

·基础研究·

间歇有氧运动通过上调高血压肾病大鼠 肾上腺髓质素降低血压机制的研究

李宏伟¹ 段 平¹ 赖 敏¹

摘要

目的:研究间歇有氧运动(IAE)对高血压肾病大鼠(HNR)肾脏肾上腺髓质素(ADM)的影响,探讨运动降低血压的肾性因素及其机制。

方法:HNR 32只,分为间歇有氧运动组(IAE组),对照组(C组)。IAE组进行8w的间歇跑台有氧运动。采用尾压法测血压,酶联免疫吸附法测运动前后血清中ADM的含量,免疫组织化学法显示HNR肾脏ADM的表达,免疫印记法检测肾脏ADM的特异性受体RAMP2和CRLR的定表达量。

结果:IAE组血压明显低于C组($P < 0.05$);IAE组血清中ADM的含量明显高于C组($P < 0.05$);肾脏ADM表达明显强于C组;肾脏RAMP2和CRLR定表达量均明显高于C组($P < 0.05$)。

结论:间歇有氧运动使HNR的血压下降,其降血压的作用机制可能与运动导致的血液中ADM升高,肾脏ADM表达增强及其特异性受体上调有关。

关键词 间歇有氧运动;高血压肾病大鼠;肾上腺髓质素;肾上腺髓质素特异性受体

中图分类号:R544.1, R493 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2018)-01-036-05

Intermittent aerobic exercise decreases blood pressure of hypertensive nephropathy rat by up-regulated expression of adrenomedullin/LI Hongwei, DUAN Ping, LAI Min//Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2018, 33(1): 36—40

Abstract

Objective: To probe the effect of intermittent aerobic exercise on adrenomedullin secretion of kidney in hypertensive nephropathy rat (HNR), and investigate the renal mechanism for exercise in the prevention and treatment of hypertension.

Method: Thirty-two HNRs were divided into two groups: intermittent exercise group (Group IAE) and control group (Group C). The IAE group performed intermittent treadmill exercise for 8 weeks and their blood pressure was measured before and after exercise by tail pressure of HNR, and serum ADM was detected by enzyme linked immunosorbent assay. Adrenomedullin (ADM) was expressed in kidney by immunohistochemistry. Quantification of specific receptor RAMP2 and CRLR in kidney ADM was detected by immunoblotting.

Result: The blood pressure in the Group IAE was significantly lower than that in the Group C ($P < 0.05$). The expression of ADM of kidney and serum in the Group IAE was obviously higher than that in the Group C. The quantity of RAMP2 and CRLR in kidney was obviously increased ($P < 0.05$).

Conclusion: Intermittent aerobic exercise increases serum ADM of HNR with the up-regulated expression of ADM in kidney and their specific receptor CRLR and RAMP2. The increase of serum ADM induced by intermittent aerobic exercise may be related to the change of ADM and the regulation of its specific receptor which may be one of the mechanisms for intermittent aerobic exercise in the prevention and treatment of hy-

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2018.01.007

1 赣南师范大学体育学院,江西省赣州市,341000

作者简介:李宏伟,男,博士,副教授;收稿日期:2017-02-13

pertension.

Author's address School of Sport Gannan Normal University, Ganzhou, 341000

Key word intermittent aerobic exercise; hypertensive nephropathy rat; adrenomedullin; specificity receptor of adrenomedullin

