

木犀草素对自发性高血压大鼠心肌组织醛糖还原酶活性影响及机制

吕立华¹, 张玉碧², 吕林华³ (1.邵阳医学高等专科学校药理学系, 湖南 邵阳 422000; 2.邵阳市中心医院内六科, 湖南 邵阳 422000; 3.中山大学附属第一医院, 广州 510083)

摘要: 目的 阐明木犀草素对自发性高血压大鼠心肌组织醛糖还原酶(AR)活性的影响, 为深入研究 AR 在高血压心血管重塑中的作用和机制提供基础。方法 采用紫外分光光度法测定木犀草素对自发性高血压大鼠心肌 AR 活性的影响。采用免疫荧光法测定血管紧张素 II (Ang II) 的含量。结果 木犀草素组心肌 AR 活性($0.054 2 \pm 0.001 8$)和 Ang II (110.48 ± 3.79) 活性均下降($P < 0.05$), 各组 AR 活性变化趋势与 Ang II 浓度变化成直线相关性($r = 0.968 6$, $P = 0.04$)。结论 木犀草素可显著抑制 AR 活性, 其机制可能与抑制 Ang II 有关。

关键词: 木犀草素; 高血压; 醛糖还原酶; 心血管重塑

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)07-0581-03

The Effect and Mechanism of Luteolin on the Activity of Aldose Reductase from Cardiac Muscle of Rats

LÜ Lihua¹, ZHANG Yubi², LÜ Linhua³ (1. Shaoyang Medical College Department of Pharmacy, Shaoyang 422000, China; 2. Shaoyang Center Hospital Internal Medicine Six Branch, Shaoyang 422000, China; 3. The First Affiliated Hospital of SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the intervention effect of luteolin on the activity of aldose reductase (AR) in spontaneously hypertensive rat (SHR), and to provide experimental evidence for study on the effect and mechanism of AR on attenuating hypertension-induced cardiovascular remodeling. **METHODS** Ultraviolet spectrophotometry was performed to determine the activity of AR from cardiac muscle of SHR. Immunofluorescence method were performed to determine the content of blood plasma active mass of Ang II. **RESULTS** The activities of AR ($0.054 2 \pm 0.001 8$) and Ang II (110.48 ± 3.79) from cardiac muscle of SHR that had been induced by intragastric administration of luteolin were significantly lower than by intragastric administration of normal saline, and were higher than normal group ($P < 0.05$). The changed tendency of AR activity were correlated with content of Ang II ($r = 0.968 6$, $P = 0.04$). **CONCLUSION** Luteolin can inhibit the activity of AR. The mechanism may be related to decreasing content of Ang II.

KEY WORDS: luteolin; hypertension; aldose reductase; cardiovascular remodeling

我国成人原发性高血压患者已超过 1.6 亿。目前由心血管重塑(remodeling)所引起的心、脑、肾等靶器官损害严重危害着患者的健康。有研究表明, 多种氧化应激可以激活醛糖还原酶(aldose reductase, AR), 激活的 AR 可以促进炎症反应和 VSMC 增殖, VSMC 增殖是高血压血管重塑的主要机制, 因此推测 AR 可能参与了高血压心血管重塑。笔者拟采用自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)动物疾病模型来进行研究。其最大优点, 就是疾病的发生、发展与人类相应的疾病很相似。本试验研究了木犀草素对 SHR 心肌组织 AR 活性和血管紧张素(Ang II)的影响, 目前国内尚未见报道, 同时为深入研究 AR 在高血压心血管重塑中的作用和机制提供了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 WKY 大鼠: [上海实验动物中心, 动物合格证号: (沪)2006-0001, 清洁级], ♂, 18 周龄, 每 5 只放在金属饲养笼中饲养。饲养条件: 室温(23 ± 1) °C, 人工照明 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ (7:00~19:00), 自由饮食及饮水。试验前适应环境及尾动脉测压操作 1 周。自发性高血压大鼠(SHR): [饲养条件同 WKY 大鼠], ♂, 18 周龄, 每 5 只放在金属饲养笼中饲养。

1.1.2 试剂与药品 Bradford 法蛋白测定试剂盒(北京北方伟业), 广谱酶抑制剂(德国默克), 血管紧张素 II 放射免疫试剂盒(上海源叶生物科技有限公司), 木犀草素(中山大学药学院), 苯那普利

基金项目: 湖南省教育厅资助科研项目(09C048)

作者简介: 吕立华, 女, 硕士, 副教授 Tel: 13975983412

E-mail: hnsylvlh@163.com

(华海药业)。

1.1.3 仪器 高速低温离心机(SIGMA 公司), RBP-1 型大鼠尾动脉血压仪(中日友好临床医学研究所), 酶标仪, 闪烁仪(中山大学中心实验室), GC-300 γ 放射免疫计数仪(科大创新中佳分公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组 18 只 18 周龄, δ , SHR 随机分 3 组: SHR 模型组、木犀草素治疗组(临用前用热水溶解)(20 mg·kg⁻¹·d⁻¹)^[1]、苯那普利组(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)。同性别、同周龄的 6 只 WKY 大鼠为正常组。各组药物连续灌胃给药, 每天 1 次, 连续喂养 4 周。

