

增龄和高血压经 PI3K/Akt 和 MAPK 信号通路间平衡介导调控血管平滑肌细胞的表型转换

张琳, 廖静雯, 吴迎, 曾凡星, 石丽君

(北京体育大学运动与体质健康实验室, 北京市 100084)

[关键词] 增龄; 高血压; 血管平滑肌细胞; 表型转换; PI3K/Akt 通路; MAPK 通路

[摘要] **目的** 探究增龄和高血压对胸主动脉血管平滑肌细胞(VSMC)表型转换的影响及磷脂酰肌醇激酶(PI3K/Akt)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路对VSMC表型的调控。**方法** 选取1、3、9、16月龄的雄性Wistar Kyoto大鼠(WKY)和自发性高血压大鼠(SHR)各12只,尾动脉无创测定血压,取各组大鼠的胸主动脉进行实验。HE染色测量胸主动脉的管壁厚度;免疫组织化学染色检测VSMC表型标志蛋白 α 平滑肌肌动蛋白(α -SM-actin)、调宁蛋白、骨桥蛋白(OPN)的表达和分布;Western blot检测VSMC表型标志蛋白 α -SM-actin、调宁蛋白、OPN及信号蛋白p-Akt、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、p-42/44ERK、p-p38MAPK的表达量。**结果** HE染色结果显示,增龄导致管壁厚度增加,且在9月龄时WKY和SHR出现显著差异($P < 0.01$)。免疫组织化学染色和Western blot结果表明,3月龄后,WKY和SHR的 α -SM-actin、调宁蛋白表达量随月龄增加出现下调,而OPN出现上调;p-Akt、eNOS的蛋白表达量随月龄增加逐渐下调,p-42/44ERK、p-p38MAPK蛋白表达量随月龄增长逐渐上调,且3月龄时两组已有显著差异($P < 0.01$)。**结论** 增龄和高血压均导致大鼠胸主动脉VSMC收缩表型标志蛋白 α -SM-actin、调宁蛋白的表达下调,合成表型标志蛋白OPN的表达上调,二者的交互作用更显著。VSMC的表型转换可能是通过PI3K/Akt和MAPK信号通路间的平衡作用进行调控的。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Aging and hypertension mediate the phenotypic switching of vascular smooth muscle cells through the balance between PI3K/Akt and MAPK signaling pathways

ZHANG Lin, LIAO Jing-Wen, WU Ying, ZENG Fan-Xing, SHI Li-Jun

(Department of Exercise and Physical Health, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

[KEY WORDS] Aging; Hypertension; Vascular smooth muscle cell; Phenotypic switching; PI3K/Akt signaling pathway; MAPK signaling pathway

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects of aging and hypertension on phenotypic switching of thoracic aortic vascular smooth muscle cell (VSMC) and regulation of VSMC phenotype by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/Akt) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Methods** Male Wistar Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) were studied at 1, 3, 9, 16 months of age, and each group had 12 rats. Blood pressure was noninvasively measured in the caudal artery. The thoracic aorta of rats in each group was taken for the experiment. HE staining was used to measure the wall thickness of the thoracic aorta. The expression and distribution of VSMC phenotype marker proteins α -smooth muscle-actin (α -SM-actin), calponin and osteopontin (OPN) were detected by immunohistochemical staining. Western blot was used to detect the expression of VSMC phenotype marker protein α -SM-actin, calponin, OPN, and signal proteins p-Akt, endothelial nitric oxide synthase (eNOS), p-42/44ERK and p-p38MAPK. **Results** HE staining showed that aging resulted in an increase in the thickness of vascular wall, and at 9 months old, there was a significant difference between WKY and SHR ($P < 0.01$). Immunohistochemical staining and Western blot showed that after 3 months old, the expressions of α -SM-actin and calponin in WKY and SHR decreased with the increase of age, while OPN increased; The expressions of p-Akt and eNOS proteins

[收稿日期] 2016-11-07

[修回日期] 2017-07-10

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31371201);国家体育总局全民健身领域课题(2015B035)

[作者简介] 张琳,博士研究生,研究方向为运动和心血管生理学,E-mail为 zhanglinbus@126.com。通讯作者石丽君,教授,博士研究生导师,研究方向为运动和心血管生理学,E-mail为 l_j_shi72@163.com。

gradually decreased with the increase of age, and the expressions of p-42/44ERK and p-p38MAPK proteins increased gradually with the increase of age; At 3 months old, there was significant difference between the two groups ($P < 0.01$). **Conclusion** Aging and hypertension all contribute to the decreases in expressions of VSMC contractile phenotype marker proteins α -SM-actin and calponin, and the increase in the expression of VSMC synthetic phenotypic marker protein OPN in rat thoracic aorta. The interaction between aging and hypertension is more significant. The phenotypic switching of VSMC may be mediated by the balance between PI3K/Akt and MAPK signaling pathways.

血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 对血管的舒缩活动起着重要的作用^[1]。高度分化的 VSMC 称为收缩型 VSMC, 一般存在于成熟的个体中, 表现出收缩功能。未分化的 VSMC 称为合成型 VSMC, 一般存在于胚胎时期及发生病变的血管中, 表现出强大的增殖和迁移能力。VSMC 从收缩型转变为合成型的过程称为 VSMC 的表型转换^[2]。VSMC 的增殖和迁移, 一方面可以促进损伤血管的自我修复, 另一方面又将其卷入深深的致病过程。VSMC 的收缩表型标志蛋白有 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SM-actin)、调宁蛋白 (calponin)、平滑肌肌球蛋白重链蛋白 (SM-MHC)、转凝蛋白 (SM22 α) 等^[3], 合成表型标志蛋白有骨桥蛋白 (osteopontin, OPN)^[4]、表皮调节素 (epiregulin)^[5]。VSMC 表型的调控, 并非单一信号通路决定的。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 是能被不同的细胞外刺激激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, MAPK 的级联反应共同调节细胞的生长、分化、炎症反应等多种重要的细胞生理及病理过程^[6]。磷脂酰肌醇激酶 (PI3K/Akt) 途径对于维持 VSMC 收缩表型起着重要的作用, PI3K/Akt 的抑制剂可促使 VSMC 表型失去收缩活性^[7]。因而, VSMC 的表型转换可能与 MAPK 和 PI3K/Akt 信号通路间的平衡有关。

