

运动训练联合基因治疗对自发性高血压大鼠心功能的影响*

周 燕¹ 梁远红³ 王晋明² 魏 捷¹ 王 芳² 谢 刚²

摘要 目的:研究运动训练联合 β_1 肾上腺素能受体反义基因治疗对自发性高血压大鼠(SHR)血压、心功能、心脏 β_1 受体 mRNA、蛋白的影响,探讨运动训练联合 β_1 受体反义基因治疗改善心功能的机制。方法:阳离子脂质体混合物与 β_1 反义寡核苷酸(β_1 -AS-ODN)经鼠尾静脉注射,Tail-cuff 法检测血压,颈动脉插管测定血流动力学指标,半定量 RT-PCR 测定 β_1 mRNA 水平,Western 印迹测定心脏 β_1 受体的蛋白水平。结果:与 SHR 组比较,运动联合基因治疗可以使血压下降维持 4 周,血压最大下降 40mmHg, LVSP、LVEDP 显著降低($P<0.01$, $P<0.01$),左室最大收缩和舒张速率显著升高($P<0.01$, $P<0.01$), β_1 受体 mRNA 明显降低($P<0.05$), β_1 受体蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。结论:运动训练联合 β_1 受体反义基因治疗可以明显地降低血压,改善心功能;其机制是运动训练增强基因治疗对 β_1 受体 mRNA 和蛋白的抑制作用,在转录和转录后抑制过度激活的 β_1 受体的表达。

关键词 运动训练;基因治疗;心功能;自发性高血压

中图分类号:R544.1,R493

文献标识码:A

文章编号:1001-1242(2007)-05-0403-03

Effects of exercises training and β_1 adrenoreceptor antisense gene therapy on blood pressure and cardiac function in spontaneously hypertensive rats/ZHOU Yan, LIANG Yuanhong, WANG Jinming, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2007, 22(5):403—405

Abstract **Objective:** To evaluate the effects of β_1 adrenoreceptor antisense gene therapy on blood pressure, cardiac function, β_1 adrenoreceptor mRNA and protein in spontaneously hypertensive rats SHR. **Method:** Liposome/AS-ODNs were tested intravenously in SHR. Blood pressure was measured by Tail-cuff method. The hemodynamic studies of the rats were performed after 4 weeks of the injection. The levels of myocardial β_1 adrenoreceptor mRNA and protein were tested by RT-PCR and Western blotting. **Result:** On the basis of the magnitude and duration of hypotension, exercises training with β_1 -AS-ODN decreased blood pressure by up to 40mmHg for 4 weeks. Compared with the SHR group, after exercises training with β_1 -AS-ODN LVSP and LVEDP decreased ($P<0.01$, $P<0.01$); $\pm dp/dt_{max}$ increased significantly ($P<0.01$, $P<0.01$); the levels of myocardial β_1 adrenoreceptor mRNA and protein decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Exercise training with β_1 -AS-ODN can significantly ameliorate blood pressure and cardiac function in SHR, which is associated with reducing the levels of myocardial β_1 adrenoreceptor mRNA and protein. The inhibition of overactive β_1 -AR expression probably occurs in transcription and post-transcriptional steps.

Author's address Emergency Department, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, 430060

Key words exercises training; gene therapy; cardiac function; spontaneously hypertension

运动训练已经作为改善心血管疾病的一种治疗手段,适当的运动可以抑制体内过度激活的神经激素,降低高血压,延缓高血压引起的心力衰竭的进展,改善患者的预后^[1]。 β 受体阻滞剂已经广泛用于高血压、心力衰竭的治疗,但药物作用时间都相对较短,特异性相对差,且长期服用有副作用。高血压反义基因治疗具有高度特异性和长期降压的作用,而且副作用少^[2-3]。本研究小组已经报道针对 β_1 受体的反义基因治疗对高血压大鼠有很好的降压效果^[4-5],但运动训练是否能进一步促进基因治疗对血压和心功能的改善目前尚未见报道。

本实验研究运动训练联合 β_1 肾上腺素能受体

反义基因治疗对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)血压、心功能、心脏 β_1 受体 mRNA 和蛋白的影响,探讨运动训练和 β_1 受体反义基因治疗改善心功能的机制。

* 基金项目:湖北省自然科学基金资助项目(2004AA309B09)

