

Val-Glu-Pro 对原发性高血压大鼠的体内降压作用*

鲁 军^{1, 2, 3, 4)} 杨 阳¹⁾ 陈 林¹⁾ 任迪峰^{1, 3)**} 蔡木易^{2)**}王建中¹⁾ EGASHIRA Yukari⁴⁾ TANOKURA Masaru³⁾¹⁾ 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ²⁾ 中国食品发酵工业研究院, 北京 100027;³⁾ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan;⁴⁾ Laboratory of Food and Nutrition, Graduate School of Science and Technology, Chiba University, Chiba 271-8553, Japan)

摘要 Val-Glu-Pro(VEP)是从钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)中发现的一种血管紧张素转化酶(ACE)抑制肽。以原发性高血压大鼠(SHR)为模型,检测单次口服和一周间口服 VEP 的降压效果,并通过 Real-time PCR 和酶联免疫吸附法(ELISA)探索其对肾素-血管紧张素系统(RAS)主要成分在 SHR 大鼠肾脏和血清中的表达调控作用。结果表明:口服 VEP 的最低有效降压剂量为 5 mg/kg,加大剂量后表现出剂量效应,最低加权收缩压(WSBP)出现在口服后 6 h,最低加权舒张压(WDBP)出现在口服后 4 h。在一周间口服试验中,10 mg/kg VEP 处理组的 WSBP 在第 5 日显著低于负对照组。此外,口服 VEP 显著下调了 SHR 大鼠肾脏中肾素(renin)、ACE、血管紧张素 II (Ang II)类型 1 受体(AT1)的 mRNA 表达,并上调 Ang II 类型 2 受体(AT2)的 mRNA 表达,说明 VEP 的降压效果可能与对 RAS 系统的抑制作用相关,在高血压的预防和治疗中具有潜在的应用前景。

关键词 Val-Glu-Pro, 肾素-血管紧张素系统, ACE 抑制肽, 降压作用, 原发性高血压大鼠

学科分类号 Q5, R15

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00533

血管紧张素转化酶(ACE, EC. 3.4.15.1)是肾素-血管紧张素系统(RAS)中的一种多功能羧肽酶,在血压调节过程中起着非常重要的作用^[1]。ACE 不仅可将血管舒缓激肽降解为失活片段,还可催化无生理活性的血管紧张素 I (Ang I)转换生成血管紧张素 II (Ang II),而 Ang II 能够激活脉管系统中的血管紧张素 II 类型 1 受体(AT1),提高交感神经活动水平和精氨酸血管加压素的释放水平,并刺激肾上腺分泌醛固酮,直接或间接地影响钠和水分的再吸收,从而引起血管收缩,导致升压效应^[2-4]。血管紧张素 II 类型 2 受体(AT2)与 Ang II 相互作用则通常会起到与 AT1 相反的生理作用,例如敲除 AT2 受体的小鼠受一氧化氮合成抑制剂处理会引起高血压并减少钠和水分的排泄^[5]。

近 20 年来,利用 ACE 抑制剂减缓或阻滞 RAS 的作用已成为高血压防治中的一种重要手段^[6]。由于利用酶解等手段从食源性蛋白质中分离的 ACE 抑制肽没有人工合成 ACE 抑制剂的副作用^[7],因此备受研究者的关注。我们近期从钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)中首次纯化获得一种 ACE 抑制肽

Val-Glu-Pro(VEP)^[8], IC_{50} 值为 $(27.36 \pm 0.14) \mu\text{mol/L}$,对主要胃肠蛋白酶具有良好的体外消化稳定性,但是其体内降压作用尚不清楚。本研究旨在以原发性高血压大鼠(SHR)为模型,检测单次口服和一周间口服 VEP 的降压效果,并探索其对 RAS 系统主要成分在 SHR 大鼠肾脏和血清中的表达调控作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料和试剂

VEP 在日本东京大学农业生命科学院应用生命化学研究科食品工学研究室利用固相法化学合成,合成肽的纯度经高效液相色谱和质谱分析验

* 国家留学基金([2007]3021),中央高校基本科研业务费专项资金(TD2010-3, YX2011-21),国家林业公益性行业科研专项资金(200704025)和第 38 批留学回国人员科研启动基金资助项目。

** 通讯联系人。

任迪峰. Tel: 010-62336700, E-mail: rendifeng@163.com

蔡木易. Tel: 010-64684889, E-mail: caimuyi@vip.sina.com

收稿日期: 2010-10-16, 接受日期: 2011-02-14

证, 纯度高于 95%.

戊巴比妥钠购自日本 Sigma Aldrich 公司; RNA 提取和纯化试剂盒(SV Total RNA Isolation System)购自美国 Promega 公司; 第一链 cDNA 合成试剂盒(Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit)购自德国 Roche Diagnostics 公司; 实时荧光定量聚合酶链式反应试剂盒[SYBR® Premix Ex Taq™ II Kit (Perfect Real Time PCR)] 购自日本 Takara Bio 公司; 大鼠总血管紧张素原分析试剂盒(Rat Total Angiotensinogen Assay Kit) 购自日本 Immuno-Biological Laboratories 公司; Ang II 酶联免疫试剂盒[Angiotensin II Enzyme ImmunoAssay Kit (Human, Rat, Mouse, Porcine, Canine)] 购自美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司; ACE 免疫分析试剂盒(ACE ImmunoAssay Kit)购自美国 Research & Diagnostics Systems 公司.

