

研究论文

雷米普利对自发性高血压大鼠脑动脉缝隙连接蛋白43表达的影响

田甜, 谭朝阳, 贾奇花, 丛雯雯, 田俊杰, 马克涛, 李丽, 司军强*

石河子大学医学院生理学教研室/新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室, 石河子 832002

摘要: 本文旨在探讨血管紧张素转换酶抑制剂雷米普利(Ramipril)是否通过调节脑动脉血管细胞缝隙连接蛋白43 (connexin 43, Cx43)的表达发挥其降压及保护脑动脉的作用。Wistar-Kyoto (WKY)和自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)随机分为4组: WKY组、WKY + Ramipril组、SHR组、SHR + Ramipril组($n = 8$)。运用无创尾动脉测压仪测量收缩压; 采用苏木素-伊红染色观察脑动脉病理学改变; 应用压力肌动图技术检测各组脑动脉血管收缩率; 应用免疫荧光和免疫组织化学技术分析脑动脉上Cx43的分布及表达; 采用real-time PCR和Western blot技术分别检测脑动脉上Cx43 mRNA及蛋白表达。结果显示: (1) SHR组收缩压显著高于WKY组($P < 0.01, n = 8$); SHR + Ramipril组收缩压明显低于SHR组($P < 0.01, n = 8$)。 (2) 相比于WKY组, SHR组脑动脉管壁增厚明显($P < 0.01, n = 8$), 而SHR + Ramipril组相比于SHR组, 动脉管壁厚度明显减少。 (3) SHR组脑动脉收缩率高于WKY组($P < 0.05, n = 8$); SHR + Ramipril组脑动脉收缩率低于SHR组($P < 0.05, n = 8$)。应用2-APB (Cx43非特异性阻断剂)或Gap26 (Cx43特异性阻断剂)预孵育后, SHR + Ramipril组动脉收缩率显著下降($P < 0.05, n = 8$); 给予Cx43非特异性激动剂AAP10预孵育后, SHR + Ramipril组动脉收缩率显著升高 ($P < 0.05, n = 8$)。 (4) SHR组脑动脉上Cx43 mRNA及蛋白表达水平高于WKY组($P < 0.05, n = 8$); SHR + Ramipril组脑动脉上Cx43 mRNA及蛋白表达水平明显低于SHR组($P < 0.05, n = 8$)。以上结果提示, 雷米普利能够下调SHR脑动脉血管细胞间Cx43 mRNA和蛋白的表达, 降低血压, 改善高血压诱发的脑动脉重塑以及血管功能障碍。

关键词: 雷米普利; 自发性高血压; 肾素-血管紧张素-醛固酮系统; 脑动脉; 缝隙连接蛋白43

中图分类号: R331.3+3

Effects of Ramipril on the expression of connexin 43 in cerebral arteries of spontaneously hypertensive rats

TIAN Tian, TAN Chao-Yang, JIA Qi-Hua, CONG Wen-Wen, TIAN Jun-Jie, MA Ke-Tao, LI Li, SI Jun-Qiang*

Department of Physiology, Shihezi University Medical College/Xinjiang Key Laboratory of Endemic and Ethnic Diseases, Ministry of Education, Shihezi 832002, China

Abstract: The present study was designed to examine whether Ramipril (an inhibitor of angiotensin-converting enzyme) affected spontaneous hypertension-induced injury of cerebral artery by regulating connexin 43 (Cx43) expression. Wistar-Kyoto (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) were randomly divided into WKY, WKY + Ramipril, SHR, and SHR + Ramipril groups ($n = 8$). The arterial pressure was monitored by the tail-cuff method, and vascular function in basilar arteries was examined by pressure myography. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to show vascular remodeling. The expression and distribution of Cx43 was determined by using immunofluorescence and immunohistochemistry analysis. The protein and mRNA levels of Cx43 were examined by Western blot and real-time PCR analysis, respectively. The results showed that chronic Ramipril treatment significantly attenuated blood pressure elevation ($P < 0.01, n = 8$) and blood vessel wall thickness in SHR ($P < 0.01, n = 8$). The cerebral artery contraction rate in the SHR group was higher than that in the WKY group ($P < 0.05, n = 8$). The cerebral artery contraction rate in the SHR +

Received 2018-07-03 Accepted 2018-09-28

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81560081).

*Corresponding author. Tel: +86-993-2057137; E-mail: sijunqiang@shzu.edu.cn

Ramipril group was lower than that in the SHR group ($P < 0.05$, $n = 8$). Pretreatment with 2-APB (Cx43 non-specific blocker) or Gap26 (Cx43 specific blocker) significantly decreased the vasoconstriction rate, while pretreatment with AAP10 (Cx43 non-specific agonist) significantly increased the vasoconstriction in the SHR + Ramipril group ($P < 0.05$, $n = 8$). In addition, the expression of Cx43 mRNA and protein in cerebral arteries of SHR group was higher than that of WKY group ($P < 0.05$, $n = 8$). The mRNA and protein expression of Cx43 in cerebral arteries of SHR + Ramipril group was significantly lower than that of SHR group ($P < 0.05$, $n = 8$). These results suggest that Ramipril can down-regulate the expression of Cx43 mRNA and protein in cerebral arterial cells of SHR, lower blood pressure, promote vasodilation, and improve arterial damage and vascular dysfunction caused by hypertension.

Key words: Ramipril; spontaneous hypertension; rennin-angiotensin-aldosterone system; cerebral artery; connexin 43

高血压是多种心血管事件的独立危险因素, 可导致不可逆转的心肌、血管重塑, 严重危害人类健康。当发生血管重塑时, 血管内皮细胞和平滑肌细胞排列紊乱并发生不同程度的增生, 进而导致血管壁增厚, 管腔狭窄^[1]。血管重塑在多种脑血管疾病如脑动脉粥样硬化、脑微动脉瘤中可导致脑血栓形成和脑出血, 是脑卒中不可逆转的原因之一^[2]。缝隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 作为血管细胞间缝隙连接的主要蛋白成分, 在调节细胞间信息传导、维持血管正常的结构和功能中发挥重要作用^[3-7]。近年来 Cx43 在血管损伤中的作用已得到广泛认可, 在对肾素依赖性高血压小鼠模型、颈动脉损伤小鼠模型、动脉粥样硬化小鼠模型、自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 模型等的研究显示, 模型组动脉血管中均检测到 Cx43 表达水平显著高于正常对照组, 而敲除 Cx43 或抑制 Cx43 表达后可不同程度缓解动脉血管重塑^[8-12]。此外, 在人动静脉血管内膜增生的研究中显示, Cx43 过表达促进人隐静脉平滑肌细胞的增殖和迁移, 进而诱发血管重塑^[13], 提示 Cx43 表达水平的变化参与血管重塑的发生与发展。

