

## $\beta 1$ 亚基启动子区甲基化在高血压和增龄调控肠系膜动脉 $BK_{Ca}$ 通道功能中的作用

张慧荣, 张严焱, 李珊珊, 石丽君

(北京体育大学运动与体质健康教育部重点实验室, 北京市 100084)

[关键词] 高血压; 增龄; 大电导钙激活钾通道; 甲基化

[摘要] **目的** 探讨高血压和增龄对大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞大电导钙激活钾通道( $BK_{Ca}$ )  $\beta 1$  亚基甲基化程度的影响。**方法** 选用3、16月龄雄性正常血压大鼠(WKY)和自发性高血压大鼠(SHR),尾动脉无创测定血压,取各组大鼠肠系膜动脉进行实验。分别采用膜片钳全细胞模式记录  $BK_{Ca}$  通道电流、单通道检测  $BK_{Ca}$  通道门控特性;离体微血管张力测定  $BK_{Ca}$  通道在血管张力中的作用;蛋白免疫印迹观察  $BK_{Ca}$  通道  $\alpha$ 、 $\beta 1$  亚基表达情况;亚硫酸氢盐测序 PCR 测定  $\beta 1$  亚基启动子区甲基化程度。**结果** 3月龄时SHR的  $BK_{Ca}$  通道平均电流密度较同龄WKY显著增大;WKY、SHR的  $BK_{Ca}$  通道平均电流密度随增龄均显著降低。高血压时,他莫昔芬诱发的  $BK_{Ca}$  通道开放概率增加显著高于WKY;此外,  $BK_{Ca}$  通道在血管张力调节中的贡献率亦显著高于同龄WKY。  $BK_{Ca}$  通道  $\beta 1$  亚基表达在高血压时发生显著上调,随增龄变化,  $\beta 1$  亚基表达在正常血压和高血压中均发生下调。高血压降低了  $\beta 1$  亚基启动子区甲基化程度,而增龄增加了其甲基化程度。**结论** 高血压时,  $BK_{Ca}$  通道  $\beta 1$  亚基启动子区发生去甲基化,  $\beta 1$  亚基表达增多,  $BK_{Ca}$  通道功能增强;而在增龄过程中,  $\beta 1$  亚基启动子区发生甲基化,其表达减少,  $BK_{Ca}$  通道功能减弱。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

### Role of $\beta 1$ submit promoter methylation when hypertension and aging regulate the activity of large-conductance $Ca^{2+}$ -activated $K^+$ channel in mesenteric arteries

ZHANG Huirong, ZHANG Yanyan, LI Shanshan, SHI Lijun

(Key Laboratory of Sports and Physical Health Ministry of Education, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

[KEY WORDS] hypertension; aging; large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel; methylation

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of  $\beta 1$  submit promoter methylation when hypertension and aging regulate the activity of large-conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channel in mesenteric arteries. **Methods** Male Wistar Kyoto rats (WKY) and spontaneously hypertensive rats (SHR) were studied at 3, 16 months of age, blood pressure was noninvasively measured in the caudal artery, the mesenteric arteries were taken for the experiment. The whole-cell  $K^+$  currents and  $BK_{Ca}$  single channel currents were measured using whole-cell and inside-out patch, respectively. Isometric contraction study was performed to investigate the contribution of  $BK_{Ca}$  channel to vascular tone regulation. Western blot was used to detect the expression of  $\alpha$  and  $\beta 1$  submit of  $BK_{Ca}$  channel in mesenteric arteries. DNA bisulfite sequencing PCR was performed to investigate of the DNA methylation status at  $\beta 1$  gene (*KCNMB1*) promoter. **Results** At 3 months old, compared to WKY, the mean peak  $BK_{Ca}$  current density of SHR was significantly increased. Aging decreased the mean peak whole-cell current density of both SHR and WKY. The increases in the  $P_o$  of  $BK_{Ca}$  channels that tamoxifen evoked in WKY were significantly lower than those of age-matched SHR. Meantime, hypertension increased the contribution of  $BK_{Ca}$  channels in vascular tone regulation. Compared with age-matched WKY, the protein expression level of the  $\beta 1$  subunit observed in SHR was always significantly increased. Aging reduced  $\beta 1$  subunit expression in mesenteric arteries. Hypertension decreased  $BK_{Ca}$  channel  $\beta 1$  submit promoter methylation in mesenteric arteries, in contrast, aging

[收稿日期] 2018-06-06

[修回日期] 2018-09-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31771312);中央高校科研业务费专项资金资助项目(2018GJ010)

[作者简介] 张慧荣,硕士研究生,研究方向为运动和心血管生理学,E-mail为 m18612362395@163.com。通信作者石丽君,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。

increased BK<sub>Ca</sub> channel  $\beta 1$  submit promoter methylation in mesenteric arteries. **Conclusions** During hypertension, *KCNMB1* gene demethylated and the expression of  $\beta 1$  submit increased, which enhanced the function of BK<sub>Ca</sub> channel. Aging not only enhanced CpG methylation at *KCNMB1* gene promoter but also upregulated  $\beta 1$  subunit expression, which diminished the function of BK<sub>Ca</sub> channel.

高血压和增龄都是心血管疾病发生发展的主要危险因素<sup>[1-3]</sup>,但是它们之间的关系并不明确。当高血压与增龄共同作用时,可能会加速内皮、血管功能障碍,动脉硬化增加,血管反应性降低,血压升高<sup>[4-6]</sup>。大电导钙激活钾(large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>,BK<sub>Ca</sub>)通道是由构成孔道的 $\alpha$ 亚基和调节亚基 $\beta 1$ 亚基(*KCNMB1*)构成。BK<sub>Ca</sub>通道广泛分布于阻力动脉的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells,VSMC)上<sup>[7]</sup>,在膜去极化和局部[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>升高条件下激活,BK<sub>Ca</sub>通道的开放是血管平滑肌舒张的重要负反馈机制<sup>[8]</sup>。 $\beta 1$ 亚基可调节BK<sub>Ca</sub>通道的钙敏感性和门控特性,从而控制血管平滑肌细胞膜电位和血管收缩力,继而影响血压<sup>[9-10]</sup>。

