

# 血管平滑肌细胞表型转化在高盐诱导的大鼠颈动脉重构中的作用

胡从智<sup>1,2</sup>, 商黔惠<sup>1,2</sup>, 刘婵<sup>1</sup>, 刘娟<sup>1</sup>, 赵宇<sup>1,3</sup>, 王晓春<sup>1</sup>

(1.遵义医学院临床医学研究所 心血管病研究所 高血压研究室,2.遵义医学院附属医院心内科,

3.遵义医学院附属医院内分泌科, 贵州省遵义市 563003)

[关键词] 高盐饮食; 高血压; 颈动脉重构; 表型转化

[摘要] 目的 探讨血管平滑肌细胞发生表型转化在高盐饮食诱导的 Wistar 大鼠颈动脉重构中的作用以及替米沙坦的干预效应。方法 雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组(0.5%NaCl 饲料饲养)、高盐模型组(4%NaCl 饲料饲养)和替米沙坦组(替米沙坦+4%NaCl 饲料饲养),共喂养 24 周。HE 染色和 Masson 染色观察颈动脉中膜形态结构的变化。通过 real-time PCR 和免疫组织化学法测定  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、平滑肌 22 $\alpha$ (SM22 $\alpha$ )、骨桥蛋白(OPN)的 mRNA 和蛋白在颈动脉的表达。结果 与对照组比较,高盐模型组大鼠的血压明显升高( $P<0.05$ ),颈动脉中膜增厚、中膜厚度/腔径比、血管壁横截面积、中膜胶原容积分数增加,增殖细胞核抗原(PCNA)阳性表达明显增加( $P<0.01$ ), $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  的蛋白和 mRNA 表达明显降低,而 OPN 的蛋白和 mRNA 表达升高;与高盐模型组比较,替米沙坦组大鼠的血压降低,颈动脉中膜厚度和血管壁横截面积减少、中膜胶原容积分数降低、PCNA 阳性表达率减少( $P<0.01$ ), $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  的蛋白及 mRNA 表达升高,而 OPN 的蛋白和 mRNA 表达降低。结论 4%高盐饮食可引起 Wistar 大鼠颈动脉重构和血压升高,其机制之一可能为血管平滑肌细胞在高盐的作用下发生了由收缩型向合成型转变的表型转化;替米沙坦能够抑制血管平滑肌细胞发生表型转化,并改善颈动脉重构。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## The Role of Phenotype Transformation of Vascular Smooth Muscle Cells in High Salt-induced Carotid Artery Remodeling of Wistar Rats

HU Cong-Zhi<sup>1,2</sup>, SHANG Qian-Hui<sup>1,2</sup>, LIU Chan<sup>1</sup>, LIU Juan<sup>1</sup>, ZHAO Yu<sup>1,3</sup>, and WANG Xiao-Chun<sup>1</sup>

(1. Clinical Medicine Institute & Institute of Cardiovascular Disease & Hypertension Research Lab, Zunyi Medical College, 2. Department of Cardiology of Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, 3. Department of Endocrinology of Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

[KEY WORDS] High-salt Diet; Hypertension; Carotid Artery Remodeling; Phenotypic Transformation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of vascular smooth muscle cell phenotype transformation in carotid artery remodeling of Wistar rats fed by high salt diet, and the intervention of telmisartan. **Methods** The male Wistar rats were randomly divided into control group (0.5%NaCl feed), model group (4%NaCl feed), telmisartan group (4%NaCl and telmisartan 5 mg/(kg·day) feed). After 24 weeks, changes of morphology and structure of carotid artery were investigated by HE staining and Masson staining. The mRNA and protein levels of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), smooth muscle 22 $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ) and osteopontin (OPN) were analyzed by quantitative real-time PCR and immunohistochemical staining. **Results** Compared with the control group, the blood pressure, media thickness, cross-sectional area, collagen volume fraction, and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cells were elevated in the model group. At the same time, the model group showed an increase in the mRNA and protein levels of  $\alpha$ -SMA, SM22 $\alpha$ , and a decrease of OPN. The telmisartan reduced the blood pressure, media thickness, cross-sectional area, collagen volume fraction, and the expression of PCNA and OPN, compared with the model group. Moreover, the mRNA and protein levels of  $\alpha$ -SMA, SM22 $\alpha$  were upregulated by telmisartan. **Conclusions** The 4% high salt diet can cause carotid artery remodeling and elevated-blood pressure in

[收稿日期] 2015-10-09

[修回日期] 2016-01-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160041 和 81460077);贵州省社会发展攻关计划项目[黔科合 SY 字(2011)3047 号]

[作者简介] 胡从智,硕士研究生,研究方向为高血压发病机制及其靶器官损害,E-mail 为 237876479@qq.com。刘婵,助理研究员,研究方向为高血压发病机制和药物干预,E-mail 为 zmliuchan@163.com。通讯作者商黔惠,教授,硕士研究生导师,研究方向为高血压发病机制和药物干预,E-mail 为 qhshang60@126.com。

Wistar rats. The vascular smooth muscle phenotype transformation might be involved in the mechanism of carotid artery remodeling induced by high salt. Telmisartan can prevent artery remodeling partially via regulating vascular smooth muscle cell phenotypic transformation.