增龄和高血压均可引起动脉管壁纤维化程度加重, 顺应性降低, 管壁增厚^[8]。高血压可以加速增龄带来的这一系列的变化, 使机体的心血管应变能力下降^[9]。Sehgel 等^[10] 在研究高血压与增龄 2 种因素对 VSMC 的影响中发现, 高血压和增龄都能够影响血管弹性, 这与 VSMC 的结构和功能改变有着密切的关系。本研究选用增龄 1、3、9、16 月 4 个月龄的 Wistar Kyoto 大鼠 (WKY) 和自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 作为实验对象, 通过 HE 染色、免疫组织化学染色和 Western blot 实验观察增龄和高血压对胸主动脉 VSMC 表型标志蛋白和调控 VSMC 表型转换信号通路的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

雄性 1、3、9、16 月龄的 SPF 级 WKY 和 SHR 均

购于北京维通利华实验动物技术有限公司。大鼠饲养条件如下: 标准饲料喂养, 自由饮食和进水。动物的饲养完全符合北京体育大学动物伦理委员会的相关规定。大鼠分组情况如下: 1 月龄 WKY (1W)、3 月龄 WKY (3W)、9 月龄 WKY (9W)、16 月龄 WKY (16W)、1 月龄 SHR (1S)、3 月龄 SHR (3S)、9 月龄 SHR (9S)、16 月龄 SHR (16S)。每组 12 只, 其中同月龄的 WKY 作为 SHR 的对照组。

1.2 大鼠尾动脉无创血压测定

智能无创血压测试仪 BP-2010A (购自北京软隆生物公司) 测量清醒大鼠安静时的尾动脉血压和心率 (heart rate, HR)。具体操作方法如下: (1) 连接各通道、加压传感器和保温布筒, 打开主机电源, 设定程序参数和输入大鼠信息; (2) 选择大小合适的保温布筒, 将大鼠放入其中, 利用布筒上的魔术贴对大鼠的尾部稍加固定, 套上加压传感器, 将加压传感器置于尾根处; (3) 待温度、大鼠状态和尾动脉脉搏波稳定后, 按下 Start/Stop 键, 开始测量血压, 测量时保持布筒温度为 39 $^{\circ}$ C; (4) 当加压尾套加压使外部压力超过尾动脉收缩压 (systolic blood pressure, SBP) 时, 大鼠的尾动脉血流被阻断, 脉搏波消失, 随后压力逐渐减小, 当外部压力减小至 SBP 时, 脉搏波开始出现, 此即 SBP; (5) 测量结束, 软件根据脉搏波曲线自动拟合计算出大鼠的 SBP 和 HR 等。

1.3 HE 染色

选取各组大鼠胸主动脉进行石蜡包埋固定, 梯度浓度酒精二甲苯脱水透明后, 浸蜡包埋。蜡块固定于病理切片机上, 切成 4 μ m 的蜡片, 将切片放于 60 $^{\circ}$ C 烤箱烤 2 h。二甲苯脱蜡及梯度浓度酒精水化后, 分别用苏木素、伊红对细胞核和细胞质进行着色, 酒精二甲苯处理后封片。

1.4 免疫组织化学染色

检测各组大鼠 α -SM-actin、Calponin、OPN 的表达。对抗原修复后的各组胸主动脉切片使用 0.3% Triton X-100 进行打孔处理, 牛血清白蛋白封闭 20 min 后进行免疫反应, 滴加一抗 (α -SM-actin、Calponin、OPN, 1:200) 于切片上, 4 $^{\circ}$ C 过夜。第 2 天取出切片, 室温复温 1 h 后, 用 0.01 mol/L 磷酸盐缓

冲液洗 3 次,每次 5 min(一抗不同要分开洗)。滴加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,联苯二胺显色,苏木素复染,梯度酒精和二甲苯处理后,中性树胶封片。

1.5 蛋白免疫印迹

采用蛋白免疫印迹技术检测各组大鼠胸主动脉 VSMC 表型标志蛋白 α -SM-actin, Calponin, OPN 及信号蛋白 p-Akt, Akt、内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、p-42/44ERK、42/44ERK、p-p38MAPK、p38MAPK 的蛋白表达量,一抗的浓度 eNOS 为 1 : 500,其余均为 1 : 200。动物麻醉后,取大鼠胸主动脉于 4℃ 的 Krebs 液中,将剥离干净的胸主动脉样品立即投入液氮中暂存。研磨后,加裂解液,取上清,BCA 试剂盒测定蛋白浓度后电泳。具体操作方法见本课题组前期发表的文章^[11]。

1.6 数据统计

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。SPSS 19.0 对增龄、

高血压进行 2×4 水平的双因素方差分析。蛋白印迹法用 Image-lab 进行分析,免疫组织化学染色用 IPP 进行分析,统计图表用 GraphPad Prism 5 进行制作。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠基础数据

大鼠的心脏重量指数(HW/BW)随月龄不断增加,且 SHR 组始终高于 WKY 组,9 月龄时二者出现显著差异($P < 0.01$;表 1)。与 3 月龄的 WKY 相比,16 月龄 WKY 的 SBP、DBP、HR 出现显著升高。3、9、16 月龄 SHR 的 SBP、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)、HR 均显著高于同月龄的 WKY ($P < 0.01$;表 1)。双因素方差分析结果显示增龄、高血压的交互作用对 SBP 和 DBP 的影响更为显著($P < 0.01$)。

表 1. 大鼠基础数据(n=12)

Table 1. The basic data of rats(n=12)

