

## 有氧运动抑制高血压大鼠肠系膜动脉 CaCCs 通道蛋白 TMEM16A 表达上调

葛未未, 单美玲, 陈 渝, 彭佳乐, 李 丽, 石丽君

(北京体育大学运动人体科学学院, 北京市 100084)

[关键词] 有氧运动; TMEM16A 蛋白; 血管张力; CaCCs 通道; 高血压; 血管平滑肌细胞

[摘要] 目的 探究有氧运动对高血压大鼠肠系膜动脉血管钙激活氯离子通道(CaCCs)蛋白 TMEM16A 的表达及血管张力的影响。方法 正常血压大鼠(WKY)随机分为正常运动组(WKY-EX)和正常安静组(WKY-SED);自发性高血压大鼠(SHR)随机分为高血压运动组(SHR-EX)和高血压安静组(SHR-SED)。运动组进行 12 周跑台运动(20 m/min, 60 min/d, 5 d/w, 12 w)。12 周有氧运动后,取各组大鼠的肠系膜动脉(3 级)进行形态学观察、离体微血管张力测定及蛋白免疫印迹分析 TMEM16A 蛋白。结果 高血压安静组大鼠心率(HR)和收缩压(SBP)水平较正常安静组显著增加( $P<0.05$ ),而 12 周有氧运动可显著降低 SHR 大鼠的体质量(BW)、HR、SBP 水平( $P<0.05$ )。高血压安静组大鼠肠系膜动脉血管平滑肌层厚度较正常安静组明显增加,而 12 周有氧运动可下调 SHR 大鼠的肠系膜动脉血管平滑肌层厚度。高血压安静组大鼠肠系膜动脉对去甲肾上腺素(NE)诱导的张力反应较正常安静组显著增加( $P<0.05$ ),而 12 周有氧运动可显著降低 SHR 大鼠肠系膜动脉对 NE 诱导的张力反应。高血压安静组大鼠肠系膜动脉对特异性 CaCCs 蛋白阻断剂(T16Ainh-A01)的敏感性较正常安静组显著增加( $P<0.05$ ),而 12 周有氧运动可显著降低 SHR 大鼠肠系膜动脉对此药物的敏感性( $P<0.05$ )。高血压安静组大鼠肠系膜动脉中 CaCCs 通道蛋白 TMEM16A 的表达水平较正常安静组显著增加( $P<0.05$ ),而 12 周有氧运动可显著降低 SHR 大鼠肠系膜动脉中 CaCCs 通道蛋白 TMEM16A 的表达水平( $P<0.05$ )。结论 有氧运动可有效下调 SHR 大鼠血压,下调 CaCCs 通道蛋白 TMEM16A 表达,抑制高血压诱导的 CaCCs 通道的病理性代偿,从而引起血管功能的改善。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

### Aerobic exercise suppresses the upregulation of CaCCs channel protein TMEM16A expression in mesenteric artery of hypertensive rats

GE Weiwei, SHAN Meiling, CHEN Yu, PENG Jiale, LI Li, SHI Lijun

(Sport Science College, Beijing Sport University, Beijing 100084, China)

[KEY WORDS] aerobic exercise; TMEM16A protein; vascular tension; CaCCs channel; hypertension; vascular smooth muscle cell

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the aerobic exercise-induced expression and vascular tone regulation of calcium-activated chloride channel (CaCCs) protein TMEM16A in mesenteric arteries of hypertensive rats. **Methods** The normotensive rats (WKY) were randomly divided into exercise group (WKY-EX) and sedentary group (WKY-SED). The spontaneously hypertensive rats (SHR) were also randomly divided into aerobic exercise group (SHR-EX) and sedentary group (SHR-SED). After one week acclimation, rats in the exercise groups were subjected to treadmill training (20 m/min, 60 min/d, 5 d/w, 12 w). After 12 weeks, mesenteric arteries (the 3rd branches) were collected for morphological observation, in vitro vascular tension determination and protein immunoblot analysis of protein TMEM16A. **Results** Compared with WKY-SED, the body weight, heart rate, and systolic blood pressure were significantly increased in hypertension ( $P<0.05$ ). However, they significantly dropped in SHR-EX group compared with its sedentary group (SHR-SED,  $P<0.05$ ). The thickness of the middle longer of the mesenteric artery in hypertensive rats was markedly increased,

[收稿日期] 2019-09-10

[修回日期] 2019-12-03

[基金项目] 国家自然科学基金项目资助(31771312)