高血压时,血管平滑肌细胞BK<sub>Ca</sub>通道 $\beta 1$ 亚基的功能和蛋白表达发生上调<sup>[11-14]</sup>。这是高血压过度升高诱发的局部保护机制,以代偿动脉腔内压力增加<sup>[14-15]</sup>。在增龄过程,BK<sub>Ca</sub>通道 $\alpha$ 和 $\beta 1$ 亚基表达出现非平行下调,降低了BK<sub>Ca</sub>通道对肠系膜动脉血管张力的调节作用<sup>[16]</sup>。而高血压和增龄共同作用下血管平滑肌细胞BK<sub>Ca</sub>通道表达和功能变化目前尚不清楚。在高血压和增龄过程中,遗传和环境因素之间存在着复杂的相互作用<sup>[17-18]</sup>。近年来,随着表观遗传学迅速发展,表观遗传修饰搭建起了环境-基因之间的桥梁或中介,而衰老和高血压的发生正是由于多种遗传和环境因素相互作用引起的;此外,与基因突变所不同的是,表观遗传学改变具有可逆性;因此,可作为预防和治疗高血压或延缓血管衰老重要药物靶点<sup>[17-18]</sup>。DNA甲基化是调节基因转录的表观遗传修饰的主要机制,发生在基因组磷酸化胞嘧啶鸟嘌呤基序(cytosinephosphate-guanine,CpG)的胞嘧啶残基。DNA超甲基化或启动子区甲基化增加,通常抑制基因转录并直接沉默相关基因<sup>[19]</sup>。启动子区的甲基化程度对调节血管适应性有关离子通道的表达起关键作用<sup>[20-22]</sup>。目前,高血压和衰老两个因素共同作用下BK<sub>Ca</sub>通道功能变化尚未见报道,以及其潜在的DNA甲基化机制还有待研究。

本研究旨在观察高血压和增龄对大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞BK<sub>Ca</sub>通道电流及门控特效、 $\beta 1$ 亚基功能和蛋白表达以及 $\beta 1$ 启动子区DNA甲基化程

度的影响。并从表观遗传学角度探讨高血压和增龄作用下血管平滑肌细胞BK<sub>Ca</sub>通道功能变化的DNA甲基化机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型

雄性3月龄(青年)和16月龄(老年)原发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat,SHR)和正常血压大鼠(wistar kyoto rat,WKY)各24只,购自北京维通利华实验动物中心。WKY-3M为正常血压3月龄组,SHR-3M为高血压3月龄组,WKY-16M为正常血压16月龄组,SHR-16M为高血压16月龄组。饲养于北京体育大学动物房,保持室温约22℃,湿度保持40%~45%,国家标准啮齿类动物分笼饲养,自由饮水。

### 1.2 主要药物

牛血清蛋白(BSA)、木瓜蛋白酶(Papain)、二硫苏糖醇(DDT)、乙二胺四乙酸(EDTA)、4-羟乙基哌嗪乙磺酸(Hepes)、Iberitoxin(IbTX)、N $\omega$ -硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)及F型胶原酶均购自Sigma(美国),其余均为国产分析纯试剂。

### 1.3 大鼠心血管反应性测定

采用动物尾动脉无创血压计(BP-2010A,北京软隆)测量大鼠的血压和心率。在大鼠月龄分别达到3月龄、16月龄当天的上午于清醒状态与安静温暖环境下测定,每只大鼠测3~5次,取3次血压(相差不超过10 mmHg)的平均值。

### 1.4 离体微血管环的制备和张力的测定

使用戊巴比妥(100 mg/kg)麻醉大鼠后,迅速打开腹腔,小心地取出各组肠系膜动脉组织,置于4℃Na-Hepes缓冲液:121.1 mmol/L NaCl、10 mmol/L Hepes、15.16 mmol/L KCl、2.4 mmol/L MgSO<sub>4</sub>、11.08 mmol/L Glucose、1.6 mmol/L CaCl<sub>2</sub>,调节至pH7.4,通以95%O<sub>2</sub>和5%CO<sub>2</sub>混合气。在微血管张力测定仪(Multiwire myograph system-620M,DMT)中使用肠系膜动脉2、3级分支的血管进行收缩特性研究。实验中,在Kmax测量后加入非选择性NOS抑制剂N $\omega$ -硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME,100  $\mu$ mol/L)。测量血管对iberitoxin(IbTX,BK<sub>Ca</sub>通道特异性阻断剂,

$10^{-7}$  mmol/L) 的反应, 以此来研究  $BK_{Ca}$  通道对血管张力的调节作用。

### 1.5 肠系膜动脉平滑肌细胞急性分离

将获取的 2-3 级肠系膜动脉置于分离液中。将血管切成 1 mm 小段, 置于酶消化液中, 在 37 °C 恒温水浴锅中孵育 25~30 min。终止消化后, 适度吹打, 吸取细胞悬液经滤网过滤至细胞浴槽内, 置于 6 °C 贴壁待用。分离液成分: 137 mmol/L NaCl, 5.6 mmol/L KCl, 1 mmol/L  $MgCl_2$ , 10 mmol/L Glucose, 10 mmol/L Hepes, 0.42 mmol/L  $Na_2HPO_4$ , 0.44 mmol/L  $NaH_2PO_4$ , 4.2 mmol/L  $NaHCO_3$  (调节至 pH7.3)。酶液成分: 2 g/L BSA, 4 g/L Papain, 1 g/L DDT 和 0.6 g/L F 型胶原酶溶于分离液中。