项 目	1W	1S	3W	3S	9W	9S	16W	16S
HW/BW	4.1±0.3	4.3±0.2	3.7±0.2	3.4±0.2	3.5±0.3	4.0±0.2 ^{de}	3.6±0.4 ^c	4.0±0.3 ^{de}
SBP(mmHg)	126.5±4.1	131.5±5.1	137±4.6	197.6±9.9 ^{bc}	142.8±4.3 ^b	201.5±13.8 ^{bc}	152.2±4.4 ^{bc}	212.0±9.0 ^{bce}
DBP(mmHg)	92.5±2.0	93.6±3.3	101.1±5.5	143.3±7.6 ^{bc}	105.0±6.1 ^a	152.9±9.6 ^{bc}	110.5±7.3 ^a	155.6±9.2 ^{bce}
HR(次/分)	420.0±20.1	400.0±15.6	355.0±14.9	408.0±18.6 ^c	354.0±15.3	423.0±13.5 ^e	365.0±12.8	438.0±13.8 ^{de}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与同种系 1 月龄大鼠比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与同种系 3 月龄大鼠比较; e 为 $P < 0.01$, 与同月龄 WKY 比较。

2.2 各组大鼠胸主动脉管壁厚度

各组大鼠胸主动脉的管壁厚度见图 1。随月龄增长, WKY 和 SHR 胸主动脉管壁厚度呈上调趋势, 且二者都从 9 月龄时出现显著差异($P < 0.01$)。9、

16 月龄时, 与 WKY 相比, 同月龄 SHR 胸主动脉的管壁厚度出现显著上调($P < 0.01$)。双因素方差分析结果显示增龄、高血压的交互作用对管壁厚度的影响更为显著($P < 0.01$)。

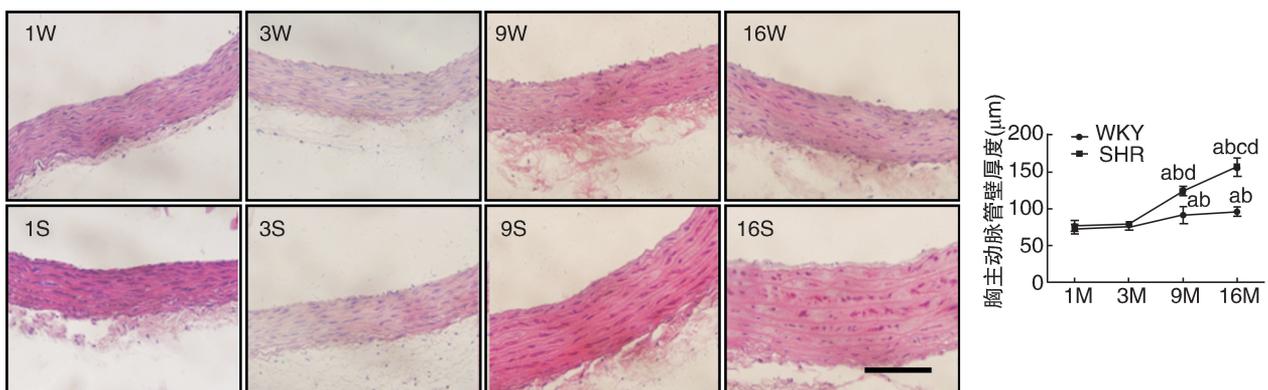


图 1. 大鼠胸主动脉管壁 HE 染色 标尺为 100 μ m。a 为 $P < 0.01$, 与同种系 1 月龄大鼠比较; b 为 $P < 0.01$, 与同种系 3 月龄大鼠比较; c 为 $P < 0.01$, 与同种系 9 月龄大鼠比较; d 为 $P < 0.01$, 与同月龄 WKY 比较。

Figure 1. HE staining of thoracic aorta wall

2.3 各组大鼠胸主动脉平滑肌表型标志蛋白分布及表达

WKY 和 SHR 增龄过程中,胸主动脉收缩表型标志蛋白 α -SM-actin 和 Calponin 的表达在 3 月龄达到峰值,之后下调,且 SHR 比 WKY 下降速率快,到达的峰值低。同月龄的 SHR 与 WKY 相比,从 3 月龄开始,SHR 的 α -SM-actin 和 Calponin 蛋白表达显著下调($P<0.05$)。与同种系 3 月龄相比,WKY 和

SHR 在 9 月龄时 α -SM-actin、Calponin 蛋白表达开始出现显著下调($P<0.05$)。合成表型 OPN 的表达趋势相反。随月龄增长 OPN 的表达不断增加,且 SHR 比 WKY 的增加速率要快,到达的峰值也高。与同月龄的 WKY 相比,3、9 月龄 SHR 的 OPN 蛋白表达出现显著上调($P<0.05$)。与同种系 3 月龄相比,WKY 和 SHR 在 9 月龄时 OPN 表达出现显著上调($P<0.01$)(图 2)。

