

# ERK1/2 参与自发性高血压大鼠离体血管环对 apelin-13 舒张反应性降低作用\*

刘厂辉<sup>1)\*\*</sup> 李新<sup>2)\*\*</sup> 陈锋<sup>2)\*\*</sup> 潘伟男<sup>2)</sup> 封芬<sup>2)</sup> 秦旭平<sup>2)</sup>  
李兰芳<sup>2)</sup> 苏桃<sup>2)</sup> 陈临溪<sup>2)\*\*\*</sup>

(<sup>1</sup>南华大学附属第一医院心内科, 衡阳 421001; <sup>2</sup>南华大学药物药理研究所, 衡阳 421001)

**摘要** 研究自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)离体血管环对 G 蛋白偶联受体 APJ 的内源性配体 apelin-13 的血管收缩与舒张反应及其与一氧化氮(NO)和 ERK1/2 通路关系. 采用离体血管环体外灌流方法用 Power-Lab 生物信息采集仪检测血管环的张力. 实验分组如下: 新福林(Phenylephrine, PE)组, 乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)组, apelin-13 组, apelin-13+PE 组, apelin-13+Ach 组, PD98059(ERK1/2 抑制剂)+PE 组, PD98059+Ach 组, LNNA(L-nitro-arginine, 硝基左旋精氨酸, 一氧化氮合酶抑制剂)+PE 组, LNNA+Ach 组, apelin-13(预孵育)+PD98059+PE 组, apelin-13(预孵育)+PD98059+Ach 组, apelin-13(预孵育)+LNNA+PE 组和 apelin-13(预孵育)+LNNA+Ach 组, 以 WKY 大鼠血管环为对照组. 培养大鼠血管平滑肌细胞, Western blot 检测 ERK1/2 蛋白表达. 结果显示: a. apelin-13 对于有内皮的血管表现出浓度依赖性舒张作用, 血管舒张百分比 SHR<WKY 大鼠, 而对于去除内皮血管, apelin-13 则表现出收缩血管的作用, 且收缩张力 SHR>WKY 大鼠, apelin-13 预孵育, 能减少 SHR 和 WKY 大鼠血管对新福林的缩血管反应性, 增加对乙酰胆碱的舒张反应性; b. NOS 抑制剂 LNNA 阻断 NO 形成后, 血管环对 apelin-13 的舒张反应明显抑制, 且 SHR 组较 WKY 组对 apelin 的舒张反应减少更明显, 提示 apelin-13 的舒血管效应至少部分依赖 NO 通路, 而 SHR 高血压大鼠 NO 通路障碍减弱了 apelin 对血管的舒张作用; c. ERK1/2 抑制剂 PD98059 预孵育后血管环对 apelin-13 表现出浓度依赖性的收缩, 与去除内皮后 apelin-13 的收缩血管效应趋势一致, 血管收缩张力 SHR>WKY 大鼠, PD98059 逆转了 apelin-13 引起的血管舒张效应; d. Apelin-13 促大鼠 VSMCs ERK1/2 磷酸化增加并呈剂量依赖性和时间依赖性, ERK1/2 抑制剂 PD98059 可以减少 apelin-13 诱导 ERK1/2 的磷酸化. 结果表明, 自发性高血压大鼠离体血管环对 apelin-13 舒张反应性降低, NO 通路和 ERK1/2 通路介导了 apelin-13 的舒张血管作用.

**关键词** apelin-13, APJ, 一氧化氮合酶, 自发性高血压大鼠, 细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)

**学科分类号** Q4, R36, R9

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00360

Apelin 是近年来发现的 APJ 受体(apelin-angiotensin receptor-like, APJ, 血管紧张素受体样受体)的配体, 能够引起血管舒张从而降低血压, 可能参与高血压形成, 引起了人们的广泛关注. 1993 年, O'Dowd 等<sup>[1]</sup>在人类基因中首次识别出受体 APJ, 由于不知其内源性配体, 称为孤儿 G 蛋白偶联受体(orphan G protein-coupled receptor, oGPCRs), 该受体与血管紧张素受体基因序列有 35%的同源性, 但不与血管紧张素 II 结合. 直到 1998 年, Tatemoto 等<sup>[2]</sup>以肽类分离和检测胞外基质 pH 值变化的方法从牛胃组织提取物中分离纯化出 APJ 的内源性配体 apelin. 依据肽段长短的不同,

apelin 可分为 apelin-13、apelin-36、apelin-37 等多种. 在众多的 apelin 中 apelin-13 的血管生物活性最强, 能明显地扩张血管, 引起血压的变化<sup>[3,4]</sup>. APJ/apelin 的结构在不同物种之间相似, 进化上高度保守, 其在人体的大部分组织均有分布, 如肺、

\* 国家自然科学基金项目(30901577)和湖南省教育厅优秀青年基金项目(03B036).

\*\* 共同第一作者.

\*\*\* 通讯联系人.

Tel: 0734-8281587, E-mail: chenlinxi@tom.com

收稿日期: 2009-06-09, 接受日期: 2009-07-22

心、骨骼肌、肾、脑和肝脏等,且二者的分布情况基本一致<sup>[5]</sup>。

近年来,有文献报道了一些 apelin 和 APJ 的心血管功能作用:在 APJ 受体缺陷型小鼠中,apelin 及一氧化氮(nitric oxide, NO)的扩血管、降血压效应丧失<sup>[6,7]</sup>,还可能引起动脉粥样硬化<sup>[8]</sup>;Tatemoto 等<sup>[9]</sup>报道给予大鼠 apelin 后,大鼠的平均动脉压呈剂量依赖性下降,同时血浆中亚硝酸盐/硝酸盐水平上升;经腹膜给 apelin 后,大鼠的短时饮水行为增加,对食物摄取、水平衡、体液平衡的中枢性调节有重要作用,apelin 能调节大鼠下丘脑室旁核和视上核血管加压素的释放<sup>[10~12]</sup>。这些都提示动物体内 apelin 可能具有扩张血管、拮抗血管紧张素、降低血压的作用,apelin-APJ 作为一种新发现的血管活性物质参与了血压的调节。虽然 apelin 与血管紧张素 1 型受体(AT<sub>1</sub>)不结合,但 APJ、apelin 和 AT<sub>1</sub>、血管紧张素 II 在组织分布上极其相似,同时 apelin 还能在血管紧张素转换酶(angiotensin I converting enzyme 2, ACE2)的作用下降解成无活性的产物,这些都提示 apelin 和血管紧张素 II 很可能影响相同或相关的生物学过程<sup>[13~16]</sup>。Apelin 的发现是对传统的肾素-血管紧张素-醛固酮系统(renin-angiotensin-aldosterone system, RAS)的一大补充与完善,它在心血管稳态的调节过程中很可能起重要的作用,可能具有重要的心血管生理和病理生理调节意义。