### 1.6 全细胞记录

采用全细胞记录模式测定  $BK_{Ca}$  通道电流。记录电极经控制仪两部控制后电极尖端直径约为 1~2  $\mu m$ , 充灌电极内液后电极阻抗为 3~5 M $\Omega$ 。将细胞钳制在 -70 mV, 记录电流-电压 (I-V) 曲线, 阶跃 +10 mV, 递增至 +70 mV, 持续 350 ms。细胞外液成分: 134 mmol/L NaCl, 6 mmol/L KCl, 1 mmol/L  $MgCl_2$ , 1.8 mmol/L  $CaCl_2$ , 10 mmol/L Glucose, 10 mmol/L Hepes (pH7.4)。电极内液成分: 110 mmol/L K-aspartate, 30 mmol/L KCl, 1 mmol/L EGTA, 3 mmol/L  $Na_2ATP$ , 0.85 mmol/L  $CaCl_2$ , 10 mmol/L Glucose, 10 mmol/L Hepes (用 KOH 调至 pH7.2)。

### 1.7 单通道记录

$BK_{Ca}$  单通道电流采用膜片钳内面向外记录模式, 细胞内、外液为对称性高  $K^+$  (145 mmol/L), 电极电阻 15~20 M $\Omega$ 。浴液中的游离  $Ca^{2+}$  浓度通过加入适量  $CaCl_2$  和 EGTA 调整为 100 nmol/L。采样为 Gap free 模式, 采样频率为 10 kHz, Bessel 低通滤波频率为 2 kHz。在 Clampex10.0 软件控制下, 进行 A/D、D/A 转换, 采用 pCLAMP10.2 软件进行数据的采集和分析。电极内液成分: 100 mmol/L KCL, 45 mmol/L K-aspartate, 1 mmol/L EGTA, 10 mmol/L Hepes, 5 mmol/L Glucose (用 KOH 调至 pH7.4)。

### 1.8 蛋白免疫印迹检测

采用蛋白免疫印迹技术检测各组肠系膜动脉平滑肌细胞  $BK_{Ca}$  通道  $\alpha$  和  $\beta 1$  亚基表达的变化。取肠系膜动脉置于 4 °C 的 Na-Hepes 液中, 剥离周围组织后投入液氮研磨, 加入裂解液, 离心后取上清。BCA 试剂盒 (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA) 测定蛋白质浓度, 总蛋白提取物在 10%~15% SDS 聚丙烯酰胺凝胶上分离并转移到聚偏氟乙烯

(PVDF) 膜上。5% BSA 封闭, 一抗 (anti-KCa 1.1, 1:300; anti-slo $\beta 1$ , 1:300; Alomone Labs) 4 °C 过夜。在 TBST 中充分洗涤后, 用相应二抗孵育膜, 然后在 TBST 中洗涤。用 ECL 化学发光液观察与免疫印迹结合的辣根过氧化物酶, 并用 Bio-Rad ChemiDOC XRS<sup>+</sup> 记录信号。用  $\beta$ -actin 标准化所有样品的加样。

### 1.9 DNA 亚硫酸氢盐测序 PCR

使用 PureLink Genomic DNA Mini 试剂盒 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 从肠系膜动脉中分离基因组 DNA。以在 260 nm/280 nm 处的吸光度来确定 DNA 质量, 并使用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行确认。随后, 使用 EZ DNA Methylation-Gold 试剂盒 (ZYMO Research, Orange) 将 DNA 样品进行硫酸氢钠转化。PCR 扩增 CpG 岛上的 *KCNMB1* 启动子区 (10 号染色体 18911664-18912065, 长度为 402 bp, 含有 7 个 CpG 位点); 用 2.0% 琼脂糖凝胶分离产物, 使用 TIANgel Midi 纯化试剂盒 (Tiangen)。将纯化的条带克隆到 pEASY-T1 克隆载体中。每个样品总共选择 10 个克隆测序, 引物: 正向为 5'-AGAG AAAATAGAGGTTTAGA GAGGTGT-3', 反向为 5'-ATCAAATCTAAACACACAACCTTACTCC-3'。甲基化率: 甲基化的 CpG / (甲基化的 CpG + 未甲基化的 CpG), 数据以百分比表示。

### 1.10 统计学分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。组间比较使用双因素方差分析。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高血压和增龄对心率和血压的影响

高血压大鼠的心率 (heart rate, HR)、收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP) 及平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP) 均显著高于同龄正常血压大鼠 ( $P < 0.05$ )。无论是 WKY 还是 SHR, 与 3 月龄同品系大鼠相比, 16 月龄大鼠的收缩压和平均动脉压均显著升高 ( $P < 0.05$ )。与 3 月龄高血压大鼠相比, 16 月龄高血压大鼠心率显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而正常血压大鼠的心率随年龄增加只略微增加 ( $P > 0.05$ )。高血压和增龄对收缩压和平均动脉压的交互作用显著 (表 1)。

表 1. 各组大鼠心率、血压值( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

Table 1. The heart rate and blood pressure of rats in different groups( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

项目	WKY-3M	SHR-3M	WKY-16M	SHR-16M
HR (次/分)	355.4±9.6	412.1±11.0 <sup>a</sup>	369.1±12.8	439.5±14.3 <sup>ab</sup>
SBP (mmHg)	134.9±2.6	191.6±2.3 <sup>a</sup>	152.2±5.1 <sup>b</sup>	212.0±6.1 <sup>ab</sup>
DBP (mmHg)	93.7±4.6	145.6±4.2 <sup>a</sup>	106.3±4.3	155.6±7.3 <sup>a</sup>
MAP (mmHg)	107.4±2.8	160.9±5.2 <sup>a</sup>	121.3±3.3 <sup>b</sup>	174.4±3.9 <sup>ab</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与同龄 WKY 相比; b 为  $P<0.05$ , 与同品系 3 月龄大鼠相比。

2.2 高血压和增龄对肠系膜动脉平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub> 通道电流的影响

+70 mV 的钳制电压下, 3 月龄正常血压大鼠 BK<sub>Ca</sub> 通道电流密度峰值为 15.3±0.7 pA/pF, 16 月龄正常血压大鼠 BK<sub>Ca</sub> 通道电流密度峰值为 10.2±0.3 pA/pF ( $n=18$  cells); 而 3 月龄高血压大鼠 BK<sub>Ca</sub> 通道