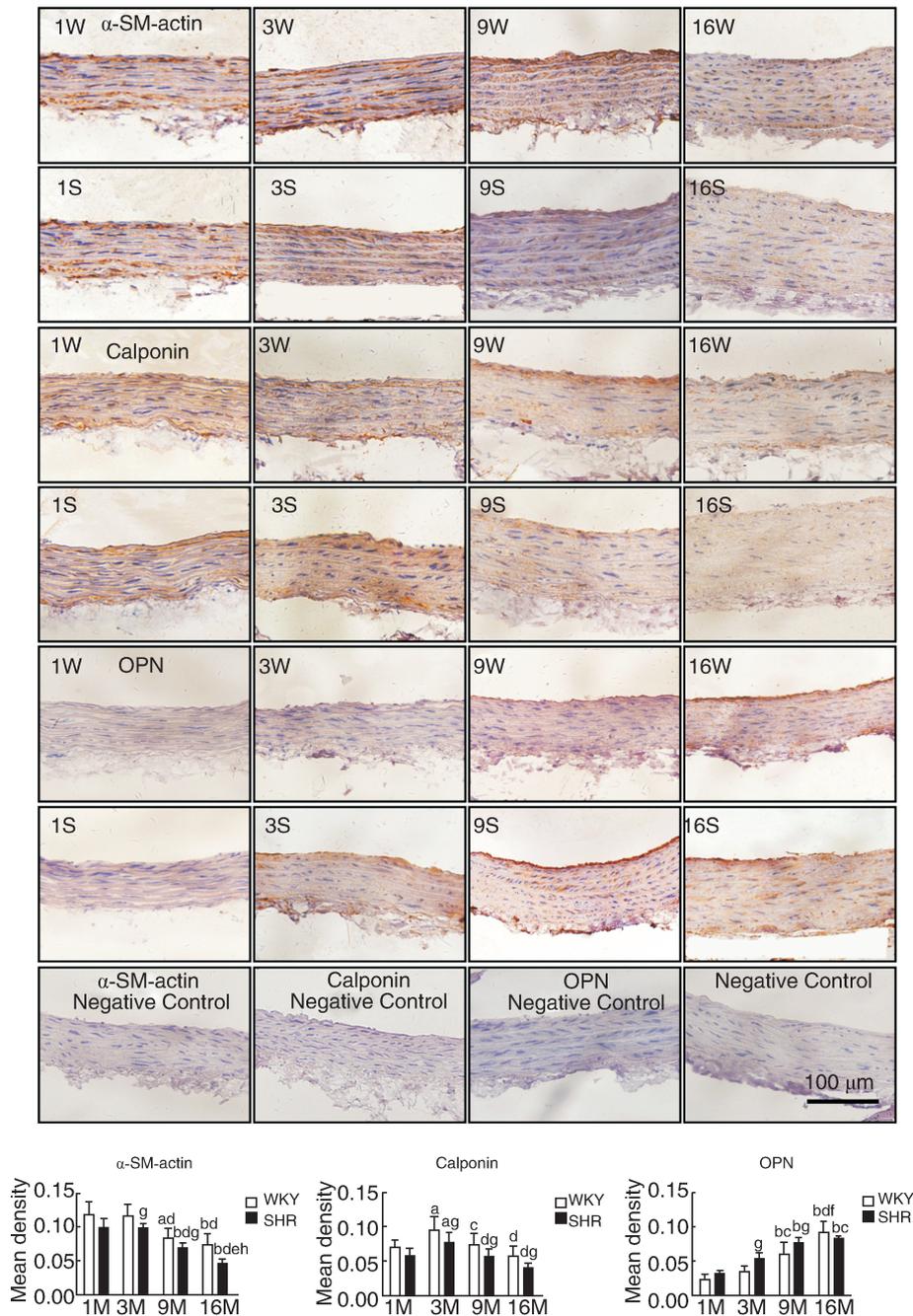


图 2. 各组大鼠胸主动脉标志蛋白分布及表达 棕色沉淀代表蛋白的阳性反应。a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与同种系 1 月龄大鼠比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与同种系 3 月龄大鼠比较; e 为 $P<0.05$, f 为 $P<0.01$, 与同种系 9 月龄大鼠比较; g 为 $P<0.05$, h 为 $P<0.01$, 与同月龄 WKY 比较。

Figure 2. Distribution and expression of marker proteins in thoracic aorta of rats in each group

2.4 各组大鼠胸主动脉平滑肌表型标志蛋白的表达量

3 月龄时,SHR 和 WKY 胸主动脉中 α -SM-actin 与 Calponin 的蛋白表达量均到达顶峰,之后随月龄增长,蛋白表达量开始下调。与 WKY 相比,SHR 在 3 月龄时 α -SM-actin 和 Calponin 的蛋白表达量显著下调($P<0.01$;图 3)。双因素方差分析结果显示,增龄、高血压的交互作用对 α -SM-actin 蛋白表达的影响更为显著($P<0.01$)。

OPN 作为合成表型的标志蛋白,变化趋势同 α -SM-actin 以及 Calponin 相反。WKY 和 SHR 胸主动脉 OPN 的蛋白表达量随月龄增长均呈现上调趋势,但 SHR 大鼠 OPN 的上调趋势要快于 WKY。与 WKY 相比,SHR 在 3 月龄时 OPN 的蛋白表达量出现显著升高($P<0.01$;图 4)。双因素方差分析结果显示,增龄、高血压的交互作用对 OPN 蛋白表达的影响更为显著($P<0.05$)。

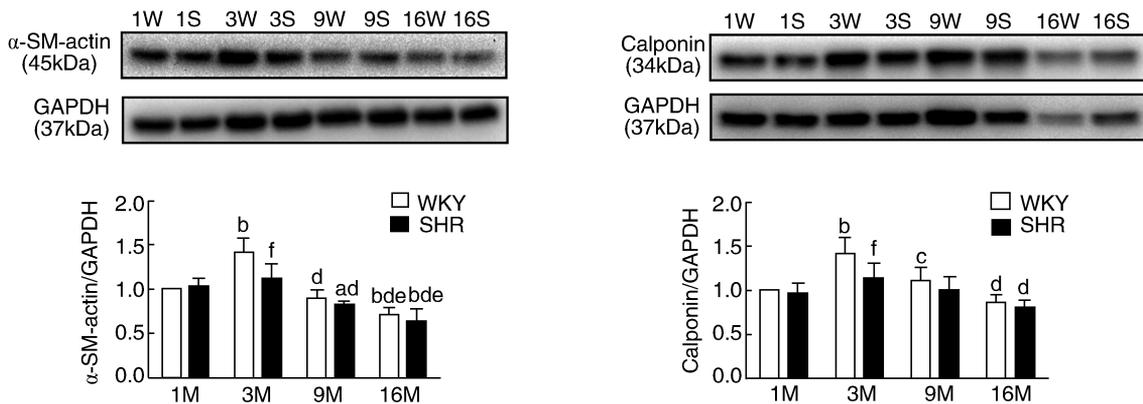


图 3. 各组大鼠胸主动脉 α -SM-actin 和 Calponin 蛋白表达量 a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与同种系 1 月龄大鼠比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与同种系 3 月龄大鼠比较; e 为 $P<0.05$, 与同种系 9 月龄大鼠比较; f 为 $P<0.01$, 与同月龄 WKY 比较。