高血压致病因素作用的靶器官和最终损害造成脏器的衰竭,是高血压严重的并发症和导致患者死亡的主要原因。从降低血压和保护脏器的角度防治高血压是目前高血压的研究热点。间歇有氧运动(intermittent aerobic exercise, IAE)对心血管的保护作用前期进行了研究^[1-5],探讨了心肌肾上腺髓质素(adrenomedullin, ADM)的分泌特征,运动的影响。然而有关具体的运动方式、相关的机制及从运动对脏器保护的角度来进行研究,目前尚未见报道。我们前期的研究显示,IAE有良好的心血管保护及降压作用。IAE可诱导ADM的产生和释放,ADM是重要的心脏内源性保护物质^[4-7],它对心血管的保护作用,我们前期已经进行了广泛的研究。除此之外它还有降压作用:扩张冠状动脉,增加血流量;排钠、抑制醛固酮。IAE降压的肾性因素(肾脏保护作用)是否与ADM有关,目前尚未见文献报道。ADM作为配体必须与相应的特异性受体结合才能发挥作用。我们前期的研究^[6-7],IAE使ADM特异性受体——肾上腺髓质素受体活性修饰蛋白2(receptor activity modifying protein, RAMP2)和降钙素受体样受体(calcitonin receptor like receptor, CRLR)的基因及蛋白表达均上调。本研究在前期研究的基础上,以高血压肾病大鼠(hypertensive nephropathy rat, HNR)为研究对象,继续探讨ADM的作用,试图阐明其在IAE中的降压、脏器保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物及实验模型的建立

选取购于南昌大学动物实验中心28周龄SPF级雄性HNR大鼠37只。随机分为间歇有氧运动组(IAE组,21只)和对照组(C组,16只)。运动模型为IAE组的SHR以30m/min的跑速,间歇5min,重复3次,总时间55min,总共8周的负荷跑台训练^[8-12]。C组放在静止跑台同样时间。

1.2 动物取材

运动前断尾取血(-20℃)保存。运动结束以后,

各组HNR按1ml/100g体重以0.45%戊巴比妥钠为麻醉剂腹腔注射,麻醉成功后,SHR仰卧固定,打开腹腔,采取下腔静脉取血,取血液量为5ml,静置离心5000r/min,20min,离心,取血清,保存(-20℃)。开腹取肾脏,用冰浴生理盐水冲洗,经肾门处横断,一部分置多聚甲醛冷藏保存,另一部分投液氮中,最后转入冰箱保存(-80℃)。

1.3 收缩压测定

测定大鼠在运动开始的第1周及第8周的收缩压(每次测定的时间固定在上午8点钟):HNR在40℃左右预热20min,安静状态下尾压,间隔5min左右再测1次,一共测定3次,取其平均值。

1.4 血清ADM的测定

应用美国ADL公司生产的羊抗鼠ADM酶联免疫试剂盒(血清),酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清ADM含量。测定方法:将特异性的抗体包被在聚苯乙烯微量滴定板孔的内壁上,加入标准品或检测样品后孵育,样本中的ADM即与固相膜上的抗体结合,洗去未结合的反应物,加入显色剂孵育,上酶标仪读每个反应孔的颜色。严格按照试剂盒操作,并按照ADM标准品反应后的吸光度与初始浓度公式测出ADM含量。ADM标准品反应后的吸光度与初始浓度具有线性关系,确定系数 R^2 达到0.968, $P < 0.05$,回归方程 $Y = -88.0697 + 405.75X$ 。

1.5 肾脏免疫组织化学实验

IAE组和C组(各16只HNR大鼠,IAE组淘汰5只运动状态差的HNR大鼠),运动后应用免疫组织化学方法检测肾脏ADM表达,以肾脏着色强度为阳性表达。并应用计算机图像扫描技术对肾脏阳性表达进行半定量分析。方法:以4%多聚甲醛溶液固定肾脏标本,石蜡切片。应用SABC免疫组织化学染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司生产)及DAB(武汉博士德生物工程有限公司),按照试剂盒操作使用。

1.6 肾脏免疫印记实验

应用免疫印迹法检测IAE组运动后和C组(各16只HNR大鼠)肾脏ADM的特异性受体的定量。

方法:肾脏裂解液进行 SDS-PAGE 电泳,恒压转膜,BPS 封闭,分别加入羊抗 RAMP2(稀释比例 1:1500)和羊抗 CRLR(稀释比例 1:2000)室温孵育 150min(羊多克隆 RAMP2 及 CRLR 抗体购于美国 Santa Cruze 公司)。Western Blot 测总蛋白中 Beta-actin 表达,取电泳后获得的 SDS-PAGE 胶按湿转法要求进行转膜。按照 Marker 指示,图像用 Bandsan 灰度值分析;RAMP2 及 CRLR 相对表达量以其特异性结合条带灰度值与 Actin 条带的灰度值比值显示。

