

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2017)25-03-0230-08

高血压和增龄对大鼠小动脉平滑肌表型转换和 miR-143/145 表达的影响

廖静雯, 张琳, 张严焱, 叶芳, 曾凡星, 石丽君

(北京体育大学运动生理教研室, 北京市 100084)

[关键词] 血管平滑肌; 表型转换; miRNA; 高血压; 增龄

[摘要] **目的** 观察血管平滑肌细胞(VSMCs)表型在增龄与高血压过程中的变化特点,以及增龄与高血压对 miR-143/145 表达的影响,从而探讨 VSMCs 表型转换和 miR-143/145 在增龄与高血压血管中的关系。**方法** 研究对象为 1、3、9、16 月龄正常大鼠(WKY 组)及原发性高血压大鼠(SHR 组),分别对其血压、肠系膜动脉形态、VSMCs 表型标志蛋白、miR-143/145 的表达进行定量。**结果** 血压和血管形态均随年龄和高血压发展有显著变化,VSMCs 收缩表型标志蛋白 α -actin 和 Calponin 的表达在 3 月达到峰值后随年龄逐渐下降,合成表型标志蛋白 OPN 在 SHR 中随年龄上升, α -actin、Calponin 和 OPN 在同龄的各年龄段 WKY 组和 SHR 组之间差异均具有显著性($P < 0.05$)。miR-143/145 在发育过程中表达升高而随衰老减少,且在 3 月时 WKY 组表达显著高于 SHR 组($P < 0.05$)。**结论** 高血压和增龄促进 VSMCs 由收缩表型向合成表型转换,miR-143/145 的表达在高血压和增龄发展过程中被抑制,miR-143/145 可能参与了高血压和增龄发生发展过程中 VSMCs 的表型转换过程。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The effects of VSMCs phenotype switching and miR-143/145 in arteries during hypertension and aging in rats

LIAO Jing-Wen, ZHANG Lin, ZHANG Yan-Yan, YE Fang, ZENG Fan-Xing, SHI Li-Jun

(Department of Exercise Physiology, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

[KEY WORDS] Vascular smooth muscle; Phenotype switching; miRNA; Hypertension; Aging

[ABSTRACT] **Aim** This study was designed to explore the characteristics of VSMCs phenotype during aging and hypertension, and how miR-143/145 were influenced. **Methods** Mesenteric arteries from 1-, 3-, 9-, and 16-month-old WKY and SHR were isolated, artery histology were evaluated by staining with HE. VSMCs phenotype marker including α -actin, Calponin, and OPN were measured. miR-143/145 were quantified by real-time PCR. **Results** VSMCs contractile marker α -actin and Calponin expression both reached the peak at 3M and then decreased, while OPN increased with age in SHR with no obvious changes in WKY. The expressions of α -actin, Calponin, and OPN showed significant differences between SHR and the age-matched WKY. miR-143/145 firstly increased with age and then decreased in both WKY and SHR, and miR-143/145 in WKY-3M was significantly higher than the age-matched SHR. **Conclusion** Aging and hypertension accelerate the VSMCs phenotype switching in arterioles, promoting the synthesis phenotype; miR-143/145 is inversely regulated with contractile VSMCs and could play a role during aging hypertension.

血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)是血管壁的主要细胞成分,是决定血管活性、血管反应性和血管构型的重要因素;高血压阻力血管结构变化主要是由于小动脉 VSMCs 增殖,这

是引起外周阻力升高的主要原因^[1]。衰老作为独立的因素同样可以导致血管系统受损,衰老个体的心血管疾病发病率明显升高^[2];同时,衰老血管重构中 VSMCs 也表现出了表型转换的特征^[3]。可见,

[收稿日期] 2016-06-16

[修回日期] 2016-10-22

[基金项目] 国家体育总局科研课题资助项目(2015B035);中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2015ZD008)

[作者简介] 廖静雯,博士,研究方向为运动的心血管适应机制,E-mail 为 13581700586@163.com。通讯作者石丽君,博士,教授,博士研究生导师,研究方向为运动与心脑血管功能调控,E-mail 为 l_j_shi72@163.com。

血管发育衰老和高血压发生发展过程中均伴随着血管的重构,VSMCs 表型转换是一个动态的连续的过程并在动脉血管重构中可能发挥了重要作用。当衰老和高血压共同作用时可能加速了动脉血管形态和功能的改变,VSMCs 表型转换在这个过程中作用并不清楚。

microRNA(miRNA, miR)是一类不含遗传信息的非编码小RNA,它主要对mRNA进行转录后的负向调节。由于miRNA可以内源性地同时作用于与高血压有关的靶基因,miRNA可能为全面而深入地了解高血压发病机制提供很好的切入点。研究显示,miR-143/145在收缩表型的VSMCs中表达丰富,miR-143/145在受损血管中被抑制,而其过表达可以使培养的VSMCs向收缩表型转换^[4]。miR-143/145在衰老的血管中的作用尚未见报道;特别当衰老和高血压同时作用时,miR-143/145在血管中的变化规律有待研究。

本实验检测增龄对正常血压和高血压大鼠血压、肠系膜动脉形态和VSMCs表型标志蛋白表达的影响,观察小动脉平滑肌表型是否与血管形态及功能在时程发展上相对应,同时观察miR-143/145在VSMCs表型转换的各阶段是否呈规律性表达。研究旨在探讨增龄与高血压两个因素共同作用下动脉VSMCs的表型变化规律及miR-143/145在这个过程中作用。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