电流密度显著升高至 21.3±0.7 pA/pF ( $n=24$  cells,  $P<0.05$ ), 约为正常血压的 1.39 倍; 16 月龄高血压大鼠 BK<sub>Ca</sub> 通道电流密度则减少为 11.8±0.5 pA/pF ( $n=20$  cells,  $P<0.05$ )。提示, 高血压和增龄均对 BK<sub>Ca</sub> 通道电流密度有显著影响, 衰老引起 BK<sub>Ca</sub> 通道功能降低, 高血压则使 BK<sub>Ca</sub> 通道功能增强(图 1)。

2.3 高血压和增龄对 BK<sub>Ca</sub> 通道在肠系膜动脉张力调节中的作用的影响

BK<sub>Ca</sub> 通道的特异性阻断剂 IbTX 可诱发大鼠肠系膜动脉收缩。无论是 3 月龄还是 16 月龄, 与正常血压大鼠相比, IbTX 使高血压大鼠肠系膜动脉张力增加的作用更明显 ( $n=6, P<0.05$ )。而随着增龄变化, IbTX 诱发的血管收缩作用逐渐减弱 ( $P>0.05$ )。提示, 高血压时, BK<sub>Ca</sub> 通道参与血管张力调节作用增强; 而增龄使血管张力调节作用减弱(图 2)。

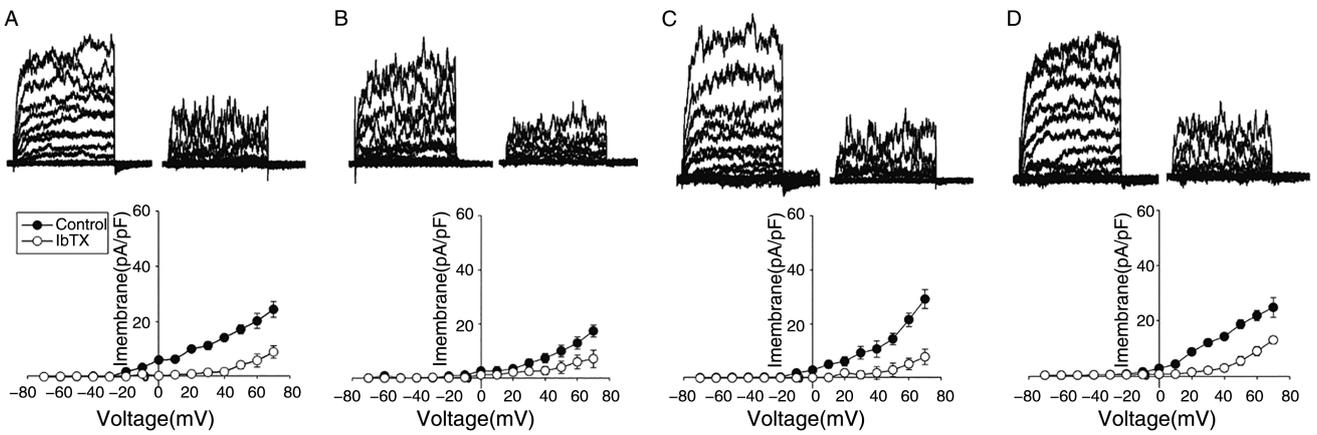


图 1. 高血压和增龄对大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub> 通道电流的影响 A 为 WKY-3M 组, B 为 WKY-16M 组, C 为 SHR-3M 组, D 为 SHR-16M 组。每组中左上图为阶跃模式记录得到的全细胞 K<sup>+</sup> 电流, 右上图为 IbTX (100 nmol/L) 阻断后的全细胞 K<sup>+</sup> 电流, 下图为不同钳制电压下的电流密度及 IbTX (100 nmol/L) 阻断后的电流密度。

Figure 1. The effect of hypertension and aging on whole-cell BK<sub>Ca</sub> channels currents in myocytes of the mesenteric artery

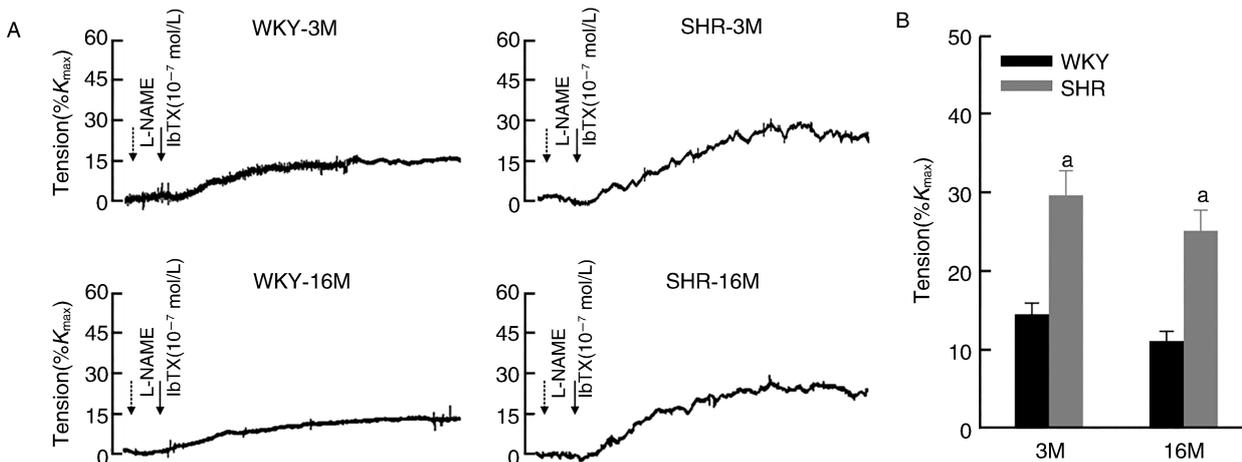


图 2. BK<sub>Ca</sub> 通道阻断剂 IbTX 对大鼠肠系膜动脉张力的影响 A 为 BK<sub>Ca</sub> 通道阻断剂 IbTX (10<sup>-7</sup> mol/L) 对各组大鼠肠系膜动脉血管张力影响的实验图形; B 为 IbTX 对血管张力影响的数据统计图 ( $n=6$ )。a 为  $P<0.05$ , 与同龄 WKY 相比。