[作者简介] 葛未未, 硕士研究生, 研究方向为运动与心血管生理学, E-mail 为 geweiwei34440@126.com。通信作者石丽君, 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 shilj@bsu.edu.cn。

but it effectively decreased in SHR-EX compared with SHR-SED. The norepinephrine (NE) induced a marked increase of vascular tension in mesenteric arteries in all four groups, which was significantly higher in SHR-SED than that in WKY-SED ( $P < 0.05$ ). Selective CaCCs channel blocker (T16Ainh-A01) induced concentration-dependent vasorelaxation in mesenteric arteries precontracted with norepinephrine. However, these effects were greatly decreased in SHR-EX group ( $P < 0.05$ ). Western blotting data showed that the protein expression of TMEM16A was significantly increased with hypertension, whereas aerobic exercise could effectively ameliorate the changes ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Hypertension is associated with an increase of CaCCs channel protein TMEM16A expression, which is a negative feedback to regulate vascular contractility, whereas aerobic exercise can significantly weaken this hypertension-associated pathological upregulation of CaCCs channels to improve the vascular function.

高血压是由多种诱发因素相互作用引起的慢性疾病,被称为是心、脑、肾和血管等多种疾病的第一危险因素<sup>[1]</sup>。血管的张力增大、血管壁变厚、血流通道的缩小、血管弹性的下降等可能是慢性高血压的发病诱因<sup>[2]</sup>。当高血压发生时,在肠系膜动脉血管中内皮依赖型的血管收缩功能受损,管腔内压力持续增大,导致血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)产生病理性变化。这可能与肠系膜动脉中的离子通道重构密切相关,其中钙激活氯离子通道(calcium-activated chloride channels, CaCCs)在信号转导的过程中扮演着重要的角色。心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  增多会激活细胞膜上的 CaCCs,在快速复极化的早期阶段,产生瞬时外向钙激活的  $\text{Cl}^-$  电流(氯离子流入),从而加速复极过程,缩短心肌细胞动作电位的时间进程,加快心率<sup>[3-6]</sup>。在 VSMC 上激活细胞膜上的 CaCCs 便会引起  $\text{Cl}^-$  内流,导致细胞膜去极化,引起电压依赖性钙通道开放,最终导致血管平滑肌收缩<sup>[7-10]</sup>。高血压导致血管平滑肌层结构变厚、内膜迁移,而有氧运动可以改善这种高血压引起的血管平滑肌病理性变化,但其改善的机制目前还不清楚。

TMEM16A(transmembrane protein 16A, TMEM16A)是 CaCCs 的主要分子结构,其氨基和羧基均在质膜内,并由 8 个跨膜结构域组成,第 5、6 跨膜结构域可构成折返环以反插入质膜内,利于形成通道孔;其中 a、b、c、d 等 4 个可剪切片段分别对应着不同长度氨基酸<sup>[11]</sup>。在哺乳动物(BALB/c 小鼠)<sup>[12]</sup>中发现 TMEM16A 在肠系膜动脉平滑肌细胞,肺动脉平滑肌细胞等中表达<sup>[1,13]</sup>。在 VSMC 的不同部位, TMEM16A 的表达位置不相同,有些主要在细胞中表达,有的则主要在细胞膜上表达,这可能与不同的生理作用有关<sup>[14]</sup>。研究表明,野百合碱介导的肺动脉高压和低氧性肺动脉高压大鼠中发现 TMEM16A 表达增加导致  $\text{I}_{\text{Cl,Ca}}$  密度和活动显著增加,致使肺动脉收缩力以及对特异性 CaCCs 蛋白阻

断剂(T16Ainh-A01)的敏感性比正常值高<sup>[15-16]</sup>。大量研究表明有氧运动作为非药物性物理疗法对多种疾病具有改善作用。本实验室前期研究表明,长期规律的有氧运动可以使动脉血管产生良好的适应性。但是, CaCCs 通道蛋白 TMEM16A 在有氧运动调控高血压大鼠肠系膜动脉血管张力中的作用还不明确。因此,本研究在前期研究的基础上,探究 CaCCs 通道蛋白 TMEM16A 在有氧运动调控高血压大鼠肠系膜动脉血管张力中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂和溶液