近年来的研究表明,高盐摄入不仅导致血压升高,而且有独立于血压之外的多重作用,直接导致组织器官损伤,如左心室肥厚、肾功能损害、脑卒中等<sup>[1]</sup>,但其机制尚未完全明了。高血压引起动脉重构在组织学上主要表现为动脉血管中膜增厚、纤维化,中层平滑肌增生肥厚,细胞外基质重构。血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)是血管壁的主要结构细胞,也是血管发生重构的关键因素<sup>[2]</sup>。在高血压等病理状态下,血管结构和功能发生适应性改变,VSMC增殖、肥大,由收缩型向合成型转变,并向内膜迁移,合成与分泌功能增强,导致血管重构。在高血压大鼠中,VSMC表型的变化参与了血管重构<sup>[3-4]</sup>。VSMC表型标志物中 $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、平滑肌22 $\alpha$ (smooth muscle 22 $\alpha$ , SM22 $\alpha$ )主要为收缩表型标志物,骨桥蛋白(osteopontin, OPN)主要为合成表型标志物<sup>[5-6]</sup>。新近研究表明,VSMC表型标志物SM22 $\alpha$ 、OPN与血管重构存在相关性<sup>[7]</sup>。高盐诱导大鼠血管重构是否与VSMC的表型转化存在某种机制上的联系,目前未见文献报道。血管紧张素转化酶抑制剂依那普利、血管紧张素II 1型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1R)拮抗剂能调节自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)心肌壁内动脉VSMC向收缩型转化<sup>[8]</sup>。但是否也通过阻止VSMC发生表型转化来改善血管中膜的重构需要进一步的研究。本研究主要探讨高盐饮食(4%NaCl饲料)对正常Wistar大鼠发生血管重构的基础上,进一步探讨VSMC表型转化在血管重构中的作用以及替米沙坦的干预效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

5~7周龄清洁级雄性健康Wistar大鼠,体重80~100g,由重庆第三军医大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK-(渝)2007-005。0.5%NaCl和4%NaCl的颗粒饲料购自广东省实验动物中心,许可证号:SCXK-(粤)2008-0002。

### 1.2 模型的建立及分组

Wistar大鼠适应性饲养一周随机分为三组:对照组( $n=8$ )、高盐模型组( $n=10$ )、替米沙坦组( $n$

$=9$ )。对照组饲以正常盐含量(0.5%NaCl饲料)喂养,高盐模型组饲以含4%NaCl饲料喂养,替米沙坦组予以4%NaCl饲料,同时予以替米沙坦加入饮用水中,替米沙坦给药浓度5mg/(kg·d),于实验前记录动物每日饮水量,以稍高于该饮水量配置替米沙坦,每天换一次饮用水<sup>[9-10]</sup>。各组大鼠在相同标准环境下饲养,自由饮用自来水,共饲养24周。

### 1.3 血压的测定

适应性饲养一周后测量大鼠尾动脉收缩压为基础血压,严格按照Softron BP-98A大小鼠无创测压仪说明书操作,每两周测量一次尾动脉压,每只大鼠测量3次,取其平均值。

### 1.4 标本的处理和采集

实验结束,各组大鼠术前禁食12h,10%水合氯醛按照0.3mL/100g体质量腹腔注射麻醉,大鼠仰卧固定,剪去颈部正中约2cm×3cm范围的毛,切开颈部皮肤,钝性逐层分离肌肉至颈动脉,于颈动脉分叉处约0.5cm处剪下颈动脉,以冷生理盐水冲洗,部分置于4%多聚甲醛中固定24h,脱水、透明和石蜡包埋,部分置于盛有Trizol的去酶EP管内,经液氮速冻后转入-80℃冰箱保存。

### 1.5 HE染色

石蜡切片脱蜡至水,苏木素染色3~4min,流水冲洗1min,1%盐酸酒精分化返蓝5s,流水冲洗10min,伊红染色2min,流水冲洗30s,梯度酒精脱水,烤箱烤干,中性树脂胶封片。用Olympus IX51显微镜采集100倍和400倍图像,利用Image Pro-Plus6.0图像分析系统测量颈动脉中膜血管内环、外环面积,计算内、外环半径,腔径=2×内环半径,中膜厚度=外环半径-内环半径,血管壁横截面积=血管外环面积-内环面积。

