

缝隙连接在自发性高血压大鼠肾叶间动脉收缩增强中的作用

张 雯¹, 马克涛^{1,2}, 刘卫东¹, 王 洋¹, 李 丽^{1,2}, 司军强^{1,2}

摘要 目的 探讨肾叶间动脉(RIA)的缝隙连接(GJ)在自发性高血压病中的变化。方法 应用压力肌动图技术观察自发性高血压大鼠(SHR)及Wistar大鼠RIA对内皮非依赖血管收缩剂氯化钾(KCl)和苯肾上腺素(PE)的收缩反应的差异,以及应用GJ阻断剂后血管收缩反应的变化。应用Western blot技术比较SHR及Wistar大鼠RIA连接蛋白45(Cx45)的表达差异。结果 ① KCl和PE诱导SHR RIA的收缩反应要强于Wistar大鼠,应用GJ阻断剂18β-甘草次酸(18β-GA)(100 μmol/L)干预后,KCl和PE引起的RIA血管的收缩明显降低,SHR较Wistar大鼠收缩降低幅度更为显著。② SHR大鼠RIA Cx45蛋白表达升高($P < 0.05$)。结论 SHR RIA收缩作用的增强可能是通过上调Cx45增强平滑肌细胞间GJ通讯引起的。

关键词 自发性高血压大鼠; 缝隙连接; 肾脏叶间动脉; 连接蛋白; 压力肌动图技术

中图分类号 R 331.3; R544.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)11-1570-04

原发性高血压是一种常见的心血管疾病^[1],可引发心、脑、肾损害及周围血管功能障碍。肾脏不仅在血压调节中起着重要作用,同时也是高血压损害的主要靶器官。小动脉和微动脉可通过血管舒缩调节血压,血管舒缩的协调一直是维持血管功能的关键。缝隙连接(gap junctions,GJ)为相邻两个细胞间的特殊膜结构,直接介导细胞间的电和化学信号交流,维持组织内环境稳定。近年来研究^[2]显示GJ与高血压有密切联系。前期研究^[3-4]表明自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)脑动脉和肠系膜动脉平滑肌细胞连接蛋白45(connexin45,Cx45)表达均高于Wistar大鼠。该研究通过

2014-06-19 接收

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(编号:2012CB526600);国家自然科学基金(编号:31260247)

作者单位:¹新疆石河子大学医学院生理教研室,石河子 832002

²新疆地方与民族高发病教育部重点实验室,石河子 832002

作者简介: 张 雯,女,硕士研究生;

李 丽,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:Lily7588@163.com

观察应用GJ阻断剂18β-甘草次酸(18β-glycyrrhetic acid, 18β-GA)阻断血管壁细胞间的GJ后SHR与Wistar大鼠肾叶间动脉(arteriae interlobares renis, RIA)收缩活动的异同,应用Western blot技术检测Cx45在SHR与Wistar大鼠RIA表达的差异,评估GJ功能在SHR和Wistar大鼠RIA收缩活动中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SHR大鼠购自北京维通利华实验动物有限责任公司,正常血压Wistar大鼠购自新疆医科大学实验动物中心,约12周龄,雌雄不拘,体重约为250 g,清洁级。SHR作为实验组,Wistar大鼠作为对照组,每组各20只。

1.1.2 主要试剂与仪器 Cx45一抗(美国Abcam公司);β-actin一抗、二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);BCA蛋白试剂盒(美国Pierce公司);ECL发光试剂盒(美国Thermo公司);苯肾上腺素(phenylephrine, PE)、18β-GA、乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)(美国Sigma公司);氯化钾(KCl)及其他试剂均为国产分析纯。压力型小动脉测量仪(pressure myograph system, DMT, 110P, 丹麦),BP-6无创血压监测仪(四川成都泰盟公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠无创血压测定 大鼠于40℃预热适应15 min后,清醒安静状态下用BP-6无创血压监测仪测量大鼠尾动脉收缩压,连续测量3次后取平均值。