Apelin 在高血压的发生发展过程中发挥作用的机制十分复杂,探讨其信号通路对深入了解 apelin 及整个 RAS 系统有着重大的意义,本实验室以前研究发现,apelin-13 可通过细胞外信号调节激酶 1/2(extracellular regulated kinase1/2, ERK1/2)信号通路促大鼠血管平滑肌细胞增殖<sup>[17~19]</sup>;在大鼠心肌 APJ 受体随年龄增长表达增加,而 ERK1/2 及磷酸化 ERK1/2 随年龄增长表达减少,推测 APJ 受体及其 ERK1/2 途径可能与心脏的生长发育、衰老过程有关<sup>[20]</sup>。Zhong 等<sup>[21]</sup>发现,在糖尿病小鼠 apelin 可以通过磷酸化 eNOS 调节主动脉血管环对血管紧张素 II 和乙酰胆碱的张力反应。由此推测 apelin/APJ 系统可能通过 NO、ERK1/2 通路参与高血压形成。本实验采用自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR),WKY 大鼠(对照组),观察大鼠离体胸主动脉血管环对 apelin-13 的舒张反应性,采用一氧化氮合酶抑制剂硝基左旋精氨酸(LNNA)和 ERK1/2 通路抑制剂 PD98059 探讨

apelin-13 的血管生物学效应是否与 NO 和 ERK1/2 信号通路有关,采用培养的大鼠血管平滑肌细胞观察 apelin-13 对 ERK1/2 表达及磷酸化影响。本实验的结果对深入理解 apelin/APJ 系统的功能及其与高血压、动脉粥样硬化等疾病有重要意义,为 apelin/APJ 系统成为筛选新药的作用靶点提供新依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

实验动物:SHR 和 WKY 购自上海斯莱克实验动物中心。主要试剂:apelin-13 多肽(057-19)购自美国 Phoenix Biotech 公司;L-arginine 购自美国 Amresco 公司,(R)-(-)-phenylephrine hydrochloride, N-nitro-L-arginine 和 acetylcholine chloride 购自美国 Sigma 公司;2'-amino-3'-methoxyflavone 购自上海康成生物公司;其他均为国产分析纯。主要仪器:鼠尾测压仪(HX-1 型)购自中南大学湘雅医学院;Power-Lab 生理记录仪和桥式放大器与张力换能器购自澳大利亚 ADInstruments 公司,记录血管张力和数据分析采用 chart 5 软件。

### 1.2 动物的饲养和血压测量

SHR 和 WKY 都是从上海斯莱克实验动物中心购买,为同一批次 8 周大小雄性大鼠,在清洁级动物房饲养。每隔 3 天测一次血压,测血压都在当天上午 8:00~9:00 进行。先给大鼠换笼,用高瓦数灯泡进行照耀保温。将 HX-II 型小动物血压计和 BL-420 型生物信号机能系统(成都泰盟公司)连接在一起,采用无创性套尾法测定大鼠清醒状态下尾动脉收缩压。

### 1.3 大鼠主动脉环的获取

颈椎脱臼法处死大鼠,固定后从腹部起直至胸腔剪开,用沾有 pH 7.2 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)的棉花轻轻擦拭组织表面,清理视野。找到胸主动脉后两端用止血钳夹后剪断,迅速取出胸主动脉放入盛有缓慢充入混合气体(95% O<sub>2</sub>+5% CO<sub>2</sub>)的 4℃ kerb's 液培养皿中(用蒸馏水配成 10 倍的母液(mmol/L): NaCl 118, KCl 4.7, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 20, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.1 葡萄糖 4.5, CaCl<sub>2</sub> 1.25), NaHCO<sub>3</sub> 和葡萄糖在临用前加入,配成的溶液 pH 在 8.1~8.4 之间。在 4℃ 的环境中将血管在 kerb's 液中不停漂洗,尽量去除血管内残余血液,在不伤及血管壁的情况下用眼科剪小心剪去外周多余的结缔组织和脂肪组织。将胸主动脉剪成约 3 mm 长的动脉环放在已经通入

混合气体的 4°C korb's 液中备用.

### 1.4 血管环实验

实验时,先在血管槽中以 0 g 张力孵育血管,第 45 min 把血管环挂上张力换能器并调节微距至 0.0196 N (2 g)张力左右再稳定 45 min. 此后用 60 mol/L 的 KCl 刺激血管收缩,达到最大值稳定后冲洗,反复 2 次. 加药前 5 min 内张力没有较大下降并基本维持同一水平线时,则此时的张力就确定为此次实验的初始张力,然后按要求加药并记录. 一只大鼠胸主动脉可以做成 4~6 条血管环. 实验时其余的血管环应该置于普通冰箱 4°C 的环境下并浸泡在通有 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 混合气体的 korb's 液中保存,每隔 3 h 拿出通入混合气体后再置于冰箱. 一只大鼠的整个血管环实验在 16 h 内结束. 每次进行阻断剂实验后都要对管壁进行清洗,防止残存的阻断剂对下一步的实验产生影响. 去除血管内皮细胞实验前先使用细牙签小心地穿过血管环,用其侧壁轻轻地与血管内壁进行旋转摩擦,去除血管内皮细胞后再开始实验.

### 1.5 大鼠血管平滑肌细胞的培养

采用 Campbell JC 的组织贴块法培养大鼠血管平滑肌细胞. 无菌条件下分离 8 周雄性 SD 大鼠的胸主动脉,浸泡于装有适量无菌 PBS 液体的培养皿中清洗 2~3 次,轻轻剥除血管外膜、内膜和纤维结缔组织后,将血管中膜平滑肌层剪成 1 mm × 1 mm 大小的组织块,均匀摆布于培养瓶内,加入少量含 20% FBS 的 DMEM 培养液,置于 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 孵育箱中培养. 3~5 天换液一次,待细胞长至 70%~80%融合时用 0.25%胰蛋白酶消化传代,用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养. 显微镜观察:细胞呈长梭形或三角形,呈典型的“峰-谷”样生长,采用 SM α-actin 免疫组织化学方法鉴定大鼠血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs). 实验取第 5~10 代细胞.

### 1.6 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 13.0 for windows 软件进行分析,两样本均数比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为有统计学意义.

## 2 结 果

### 2.1 新福林、乙酰胆碱对自发性高血压大鼠血管环张力的影响

新福林( $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L)

能够使血管环明显收缩,收缩张力呈浓度依赖性增加,且 SHR 大鼠对新福林的收缩反应高于 WKY 对照组,新福林( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)时 SHR 大鼠血管收缩张力由对照组( $0.89 \pm 0.04$ ) g 增加至( $1.51 \pm 0.06$ ) g (*P* < 0.05, 图 1). 在  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 新福林的预刺激下,乙酰胆碱( $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L)对血管环有舒张作用,舒张百分率随乙酰胆碱浓度的升高呈浓度依赖性的增加,且 SHR 大鼠对乙酰胆碱的舒张反应低于 WKY 对照组,乙酰胆碱( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)时 SHR 大鼠血管最大舒张百分比由对照组( $76.58 \pm 5.54$ )% 减为( $53.59 \pm 5.34$ )% (*P* < 0.05, 图 2). 对比内皮存在血管环,去除内皮血管环在  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 新福林的预刺激下,对不同浓度的乙酰胆碱  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 不再表现出浓度依赖性的舒张,SHR 及其对照组 WKY 大鼠血管环在去除内皮后对乙酰胆碱的舒张作用均无反应,两者张力变化无显著性的差别(图 2). 由此可见,两种大鼠胸主动脉血管对新福林均表现出收缩反应,收缩张力 SHR 大鼠大于 WKY 大鼠. 对于乙酰胆碱两种大鼠血管均表现出内皮依赖性的舒张,SHR 大鼠的舒张百分率要小于 WKY 大鼠. 在去除血管内皮后,两种大鼠血管对乙酰胆碱的舒张反应明显变小,两者之间无显著差别.

