论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1188-03

缺氧致大鼠心肺组织中 apelin 的表达降低

龚永生[1,2],范小芳[2],高钰琪[1],吴小脉[2],毛孙忠[1,2],吴 洲[1] ([1]第三军医大学高原军事医学系病理生理学与高原生理学教研室,全军高原医学重点实验室,重庆 400038;[2]温州医学院肺心病研究室,温州 325027)

提 要: 目的 观察缺氧大鼠心肺组织中新发现的小分子活性肽 apelin 的变化,探讨其在缺氧性肺动脉高压发生发展中的病理生理学意义。**方法** 雄性 SD 大鼠 20 只,分为对照组和缺氧组(9% ~11% O_2,9 h/d,6 d)。导管法测定平均肺动脉压(mPAP)、平均颈动脉压(mCAP),称重法测定右心室与左心室加室间隔重量比(RV/LV+S)。放免法测定血浆、右室心肌及肺组织匀浆 apelin 水平,RT-PCR 检测右室心肌及肺组织 apelin mRNA 表达的变化。**结果** ①缺氧组大鼠 mPAP 较对照组高 26.06%($P<0.05$),RV/LV+S 较对照组高 10.83%($P<0.01$)。mCAP 两组间差异无统计学意义。②缺氧组大鼠右心室肌、肺组织 apelin 浓度(pg/mg)较对照组分别低 16.33%($P<0.05$)和 14.10%($P<0.01$),血浆 apelin 浓度(pg/ml)两组间差异无统计学意义。③缺氧组大鼠心肌和肺组织 apelin mRNA 表达水平较对照组分别低 22.95% 和 22.82%(均 $P<0.05$)。**结论** 缺氧大鼠右室心肌及肺组织局部 apelin 蛋白和基因表达的显著下降,可能是导致大鼠缺氧性肺动脉高压发生、发展的重要因素之一。

关键词: apelin;缺氧;高血压,肺;大鼠

中图法分类号: R322.11; R322.35; R364.4 **文献标识码**: A

Decreased expression of apelin in lung and heart tissue of rats induced by hypoxia

GONG Yong-sheng[1,2], FAN Xiao-fang[2], GAO Yu-qi[1], WU Xiao-mai[2], MAO Sun-zhong[1,2], WU Zhou[1] ([1]Department of Pathophysiology, College of High Altitude Military Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, [2]Institute of Pneumocardial Diseases, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325027, China)

Abstract: Objective To investigate the probable function of new peptide apelin in pathological proceeding of pulmonary hypertension induced by hypoxia. **Methods** Twenty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal control group and hypoxia group (9% -11% O_2, 9 h/d, 6 d). The mean of pulmonary arterial pressure (mPAP), mean carotid arterial pressure (mCAP) and the weight ratio of right ventricle to left ventricle plus septum (RV/LV+S) were measured. The concentration of apelin in the plasma, right ventricular myocardium and lung tissue were measured by radioimmunity. The expression of apelin gene in right ventricular myocardium and lung tissue were measured by reverse transcription-polymerase chain raction (RT-PCR). **Results** The mPAP and RV/(LV+S) of hypoxic group were respectively more by 26.06% and 10.83% than control group ($P<0.05$, $P<0.01$), while mCAP was of no significant difference between the two groups. The apelin concentration (pg/mg) of right ventricular myocardium and lung tissue of hypoxic group were lower by 16.33% and 14.10% than control group ($P<0.05$, $P<0.01$), but the plasma level of apelin (pg/ml) was of no difference. The expression of apelin mRNA in right ventricular myocardium and lung tissue of hypoxic group were lower by 22.95% and 22.82% than control group ($P<0.05$). **Conclusion** The local decreased expression of apelin gene and peptide in the right ventricle and lung tissue in rats might be an important factor in the development of pulmonary hypertension induced by hypoxia.