除文中另有说明, 其他试剂均从日本 Wako Pure Chemicals Industries 公司购买; 所有试剂均为分析纯或测定所需相应等级, 溶液均以美国 Millipore 公司的 Milli-Q 高纯水配制.

1.2 主要仪器和设备

PSSM-8 同步化多相式全自动固相多肽合成仪(日本 Shimadzu 公司); 基质辅助激光解吸电离 - 飞行时间质谱仪(日本 Kratos Analytical Shimadzu 公司); BP-98A-L 型大小鼠专用无创自动血压计(日本 Softron 公司); NanoDrop ND-1000 超微量核酸蛋白质测定仪(美国 NanoDrop Technologies 公司); Veriti 96 孔热循环仪(美国 Applied Biosystems 公司); Lightcycler 3.5 实时荧光定量 PCR 仪(德国 Roche Diagnostics 公司); Benchmark Plus 酶标仪(美国 Bio-Rad Laboratories 公司).

1.3 单次口服剂量试验

试验中 8 周龄雄性 SPF 雄性 SHR 大鼠购自日本 Charles River Laboratories 公司, 体重为 (235.0 ± 6.6) g. 饲养环境温度 $(22 \pm 1)^{\circ}\text{C}$, 每日照明为 12 h 光照 - 黑暗交替, 照明时间从上午 7:00~19:00. 在试验前, SHR 大鼠均有一周的适应环境期, 所用饲料基于 AIN-93G 配方^[9]配制而成. 整个饲养过程严格遵照日本千叶大学的《实验动物饲养和使用伦理指南》(The Ethical Guide for Care and Use of Laboratory Animals)执行. 本研究获日本千叶大学动物试验伦理委员会(Ethics Committee for Animal Experiments of Chiba University)批准进行.

一周适应期后, SHR 大鼠按平均血压和体重分为 10 组, 每组 5 只. 负对照组(A)口服 0.9% 生理盐水; 正对照组(B)口服人工合成降压药物硫甲丙脯酸(Captopril), 剂量为 10 mg/kg 体重; 另外有 4 组(C、D、E、F)分别口服剂量为 1.25、2.5、5 和 10 mg/kg 体重的 VEP. Captopril 和 VEP 均溶于 0.9% 生理盐水中, 口服量在 0.25~0.35 ml 之间(需配制的相应溶液浓度根据所需的剂量计算), 通过 KN-349 NIS 式柔软性弯管注射管(日本 Natume Seisakusho 公司)灌胃注入. 对所有 SHR 大鼠的灌胃操作在上午 10:30~11:30 之间全部完成, SHR 大鼠在口服前以及口服后 2 h、4 h、6 h、8 h 和 24 h 的动脉收缩压(SBP)和动脉舒张压(DBP)依次按 1.4 中的步骤测定.

1.4 动脉血压的测定

SHR 大鼠的动脉血压通过尾部套管法测定. 所用仪器为日本 Softron 公司的 BP-98A-L 型大小鼠专用无创自动血压计, 该型血压计同时提供了心率检测功能. 考虑到 SHR 大鼠在检测血压时的紧张而引起的波动, 本试验定义加权动脉收缩压(WSBP)和加权动脉舒张压(WDBP)如下:

$$\text{WSBP} = \frac{\text{SBP}}{\text{HR}/\text{Ave.HR}}; \quad \text{WDBP} = \frac{\text{DBP}}{\text{HR}/\text{Ave.HR}}$$

其中: WSBP 为加权动脉收缩压(mmHg); SBP 为动脉收缩压(mmHg); HR 为心率; Ave.HR 为试验中全部 SHR 大鼠在相同测定时间点的平均心率; WDBP 为加权动脉舒张压(mmHg); DBP 为动脉舒张压(mmHg).

在测定血压时, SHR 大鼠先放于血压计附带的扩张型保温器中, 在 38°C 下等待 5~10 min 直至尾部动脉血压可测. 每次测定重复 5 次, 测定值取去除最大值和最小值后的平均值. 为了尽可能消除测定干扰和 SHR 大鼠的紧张因素所引起的血压、心率波动, 所有测定均由作者在安静环境中独立完成. 另外, 在试验前 SHR 大鼠适应环境的一周期间, 每日均按相同步骤为每只 SHR 大鼠测定血压上下午各 1 次, 以便实验动物熟悉该检测过程, 从而尽可能消除紧张情绪^[10].

1.5 一周间口服降压效果试验

根据单次口服剂量试验结果, 6 组 SHR 大鼠保留 3 组继续进行为期一周的降压效果试验和调控机制的研究: 负对照组、正对照组以及单次口服降压效果最为显著的 VEP 处理组. 每日 10:30~11:30, 通过 KN-349 NIS 式注射管为各组 SHR 大

鼠灌胃注入相应的口服溶液, 即: 0.9% 生理盐水 (负对照组); 10 mg/kg 体重的 Captopril (正对照组, 溶于 0.9% 生理盐水中); 10 mg/kg 体重的 VEP (处理组, 溶于 0.9% 生理盐水中)。在每日口服前, SHR 大鼠的血压按 1.4 中的步骤测定, 如此持续一周。