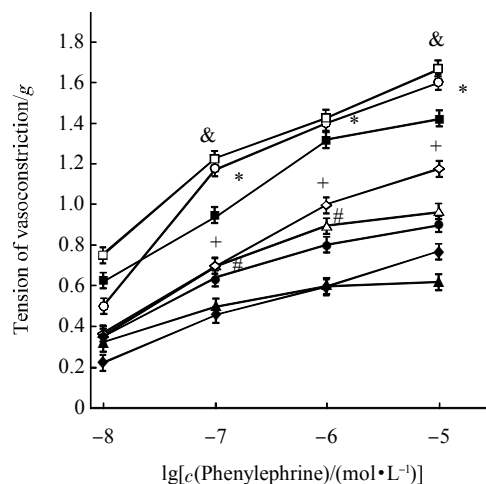
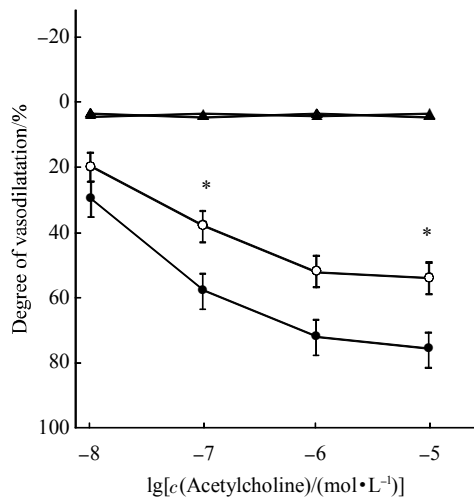


Fig. 1 Effects of phenylephrine on the tension of vasoconstriction in SHR and WKY

\**P* < 0.05, SHR vs WKY; #*P* < 0.05, PD98059-SHR vs PD98059; \**P* < 0.05, apelin-SHR vs apelin-WKY; &*P* < 0.05, LNNA-SHR vs LNNA-WKY.  $\bar{x} \pm s$ , *n* = 8. ●—●: WKY; ○—○: SHR; △—△: PD98059-SHR; ▲—▲: PD98059-WKY; ◆—◆: Apelin-WKY; ◇—◇: Apelin-SHR; ■—■: LNNA-WKY; □—□: LNNA-SHR.

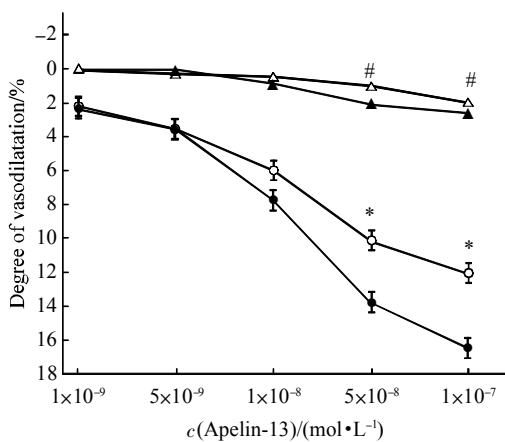


**Fig. 2** Effects of acetylcholine on the degree of vasodilatation in SHR and WKY

\* $P < 0.05$ , SHR vs WKY.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ . ●-●: SHR with endothelial; ○-○: WKY with endothelial; △-△: SHR without endothelial; ▲-▲: WKY without endothelial.

### 2.2 Apelin-13 对自发性高血压大鼠内皮完整和去内皮血管环张力影响

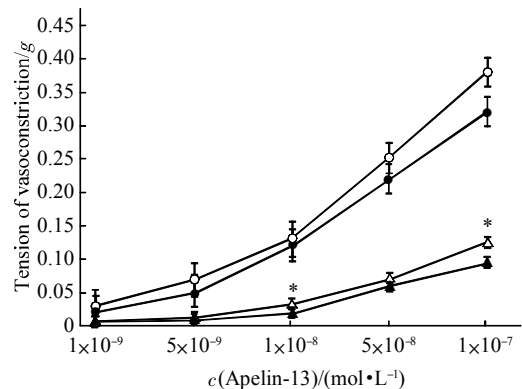
在  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 新福林的预刺激下, 两组大鼠血管环对 apelin-13 ( $1 \times 10^{-9}$ 、 $5 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $5 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L) 表现出浓度依赖性的舒张, 且 SHR 大鼠对 apelin-13 的舒张反应要低于 WKY 对照组, 在 apelin-13 ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L) 时, SHR 最大舒张百分比由 WKY 对照组 ( $16.49 \pm 0.63$ )% 减少至 ( $12.14 \pm 0.67$ )% ( $P < 0.05$ , 图 3)。去除内皮后, 两



**Fig. 3** Effects of apelin-13 on the degree of vasodilatation in SHR and WKY

\* $P < 0.05$ , SHR vs WKY; # $P < 0.05$ , LNNNA-SHR vs LNNNA-WKY.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ . ○-○: SHR; ●-●: WKY; △-△: SHR-LNNA; ▲-▲: WKY-LNNA.

组大鼠血管环对 apelin-13 ( $1 \times 10^{-9}$ 、 $5 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $5 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L) 表现出浓度依赖性的收缩, 且 SHR 大鼠对 apelin-13 的收缩反应略高于 WKY 对照组, apelin-13 ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L) 时 SHR 大鼠血管最大收缩张力由对照组 ( $0.32 \pm 0.06$ ) g 增加至 ( $0.38 \pm 0.09$ ) g, 但统计学无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 图 4)。由此可见, apelin-13 对于有内皮的血管表现出舒张血管的作用, 且舒张百分率 SHR 大鼠要低于 WKY 对照组大鼠, 而对于去除内皮的血管, apelin-13 则表现出收缩血管的作用, 且收缩张力 SHR 大鼠要高于 WKY 对照组, 结果提示 Apelin-13 是一种血管内皮依赖性的舒血管活性物质。



**Fig. 4** Effects of apelin-13 on the tension of vasoconstriction in SHR and WKY

\* $P < 0.05$ , PD98059-SHR vs PD98059-WKY.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 4$ . ●-●: WKY without endothelial; ○-○: SHR without endothelial; △-△: PD98059-SHR; ▲-▲: PD98059-WKY.

### 2.3 ERK1/2 抑制剂 PD98059 和 NOS 抑制剂 LNNNA 预孵育, apelin-13 对自发性高血压大鼠血管环张力的影响

用  $5 \times 10^{-5}$  mol/L ERK1/2 阻断剂 PD98059 预孵育血管环 30 min 后, 两组大鼠血管环对 apelin-13 ( $1 \times 10^{-9}$ 、 $5 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $5 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L) 表现出浓度依赖性的收缩, SHR 组大鼠血管环收缩要大于 WKY 对照组血管环收缩, apelin-13 ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L) 时 SHR 最大收缩张力由对照组 ( $0.095 \pm 0.006$ ) g 增至 ( $0.126 \pm 0.007$ ) g ( $P < 0.05$ , 图 4)。LNNNA  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 预孵育 SHR 及 WKY 血管 30 min 后, 两组大鼠血管环对 apelin-13 ( $1 \times 10^{-9}$ 、 $5 \times 10^{-9}$ 、 $1 \times 10^{-8}$ 、 $5 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$  mol/L) 表现出浓度依赖性的舒张, SHR 大鼠对 apelin-13 的舒张反应要低于 WKY 对照组, apelin-13 ( $1 \times 10^{-7}$  mol/L) 时 SHR 最大舒张百分比由对照组 ( $2.64 \pm 0.35$ )% 减至 ( $1.98 \pm 0.52$ )% ( $P < 0.05$ , 图 3)。两组大鼠在 apelin-13

的作用下, 对比用 LNNA 预孵育的血管环舒张百分率明显较没用 LNNA 预孵育的血管环舒张百分率要低(图 3). 由此可见, PD98059 预孵育后的血管对于 apelin-13 表现出浓度依赖性收缩, 与去除内皮后 apelin-13 的血管效应趋势一致, SHR 组大鼠血管收缩张力要大于 WKY 对照组血管. LNNA 预孵育后的血管仍对 apelin-13 表现出舒张, SHR 大鼠血管环舒张百分率要比 WKY 对照组小, 且对比舒张幅度明显较没有 LNNA 预孵育的同型血管要小.