肾素 - 血管紧张素 - 醛固酮系统 (rennin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 过度激活是高血压的发病机制之一。血管紧张素 II (angiotensin II, AngII) 作为循环和局部主要的效应分子, 在高血压发病中发挥着十分重要的作用^[14, 15]。血管紧张素转换酶抑制剂雷米普利 (Ramipril) 可降低体内 AngII 水平、抑制血管基质纤维及平滑肌细胞增生、延缓或逆转血管重塑、改善血管舒缩功能、提高血管顺应性^[16]。研究表明, 在兔动脉球囊损伤模型中, 雷米普利可通过下调 Cx43 mRNA 和蛋白的表达水平抑制家兔动脉血管重塑^[17], 但雷米普利对 Cx43 表达的调节在高血压诱导的脑血管重塑中的作用暂不明确。本研究通过观察雷米普利干预前后 Wistar-Kyoto (WKY)

大鼠和 SHR 脑动脉 Cx43 mRNA 及蛋白表达水平变化、脑动脉损伤程度以及血管收缩率变化, 探究雷米普利对 Cx43 表达的调节在 SHR 脑动脉保护中的作用和意义, 进而为临床上治疗高血压引发的脑动脉重塑提供新的思路和方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物选择 9 周龄的 SHR 和 WKY 大鼠, 体重 160~200 g, 购自北京维通利华实验动物有限责任公司 (许可证编号: SCXK 京 2007-0001)。置于 23 °C、昼/夜交替、自由饮水和进食的条件下饲养。在 7 d 的适应期后, 连续 3 d 测量各组大鼠尾动脉压, 血压 ≥ 150 mmHg 的 SHR 方可使用。将大鼠随机分为 4 组: WKY 组、WKY + Ramipril 组、SHR 组、SHR + Ramipril 组 ($n = 8$)。SHR + Ramipril 组以 5 mg/kg 的雷米普利 (溶解在生理盐水中) 每天同一时间灌胃 8 周。SHR 和 WKY 组以相同体积的生理盐水, WKY + Ramipril 组以同等剂量雷米普利每天在同一时间灌胃 8 周。经药物治疗后, 运用无创尾动脉压测量法检测血压^[18, 19]。本研究中所有动物实验均符合石河子大学医学院动物护理和使用委员会相关规定, 并获得批准 (No. A2046-047-02)。

1.2 主要试剂与仪器 雷米普利 (美国 Sigma 公司, R0404-250MG); 小鼠 Cx43 单克隆抗体 (美国 Abcam 公司, ab79010); 小鼠抗 GAPDH 单抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司, TA309157); 辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司, 产品编号 ZB-2301); 2-APB (美国 Sigma 公司, 047K1192); Gap26 (美国 APEX-BIO 公司, 197250-15-0); AAP10 (杭州中肽生化有限公司, 5202977249); RNeasy Mini Kit 试剂盒 (德国 Qiagen 公司); CFX96Touch 荧光定量 PCR 检测系统 (美国 Bio-Rad 公司); LSM510 激光共聚焦显微镜 (德国 Carl Zeiss 公司); 压力型小动脉测量仪

(DMT, 110P, 丹麦)。

1.3 病理组织学分析 腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 使大鼠安乐死, 取脑组织称重并将其固定在含有 10% 多聚甲醛的磷酸盐缓冲液中。组织脱水并嵌入石蜡中, 切成 5 μm 的组织切片。将脑组织切片在二甲苯中脱蜡, 然后在分级乙醇溶液中水化, 组织用苏木素-伊红染色后洗涤, 脱水后在酒精中分化, 用光学显微镜进行拍摄。参照 Allagnat 等人^[20]的方法, 以血管壁面积与管腔面积的比值作为评价血管壁厚度的指标。

1.4 压力肌动图检测脑动脉舒缩活动 快速取出大鼠脑动脉并将其置于 PSS 溶液中剥离基底动脉, 清除血管周围的结缔组织, 剪成 2~3 mm 的血管段, 将血管段套在压力肌动图系统水浴槽内的两个玻璃微电极上, 并使用尼龙线进行固定, 随后将动脉段和水浴槽转移到倒置显微镜台上, 连续记录基底动脉的外径。温度恒定于 37 $^{\circ}\text{C}$ 。初始平衡阶段保持液体流入 P_1 端压力为 20 mmHg, P_2 端压力为 5 mmHg, 持续时间为 3 min, 以冲走血管内残留物, 之后 P_1 、 P_2 端均调至 10 mmHg, 以 10 mmHg 为一个梯级, 使血管内压力逐渐升至 60 mmHg 后, 血管段在 PSS 溶液内稳定 1 h。以苯肾上腺素检测动脉段收缩性, 两次收缩幅度相差小于 10%, 用乙酰胆碱舒张时, 舒张率大于 80% 认为内皮完整。启动负压吸引器, 将溶液中的 PSS 溶液控制在 5 mL。首先血管在 PSS 溶液中达到了平台期并记录, 2-APB 孵育 20 min, Gap26 孵育 15 min, AAP10 孵育 20 min, 然后加入 60 mmol/L KCl 溶液置换浴槽中的液体。待血管收缩且血管直径进入平台阶段, 观察并记录血管直径的变化^[21]。用 Myo VIEW 软件记录实验数据^[22]。血管直径收缩幅度变化公式: 血管收缩率 (%) = $(D_{\text{PSS}} - D_{\text{KCl}}) / D_{\text{PSS}} \times 100\%$ 。 D_{PSS} 为血管在 PSS 溶液中稳定后的直径, D_{KCl} 为血管在 60 mmol/L KCl 溶液中稳定时的直径。

1.5 免疫荧光和免疫组织化学技术观察 Cx43 的表达和分布 将各组大鼠脑动脉固定在 10% 多聚

甲醛中, 然后组织脱水包埋在石蜡中, 进行石蜡组织切片后, 将脑组织切片在二甲苯中脱蜡, 然后在分级乙醇溶液中水化。PBS 漂洗 3 次, 0.3% Triton X-100 破膜 30 min, PBS 漂洗 3 次, BSA 室温封闭 1 h^[23]。在湿盒内孵育一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日 PBS 漂洗 3 次, 滴加荧光二抗 (FITC 标记的抗小鼠二抗, 北京中杉金桥生物技术有限公司, 125106) 室温孵育 1 h。PBS 漂洗 3 次, 滴加碘化丙啶 (propidium iodide, PI), 湿盒内室温避光染色 30 s。PBS 漂洗 3 次, 甘油封片。激光共聚焦显微镜观察。