Figure 3. Expressions of α -SM-actin and calponin protein in thoracic aorta of rats in each group

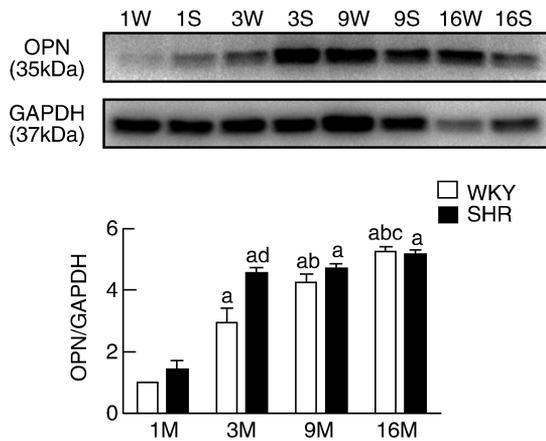


图 4. 各组大鼠胸主动脉 OPN 蛋白表达量 a 为 $P<0.01$, 与同种系 1 月龄大鼠比较; b 为 $P<0.01$, 与同种系 3 月龄大鼠比较; c 为 $P<0.05$, 与同种系 9 月龄大鼠比较; d 为 $P<0.01$, 与同月龄 WKY 比较。

Figure 4. Expression of OPN protein in thoracic aorta of rats in each group

2.5 各组大鼠胸主动脉平滑肌表型转换信号通路蛋白表达量

本实验中检测了对平滑肌表型调控的 2 条信号通路, 分别是磷脂酰肌醇激酶通路 (PI3K/Akt/eNOS) 和丝裂原活化蛋白激酶级联途径 (MAPK 信

号 44ERK 和 p38MAPK), 观察增龄过程中 2 个通路的磷酸化水平。

PI3K/Akt/eNOS 信号通路对血管平滑肌的表型转化具有重要的调控作用, 本实验对此信号通路的相关蛋白进行了检测, SHR 和 WKY 磷酸化 Akt 的水平均随月龄增长呈下调趋势, 但 SHR 的 p-Akt 的下调要先于 WKY 大鼠。同时, 与 WKY 相比, 在 1 月龄时 SHR 的 p-Akt 的表达已出现显著差异 ($P<0.01$; 图 5)。本实验同时检测了 Akt 的下游分子 eNOS 的蛋白表达量, 增龄导致 WKY 和 SHR 的 eNOS 蛋白表达量持续下调。与同月龄段的 WKY 相比, 1 月龄时 SHR 的 eNOS 蛋白表达量便显著下调 ($P<0.01$; 图 5)。双因素方差分析结果显示, 增龄、高血压的交互作用对 eNOS 和 p-Akt 蛋白表达的影响更为显著 ($P<0.01$)。

本实验分别对各组大鼠胸主动脉 MAPK 通路中的 ERK 和 p38MAPK 的磷酸化水平进行了检测。随月龄的增长, 无论是 WKY 还是 SHR, ERK 和 p38MAPK 的磷酸化水平均升高, 与同月龄的 WKY 相比, SHR 的 p-ERK 和 p-p38MAPK 蛋白表达量在 3 月龄时呈显著上调 ($P<0.01$; 图 6)。双因素方差分析结果显示, 增龄、高血压的交互作用对 p-ERK 蛋白表达的影响更为显著 ($P<0.01$)。

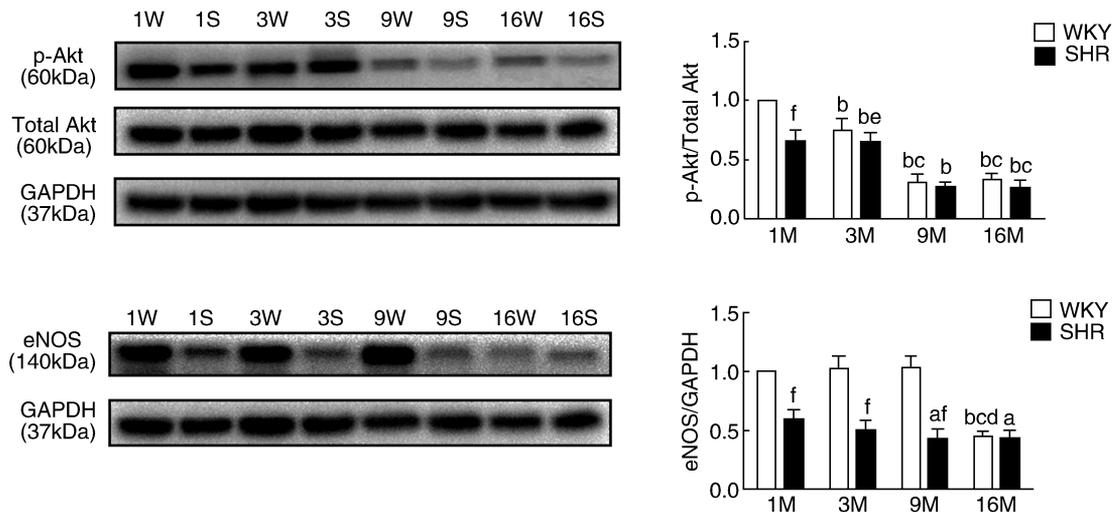


图 5. 各组大鼠胸主动脉 PI3K/Akt/eNOS 蛋白的表达 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与同种系 1 月龄大鼠比较; c 为 $P < 0.01$, 与同种系 3 月龄大鼠比较; d 为 $P < 0.01$, 与同种系 9 月龄大鼠比较; e 为 $P < 0.05$, f 为 $P < 0.01$, 与同龄 WKY 比较。