1 武汉大学人民医院急诊科,武汉市解放路 238 号,430060

2 武汉大学人民医院心内科

3 通讯作者:梁远红(广东省人民医院,广东省心血管病研究所,510080)

作者简介:周燕,女,硕士,医师

收稿日期:2006-09-07

1 材料与方法

1.1 动物模型制备和基因治疗前准备

250—280g 雄性 SHR 和维凯(Wistar-Kyoto rat, WKY)大鼠购于中国科学院上海实验动物中心(许可证号 SCXK 2003-0003), 基因治疗的反义寡核苷酸($\beta 1$ -AS-ODN)序列为 5', -CCGCGCCCATGCCGA-3'^[6-7], 骨架硫代磷酸化修饰。阳离子脂质体(DOTAP/cholesterol Qbiogene) 和辅助脂质体 (DOPE, Sigma) 以 1:1 的摩尔比混合。

1.2 动物分组及血压测定

所有动物术前测定基础血压(大鼠血压测定仪, 中日友好医院心血管病研究所)。各运动组的大鼠在大鼠专用跑台进行运动训练, 速度为 20m/min, 训练时间 60min/d, 持续 4 周结束^[8]。随机分为 5 组(运动组、基因治疗组、运动及基因治疗组、SHR 组、WKY 组, 每组均为 8 只), 经鼠尾静脉单次注射阳离子脂质体/ $\beta 1$ -ODN, 注射剂量为 0.5mg/kg, 每周测血压 1 次至注射后第 4 周。

1.3 血流动力学指标测定

注射后第 4 周, 用氯胺酮(100mg/kg)腹腔注射麻醉各组大鼠, 分离左颈总动脉, 将充有肝素生理盐水的静脉套管针(内径 0.9mm)插入, 连接压力换能器和四导多功能生理记录仪, 缓慢插管至左心室, 稳定 5min 后测定并计算左心室收缩压 (left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室舒张末压 (left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP) 及左室最大收缩和舒张速率 ($\pm dp/dtmax$)。

1.4 半定量 RT-PCR 检测心脏组织 $\beta 1$ mRNA 水平

动物于注射后第 4 周处死, 取左心室肌用 Trizol (Invitrogen) 提取总 RNA, RT 和 PCR 按试剂盒 (MBI) 步骤操作。 $\beta 1$ 的引物为上游: 5'-CTCC-GAAGCT CGGCATGG-3', 下游: 5'-GCACGTCTAC-CGAAGTCCAGA-3', 所得产物为 432bp; GAPDH 的引物为上游: 5'-ATGGGGTGATGCTGCTGCTG-3', 下游: 5'-GTTTCTCCAGCGGCATGT-3', 所得产物为 485bp。

1.5 心脏 $\beta 1$ 受体蛋白水平的检测

试剂盒提取心肌蛋白, Bradford 法测蛋白浓度, 将蛋白提取液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, Western 印迹化学发光法检测心脏 $\beta 1$ 蛋白 (Santa Cruz) 表达水平, 凝胶图像处理系统对结果进行分析。

1.6 统计学分析

各组数据用均值 $\pm$ 标准差表示, 组间比较用方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 各组血压的变化

SHR 组血压范围为 185—200mmHg, WKY 组血压范围为 120—130mmHg, 与 SHR 组血压比较, 运动可使血压降低 10mmHg; 基因治疗可使血压下降维持 4 周, 使血压最大下降 37mmHg; 运动联合基因治疗也可以使血压下降维持 4 周, 使血压最大下降 40mmHg。见图 1。

2.2 各组心功能的变化

SHR 组心功能各项指标与 WKY 组相比都有显著性差异, LVSP、LVEDP 明显升高 ($P<0.01$, $P<0.01$), $\pm dp/dtmax$ 明显降低 ($P<0.01$, $P<0.01$)。与 SHR 组比较, 运动组的 LVSP、LVEDP 稍稍降低, $\pm dp/dtmax$ 稍稍升高, 但差异无显著性意义; 基因治疗组的 LVSP、LVEDP 降低 ($P<0.01$, $P<0.05$), $\pm dp/dtmax$ 升高 ($P<0.01$, $P<0.05$), 改善了心功能; 运动联合基因治疗组的 LVSP、LVEDP 均降低 ($P<0.01$, $P<0.01$), $\pm dp/dtmax$ 明显升高 ($P<0.01$, $P<0.01$), 明显地改善了心功能。见图 2。