脑组织切片在二甲苯中脱蜡, 然后在分级乙醇溶液中水化。PBS 漂洗 3 次, 滴加内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育 10 min。PBS 漂洗 3 次, 0.3% Triton X-100 破膜 30 min, PBS 漂洗 3 次, BSA 室温封闭 1 h。在湿盒内孵育一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日室温复温 1 h。PBS 漂洗 3 次, 滴加二抗 (辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG) 室温孵育 1 h。PBS 漂洗 3 次, 滴加 DAB 显色试剂, 室温染色 30 s。PBS 漂洗 3 次。滴加苏木素室温染色 60 s。PBS 漂洗 3 次, 中性树脂胶封片。光学显微镜观察。

1.6 Real-time PCR 检测 Cx43 mRNA 表达水平

采用 RNeasy Mini Kit 试剂盒 (74104, Qiagen) 提取总 RNA, 反转录为 cDNA (K1622, Thermo), 反应条件为: 70 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 min, 最后 4 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min 转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, 进行 RT-PCR 反应 (201054, Qiagen), 扩增靶基因 Cx43 和内参 β -actin。Primer Premier 5.0 软件设计引物, 引物序列见表 1, 由上海生工生物工程有限公司合成。RT-PCR 反应体系及条件以制造商协议 (Qiagen) 为标准^[22], 反应条件为: 90 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 循环 40 次。反应完成后利用仪器分析软件, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方法进行分析, 计算公式为 $\Delta\Delta C_t = C_t$ (实验组目的基因 - 实验组内参基因) - C_t (对照组目的基因 - 对照组内参基因), 每组重复 3 次。

1.7 Western blot 检测 Cx43 蛋白表达水平 常规

表1. 引物序列表

Table 1. Primer sequences

GenBank accession No.	Gene	Primer sequences (5'-3')	Product (bp)
NM_012567.2	Cx43	F: GCTCCACTCTCGCCTATGTC	113
		R: TAGTTCGCCAGTTTTGCTC	
NM_031144.3	β -actin	F: CGTAAAGACCTCTATGCCAACA	163
		R: AGCCACCAATCCACACAGAG	

提取脑动脉总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度后, 取蛋白样品加入上样缓冲液, 置于沸水中持续 8 min 使蛋白变性, 于 SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离^[21], 电泳完毕后将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上, 充分封闭后分别加入 Cx43 及 GAPDH 抗体, 4 °C 过夜, 洗膜后再加入稀释好的二抗 (山羊抗小鼠 IgG/ 辣根过氧化物酶标记) 溶液室温孵育 2 h, 再次洗膜后与 ECL 反应, 置于 X 线胶片暗盒中曝光, 显影, 并用 ImageJ2x 分析软件检测并分析条带的灰度值。

1.8 统计学方法及数据处理 实验结果均用 Excel 记录, 多组之间的比较采用双因素方差分析, 两两之间的比较用 Bonferroni 法, 采用 SPSS19.0 软件予以统计分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 并利用 Graphpad Prism 制作柱状图。

2 结果

2.1 雷米普利对大鼠收缩压的影响

如图 1 所示, WKY + Ramipril 组与 WKY 组之间收缩压无统计学差异; SHR 组收缩压显著高于 WKY 组 ($P < 0.01$, $n = 8$); SHR + Ramipril 组收缩压明显低于 SHR 组 ($P < 0.01$, $n = 8$); SHR + Ramipril 组收缩压显著高于 WKY + Ramipril 组 ($P < 0.05$, $n = 8$)。

2.2 雷米普利对大鼠脑动脉病理学改变的影响

苏木素 - 伊红染色结果如图 2A 所示, WKY 组脑动脉内皮细胞排列整齐, 紧贴于内弹力膜上, 中

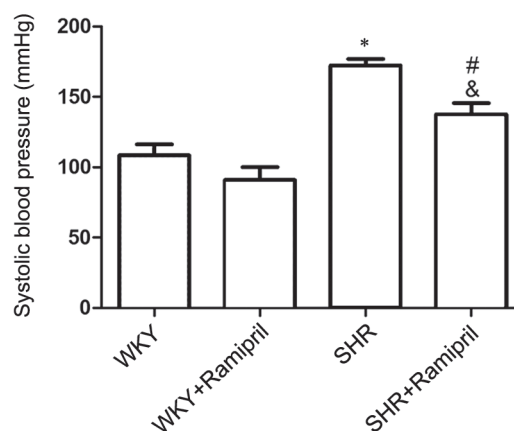


图 1. 各组大鼠收缩压的比较

Fig. 1. Comparison of systolic blood pressure detected by the tail-cuff method in each group. Mean \pm SD, $n = 8$. * $P < 0.01$ vs WKY group; # $P < 0.01$ vs SHR group; & $P < 0.05$ vs WKY + Ramipril group.

膜无增厚, 内皮细胞及平滑肌细胞未见水肿; WKY + Ramipril 组脑动脉内皮细胞紧贴于内弹力膜上, 中膜弹性纤维和平滑肌细胞排列整齐, 平滑肌细胞及基质纤维未见增生。SHR 组脑动脉内皮细胞游离于内弹力膜, 中膜弹性纤维和平滑肌细胞排列紊乱, 平滑肌细胞水肿明显, 基质纤维显著增生; SHR + Ramipril 组脑动脉内皮细胞紧贴于内弹力膜上, 中膜弹性纤维和平滑肌细胞排列较整齐, 平滑肌细胞水肿减轻, 基质纤维稍增生。