Anti-Anoctamin-1 (extracellular) CaCCs 购自 AlomoneLabs(以色列);去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、Hepes、T16Ainh-A01、EDTA、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 均购自美国 Sigma 公司。Krebs 溶液(mmole/L): 131.5 NaCl、5 KCl、13.5  $\text{NaHCO}_3$ 、1.2  $\text{MgCl}_2$ 、11.2 葡萄糖、1.2  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、2.5  $\text{CaCl}_2$ 、0.025 EDTA; pH = 7.4, 持续充 95%  $\text{O}_2$ -5%  $\text{CO}_2$  的混合气体。4% 多聚甲醛磷酸缓冲液:称 40 g 多聚甲醛和 500 mL 0.1 mol/L PBS, 将二者混匀并加热至 60  $^{\circ}\text{C}$ , 滴加 NaOH(1 mol/L), 边滴加边搅拌, 至溶液清晰后停止滴加, 冷却后, 用 PBS(0.1 mol/L)定容为 1 L。电泳缓冲液: SDS 1 g、甘氨酸 14.41 g、Tris 3.03 g、双蒸水溶解后定容为 1 L, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。转膜缓冲液: 甘氨酸 14.41 g、Tris 3.03 g、无水甲醇 200 mL, 用双蒸水定容为 1 L 并 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.2 动物和训练方案

本实验选取 3 月龄雄性正常血压大鼠(WKY) 24 只, 随机均分为正常运动组(WKY-EX)和正常安静组(WKY-SED); 自发性高血压大鼠(SHR) 24 只, 随机均分为高血压运动组(SHR-EX)和高血压安静组(SHR-SED)。实验动物购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号为 SCXK(京)2013-

0001,于北京体育大学动物饲养室内饲养。各组大鼠均用国家标准啮齿类动物常规饲料进行喂养,并自由饮食。动物实验的处理方法符合北京体育大学动物福利伦理委员会的相关规定。高血压安静组和正常安静组大鼠不进行任何运动干预;高血压运动组和正常运动组大鼠先进行一周适应性训练:第1~2天,坡度为0度,10 m/min,10 min/d;第3~5天,坡度为0度,15 m/min,30 min/d。正式训练方案:坡度为0度,20 m/min,60 min/d,5 d/w,共12 w。其运动强度为 $VO_2\max$ 的55%~65%<sup>[17]</sup>。

### 1.3 大鼠血压和心率的测定

全自动智能无创大鼠血压测试仪(BP-2010A购自Beijing Soft Biotechnology Co,Ltd)测量各组大鼠的体质量(BW)、心率(HR)和收缩压(SBP)。

### 1.4 HE染色

通过大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,并取肠系膜动脉于4℃Na-HEPES缓冲液中剥离脂肪组织,放入4%多聚甲醛溶液中进行4℃固定12 h,流水冲12 h。脱水透明:依次以70%乙醇、70%乙醇、75%乙醇、80%乙醇、85%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、95%乙醇、100%乙醇、100%乙醇进行脱水处理,每次20 min。二甲苯中进行40 min透明处理。包埋:将组织放入溶化的石蜡中进行包埋。切片与烤片:切片厚度4 μm,37℃水浴锅中展片。60℃烤箱烤片2 h。脱蜡与水化:切片在二甲苯中进行20 min脱蜡。进行梯度乙醇(100%-100%-95%-90%-80%-70%-70%,5 min/次)处理。染色:苏木精染色3 min,并流水冲洗到无蓝色液体时,放入75%盐酸乙醇中分化,伊红染色2 min。脱水透明:70%乙醇脱水,梯度增加至100%乙醇,二甲苯进行两次透明处理。封片:滴加封片剂(中性树脂封片剂)于组织上,用盖玻片封片,晾干后拍片。

### 1.5 离体微血管环张力测定

选取大鼠肠系膜动脉(3级分支)用作血管环张力测试。大鼠腹腔麻醉并取肠系膜动脉放于4℃Na-Hepes缓冲液中。在解剖显微镜下去除黏附在动脉上的残留血液和脂肪结缔组织。把肠系膜动脉的3级分支剪切成2 mm动脉血管环,并测量其张力。加入60 mmol/L KCl以刺激血管预收缩(消除各组大鼠微血管环的差异),待血管张力达到平台时记录其张力为100% $KCl_{\max}$ ,后续实验中分别给予去甲肾上腺素(NE,  $10^{-5}$  mol/L)、T16Ainh-A01( $10^{-9}$ ~ $10^{-5}$  mol/L)刺激血管环,观察各组肠系膜动脉血管环张力的反应性。