1.7 统计学分析

实验数据采用 SPSS 16.0 软件处理,所有数据均用平均数±标准差表示,组间比较采用两样本均数 *t* 检验,运动前后比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 收缩压的测定

IAE 组和 C 组在运动前收缩压(systolic pressure, SP)差异均不具有显著性意义($P > 0.05$);在运动后 IAE 组 SBP 降至(152 ± 13)mmHg(运动前 177 ± 12 mmHg)($P < 0.05$),而 C 组在 8 周后升至(174 ± 11)mmHg(运动前 172 ± 11 mmHg),差异具有显著性意

义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 血清 ADM 含量的测定

采用 ELISA 法测定血清中 ADM 的浓度。结果表明,IAE 组运动后血清中 ADM 的浓度明显高于运动前 IAE 组及 C 组,差异具有显著性意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 肾脏 ADM 表达

应用免疫组织化学方法检测肾脏 ADM 表达,以肾脏着色强度为阳性表达。运动后肾脏肾小球内皮细胞、近曲小管和远曲小管上皮细胞和系膜细胞中均有棕黄、浓染强于运动前的 ADM 表达。见图 1。

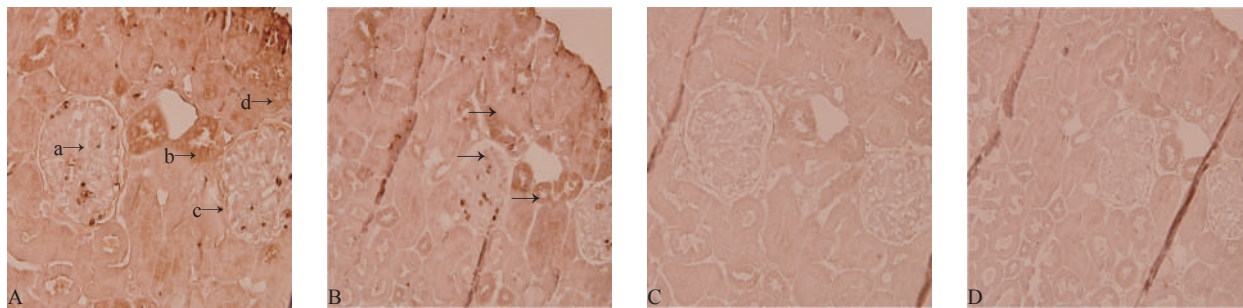
计算机图像半定量分析结果见表 2,IAE 组肾脏阳性面积及平均光密度均高于 C 组($P < 0.05$)。

2.4 Western Blot 分析各组蛋白结果

Western Blot 分析各组蛋白结果如图 2。可见 10kD 以上均有蛋白条带分布。蛋白主要集中在 30kD 以上的蛋白,10kD 以下的蛋白峰度较低。所得的图像用 Bandsan 软件进行灰度值分析;RAMP2 及 CRLR 蛋白相对表达量以其特异性结合条带灰度值与 Actin 结合条带的灰度值比值表示,结果见表 3。

图 1 两组肾脏肾上腺髓质素(ADM)表达

(SABC 免疫组织化学染色,×400)



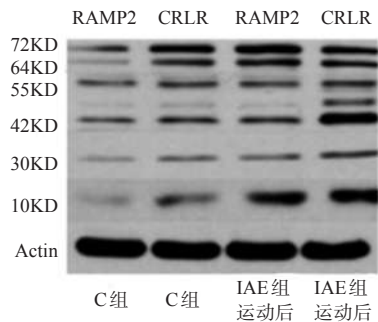
A、B 为运动后 ADM 在肾脏表达情况,可见 ADM 棕黄、浓染,增强表达分布于肾脏各部位;→ 显示 ADM 表达部位。
a 肾小球内皮细胞,b 近曲小管,c 远曲小管上皮细胞,d 系膜细胞; C、D 为对照组。