Figure 5. Expressions of PI3K/Akt/eNOS proteins in thoracic aorta of rats in each group

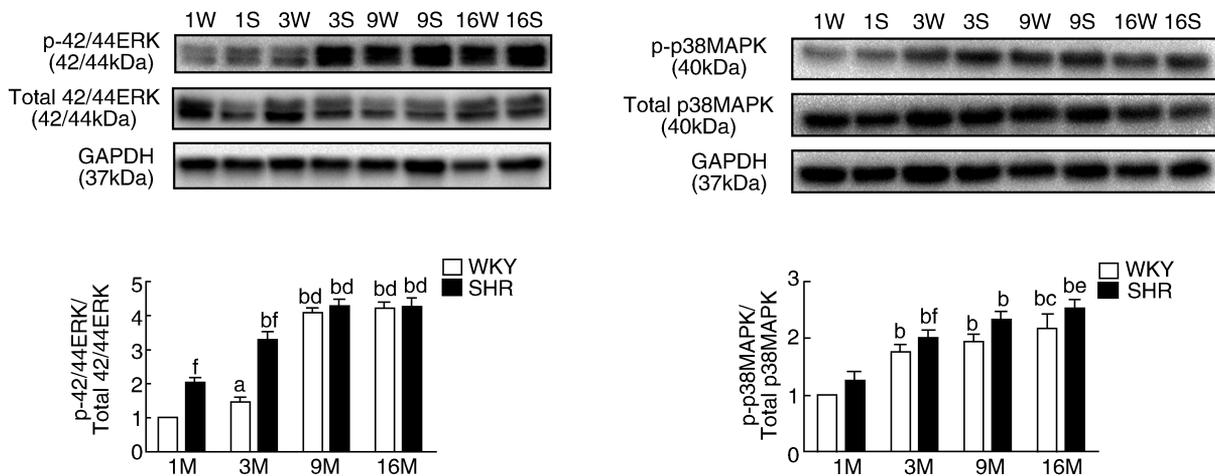


图 6. 各组大鼠胸主动脉 MAPK 信号蛋白的表达 a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与同种系 1 月龄大鼠比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与同种系 3 月龄大鼠比较; e 为 $P < 0.05$, f 为 $P < 0.01$, 与同龄 WKY 比较。

Figure 6. Expression of MAPK signaling protein in thoracic aorta of rats in each group

3 讨论

SHR 模型作为人类研究原发性高血压的发病机制及抗血压药物的筛选而得到广泛应用^[10]。本实验选取了 1、3、9、16 月龄的正常和高血压大鼠作为实验对象,探究增龄和高血压对 VSMC 表型转换以及表型转换相关信号通路 PI3K 和 MAPK 的影响。

增龄和高血压作为 2 个独立危险因素共同威胁着心血管系统。增龄导致血管硬度增加,管壁增厚变硬,外周阻力增加,血管壁的弹性功能减退。衰退性生理变化与病理性动脉粥样硬化在老年很难明显区分^[12-14]。Sehgel 等^[15]对 16 周龄和 64 周龄

的 SHR 进行研究发现,高血压能增加 VSMC 的僵硬程度,并且月龄的增加能够使此现象的程度加深。高血压发生时由于小动脉处于痉挛状态,外周阻力增加,心脏为了将血液更加顺畅且持续地向外周血管和器官进行供应,必须加大收缩力度和程度,其结果必然导致心肌劳损。同时由于血液切应力的增加,使得内皮细胞加紧分泌各种生长因子,对损伤的血管进行修复,但这种修复过程又将其深深地卷入致病过程,从而造成严重损伤心血管系统的恶性循环^[16]。

1 月时大鼠为幼年时期,3 月发生性成熟,9 月为中年期,16 月为老年期。心脏重量指数可以评价心肌肥大的程度。1 月大鼠的心重较体重发育更

快,所以显示心脏重量指数较大。3月龄进入成熟后,体重增长较快,心脏重量指数有所下降。与同龄的WKY相比,SHR的心脏重量指数在9月和16月时显著升高,说明高血压导致心脏发生肥大。与3月相比,16月的WKY的心脏重量指数也显著增加。实验结果表明,高血压和增龄均导致心脏发生肥大。但高血压导致的心脏肥大更为严重,这也说明高血压和增龄的交互作用使心脏的病理性肥大程度加重。WKY组的SBP和DBP均随着月龄的增加不断上调,9月和16月时SBP显著上调;而SHR自3月达到性成熟后,表现为高血压,且随月龄增长SBP和DBP不断上调。与同龄的WKY相比,SHR从3月开始SBP和DBP均显著上调。增龄和高血压的交互作用对SBP和DBP有更为显著的影响。WKY的心血管系统承受增龄带来的损伤,而SHR的病理性变化是由增龄和高血压双重影响导致的。

正常健康的动脉血管富有弹性,舒缩性能好,其主要作用表现在心脏舒张期,将贮存于动脉中的弹性势能转化为动能继续推动血液泵入外周,保证血液循环的顺利进行。但随着年龄的增长,人体器官出现老化,血管也出现了退行性变化,主要表现为动脉管壁的弹性下降,管壁增厚,硬度增加,内膜发生钙化和脂类物质沉积等现象,我们将血管的这种适应性变化称之为血管老化^[17]。由健康增龄所引起的血管变化我们称之为生理性血管老化;而由高血压、冠心病、动脉粥样硬化等疾病引起的变化我们称之为病理性血管老化。

实验表明,增龄和高血压都能使胸主动脉的管壁厚度不断增加,VSMC不断增殖和迁移,导致管壁不断增厚。9月时SHR的胸主动脉管壁厚度已显著高于WKY,说明高血压导致血管平滑肌层不断增厚。同时SHR管壁厚度随月龄增加出现上调的趋势也更为明显,说明高血压和增龄可加速血管的老化。