### 2.4 Apelin-13 预孵育后, 新福林、乙酰胆碱对自发性高血压大鼠血管环张力的影响

Apelin-13  $1 \times 10^{-8}$  mol/L 预孵育血管 30 min 后, 血管环在新福林( $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L)作用下表现出浓度依赖性收缩, 且 SHR 大鼠的收缩反应高于 WKY 对照组,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 新福林时 SHR 大鼠血管最大收缩力由对照组 ( $0.77 \pm 0.07$ ) g 增至 ( $1.18 \pm 0.05$ ) g ( $P < 0.05$ , 图 1). 对比无 apelin-13 预孵育的血管环, apelin-13 预孵育后的血管对新福林的收缩反应明显变小, 且无论 apelin-13 预孵育与否, SHR 对新福林的收缩张力比 WKY 都要大(图 1).  $1 \times 10^{-8}$  mol/L apelin-13 预孵育血管 30 min 后在  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 新福林的刺激下, 大鼠血管环对乙酰胆碱( $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L)表现出浓度依赖性舒张, SHR 大鼠舒张百分率要低于 WKY 对照组,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 乙酰胆碱时 SHR 最大舒张百分比由对照组

( $81.06 \pm 5.38$ )% 降低至 ( $55.14 \pm 4.92$ )% ( $P < 0.05$ , 图 5). 对比无 apelin-13 预孵育的血管环, apelin-13 预孵育后的血管在新福林刺激下对乙酰胆碱的收缩百分率变大(图 5). 由此可见, apelin-13 预孵育后, 两组大鼠的血管环在新福林的作用下虽然都表现出收缩反应, 但收缩张力对比无 apelin-13 预孵育的血管张力偏小. Apelin-13 预孵育后两组大鼠的血管环在乙酰胆碱的作用下, 其舒张百分率都较无 apelin-13 预孵育的血管有所增高. 在内皮存在的情况下 apelin-13 对新福林引起的血管收缩反应有一定的拮抗作用, 对乙酰胆碱引起的血管舒张作用有协同效应.

### 2.5 ERK1/2 抑制剂 PD98059 和 NOS 抑制剂 LNNA 预孵育后新福林、乙酰胆碱对自发性高血压大鼠血管环张力的影响

PD98059  $5 \times 10^{-5}$  mol/L 预孵育血管 30 min 后, 两组大鼠主动脉环在新福林  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 刺激下的收缩张力表现出浓度依赖性增加, SHR 大鼠对新福林的收缩反应高于 WKY 对照组,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 新福林时 SHR 最大收缩张力由对照组 ( $0.67 \pm 0.06$ ) g 增至 ( $0.97 \pm 0.04$ ) g ( $P < 0.05$ , 图 1). PD98059 预孵育后 SHR 及 WKY 大鼠血管对 PE 的收缩张力均显著低于无 PD98059 孵育的同类型血管(图 1).  $5 \times 10^{-5}$  mol/L PD98059 预孵育血管 0.5 h 后, 在  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 新福林的预刺激下 SHR 大鼠对乙酰胆碱  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 的舒张反应低于 WKY 对照组,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 乙酰胆碱时 SHR 最大舒张百分比由对照组 ( $91.85 \pm 4.67$ )% 减至 ( $73.68 \pm 5.35$ )% ( $P < 0.05$ , 图 6). 对比无 PD98059 孵育的血管, PD98059 预孵育后 SHR 及 WKY 大鼠血管环对 Ach 的舒张反应均大于无 PD98059 孵育的同类型血管(图 6).  $1 \times 10^{-4}$  mol/L LNNA 预孵育血管 30 min 后, 两组大鼠主动脉环在新福林  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 刺激下的收缩张力表现出浓度依赖性增加, SHR 大鼠对新福林的收缩反应高于 WKY 对照组,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 新福林时 SHR 最大收缩张力由 ( $1.43 \pm 0.34$ ) g 增加至 ( $1.67 \pm 0.36$ ) g ( $P < 0.05$ , 图 1). LNNA 预孵育后 SHR 及 WKY 大鼠血管对 PE 的收缩反应均大于无 LNNA 孵育的同类型血管.  $1 \times 10^{-4}$  mol/L LNNA 预孵育血管后, 在  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 新福林的预刺激下, SHR 大鼠对乙酰胆碱  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 舒张反应低于 WKY 对照组, 乙酰胆碱 ( $1 \times 10^{-5}$  mol/L)

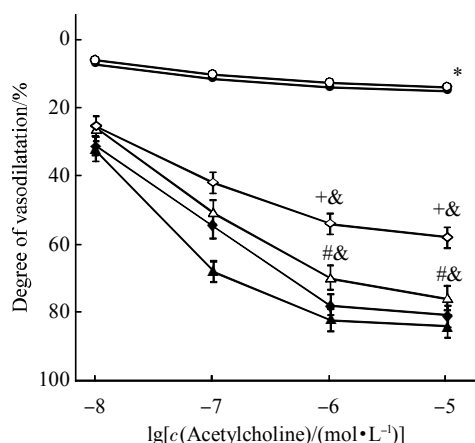


Fig. 5 Effects of acetylcholine on the degree of vasodilatation in SHR and WKY

\* $P < 0.05$ , apelin-LNNA-SHR vs apelin-LNNA-WKY; # $P < 0.05$ , apelin-PD98059-SHR vs apelin-PD98059-WKY; \* $P < 0.05$ , apelin-SHR vs apelin-WKY; & $P < 0.01$ , vs apelin-SHR.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ . ●—● Apelin-LNNA-WKY; ○—○ Apelin-LNNA-SHR; ▲—▲ Apelin-PD98059-WKY; △—△ Apelin-PD98059-SHR; ◆—◆ Apelin-WKY; ◇—◇ Apelin-SHR.

时 SHR 最大舒张百分比由  $(14.39 \pm 0.65)\%$  减为  $(13.52 \pm 0.53)\%$  ( $P < 0.05$ , 图 6). 由此可见, 与直接用血管活性物质刺激的血管环实验进行对比可以发现: ERK1/2 通路抑制剂 PD98059 可以抑制血管环对 PE 的收缩反应, 增加血管对 Ach 的舒张反应. NOS 抑制剂 LNNA 可以使血管对 PE 的收缩反应性增强, 并抑制 Ach 的血管舒张作用.

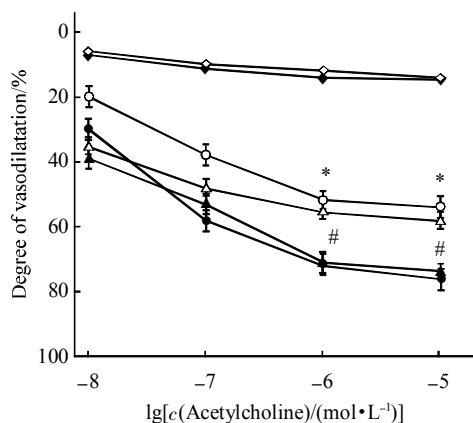


Fig. 6 Effects of acetylcholine on the degree of vasodilatation in SHR and WKY

\* $P < 0.05$ , SHR vs WKY; # $P < 0.05$ , PD98059-SHR vs PD98059-WKY.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ .  $\Delta$ - $\Delta$ : PD98059-SHR;  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ : PD98059-WKY;  $\circ$ - $\circ$ : SHR;  $\bullet$ - $\bullet$ : WKY;  $\diamond$ - $\diamond$ : LNNA-SHR;  $\blacklozenge$ - $\blacklozenge$ : LNNA-WKY.

