毁效果[1]

自右侧颈总动脉插管至升主动脉,通过压力感受器连接多导生理记录仪记录血压、心率,自左侧颈外静脉插管至上腔静脉,注入酪胺(150 μg/kg),记录酪胺注入前后收缩压和心率的变化。

1.5 AngⅡ引起的升血压作用[2]

血压和心率的测定方法同1.4,自左侧颈外静脉插管注入AngⅡ5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 nmol/kg,记录 AngⅡ注入前后收缩压和舒张压的变化。

1.6 AngⅡ引起的缩血管作用[3]

检测血管环初张力为2.0 g时对60 mmol/ L KCl 的收缩反应,记录收缩张力曲线,更换孵育血管的 PBS 液,将血管环初张力调整至2.0 g,平衡约20~30 min,向浴槽中累积加入 AngⅡ,使之浓度为1.0、3.2、10.0、32.0、100.0、320.0 nmol/L,1.0、3.2 μmol/L,记录张力变化曲线,测定 AngⅡ缩血管效应的剂量依赖关系;动脉环张力曲线经 Chart 软件处理,计算收缩幅度=最高值-基础值(初张力);数据分析中,收缩反应大小以收缩幅度占 KCl 所引起的收缩幅度的百分数表示。

1.7 放射配体受体结合实验[3]

1.7.1 按照文献[3]的方法制备受体蛋白并进行蛋白定量,稀释至5 μg/μl。

1.7.2 受体饱和实验 反应体系1 000 μl,其中[^{3}H]-AngⅡ 50 μl(终浓度为0.25、0.5、1、2、4、6、8、10、16、20 nmol/L),非特异性结合管中加入 10^{-3} mol/L 非标记 AngⅡ 20 μl,补充分析缓冲液至900 μl,加入蛋白100 μl,启动反应;25 ℃孵育60 min,以冰冷缓冲液终止反应,迅速进行减压过滤,以冰冷缓冲液冲洗2~3次;将滤纸放入烤箱充分干燥后,置于闪烁杯内,加入闪烁液5 ml,充分混匀,静置2 h,测定每分钟衰变次数。

1.7.3 竞争结合实验 反应体系1 000 μl,其中[^{3}H]-AngⅡ 50 μl(终浓度2 nmol/L),非特异性结合管中加入 10^{-3} mol/L 非标记 AngⅡ 20 μl,补充分析缓冲液至900 μl,孵育20 min,加入蛋白100 μl 启动反应;后续步骤同受体饱和实验。

1.8 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)

1.8.1 按照 Tripure 分离试剂盒(德国 BM 公司)提供的步骤提取组织总 RNA,本实验 RNA 样品的 $D(260)/D(280)$ 在1.790-2.000之间,符合 RNA 样品纯度的要求。

1.8.2 逆转录(RT) 反应体系20 μl($MgCl_2$ 4 μl,10×RNA buffer 2 μl,dNTP 2 μl,RNase Inhibitor 0.5 μl,Reverse Transcriptase 1 μl,Random 9 mers 1 μl,总 RNA 1 μg,补充 RNase free H_2O 至20 μl)。反应条件为:30 ℃ 10 min,45 ℃ 30 min,99 ℃ 5 min,5 ℃ 5 min。

1.8.3 聚合酶链反应(PCR) 反应体系100 μl:cDNA 20μl,$MgCl_2$ 6 μl,10×RNA buffer 8 μl,灭菌蒸馏水63.5 μl,TaKaRa *Taq* 0.5 μl,上游引物(20 μmol/L) 1 μl,下游引物(20 μmol/L) 1 μl,混匀后每管加入无菌液状石蜡50 μl,置于 PCR 仪内,94 ℃变性5 min,按下列循环条件进行扩增:94 ℃ 45 s,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1.5 min,循环35次,最后在72 ℃延伸10 min,取出反应管置于4 ℃ 10 min,进行电泳。

分别用 AT_1 和参照 GADPH 引物扩增 cDNA 片段。PCR 扩增完毕后,每管分别取10 μl PCR 产物,进行琼脂糖(1.5%)凝胶电泳,用 Gel Doc 2000 凝胶扫描成像系统(Bio Rad 公司)对电泳条带进行扫描定量并摄像,结果以光密度值比值(AT_1/GAPDH)表示。