1月、3月、9月和16月龄原发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)和正常大鼠(wistar kyoto rats, WKY)各20只,购自北京维通利华实验动物中心,于北京体育大学清洁级动物房饲养。国家标准啮齿动物饮料喂养,自由饮食和饮水;饲养房温度为20~25℃,相对湿度为45%~55%,昼夜12/12h照明。

1.2 无创尾动脉血压测量

大鼠在清醒状态时于安静温暖环境下进行适应和测试,运用动物智能无创血压计(BP-2010A,北京软隆)测量大鼠血压和心率(heart rate, HR),方法参考文献^[5]。每只大鼠间隔1min测量5次,取5次测量的平均值作为大鼠动脉血压等相关数据。

1.3 取材

大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,剪开腹腔,由腹腔静脉抽血后迅速剪下肠系膜动脉。用于

HE染色的肠系膜动脉置于生理缓冲液中,小心剥离周围粘连的脂肪组织后将血管置入4%多聚甲醛溶液中固定待用;用于Western blot检测的肠系膜动脉快速剥离周围粘连的脂肪组织和残余的血液后投入液氮中保存待测;用于RT-qPCR检测的肠系膜动脉尽量剥离周围粘连的脂肪组织和残余的血液,浸没于装有RNA later的冻存管中于-20℃保存待测。

1.4 HE染色

组织经多聚甲醛固定后于乙醇中脱水,将样本转移至二甲苯和石蜡的溶液中后再转移至纯石蜡中,于冰上冷却。每个组织石蜡块切片20张,切片厚度为5 μm,水浴中展片后于干燥箱烘干,使切片贴于载玻片上并做好标记。玻片用苏木素和伊红染色后,中性树脂胶封片,于室温温存拍摄。运用倒置显微镜进行镜检,每个样本组织切片随机选取5个视野,应用Image J软件进行测量,每个视野测量3次并取平均值,将5个视野的平均值作为样本组织切片的实验结果。

1.5 Western blot测定

组织在液氮研磨粉碎后加入裂解液,充分裂解后取上清待测。采用BCA测试方法,按照试剂盒说明步骤对蛋白浓度进行测定。采用SDS-PAGE电泳对各分子里样品蛋白进行分离(5%浓缩胶和10%分离胶),运用湿转法以恒定电流(250 mA)将蛋白转膜至PVDF膜上。以5%BSA孵育PVDF膜1.5 h后用含有稀释的一抗(α -actin 1:200, Calponin 1:500, OPN 1:100)4℃孵育过夜。TBST洗膜后将PVDF膜封入含有相应二抗(一般稀释比例为1:1 000)的塑料膜中孵育1 h。TBST漂洗PVDF膜,配制ECL发光试剂反应液,滴加到PVDF膜上,待其反应一段时间放入凝胶成像系统(Bio-rad, ChemiDoc™ XRS+ System)中进行拍摄。利用Image Lab软件对拍摄出的条带影像进行分析。将每个条带的灰度值与相应样品的内参GAPDH的灰度值进行比较,计算出的目的条带的相对含量值。

1.6 实时荧光定量PCR

采用miRcute miRNA提取分离试剂盒(TIAN-GEN, DP501),按照说明书步骤进行操作。反转录采用RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒(Thermo Scientific, K1622),按照说明书步骤进行操作。miRNA及其对应的内参U6应用特异性茎环引物进行反应,miR-145逆转录引物:5'-GTC GTA TCC AGT GCA GGG TCC GAG GTA TTC GCA CTG GAT ACG AAG GGA TTC-3'; miR-143逆转录引物:5'-GTC GTA TCCA GTG CAG GGT CCG AGG TAT

TCG CAC TGG ATA CGA TGA GCT AC-3'; U6 逆转录引物:5'- CTC GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT -3'。cDNA 扩增采用 Power SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒 (Applied biosystems, 4367218) 进行反应,按照说明书步骤进行操作;miR-145 扩增引物为:5'-GAC CAG TCC AGT TTT CCC AG-3'和 5'-TCG TAT CCA GTG CAG GGT C-3'; miR-143 扩增引物为:5'-ACG AGA TGA GAT GAA GCA CT-3'和 5'-TCG TAT CCA GTG CAG GGT C-3'; U6 扩增引物为:5'- CTC GCT TCG GCA GCA CAT ATA CT -3'和 5'-ACG CTT CAC GAA TTT GCG TGT C-3'。反应结束后导出数据,获得 Ct 值,计算 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{实验组待测基因}} - Ct_{\text{实验组参照基因}}) - (Ct_{\text{对照组待测基因}} - Ct_{\text{对照组参照基因}})$,目的基因的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.7 统计学分析

数据输入及计算采用 SPSS16.0 软件。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;对增龄和高血压的交互作用采用双因素方

差分析;各组间多重比较采用独立样本 *t* 检验。显著性检验水平以 $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结 果

2.1 各组大鼠血压和心率的变化

大鼠达到性成熟后(即 3、9、16 月龄),与同龄 WKY 组比较,心率、收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)和平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)均显著升高($P<0.05$),而 1 月龄 WKY 组和 SHR 组之间各数值差异均未见显著性(表 1)。正常大鼠与原发性高血压大鼠在成年后,血压和心率均随着年龄增加而增加(表 1)。增龄和高血压对血压的交互作用显著,对 SBP 和 MAP 在 9 月和 16 月差异均具有显著性($P<0.05$)。