### 1.6 Western Blot 定量分析蛋白 TMEM16A

Western Blot 免疫印迹定量分析蛋白 TMEM16A。腹腔麻醉后,取肠系膜动脉,剔除脂肪后立刻液氮暂存,随后超低温冰箱(-80℃)保存。对肠系膜动脉组织研磨,称取100 mg,加入裂解液RIPA(500 μL),冰水浴中匀浆1 min。将均浆液放置于4℃摇床上1 h,离心30 min,转速为13 000 r/min,并取上清液。BCA(Thermo Scientific Pierce 公司,USA)试剂盒测试上清液中蛋白浓度以确定提取蛋白浓度。用缓冲液和生理盐水(样品比例一定)稀释上清液。制备电泳缓冲液,聚丙烯酰胺凝胶,根据蛋白浓度调整上样量,每孔上样保持40~50 μg。先90 V电压电泳,等蛋白样品电泳到分离胶之后改成120 V。转膜(TMEM16A蛋白250 mA恒流50 min)、5%BSA封闭2 h。加一抗,用BSA稀释一抗Anti-Anoctamin-1(CaCCs),1:300;4℃冰箱过夜,第2天室温摇床1 h,随后TBST洗3次,每次10 min,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔(二抗)IgG(1:8 000)孵育1 h。TBST洗3次,每次10 min。Chemi-DocXRS+系统成像,并以Image Lab软件进行灰度值分析。

### 1.7 统计学分析

用SPSS17.0对实验数据进行双因素方差分析。实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为差异有显著性。用Image J对肠系膜3级动脉血管HE染色图片进行分析,用Image Lab对蛋白免疫印迹条带灰度值进行分析,用Graph Pad Prism 5作柱状统计图。

## 2 结果

### 2.1 有氧运动对大鼠体质量、心率、收缩压的影响

高血压安静组大鼠HR和SBP水平较正常安静组显著增加( $P<0.05$ ),而12周有氧运动可显著降低SHR大鼠的BW、HR、SBP水平( $P<0.05$ )。此外,12周有氧运动可显著降低WKY大鼠的BW、SBP水平( $P<0.05$ )。在干预前后随着年龄的增长正常安静组大鼠的HR和SBP水平也有著性增加( $P<0.05$ ),但有氧运动可以抑制此增龄性变化(表1)。

### 2.2 有氧运动对SHR大鼠肠系膜动脉形态结构的影响

高血压安静组大鼠的肠系膜动脉血管平滑肌层厚度较正常安静组具有明显的增加,而12周有氧运动可改善此变化(图1)。

表 1. 各组大鼠基础指标的比较

Table 1. Basic indicators of rats in each group

分组	BW (g)		HR (次/分)		SBP (mmHg)	
	干预前	干预后	干预前	干预后	干预前	干预后
正常安静组 (WKY-SED)	263±20	375±27 <sup>c</sup>	357±23	366±25	144±13	156±12
正常运动组 (WKY-EX)	271±13	354±18 <sup>ac</sup>	355±27	341±30	149±8	132±14 <sup>a</sup>
高血压安静组 (SHR-SED)	267±13	376±27 <sup>c</sup>	431±10 <sup>a</sup>	461±24 <sup>a</sup>	209±14 <sup>a</sup>	222±11 <sup>ac</sup>
高血压运动组 (SHR-EX)	273±8	344±19 <sup>bc</sup>	435±35	425±13 <sup>b</sup>	207±11	196±18 <sup>bc</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与正常安静组 (WKY-SED) 比较; b 为  $P<0.05$ , 与高血压安静组 (SHR-SED) 比较; c 为  $P<0.05$ , 与干预前比较。

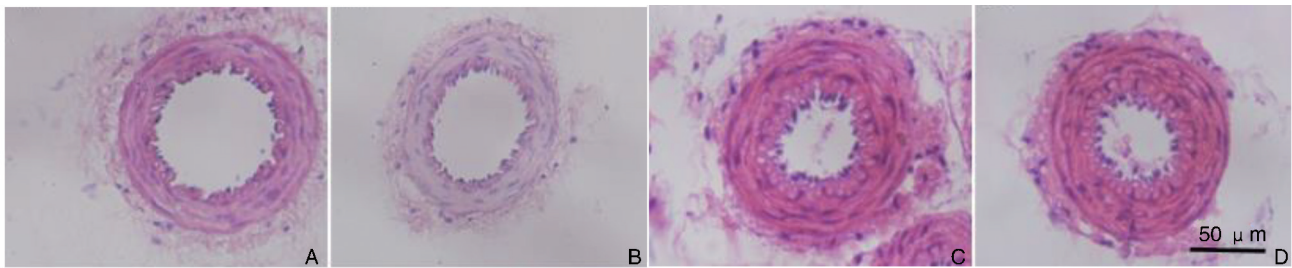


图 1. 各组肠系膜动脉血管结构 ( $n=6$ ) 红色为伊红染液染细胞质, 蓝色为苏木精染液染细胞核。A、B、C、D 依次为正常安静组、正常运动组、高血压安静组和高血压运动组。