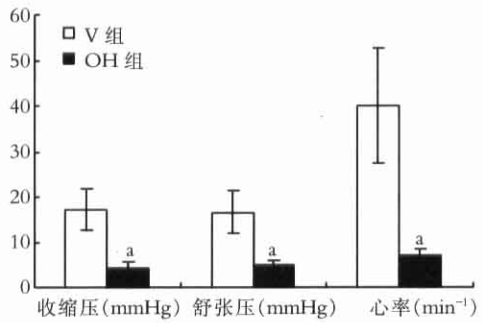
1.9 统计学处理[4]

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件包进行组间 t 检验;受体饱和实验以 Grafit 统计软件处理,进行曲线拟和并求得 B_{max} 及 K_D。

2 结果

2.1 化学切断法损毁交感神经的效果(酪胺反应实验)

静脉注射酪胺后,V 组大鼠血压升高、心率加快,而 OH 组收缩压(SBP)、舒张压(DBP)与心率(HR)的改变较对照组明显减弱($P<0.01$,图1),提示大鼠交感神经功能受损。



a: $P<0.01$,与 V 组比较

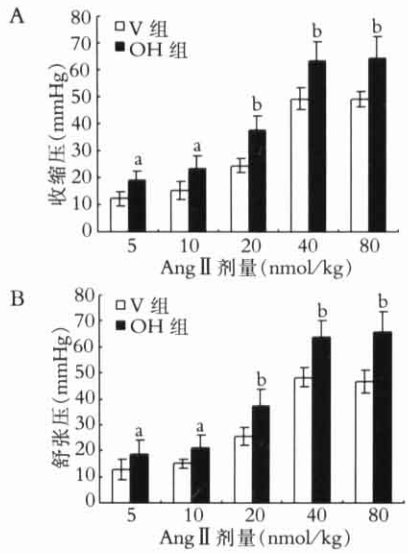
图1 大鼠静脉注射酪胺后血压与心率的变化

2.2 交感神经损毁对 AngⅡ升压效应的影响

自颈外静脉导管依次给予 AngⅡ5.0、10.0、20.0、40.0、80.0 nmol/kg 后,两组大鼠收缩压(SBP)与舒张压(DBP)均有升高。同 V 组大鼠相比,OH 组大鼠 SBP、DBP 的升高更为明显,在所有剂量,两组均有显著性差异(图2)。

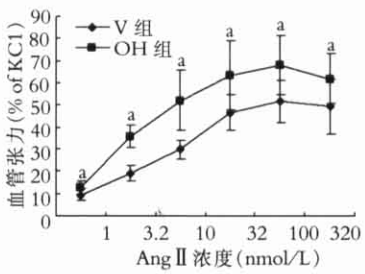
2.3 交感神经损毁对 AngⅡ缩血管效应的影响

在孵育动脉环的浴槽中累积加入浓度为 1.0×10^{-9}、3.2×10^{-9}、1.0×10^{-8}、3.2×10^{-8}、1.0×10^{-7}、3.2×10^{-7} mol/L 的AngⅡ,可引起动脉收缩,同 V 组大鼠相比,OH 组大鼠的离体主动脉环对 AngⅡ的反应性较强,在所有剂量两组均有显著性差异($P<0.05$,图3)。