VSMC对血压的维持起着至关重要的作用。VSMC在生长发育过程中会经历2种表型,但2种表型并非存在明确的时间界限。在胚胎发育时期,VSMC以未分化、具有较强增殖能力的合成表型为主,而在健康成熟个体,VSMC以高度分化的收缩表型为主,无增殖和迁移能力。但当血管发生损伤时,VSMC会从收缩表型转化为合成表型,相应的收缩表型标志蛋白如 α -SM-actin、Calponin、SM-MHC会处于劣势表达,合成表型标志蛋白如OPN和Epi-regulin则会处于优势表达。

本实验中对于胸主动脉VSMC收缩表型标志蛋

白的检测选取了 α -SM-actin和Calponin两种,对于合成表型标志蛋白选取了具有代表性的OPN。分别采用免疫组织化学染色和Western blot技术对1、3、9、16月的WKY和SHR胸主动脉的3个标志蛋白的表达量进行了检测。实验结果表明,在WKY和SHR各自的生长发育过程中,未进入成年时其收缩表型标志蛋白 α -SM-actin和Calponin的表达量呈现不断增高的趋势,但进入成年期后开始下降。在血管损伤模型中,血流发生异常,血管内皮细胞损伤,血胆固醇升高时,VSMC中的 α -SM-actin表达显著下降^[18]。Duband等^[19]的研究发现,相比于原肌球蛋白、 α -SM-actin,Calponin在分化上具有延迟性的特点,更能方便可靠地说明分化程度。 α -SM-actin、Calponin两蛋白在大鼠3月时表达达到峰值,但SHR的峰值低于WKY,说明高血压对收缩表型标志蛋白的表达产生显著影响。随月龄增加,WKY和SHR均出现下调,说明了增龄同样对收缩表型标志蛋白产生显著影响。观察16月大鼠发现,增龄和高血压的双重作用对 α -SM-actin影响更为显著。

近年来的研究发现,OPN在心血管疾病模型中表达上调,并对心肌的重构扮演着重要的角色^[20]。OPN与炎症反应和高血压有着密切的关系^[21],它可作为新的高血压生物标记物,可以补充现有的诊断工具,进一步细化危险人群的分层^[22]。也有研究表明,在动脉粥样硬化早期,调控OPN mRNA的过表达会进一步导致 α -SM-actin和Calponin表达水平的下降^[23]。本研究表明,作为合成表型标志蛋白的OPN表达量在WKY组和SHR组中均随月龄增长而出现逐渐增加的趋势。在未达到性成熟时,即3月前,WKY和SHR之间并未有显著性差异,但在性成熟发生后,SHR组OPN蛋白表达增加速率远远超出了WKY组。WKY的增龄过程中OPN的表达呈上调趋势,说明增龄诱导OPN表达增多,平滑肌蛋白结构发生重构。在高血压等血管损伤模型中,血管会发生重塑,平滑肌的表型会发生变化,未分化的具有增殖和迁移能力的VSMC合成表型标志蛋白会不断增多,并伴随肌纤维骤减,同时管壁出现明显的增厚现象。说明增龄和高血压的交互作用使OPN的表达上调更为明显。

许多潜在的治疗高血压的对策是通过激活或抑制VSMC的一些特殊信号转导通路。信号转导通路是一个复杂的网状结构,在时间和空间上对VSMC的多种蛋白表达进行共同调控,这些信号通路之间也相互影响^[24]。深入了解调控VSMC表型的信号通路对高血压疾病的防治具有重要意义。

VSMC 不像骨骼肌和心肌细胞那样分化完全,它仍然具有相当大的可塑性。在各种生长因子的刺激下,会激活相关信号通路,对蛋白表达进行调控。目前研究比较广泛的是 PI3K/Akt/eNOS 与 MAPK 两条通路间平衡作用对 VSMC 表型的调控。PI3K/Akt 信号通路的活化在人类的肿瘤谱中属于失调状态,PI3K 的家族成员属于原癌基因。由于 PI3K/Akt 这一通路在细胞生长和分化过程中发挥着至关重要作用^[25],所以一旦此信号通路的调控处于失活状态就会导致细胞生长和分化的调节紊乱。高血压的发生发展与 NO 产出量减少和活性降低有关,这使得血管的氧化应激作用增强。NO 的生成主要来源于 eNOS 的促进作用。研究发现,MAPK 信号转导通路普遍存在于哺乳动物的细胞中,由 Ras 激活的 MAPK 信号通路包括 42/44ERK、p38MAPK、JNK 等多条信号通路。现已知 ERK 存在于所有真核细胞中,是一种进化十分保守的蛋白,ERK 对于肿瘤细胞增殖、迁移和凋亡都起着重要的调节作用。Amlodipine 和 Enalapril 作为治疗高血压的药物可以通过抑制 MEK1-ERK 通路和 MKK6-p38MAPK 通路,促进 eNOS 和 Akt 通道的上调来抑制平滑肌细胞的去分化^[26]。也有报道指出,ERK 也参与 VSMC 的增殖过程^[27]。p38MAPK 作为 MAPK 家族的重要一员,一直作为介导炎症反应的通路被大家所关注。近年来研究表明,p38MAPK 除了参与各种细胞内的反应外,还介导细胞的生长、分化和凋亡,特别是在肌细胞的分化过程中发挥重要作用^[28]。因此,本实验选取了与 VSMC 表型转换密切相关的 PI3K/Akt 与 MAPK 两条通路来进行研究。