Figure 2. Effects of BK<sub>Ca</sub> channel inhibitor IbTX on vascular tension in mesenteric arteries

### 2.4 高血压和增龄对肠系膜动脉平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub>通道 β1 亚基的影响

本实验室前期研究结果表明,高血压时, BK<sub>Ca</sub>通道 β1 亚基上调,而增龄使其表达下调<sup>[14,16]</sup>。通过膜片钳单通道记录模式观察 BK<sub>Ca</sub>通道 β1 亚基特异性激活剂他莫昔芬(Tamoxifen, 1 mmol/L, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>free</sub> = 100 nmol/L)对各组平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub>通道的单通道电流的影响,以此探究高血压及增龄两种因素作用下 β1 亚基对 BK<sub>Ca</sub>通道活性的影响。在 3 月龄正常血压大鼠中,他莫昔芬使 BK<sub>Ca</sub>通道开放概率(P<sub>o</sub>)

增加近 3.8 倍 (n = 16),而在高血压大鼠中增加了 6.2倍 (n = 18, P < 0.05)。表明他莫昔芬对正常血压大鼠 BK<sub>Ca</sub>通道 P<sub>o</sub> 的增加程度显著低于同龄的高血压大鼠 (P < 0.05)。与 3 月龄高血压大鼠相比, 16 月龄高血压大鼠 BK<sub>Ca</sub>通道 P<sub>o</sub> 没有显著上调或下调趋势,推测这种变化为增龄与高血压的共同作用所导致的。综上所述,高血压可上调 BK<sub>Ca</sub>通道的 β1 功能,即伴随高血压发展,β1 亚基上调, BK<sub>Ca</sub>通道激活水平升高(图 3)。

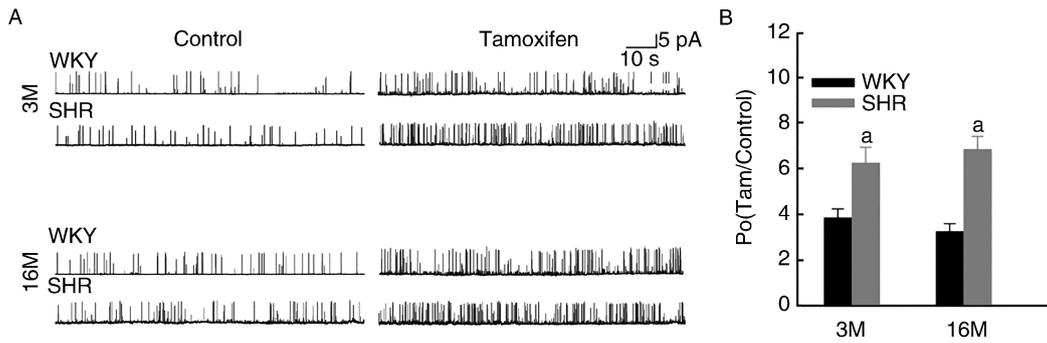


图 3. 各组大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub>单通道门控特性 A 为他莫昔芬(1 μmol/L)对 BK<sub>Ca</sub>单通道活性的影响,浴液中游离钙离子浓度为 100 nmol/L,HP = +40 mV; B 为统计图,使用他莫昔芬后 P<sub>o</sub> 值出现成倍变化 (n = 6)。a 为 P < 0.05,与同龄 WKY 相比。纵坐标为 pA, 1 pA = 10<sup>-12</sup> A。

Figure 3. Gating characteristics of BK<sub>Ca</sub> single channel currents in mesenteric arteries

### 2.5 高血压和增龄对 BK<sub>Ca</sub>通道肠系膜动脉平滑肌细胞中 α、β1 亚基表达的影响

α 亚基表达量在各组之间无显著差异 (P > 0.05)。然而,与同龄正常血压大鼠相比,高血压大鼠 β1 亚基表达始终增高 (n = 6, P < 0.05)。16 月龄

高血压大鼠 β1 亚基表达量 (1.30 ± 0.15) 显著低于 3 月龄高血压大鼠 (2.17 ± 0.13)。提示,高血压上调肠系膜动脉平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub>通道 β1 亚基表达,增龄下调其表达(图 4)。

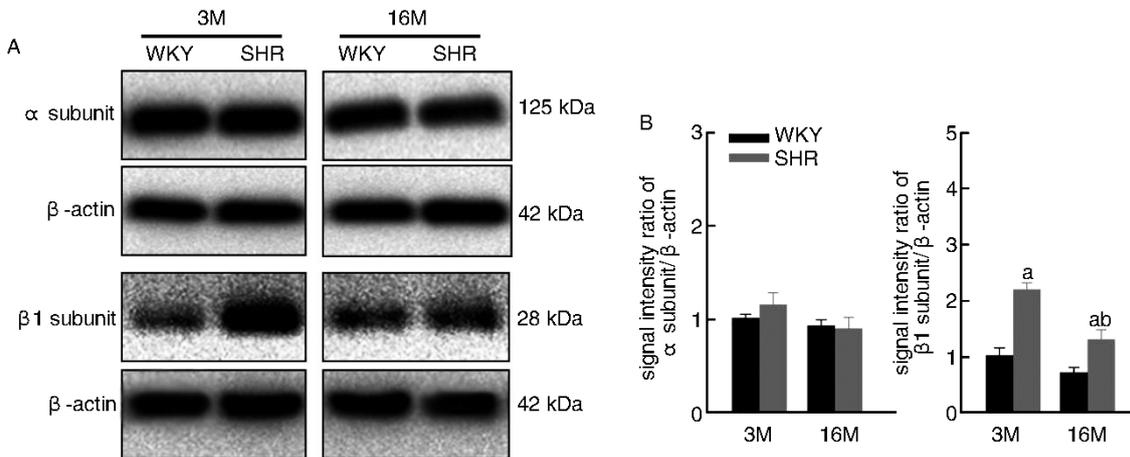


图 4. 各组大鼠肠系膜动脉 BK<sub>Ca</sub>通道的 α、β1 亚基的表达 A 为各组大鼠肠系膜动脉 BK<sub>Ca</sub>通道 α、β1 亚基的泳道条带图像, B 为 α、β1 亚基分别与 β-actin 的平均比值统计出的图形。a 为 P < 0.05,与同龄 WKY 相比; b 为 P < 0.05,与 3M 同品系相比。