Figure 1. The structure of mesenteric artery in each group (HE staining  $n=6$ )

### 2.3 有氧运动对 SHR 肠系膜动脉血管张力反应性的影响

#### 2.3.1 对 KCl 诱发的肠系膜动脉收缩反应的影响

KCl 可诱导血管产生收缩反应, 本实验检测各

组大鼠肠系膜动脉对 KCl (60 mmol/L) 诱导的张力反应。然而各组大鼠的肠系膜动脉对 KCl 诱导的张力反应差异并无显著性, 提示高血压和有氧运动并不改变 KCl 诱发的肠系膜动脉收缩反应 (图 2)。

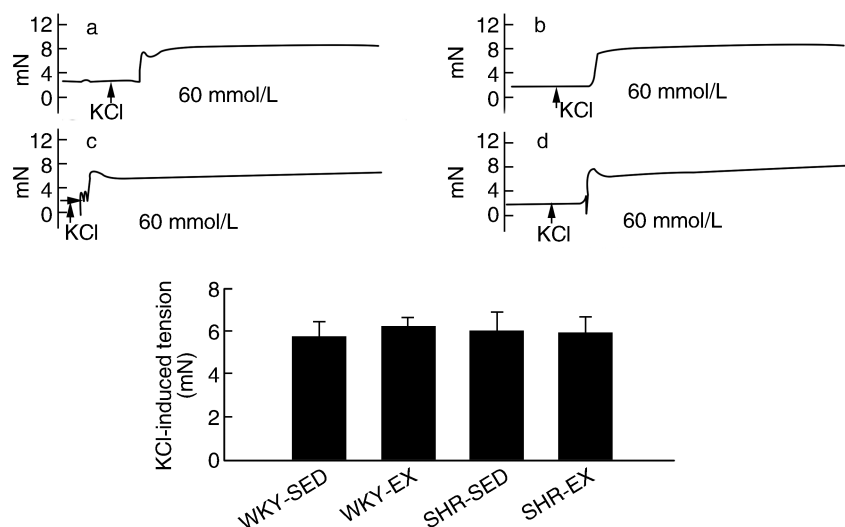


图 2. 各组大鼠肠系膜动脉对 KCl (60 mmol/L) 诱导的张力反应 ( $n=6$ ) a、b、c、d 依次为正常安静组 (WKY-SED)、正常运动组 (WKY-EX)、高血压安静组 (SHR-SED) 和高血压运动组 (SHR-EX)。

Figure 2. Tension response induced by KCl (60 mmol/L) in the mesenteric artery in each group ( $n=6$ )

#### 2.3.2 有氧运动对去甲肾上腺素 (NE) 诱发的肠系

膜动脉收缩反应的影响

NE 可诱导血管产生收



缩反应,本实验检测各组大鼠肠系膜动脉对 NE 诱导的张力反应。然而,由于血管内皮一氧化氮合酶(eNOS)对 NE 诱导的血管反应会产生影响,为避免这种影响,本实验中在加入 NE 之前,各组肠系膜动脉均先孵育 eNOS 阻滞剂(L-NAME) 20 min。研究发现加入 L-NAME 孵育后,血管对 NE 诱导的收缩反应增强,提示内皮 eNOS 能够减弱 NE 诱导的血管收缩反应。此外,高血压安静组大鼠肠系膜动脉对 NE 反应较正常安静组显著增加( $P<0.05$ ),而 12 周有氧运动可显著降低 SHR 大鼠肠系膜动脉对 NE 的反应(图 3 和 4)。