Key words: apelin; hypoxia; hypertension, pulmonary; rat

基金项目:浙江省卫生厅资助项目(2005B126)、温州市科委资助项目(Y2004A115)

Supported by the Funds of Zhejiang Health Department (2005B126) and the Research Foundation of Scientific Committee of Wenzhou (Y2004A115)

作者简介:龚永生(1961-),男,浙江省永康市人,博士研究生,教授,主要从事低氧性肺动脉高压机制方面的研究。电话:(0577)88838649, E-mail: fxbwzmc@126.com

通讯作者:高钰琪,电话:(023)68752331, E-mail: gyq@mail.tmmu.com.cn

收稿日期:2005-10-28;**修回日期**:2006-01-17

缺氧性肺动脉高压是包括慢性阻塞性肺疾病、睡眠呼吸暂停综合征在内的众多心肺疾病发生发展过程中重要的病理生理环节。肺血管收缩反应性增强和肺血管重构是其重要的病理生理基础，其机制十分复杂，迄今尚未完全阐明，是一涉及多因素、多因子调节的复杂病理过程，何为关键的靶点尚不明确。

apelin 是新发现的小分子活性多肽[1]，具有循环激素、旁/自分泌的功能。初步研究表明 apelin 对正常与病变心脏都具有正性肌力、舒张血管、降低血压的心血管保护作用[2]。Apelin 及其受体 APJ 的 mRNA 及蛋白广泛存在于哺乳动物与人的多种组织（脑、肺、心脏、血管等）中，但以在肺组织的联合表达最高[3]。据此，我们推测 apelin-APJ 系统除了有广泛的生物学作用外，在调节肺循环系统稳态方面可能具有某种特殊的生理与病理意义。本实验旨在研究缺氧大鼠心、肺组织及循环血液中 apelin 表达的变化，初步探讨这一新的血管活性多肽与缺氧性肺动脉高压病理进程的关系及在其中可能扮演的角色。

1　材料与方法

1.1　材料

健康雄性 SD 大鼠 20 只，体质量 180 ~ 220 g，由温州医学院实验动物中心提供。apelin-36 放免试剂盒由美国 Phoenix Pharmaceutical INC. 提供。异丙肾上腺素、抑肽酶（aprotinin）、杆菌肽购自 Sigma Co 公司；Trizol 购自 GIBCO BRL.（U. S. A.）；dNTP 购自 Clontech co.（U. S. A.），MMLV 逆转录酶、*Taq* 酶、RNAsin 和 Oligo（dT）15 Primer 为 Promega co.（U. S. A.）的产品。余为市售分析纯产品。4 个 PCR 引物由赛百盛公司合成（表 1）。

表 1　RT-PCR 扩增的寡核苷酸引物及反应条件

	靶序列	长度（bp）	退火温度（℃）	循环数
apelin-36	上游引物：5′-TGCTCTGGCTCTCCTTGACT-3′	190	59	32
	下游引物：5′-ATGGGTCCCTTATGGGAGAG-3′			
β-actin	上游引物：5′-ATCTGGACCACACCTTC-3′	291	55	24
	下游引物：5′-AGCCAGGTCCAGACGCA-3′			

1.2　缺氧动物模型复制[4]

20 只雄性 SD 大鼠分成 2 组：对照组与缺氧组，每组 10 只，将缺氧组大鼠放入常压低氧动物饲养舱内，舱内吸入气氧浓度为 9% ~ 11%，二氧化碳浓度 <3%，每天 9 h，共 6 d；对照组置于舱外自由呼吸空气与摄食。

动物饲养到规定时间后，术前禁食过夜，自由饮水，戊巴比妥钠（35 mg/kg）腹腔麻醉，右心导管法测量肺动脉压力（mPAP），左颈总动脉插管测平均颈动脉压（mCAP）后取 2 ml 全血加 10% EDTA 1 mg/ml 抗凝，4 ℃，3 500 r/min 离心 10 min，收集血浆，立即加入抑肽酶 500 kIU/L，于 -70 ℃保存待测 apelin-36。处死动物，迅速剪开胸腔取出心肺剪去右心房组织，沿室间隔边缘剪下右心室，分别称取右心室（RV）游离壁和左心室加室间隔（LV + S）的重量，并计算出 RV/LV + S，作为右心室肥大的指标。取右肺组织及右心室肌各约 100 mg 提取 RNA，待测 apelin-36 mRNA 水平；余右肺组织及右心室肌于 -70 ℃保存待测 apelin-36 的蛋白水平。

1.3　血浆、肺组织、右心室 apelin-36 放射免疫（RIA）测定

按放免药盒说明书操作测定 apelin-36 含量。其 IC50 为 26 pg/管，与 apelin-36（人）、apelin-16（人，小牛）、apelin-13（人，小牛）、apelin-12（人，小牛）交叉反应性为 100%，结合率为 38%。