### 1.6 Masson染色

石蜡切片脱蜡至水,苏木素染色7min,流水冲洗,丽春红酸性复红染色5min,0.5%冰醋酸冲洗,1%磷钼酸分化数十秒,0.5%冰醋酸冲洗,2%亮绿染色1min,梯度酒精脱水,烤箱烤干(60℃,3~5min),中性树脂胶封片。Masson染色使得胶原纤维呈绿色,肌纤维和弹力纤维呈红色。用Olympus IX51显微镜采集100倍和400倍图像,选用100倍图片,利用Image Pro-Plus6.0图像分析系统计算血管中膜胶原

容积分数,胶原容积分数=血管中膜胶原面积/血管中膜面积。

### 1.7 免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡至水,PBS 缓冲液冲洗,3%过氧化氢封闭 10 min,进行抗原修复(中高火 5 min,中低火 10 min),待修复液自然冷却至室温,PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 10 min,山羊血清封闭 10 min,甩干,滴加一抗将整个血管覆盖(一抗浓度分别为  $\alpha$ -SMA 1:150,SM22 $\alpha$  1:100,OPN 1:150,PCNA 1:100),于湿盒中 4℃ 冰箱过夜(12~16 h),将湿盒从冰箱中取出于 37℃ 烘箱复温 30 min,PBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 10 min,滴加二抗室温孵育 30 min,PBS 缓冲液冲洗,DAB 显色,在镜下控制显色时间,终止显色,流水冲洗 10 min,苏木素染色 5 min,流水冲洗 10 min,1%盐酸酒精分化 4 s,流水冲洗 10 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。每个标本使用 Olympus IX51 显微镜在固定的曝光时间等条件下,采集 400 倍图像。利用 Image Pro-Plus6.0 图像分析软件,校正好光密度值,每个标本随机选取 5 个视野分析平均光密度(胞浆表达)或阳性细胞表达率(胞核表达)。平均光密度=累计光密度/颈动脉中膜面积,阳性细胞表达率=颈动脉中膜阳性细胞核数目/颈动脉中膜总细胞核数目。

### 1.8 real-time PCR 检测

将冰冻保存于 Trizol 中的样本于冰上充分研磨,按照 RNA 提取试剂盒说明书进行 RNA 提取和纯化,紫外分光光度计测定样本在 260 nm 和 280 nm 的吸光度值及浓度, $A_{260}/A_{280}$  在 1.8~2.0 范围内。将 RNA 样本统一稀释为 50  $\mu$ g/L,配置 20  $\mu$ L 体系的逆转录液进行逆转录合成 cDNA 后进行 real-time PCR 反应,结果以 Ct 值为参数(相对法)进行统计处理。引物序列见表 1。

### 1.9 统计学方法

所有数据用  $\bar{x}\pm s$  表示,三组间比较行单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血压的变化

各组大鼠基础血压无明显差异;实验末,与对照组比较,高盐模型组血压明显升高( $P<0.01$ );经替米沙坦干预后,血压降低( $P<0.01$ ;表 2)。

表 1. PCR 引物序列

Table 1. PCR primer sequence

基因名称	引物序列	扩增产物大小
$\alpha$ -SMA	上游 5'-ACCATCGGAATGAACGCTT-3'	263 bp
	下游 5'-TTGCGTCTGGAGGAGCAAT-3'	
SM22 $\alpha$	上游 5'-GAGTCACGAAGACTGACATGTTCCA-3'	90 bp
	下游 5'-TGCCCAAAGCCATTACAGTCC-3'	
OPN	上游 5'-GCCGAGGTGATAGCTTGGCTTA-3'	136 bp
	下游 5'-TTGATAGCTCATCGGACTCCTG-3'	
GAPDH	上游 5'-CAGTGCCAGCCTCGTCTCA-3'	76 bp
	下游 5'-TAACCAGGCGTCCGATACG-3'	

表 2. 各组大鼠尾动脉血压比较( $\bar{x}\pm s$ , mmHg)

Table 2. Comparison of rat tail artery blood pressure in each group( $\bar{x}\pm s$ , mmHg)

分组	n	基础血压	24 周血压
对照组	8	108.4 $\pm$ 4.8	107.8 $\pm$ 7.6
高盐模型组	10	112.2 $\pm$ 5.0	140.7 $\pm$ 8.0 <sup>a</sup>
替米沙坦组	9	105.4 $\pm$ 10.5	108.7 $\pm$ 7.5 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P<0.01$ ,与高盐模型组比较。

### 2.2 颈动脉血管重构情况

与对照组比较,高盐模型组颈动脉中膜细胞层数增多,VSMC 细胞核数量增加且排列紊乱,中膜弹性膜弯曲;与高盐模型组比较,替米沙坦组以上现象有所改善(图 1)。

与对照组比较,高盐模型组颈动脉中膜厚度、中膜厚度/腔径比、血管壁横截面积增加( $P<0.05$ );经替米沙坦干预后,颈动脉中膜厚度、血管壁横截面积明显减小( $P<0.05$ )。各组间腔径无统计学差异(表 3)。