如图 2B 所示, WKY + Ramipril 组与 WKY 组之间管壁面积 / 管腔面积比值无统计学差异; 相比

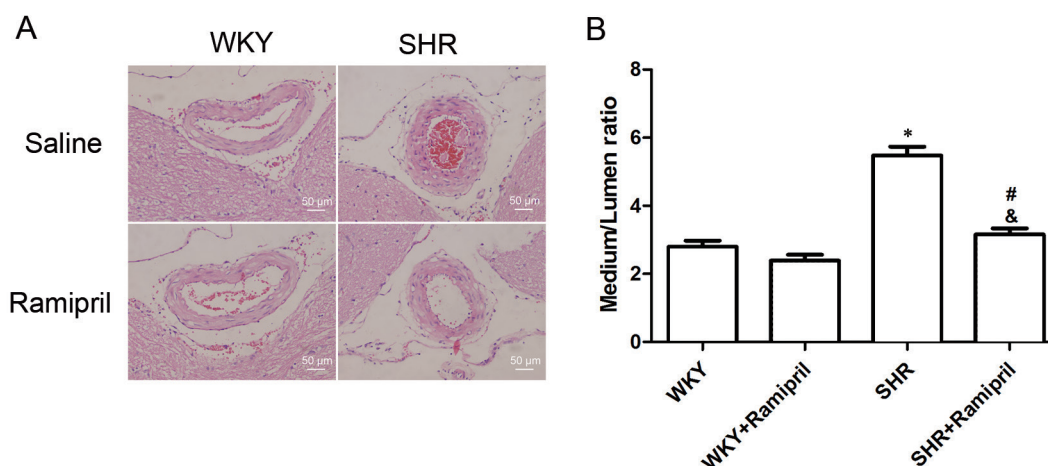


图 2. 各组大鼠脑动脉病理学评估

Fig. 2. The histomorphology of cerebral arteries in each group. A: The morphology of cerebral arteries under the stereo microscope detected by HE staining. Scale bar, 50 μ m. B: Comparison of the ratio of cerebral artery medium area to lumen area in each group. Mean \pm SD, $n = 8$. * $P < 0.01$ vs WKY group; # $P < 0.01$ vs SHR group; & $P < 0.05$ vs WKY + Ramipril group.

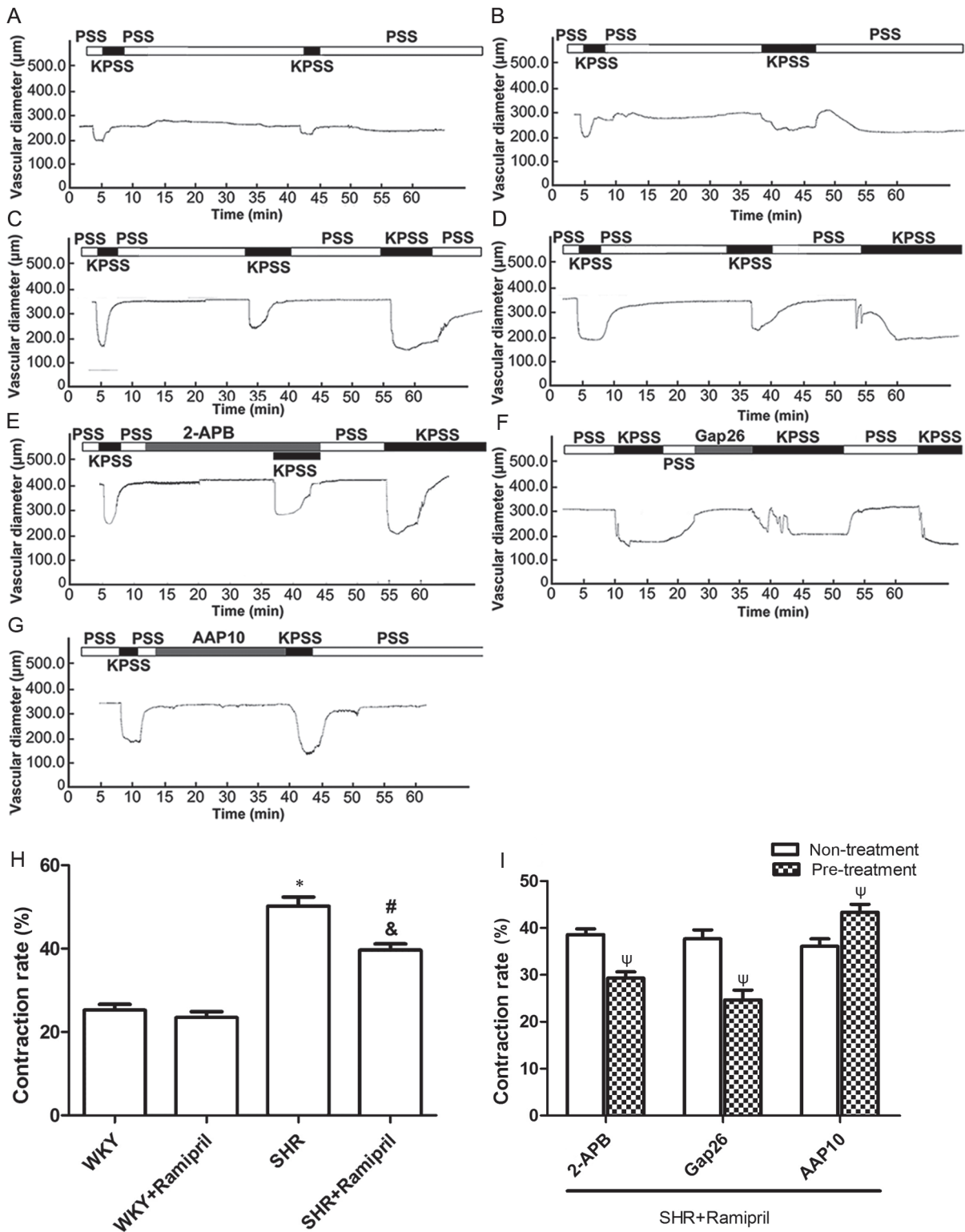


图 3. 60 mmol/L KCl引起的各组大鼠脑动脉收缩率的变化

Fig. 3. Changes of the cerebral basilar artery contraction rate induced by 60 mmol/L KCl in each group recorded by pressure myograph system. Vascular function in basilar arteries was examined by pressure myography. A: WKY group. B: WKY + Ramipril group. C: SHR group. D: SHR + Ramipril group. E: SHR + Ramipril + 2-APB group. F: SHR + Ramipril + Gap26 group. G: SHR + Ramipril + AAP10 group. H: Comparison of cerebral artery contraction rates in each group. I: Comparison of cerebral arterial contraction rates in SHR + Ramipril group before and after different treatments. Mean \pm SD, $n = 8$. * $P < 0.05$ vs WKY group; # $P < 0.05$ vs SHR group; & $P < 0.05$ vs WKY + Ramipril group. $\psi P < 0.05$ vs non-treatment.