2.3 不同时段心脏组织 $\beta 1$ mRNA 的水平

注射后第 4 周, 与 SHR 组 $\beta 1$ 受体 mRNA 表达

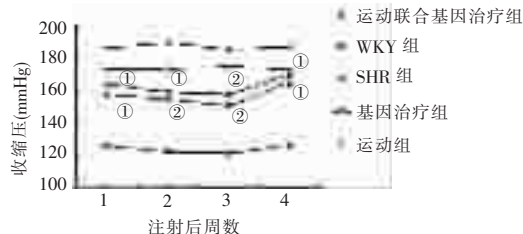


图 1 注射后各组血压随时间变化的分析与 SHR 组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$

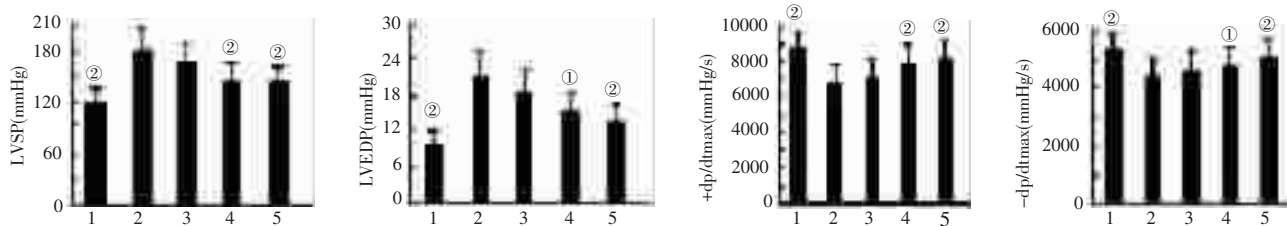


图 2 注射 4 周后各组心功能的变化

1:WKY 组;2:SHR 组;3:运动组;4:基因治疗组;5:运动联合基因治疗组基因治疗组。LVSP:左心室收缩压;LVEDP:左室舒张末压;+dp/dtmax:左室最大收缩速率; -dp/dtmax:左室最大舒张速率。与 SHR 组比较: ① $P<0.05$, ② $P<0.01$

水平比较,运动组、基因治疗组 $\beta 1$ 受体 mRNA 表达水平稍稍下降;运动组联合基因治疗组 $\beta 1$ 受体 mRNA 明显降低 ($P<0.05$)。见图 3。

2.4 心脏组织 $\beta 1$ 受体蛋白水平的变化

注射后第 4 周,与 SHR 组 $\beta 1$ 受体蛋白表达水平比较,运动组 $\beta 1$ 受体蛋白表达水平稍稍下降,基因治疗组 $\beta 1$ 受体蛋白表达水平明显下降 ($P<0.05$),运动联合基因治疗组 $\beta 1$ 受体蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$)。与基因治疗组比较,运动联合基因治疗组 $\beta 1$ 受体蛋白表达水平降低 ($P=0.0472$)。见图 4。

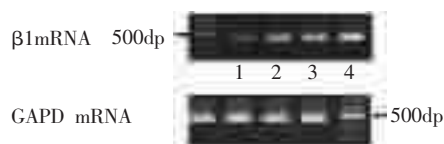


图 3 各组心脏组织 $\beta 1$ mRNA 水平的变化
1 运动联合基因治疗组; 2 基因治疗组; 3 运动组; 4 SHR 组

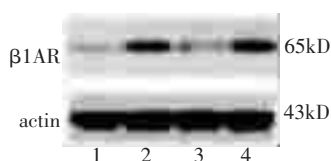


图 4 各组心脏组织 $\beta 1$ 蛋白表达水平的变化
1 运动联合基因治疗组; 2 运动组; 3 基因治疗组; 4 SHR 组

3 讨论

运动训练作为一种康复治疗手段已经应用于心血管疾病,目前临床上认为,交感神经的活性程度越高,高血压患者病程的进展也越快,更容易发展为慢性心力衰竭。对于高血压患者来说,保持适量的体能运动,可通过抑制体内过度激活的神经激素而使血压降低更平稳,改善心功能^[1]。