1.4　肺组织、右心室总 RNA 的提取及半定量逆转录 PCR（RT-PCR）测定 apelin-36 mRNA 水平

各取 50 ~ 100 mg 肺和右心室肌组织，用 Trizol 一步法提取总 RNA。M-MuLV 逆转录酶及 Oligo（dT）15 Primer 逆转录成单链 cDNA。测定 apelin-36 mRNA 含量的 PCR 反应体积 25 μl：cDNA 1 μl，5 pmol/L ADM-S 及 apelin-36-A 引物 1 μl，2.5 mmol/L dNTP 1 μl，含 15 mmol/L $MgCl_2$ 的 10 × PCR 缓冲液 2.5 μl，*Taq* DNA 聚合酶 1.25 IU，反应条件：95 ℃ 5 min；94 ℃ 30 s，61 ℃ 30 s，72 ℃ 40 s，热循环 32 次；72 ℃ 5 min。取 2 μl PCR 产物，以 β-actin 上下游引物作 PCR，94 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，72 ℃ 40 s，热循环 24 次。PCR 产物经琼脂糖电泳，凝胶成像及定量扫描仪分析，分别获得 190 bp 和 291 bp 的条带。apelin-36 mRNA/β-actin mRNA 值即为 apelin-36 mRNA 的相对含量。重复 3 次独立实验。PCR 反应条件见表 1。

1.5　统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.5 统计软件分析。两组间比较采用两独立样本 t 检验。

2　结果

2.1　右心室重量比及肺动脉压的变化

缺氧组大鼠 mPAP 较对照组高 26.06%（$P < 0.01$），RV/LV + S 较对照组高 10.83%（$P < 0.01$）。两组大鼠 mCAP 差异无统计学意义（$P > 0.05$）（表 2）。

表 2　两组大鼠 mPAP、mCAP 及 RV/LV + S 比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	mPAP（mmHg）	mCAP（mmHg）	RV/LV + S（%）
对照组	10	14.43 ± 1.90	130.60 ± 1.53	24.00 ± 0.86
缺氧组	10	18.19 ± 2.82[b]	134.40 ± 9.95	26.60 ± 0.74[a]

a：$P < 0.01$，b：$P < 0.05$，与对照组比较

2.2　血浆和心肌、肺组织 apelin 蛋白水平变化

缺氧组大鼠右心室肌、肺组织 apelin 浓度较对照组分别低 16.33%（$P < 0.05$）和 14.10%（$P < 0.01$）。而血浆 apelin 浓度两组间差异无统计学意义（$P > 0.05$）（表 3）。

表 3　两组大鼠血浆、肺组织及右心室肌 apelin 含量的变化（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	血浆（pg/ml）	肺组织（pg/mg）	右心室肌（pg/mg）
对照组	10	436 ± 54	11.17 ± 0.73	6.81 ± 0.73
缺氧组	10	427 ± 63	9.60 ± 1.90[b]	5.70 ± 0.87[a]

a：$P < 0.01$，b：$P < 0.05$，与对照组比较

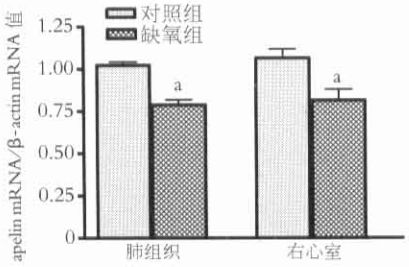
2.3　心肌、肺组织 apelin mRNA 表达的变化

缺氧组大鼠心肌和肺组织 apelin mRNA 表达水平较对照组分别低 22.95% 和 22.82%（$P < 0.01$），见图 1、2。



1：对照组肺组织；2：缺氧组肺组织；3：对照组右心室；4：缺氧组右心室

图1 apelin 基因 RT-PCR 扩增产物



a：$P<0.05$，与对照组比较

图2 肺组织及右室心肌 apelin mRNA 表达的变化

3 讨论

慢性缺氧性肺动脉高压是临床常见的病理生理过程，也是慢性阻塞性肺疾病、睡眠呼吸暂停综合征、慢性肺源性心脏病等多种心肺疾病发生发展的重要病理环节。异常的肺血管收缩、平滑肌细胞和内皮细胞增殖、内膜纤维化、管壁增厚及局部血栓形成，最终导致肺循环血流动力学的紊乱、肺动脉压力增高及右心负荷加重[5]。但这一系列病理演变背后的分子学机制并未完全明确。目前认为，血管活性调节因子的异常与肺循环稳态失衡关系十分密切。