A：收缩压；B：舒张压；a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 V 组比较

图 2　大鼠静脉注射 Ang Ⅱ后的变化



a：$P<0.05$，与 V 组比较

图 3　Ang Ⅱ引起的主动脉环收缩

2.4　交感神经损毁对 [^{3}H]-Ang Ⅱ与大鼠心肌 AT_1R 结合特性的影响

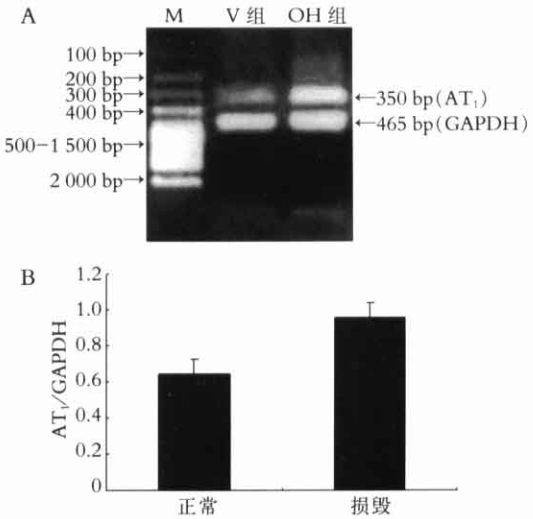
采用放射配体受体结合分析观察交感神经损毁对大鼠心肌 AT_1R 受体数量及亲和性的影响，结果显示交感神经损毁后，心肌 AT_1R 饱和曲线明显上升，采用 Grafit 统计软件对数据进行分析，显示交感神经损毁后受体结合数量(B_{max})由 400 fmol/mg 上升至 603 fmol/mg，而亲和力(K_D)未发生明显变化(健全大鼠与交感神经损毁大鼠分别为 2.42 nmol/L、2.55 nmol/L)(表 1)。

表 1　大鼠心肌 AT_1R 与[^{3}H]-Ang Ⅱ的结合特性(fmol/mg，结果以均数表示，双复管测定)

组别	[^{3}H]-AngⅡ 浓度(nmol/L)									
	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	16.0	20.0
V 组	42.1	62.8	117.8	189.5	246.6	260.0	304.3	310.3	319.9	402.1
OH 组	69.2	91.4	173.7	228.1	310.4	401.0	423.2	502.8	538.1	604.6

2.5　交感神经损毁对血管平滑肌 AT_1R mRNA 表达的影响

交感神经损毁后血管平滑肌 AT_1R mRNA 的表达较之健全组明显增强。Gel Doc 2000 凝胶扫描成像系统对电泳条带扫描定量结果显示 AT_1/GAPDH(光密度比值)在 V 组为 0.64，而 OH 组为 0.96(图 4)。



A：电泳结果；B：定量结果

图 4　大鼠血管平滑肌 AT_1R mRNA 的表达

3　讨论

交感神经系统是调控血压的重要环节，它与机体其他众多调节因素相互作用相互制约，在维持正常生理功能的过程中发挥关键作用，其平衡失调在疾病发生的病理生理过程中具有重要意义。近年有研究采用化学切断法自幼年损毁大鼠交感神经，观察机体的整体改变，结果显示[5,6]，自幼年损毁交感神经后，大鼠在生长过程中心率和血压保持在比较稳定的水平，与健全组比较无显著性差异。大鼠在幼年损毁交感神经，成年后没有出现血压下降，提示幼年损毁交感神经可能促使机体激发某些代偿机制，提高其他血压调控因素如肾素-血管紧张素系统(RAS 系统)的活性，以维持血压的正常水平。

本实验采用化学性交感神经切断术自幼年起毁损大鼠交感神经，在组织水平去除调控血压的一个重要因素，系统观察 RAS 功能水平的变化，并从受体亲和力及受体 mRNA 表达水平的角度初步考察这一功能变化发生的机制，期望能够较为直接地阐明交感神经系统对 RAS 系统活性的影响。

实验结果显示，交感神经损毁后，Ang Ⅱ引起的升血压及缩血管作用显著增强。提示交感神经损毁后，RAS 系统活性增高，这可能是幼年损毁交感神经后血压和心率维持正常水平的原因之一。

已有的研究结果[5]显示交感神经损毁后血浆 Ang Ⅱ水平与健全组并无差异，提示交感神经损毁后 RAS

系统活性增高不是 Ang Ⅱ 水平升高的结果，而可能是血管紧张素受体功能水平升高所引起的。为此我们进行了放射配体受体结合实验及反转录聚合酶链反应考察 AT_1R 表达水平及亲和活性的变化。结果显示，交感神经损毁后，血管平滑肌 AT_1R mRNA 表达水平明显高于健全组，受体结合实验则显示，交感神经损毁后，心肌 AT_1R 饱和曲线明显上升，采用 Scatchard 线性转换法对数据进行分析，显示交感神经损毁大鼠心肌 AT_1R 数量（B_{max}）较健全大鼠高得多（603 fmol/mg protein *vs* 400 fmol/mg），虽然亲和指数 K_D 未发生明显变化（在健全大鼠 K_D 为 2.42 nmol/L，而交感神经损毁后为 2.55 nmol/L），但建立在受体结合数量显著升高的基础上，整体亲和活性是升高的。