1.2.2 大鼠RIA段的制备 将大鼠用1%戊巴比妥钠2 ml/kg腹腔注射麻醉,断头放血处死动物。迅速取出肾脏,置于4℃氧饱和(95% O₂和5% CO₂)生理盐溶液(PSS)中。纵行剖开肾脏,固定于硅胶培养皿中,于解剖显微镜下,暴露叶间动脉,清除血管周围结缔组织,选取无分支叶间动脉。剪成2~3 mm的血管段用于压力肌动图实验。

1.2.3 压力肌动图记录血管直径变化 将血管段置于装有5 ml PSS液灌流槽内,血管段一端套接在

口径为 50~100 μm 玻璃插管(玻璃插管用 P-97 拉制仪拉制)上,用 10-0 眼科尼龙线加固以防漏气,用装有 PSS 液的注射器缓慢冲走管腔内残留血液,另一端套在另一个玻璃插管上同样固定,灌流槽移至倒置显微镜台上,放大倍数为 100。血管段内外均处于 37 °C 氧饱和 PSS 中,浴槽中恒速通以 95% O₂、5% CO₂ 混合气体。用 Myoview 软件(丹麦 DMT 公司)控制血管内压力并记录实验数据。(DMT 由一个摄像机和控制系统控制,血管直径变化可通过视频显微测量技术和一个校准视频尺寸分析仪来记录分析测量,单位是 μm 。)

血管段平衡后进行标化,先用 K-PSS 溶液(KCl 60 mmol/L)激发血管收缩,PSS 冲洗后孵育 30 min;给予 PE(10⁻⁵ mol/L)收缩血管,收缩达最大平台后,用 ACh(10⁻⁵ mol/L)舒张血管,舒张率 > 70% 认为内皮完整,血管活性良好,可用于实验,否则丢弃,用 PSS 液冲洗后准备实验。

血管稳定 30 min 后开始实验。血管内压力 7.98 kPa,温度 37 °C,水浴槽内 PSS 控制在 5 ml,用微量移液器向浴槽中依次累积加入不同浓度 KCl 和 PE 终浓度分别为 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 mmol/L 和 0.01、0.03、0.1、0.3、1、3、10、30 $\mu\text{mol}/\text{L}$,血管达到最大反应稳定后加高一级浓度,分别观察该浓度对血管直径的影响,及加入 18 β -GA(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)干预后 KCl 和 PE 引起血管直径的变化。观察指标:血管直径,血管直径变化 D(μm) = D_p - D_x;为了减小不同血管直径的差异引起的误差,采用血管收缩率比较所得结果,血管收缩率 Rate(%) = (D_p - D_x) / D_p。(D_p:血管段在 PSS 中稳定时的直径 D_x:药物反应后血管稳定的直径)

1.2.4 Western blot 检测 将动脉放入预冷的 RI-PA 缓冲液中,电动匀浆器冰上充分匀浆 4 °C 离心机 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液后采用 BCA 法测定蛋白浓度。聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):梯度胶(5%~10%)恒压电泳,半干转膜法将蛋白转移至硝酸纤维膜,5% 脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 1 h,一抗(1:1 000)4 °C 过夜,二抗(1:20 000)室温孵育 2 h,TBST 清洗 3 次后与 ECL 反应 1 min,置于 X 线胶片暗盒中曝光、显影。以目的蛋白和内参 β -actin 的平均灰度值的比值作为蛋白相对表达量,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件进行

分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 SHR 和 Wistar 大鼠尾动脉血压 SHR 收缩压(26.8 ± 0.1) kPa 高于 Wistar 大鼠收缩压(15.7 ± 0.1) kPa,差异有统计学意义($t = 20.52, P < 0.01$)。

2.2 18 β -GA 抑制 KCl 对 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 血管的收缩作用 10~100 mmol/L 的 KCl 可引起 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 浓度依赖性的收缩,SHR 的 RIA 收缩明显高于 Wistar 大鼠,30~100 mmol/L KCl 引起的收缩率不同,差异有统计学意义($P < 0.05$),100 mmol/L KCl 诱导的 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 的收缩率分别为(47.21 ± 3.81)% 和(41.27 ± 4.76)% ($P < 0.05$)。18 β -GA(100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)预孵育 20 min 后,KCl 诱导 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 的收缩率明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。SHR 比 Wistar 大鼠降低幅度更为明显($P < 0.01$)。见图 1。