于 WKY 组, SHR 组管壁面积 / 管腔面积比值显著增加 ($P < 0.01, n = 8$); SHR + Ramipril 组管壁面积 / 管腔面积比值明显低于 SHR 组 ($P < 0.01, n = 8$); 相比于 WKY + Ramipril 组, SHR + Ramipril 组管壁面积 / 管腔面积比值显著增加 ($P < 0.05, n = 8$)。

2.3 雷米普利对 KCl 诱导的大鼠脑动脉收缩反应的影响

给予 60 mmol/L KCl 均可引起各组脑动脉收缩反应。WKY + Ramipril 组与 WKY 组之间脑动脉收缩率无统计学差异; 与 WKY 组相比, SHR 组脑动脉收缩率明显升高 ($P < 0.05, n = 8$); 与 SHR 组相比, SHR + Ramipril 组脑动脉收缩率显著降低 ($P < 0.05, n = 8$); SHR + Ramipril 组脑动脉收缩率明显高于 WKY + Ramipril 组 ($P < 0.05, n = 8$) (图 3A~D, 图 3H)。

应用 Cx43 非特异性阻断剂 2-APB (100 $\mu\text{mol/L}$) 预孵育 20 min 后, SHR + Ramipril 组 KCl 诱发的脑动脉收缩率由 (38.60 ± 1.23)% 下降到 (29.31 ± 1.32)% ($P < 0.05, n = 8$) (图 3E, 图 3I); 加入 Cx43 特异性阻断剂 Gap26 (100 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 15 min 后, KCl 引起的 SHR + Ramipril 组脑动脉收缩率由 ($37.70 \pm$

1.92)% 下降至 (24.66 ± 2.10)% ($P < 0.05, n = 8$) (图 3F, 图 3J); 给予 Cx43 非特异性激动剂 AAP10 (100 $\mu\text{mol/L}$) 预孵育 20 min 后, SHR + Ramipril 组脑动脉收缩率由 (36.10 ± 1.62)% 增加至 (43.36 ± 1.72)% ($P < 0.05, n = 8$) (图 3G, 图 3K)。

2.4 雷米普利对大鼠脑动脉 Cx43 分布和表达的影响

免疫荧光和免疫组织化学染色结果均显示, WKY 组与 WKY + Ramipril 组相比脑动脉 Cx43 表达无明显差异; 与 WKY 组相比, SHR 组 Cx43 在脑动脉上表达明显增强; 给予雷米普利干预后, SHR + Ramipril 组 Cx43 表达显著低于 SHR 组 (图 4, 图 5)。

2.5 雷米普利对大鼠脑动脉 Cx43 mRNA 及蛋白表达水平的影响

结果如图 6 所示, WKY + Ramipril 组与 WKY 组之间 Cx43 mRNA 及蛋白表达无统计学差异; SHR 组 Cx43 mRNA 及蛋白表达水平明显高于 WKY 组 ($P < 0.05, n = 8$); SHR + Ramipril 组 Cx43 mRNA 及蛋白表达水平显著低于 SHR 组 ($P < 0.05, n = 8$); 与 WKY + Ramipril 组相比, SHR + Ramipril 组 Cx43 mRNA 及蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, n = 8$)。

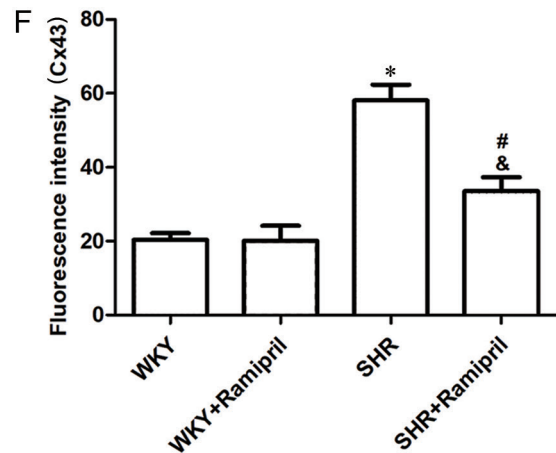
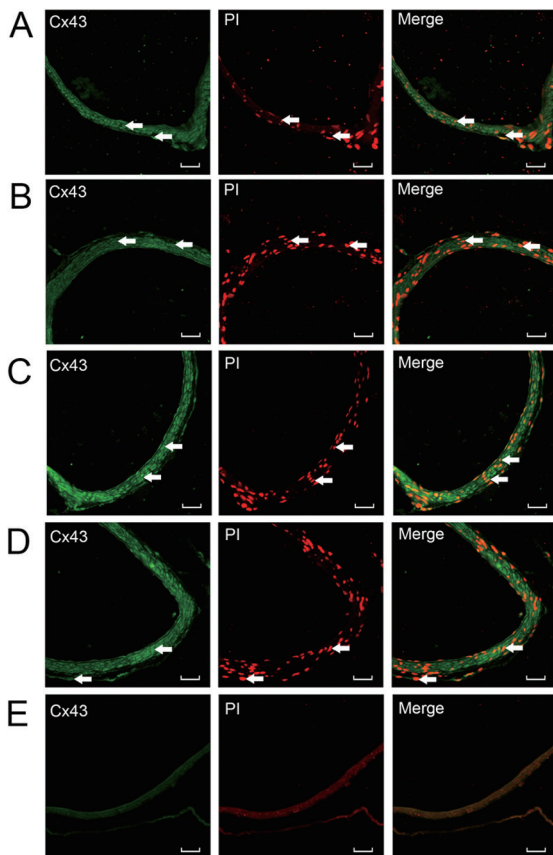


图 4. 免疫荧光检测各组大鼠脑动脉上 Cx43 分布及表达水平

Fig. 4. Comparison of Cx43 expression and distribution in cerebral arteries in each group detected by immunofluorescence method. A: WKY group. B: WKY + Ramipril group. C: SHR group. D: SHR + Ramipril group. E: Negative control group. F: The fluorescence intensity of Cx43 in each groups. Positive cells were indicated by arrows. Mean \pm SD, $n = 8$. * $P < 0.05$ vs WKY group; # $P < 0.05$ vs SHR group; & $P < 0.05$ vs WKY + Ramipril group. Green: Cx43; Red: Nucleus. Scale bar, 25 μm .