### 2.3 颈动脉 Masson 染色情况及血管中膜胶原容积分数变化

Masson 染色下,颈动脉中膜平滑肌细胞胞浆被染成红色,胶原纤维被染成绿色(图 2)。与对照组比较,高盐模型组颈动脉中膜胶原沉积明显增加( $P<0.05$ );与高盐模型组比较,替米沙坦组胶原沉积减少( $P<0.05$ ;表 4)。

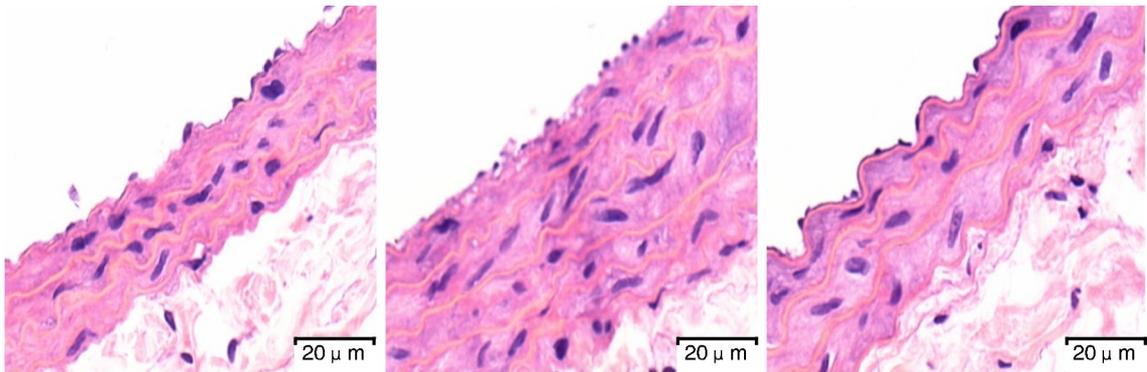


图 1. 各组大鼠颈动脉形态学比较 从左至右分别为对照组、高盐模型组、替米沙坦组。

Figure 1. Comparison of rat carotid artery morphology in each group

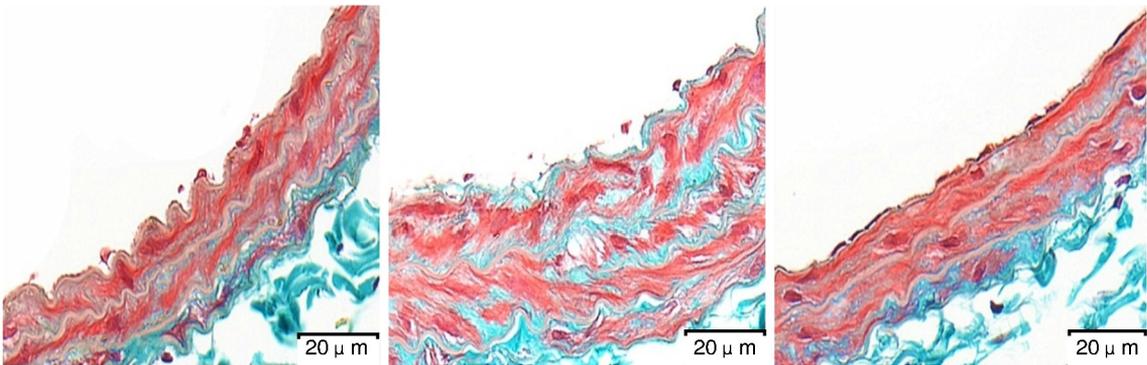


图 2. 各组大鼠颈动脉 Masson 染色 从左至右分别为对照组、高盐模型组、替米沙坦组。

Figure 2. Masson staining of carotid artery in each group

表 3. 各组大鼠颈动脉重构相关指标( $\bar{x}\pm s$ )

Table 3. Related indexes of carotid artery remodeling in rats( $\bar{x}\pm s$ )

分组	中膜厚度( $\mu\text{m}$ )	腔径( $\mu\text{m}$ )	中膜厚度/腔径比	血管壁横截面积( $\text{mm}^2$ )
对照组	61.72±6.00	455.98±91.40	0.139±0.03	0.096±0.022
高盐模型组	84.34±9.41 <sup>a</sup>	442.24±70.65	0.198±0.05 <sup>a</sup>	0.138±0.013 <sup>a</sup>
替米沙坦组	67.64±10.47 <sup>b</sup>	364.44±81.09	0.194±0.05 <sup>a</sup>	0.109±0.058 <sup>b</sup>

a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与高盐模型组比较。

表 4. 各组大鼠颈动脉中膜胶原容积分数( $\bar{x}\pm s$ )

Table 4. Rat carotid artery collagen fiber area ratio in each group( $\bar{x}\pm s$ )