## 2.6 Apelin-13 分别与 ERK1/2 抑制剂 PD98059 和 NOS 抑制剂 LNNA 共同预孵育血管后, 新福林、乙酰胆碱对血管的影响

$1 \times 10^{-8}$  mol/L apelin-13 和  $5 \times 10^{-5}$  mol/L PD98059 共同预孵育血管 30 min 后, 血管环在新福林  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 刺激下的收缩张力表现出浓度依赖性增加, SHR 大鼠对新福林的收缩反应高于 WKY 对照组,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 新福林时 SHR 最大收缩张力由对照组  $(0.70 \pm 0.59)$  g 增加至  $(1.00 \pm 0.45)$  g ( $P < 0.05$ , 图 7). 对比单独用 PD98059 预孵育的血管, apelin-13 与 PD98059 共同预孵育后 SHR 及 WKY 大鼠血管环对 PE 的收缩反应要大于 PD98059 单独孵育的同类型血管.  $1 \times 10^{-8}$  mol/L apelin-13 和  $5 \times 10^{-5}$  mol/L PD98059 共同预孵育血管 30 min 后, 在  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 新福林的预刺激下血管对乙酰胆碱  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 表现出浓度依赖性舒张, 舒张百分率 SHR 大鼠低

于 WKY 对照组,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 乙酰胆碱时 SHR 最大舒张百分比由对照组  $(86.03 \pm 4.67)\%$  减至  $(76.19 \pm 5.35)\%$  ( $P < 0.05$ , 图 5). Apelin-13 与 PD98059 共同预孵育后的 SHR 及 WKY 大鼠血管对 Ach 的舒张反应与 PD98059 单独孵育的同类型血管比较差异不大,  $1 \times 10^{-8}$  mol/L apelin-13 和  $1 \times 10^{-4}$  mol/L LNNA 共同预孵育血管 30 min 后, 血管环在新福林  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 刺激下的收缩张力表现出浓度依赖性增加, SHR 大鼠对新福林的收缩反应高于 WKY 对照组,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 新福林时 SHR 最大收缩张力由  $(1.37 \pm 0.69)$  g 增加至  $(1.70 \pm 0.87)$  g ( $P < 0.05$ , 图 7).  $1 \times 10^{-8}$  mol/L apelin-13 和 LNNA  $10^{-4}$  mol/L 共同预孵育血管 30 min 后, 在  $1 \times 10^{-6}$  mol/L 新福林的预刺激下血管对乙酰胆碱  $1 \times 10^{-8}$ 、 $1 \times 10^{-7}$ 、 $1 \times 10^{-6}$ 、 $1 \times 10^{-5}$  mol/L 表现出浓度依赖性舒张(图 5), SHR 大鼠对乙酰胆碱的舒张反应低于 WKY 对照组,  $1 \times 10^{-5}$  mol/L 乙酰胆碱时 SHR 最大舒张百分比由  $(14.90 \pm 0.44)\%$  减为  $(13.64 \pm 0.61)\%$  ( $P < 0.05$ , 图 5). Apelin-13 与 LNNA 共同孵育后 SHR 及 WKY 大鼠血管对 Ach 的舒张反应要大于 LNNA 单独孵育的同类型血管, 随着 Ach 浓度的增加舒张度变大. 由此可见, PD98059 和 LNNA 作为 ERK1/2 和 NO 通路抑制剂在预孵育血管过程中对 apelin-13 的血管生物学效应产生影响, 对比 PD98059 单独孵育的血管,

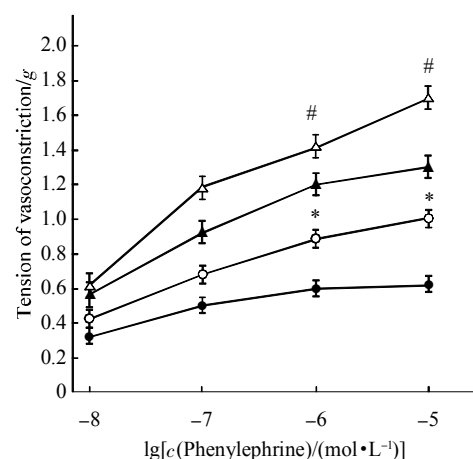


Fig. 7 Effects of phenylephrine on the tension of vasoconstriction in SHR and WKY

\* $P < 0.05$ , apelin-PD98059-SHR vs apelin-PD98059-WKY; # $P < 0.05$ , apelin-LNNA-SHR vs apelin-LNNA-WKY.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ .  $\bullet$ - $\bullet$ : Apelin-PD98059-WKY;  $\circ$ - $\circ$ : Apelin-PD98059-SHR;  $\blacktriangle$ - $\blacktriangle$ : Apelin-LNNA-WKY;  $\diamond$ - $\diamond$ : Apelin-LNNA-SHR.

PD98059 和 apelin-13 共孵育后使 PE 对血管的收缩作用增强, 对比 LNNA 单独孵育的血管, LNNA 和 apelin-13 共孵育后使 PE 对血管的收缩作用减弱, 而 Ach 的舒张血管效应得到加强.

### 2.7 Apelin-13 对大鼠 VSMCs ERK1/2 磷酸化的量效和时效变化

分别用 0、0.5、1、2、4  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13, 10% FBS 和 1  $\mu\text{mol/L}$  Ang II 刺激大鼠 VSMCs, 24 h 后收集蛋白质, Western blot 结果显示, ERK1/2 磷酸化增加并呈剂量依赖性, 而 ERK1/2 无明显变化(图 8). 用 2  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13 刺激大鼠 VSMCs 0、0.5、1、2、4、6、8、12 和 24 h 后, 收集蛋白质, Western blot 结果显示, ERK1/2 磷酸化在 4 h 表达最高, 之后逐渐降低, 并且 24 h 时间点的磷酸化仍高于 0 h 对照组, 而 ERK1/2 无明显变化(图 9). 用 ERK1/2 抑制剂 PD98059 10  $\mu\text{mol/L}$  预孵育 VSMCs 30 min 后, 再用 2  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13 刺激 4 h 后, 收集蛋白质, Western blot 结果显示, PD98059 可以抑制 apelin-13 诱导的 ERK1/2 磷酸化, 对 ERK1/2 影响不明显(图 10).

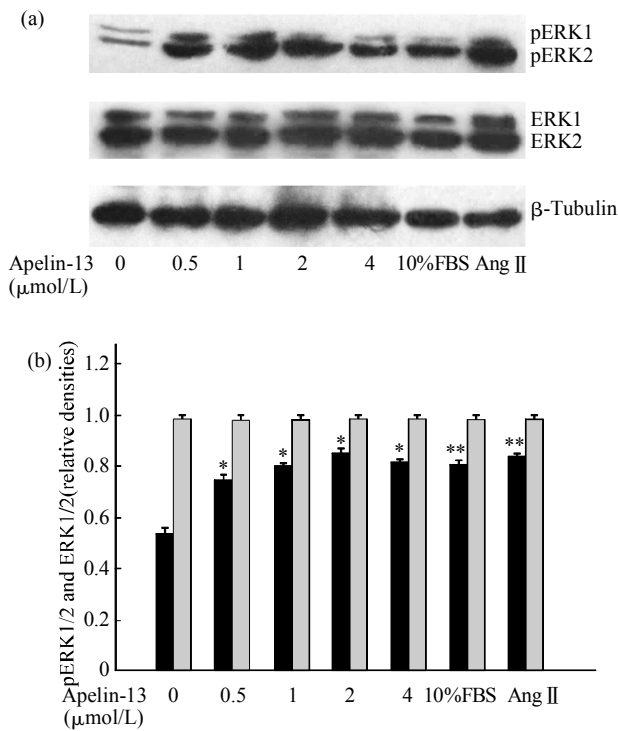


Fig. 8 Dose effects of apelin-13 on expression of pERK1/2 and ERK1/2 in VSMCs

\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$ , vs 0  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ■: pERK1/2; □: ERK1/2.