表 1. 各组大鼠血压和心率的比较($\bar{x} \pm s, n=20$)
Table 1. Comparison of blood pressure and heart rate of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	时间(月)	HR (bpm)	SBP(mmHg)	DBP (mmHg)	MAP(mmHg)
WKY 组	1	424.5±5.9	124.5±4.1	89.5±1.7	98.5±5.4
	3	355.4±9.6	134.9±2.6	93.7±4.6	107.4±2.8
	9	358.6±7.8	142.8±4.8 ^b	100.8±4.3	114.8±2.6 ^b
	16	369.1±12.8 ^c	152.2±5.1 ^{bc}	106.3±4.3	121.3±3.3 ^b
SHR 组	1	399.5±10.1	129.5±5.1	90.6±5.3	103.5±3.2
	3	412.1±11.0 ^d	191.6±2.3 ^{ad}	145.6±4.2 ^{ad}	160.9±5.2 ^{ad}
	9	425.6±13.1 ^d	201.5±5.2 ^{abd}	152.3±4.4 ^{ad}	168.7±4.5 ^{ad}
	16	439.5±14.3 ^{cd}	212.0±6.1 ^{abcd}	155.6±7.3 ^{abd}	174.4±3.9 ^{acd}

a 为 $P<0.05$,与同组 1 月大鼠比较;b 为 $P<0.05$,与同组 3 月大鼠比较;c 为 $P<0.05$,与同组 9 月大鼠比较;d 为 $P<0.05$,与同龄 WKY 组比较。

2.2 大鼠肠系膜动脉形态学的变化

肠系膜动脉形态在 WKY 组和 SHR 组均随年龄的增加出现了变化,在 3 月、9 月、16 月年龄阶段,SHR 相对其同龄的 WKY,肠系动脉内径和壁厚组间差异均有显著性($P<0.05$),表现为 SHR 血管内径小于 WKY 组,SHR 血管壁厚大于 WKY 组,动脉壁厚与其内径的比值在 SHR 中也显著大于其同龄的 WKY 动脉($P<0.05$)。观察正常血压大鼠 WKY 肠系动脉的形态显示,3 月后动脉壁厚随增龄显著增加,而动脉内径趋于减小,动脉壁厚与内径的比值也有增加的趋势。在原发性高血压大鼠 SHR 肠系膜动脉中,随着年龄的增加动脉血管内径明显减小,动脉血管壁厚增加,而成年后(3 月)随着年龄增加壁厚未出现明显升高,其壁厚/内径的比值随年

龄具有明显升高的趋势,肠系膜动脉 HE 染色及具体变化趋势见图 1。增龄和高血压对壁厚与内径的比值有显著的交互作用,体现在 3 月、9 月和 16 月($P<0.05$)。

2.3 大鼠肠系膜动脉 VSMCs 表型标志蛋白的变化

2.3.1 标志蛋白 α -actin 的变化 正常和原发性高血压大鼠动脉 VSMCs 中 α -actin 随增龄的相对表达变化见图 2。无论是 WKY 还是 SHR 中, α -actin 表达在 3 月达到峰值,随着年龄的增加和衰老 α -actin 表达逐渐呈现下降趋势。在各年龄段 α -actin 表达在 WKY 均显著高于其同龄 SHR($P<0.05$)。增龄和高血压对 α -actin 的表达有显著的交互作用,协同调节 α -actin 使之表达下降,在 9 月和 16 月具有显著效应($P<0.05$)。