分组	胶原容积分数
对照组	7.00%±1.68%
高盐模型组	13.12%±2.35% <sup>a</sup>
替米沙坦组	9.31%±1.39% <sup>b</sup>

a 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P<0.01$ , 与高盐模型组比较。

#### 2.4 颈动脉 PCNA 蛋白的表达

颈动脉中膜平滑肌细胞增殖细胞核抗原 (pro-

liferating cell nuclear antigen, PCNA) 蛋白表达在细胞核呈棕黄色。与对照组比较, 高盐模型组颈动脉中膜平滑肌细胞 PCNA 的表达明显增加 ( $14.583 \pm 1.242$  比  $24.557 \pm 2.723$ ,  $P<0.01$ ); 经替米沙坦干预后, PCNA 的表达明显减少 ( $24.557 \pm 2.723$  比  $15.598 \pm 1.367$ ,  $P<0.01$ ; 图 3)。

#### 2.5 颈动脉 $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$ 、OPN 蛋白和 mRNA 的表达

颈动脉中膜平滑肌细胞  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$ 、OPN 蛋白表达在细胞胞浆呈棕黄色。与对照组比较, 高盐模型组颈动脉中膜  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  蛋白和 mRNA

表达减少,而 OPN 蛋白和 mRNA 表达增高 ( $P < 0.05$ );经替米沙坦干预后, $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  蛋白和