1.2.2 标本收集 4 周后麻醉大鼠, 颈动脉插管放血收集血液 6 mL。处死大鼠, 迅速剪下心脏, 在冰上分离左心室, 液氮冷却, 于-80 °C 冻存。

1.2.3 测量左心室 AR 活性

1.2.3.1 Bradford 法测定蛋白浓度 用 4 倍体积的稀释液(包含 10 mmol·L⁻¹ 巯基乙醇和 1:100 的广谱酶抑制剂的 10 mmol·L⁻¹ 磷酸氢二钾)将心肌组织匀浆。4 °C 下 13 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液测定蛋白浓度。完全溶解蛋白标准品(5 mg·mL⁻¹), 混匀, 用稀释液 60 μ L 稀释至 150 μ L, 使终浓度为 2 mg·mL⁻¹。将标准品按 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μ L 分别加到 96 孔板标准品孔中, 加标准品稀释溶液补足到 20 μ L。吸取组织匀浆液上清 5 μ L 加到 96 孔板样品孔中, 加入稀释液至 50 μ L, 各孔加入 200 μ L G250 染色液, 室温放置 3~5 min。用酶标仪测定 595 nm 波长下的吸光度, 然后绘制蛋白浓度与吸光度的标准曲线, 并计算回归方程。根据回归方程计算上清液的蛋白浓度。

1.2.3.2 AR 活性测定 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH 6.2), 含 80 μ g 蛋白的组织匀浆上清液(根据上清液的蛋白浓度计算需要加入的体积), 75 μ mol·L⁻¹ NADPH, 5 mmol·L⁻¹ DL-甘油醛。反应体系总体积为 200 μ L。室温反应 3 min, 在紫外分光光度计上测定 340 nm 吸光值的变化, 对照组不加 DL-甘油醛。以吸光值的变化为酶的活性。

1.2.4 Ang II 含量测定 采用放射免疫法, 实验步骤按试剂盒说明书进行。测定各管放射性计数 cpm 后, 计算各管的百分结合率(Bi/Bo%), 以各标准管的结果绘制 Bi/Bo-Log 图。样品测定管 Ang II 浓度根据 Bi/Bo 的百分结合率从标准曲线算出。

$$Bi/Bo\% = \frac{Bi - NSB}{Bo - NSB} \times 100\%$$

Bo: 0 标准管的 cpm; Bi: 各管 cpm; NSB: 非特异性结合管 cpm。

Ang II 标准曲线方程为: $Y=5.28X-3.16$, $r=0.999\ 2$ 。

1.2.5 数据处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析和 t 检验, 用 SPSS11.5 统计软件进行统计学检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌组织 AR 活性与 Ang II 活性

18 周龄 SHR 模型组和本犀草素组心肌 AR 活性较 WKY 大鼠正常组增强($P<0.05$); 木犀草素组和苯那普利组 AR 活性均比模型组降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。18 周龄 SHR 模型组和本犀草素组血浆 Ang II 活性较 WKY 正常组升高($P<0.05$), 苯那普利组和本犀草素组 Ang II 活性比模型组降低, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠心肌组织 AR 活性及血浆活性物质 Ang II 浓度($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Activity of AR in myocardium tissue and concentration of Ang II in rats ($n=4$, $\bar{x} \pm s$)

组别	AR 活性/ng·mL ⁻¹ ·h ⁻¹	Ang II 浓度/pg·mL ⁻¹
正常组	0.030 5 $\pm$ 0.001 7	68.90 $\pm$ 6.44
模型组	0.091 8 $\pm$ 0.002 7 ¹⁾	139.21 $\pm$ 10.48 ¹⁾
苯那普利组	0.033 9 $\pm$ 0.002 5 ²⁾	73.60 $\pm$ 4.47 ²⁾
木犀草素组	0.054 2 $\pm$ 0.001 8 ¹⁾²⁾	110.48 $\pm$ 3.79 ¹⁾²⁾

注: 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$

2.2 心肌组织 AR 活性与 Ang II 活性相关分析

进一步研究正常组、模型组、苯那普利组、木犀草素组血浆 Ang II 浓度与 AR 活性的相关性。用 SPSS11.5 统计软件进行统计学检验, Pearson 相关系数 $r=0.968\ 6$, $P=0.04$ 。H₀: $\rho=0$, 即血浆 Ang II 浓度与 AR 活性无直线相关关系; H₁: $\rho \neq 0$, 血浆 Ang II 浓度与 AR 活性有直线相关关系, $\alpha=0.05$, 经相关系数 t 检验, $n=14$, $t=2.673$, $0.02<P=0.04<0.05$ 按 $\alpha=0.05$ 水准, 拒绝 H₀, 接受 H₁, 可认为血浆 Ang II 浓度与 AR 活性有直线相关关系, 见图 1。