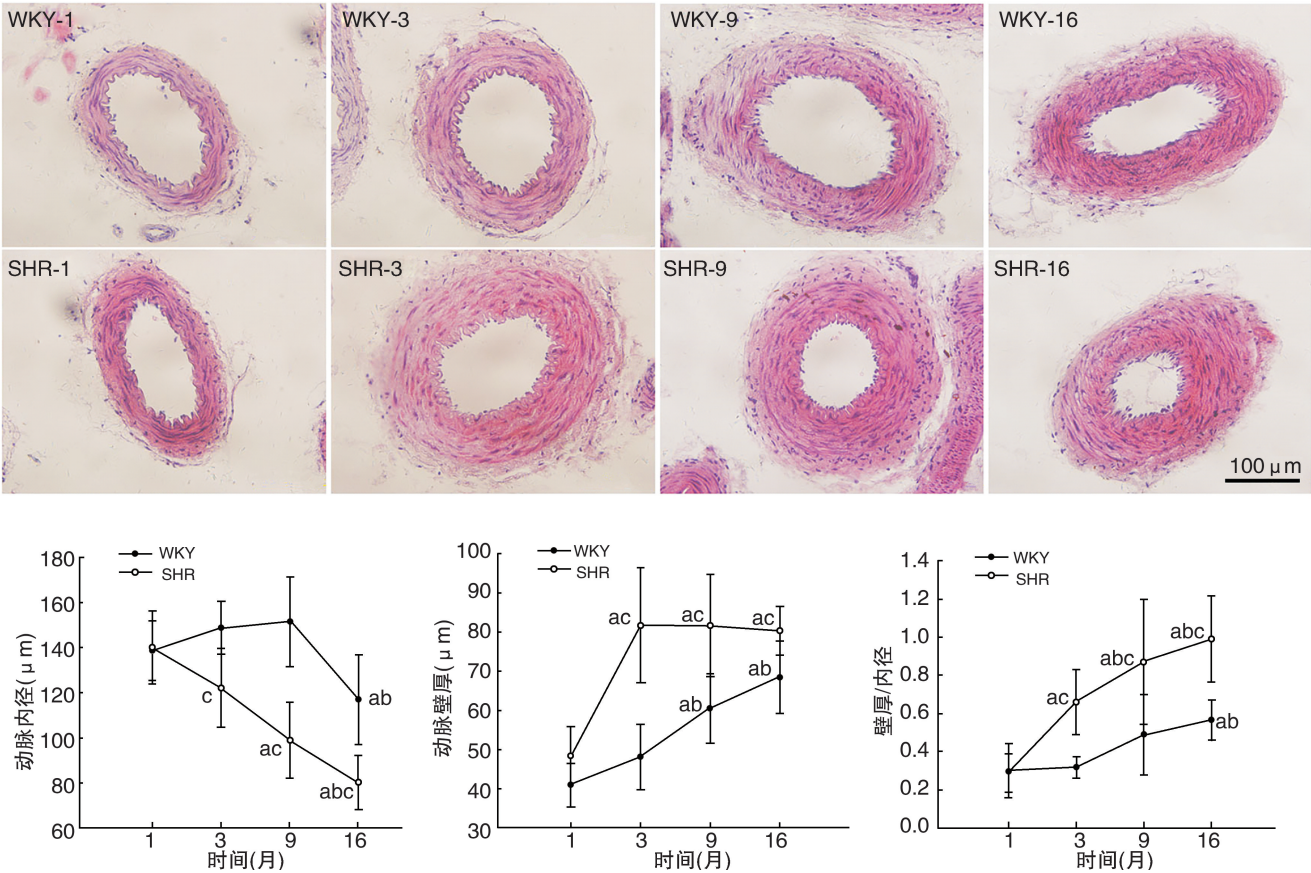


图 1. 各组肠系膜动脉 HE 染色结果和形态变化趋势 ($n=6$) a 为 $P<0.05$, 与同组 1 月大鼠比较; b 为 $P<0.05$, 与同组 3 月大鼠比较; c 为 $P<0.05$, 与同龄 WKY 组比较。

Figure 1. Morphological changes and HE staining results of mesenteric artery in each group ($n=6$)

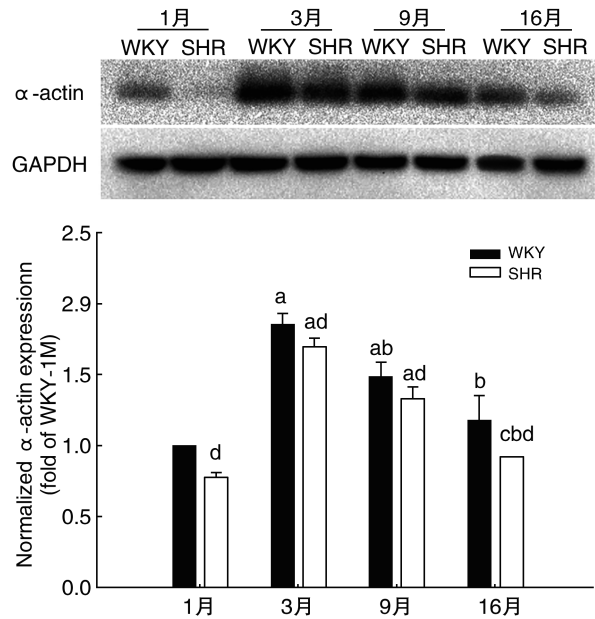


图 2. 高血压和增龄对 VSMCs 表型标志蛋白 α -actin 表达的影响 ($n=12$) a 为 $P<0.05$, 与同组 1 月大鼠比较; b 为 $P<0.05$, 与同组 3 月大鼠比较; c 为 $P<0.05$, 与同组 9 月大鼠比较; d 为 $P<0.05$, 与同龄 WKY 组比较。

Figure 2. Effect of hypertension and aging on the expression of α -actin ($n=12$)

2.3.2 标志蛋白 Calponin 的变化 正常和原发性高血压大鼠动脉 VSMCs 中 Calponin 随增龄的相对表达变化见图 3。在各年龄阶段, WKY 组 Calponin 表达均高于其同龄 SHR 组且具有显著性差异 ($P<0.05$); 正常大鼠肠系膜动脉 VSMCs 中, Calponin 表达在 3 月出现了较明显的峰值, 后随年龄表达下降; 在原发性高血压大鼠肠系膜动脉 VSMCs 中 Calponin 表达并未见显著性变化。增龄和高血压对 Calponin 的表达并无交互作用。

2.3.3 标志蛋白 OPN 的变化 正常和原发性高血压大鼠动脉 VSMCs 中 OPN 随增龄的相对表达变化见图 4。在各年龄阶段, WKY 组 OPN 表达均显著低于其同龄 SHR 组 ($P<0.05$); 原发性高血压大鼠肠系膜动脉 VSMCs 中, OPN 表达随年龄增加而增多, 在 9 月出现较明显的峰值后变化趋势不明显; 正常大鼠中 OPN 表达在 9 月也达到最大值, 整体随年龄变化不显著。增龄和高血压对 OPN 的表达也无交互作用。