mRNA 表达升高,OPN 蛋白和 mRNA 表达下降 ( $P < 0.05$ ;图 4 和表 5)。

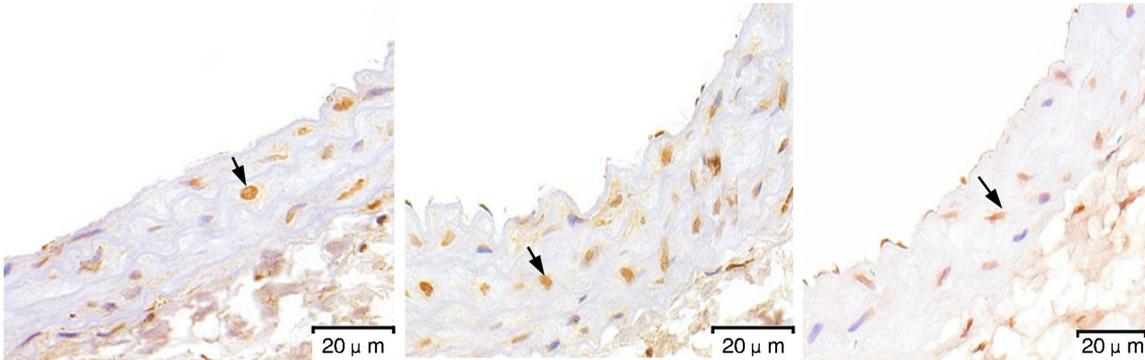


图 3. 颈动脉 PCNA 免疫组织化学染色 从左至右分别为对照组、高盐模型组、替米沙坦组;→为阳性细胞核。

Figure 3. Expression of rat carotid media PCNA by immunohistochemical staining

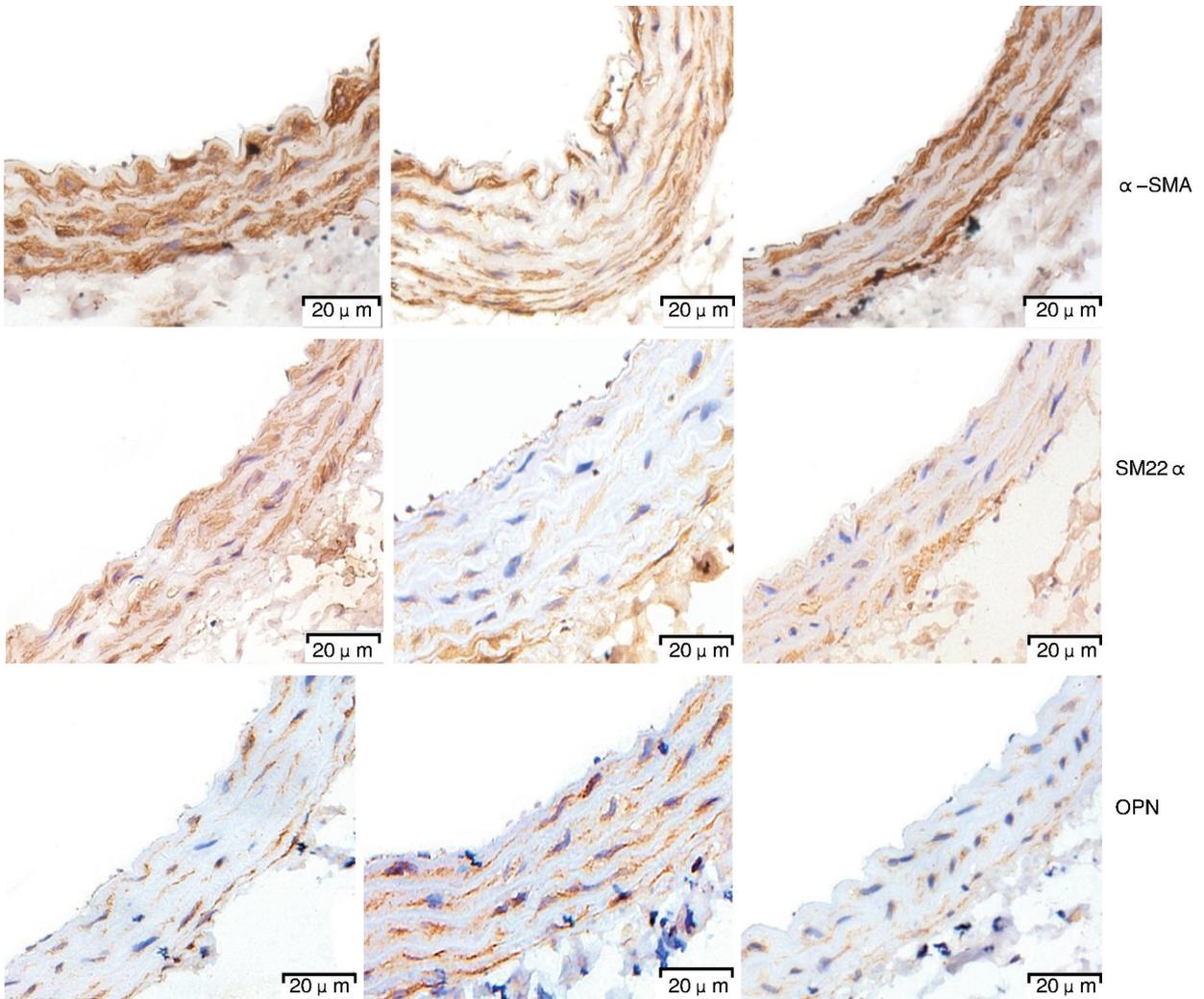


图 4. 颈动脉  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$ 、OPN 免疫组织化学染色 从左至右分别为对照组、高盐模型组、替米沙坦组。

Figure 4. Expression of rat carotid media  $\alpha$ -SMA, SM22 $\alpha$ , OPN by immunohistochemical staining

表 5. 各组大鼠颈动脉  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  和 OPN 的表达Table 5. The expression of  $\alpha$ -SMA, SM22 $\alpha$  and OPN of carotid artery in each group

项目	对照组	高盐模型组	替米沙坦组
$\alpha$ -SMA 蛋白	0.1788 $\pm$ 0.0309	0.0782 $\pm$ 0.0096 <sup>a</sup>	0.1221 $\pm$ 0.0072 <sup>b</sup>
mRNA	161.9 $\pm$ 62.2	85.1 $\pm$ 13.9 <sup>a</sup>	146.9 $\pm$ 23.7 <sup>b</sup>
SM22 $\alpha$ 蛋白	0.0106 $\pm$ 0.0012	0.0052 $\pm$ 0.0010 <sup>a</sup>	0.0095 $\pm$ 0.0016 <sup>b</sup>
mRNA	141.1 $\pm$ 56.8	43.1 $\pm$ 15.1 <sup>a</sup>	140.5 $\pm$ 23.7 <sup>b</sup>
OPN 蛋白	0.0038 $\pm$ 0.0098	0.0067 $\pm$ 0.0011 <sup>a</sup>	0.0041 $\pm$ 0.0012 <sup>b</sup>
mRNA	79.7 $\pm$ 15.5	366.1 $\pm$ 72.6 <sup>a</sup>	96.5 $\pm$ 22.8 <sup>b</sup>

a 为  $P < 0.01$ , 与对照组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与高盐模型组比较。

### 3 讨论

大量的流行病学和动物实验证实高盐摄入可引起高血压,并且其作为一种重要的环境因素可独立于血压因素引起血管重构<sup>[11]</sup>。王倩等<sup>[12]</sup>用高盐饮水喂养正常 Wistar 大鼠 21 天,大鼠血压明显升高;曾昭华等<sup>[13]</sup>用 4% 高盐饲料喂养正常 Wistar 大鼠,8 周后大鼠血压升高并且出现了血管重构。因此,慢性盐负荷可以促进大鼠血压升高,血管发生重构。血管重构是对各种刺激因素的适应性改变,血管重构主要分为增生性重构和肥厚性重构,增生性重构主要表现为 VSMC 数目及细胞外基质增加,并且发生 VSMC 向内膜移行等行为;肥厚性重构表现为平滑肌细胞肥大、血管壁厚度增加<sup>[14]</sup>。本实验室的前期实验表明 8% 高盐饮食可以直接导致大鼠颈动脉中膜增厚、平滑肌细胞肥大和增殖<sup>[15]</sup>。在本研究中可以观察到 4% 高盐模型组 Wistar 大鼠颈动脉中膜厚度、中膜厚度/腔径比及血管壁横截面积较对照组均有所增加,并且通过 Masson 染色可见血管中膜大量胶原沉积。PCNA 是与细胞增殖周期相关的核蛋白,反应细胞的增殖状态,同时也是 VSMC 进入细胞循环和增殖所必需的因子,能够很好地评价细胞的增殖状态。PCNA 免疫组织化学染色结果显示,高盐模型组颈动脉中膜 PCNA 阳性细胞表达率较对照组明显升高,VSMC 处于增殖状态。以上结果表明 4% NaCl 高盐饮食可以导致 Wistar 大鼠颈动脉发生增生和肥厚性重构。