3 讨论

在肾脏中,ADM 免疫阳性颗粒分布于肾小球内皮细胞、近曲小管和远曲小管上皮细胞和系膜细胞,我们的研究与上述 ADM 的分布一致。关于运动对肾脏 ADM 的影响,国内外尚没有报道。但研究表明^[13-16],肾脏作为 ADM 的主要靶器官之一,缺氧时肾实质细胞和血管内皮细胞、血管平滑肌细胞 ADM mRNA 表达增加。运动时为保证重要生命器

官(如脑和心脏)和主要运动器官(如骨骼肌)的血液供应,体内血液重新分配,使肾血流量相对减少,为保证正常的肾功能,肾脏的保护因子 ADM 一定会发生适应性调整,表现为分泌和释放增加。我们的运动强度引起了肾脏 ADM 免疫阳性分布和量的变化,其特异性受体亦发生了上调反应。ADM 通过与 ADM 特异性受体结合以自分泌和(或)旁分泌的方式调节。ADM 对心血管的调节作用通过信号转导

图2 Western Blot分析各组蛋白



RAMP2, 肾上腺髓质素受体活性修饰蛋白2; CRLR, 降钙素受体样受体

表1 两组大鼠收缩压及血清肾上腺髓质素(ADM)比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	IAE组(n=16)		对照组(n=16)	
	运动前	运动后	实验前	实验后
SBP/mmHg	167±12	150±13 ^①	168±11	174±12
血清ADM含量	2.8050±0.6553	2.860±0.699 ^②	2.7910±0.645	2.7890±0.654

IAE组运动后与IAE组运动前比较:① $P < 0.05$; IAE组运动后与C组实验后比较:② $P < 0.05$

表2 两组大鼠肾脏免疫组织化学染色图像分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	视野数	肾脏阳性面积(μm^2)	肾脏平均光密度(MOD)
对照组	16	25	319.11±101.02	1655.85±310.88
IAE组	16	25	377.61±107.11 ^①	2071.71±312.77 ^①

与C组比较:① $P < 0.05$

表3 两组大鼠CRLR及RAMP2含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, 例)

组别	例数	受体	受体的相对含量
对照组	16	CRLR	0.89±0.31
		RAMP2	0.91±0.35
IAE组	16	CRLR	1.57±0.34 ^①
		RAMP2	1.66±0.58 ^①

与C组比较:① $P < 0.05$

完成, ADM与7次跨膜结构的G-蛋白偶联受体-CRLR(RAMP2)结合则为特异性ADM受体(RAMP2/CRLR)。ADM受体活化后主要通过:①升高cAMP浓度;②激活血管内皮细胞内磷脂酶C活性发挥作用。我们以往的研究ADM对心脏的保护作用说明间歇有氧运动促使心肌细胞、血管平滑肌细胞、内皮细胞合成和释放ADM作用于心肌局部,同时通过上调RAMP2和CRLR的mRNA和蛋白表达,实现信号转导而完成心肌细胞保护作用。那么,对HNR血压的影响是否也是这样,本研究表明,间歇有氧运动的降血压机制可能为,间歇有氧运