试验第 7 日为所有 SHR 大鼠测完血压后, 在 10:30 以 50 mg/kg 体重的剂量向 SHR 大鼠腹部注射戊巴比妥钠。待 SHR 大鼠深度麻醉无知觉时, 对其进行解剖。血液通过注射器从心脏抽出, 静置 30 min 后 1 200 g 离心 20 min, 取上层血清分装后在 -20℃ 下贮藏以备分析。肾脏取出称重后, 立即放入液氮提罐中冷冻, 之后在 -80℃ 下贮藏以备分析。

1.6 RAS 系统主要成分 mRNA 表达水平和血清浓度的检测

SHR 大鼠肾脏总 RNA 采用 SV Total RNA Isolation System 试剂盒提取并纯化, RNA 的纯度按 260 nm 和 280 nm 的吸光度比值确定 (即 A_{260}/A_{280}), RNA 的完整性经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色检验。第一链 cDNA 采用 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 在 1 μ g RNA 的基础上进行合成。Real-time PCR 反应采用 SYBR® Premix Ex Taq™ II Kit 在 Roche Lightcycler 3.5 实时荧光定量 PCR 仪上进行, 以 RAS 系统主要成分血管紧张素原(Ang)、肾素(Renin)、ACE、AT1 和 AT2 作为目的基因, 并以看家基因 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为参照标准, 引物序列如下^[11-12]:

Ang(正向), 5' GCCCAGGTCGCGATGAT 3'; Ang(反向), 5' TGTACAAGATGCTGAGTGAGG-CAA 3'; Renin(正向), 5' AACATTACCAGGG-CAACTTTCCTACT 3'; Renin(反向), 5' ACCCC-TTCATGGTGATCTG 3'; ACE(正向), 5' CAC-CGGCAAGGTCTGCTT 3'; ACE(反向), 5' CTT-GGCATAGTTTCGTGAGGAA 3'; AT1(正向), 5' CGGCCTTCGATAACATGA 3'; AT1(反向), 5' CCTGTCACTCCACCTCAAAACA 3'; AT2(正向), 5' CAATCTGGCTGTGGCTGACTT 3'; AT2(反向), 5' TGCACATCACAGGTCCAAAGA 3'; GAPDH(正向), 5' GGGCAAGGTCATCCCTGAG-CTGAA 3'; GAPDH(反向), 5' GAGGTCCACCA-CCCTGTTGCTGTA 3'。

Real-time PCR 的整个热循环反应过程为: 初

期变性, 95℃ 10 s, 1 循环; PCR 反应, 95℃ 5 s, 65℃ 20 s, 45 循环; 融解曲线分析, 95℃ 0 s, 60℃ 15 s, 95℃ 0 s, 1 循环; 冷却, 40℃ 30 s, 1 循环; 初期变性, 95℃ 10 s, 1 循环; PCR 反应, 95℃ 5 s, 65℃ 20 s, 45 循环; 融解曲线分析, 95℃ 0 s, 60℃ 15 s, 95℃ 0 s, 1 循环; 冷却, 40℃ 30 s, 1 循环。Real-time PCR 的相对定量结果按 Pfaffl^[13]的方法计算。

RAS 系统主要成分 Ang、ACE 和 Ang II 在 SHR 大鼠血清中的浓度分别采用 IBL Rat Total Angiotensinogen Assay Kit、R&D ACE ImmunoAssay Kit 和 Phoenix Pharmaceuticals Angiotensin II Enzyme ImmunoAssay Kit 进行检测。反应液采用 Benchmark Plus 酶标仪进行分析, 所有样品均重复检测, 酶标仪附送的 Microplate Manager version 5.2.1 系统会自动扣除空白检测值并计算平均值, 然后根据四参数双对数或半对数标准曲线自动计算检测的吸光度值和样品浓度。上述 Real-time PCR 和 ELISA 检测分析均按照相应试剂盒说明进行操作。

1.7 统计方法

结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。在单因素方差分析后, 采用日本 Esumi 公司的 Excel Toukei 6.0 版软件进行 Scheffe 多重比较分析, 显著水平设为 $P < 0.05$ 。

2 结 果

2.1 单次口服剂量试验

口服不同剂量的 VEP 后 24 h 内的 WSBP 变化值如图 1 所示。负对照组口服生理盐水后在 24 h

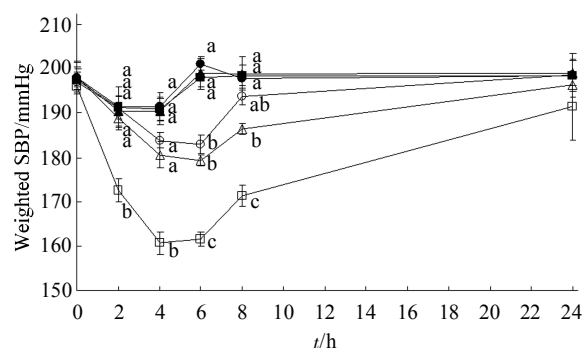


Fig. 1 The WSBP changes of the SHRs during 24 h after orally administrated with various doses of VEP

$n = 5$. Values with dissimilar lowercase letters (a~d) were significantly different, $P < 0.05$. ●—●: Saline; ▲—▲: VEP 1.25 mg/kg; ■—■: VEP 2.5 mg/kg; ○—○: VEP 5 mg/kg; △—△: VEP 10 mg/kg; □—□: Captopril 10 mg/kg.