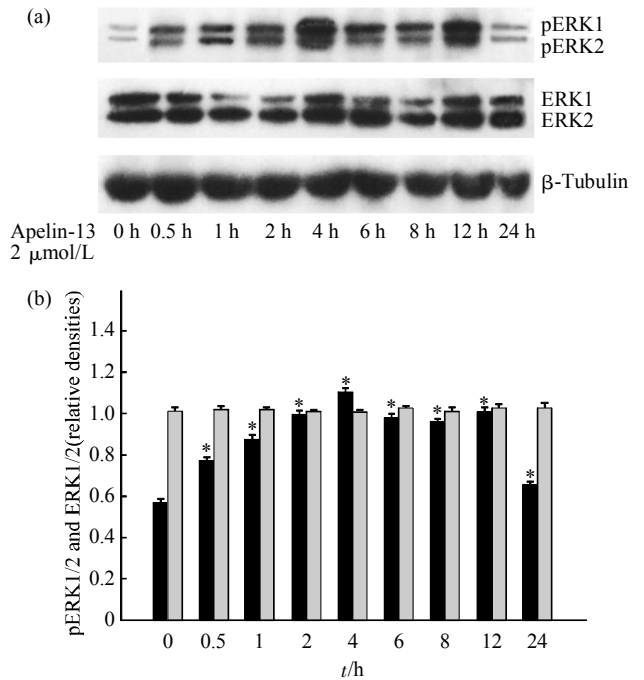


Fig. 9 Time effects of apelin-13 on expression of pERK1/2 and ERK1/2 in VSMCs

\* $P < 0.01$ , vs 2  $\mu\text{mol/L}$  apelin-13 0 h.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ■: pERK1/2; □: ERK1/2.

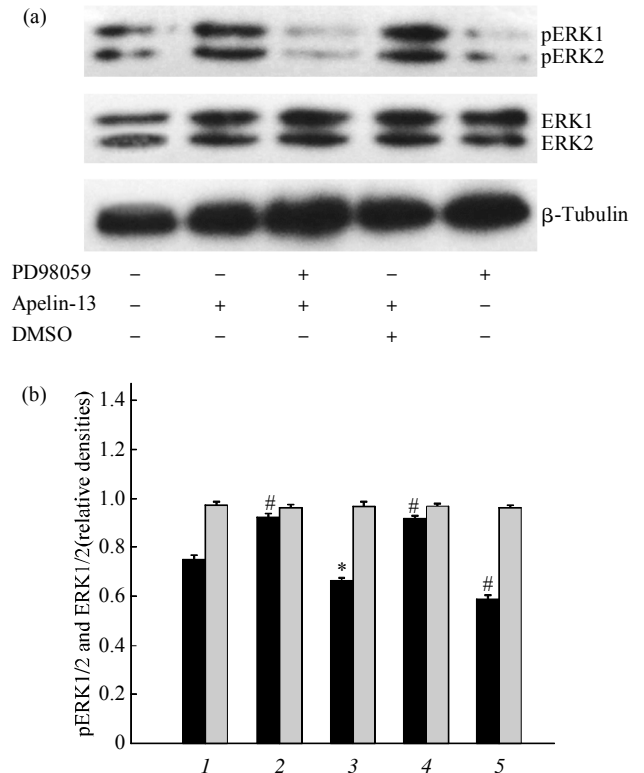


Fig. 10 Effects of PD98059 on pERK1/2 and ERK1/2 activities induced by apelin-13 in VSMCs

\* $P < 0.01$ , vs apelin-13; # $P < 0.05$  vs control.  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ . ■: pERK1/2; □: ERK1/2. 1: Control; 2: Apelin-13; 3: PD98059 + apelin-13; 4: DMSO + apelin-13; 5: PD98059.

### 3 讨 论

以前的实验发现,活体大鼠尾静脉注射 apelin 后能够引起血管舒张从而降低血压, apelin 可能参与高血压形成,从而引起了人们的广泛关注. APJ 和 apelin 在人体的大部分组织,如肺、心、骨骼肌、肾、脑和肝脏等均有分布,且二者的分布情况基本一致<sup>[1]</sup>. 近来发现,安装左心室辅助装置的病人心室肌标本 APJ 基因明显上调<sup>[2]</sup>, apelin 在冠状动脉内皮和心肌组织有高表达,而且发现,在左心衰竭的病人血浆中 apelin 及 apelin mRNA 水平明显增加,说明 apelin、APJ 受体在人慢性心衰过程中有重要的病理生理学意义. 前期实验证实,外周静脉注射 apelin 可降低正常大鼠血压,其特点表现为降低血压的同时不影响心率,且动脉压力感受性反射敏感度降低. 本课题中大鼠胸主动脉血管在离体培养的情况下, apelin 均能够舒张 SHR 及 WKY 大鼠胸主动脉,从而进一步证实 apelin 是一种降血压活性物质,它的降血压作用可以通过舒张血管来完成.

目前对 apelin 的信号转导通路还不十分清楚. 有人从 mRNA 和蛋白质水平证实了 APJ 和 apelin 在血管平滑肌有表达. Apelin 可与血管内皮层的 APJ 受体结合激活一氧化氮合酶(NOS),释放 NO 引起血管舒张,降低大鼠平均动脉血压<sup>[6,7]</sup>. 但有人发现 apelin 与 VSMCs 内 APJ 结合后,产生的直接效应是使血管收缩,是一种潜在的血管收缩因子. 此外, apelin 对于剥除内皮的离体隐静脉也具有较弱的收缩血管作用,其作用强度与 Ang II 相当<sup>[23]</sup>. Tatsuo 等进一步研究发现, apelin-APJ 信号与 Gi 蛋白结合后,可激活蛋白激酶 C(PKC)、Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 离子交换泵等而使肌球蛋白轻链磷酸化从而引起平滑肌收缩<sup>[24]</sup>. 本实验发现, apelin-13 对于有内皮的血管表现出浓度依赖性舒张作用,而对于去除内皮血管, apelin-13 则表现出收缩血管的作用,提示 apelin 的扩血管作用是内皮依赖性的,在去除内皮的血管中 apelin 表现出较强的收缩血管作用,因此对于血管平滑肌来说, apelin 实际上是一种缩血管物质而非扩血管物质,但是在有内皮存在时,由于血管内皮中的 APJ 受体经自分泌形式激活,导致 NO 扩血管物质的释放,从而拮抗和掩盖了 apelin 的缩血管效应.

丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)是一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶.