本研究采用自发性高血压大鼠模型,探讨运动训练、运动训练联合基因治疗对血压、心功能、心脏 $\beta 1$ 受体 mRNA 和蛋白的表达。SHR 组血压范围为 185—200mmHg, WKY 组血压范围为 120—130mmHg,与 SHR 组血压比较,运动可使血压降低 10mmHg。因为血流动力学检测不仅准确反映血压水平,更重要的是提供心功能的信息,所以本研究选用反映心脏收缩功能的指标 LVSP、+dp/dtmax 及反映心脏舒张功能的指标 LVEDP、-dp/dtmax。与 WKY 组比较,SHR 组的 LVSP、LVEDP 明显升高、+dp/dtmax 明显降低,说明 SHR 心脏收缩功能和舒张功能均受损。国外有研究报道^[6-7],针对 $\beta 1$ 受体的反义基因治疗对自发性高血压大鼠有很好的降压效果,而且没有中枢神经系统和 $\beta 2$ 受体阻滞的副作用。本研究小组先前的研究结果表明^[4-5],阳离子脂质体是安全有效的非病毒载体,它不能降低血压,但是它能增加基因治疗的疗效^[9-10]。本实验结果显示,基因

治疗组的 LVSP、LVEDP 降低 ($P<0.01$, $P<0.05$), +dp/dtmax 升高 ($P<0.01$, $P<0.05$),改善了心功能;运动联合基因治疗组的 LVSP、LVEDP 均显著降低 ($P<0.01$, $P<0.01$), +dp/dtmax 显著升高 ($P<0.01$, $P<0.01$),明显地改善了心功能,说明运动可以增强基因治疗改善心功能的作用。

AS-ODNs 抑制目的基因表达存在以下几种机制^[3]:①RNase H 依赖性机制。RNase H 是一种广泛存在的酶。在细胞核中的浓度高,其生理功能主要是参与 DNA 的复制。它能降解 DNA-RNA 复合物中的 RNA 链。②细胞核内的 DNA-RNA 杂交双链不易出核。杂交双链中 DNA 的空间位阻作用抑制核糖体与 mRNA 的结合。这些都能有效地阻断翻译过程。③干扰转录过程。AS-ODNs 入核后能与基因组的 DNA 形成三聚体,干扰转录因子/RNA 聚合酶与 DNA 模板链的有效结合,从而使转录不能启动。本实验采用半定量 RT-PCR 方法来检测 $\beta 1$ 受体水平。结果显示,与 SHR 组 $\beta 1$ 受体 mRNA 表达水平比较,运动组、基因治疗组 $\beta 1$ 受体 mRNA 表达水平稍稍下降;运动组联合基因治疗组 $\beta 1$ 受体 mRNA 明显降低 ($P<0.05$),提示运动可以增强基因治疗对 mRNA 的抑制作用,在转录水平抑制过度激活的 $\beta 1$ 受体的表达。

心肌 β 受体的密度较高,约是血管紧张素受体的 20—25 倍。大鼠心脏存在大量 $\beta 1$ 受体,约占总 β 受体的 3/4,它介导正性肌力作用。结果显示,与 SHR 组 $\beta 1$ 受体蛋白表达水平比较,运动组 $\beta 1$ 受体蛋白表达水平稍稍下降,基因治疗组 $\beta 1$ 受体蛋白表达水平明显下降 ($P<0.05$),运动组联合基因治疗组 $\beta 1$ 受体 mRNA 显著降低 ($P<0.01$)。进一步证明基因治疗降压与改善心功能的作用特异性地与 $\beta 1$ 受体结合相关,而且运动可以增强基因治疗对 $\beta 1$ 受体蛋白表达的抑制作用,在转录后水平抑制过度激活的 $\beta 1$ 受体的表达。

4 结论

运动训练联合 $\beta 1$ 受体反义基因治疗可以明显地降低血压,改善心功能;其机制是运动训练增强基因治疗对 $\beta 1$ 受体 mRNA 和蛋白的抑制作用,在转录和转录后抑制过度激活的 $\beta 1$ 受体的表达。

参考文献

- [1] Beitelshes AL, Zineh I, Yarandi HN, et al. Discordant beta-blocker effects on clinic, Ambulatory, Resting, and exercise hemodynamics in patients with hypertension [J].

(下转 417 页)