内的 WSBP 值没有显著变化, 正对照组口服 Captopril(10 mg/kg)后在 2 h、4 h、6 h、8 h 的 WSBP 值与负对照组相比均有显著下降, 其中最低 WSBP 值出现在口服后 4 h, 与 0 h 相比降压幅度达 35.2 mmHg. 口服 1.25 mg/kg 和 2.5 mg/kg VEP 处理组的 WSBP 变化值在 24 h 内与负对照组相比均无显著差异; 5 mg/kg VEP 的处理组在口服后 6 h 的 WSBP 值与负对照组相比有显著下降, 与 0 h 相比降压幅度为 14.0 mmHg; 10 mg/kg VEP 的处理组在口服后 6 h、8 h 的 WSBP 值与负对照组相比有显著下降, 其中口服后 6 h 的 WSBP 值最低, 与 0 h 相比降压幅度达 18.9 mmHg. 以上结果表明, 口服 VEP 的最低有效降压剂量为 5 mg/kg, 加大剂量后表现出剂量效应, 并且在口服后 6 h 达到最低 WSBP 值, 但最大降压幅度与正对照 Captopril 相比要低.

图 2 显示了口服不同剂量的 VEP 后 24 h 内的 WDBP 变化情况. 负对照组口服生理盐水后在

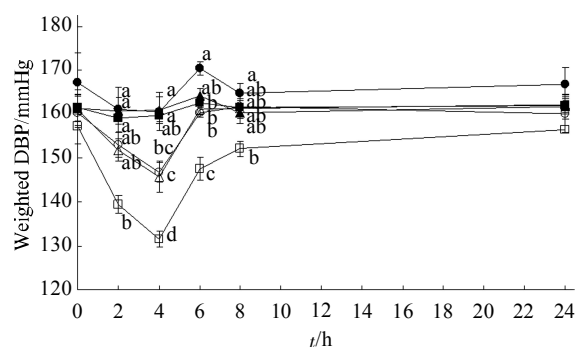


Fig. 2 The WDBP changes of the SHRs during 24 h after orally administrated with various doses of VEP

$n = 5$. Values with dissimilar lowercase letters (a~d) were significantly different, $P < 0.05$. ●—●: Saline; ▲—▲: VEP 1.25 mg/kg; ■—■: VEP 2.5 mg/kg; ○—○: VEP 5 mg/kg; △—△: VEP 10 mg/kg; □—□: Captopril 10 mg/kg.

24 h 内的 WDBP 值没有显著变化, 正对照组口服 Captopril(10 mg/kg)后在 2 h、4 h、6 h、8 h 的 WDBP 值与负对照组相比均有显著下降, 其中口服后 4 h 的 WDBP 值最低, 与 0 h 相比降压幅度为 25.8 mmHg. 口服 1.25 mg/kg VEP 的处理组 WDBP 变化值在 24 h 内与负对照组相比均无显著差异; 2.5 mg/kg VEP 的处理组在口服后 6 h 的 WDBP 值虽然显著低于负对照组, 但与 0 h 相比反有升高, 这可能是由于大鼠在一日内不同时间的血压波动所致^[4]; 5 mg/kg VEP 的处理组同样在口服后 4 h、6 h 有显著降压效果, 最低 WDBP 值出现在口服后 4 h, 与 0 h 相比降压幅度为 13.6 mmHg; 10 mg/kg VEP 的处理组在口服后 4 h、6 h 的 WDBP 值显著低于负对照组, 其中最低 WSBP 值也出现在口服后 4 h, 与 0 h 相比降压幅度为 15.3 mmHg. 上述结果同样表明口服 VEP 的最低有效降压剂量为 5 mg/kg.

此外, 从图 1 和图 2 中均可看出, 负对照组的 WSBP 和 WDBP 值在口服后 4 h 到 6 h 均有明显的上升, 这可能是与 SHR 大鼠在下午有个血压生理高峰^[4]有关, 而正对照组和相应剂量处理组在该时间的血压值显著低于负对照组, 表现出对血压生理性升高具有一定的抑制作用.

2.2 一周口服降压效果试验

根据单次口服剂量试验结果, 单次口服降压效果最为显著的剂量为 10 mg/kg 体重的 VEP 处理组以及负对照组和正对照组, 继续进行为期一周的降压效果试验. 在一周试验期间内, SHR 大鼠未出现过敏、死亡等异常现象. 表 1 显示了 SHR 大鼠的主要成长指标和饮食参数, 如表 1 所示, 在终体重、体重增加值、饲料效率、屠体重量或肾脏比率等方面, 各组之间并无显著差异.

Table 1 The growth and diet parameters of the SHRs during the experiment period

Groups	Initial body weight /g	Body weight gain /g	Liquid intake /g	Diets/g	Diet efficiency ¹⁾ /%	Kidney ratio ^{2)/%}	Carcass weight/g
Saline	233.00 ± 6.16	24.00 ± 5.61	261.04 ± 49.37	134.57 ± 6.55	2.55 ± 0.48	0.96 ± 0.07	189.40 ± 6.02
Captopril, 10 mg/kg	236.80 ± 10.38	18.00 ± 7.58	307.93 ± 24.34	167.49 ± 28.91	1.54 ± 0.61	0.98 ± 0.06	192.80 ± 6.18
VEP, 10 mg/kg	235.40 ± 3.36	24.00 ± 4.00	282.83 ± 14.00	143.12 ± 15.78	2.40 ± 0.44	0.96 ± 0.02	194.80 ± 9.26

Data are $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. ¹⁾ The diet efficiency = body weight gain per 100 g diet. ²⁾ The kidney ratio = kidney weight × 100/carcass weight.