动的刺激启动了HNR肾脏CRLR和RAMP2的表达,ADM在肾脏的局部及血液外周增高。ADM(配体)与RAMP2和CRLR(特异性受体)结合,通过升高cAMP或激活血管内皮细胞内磷脂酶C或通过细胞外信号调节激酶PI3K/Akt的受体后信号转导产生降压作用。与ADM特异性受体结合后可通过激活腺苷酸环化酶、一氧化氮合成酶NOS等多种信号转导通路实现其扩张血管、排钠利尿、调节细胞增殖、迁移与分化等生理功能^[15]。随着运动强度的增加,ADM及其ADM受体系统的上调应该显得突出。研究表明,血压的调节主要牵涉以下机制:①通过强心作用,降低血压(中心机制);②通过舒张血管作用,降低血压(外周机制);③通过内分泌调节作用,减低血浆肾素—血管紧张素—醛固酮系统的血管收缩及降低水钠潴留作用,降低血压(内分泌机制)^[16];④长期运动使得某些影响高血压的危险因素,高血脂、高血液粘滞度和高体重的因素降低,降低血压作用(长期机制)^[16]。那么,是否有一种物质有此作用,间歇有氧运动降低血压的机制是否与此种物质有关。ADM是由52个氨基酸组成的多肽,心肌细胞和血管内皮细胞能产生和分泌该物质^[1-3]。ADM的第一个作用强心,降低血压(中心机制),我们前期已经进行了深入的研究^[4-7],间歇有氧运动方式使ADM在心肌和冠状血管生成和表达增多,对心脏产生了强心作用。本研究继续重复这样的运动方式,探讨这种运动方式是否也能对肾脏产生影响。本研究的结果,HNR间歇有氧运动8周后,SP明显下降($P < 0.05$),血清ADM明显升高($P < 0.05$),肾脏ADM表达增强($P < 0.05$),其特异性受体表达上调($P < 0.05$),显示3:1(运动:休息)的间歇有氧运动,强度中等,时间1h,坚持2个月,对肾脏ADM也产生同样的效果,显示这样的运动方式对肾脏产生良好的影响(血压下降)。有关ADM在外周组织的分布,多是应用放射免疫和Northern Blot杂交的方法证明的。我们应用免疫组织化学的方法发现,不仅在大鼠的心脏中存在ADM的免疫阳性颗粒,在肾脏也有ADM免疫阳性颗粒存在。我们和国外实验室的结果均提示,ADM不仅是肾上腺髓质和血管内皮细胞合成分泌的一种循环激素,它也是由肾小球内皮细胞,近曲小管和远曲小管上皮细胞

和系膜细胞分泌的一种局部激素,它可能以自分泌、旁分泌和胞内分泌的方式发挥其调节肾脏功能的作用。有研究表明,间歇有氧运动是一种效率比较高的运动形式,即便是在较低的负荷量运动时,间歇有氧运动时也可产生与传统的持续有氧运动一样的骨骼肌代谢方面的适应性变化及降压效果。我们的研究结果及前期的研究表明^[4-7],间歇有氧运动使ADM在心肌、冠状血管和肾脏表达增高,提示,心肌细胞、冠状血管内皮细胞和主动脉内皮细胞及平滑肌细胞可分泌ADM,通过自分泌、旁分泌和远距离的自我反馈和调节作用可以直接增强心肌细胞收缩力,扩张冠状动脉,降低冠脉血管阻力,对心肌细胞及血管产生保护作用并降低血压(中央机制),同时通过舒张主动脉降低血压(外周机制);其次,血液中ADM增加表明,心肌细胞和冠状血管内皮细胞分泌的ADM可以入血,借助远距离分泌调节外周血管,通过使外周血管的内皮细胞内NO增多,而产生骨骼肌、肺动脉及肾动脉的外周舒张血管,总的外周阻力下降和降压(外周机制)^[4-7,13-16];再次,通过内分泌调节作用(内分泌机制),通过减低血浆肾素—血管紧张素—醛固酮系统的血管收缩和水钠潴留作用而达到降压的效果。最后,ADM在调节肾脏泌尿功能方面起一定作用,ADM具有很强的促钠排泄及利尿功能,这与ADM能扩张肾动脉、增加肾血流量、增加肾小球滤过率及抑制远曲小管钠的重吸收有关,并通过这种方式降低血压,实现肾功能保护。