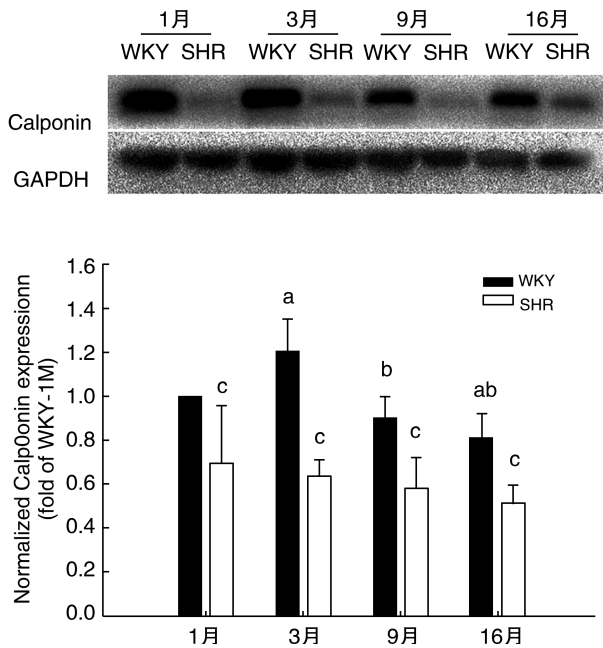


图3. 高血压和增龄对 VSMCs 表型标志蛋白 Calponin 表达的影响 ($n=12$) a 为 $P<0.05$, 与同组 1 月大鼠比较; b 为 $P<0.05$, 与同组 3 月大鼠比较; c 为 $P<0.05$, 与同龄 WKY 组比较。

Figure 3. Effect of hypertension and aging on the expression of Calponin ($n=12$)

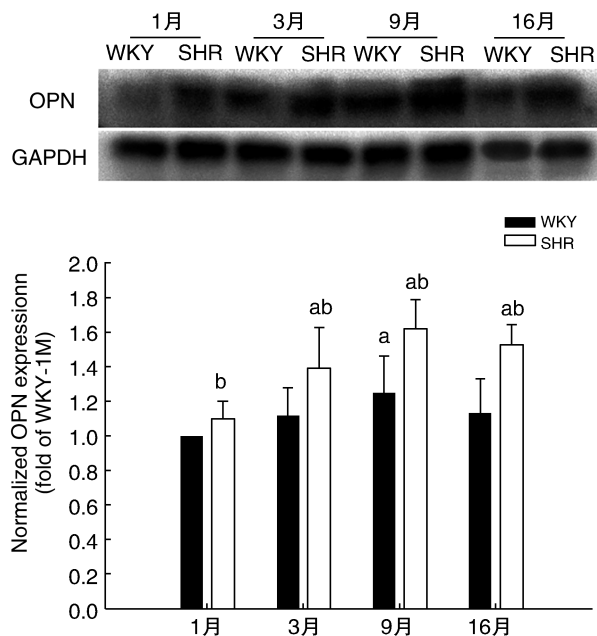


图4. 高血压和增龄对 VSMCs 表型标志蛋白 OPN 表达的影响 ($n=12$) a 为 $P<0.05$, 与同组 1 月大鼠比较; b 为 $P<0.05$, 与同龄 WKY 组比较。

Figure 4. Effect of hypertension and aging on the expression of OPN ($n=12$)

2.4 大鼠肠系膜动脉 miR-143 和 miR-145 表达的变化

正常和原发性高血压大鼠动脉 VSMCs 中 miR-

143 和 miR-145 表达随增龄的相对变化见图 5。miR-145 表达随年龄增加而增加, WKY 和 SHR 均在 9 月达到峰值后下降; miR-145 在同年龄组间表达差异在 1 月和 3 月具有显著性 ($P<0.05$)。miR-143 的变化较 miR-145 趋于平缓, 随着年龄的增加其峰值见于 3 月组, 且在 WKY 组更为明显。增龄和高血压对 miR-145 的表达具有显著的交互作用 ($P<0.05$), 见于 9 月和 16 月; 而两因素对 miR-143 的交互作用并不显著。

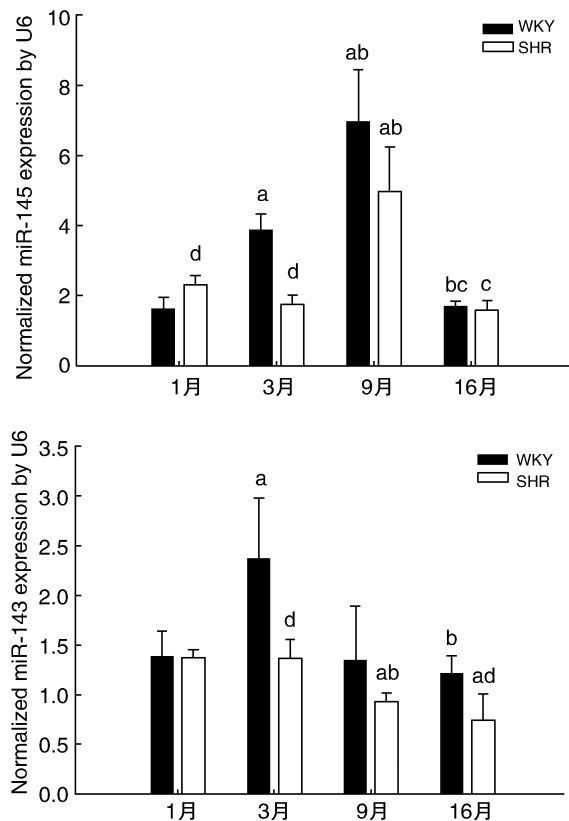


图5. 高血压和增龄对肠系膜动脉 miR-145 和 miR-143 表达的影响 ($n=12$) a 为 $P<0.05$, 与同组 1 月大鼠比较; b 为 $P<0.05$, 与同组 3 月大鼠比较; c 为 $P<0.05$, 与同组 9 月大鼠比较; d 为 $P<0.05$, 与同龄 WKY 组比较。