在一周口服降压效果试验期间内, 各试验组的 WSBP 值变化如图 3 所示, 从图 3 可以看出自口服第 3 日起, 正对照组的 WSBP 值显著低于负对照组和 VEP 处理组, 第 6 日的 WSBP 值与最初 WSBP 值相比下降 33.0 mmHg, 每日平均下降值分别为 5.5 mmHg, 表现出明显的降压作用。同时, 从第 3 日起 VEP 处理组的 WSBP 值也均低于负对照组, 其中在第 5 日 WSBP 值与负对照组差异显著, 第 6 日 WSBP 值为 (192.0 ± 3.5) mmHg, 与最初 WSBP 值相比下降 6.2 mmHg, 每日平均下降值为 1.3 mmHg。

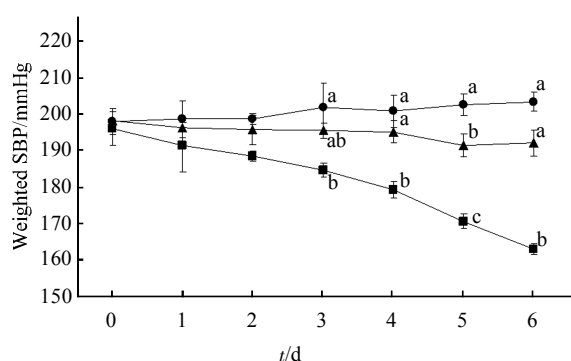


Fig. 3 The WSBP changes of the SHR during the one-week experiment period

$n = 5$. Values with dissimilar lowercase letters (a~c) were significantly different, $P < 0.05$. ●—●: Saline; ▲—▲: VEP 10 mg/kg; ■—■: Captopril 10 mg/kg.

在一周口服降压效果试验期间内, 各试验组的 WDBP 值变化如图 4 所示, 自口服第 4 日起, 正对照组的 WDBP 值显著低于负对照组和 VEP 处理组, 第 6 日的 WDBP 值与最初 WDBP 值相比下降

24.0 mmHg, 每日平均下降 4.0 mmHg, 而负对照组和 VEP 处理组均未表现出明显的下降。

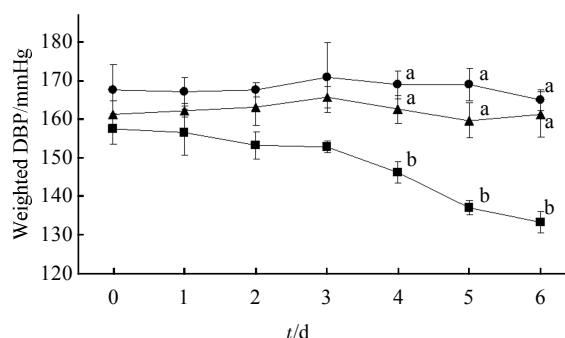


Fig. 4 The WDBP changes of the SHR during the one-week experiment period

$n = 5$. Values with dissimilar lowercase letters (a, b) were significantly different, $P < 0.05$. ●—●: Saline; ▲—▲: VEP 10 mg/kg; ■—■: Captopril 10 mg/kg.

2.3 肾脏中 RAS 系统主要成分的 mRNA 表达水平

试验中目标基因按相对表达水平(即相对于看家基因 GAPDH 而言, 各组之间目标基因的表达变化水平)进行计算比较。各试验组 SHR 大鼠肾脏中 renin 的 mRNA 表达水平如图 5a 所示。负对照组的 renin mRNA 表达水平最高, 正对照组和 VEP 处理组均显著降低了 renin 的 mRNA 表达水平, 下降比例分别约为 99.42% 和 67.72%。同正对照组相比, VEP 处理组的肾脏 renin 表达水平无显著差异。图 5b 显示了 ACE 的 mRNA 表达水平, 从图 5b 可以看出, 负对照组的 ACE mRNA 表达水平也为

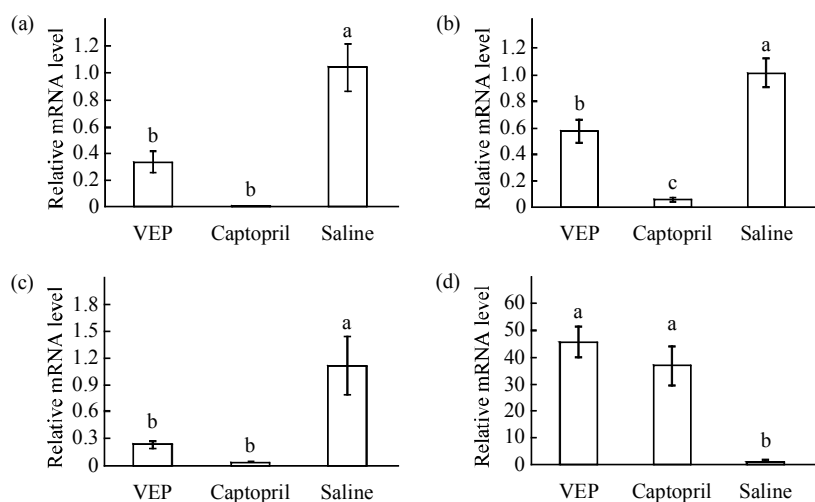


Fig. 5 The regulative effect of VEP on major RAS components in the kidney of SHR

(a) Change of renin mRNA levels. (b) Change of ACE mRNA levels. (c) Change of mRNA levels of the AT1 receptor. (d) Change of mRNA levels of the AT2 receptor. $n = 5$. Values with dissimilar lowercase letters (a~c) were significantly different, $P < 0.05$.