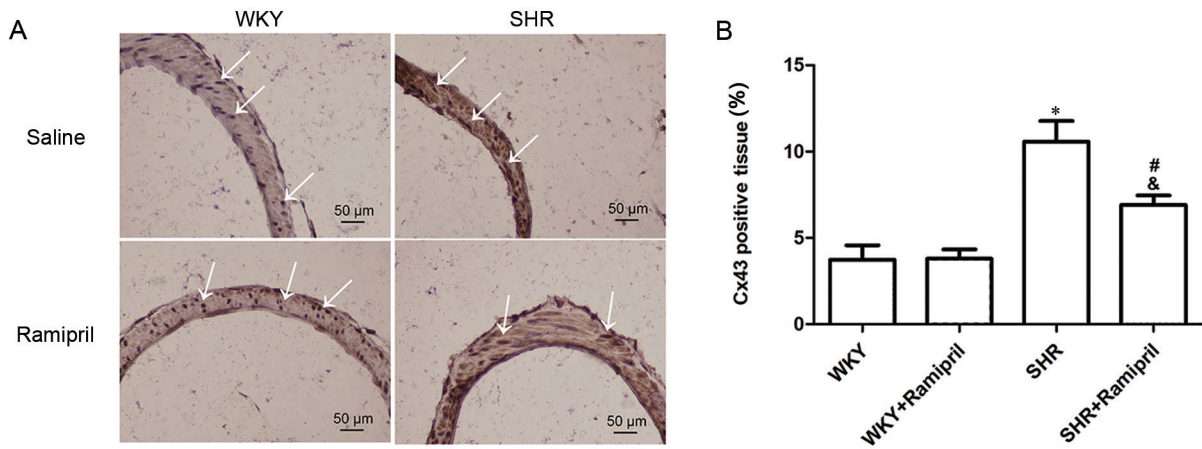


图 5. 免疫组织化学染色法检测各组大鼠脑动脉中Cx43分布及表达水平

Fig. 5. Comparison of Cx43 distribution and expression in cerebral arteries in each group detected by immunohistochemistry. *A*: Representative Cx43 staining performed on cross-sections from cerebral arteries. *B*: Quantitative assessments of positive staining. Positive cells were indicated by arrows. Mean \pm SD, $n = 8$. * $P < 0.05$ vs WKY group; # $P < 0.05$ vs SHR group; & $P < 0.05$ vs WKY + Ramipril group. Brown: Cx43; Purple: Nucleus. Scale bar, 50 μ m.

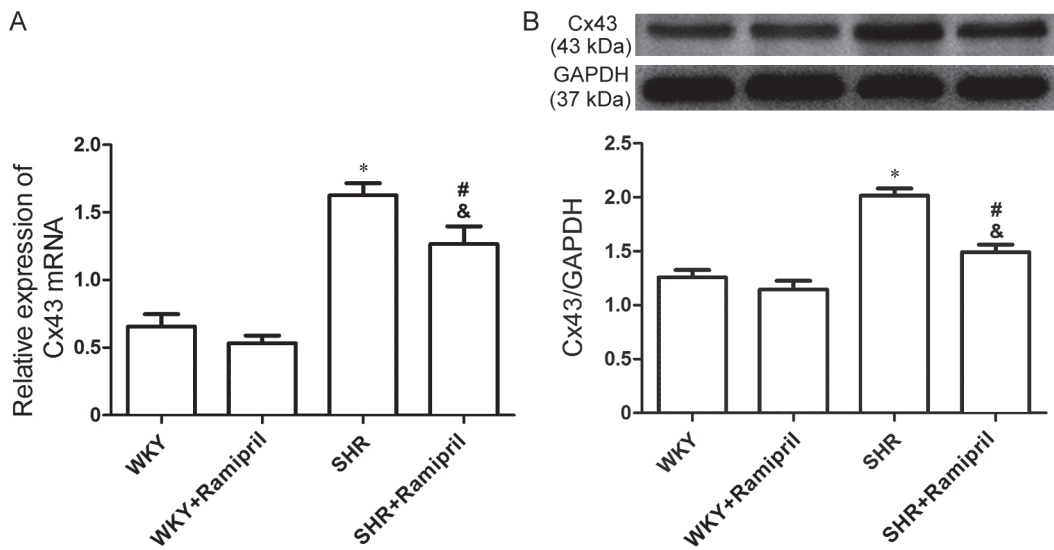


图 6. 各组大鼠脑动脉Cx43 mRNA及蛋白表达水平比较

Fig. 6. Comparison of Cx43 mRNA and protein expression in cerebral arteries in each group. *A*: The Cx43 mRNA expression in cerebral arteries detected by real-time PCR. *B*: The CX43 expression in cerebral arteries detected by Western blot. Mean \pm SD, $n = 8$. * $P < 0.05$ vs WKY group; # $P < 0.05$ vs SHR group; & $P < 0.05$ vs WKY + Ramipril group.

3 讨论

高血压是脑卒中、心力衰竭、心脏猝死等心脑血管事件的主要危险因素。高血压可造成血管结构和功能的异常改变，然而其病理过程中出现的血管局部损伤、重塑、氧化应激以及炎症反应又可加速高血压的发展^[24-27]。本研究结果显示，相比于WKY组，SHR组收缩压显著升高；脑动脉中膜弹力纤维和平滑肌细胞排列紊乱，平滑肌细胞水肿，

平滑肌细胞及基质纤维显著增生，提示高血压发生时出现血管重塑，证实了高血压造成的血管损害。

RAAS系统稳态失衡是高血压发病的重要机制之一。AngII作为RAAS系统的关键组成部分，参与高血压的发生和发展。血管紧张素转换酶抑制剂雷米普利可下调血浆AngII水平、延缓或逆转血管重塑、改善血管舒缩功能、提高血管顺应性。本研究证实，相比于SHR组，SHR + Ramipril组收缩压

显著下降, 脑动脉损伤程度减轻, 提示雷米普利对 SHR 具有降压和抑制脑血管重塑作用。Li 等在对家兔球囊损伤模型的研究中发现, 雷米普利可通过下调动脉中 Cx43 mRNA 和蛋白的表达水平改善家兔动脉血管重塑^[17]; 此外, 雷米普利可不同程度降低 SHR 血压, 下调血浆 AngII 水平, 改善左室肥大和心肌纤维化程度, 恢复心肌 Cx43 mRNA 及蛋白表达水平^[28]。但雷米普利对 SHR 脑动脉 Cx43 表达水平的调节以及 Cx43 在高血压诱导的脑血管重塑中的作用尚不明确。

当发生动脉重塑时, 血管同步收缩反应受限, 进而损害血管的舒缩功能^[29]。然而, 动脉的收缩和舒张取决于动脉血管细胞之间的缝隙连接对血管活性的调节^[30, 31]。已有研究证实, 缝隙连接在诱导平滑肌增殖、调节血管外周阻力和血压等方面发挥着极其重要的作用^[32–34]。本研究结果显示: 与 WKY 组相比, KCl 诱导的脑动脉收缩反应在 SHR 组更明显, 给予雷米普利干预后, SHR + Ramipril 组脑动脉收缩反应明显减弱, 提示高血压发生时脑动脉收缩功能异常, 雷米普利可缓解脑动脉血管收缩功能的异常改变, 这与本研究组前期实验结果^[35]以及 Anderson 等^[36, 37]报道一致。Cx43 半通道通过诱导 Ca²⁺ 入胞、ATP 释放、嘌呤能信号转导增强血管收缩反应。应用 Cx43 特异性半通道阻断肽 TAT-L2, 可减少 Cx43 介导的 Ca²⁺、ATP、IP₃ 在血管壁平滑肌细胞间扩散^[38]。本研究观察到, Cx43 非特异性阻断剂 2-APB 以及 Cx43 特异性阻断剂 Gap26 预处理可减弱 KCl 引起的动脉收缩反应。值得注意的是, 本研究中应用 Cx43 非特异性激动剂预孵育后, 动脉收缩反应较孵育前显著增强, 提示 Cx43 参与雷米普利对 SHR 脑动脉收缩反应的调节。2-APB 及 Gap26 对动脉收缩反应的抑制作用可能是由于其阻断 Cx43 半通道, 抑制细胞外高钾所致的血管壁平滑肌细胞去极化后 Ca²⁺、ATP、IP₃ 在血管壁平滑肌细胞间的传递。Ca²⁺ 在平滑肌细胞间扩散受限, 导致其直接作用的血管平滑肌收缩, 而未能直接作用的平滑肌不能出现同步收缩反应, 最终引起参与脑动脉协调性收缩的平滑肌细胞数量减少, 脑动脉的收缩反应减弱。