本实验的研究结果表明,PI3K/Akt/eNOS 信号通路对 VSMC 的表型具有调控作用,其激活后调控 VSMC 收缩表型标志蛋白的表达上调,对维持 VSMC 的收缩表型起到重要作用。无论是 WKY 还是 SHR,在增龄过程中,PI3K/Akt/eNOS 信号通路的调控作用逐渐减弱,磷酸化水平逐渐下调。相反,ERK 和 p38MAPK 信号通路主要维持 VSMC 的合成表型,使其具有增殖和迁移的能力,随月龄增长,这 2 条信号通路的调控作用逐渐增强。同一月龄的 SHR 与 WKY 相比,SHR 表现出过早地去分化作用增强,分化作用减弱。这同时也验证了,无论是增龄还是高血压,血管出现损伤后进行自动修复,VSMC 开始增殖和迁移,这也将其卷入致病过程,同时高血压加速了增龄过程中 VSMC 病变的发生和发展。

综上所述,增龄和高血压均导致 VSMC 收缩表

型标志蛋白表达下调,合成表型标志蛋白表达上调,二者的交互作用更为显著;VSMC 的表型可能是由促分化的 PI3K/Akt 通路和促合成的 MAPK 通路之间的平衡作用决定的。

[参考文献]

- [1] 姚宗芹, 陈 弹, 蒋廷波, 等. 继发性高血压的临床特点及诊断分析[J]. 四川医学, 2010, 31(2): 179-181.
- [2] Lavigne MC, Ramwell PW, Clarke R. Growth and phenotypic characterization of porcine coronary artery smooth muscle cells[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1999, 35(3): 136-143.
- [3] Beamish JA, He P, Kottke-Marchant K, et al. Molecular regulation of contractile smooth muscle cell phenotype: implications for vascular tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2010, 16(5): 467-491.
- [4] Weber GF, Lett GS, Haubein NC. Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival [J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(6): 861-869.
- [5] Jonker DJ, Karapetis CS, Harbison C, et al. Epiregulin gene expression as a biomarker of benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(3): 648-655.
- [6] Gerthoffer WT. Mechanisms of vascular smooth muscle cell migration[J]. *Circ Res*, 2007, 100(5): 607-621.
- [7] Fan Z, Li C, Qin C, et al. Role of the PI3K/AKT pathway in modulating cytoskeleton rearrangements and phenotype switching in rat pulmonary arterial vascular smooth muscle cells[J]. *DNA Cell Biol*, 2014, 33(1): 12-19.
- [8] 杨 静, 雷 燕. 细胞衰老与血管老化的关系及其研究进展[J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(4): 369-374.
- [9] Rensen SS, Doevendans PA, van Eys CJ. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity[J]. *Neth Heart J*, 2007, 15(3): 100-108.
- [10] Sehgel NL, Qiu H, Hunter WC. Hypertension and aging effects on vascular smooth muscle cell contribution to reconstituted aortic tissue elasticity [C]. *Bioengineering Conference (NEBEC)*, 2011; 1-2.
- [11] Li Z, Lu N, Shi L. Exercise training reverses alterations in Kv and BKCa channel molecular expression in thoracic aorta smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats[J]. *J Vasc Res*, 2014, 51(6): 447-457.
- [12] 李玉林, 杨相林. 肾性高血压家兔主动脉内膜和中膜结构改变及其与自然老化的关系[J]. *老年医学杂志*, 1982, 2(2): 9-14.
- [13] 范 平, 司军强, 刘政江, 等. 自发性高血压大鼠模型的应用研究进展 [J]. *农垦医学*, 2004, 26(6): 444-448.
- [14] 许士凯. 衰老理论与心血管系统老化研究进展[J]. 实

- 用老年医学, 1989, 3(3): 127-129.
- [15] 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.
- [16] 吴金星, 张 钧. 原发性高血压对组织因子的影响及其机制的探讨[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2009, 11(2): 155-157.
- [17] Fukutomi M, Kario K. Aging and hypertension. [J]. *Expert Rev Cardiovasc Ther*, 2010, 8(11): 1 531-539.
- [18] Chen CH, Ho HH, Wu ML, et al. Modulation of cysteine-rich protein 2 expression in vascular injury and atherosclerosis[J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(11): 7 033-041.
- [19] Duband JL, Gimona M, Scatena M, et al. Calponin and SM22 as differentiation markers of smooth muscle: spatio-temporal distribution during avian embryonic development [J]. *Differentiation*, 1993, 55(1): 1-11.
- [20] Rosenberg M, Zugck C, Nelles M, et al. Osteopontin, a new prognostic biomarker in patients with chronic heart failure[J]. *Circ Heart Fail*, 2008, 1(1): 43-49.
- [21] Stępień E, Wypasek E, Stopyra K, et al. Increased levels of bone remodeling biomarkers (osteoprotegerin and osteopontin) in hypertensive individuals[J]. *Clin Biochem*, 2011, 44(10-11): 826-831.
- [22] Rosenberg M, Meyer FJ, Gruenig E, et al. Osteopontin (OPN) improves risk stratification in pulmonary hypertension (PH)[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 155(3): 504-505.
- [23] Gao H, Steffen MC, Ramos KS. Osteopontin regulates α -smooth muscle actin and calponin in vascular smooth muscle cells[J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(2): 155-161.
- [24] Brozovich FV, Nicholson CJ, Degen CV, et al. Mechanisms of vascular smooth muscle contraction and the basis for pharmacologic treatment of smooth muscle disorders [J]. *Pharmacol Rev*, 2016, 68(2): 476-532.
- [25] Osaki M, Oshimura M, Ito H. PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer[J]. *Apoptosis*, 2004, 9(9): 667-676.
- [26] Umemoto S, Kawahara S, Hashimoto R, et al. Different effects of amlodipine and enalapril on the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway for induction of vascular smooth muscle cell differentiation in vivo[J]. *Hypertens Res*, 2006, 29(3): 179-186.
- [27] Zhang YM, Wang KQ, Zhou GM, et al. Endothelin-1 promoted proliferation of vascular smooth muscle cell through pathway of extracellular signal-regulated kinase and cyclin D1[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, 24(6): 563-568.
- [28] Cuenda A, Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773(8): 1 358-375.
- (此文编辑 曾学清)