最高. 正对照组和 VEP 处理组均显著降低了 ACE 的 mRNA 表达水平, 下降比例分别约为 94.06% 和 43.56%. 与 renin 不同的是, 同正对照组相比, VEP 处理组的肾脏 ACE 表达水平与之差异显著.

图 5c 和图 5d 分别显示了 AT1 和 AT2 的 mRNA 表达水平. 负对照组的 AT1 mRNA 表达水平最高, 正对照组和 VEP 处理组均显著降低了 AT1 的 mRNA 表达水平, 下降比例分别约为 97.302% 和 79.28%. 同正对照组相比, VEP 处理组的表达水平无显著差异. 然而, 与检测的其他目标因子相反, 负对照组的 AT2 mRNA 表达水平最低. 正对照组和 VEP 处理组则显著提高了 AT2 的 mRNA 表达水平, 分别提高约 27.55 和 35.25 倍. 同正对照组相比, VEP 处理组与之均无显著差异, 然而值得注意的是, VEP 处理组的 AT2 mRNA 表

达水平比正对照组要高, 调控作用更强. 此外, 经 real-time PCR 分析在大鼠肾脏中未检测到 Ang 的 mRNA 表达, 表明 Ang 在肾脏中的表达水平极低.

2.4 血清中 RAS 系统主要成分的蛋白质表达水平

各试验组 SHR 大鼠血清中 Ang、ACE 和 Ang II 的表达水平如图 6 所示, 可以看出负对照组血清中 Ang、ACE 和 Ang II 的浓度均为最高. 与负对照组相比, 正对照组显著降低了这些因子的表达水平, 下降比例分别约为 15.76%、29.78% 和 60.36%. VEP 处理组的 Ang 表达水平与负对照组相比基本没有差异, 下降比例仅有 2.40%. VEP 处理组的 ACE 和 Ang II 表达水平下降比例分别达 20.46% 和 38.55%, 虽然与负对照组相比仍无显著差异, 但与正对照组相比也无显著差异.

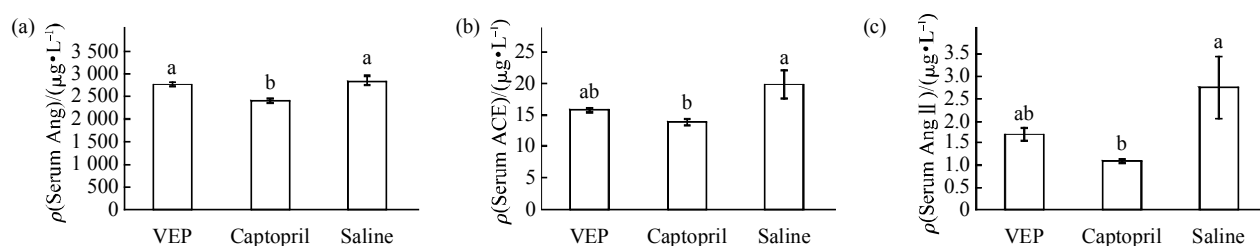


Fig. 6 The regulative effect of VEP on major RAS components in the serum of SHR

(a) Change of serum Ang concentrations. (b) Change of serum ACE concentrations. (c) Change of serum Ang II concentrations. $n = 5$. Values with dissimilar lowercase letters (a, b) were significantly different, $P < 0.05$.

3 讨 论

由于 SHR 大鼠的高血压病理特征与人类高血压的特征非常相似, 因此通常用作评价功能性食品或药物降压效果的初步模型^[10, 15]. 本研究表明, VEP 和正对照药物 Captopril 在对 SHR 大鼠单次口服和一周口服试验中均具有明显的降压效果, 而 Captopril 的降压效果比 VEP 更为显著, 这一点也与以前研究^[8]中所测得的体外 ACE 抑制活性是一致的. VEP 的体外 ACE 抑制活性以 IC_{50} 值表示为 $(27.36 \pm 0.14) \mu\text{mol/L}$, 而 Captopril 的 IC_{50} 值仅为 $0.007 \mu\text{mol/L}$ ^[16].

值得注意的是, 虽然 VEP 的 IC_{50} 值比 Captopril 高出约 4 000 倍, 即体外 ACE 抑制活性远低于 Captopril, 但在体内降压效果上, 同等剂量 VEP (10 mg/kg) 的降压幅度与 Captopril 较为接近. Fujita 和 Yoshikawa 的研究^[17]中从鱼肉蛋白中提取的降压

肽也具有类似结果, 表明从天然食物中提取出的 ACE 抑制活性肽与 Captopril 相比往往具有比体外活性要强的体内活性, 这可能是与这些多肽与 ACE 的高亲和性和解离时间较慢有关. 与 Captopril 之类的人工合成 ACE 抑制剂相比, 序列源于天然蛋白质资源的活性肽可能还会具有其他体内生理功能, 从而增强其降压效果. 例如, 源自卵清蛋白的多肽 RADHPF 就会通过与消化道或中枢神经系统的特定受体结合引起降压效果^[18]. 此外, 具有抗氧化活性的物质往往也具有降低血压的效果^[19-20], 因此 VEP 的体内降压作用还可能与抗氧化活性有关.