血管重构其内容至少包括细胞的增殖、迁移、凋亡以及基质的合成、降解和重新排列。血管中膜主要由 VSMC 构成,高分化的 VSMC 呈收缩表型,具有收缩功能,但是 VSMC 并非终末分化细胞,能在收缩表型和合成表型之间相互转变<sup>[5]</sup>。在某些病理

因素的刺激下 VSMC 则会从收缩表型向合成表型转化,合成和分泌功能重新活跃,具有高增殖、迁移、合成细胞外基质的能力,造成 VSMC 增殖、肥大和向内膜下迁移等生物行为的改变<sup>[16]</sup>,并且 VSMC 向合成型转化成为其增殖的前提<sup>[17]</sup>。所以,VSMC 收缩表型标志物的降低,同时合成表型标志物的升高可以表明 VSMC 已经发生或正在发生从收缩表型向合成表型的转化。收缩表型的 VSMC 处于高分化状态,有  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  等基因的表达, $\alpha$ -SMA 是一种骨架蛋白,是 VSMC 收缩表型早期特异性标志物。SM22 $\alpha$  也是一种骨架相关蛋白,与细胞骨架重构和表型调节有关,在 VSMC 中其表达具有特异性,在收缩表型 VSMC 中大量表达,而在合成表型中表达量显著减少<sup>[18-19]</sup>,并且可以抑制 VSMC 的增殖、维持 VSMC 的收缩表型,是 VSMC 收缩表型的标志物之一<sup>[5]</sup>。OPN 是一种磷酸化的糖蛋白,是 VSMC 合成表型的标志物<sup>[20]</sup>,并且 VSMC 在多种细胞因子和生长因子的刺激下在增殖的同时大量表达 OPN,在大鼠体内采用基于 shRNA 基因阻断技术抑制 VSMC OPN 基因表达后,细胞增殖受到明显的抑制,这也说明骨桥蛋白与 VSMC 的增殖密切相关<sup>[7]</sup>。国外研究发现 SHR 主动脉血管壁中 OPN mRNA 表达与其重构程度具有正性相关<sup>[5]</sup>,并且在 SHR 和血管紧张素 II 诱导的高血压小鼠模型中主动脉 OPN 表达增加<sup>[21]</sup>。以上的研究均提示血管的重构与 VSMC 的表型转化密切相关。因此,本研究通过对  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$ 、OPN 表达的检测以反映 VSMC 表型的变化。在本研究中发生颈动脉重构的高盐模型组较对照组收缩表型 SM22 $\alpha$ 、 $\alpha$ -SMA 的蛋白和 mRNA 表达降低,且同时合成表型 OPN 的蛋白和 mRNA 表达升高,进一步揭示 VSMC 表型标志物中  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  的降低和 OPN 的升高共同作用引起 VSMC 增殖、血管重构。因此在本研究中 VSMC 由收缩型向合成型转化是 4% 高盐饮食引起大鼠颈动脉发生重构可能的机制之一。

替米沙坦可选择性阻滞 AT1R,不仅具有降压作用,且能改善高血压患者内皮功能,逆转已经重构的血管<sup>[22]</sup>,本实验室前期的研究也发现替米沙坦能改善 8% 高盐饮食诱导的主动脉和肠系膜动脉血管重构<sup>[23]</sup>。目前国内外关于血管紧张素受体拮抗剂逆转 VSMC 表型转化改善血管重构的研究报道甚少,本研究中替米沙坦组收缩表型标志物  $\alpha$ -SMA、SM22 $\alpha$  表达升高,而合成表型标志物 OPN 表达降低,使 VSMC 由合成型向收缩型逆转,提示替米沙坦可能通过逆转 VSMC 表型转化来改善血管重构。

综上所述,长期高盐饮食可以引起 Wistar 大鼠血压升高,并且诱导颈动脉发生增生和肥厚性重构,而 VSMC 由收缩型向合成型转化可能是其发生重构的机制之一,替米沙坦可能通过逆转 VSMC 表型转化来改善颈动脉重构。