早前有近似的研究结果提示[8] 用培养的大鼠脑神经细胞研究儿茶酚胺与血管紧张素 Ⅱ 受体之间的相互作用时，以不同浓度的去甲肾上腺素孵育体外培养的大鼠下丘脑和脑干的神经细胞，并进行放射配体受体结合分析，发现血管紧张素 Ⅱ 与神经细胞的特异性结合降低，这一变化呈浓度依赖性。Scatchard 分析表明应用去甲肾上腺素后神经细胞表面 AT_1R 最大结合 Bmax 降低（提示受体数目减少），亲和常数 K_D 不变（提示受体亲和力不变），进一步进行 mRNA 表达量的定量检测，结果表明 NE 可降低 AT_1R mRNA 的转录速率，并进而使其蛋白表达水平降低。相近的研究结果[9] 还有去甲肾上腺素灌注大鼠主动脉可使组织对血管紧张素的反应性减弱，这些研究结果提示：①去甲肾上腺素水平升高可降低 AT_1R 的 mRNA 及蛋白表达，但不影响受体与 Ang Ⅱ 的亲和力；②去甲肾上腺素水平升高，可降低组织对 Ang Ⅱ 的反应性。本实验采用不同的方法进行观察得出了与之较为一致的结果。

本实验采用化学性交感神经切断术，观察交感神经损毁后 Ang Ⅱ 及 AT_1R 活性的变化，结果显示，幼年损毁大鼠交感神经，可使血管平滑肌 AT1R 表达增强，进而导致 Ang Ⅱ 引起的升高血压和收缩血管作用显著增强，这可能是幼年损毁交感神经后大鼠维持正常血压、心率的重要原因之一。

参考文献：

[1] ZERROUK A, AUGUET M, CHABRIER P E. Augumented endothelium-dependent contraction to angiotensin II in the SHR aorta: role of an inducible cyclooxygenase metabolite [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1998, 31(4): 525 - 533.

[2] DAFFONCHIO A, FRANZELLI C, RADAELLI A, *et al*. Sympathectomy and cardiovascular spectral components in conscious normotensive rats [J]. Hypertension, 1995, 25(6): 1287 - 1293.

[3] KUROSAWA Y, MINAMI K, HASHIMOTO Y, *et al*. Functional and binding studies of insurmountable antagonism of 606A, a novel AT1-receptor antagonist in rabbit tissues [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1999, 34(1): 132 - 138.

[4] 李家泰. 临床药理学 [M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1999：200.

[5] 姚开虎，钱永如，祝之明. 交感神经损毁对高蔗糖诱发幼年大鼠血压升高的影响 [J]. 中华儿科杂志，2003，41(3)：219 - 222.

[6] MIRCOLI L, MANGONI A A, GIANNATTASIO C, *et al*. Heart rate-dependent stiffening of large arteries in intact and sympathectomized rats [J]. Hypertension, 1999, 34(4 Pt 1): 598 - 602.

[7] SUMNERS C, RAIZADA M K. Catecholamine-angiotensin Ⅱ receptor interaction in primary cultures of rat brain [J]. Am J Physiol, 1984, 246(5 Pt 1): C502 - C509.

[8] SEASHOLTZ T M, GURDAL H, WANG H Y, *et al*. Desensitization of norepinephrine receptor function is associated with G protein uncoupling in the rat aorta [J]. Am J Physiol, 1997, 273(1 Pt 2): H279 - H285.

（编辑 薛国文）

参考文献类型及标识

根据 GB 3469 规定，以单字母方式标识以下各种参考文献类型：

参考文献类型	专著	论文集	报纸文章	期刊文章	学位论文	报告	标准	专利
文献类型标识	M	C	N	J	D	R	S	P

对于专著、论文集中的析出文献，其文献类型标识建议采用单字母"A"；对于其他未说明的文献类型，建议采用单字母"Z"。

对于数据库(database)、计算机程序(computer program)及电子公告(electronic bulletin board)等电子文献类型的参考文献，建议以下列双字母作为标识：

电子参考文献类型	数据库	计算机程序	电子公告
电子文献类型标识	DB	CP	EB

本刊编辑部