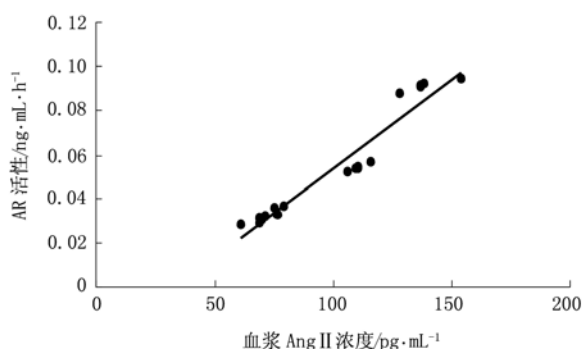


图1 血浆 Ang II 浓度与心肌 AR 活性的相关性分析

Fig 1 Relationship analysis between plasma Ang II concentration and cardiac activity of AR

3 讨论

对于AR研究进展主要为: AR是糖尿病大血管病变及微循环障碍防治的靶点, AR抑制剂可以有效抑制高血糖引起的VSMC增殖, 是临床上防治糖尿病并发症的有效药物。同时AR可能是多种病理状态下细胞增殖作用的潜在调节因素。由于高血压心血管重塑的病理过程为VSMC迁移增殖、心肌细胞肥大、间质纤维细胞分化和胶原合成。推测AR可能在高血压心血管重塑中起着重要的调节作用。

Ang II激活的肽类生长因子 TGF- β 1 可以直接激活 AR, RAS 激活后, Ang II 升高, 通过 NADPH 氧化酶、一氧化氮合酶、黄嘌呤氧化酶和线粒体等途径促使过量生成活性氧族(reactive oxygen species, ROS)^[2]; 生成的 ROS 激活氧化应激敏感性酶, 活化细胞内信号传导通路, 激活核转录因子(NF- κ B、AP-1), 促进血管炎症反应, 引起心血管重塑。

在体研究显示, 木犀草素组和苯那普利组 AR 活性和 Ang II 活性均比 SHR 模型组降低($P<0.05$), 表明抗高血压心血管重塑与降低 AR 活性有关, Ang II 可能是导致高血压新血管重塑的重要因子。各组血浆 Ang II 浓度与 AR 活性的相关性研究, 显示血浆 Ang II 浓度与 AR 活性有直线相关关系, 表明高血压 AR 活性增强的原因与 Ang II 有关。

新近研究表明, Ang II 引起心血管重构的主要机制是Ang II 与AT2I结合, 激活以下几条与细胞生长有关的信号转导通路: ①通过磷脂酶C生成甘油二酯和三磷酸肌醇, 进一步激活蛋白激酶C和细胞

内Ca²⁺释放; ②激活丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK), 使MAPK磷酸化, 再通过核转位调节核内转录因子, 引起细胞增殖和生长反应; ③Ang II还可通过磷脂酶 γ 引起酪氨酸激酶磷酸化, 调节细胞生长。上述几条途径启动核转录, 诱导血管外膜成纤维细胞增殖相关基因表达, 使蛋白质核酸合成, 最终导致血管外膜成纤维细胞增殖^[3]。

根据目前研究进展和笔者前期实验结果, 推测: Ang II 是导致高血压新血管重构的主要因子, Ang II 可以促进氧化应激, AR 是氧化应激敏感性酶^[4], 并且 AR 通过介导细胞信号转导可以促进血管平滑肌细胞增殖, 血管平滑肌细胞增殖是心血管重构的一个重要表现。AR 活性的降低一方面通过减少核转录因子(NF- κ B、AP-1)的激活抑制血管炎症反应, 另一方面 AR 活性的降低可以直接抑制心血管细胞增殖, 发挥防治心血管重塑的作用。Ang II 能调控细胞生长、细胞程序性死亡, 血管 SMC 迁移, 细胞外基质调控, 它还调控血管氧化还原状态。Ang II 是心、脑、肾及血管等靶器官损害发生发展的中心环节。而木犀草素对 AR 活性有抑制作用, AR 活性与 Ang II 浓度具有相关性, 推测木犀草素通过抑制 AR 发挥逆转心血管重塑的作用。从而为阐明醛糖还原酶是防治高血压心血管重塑的新靶点和抗心血管重塑的机制提供了实验依据和新的思路。

REFERENCES

- [1] XIE L D, OUYANG Q F, ZHAO H J, et al. Fluvastatin, benazepril in spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cell L-type calcium channel a1C expression [J]. Chin J Hypertension(中华高血压杂志), 2008, 16(12): 1100-1102.
- [2] TAMARA M, PARAVICINI, RHIAN M, et al. Redox signaling in hypertension[J]. Cardiovasc Res, 2006, 71 (8): 247-258.
- [3] GUO S. Vascular adventitial Ang II regulation of TLR4 in hypertensive vascular remodeling of the effect and mechanism [J]. Qiqihar J Med Coll (齐齐哈尔医学院学报), 2008, 29 (12): 215-219.
- [4] KARISEROVA K, SRIVASTAVA S, HOETKER J D. Redox activation of aldose reductase in the ischemic heart[J]. J Biol Chem, 2006, 281 (22): 15110-15120.

收稿日期: 2009-10-15