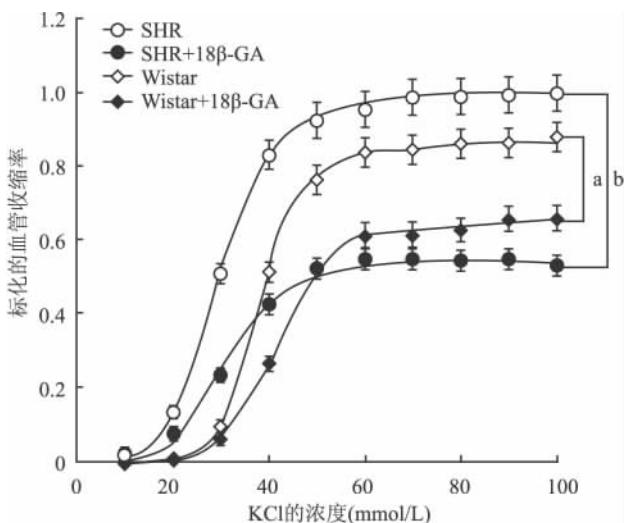


图 1 KCl 引起 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 血管收缩率曲线

a: $t = 8.26, P < 0.05$; b: $t = 10.79, P < 0.01$

2.3 18 β -GA 抑制 PE 对 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 血管的收缩作用 在 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 血管上施加浓度为 0.01~30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 PE 后,SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 可产生浓度依赖性的收缩反应,PE 引起 SHR RIA 收缩高于 Wistar 大鼠,0.3~30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 PE 引起的收缩率与 Wistar 大鼠存在差异($P < 0.05$)。30 $\mu\text{mol}/\text{L}$ PE 作用于 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA,引起的收缩率分别为(51.7 ± 4.77)% 和

($43.0 \pm 4.65\%$) ($P < 0.05$)。经 18β -GA (100 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 20 min 后, PE 引起 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 血管收缩率明显降低, SHR 下降更为显著 ($P < 0.01$)。见图 2。

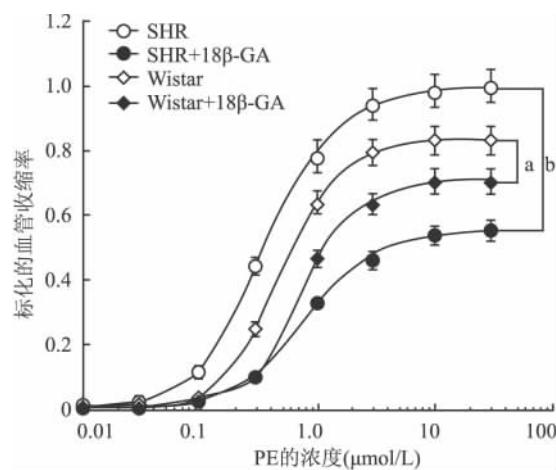


图 2 血管收缩剂 PE 引起 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 收缩率曲线
a: $t = 6.61, P < 0.05$; b: $t = 20.23, P < 0.01$

2.4 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA Cx45 蛋白表达

SHR Cx45 蛋白表达高于 Wistar 大鼠, 差异有统计学意义 ($t = -34.35, P < 0.05$)。见图 3。

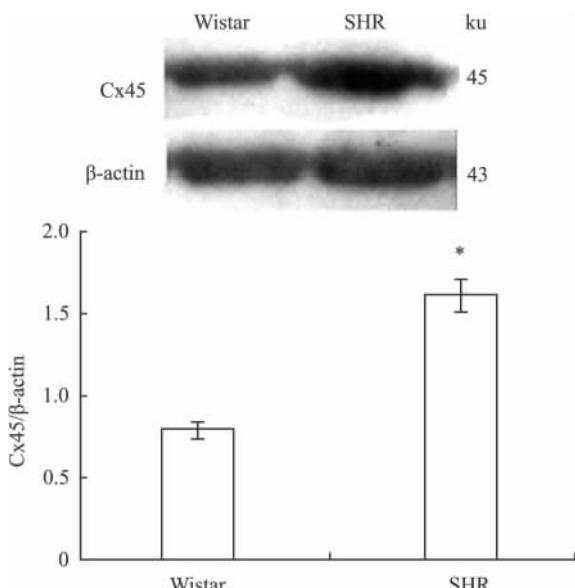


图 3 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA Cx45 蛋白表达与 Wistar 大鼠比较:^{*} $P < 0.05$