Figure 5. Effect of hypertension and aging on the expression of miR-145 and miR-143 ($n=12$)

3 讨论

本研究对正常血压和高血压大鼠在增龄过程中血压和血管形态进行观察, 并对小动脉中 VSMCs 表型标志蛋白 α -actin、Calponin 和 OPN 的表达定量, 最后检测了在 VSMCs 表型转换中重要的 miR-143/145 在各血管中的表达。结果显示高血压和增龄加速了小动脉 VSMCs 表型转换, 促进 VSMCs 由

收缩表型向合成表型转换;miR-143/145 表达随发育增加而随衰老抑制,miR-143/145 在成年后高血压血管中显著高于高血压小血管;增龄和高血压也协同作用于其表达,提示 miR-143/145 可能参与了高血压和增龄发生发展过程中 VSMCs 的表型转换过程。

3.1 高血压对小动脉 VSMCs 表型转换和 miR-143/145 表达的影响

高血压可以引起血管重构,其中小动脉阻力血管的重构在调节血压中起了关键性作用。本实验中小动脉各形态指标在成年后的各阶段 SHR 与 WKY 比较均有显著性差异。高血压阻力血管在结构重塑和力学变化间的相互作用十分复杂,两者可能互为因果,即血压的升高促进了血管的重塑而血管重塑进一步改变化了血管中血流的力学变化;由于血压过高使得动脉中膜肥厚而分担了管壁的压力,这一过程抵消了血管壁由于成分的变化引起的硬度增加^[6-7]。高血压阻力血管结构变化主要是由于小动脉 VSMCs 增生肥大,VSMCs 参与了高血压的发生发展,是引起外周阻力升高的主要原因^[1]。

虽然 VSMCs 的表型调节在高血压已经明确,但 VSMCs 的去分化程度与高血压严重程度的确切关系尚未确立。本研究选择了 α -actin、Calponin 和 OPN 作为界定 VSMCs 表型的标志蛋白,其中 α -actin 和 Calponin 是收缩表型标志蛋白,一般在成熟分化的 VSMCs 表达相对较多,而 OPN 是合成表型标志蛋白,在病理损伤血管 VSMCs 表达较多。Calponin 比较起 α -actin 对于高血压更为敏感,Calponin 在各个年龄段的 SHR 中与 WKY 比均显著降低,在正常血管中随增龄表达下降(与 α -actin 也有相同的变化规律),然而在高血压血管中保持较低的表达水平。收缩表型标志蛋白 OPN 在 4 个年龄阶段中 SHR 比较于 WKY 其 OPN 表达均显著偏高,表明 OPN 可以区分各年龄段 VSMCs 表型。VSMCs 的表型转换是相对的连续的过程,即在 VSMCs 以收缩表型为主的功能正常血管中依然含有少数收缩表型肌细胞,而在以合成分泌表型 VSMCs 为主的病理血管还保持了血管的肌收缩特性;从单个 VSMCs 来说,在其由于体内外因素发生表型转换过程中,也是一个连续可逆的过程。

miRNA 作为表观遗传调控的重要方面已经进入研究者的视野,它主要对 mRNA 进行转录后的负向调节,这个过程不涉及细胞基因序列的改变^[8]。在众多 miRNA 分子中 miR-143/145 在 VSMCs 丰富表达并对 VSMCs 表型调节研究最为广泛,如在体敲

除和离体转染实验都证明 miR-143/145 可以促进 VSMCs 维持其收缩表型^[4, 9-10]。本研究结果也显示,在成年大鼠小动脉中,3 月 SHR 中 miR-143/145 表达显著低于其同龄的正常大鼠动脉;与以往研究一致,无论是动物还是人体实验中,miR-145 的表达均上调,靶向于 miR-145 的治疗方法可能成为新的治疗途径^[11]。Fu 等^[12]发现人类编码 miR-143 基因启动子区域(rs4705342)的多态性与原发性高血压的发生密切相关;Deng 等^[13]证明 miR-143/145 通过调节 VSMCs 参与了在肺动脉高压的病理过程;最新研究也在小鼠和人体实验中证实了对 miR-145 表达的抑制可以起到治疗肺动脉高压的效果^[14-15]。另外,Kontaraki 等^[16]测量了原发性高血压患者和正常人外周血液中各 miRNA 的变化,其中 miR-143 和 miR-145 在高血压患者血液中显著降低。

3.2 增龄对小动脉 VSMCs 表型转换和 miR-143/145 表达的影响

增龄过程包含了发育、性成熟和衰老等一系列连续的阶段,血压也随着机体生长发育和逐渐衰老呈现动态的变化。正常人体的血压在生长发育阶段逐渐升高,成年后保持在一定的范围,机体随年龄衰老的同时血压也升高且主要体现在 SBP 的升高。