apelin 是新发现的小分子活性多肽[1]，具有循环激素、旁/自分泌的功能，其受体为孤儿 G 蛋白耦联受体-血管紧张素受体 AT-1 相关的受体蛋白（APJ）。apelin-APJ 的 mRNA 及蛋白广泛存在于哺乳动物与人的多种组织（脑、肺、心脏、血管、乳腺等）中，但以在肺组织的联合表达最高[3]，这提示 apelin-APJ 系统除了有广泛的生物学作用外，在调节肺循环系统稳态方面可能具有特殊的生理与病理意义。初步研究表明 apelin 对正常与病变心脏都具有正性肌力、舒张血管、降低血压的心血管保护作用[2,6-8]，但其在肺循环中的作用尚知之甚少。本研究结果提示，缺氧大鼠 mPAP 及 RV/LV+S 均显著高于对照组，说明动物发生了缺氧性肺动脉高压和右心室肥大。缺氧大鼠心肌和肺组织 apelin 蛋白及基因表达水平均较对照组显著降低，而循环血液中 apelin 浓度两组间并无显著性差异。

有研究表明，心内膜和血管内皮系产生、释放 apelin 的主要组织[6,9,10]。而慢性缺氧可导致肺循环系统内皮组织的损伤，我们推测，这可能是缺氧性肺动脉高压大鼠肺组织 apelin 表达降低的原因之一。而 apelin 基因及蛋白表达的降低，使之舒张肺血管的效应减弱，进一步导致肺循环稳态的失衡，从而加剧肺动脉高压的形成。此外，有研究报道，机械牵拉培养的新生鼠心室肌细胞，apelin mRNA 表达显著下调，慢性心室内压超负荷的在体动物模型也观察到同样的结果[8]。本研究结果与之相符。缺氧性肺动脉高压导致右心室后负荷显著增高，从而使其 apelin 表达下调。

综上所述，右室心肌及肺组织局部 apelin 蛋白和基因表达的显著下降，可能是导致大鼠缺氧性肺动脉高压发生、发展的重要因素之一。但 apelin 在慢性肺动脉高压病理进程中的动态变化如何，外源性补充 apelin 是否可能改善肺动脉高压从而作为新的治疗靶点，都有待进一步的研究和探讨。

（致谢：本研究得到北京大学医学部生理与病理生理学系唐朝枢教授、齐永芬副教授及潘春水博士等的大力支持与帮助，在此表示谢意。）

参考文献：

[1] TATEMOTO K, HOSOYA M, HABATA Y, *et al*. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor[J]. Biochem Biophy Res Commun, 1998, 251 (2): 471-476.

[2] BERRY M K, PIROLLI T J, JAYASANKAR V, *et al*. Apelin has *in vivo* inotropic effects on normal and failing hearts[J]. Circulation, 2004, 110(11 Suppl 1): II187-II193.

[3] O'CARROLL A M, SELBY T L, PALKOVITS M, *et al*. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues [J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1492 (1): 72-80.

[4] 李继武，龚永生，范小芳，等. 慢性低 O_2 高 CO_2 性肺动脉高压大鼠肺血管基质金属蛋白酶基因表达[J]. 中国病理生理杂志，2003，19(5)：657-660.

[5] MARCOS E, FADEL E, SANCHEZ O, *et al*. Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension[J]. Circ Res, 2004, 94(9): 1263-1270.

[6] KATUGAMPOLA S D, MAGUIRE J J, MATTHEWSON S R, *et al*. [^{125}I]-(Pyr^{1}) Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man[J]. Br J Pharmacol, 2001, 132(6): 1255-1260.

[7] ASHLEY E A, POWERS J, CHEN M, *et al*. The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading *in vivo*[J]. Cardiovasc Res, 2005, 65(1): 73-78.

[8] SZOKODI I, TAVI P, FOLDES G, *et al*. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility [J]. Circ Res, 2002, 91(5): 434-440.

[9] KLEINZ M J, DAVENPORT A P. Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells [J]. Regul Pept, 2004, 118 (3): 119-125.

[10] ISHIDA J, HASHIMOTO T, HASHIMOTO Y, *et al*. Regulatory roles for APJ, a seven-transmembrane receptor related to angiotensin-type 1 receptor in blood pressure *in vivo*[J]. J Biol Chem, 2004, 279(25): 26274-26279.

（编辑 陈聪连）