Cx43 是血管细胞间缝隙连接的重要蛋白成分, 参与维持血管同步收缩。缝隙连接蛋白的表达及分布异常与高血压的发生和发展相关^[39]。Kansui 等研究显示: SHR 大鼠颈动脉平滑肌细胞中 Cx40 和

Cx37 表达降低, Cx43 表达升高^[40, 41], SHR 脑血管平滑肌细胞中 Cx45 蛋白表达增加^[42]。本研究也检测到, SHR 组脑动脉上 Cx43 mRNA 及蛋白表达水平均高于 WKY 组, SHR + Ramipril 组脑动脉上 Cx43 mRNA 及蛋白表达水平均低于 SHR 组, 提示缝隙连接蛋白表达异常可能是促进高血压发生和发展的重要因素, 雷米普利可下调脑动脉上 Cx43 mRNA 及蛋白表达水平, 进而逆转高血压诱导的脑动脉血管重塑。

综上所述, 本研究结果表明 Cx43 表达水平升高参与高血压诱导的脑动脉重塑, 雷米普利可下调 SHR 脑动脉血管细胞间 Cx43 mRNA 及蛋白表达, 发挥对脑动脉重塑的抑制作用。有研究表明, Cx43 可通过抑制 Cx37 表达和功能, 也可通过激活 MAPK-AP-1 和 Akt 等信号通路, 进而促进平滑肌细胞增殖, 加速血管重塑^[13, 20]。然而 Cx43 对 SHR 脑动脉血管损伤的具体调控机制, 以及其中可能参与的信号通路还有待进一步研究。我们将会把缝隙连接介导的脑动脉损伤机制作为日后研究重点, 为高血压诱发的脑动脉重塑提供新的治疗靶点。

参考文献

- 1 Sun HJ, Liu TY, Zhang F, Xiong XQ, Wang JJ, Chen Q, Li YH, Kang YM, Zhou YB, Han Y, Gao XY, Zhu GQ. Salusin- β contributes to vascular remodeling associated with hypertension via promoting vascular smooth muscle cell proliferation and vascular fibrosis. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852(9): 1709–1718.
- 2 Stanzone R, Bianchi F, Cotugno M, Marchitti S, Forte M, Busceti C, Ryskalin L, Fornai F, Volpe M, Rubattu S. A decrease of brain microRNA-122 level is an early marker of cerebrovascular disease in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 2017: 1–13.
- 3 Cruciani V, Mikalsen SO. Connexins, gap junctional intercellular communication and kinases. *Biol Cell* 2002; 94(7–8): 433–443.
- 4 Boengler K, Dodoni G, Rodriguezsinovas A, Cabestrero A, Ruizmeana M, Gres P, Konietzka I, Lopeziglesias C, Garcadorado D, Di LF. Connexin 43 in cardiomyocyte mitochondria and its increase by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 2005; 67(2): 234–244.
- 5 Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Cardiac arrhythmogenesis and the gap junction. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27(1): 37–44.
- 6 Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, Laing JG, Beyer EC, Yamada KA, Kléber AG, Schuessler RB, Saffitz JE. Dephos-

- phorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res* 2000; 87(8): 656–662.
- 7 Guo R, Liu L, Barajas L. RT-PCR study of the distribution of connexin 43 mRNA in the glomerulus and renal tubular segments. *Am J Physiol* 1998; 275(2 Pt 2): R439–R447.
 - 8 Lin YC, Chiang CH, Chang LT, Sun CK, Leu S, Shao PL, Hsieh MC, Tsai TH, Chua S, Chung SY. Simvastatin attenuates the additive effects of TNF- α and IL-18 on the connexin 43 up-regulation and over-proliferation of cultured aortic smooth muscle cells. *Cytokine* 2013; 62(3): 341–351.
 - 9 Zhong H (钟华), Hu QH, Wang EB, Zhao D, Sun ZP, Si JQ, He F. Roles of gap junction in TGF- β 1-induced proliferation of vascular smooth muscle cells from spontaneous hypertensive rats. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)* 2012; 28(1): 16–21 (in Chinese with English abstract).
 - 10 Song M, Yu X, Cui X, Zhu G, Zhao G, Chen J, Huang L. Blockade of connexin 43 hemichannels reduces neointima formation after vascular injury by inhibiting proliferation and phenotypic modulation of smooth muscle cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 2009; 234(10): 1192–1200.
 - 11 Joshi CN, Martin DN, Shaver P, Madamanchi C, Mullerborer BJ, Tulis DA. Control of vascular smooth muscle cell growth by connexin 43. *Front Physiol* 2012; 3: 220.
 - 12 Johnstone SR, Ross J, Rizzo MJ, Straub AC, Lampe PD. Oxidized phospholipid species promote *in vivo* differential cx43 phosphorylation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Pathol* 2009; 175(2): 916–924.
 - 13 Jia G, Cheng G, Gangahar DM, Agrawal DK. Involvement of connexin 43 in angiotensin II-induced migration and proliferation of saphenous vein smooth muscle cells via the MAPK-AP-1 signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol* 2008; 44(5): 882–890.
 - 14 Gray MO, Long CS, Kalinyak JE, Li HT, Karliner JS. Angiotensin II stimulates cardiac myocyte hypertrophy via paracrine release of TGF- β 1 and endothelin-1 from fibroblasts. *Cardiovasc Res* 1998; 40(2): 352–363.
 - 15 Sil P, Sen S. Angiotensin II and myocyte growth: role of fibroblasts. *Hypertension* 1997; 30(2 Pt 1): 209–216.
 - 16 Liakishev AA. Telmisartan, ramipril, or both in patients at high risk for vascular events. Results of the ONTARGET trial. *Kardiologia* 2008; 48(5): 72.
 - 17 Li DQ, Chen WX, Zhou YP, Han Y. Effect of ramipril on the regulation of the expression of connexins 40 and 43 in a rabbit model of arterial balloon injury. *Mol Med Rep* 2012; 6(3): 565–569.
 - 18 Ni X, Wang A, Zhang L, Shan LY, Zhang HC, Li L, Si JQ, Luo J, Li XZ, Ma KT. Up-regulation of gap junction in peripheral blood T lymphocytes contributes to the inflammatory response in essential hypertension. *PLoS One* 2017; 12(9): e0184773.
 - 19 Kubota Y, Umegaki K, Kagota S, Tanaka N, Nakamura K, Kunitomo M, Shinozuka K. Evaluation of blood pressure measured by tail-cuff methods (without heating) in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull* 2006; 29(8): 1756–1758.
 - 20 Allagnat F, Dubuis C, Lambelet M, Le GL, Alonso F, Corpaux JM, Déglise S, Haefliger JA. Connexin37 reduces smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia in a mouse model of carotid artery ligation. *Cardiovasc Res* 2017; 113(7): 805–816.
 - 21 Wang LJ, Ma KT, Shi WY, Wang YZ, Zhao L, Chen XY, Li XZ, Jiang XW, Zhang ZS, Li L, Si JQ. Enhanced gap junctional channel activity between vascular smooth muscle cells in cerebral artery of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* 2017; 39(4): 295–305.
 - 22 Wang LJ, Liu WD, Zhang L, Ma KT, Zhao L, Shi WY, Zhang WW, Wang YZ, Li L, Si JQ. Enhanced expression of Cx43 and gap junction communication in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Mol Med Rep* 2016; 14(5): 4083–4090.
 - 23 Liu YH, Zhang ZP, Wang Y, Song J, Ma KT, Si JQ, Li L. Electrophysiological properties of strial pericytes and the effect of aspirin on pericyte K⁺ channels. *Mol Med Rep* 2018; 17(2): 2861–2868.
 - 24 Yang G, Wu L, Bryan S, Khaper N, Mani S, Wang R. Cystathionine gamma-lyase deficiency and overproliferation of smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 2010; 86(3): 487–495.
 - 25 Wen YD, Hong W, Sok-Hong K, Suguro R, Xiong S, Shen HM, Zhu YZ. Hydrogen sulfide protects HUVECs against hydrogen peroxide induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress. *PLoS One* 2013; 8(2): e53147.
 - 26 Yu XH, Cui LB, Wu K, Zheng XL, Cayabyab FS, Chen ZW, Tang CK. Hydrogen sulfide as a potent cardiovascular protective agent. *Clin Chim Acta* 2014; 437(1): 78–87.
 - 27 Parati G, Esler M. The human sympathetic nervous system: its relevance in hypertension and heart failure. *Eur Heart J* 2012; 33(9): 1058–1066.
 - 28 Tan LL (谭力力), Li L, Liu LM, Zhao HL. Effect of RAAS antagonist on the expression of gap junction cx43 in myocardium of spontaneously hypertensive rat. *J Sichuan Univ (Med Sci Ed) (四川大学学报医学版)* 2013; 44(4): 531–535 (in Chinese with English abstract).
 - 29 Pires PW, Jackson WF, Dorrance AM. Regulation of myogenic tone and structure of parenchymal arterioles by hypertension and the mineralocorticoid receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2015; 309(1): H127–H136.
 - 30 Figueroa XF, Isakson BE, Duling BR. Connexins: gaps in

- our knowledge of vascular function. *Physiology* (Bethesda) 2004; 19(5): 277–284.
- 31 Reeves DC, Lummis SC. The molecular basis of the structure and function of the 5-HT₃ receptor: a model ligand-gated ion channel (review). *Mol Membr Biol* 2002; 19(1): 11–26.
- 32 Song D, Liu X, Liu R, Yang L, Zou L, Liu W. Connexin 43 hemichannel regulates H9c2 cell proliferation by modulating intracellular ATP and Ca²⁺. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai) 2010; 42(7): 472–482.
- 33 Azzam EI, de Toledo SM, Little JB. Direct evidence for the participation of gap junction-mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from alpha-particle irradiated to nonirradiated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(2): 473–478.
- 34 de Wit C, Roos F, Bolz SS, Pohl U. Lack of vascular connexin 40 is associated with hypertension and irregular arteriolar vasomotion. *Physiol Genomics* 2003; 13(2): 169–177.
- 35 Ma KT, Li XZ, Li L, Jiang XW, Chen XY, Liu WD, Zhao L, Zhang ZS, Si JQ. Role of gap junctions in the contractile response to agonists in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2014; 37(2): 110–115.
- 36 Anderson CM, Lopez F, Zhang HY, Pavlish K, Benoit JN. Reduced uteroplacental perfusion alters uterine arcuate artery function in the pregnant Sprague-Dawley rat. *Biol Reprod* 2005; 72(3): 762–766.
- 37 Anderson CM, Lopez F, Zhang HY, Shirasawa Y, Pavlish K, Benoit JN. Mesenteric vascular responsiveness in a rat model of pregnancy-induced hypertension. *Exp Biol Med* (Maywood) 2006; 231(8): 1398–1402.
- 38 Bol M, Wang N, De Bock M, Wacquier B, Decrock E, Gadiclerla A, Decaluwé K, Vanheel B, van Rijen HV, Krysko DV, Bultynck G, Dupont G, Van de Voorde J, Leybaert L. At the cross-point of connexins, calcium, and ATP: blocking hemichannels inhibits vasoconstriction of rat small mesenteric arteries. *Cardiovasc Res* 2016; 113(2): 195–206.
- 39 Alonso F, Krattinger N, Mazzolai L, Simon A, Waeber G, Meda P, Haefliger JA. An angiotensin II- and NF-κB-dependent mechanism increases connexin 43 in murine arteries targeted by renin-dependent hypertension. *Cardiovasc Res* 2010; 87(1): 166–176.
- 40 Kansui Y, Fujii K, Nakamura K, Goto K, Oniki H, Abe I, Shibata Y, Iida M. Angiotensin II receptor blockade corrects altered expression of gap junctions in vascular endothelial cells from hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287(1): H216–H224.
- 41 Figueroa XF, Isakson BE, Duling BR. Vascular gap junctions in hypertension. *Hypertension* 2006; 48(5): 804–811.
- 42 Li X, Simard JM. Increase in Cx45 gap junction channels in cerebral smooth muscle cells from SHR. *Hypertension* 2002; 40(6): 940–946.