本研究选取了 SHR 和 WKY 各 4 个年龄段(1 月、3 月、9 月和 16 月)的大鼠作为研究对象,其中 1 月大鼠为幼年期,3 月为青年性成熟期,9 月为中年期,16 月为老年期。研究结果显示,无论是 SBP 还是 DBP 在发育过程中均随年龄增加而升高,高血压中 SBP 和 DBP 也随衰老持续升高,而单纯衰老因素只升高了 SBP 而对 DBP 影响不大。以往研究结果也存在一定的差异性,如 Sehgel 等^[17]用胸腔穿刺测量大鼠胸主动脉血压比较大血管中 SBP、DBP 和 MAP 在 4 月和 16 月阶段 SHR 和 WKY 的血压差异,结果显示两个年龄段中同龄 SHR 的各血压值均显著高于 WKY,WKY 由 4 月到 16 月各血压并未有显著变化,而 SHR 组只有 SBP 随增龄显著升高。结果的不同可能是由于测量方法和测量血压部位造成的。Hajdu 等^[18]在研究慢性持续性高血压过程中报道 6 月的 SHR 脑部动脉中较大的动脉舒张性明显下降,而小动脉舒张性却上升了,证明大动脉与小动脉的舒张功能存在一定的差异性。人体研究显示,血压各数值中 SBP 随年龄增长最为明显,在老年人群中高血压患者占非常大的比例,在不同的研究中为 30%~65%,其中单纯的 SBP 升高十分

常见^[19-21]。在衰老过程中,单纯的 SBP 的进行性升高主要是由大的容量血管扩张能力丧失而引起的;老年高血压患者的大动脉僵硬度和外周血管阻力升高^[22]。大血管舒张能力的减弱抵消了本该伴随外周血管阻力增加的 DBP 的升高,然而因此提前由血管壁返回的血流又使得 SBP 进一步升高。衰老过程中同时伴随 SBP 和 DBP 升高的情况常见于在其青年或中年就出现血压高的遗传性高血压患者,与青年高血压患者比较,老年的高血压患者心输出量和血管容量下降,而其外周血管阻力和左心室质量升高^[23]。

与高血压血管结构改变类似,小血管结构和功能的改变也是衰老过程中血压升高的标志^[24-25]。本研究结果显示,正常和高血压大鼠小动脉形态随增龄发生了连续动态的适应性变化。正常小动脉内径随发育逐渐增大,成年后保持稳定;而高血压动脉内径随增龄持续减小。小动脉壁随增龄增厚,其中高血压大鼠小动脉在高血压刚建立时即成年后动脉壁厚就达到峰值水平,随衰老保持这一高水平。动脉壁厚/内径比值在两种大鼠动脉中随增龄均呈明显的上升趋势。

与增龄相关的血管生理变化中,动脉 VSMCs 所表现的表型的可塑性也发挥了主要作用^[26]。在性成熟高血压建立前,血管 VMSC 处于表型变化活跃阶段,细胞外基质增加、细胞中与合成和分泌功能相关的细胞器减少、细胞内肌丝由少变多,此时细胞外基质增加的速度也减慢,直至成年 VSMCs 中收缩表型成为细胞的主要表型类型,且细胞外基质和纤维含量也保持稳定^[27-28];而后衰老和高血压对 VSMCs 表型有类似的作用,即 VSMCs 又由具有收缩功能的表型又向合成表型转换。可见,血管重构中 VSMCs 的相应的适应性变化也是血管发育和衰老中的必经过程。本研究中 α -actin 表达差异在同龄 SHR 比较 WKY 并不明显,但随发育和衰老有显著影响,提示 α -actin 可以作为在增龄过程的 VMSC 表型调节的重要指标。Calponin 作为 VSMCs 特有的分化蛋白在本研究中敏感地反应了各同龄大鼠动脉 VSMCs 表型差异性,而其在高血压大鼠动脉中的普遍低表达说明 Calponin 在高血压增龄过程中并不敏感。OPN 作为 VSMCs 合成表型标志蛋白,在正常血管中随增龄未有明显的趋势,而在高血压血管中随年龄逐渐升高,说明其在高血压血管中 OPN 随年龄变化敏感;OPN 参与了血管损伤过程中 VSMCs 增殖、迁移、分泌细胞外基质等病理生理过程,在血

管损伤修复中有重要的作用^[29-30]。

目前,尚未见有关增龄过程中 miR-143/145 作用于 VSMCs 表型转换的报道,本研究显示,miR-143/145 随发育表达升高并随衰老抑制,在 3 月和 9 月出现了表达的峰值,其表达与 VSMCs 收缩表型标志蛋白表达趋势一致,故 miR-143/145 可能参与了增龄过程中小动脉 VSMCs 表型转换。

3.3 高血压和增龄协同作用于小动脉 VSMCs 表型

衰老和高血压两因素同时作用时使血压进一步升高,其比单纯衰老或高血压因素升高血压更加明显;在增龄和高血压双重因素作用下各血压数值的变化也伴随着血管形态的改变,即血管重构。小动脉形态和功能的变化可能是由于 VMSC 表型变化所致,本研究显示增龄和高血压协同抑制了 VSMCs 表型标志蛋白 α -actin 的表达。Sehgel 等^[17]研究显示高血压使动脉 VSMCs 的迁移黏附能力增强,且衰老加重了这种效应;在增龄和高血压双重因素存在时,动脉 VSMCs 的功能都发生了改变,提示 VSMCs 表型调节可能同时参与了这两个过程。

本研究中 miR-145 和 miR-143 在血管中的表达均随发育增加随衰老而减少,miR-145 与 miR-143 在 3 月正常和高血压大鼠间存在表达差异。查阅文献,miR-143/145 参与发育和衰老血管中 VSMCs 表型转换却鲜有报道。本研究中 miR-143/145 的表达规律与 VSMCs 收缩表型标志蛋白表达基本一致,说明 miR-143/145 可能也在增龄过程中高血压小动脉 VSMCs 表型转换发挥了作用。在今后的研究中要明确 miR-143/145 在增龄和高血压过程中的确切机制,需要通过在体转染等方式干扰 miR-143/145 的表达来进一步探索。

[参考文献]