MAPK 信号通路是广泛存在于真核细胞内的一条重要信号转导通路,参与调节细胞的分化、增生、分裂和凋亡等过程. MAPK 共有三条主要通路,其中细胞外信号调节激酶 ERK1/2 通路是最主要的一条. 通过大鼠肠系膜上动脉离体实验,有人提出 ERK1/2 的通路活化可以导致 Ca<sup>2+</sup> 的内流,引起血管平滑肌的收缩. Apelin 可通过诱导激活 Ras-ERK1/2 信号途径增强心肌收缩效应. 在高血压心衰过程中,随着心衰过程的进展 ERK1/2 表达增加, ERK1/2 的促增殖作用导致心肌肥厚的发生,最终演变成充血性心衰. 因此猜测高血压过程中随着血压的增高, apelin 的增加聚集导致 ERK1/2 表达的上调,有可能通过某种方式使 eNOS-NO 受损,导致血管舒张功能受损. 但是 Wu 等<sup>[25]</sup>在研究脊髓电刺激疗法(spinal cord stimulation, SCS)改善骨端局部缺血患者的外周血液循环机制时,将单极球电极置于大鼠腰椎的 2~3 脊髓的左背柱,用激光多普勒血流成像仪(laser doppler perfusion imager, LDPI)监测左右两侧表皮的血流量,结果发现, ERK 抑制剂 U0126 和磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)的特异性抑制剂 LY294002 大大衰减 SCS 诱导血管舒张反应,表明 ERK 和 AKT 都参与 SCS 诱导血管舒张功能. 血管生成和血管舒张是控制胎盘血流量的两个关键过程,它们直接参与胎儿生长发育、胎儿的生存以及新生儿出生体重. 成纤维细胞生长因子-2(fibroblast growth factor-2, FGF2)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在调节胎盘血管生成起关键作用, Zheng 等<sup>[26]</sup>发现具有强舒血管作用的 NO 是通过 NO/cGMP/ERK1/2 介导了 FGF2 诱导的血管生成. 本实验发现, ERK1/2 抑制剂 PD98059 预孵育后血管环对 apelin-13 表现出浓度依赖性的收缩,与去除内皮后 apelin-13 的收缩血管效应趋势一致,血管收缩张力 SHR > WKY 大鼠, PD98059 逆转了 apelin-13 引起的血管舒张效应.

实验发现, apelin-13 不但能舒张含内皮血管,而且对比 WKY 大鼠, apelin-13 对 SHR 大鼠的舒张血管作用显著减弱. Apelin 是依赖于血管内皮发挥舒张血管效应的物质. 提示,高血压过程中,高血压可能导致血管内皮细胞功能障碍,由于 apelin 对血管张力的调节是通过内皮细胞释放 NO 而引起, eNOS 活性的相对不足或 NO 释放障碍可能是高血压大鼠血管对 apelin 反应性减弱的重要原因之



一, 在高血压的形成和发展过程中可能起一定作用. 同时 apelin-13 能够舒张含内皮的胸主动脉血管, 对于 LNNA 孵育过的含内皮血管, apelin-13 的舒张血管作用明显减小. 同浓度同时间 LNNA 孵育后, SHR 血管环对 apelin-13 的舒张作用相对比 WKY 减小, 这进一步说明 apelin 是通过激活血管组织 NOS/NO 系统促使 NO 生成, 最终引起血管的扩张. Apelin 舒张血管效应的实现需要通过 NO 通路, 高血压大鼠血管 apelin/APJ 的 NO 信号途径障碍造成了高血压大鼠血管舒张反应性降低. 为进一步认识 apelin-13 在高血压状态下的信号传导机制, 应用细胞外信号调节激酶 ERK1/2 抑制剂 PD98059, 观察 PD98059 对 apelin-13 诱导血管平滑肌张力变化的影响. 用 PD98059 预孵育血管环后, 再以 apelin-13 刺激血管环, 结果发现, 对比 apelin-13 单独作用血管环时表现出的舒血管效应, 加了阻断剂后血管环对 apelin-13 表现出浓度依赖性的收缩反应与去血管内皮后 apelin-13 表现出的缩血管效应相似. 另外, 新福林呈浓度性收缩血管, 在 SHR 和 WKY 大鼠中最大收缩反应值 ( $R_{max}$ ) 相似, 但是 SHR 大鼠的半数最大收缩有效浓度 ( $EC_{50}$ ) 比 WKY 大鼠的要低 ( $(1.10 \pm 0.14)$  versus  $(1.89 \pm 0.33) \mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.05$ )<sup>[27]</sup>. 乙酰胆碱内皮依赖性舒张正常血压 WKY 大鼠的主动脉, 这是通过内皮释放内皮依赖性超极化因子和 NO 介导的, 而且该反应对环氧合酶的抑制作用不敏感, 但是在 SHR 大鼠中因为伴随释放环氧依赖性收缩因子所以使乙酰胆碱内皮依赖性舒张血管作用减弱<sup>[28]</sup>, 这些跟本实验结果也相吻合. 在血管环实验中我们发现, 使用 ERK1/2 特异性抑制剂 PD98059 可以抑制 apelin-13 舒张血管的作用, 说明 ERK1/2 可能参与了该过程. 为了进一步证实该结论, 我们进行了相关细胞实验, 通过 Western blot 实验结果发现, apelin-13 使 ERK1/2 磷酸化增加, 而 PD98059 可以抑制 apelin-13 促 ERK1/2 磷酸化. 从动物和细胞两个水平都证实了 ERK1/2 参与了 apelin-13 的舒张血管作用.

综合上述结果, 本课题通过 SHR 和 WKY 大鼠离体主动脉环实验探讨了 apelin-13 在高血压状态下的作用, 并初步论证了 NO、ERK1/2 信号通路在 apelin-13 舒张高血压大鼠血管中的作用. 新发现高血压发生发展过程中, 血管对 apelin-13 的舒张反应性障碍是高血压大鼠血管舒张能力不足、血压升高的原因之一. 实验过程中发现并进一步证

明, apelin-13 的舒血管效应可以通过 apelin-13-NOS-NO 通路实现, 高血压状态下血管的 apelin/APJ 的 NO 信号途径障碍参与了高血压大鼠血管舒张反应性降低. 本实验首次发现了 ERK1/2 信号通路在介导 apelin-13 舒张大鼠血管平滑肌过程中起到了重要的作用, ERK1/2 通路被阻断后 apelin-13 的舒张血管作用被完全抑制, 血管表现出收缩效应. 对 apelin/APJ 系统的 NO, ERK1/2 信号通路进行深入的研究, 有利于为高血压、动脉粥样硬化等疾病的防治寻找新的药物作用途径和靶点.

### 参 考 文 献

- O'Dowd B F, Heiber M, Chan A, *et al.* A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene*, 1993, **136**(1~2): 355~360
- Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, *et al.* Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **251**(2): 471~476
- Japp A G, Newby D E. The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem Pharmacol*, 2008, **75**(10): 82~92
- Japp A G, Cruden N L, Amer D A, *et al.* Vascular effects of apelin *in vivo* in Man. *J Am Coll Cardiol*, 2008, **52**(11): 908~913
- 李兰芳, 封 芬, 潘伟男, 等. APJ 受体内源性配基 apelin 的组织分布及对血压的影响. *中国现代医学杂志*, 2007, **17**(12): 442~445
- Li L F, Feng F, Pan W N, *et al.* *China Journal of Modern Medicine*, 2007, **17**(12): 442~445
- 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 Biol Chem*, 2004, **279** (25): 274~279
- Kuba K, Zhang L Y, Penninger J M, *et al.* Impaired heart contractility in apelin gene-deficient mice associated with aging and pressure overload. *Circulation Research*, 2007, **101**(4): 32~42
- Kojima Y, Ramendra K, Thomas Q, *et al.* Abstract 3756: atherosclerosis development is increased in apelin/apoe double knockout mice. *Circulation*, 2008, **118**(10): S\_481
- O'Shea M, Tatemoto K, Morris M J, *et al.* Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr Neurosci*, 2003, **6**(3): 163~167
- Yamamoto K, Ohishi M, Ogihara T, *et al.* Deletion of angiotensin-converting enzyme 2 accelerates pressure overload-induced cardiac dysfunction by increasing local angiotensin II. *Hypertension*, 2006, **47**(4): 718~726
- Donoghue M, Wakimoto H, Maguire C T, *et al.* Heart block, ventricular tachycardia, and sudden death in ACE2 transgenic mice with downregulated connexins. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, **35** (9): 1043~1053