Figure 4. The expression of α and β1 submit of BK<sub>Ca</sub> channel in mesenteric arteries

## 2.6 高血压和增龄对 *KCNMB1* 基因启动子区 CpG 位点甲基化的影响

无论是 3 月龄还是 16 月龄,与正常血压大鼠相比,高血压大鼠甲基化程度显著增加( $P < 0.05$ )。无论是正常血压大鼠还是高血压大鼠,*KCNMB1* 基因启动子区甲基化程度均随年龄增加而上升( $P < 0.05$ ;图 5)。

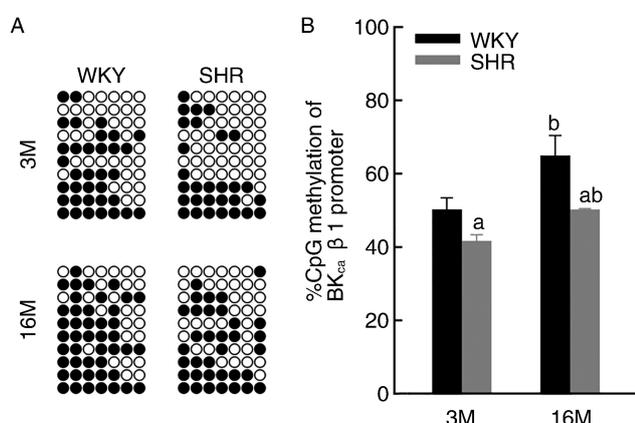


图 5. 各组大鼠肠系膜动脉 *KCNMB1* 基因启动子区甲基化程度 A 为 *KCNMB1* 启动子区 CpG 岛甲基化程度形象图,黑点代表已经甲基化,白点代表未甲基化;CpG 岛上的 7 个位点克隆 10 次后进行测序。B 图为 *KCNMB1* 启动子区 CpG 岛甲基化的平均百分比( $n=6$ )。a 为  $P < 0.05$ ,与同龄 WKY 相比;b 为  $P < 0.05$ ,与 3M 同品系相比。

Figure 5. DNA methylation status of *KCNMB1* promoter in the mesenteric arteries

## 3 讨论

本研究结果表明,高血压和增龄对肠系膜动脉平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub>通道 β1 亚基的基因启动子区甲基化程度产生相反的影响,进而使得 BK<sub>Ca</sub>通道 β1 亚基表达和功能发生变化。大鼠 3 月龄成熟,16 月为老年期。高血压引起 3 月龄大鼠 β1 亚基启动子区去甲基化,这是其表达上调的主要影响因素;随增龄变化,β1 亚基甲基化程度加大,BK<sub>Ca</sub>通道表达下调。高血压和增龄对 BK<sub>Ca</sub>通道 β1 亚基 DNA 甲基化产生完全不同的作用,因此有必要探究血管在病理和生理老化的共同作用下 BK<sub>Ca</sub>通道的变化情况。

研究表明,随着增龄变化,高血压大鼠收缩压增加、血管损伤加快、动脉硬化增加、血管反应性降低<sup>[5-6]</sup>。老年人高血压的发病率更高,而血压的持续升高会加剧其血管的病变<sup>[23]</sup>。高血压与增龄均可增加患者收缩压和平均动脉压,在血压中这种协同现象可能涉及多种机制<sup>[4-5,24]</sup>。例如,血管平滑肌细胞硬度和黏性的相互作用促进了高血压和增龄

之间的相互作用,加速了血管僵硬程度,升高了主动脉压力。此外,高血压和增龄加剧增强交感神经活动,损害植物神经功能,促使血压变化、血管衰老和血管功能障碍<sup>[25]</sup>。

高血压时,血管平滑肌细胞膜上离子通道的表达和功能也会发生异常。BK<sub>Ca</sub>通道在血管平滑肌中高度表达,并且通过内源性代偿机制缓解血管收缩,特别是在阻力动脉持续强烈肌源性收缩时,在血管舒张中起关键作用<sup>[26]</sup>。BK<sub>Ca</sub>通道由膜去极化和细胞内钙离子激活。当细胞兴奋时细胞膜去极化,电压依赖性钙通道开放,胞外 Ca<sup>2+</sup>内流,作用于肌质网终末池上 II 型雷诺丁受体敏感性钙通道,诱发钙火花释放,引起 BK<sub>Ca</sub>开放,产生瞬时外向钾电流(spontaneous transient outward K<sup>+</sup> currents, STOC),使膜超级化,电压依赖性钙通道关闭,钙内流减少,胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度下降,血管舒张,完成了对膜去极化和血管收缩的负反馈调节<sup>[27]</sup>。BK<sub>Ca</sub>通道的表达和功能与血管张力调节密切相关。Marijic 等<sup>[28]</sup>研究了 F344 大鼠和人的冠状动脉,发现其血管平滑肌中 BK<sub>Ca</sub>通道与年龄相关性很大:大鼠冠状动脉平滑肌细胞中,25~30 月龄组 BK<sub>Ca</sub>通道电流密度与 3 月龄组相比减少了 65%;人冠状动脉平滑肌上,60~70 岁组 BK<sub>Ca</sub>通道的 α 亚基蛋白与 19~56 岁组相比减少了 45%。同时另一研究表明,老年 F344 大鼠冠状动脉平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub>通道与青年相比其转录明显下调<sup>[29]</sup>。肠系膜动脉为机体主要外周阻力血管,其舒缩功能对血压的调节起关键作用。本研究检测了肠系膜动脉平滑肌细胞中 BK<sub>Ca</sub>通道电流、其在血管张力调节中的作用以及不同年龄段 WKY 和 SHR 肠系膜动脉 α 和 β1 亚基表达。结果显示高血压显著上调 BK<sub>Ca</sub>通道功能,包括 BK<sub>Ca</sub>通道全细胞电流、β1 亚基活性、β1 亚基功能和 β1 亚基表达。这些数据与蛋白免疫印迹分析结果一致,高血压肠系膜动脉中 β1 功能增强。我们的研究还提供了高血压对 BK<sub>Ca</sub>通道 β1 亚基启动子区去甲基化程度的影响的新证据,其上调 β1 亚基表达,增加青年和老年肠系膜平滑肌细胞 BK<sub>Ca</sub>通道活性。DNA 甲基化是指在 DNA 甲基化转移酶的作用下,基因组磷酸化 CpG 二核苷酸的胞嘧啶 5' 碳位共价键结合一个甲基基团。基因组中富含 CpG 的 DNA 序列的片段称为 CpG 岛。转录调控通常发生在位于启动子区域周围的 CpG 岛中,转录起始位点的 CpG 岛甲基化可导致基因长期沉默<sup>[19-20]</sup>。我们分析了位于 *KCNMB1* 基因启动子区上游 2000 bp 以内的 CpG