通过 ACE 抑制剂抑制 ACE, 阻碍 Ang I 转化为 Ang II 是目前高血压治疗药物的主要手段之一^[4]. 诸如 Captopril、Lisinopril 和 Perindopril 等之类的 ACE 抑制剂已被证实能够在高血压等心血管疾病中起到重要的抑制作用^[21]. 本试验中在一周口服试验后, 与负对照组相比, 口服 Captopril 的正对照

组显著下调 SHR 大鼠肾脏中 renin、ACE、AT1 的 mRNA 表达并上调 AT2 的 mRNA 表达, 同时显著降低血清中 Ang、ACE 和 Ang II 的蛋白质表达. VEP 处理对上述主要 RAS 成分的 mRNA 表达产生类似的调控效果, 对血清中 Ang、ACE 和 Ang II 的表达抑制作用虽不显著, 但表现出下降趋势, 并且与正对照 Captopril 处理无显著差异, 说明这些处理产生的降压效果与对 RAS 系统的抑制作用密切相关.

Ang 从肝脏分泌并释放到循环系统中^[22], 本研究在 SHR 大鼠肾脏中未检测到 Ang 的基因表达, 然而在血清中检测到 (2 000~3 000) $\mu\text{g/L}$ 的 Ang, 是与之相符的. ACE 抑制剂的降压作用认为主要与其对 ACE 的抑制从而妨碍 Ang II 生成有关^[6], 这在本试验中主要体现在正对照组和 VEP 处理组的肾脏中 ACE 的 mRNA 表达水平以及血清中 ACE 和 Ang II 含量降低上. 本研究发现 Captopril 以及 VEP 处理除了能够抑制 ACE 和 Ang II 的活性或表达水平之外, 还能显著地抑制 Ang、renin 和 AT1 的表达, 并能显著提升 AT2 的表达水平. 这可能是由于通过抑制 ACE 活性、阻碍 Ang II 生成, 抑制 Ang II 的血管收缩、致炎、扰乱胞外体液平衡等生理作用^[23-25], 导致血压降低, 而这种降压效应又会对 RAS 产生良性反馈效应(Feedback), 从而对 renin 等其他成分的表达产生调控作用. 有文献报道^[26], Ang II 的水平能够影响 renin 的合成, 因此通过 ACE 抑制剂调控 Ang II 的生成, 从而对 renin、AT1 和 AT2 起到表达调控作用是可能的.

本研究证实 ACE 抑制肽 VEP 对 SHR 大鼠具有显著的降压效果, 并对 RAS 系统的主要成分具有显著的表达调控作用, 表明 VEP 可以用作相关高血压治疗药物或功能性食品的主要功用成分, 在高血压的预防和治疗中具有潜在的应用前景. 不过, 关于 VEP 的长期降压效果和降压机制仍有待于进一步研究和证实.

参 考 文 献

- [1] Hoogwerf B J. Renin-angiotensin system blockade and cardiovascular and renal protection. *Am J Cardiol*, 2010, **105**(1 Suppl): 30A-35A
- [2] Timmermans P B, Benfield P, Chiu A T. Angiotensin II receptors and functional correlates. *Am J Hypertens*, 1992, **5**(12 Pt 2): 221S-235S
- [3] Griendling K K, Murphy T J, Alexander R W. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*, 1993, **87**(6): 1816-1828
- [4] Matthew R W, Victor J D. The renin-angiotensin-aldosterone system: a specific target for hypertension management. *Am J Hypertens*, 1999, **12**(12 Pt 3): 205S-213S
- [5] Obst M, Gross V, Janke J, *et al.* Pressure natriuresis in AT2 receptordeficient mice with L-NAME hypertension. *J Am Soc Nephrol*, 2003, **14**(2): 303-310
- [6] Brewster U C, Perazella M A. The renin-angiotensin-aldosterone system and the kidney: effects on kidney disease. *Am J Med*, 2004, **116**(4): 263-272
- [7] Atkinson A B, Robertson J I. Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. *Lancet*, 1979, **2**(8147): 836-839
- [8] 鲁 军, 任迪峰, 王建中, 等. 螺旋藻源血管紧张素转化酶抑制肽的纯化和鉴定. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(5): 568-574
- [9] Lu J, Ren D F, Wang J Z, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(5): 568-574
- [9] Reeves P G, Nielsen F H, Fahey G C Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, 1993, **123**(11): 1939-1951
- [10] Miguel M, López-Fandiño R, Ramos M, *et al.* Short-term effect of egg-white hydrolysate products on the arterial blood pressure of hypertensive rats. *Br J Nutr*, 2005, **94**(5): 731-737
- [11] Paizis G, Cooper M E, Schembri J M, *et al.* Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver. *Gastroenterology*, 2002, **123**(5): 1667-1676
- [12] Vonend O, Apel T, Amann K, *et al.* Modulation of gene expression by moxonidine in rats with chronic renal failure. *Nephrol Dial Transplant* 2004, **19**(9): 2217-2222
- [13] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 2001, **29**(9): 2002-2007
- [14] Janssen B J, Tyssen C M, Struijker Boudier H A, *et al.* 24-hour homeodynamic states of arterial blood pressure and pulse interval in conscious rats. *J Appl Physiol*, 1992, **73**(2): 754-61
- [15] Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 1963, **27**(3): 282-293
- [16] Pihlanto-Leppälä A, Rokka T, Korhonen H. Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int Dairy J*, 1998, **8**(4): 325-331
- [17] Fujita H, Yoshikawa M. LKPNM: a prodrug-type ACE-inhibitory peptide derived from fish protein. *Immunopharmacology*, 1999, **44**(1-2): 123-127
- [18] Yamada Y, Matoba N, Usui H, *et al.* Design of a highly potent anti-hypertensive peptide based on Ovokinin (2-7). *Biosci Biotechnol Biochem*, 2002, **66**(6): 1213-1217
- [19] Akpaffiong M J, Taylor A A. Antihypertensive and vasodilator actions of antioxidants in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*, 1998, **11**(12): 1450-1460
- [20] Fiordaliso F, Cuccovillo I, Bianchi R, *et al.* Cardiovascular oxidative stress is reduced by an ACE inhibitor in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Life Sci*, 2006, **79**(2): 121-129
- [21] Acharya K R, Sturrock E D, Riordan J F, *et al.* ACE revisited: a new target for structurebased drug design. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**(11): 891-902