3 讨论

血管壁内皮细胞间、平滑肌细胞间, 内皮细胞与平滑肌细胞间都存在着大量的 GJ, 血管壁才能够在纵向上和横向上的收缩与舒张反应中保持电活动、

机械活动的同步性, 使得整个血管成为统一的功能单位, 对兴奋或非兴奋信号作出一致反应, 维持血管生理活动及功能稳定性^[5-7]。细胞间离子信号和其他调节信号可通过 GJ 迅速交换, 如某一细胞受到刺激其离子电位发生变化并通过 GJ 迅速将离子或其他调节信号传递给相邻细胞使之得到信号并迅速做出反应。GJ 在血管协调一致的舒缩活动起到重要调节作用^[8]。

高血压是遗传和环境因素共同作用引起的疾病, 其发病机制除了遗传和环境因素外, 也与缩血管物质分泌增多, 活性增强; 舒血管物质分泌减少, 活性减弱有关。有研究^[2]显示 Cx 在高血压的发生发展过程中起到了关键作用, 参与了机体血压的调节。

本实验显示 KCl 和 PE 引起 RIA 的收缩作用与 Wistar 大鼠相比 SHR 明显增强。Braunstein et al^[9] 研究发现 SHR 肾小球前小动脉的收缩作用比血压正常的大鼠强 40%, 本研究结果与之一致。由此推测 SHR 的 RIA 血管收缩作用的增强可能与 SHR 血管壁 GJ 的改变有关。运用 GJ 阻断剂 18β -GA 干预 RIA 血管壁细胞间 GJ, 结果显示, 18β -GA 抑制了 KCl 和 PE 的收缩作用, 且 SHR 抑制程度明显高于 Wistar 大鼠, 应用分子生物学技术检测 RIA 上 Cx45 的表达, 发现 SHR Cx45 的表达明显增高。前期研究^[10]显示在 SHR 及 Wistar 大鼠的肠系膜三级动脉上施加 KCl 和 PE 诱导血管收缩, SHR 的收缩反应明显增强, 应用 GJ 阻断剂 2-APB (100 $\mu\text{mol/L}$) 后, 血管收缩反应均显著减弱, 其中 SHR 减弱幅度更加显著, 同时有研究^[3]显示 SHR 血管 Cx45 的表达明显增多。Li et al^[11]发现脑动脉平滑肌 Cx45 的表达增高, 本研究结果与之相似。由此推测 SHR 的 RIA 的平滑肌细胞 Cx45 的上调与其收缩作用的增强有关。

综上所述, SHR 的 RIA 血管对血管收缩剂的反应性更强, 可能与自发性高血压引起 RIA 平滑肌 Cx45 蛋白表达增加, GJ 通讯增强有关。 Ca^{2+} 是参与血管收缩的重要因子, KCl 和 PE 收缩机制均为引起细胞质钙浓度的增加而产生血管收缩。SHR 大鼠平滑肌细胞间的 GJ 通道增多, 平滑肌细胞去极化后 Ca^{2+} 在血管壁平滑肌细胞间经 GJ 的传递和扩散加快, 因此参与 RIA 协调性收缩活动的平滑肌细胞数量增多, 血管收缩作用增强。应用 GJ 阻断剂后, 阻断了 GJ 通道, Ca^{2+} 血管壁平滑肌细胞间经 GJ 的传递和扩散减慢, 其中参与 RIA 协调性收缩活动的

平滑肌有效细胞数目减少,血管收缩活动减弱。SHR RIA 收缩作用的增强可能是由于 Cx45 的上调,GJ 阻断剂阻断 GJ 后 SHR 和 Wistar 大鼠 RIA 收缩作用均减弱,SHR 减弱幅度更大,这种减弱作用的差异可能与 Cx45 的表达变化有关。