岛。无论是3月龄还是16月龄,较同龄正常血压大鼠相比,高血压大鼠 *KCNMB1* 基因启动子的平均甲基化程度总是偏高,表明高血压诱导  $\beta 1$  基因启动子去甲基化,这与  $\beta 1$  亚基表达和功能的上调一致。因此,启动子区甲基化水平在调节高血压的  $BK_{Ca}$  通道表达和活性及其调节血管收缩作用起着至关重要的作用。 $BK_{Ca}$  通道主要抑制血管平滑肌细胞肌源性收缩进一步增加,是病理条件下起保护作用的代偿机制。高血压显著上调  $BK_{Ca}$  通道,启动了这种代偿机制,增加了  $BK_{Ca}$  通道的活性和  $\beta 1$  亚基的表达量。

表观遗传学变化是衰老过程的重要组成部分,其中 DNA 甲基化已成为衰老的主要标志<sup>[18-30]</sup>。大部分组织的平均 DNA 甲基化率在早期增加,而在晚期逐渐减少<sup>[31]</sup>。本研究结果表明,正常大鼠和高血压大鼠的 DNA 甲基化随着年龄增加而增加。在老年 WKY 和 SHR 组中,随着 *KCNMB1* 基因启动子区 DNA 甲基化程度的升高, $BK_{Ca}$  通道电流减弱, $\beta 1$  亚基的表达略微下调。而在 SHR 组中,随着增龄, $\beta 1$  亚基的表达显著下调;WKY 组没有呈现出这样变化。这可能是由于 SHR 为了抵抗血管张力增加,作为代偿机制的  $BK_{Ca}$  通道被过度启动,随着增龄,这种机制失去了平衡,代偿失调,通道功能和活性减弱,调节血管张力的功能减弱。

综上,本研究表明高血压和增龄可以不同程度地改变 *KCNMB1* 启动子的甲基化程度,使大鼠肠系膜动脉平滑肌细胞  $BK_{Ca}$  通道  $\beta 1$  亚基功能和表达发生改变。从表观遗传学角度探讨高血压和增龄作用下血管平滑肌细胞  $BK_{Ca}$  通道功能变化的 DNA 甲基化机制,有助于我们了解高血压和增龄过程中  $BK_{Ca}$  通道活性和血管收缩的分子学机制的变化,综合地理解病理状态和自然衰老状态下的血管功能变化机制。

#### [参考文献]

[1] Mac Mahon S, Peto R, Cutler J, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 1, Prolonged differences in blood pressure: prospective observational studies corrected for the regression dilution bias[J]. *Lancet*, 1990, 335: 765-774.

[2] Fleg JL, Strait J. Age-associated changes in cardiovascular structure and function: a fertile milieu for future disease [J]. *Heart Fail Rev*, 2012, 17: 545-554.

[3] Cheng HM, Park S, Huang Q, et al. Vascular aging and hypertension: implications for the clinical application of central blood pressure [J]. *Int J Cardiol*, 2017, 230:

209-213.

[4] Sun Z. Aging, arterial stiffness, and hypertension[J]. *Hypertension*, 2015, 65: 252-256.

[5] 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: 370-377.

[6] Chamiot-Clerc P, Renaud JF, Safar ME. Pulse pressure, aortic reactivity, and endothelium dysfunction in old hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2001, 37: 313-321.

[7] Hill MA, Yang Y, Ella SR, et al. Large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels ( $BK_{Ca}$ ) and arteriolar myogenic signaling[J]. *FEBS Lett*, 2010, 584: 2033-2042.

[8] Orio P, Rojas P, Ferreira G, et al. New disguises for an old channel: MaxiK channel  $\beta$ -subunits[J]. *News Physiol Sci*, 2002, 17: 156-161.

[9] Patterson AJ, Henrie-Olson J, Brenner R, et al. Vasoregulation at the molecular level: a role for the  $\beta 1$  subunit of the calcium-activated potassium (BK) channel[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2002, 12: 78-82.

[10] Wu RS, Marx SO. The BK potassium channel in the vascular smooth muscle and kidney:  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits[J]. *Kidney Int*, 2010, 78: 963-974.

[11] Liu Y, Hudetz AG, Knaus HG, et al. Increased expression of  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^{+}$  channels in the cerebral microcirculation of genetically hypertensive rats: evidence for their protection against cerebral vasospasm [J]. *Circ Res*, 1998, 82: 729-737.

[12] Liu Y, Pleyte K, Knaus HG, et al. Increased expression of  $Ca^{2+}$ -sensitive  $K^{+}$  channels in aorta of hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 1997, 30: 1403-1409.

[13] Rusch NJ. BK channels in cardiovascular disease: a complex story of channel dysregulation [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297: H1580- H1582.

[14] Shi L, Zhang Y, Liu Y, et al. Exercise prevents upregulation of RyRs-BKCa<sup>2+</sup> coupling in cerebral arterial smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36: 1607-1617.