关于运动对肾脏ADM的影响还需进一步研究,本研究只研究了IAE对肾脏ADM的影响,也只探讨了中等强度,8周,3:1的IAE运动形式对肾脏的影响,在研究方法上也只采用了测血液ADM浓度,免疫组织化学半定量测定和显示肾脏ADM表达和应用免疫印迹法检测肾脏ADM特异性受体的定量。没有探讨不同运动强度和不同间歇对肾脏的影响以及靶器官如肺脏、肝脏的受损情况,受体后信号转导也没有探析。另外,本研究没有探讨运动停止后大鼠血压又升高与ADM的关系,也没有研究阻滞剂及其治疗作用,这些都是本研究的局限。进一步可研究IAE对不同脏器ADM的影响,通过设定不同运动强度和间歇时间探讨IAE对脏器保护的ADM机制,还可以研究ADM对高血压作用下血管

损害的保护作用,借助ADM阻断剂及受体阻断作用研究受体后信号转导机制,进一步揭示IAE的降压机制及对血管及脏器的保护作用及分子机制。

参考文献

- [1] Autelitano DJ, Ridings R, Tang F. Adrenomedullin is a regulated modulator of neonatal cardiomyocyte hypertrophy in vitro[J]. Cardiovasc Res, 2001, 51(2):255—264.
- [2] 白育庭,龙村,涂彬,等.肾上腺髓质素心肌保护的实验研究[J].中华胸心外科杂志,2003,19(2):103—105.
- [3] 曹彩霞,周丽敏,邢广群.肾上腺髓质素与器官保护及肾脏病研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2005,6(9):556.
- [4] 李宏伟,潘珊珊.短期和长期间歇运动对大鼠心肌和冠状血管肾上腺髓质素的影响[J].中国运动医学杂志,2009,28(4):395—397.
- [5] 李宏伟,潘珊珊.肾上腺髓质素在运动预适应诱导心肌细胞保护中的作用[J].上海体育学院学报,2009,33(6):45—49.
- [6] 李宏伟.间歇运动对肾上腺髓质素特异性受体基因表达的影响[J].体育学刊,2010,17(10):105—108.
- [7] 李宏伟.间歇运动对肾上腺髓质素特异性受体RAMP2及CRLR的影响[J].西安体育学院学报,2011,28(2):208—212.
- [8] Domenech R, Macho P, Schwarze H, et al. Exercise induces early and late myocardial preconditioning in dogs[J]. Cardiovasc Res, 2002, 55(3):561—566.
- [9] Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, et al. Repeated physiologic stresses provide persistent cardioprotection against ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Am Coll Cardiol, 2002, 40(4):826—831.
- [10] Paraskevaidis IA, Iliodromitis EK, Mavrogeni S, et al. Repeated exercise stress testing identifies early and late preconditioning[J]. Int J Cardiol, 2005, 98(2):221—226.
- [11] Ding YH, Young CN, Luan X, et al. Exercise preconditioning ameliorates inflammatory injury in ischemic rats during reperfusion[J]. Acta Neuropathol, 2005, 109(3):237—246.
- [12] Ding YH, Mrizek M, Lai Q, et al. Exercise preconditioning reduces brain damage and inhibits TNF- α receptor expression after hypoxia/reoxygenation: an in vivo and in vitro study[J]. Curr Neurovasc Res, 2006, 3(4):263—271.
- [13] Mukoyama M, Nagae T, Yokoi H, et al. Renal actions and renoprotective role of adrenomedullin[J]. Nihon Rinsho, 2004, 62(Suppl 9):237—241.
- [14] Tanaka M, Kitamura K, Ishizaka Y, et al. Plasma adrenomedullin in various diseases and exercise-induced change in adrenomedullin in healthy subjects[J]. Intern Med, 1995, 34(8):728—733.
- [15] Chun TH, Itoh H, Saito T, et al. Oxidative stress augments secretion of endothelium-derived relaxing peptides, C-type natriuretic peptide and adrenomedullin[J]. J Hypertens, 2000, 18(5):575—580.
- [16] Chini EN, Chini CC, Bolliger C, et al. Cytoprotective effects of adrenomedullin in glomerular cell injury: central role of cAMP signaling pathway[J]. Kidney Int, 1997, 52(4):917—925.