- 12 Ferrario C M. Commentary on tikellis *et al*: there is more to discover about angiotensin-converting enzyme. *Hypertension*, 2003, **41** (3): 390~391
- 13 Maia L G, Ramos M C, Fernandes L, *et al*. Angiotensin (1-7) antagonist A-779 attenuates the potentiation of bradykinin by captopril in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, **43**(5): 685~691
- 14 Brit R, Mihail T, Michael B, *et al*. Transgenic angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in vessels of SHRSP rats reduces blood pressure and improves endothelial function. *Hypertension*, 2008, **52**(5): 967~973
- 15 Diz D I, Garcia-Espinosa M A, Gallagher P E, *et al*. Injections of angiotensin -converting enzyme 2 inhibitor MLN4760 into nucleus tractus solitarii reduce baroreceptor reflex sensitivity for heart rate control in rats. *Exp Physiol*, 2008, **93**(4): 694~700
- 16 Neves L A A, Kathryn S, Brosnihan K B, *et al*. ACE2 and ANG-(1-7) in the rat uterus during early and late gestation. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, 2008, **294**(1): 151~161
- 17 潘伟男, 封芬, 陈锋, 等. Apelin-13 促大鼠血管平滑肌细胞增殖的 PKC-ERK1/2 信号通路研究. *中国药理学通报*, 2008, **24**(2): 214~218  
Pan W N, Feng F, Chen F, *et al*. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2008, **24**(2): 214~218
- 18 李峰, 李兰芳, 秦旭平, 等. Apelin-13 刺激大鼠血管平滑肌细胞增殖. *基础医学与临床*, 2008, **28**(1): 10~12  
Li F, Li L F, Qin X P, *et al*. *Basic & Clinical Medicine*, 2008, **28**(1): 10~12
- 19 Li F, Li L F, Chen L X, *et al*. Apelin-induced vascular smooth muscle cell proliferation: the regulation of cyclin D1. *Front Biosci*, 2008, **13**(1): 3786~3792
- 20 封芬, 潘伟男, 陈锋, 等. 大鼠心肌 APJ 受体及 caveolin-1/ERK1/2 表达的年龄变化研究. *中国药理学通报*, 2008, **24** (3): 299~302  
Feng F, Pan W N, Chen F, *et al*. *Chinese Pharmacological Bulletin*, 2008, **24** (3): 299~302
- 21 Zhong J C, Yu X Y, Lin S G, *et al*. Apelin modulates aortic vascular tone *via* endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway in diabetic mice. *Cardiovascular Research*, 2007, **74**(3): 388~395
- 22 Chen M M, Ashley E A, Tsalenko A, *et al*. Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction. *Circulation*, 2003, **108** (12): 1432~1439
- 23 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 Biol Chem*, 2004, **279** (25): 26274~26279
- 24 Hashimoto T, Kihara M, Ishida J, *et al*. Apelin stimulates myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, **26**(6): 1267~1272
- 25 Wu M, Komori N, Foreman R D, *et al*. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) and protein kinase B (AKT) pathways involved in spinal cord stimulation (SCS)-induced vasodilation. *Brain Res*, 2008, **1207**(5): 73~83
- 26 Zheng J, Wen Y X, Magness R R, *et al*. Activation of multiple signaling pathways is critical for fibroblast growth factor 2- and vascular endothelial growth factor-stimulated ovine fetoplacental endothelial cell proliferation. *Biol Reprod*, 2008, **78**(1): 143~150
- 27 Zhang F, Wang M H, Nasjletti A, *et al*. Modulation by 20-HETE of phenylephrine-induced mesenteric artery contraction in spontaneously hypertensive and wistar-kyoto rats. *Hypertension*, 2001, **38**(6): 1311~1315
- 28 Tang E H C, Jensen B L, Vanhoutte P M, *et al*. The role of prostaglandin E and thromboxane-prostanoid receptors in the response to prostaglandin E<sub>2</sub> in the aorta of Wistar Kyoto rats and spontaneously hypertensive rats. *Cardiovascular Research*, 2008, **78**(1): 130~138

## ERK1/2 Mediated The Vasodilatation of Apelin-13 on Vascular Rings of Spontaneously Hypertensive Rat *in vitro* \*

LIU Chang-Hui<sup>1)\*\*</sup>, LI Xin<sup>2)\*\*</sup>, CHEN Feng<sup>2)\*\*</sup>, PAN Wei-Nan<sup>2)</sup>, FENG Fen<sup>2)</sup>,  
QIN Xu-Ping<sup>2)</sup>, LI Lan-Fang<sup>2)</sup>, SU Tao<sup>2)</sup>, CHEN Lin-Xi<sup>2)\*\*\*</sup>

<sup>1)</sup> Department of Cardiology of 1<sup>st</sup> Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang 421001, China;

<sup>2)</sup> Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421001, China)

**Abstract** In order to study the effect of G protein-coupled receptor APJ endogenous ligand apelin-13 to the vasoconstriction and relaxation of spontaneously hypertensive rat's vascular rings *in vitro* and its NO and ERK1/2 pathway, perfusion method *in vitro* vascular ring and Power-Lab system was used to detect tension on rat's vascular rings. Experimental groups below: Phenylephrine group, Acetylcholine group, apelin-13 group, apelin-13+PE group, apelin-13+Ach group, PD98059+PE group, PD98059+Ach group, LNNA+PE group, LNNA+Ach group, apelin-13 (preincubation) +PD98059 +PE group, apelin (preincubation)-13 +PD98059 +Ach group, apelin-13 (preincubation)+LNNA+PE group and apelin-13 (preincubation)+LNNA+Ach group, compared with WKY rats. Rats' vascular smooth muscle cells were cultured and the expression of ERK1/2 protein was detected by Western blot. Apelin-13 for the blood vessel with endothelium has demonstrated concentration-dependent vasodilation and SHR < WKY in percentage vasodilation, but for the blood vessel without endothelium, apelin-13 shows the role of vascular contraction and SHR > WKY in contraction tension. Apelin-13 pre-incubation can reduce the SHR and WKY rats' the reactivity of vascular contraction tension on phenylephrine and increases the relaxation response to acetylcholine. After NOS inhibitors LNNA blocking the formation of NO, the relaxation response of the vascular rings to apelin-13 is significantly inhibited and apelin more pronounced reduces the diastolic response in the SHR group than in the WKY group. This suggests that the vasodilator effect of apelin-13 partly depends on NO-dependent pathway at least and SHR hypertensive rats with NO pathway obstacles reduces the vasodilation of blood vessels to apelin-13. After pre-incubation of ERK1/2 inhibitor PD98059, the response of vascular rings to apelin-13 shows concentration-dependent contraction, which is the same as the blood vessel without endothelium to apelin-13, SHR > WKY in contraction tension. PD98059 reversals the apelin-13's vasodilation effect. Western blot analysis showed that apelin-13 promoted the concentration-dependent and time-dependent expression of pERK1/2. The potent ERK inhibitor PD98059 decreased the expression of pERK1/2. The diastolic reactivity of apelin in *ex-vivo* vascular rings of SHR is reduced and the effect is mediated by NO pathway and the ERK1/2 pathway.

**Key words** apelin-13, APJ, NOS, SHR, ERK1/2

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2009.00360

---

\*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(30901577) and Outstanding Young People Education Fund Project of Hunan Province(03B036).

\*\* LIU Chang-Hui, LI Xin and CHEN Feng contributed equally to this paper.

\*\*\*Corresponding author.

Tel: 86-734-8281587, E-mail: chenlinxi@tom.com

Received: June 9, 2009 Accepted: July 22, 2009