[15] Harper SL, Bohlen HG. Microvascular adaptation in the cerebral cortex of adult spontaneously hypertensive rats [J]. *Hypertension*, 1984, 6: 408-419.

[16] Shi L, Liu X, Li N, et al. Aging decreases the contribution of MaxiK channel in regulating vascular tone in mesenteric artery by unparallel downregulation of  $\alpha$ - and  $\beta 1$ -subunit expression[J]. *Mech Ageing Dev*, 2013, 134: 416-425.

[17] Wang J, Gong L, Tan Y, et al. Hypertensive epigenetics: from DNA methylation to microRNAs[J]. *J Hum Hypertens*, 2015, 29: 575-582.

(下转第 1005 页)

- in ApoE<sup>-/-</sup> mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(3): 644.
- [7] 李传厚, 王晓静, 唐文照, 等. 毛泡桐果化学成分研究[J]. *食品与药品*, 2014, 16(1): 12-14.
- [8] Yoder BJ, Cao S, Norris A, et al. Antiproliferative prenylated stilbenes and flavonoids from *Macaranga alnifolia* from the Madagascar rainforest[J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(3): 342-346.
- [9] Graham A, Allen AM. Mitochondrial function and regulation of macrophage sterol metabolism and inflammatory responses[J]. *World J Cardiol*, 2015, 7(5): 277-286.
- [10] 陈洪娜, 唐文昭, 闫志辉, 等. Diplocone 对同型半胱氨酸致血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(7): 666-670.
- [11] Scherer EB, Da Cunha AA, Kolling J, et al. Development of an animal model for chronic mild hyperhomocysteinemia and its response to oxidative damage[J]. *Int J Dev Neurosci*, 2011, 29(7): 693-699.
- [12] Ryu H, Kim Y, Oh E, et al. Hypoxanthine induces cholesterol accumulation and incites atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice and cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(11): 2160-2172.
- [13] O'Brien KM, Dirmeier R, Engle M, et al. Mitochondrial protein oxidation in yeast mutants lacking manganese-(Mn SOD) or copper- and zinc-containing superoxide dismutase (CuZnSOD): evidence that MnSOD and CuZnSOD have both unique and overlapping functions in protecting mitochondrial proteins from oxidative damage[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(50): 51817-51827.
- [14] Wihastuti TA, Teuku H, Merika S, et al. Inhibition of oxidative stress in hypercholesterolemic rats by soy milk[J]. *J of Cardio Disease Res*, 2016, 7(2): 74-82.
- [15] Goc Z, Szaroma W, Kapusta E, et al. Protective effects of melatonin on the activity of SOD, CAT, GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP[J]. *Chin J Physiol*, 2017, 60(1): 1-10.
- [16] 温先勇, 邓正华. 氧化型低密度脂蛋白丙二醛总抗氧化能力与冠状动脉粥样硬化的关系[J]. *中国心血管病研究杂志*, 2005, 3(7): 586-587.
- [17] 刘虹彬, 温进坤, 韩梅. 氧化应激与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2001, 25(9): 360-361.
- [18] Chen F, Castranova V, Li Z, et al. Inhibitor of nuclear factor kappaB kinase deficiency enhances oxidative stress and prolongs c-Jun NH2-terminal kinase activation induced by arsenic[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(22): 7689-7693.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 986 页)

- [18] Jung M, Pfeifer GP. Aging and DNA methylation[J]. *BMC Biol*, 2015, 13: 7.
- [19] Jones PA. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond[J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13: 484-492.
- [20] Chen M, Dasgupta C, Xiong F, et al. Epigenetic upregulation of large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel expression in uterine vascular adaptation to pregnancy[J]. *Hypertension*, 2014, 64: 610-618.
- [21] Liao J, Zhang Y, Ye F, Zhang L, et al. Epigenetic regulation of L-type voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels in mesenteric arteries of aging hypertensive rats[J]. *Hypertens Res*, 2017, 40: 441-449.
- [22] Chen M, Xiao D, Hu XQ, et al. Hypoxia represses ER- $\alpha$  expression and inhibits estrogen-induced regulation of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel activity and myogenic tone in ovine uterine arteries: causal role of DNA methylation[J]. *Hypertension*, 2015, 66: 44-51.
- [23] Garcia Palmieri M. Hypertension in old age[J]. *P R Health Sci J*, 1995, 14: 217-221.
- [24] Isabelle M, Simonet S, Ragonnet C, et al. Chronic reduction of nitric oxide level in adult spontaneously hypertensive rats induces aortic stiffness similar to old spontaneously hypertensive rats[J]. *J Vasc Res*, 2012, 49: 309-318.
- [25] Sueta D, Koibuchi N, Hasegawa Y, et al. Blood pressure variability, impaired autonomic function and vascular senescence in aged spontaneously hypertensive rats are ameliorated by angiotensin blockade[J]. *Atherosclerosis*, 2014, 236: 101-107.
- [26] Yang Y, Li PY, Cheng J, et al. Function of BK<sub>Ca</sub> channels is reduced in human vascular smooth muscle cells from Han Chinese patients with hypertension[J]. *Hypertension*, 2013, 61: 519-525.
- [27] 孔祥权, 杨玉雯. 大电导钙激活钾通道的增龄变化及与高血压的关系[J]. *中国心血管病研究*, 2008, 6(1): 70-72.
- [28] Marijic J, Li Q, Song M, et al. Decreased expression of voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in coronary smooth muscle during aging[J]. *Circ Res*, 2001, 88: 210-216.
- [29] Nishimaru K, Eghbali M, Stefani E, et al. Function and clustered expression of MaxiK channels in cerebral myocytes remain intact with aging[J]. *Exp Gerontol*, 2004, 39: 831-839.
- [30] Lopez-Otin C, Blasco MA, Partridge L, et al. The hallmarks of aging[J]. *Cell*, 2013, 153: 1194-1217.
- [31] Jones MJ, Goodman SJ, Kobor MS. DNA methylation and healthy human aging[J]. *Aging Cell*, 2015, 14: 924-932.
- (此文编辑 文玉珊)