- [22] Gaillard-Sanchez I, Mattei M G, Clauser E, *et al.* Assignment by in situ hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Hum Genet*, 1990, **84**(4): 341–343
- [23] Hall J E. Control of sodium excretion by angiotensin II : intrarenal mechanisms and blood pressure regulation. *Am J Physiol*, 1986, **250**(6 Pt 2): R960–R972
- [24] Dzau V J. Evolving concepts of the renin-angiotensin system. Focus on renal and vascular mechanisms. *Am J Hypertens*, 1988, **1**(4 Pt 2): 334S–337S
- [25] Tummala P E, Chen X L, Sundell C L, *et al.* Angiotensin II induces vascular cell adhesion molecule-1 expression in rat vasculature: a potential link between the renin-angiotensin system and atherosclerosis. *Circulation*, 1999, **100**(11): 1223–1229
- [26] Wong M K, Ge W, Woo N Y. Positive feedback of hepatic angiotensinogen expression in silver sea bream (*Sparus sarba*). *Mol Cell Endocrinol*, 2007, **263**(1–2), 103–111

In vivo* Antihypertensive Effect of Val-Glu-Pro in Spontaneously Hypertensive Rats

LU Jun^{1,2,3,4}, YANG Yang¹, CHEN Lin¹, REN Di-Feng^{1,3}**, CAI Mu-Yi²**,
WANG Jian-Zhong¹, EGASHIRA Yukari⁴, TANOKURA Masaru³

⁽¹⁾ College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

⁽²⁾ China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China;

⁽³⁾ Department of Applied Biological Chemistry, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, Tokyo 113-8657, Japan;

⁽⁴⁾ Laboratory of Food and Nutrition, Graduate School of Science and Technology, Chiba University, Chiba 271-8553, Japan)

Abstract Val-Glu-Pro (VEP) is an angiotensin I -converting enzyme (ACE) inhibitory peptide derived from *Spirulina platensis*. The antihypertensive effect of VEP in spontaneously hypertensive rats (SHRs) was investigated in 24 h after one single dose and in one-week with one single dose per day. The expression regulation of VEP on major components of the renin-angiotensin system (RAS) in the kidney and serum of the SHRs was also explored with Real-Time PCR and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The results indicated that the least effective dose of VEP was 5 mg/kg and it exhibited a dose-dependent manner with increased dosages. The lowest weighted systolic blood pressure (WSBP) and weighted diastolic blood pressure (WDBP) occurred in 6 h and 4 h after administration, respectively. During the one-week experiment course, the WSBP of the VEP-treated group (10 mg/kg) was significantly lower than that of the negative control group from the 5th day. Furthermore, the VEP treatment significantly down-regulated the mRNA expression of renin, ACE, and the angiotensin II (Ang II) type 1 (AT1) receptor, and up-regulated the mRNA expression of the Ang II type 2 (AT2) receptor in the kidney of the SHRs, suggesting that the antihypertensive effect of VEP might be related to its inhibition on the RAS and that it might be of great prospects in prevention and treatment of hypertension.

Key words Val-Glu-Pro, renin-angiotensin system, ACE inhibitory peptide, antihypertensive effect, spontaneously hypertensive rat

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00533

*This work was supported by grants from the Oversea Study Program of China Scholarship Council ([2007]3021), The Fundamental Research Funds for The Central Universities of China (TD2010-3, YX2011-21), The Special Project for Public-welfare Industry of Chinese Forestry (200704025) and The Scientific Research Foundation for The Returned Overseas Chinese Scholars, State Education Ministry, China.

**Corresponding author.

REN Di-Feng. Tel: 86-10-62336700, E-mail: rendifeng@163.com

CAI Mu-Yi. Tel: 86-10-64684889, E-mail: caimuyi@vip.sina.com

Received: October 16, 2010 Accepted: February 14, 2011