#### [参考文献]

- [1] Polónia J, Maldonado J. Estimation of salt intake by urinary sodium excretion in a Portuguese adult population and its relationship to arterial stiffness [J]. *Rev Port Cardiol*, 2006, 25 (9): 801-817.
- [2] Lacolley P, Regnault V, Nicoletti A, et al. The vascular smooth muscle cell in arterial pathology: a cell that can take on multiple roles[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95 (2): 194-204.
- [3] Pfisterer L, Feldner A, Hecker M, et al. Hypertension impairs myocardium function: a novel mechanism facilitating arterial remodelling[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 96 (1): 120-129.
- [4] Alexander MR, Murgai M, Moehle CW, et al. Interleukin-1 $\beta$  modulates smooth muscle cell phenotype to a distinct inflammatory state relative to PDGF-DD via NF- $\kappa$ B-dependent mechanisms [J]. *Physiol Genomics*, 2012, 44 (7): 417-429.
- [5] Dong LH, Wen JK, Liu G, et al. Blockade of the Ras-extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway is involved in smooth muscle 22 alpha-mediated suppression of vascular smooth muscle cell proliferation and neointima hyperplasia[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30 (4): 683-691.
- [6] Yang S, Zhou JZ, Chen YH. Effects of atorvastatin calcium on osteopontin in renovascular hypertensive rats [J]. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 2010, 42 (2): 147-150.
- [7] Ye S, Sun Y, Bie A, et al. Influence of osteopontin short hairpin RNA on the proliferation and activity of rat vascular smooth muscle cells [J]. *Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2009, 29 (2): 144-149.
- [8] Kubo M, Umemoto S, Fujii K, et al. Effects of angiotensin II type 1 receptor antagonist on smooth muscle cell phenotype in intramyocardial arteries from spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertens Res*, 2004, 27 (9): 685-693.
- [9] Araki K, Masaki T, Katsuragi I, et al. Telmisartan prevents obesity and increases the expression of uncoupling protein 1 in diet-induced obese mice [J]. *Hypertension*, 2006, 48 (1): 51-57.
- [10] 罗碧辉, 曾昭华, 易家骥, 等. 培哚普利对盐敏感性高血压大鼠心脏形态及其功能的影响[J]. *中国心血管杂志*, 2004, 9 (6): 393-411.
- [11] Ferreira DN, Katayama IA, Oliveira IB, et al. Salt-induced cardiac hypertrophy and interstitial fibrosis are due to a blood pressure-independent mechanism in wistar rats[J]. *Nutr*, 2010, 140 (10): 1742-751.
- [12] 王倩, 张翼, 陆敏, 等. 高盐诱导的高血压大鼠模型肾组织可溶性表氧化物酶高表达及其作用初步探讨[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2010, 42 (2): 126-130.
- [13] 曾昭华, Rober M.K.W.Lee, 罗碧辉, 等. 一种新的高盐致高血压动物模型及其血管重构改变[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10 (1): 24-28.
- [14] 李悦梅, 杨永宗. 高血压血管重构的研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11 (2): 171-174.
- [15] 陈剑玲, 商黔惠, 陈涛, 等. 高盐饮食诱导 Wistar 大鼠颈动脉重塑的机制及替米沙坦的干预[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22 (7): 655-662.
- [16] Rensen SS, Doevendans PA, van Eys GJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity[J]. *Neth Heart J*, 2007, 15 (3): 100-108.
- [17] Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ. Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation [J]. *Vasc Surg*, 2007, 45 (Suppl A): A 25-32.
- [18] Reqan CP, Adam PJ, Madsen CS, et al. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury [J]. *Clin Invest*, 2000, 106 (9): 1139-147.
- [19] Han M, Dong LH, Zheng B, et al. Smooth muscle 22 alpha maintains the differentiated phenotype of vascular smooth muscle cells by inducing filamentous actin bundling[J]. *Life Sci*, 2009, 84 (13-14): 394-401.
- [20] 王生兰, 苏娟, 徐一洲, 等. 大鼠血管平滑肌细胞体外培养的表型转换及表型鉴定[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16 (4): 268-272.
- [21] Seo KW, Lee SJ, Ye BH, et al. Mechanical stretch enhances the expression and activity of osteopontin and MMP-2 via the Akt1/AP-1 pathways in VSMC [J]. *Mol Cell Cardiol*, 2015, 85: 13-24.
- [22] Schiffrin EL, Park JB, Intengan HD, et al. Correction of arterial structure and endothelial dysfunction in human essential hypertension by the angiotensin receptor antagonist losartan [J]. *Circulation*, 2000, 101 (14): 1653-659.
- [23] 闵晓强, 刘婵, 商黔惠, 等. 长期高盐饮食及替米沙坦干预对 Wistar 大鼠动脉重构的影响[J]. *中华高血压杂志*, 2013, 21 (10): 903-937.

(此文编辑 文玉珊)