- [1] Mulvany MJ. Small artery remodeling in hypertension[J]. Curr Hypertens Rep, 2002, 4(1): 49-55.
- [2] Ungvari Z, Kaley G, de Cabo R, et al. Mechanisms of vascular aging: new perspectives[J]. J Gerontol Biol Sci Med Sci, 2010, 65(10): 1 028-041.
- [3] Wang M, Monticone RE, Lakatta EG. Arterial aging: a journey into subclinical arterial disease [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2010, 19(2): 201-207.
- [4] 宋建涛. MiR-21, miR-145 在机械张力调节血管平滑肌细胞生物学功能中的作用及分子机制[D]. 山东济南:山东大学, 2013: 1-115.
- [5] 邱方,熊开宇,石丽君. 褪黑素在有氧运动改善自发性高血压大鼠血压和肠系膜动脉功能中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(12): 1 229-235.

- [6] Laurant P, Touyz RM, Schiffrin EL. Effect of pressurization on mechanical properties of mesenteric small arteries from spontaneously hypertensive rats[J]. *J Vasc Res*, 1997, 34(2): 117-125.
- [7] Hayoz D, Rutschmann B, Perret F, et al. Conduit artery compliance and distensibility are not necessarily reduced in hypertension[J]. *Hypertension*, 1992, 20(1): 1-6.
- [8] Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, et al. An operational definition of epigenetics[J]. *Genes Dev*, 2009, 23(7): 781-783.
- [9] Elia L, Quintavalle M, Zhang J, et al. The knockout of miR-143 and-145 alters smooth muscle cell maintenance and vascular homeostasis in mice: correlates with human disease[J]. *Cell Death Differ*, 2009, 16(12): 1 590-598.
- [10] Boettger T, Beetz N, Kostin S, et al. Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(9): 2 634-647.
- [11] Caruso P, Dempsey Y, Stevens HC, et al. A role for miR-145 in pulmonary arterial hypertension: evidence from mouse models and patient samples[J]. *Circ Res*, 2012, 111(3): 290-300.
- [12] Fu X, Guo L, Jiang ZM, et al. An miR-143 promoter variant associated with essential hypertension[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(7): 1 813-817.
- [13] Deng L, Blanco FJ, Stevens H, et al. MicroRNA-143 activation regulates smooth muscle and endothelial cell crosstalk in pulmonary arterial hypertension [J]. *Circ Res*, 2015, 117(10): 870-883.
- [14] Ogorodnikova N, Arenz C. MicroRNA-145-targeted drug and its preventive effect on pulmonary arterial hypertension (patent WO2012153135 A1) [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2015, 25(6): 723-727.
- [15] McLendon JM, Joshi SR, Sparks J, et al. Lipid nanoparticle delivery of a microRNA-145 inhibitor improves experimental pulmonary hypertension[J]. *J Control Release*, 2015, 210: 67-75.
- [16] Kontaraki JE, Marketou ME, Zacharis EA, et al. Differential expression of vascular smooth muscle-modulating microRNAs in human peripheral blood mononuclear cells: novel targets in essential hypertension[J]. *J Hum Hypertens*, 2014, 28(8): 510-516.
- [17] Sehgel NL, Sun Z, Hong Z, et al. Augmented vascular smooth muscle cell stiffness and adhesion when hypertension is superimposed on aging[J]. *Hypertension*, 2015, 65(2): 370-377.
- [18] Hajdu MA, Baumbach GL. Mechanics of large and small cerebral arteries in chronic hypertension [J]. *Am J Physiol*, 1994, 266(2): H1 027-033.
- [19] Smith WM. Epidemiology of hypertension in older patients [J]. *Am J Med*, 1988, 85(3B): 2-6.
- [20] Vokonas PS, Kannel WB, Cupples LA. Epidemiology and risk of hypertension in the elderly: the framingham study [J]. *J Hypertens Suppl*, 1988, 6(1): S3-9.
- [21] Borhani NO. Isolated systolic hypertension in the elderly [J]. *J Hypertens Suppl*, 1988, 6(1): S15-19.
- [22] Nichols WW, Nicolini FA, Pepine CJ. Determinants of isolated systolic hypertension in the elderly [J]. *J Hypertens Suppl*, 1992, 10(6): S73-77.
- [23] Messerli FH, Sundgaard-Riise K, Ventura HO, et al. Essential hypertension in the elderly: haemodynamics, intravascular volume, plasma renin activity, and circulating catecholamine levels [J]. *Lancet*, 1983, 2 (8357): 983-986.
- [24] Sowers JR, Mohanty PK. Norepinephrine and forearm vascular resistance responses to tilt and cold pressor test in essential hypertension: effects of aging [J]. *Angiology*, 1989, 40(10): 872-879.
- [25] Sowers JR. Hypertension in the elderly [J]. *Am J Med*, 1987, 82(1B): 1-8.
- [26] 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.
- [27] Hungerford JE, Little CD. Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall [J]. *J Vasc Res*, 1999, 36(1): 2-27.
- [28] Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(3): 957-989.
- [29] Speer MY, McKee MD, Guldberg RE, et al. Inactivation of the osteopontin gene enhances vascular calcification of matrix Gla protein-deficient mice: evidence for osteopontin as an inducible inhibitor of vascular calcification in vivo [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(8): 1 047-055.
- [30] 李辉. OPN 反义核苷酸抑制大鼠血管平滑肌细胞增殖机制的研究 [D]. 辽宁沈阳: 中国医科大学, 2010: 1-33.

(此文编辑 朱雯霞)