将高血压状态下 GJ 的改变和高血压引起的肾血管结构和功能的改变相联系,GJ 阻断剂或激活剂可以通过改善高血压病引发的血管的不良重塑对血管舒缩活动的影响,为今后临床治疗高血压病继发性肾脏脉管系统损害提供一定的理论依据。

参考文献

- [1] Sally I S ,Dag A ,Sarah D H ,et al. Hypertension is a potential risk factor for vascular dementia: systematic review [J]. *Int J Geriatr Psychiatry* 2011 ,26(7) : 661 - 9.
- [2] Figueroa X F ,Isakson B E ,Duling B R. Vascular gap junctions in hypertension [J]. *Hypertension* ,2006 ,48(5) :804 - 11.
- [3] Ma K T ,Li X Z ,Li L et al. Role of gap junctions in the contractile response to agonists in mesenteric artery of SHR [J]. *Hypertens Res* ,2014 ,37(2) :110 - 5.
- [4] 李新芝,司军强,马克涛,等.自发性高血压大鼠和 Wistar 大鼠脑动脉 Cx45 表达的差异[J].山东大学学报(医学版),2012 ,50(11):39 - 42.
- [5] Alonso F ,Boittin F X ,Beny J L ,et al. Loss of connexin40 is associated with decreased endothelium-dependent relaxations and Enos levels in the mouse aorta [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010 ,299(5) :H1365 - 73.
- [6] Matchkov V V. Mechanisms of cellular synchronization in the vascular wall. Mechanisms of vasomotion [J]. *Dan Med Bull* ,2010 ,57(10):B4191.
- [7] Milkau M ,Kohler R ,de Wit C. Crucial importance of the endothelial K⁺ channel SK3 and connexin40 in arteriolar dilations during skeletal muscle contraction [J]. *FASEB J* 2010 24(9) :3572 - 9.
- [8] 陈红伟,宋湖平,洪涛.缝隙连接蛋白与心脑血管疾病的关系[J].实用医学杂志,2009,25(18):3166 - 8.
- [9] Braunstein T H ,Sorensen C M ,Holstein-Rathlou N H. Connexin abundance in resistance vessels from the renal microcirculation in normo- and hypertensive rats [J]. *APMIS* 2009 ,117 (4) : 268 - 76.
- [10] 蒋学伟,司军强,李丽,等.缝隙连接对正常血压和自发性高血压大鼠肠系膜动脉收缩反应的影响[J].重庆医学,2013,42(12):1365 - 7.
- [11] Li X ,Simard J. Increase in Cx45 gap junction channels in cerebral smooth muscle cells from SHR [J]. *Hypertension* ,2002 ,40 (6) : 940 - 6.

Effects of gap junction on renal interlobar artery contraction in spontaneously hypertensive rats

Zhang Wen¹ Ma Ketao^{1,2} Liu Weidong¹ et al

(¹*Dept of Physiology, Medical College of Shihezi University Shihezi 832002*,²*Key Laboratory of Education Ministry of Xinjiang Endemic and Ethnic Diseases, Shihezi 832002*)

Abstract Objective To investigate the change of gap junction in renal interlobar of spontaneous hypertension rats (SHR) and its relationship with hypertension. **Methods** Pressure myograph was used to observe the influences of KCl and phenylephrine (PE) on the vascular contraction activities, and the differences after applying 18β-GA in RIA of SHR and Wistar rats. Western blot technique was used to investigate the differences in expressions of connexin 45 (Cx45) on protein levels in renal interlobar artery between SHR ($n=20$) and Wistar rats ($n=20$). **Results** ① The contraction reaction was induced by KCl and PE in a concentration dependent manner, and the contraction reaction of SHR was stronger than Wistar rats. After applying of 18β-GA (100 μmol/L), KCl and PE caused the significantly lower contraction rate of RIA, and that was more significant in SHR. ② The expression of Cx45 protein was significantly elevated in renal interlobar artery from SHR compared with normotensive Wistar rats ($P < 0.05$). **Conclusion** The enhancement of contraction of RIA in SHR maybe relate to the upregulation of Cx45 expression and increase gap junction communication in vascular smooth muscle cells of renal interlobar artery from SHR.

Key words spontaneously hypertensive rats; gap junction; renal interlobar artery; connexin; pressure myograph system