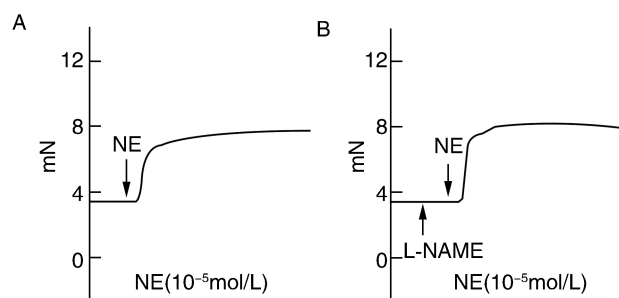


图 3. L-NAME 对 NE 诱导的血管张力的影响( $n=6$ ) A 为未加 L-NAME;B 为加 L-NAME 后。

Figure 3. Effect of L-NAME on the vascular tension induced by NE( $n=6$ )

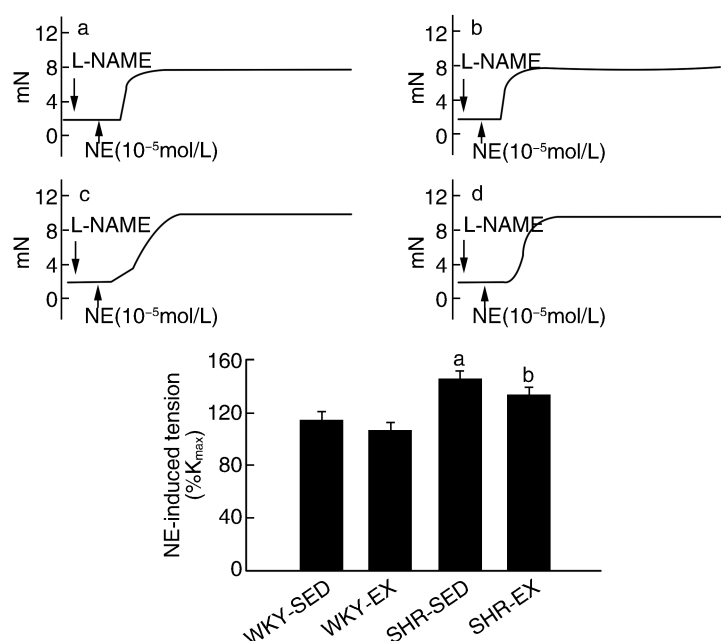


图 4. 各组大鼠肠系膜动脉对 NE( $10^{-5}$  mol/L) 的收缩反应( $n=6$ ) a、b、c、d 依次为正常安静组、正常运动组、高血压安静组和高血压运动组。a 为  $P<0.05$ ,与正常安静组(WKY-SED)比较;b 为  $P<0.05$ ,与高血压安静组(SHR-SED)比较。

Figure 4. Contraction reaction of the mesenteric artery to NE ( $10^{-5}$  mol/L) in each group of rats( $n=6$ )

**2.3.3 有氧运动对 T16 Ainh-A01 诱发的肠系膜动脉收缩反应的影响** 观察血管张力的变化并选取各组结果中具有代表性的收缩舒张图(图 5),其肠系膜微动脉舒张百分率(% NE)随 T16 Ainh-A01 浓度的升高而增加。使用 GraphPad Prism 5.0 剂量浓度-反应非线性回归曲线计算  $EC_{50}$ (图 6)。 $pIC_{50}$  是  $EC_{50}$  的负对数, $pIC_{50}$  的值表示微血管对所用药物的敏感性,其值越大表明其对药物的敏感性越大。各组大鼠的肠系膜动脉由 T16 Ainh-A01 诱发的血管  $pIC_{50}$  分别是正常安静组  $5.65 \pm 0.32$ 、正常运动组  $6.23 \pm 0.20$ 、高血压安静组  $7.68 \pm 0.12$ 、高血压运动组  $7.30 \pm 0.22$ 。高血压安静组大鼠肠系膜动脉

对药物的敏感性较正常安静组显著增加( $P<0.05$ ),而 12 周有氧运动可显著降低 SHR 大鼠肠系膜动脉对药物的敏感性( $P<0.05$ );对于正常大鼠来说有氧运动可以使肠系膜动脉对药物的敏感性适当提高。

## 2.4 有氧运动对肠系膜动脉 CaCCs 通道蛋白 TMEM16A 表达的影响

高血压安静组大鼠肠系膜动脉中 CaCCs 通道蛋白 TMEM16A 的表达水平较正常安静组显著增加( $P<0.05$ ),而 12 周有氧运动可显著降低 SHR 大鼠肠系膜动脉中 CaCCs 通道蛋白 TMEM16A 的表达水平( $P<0.05$ ,图 7)。

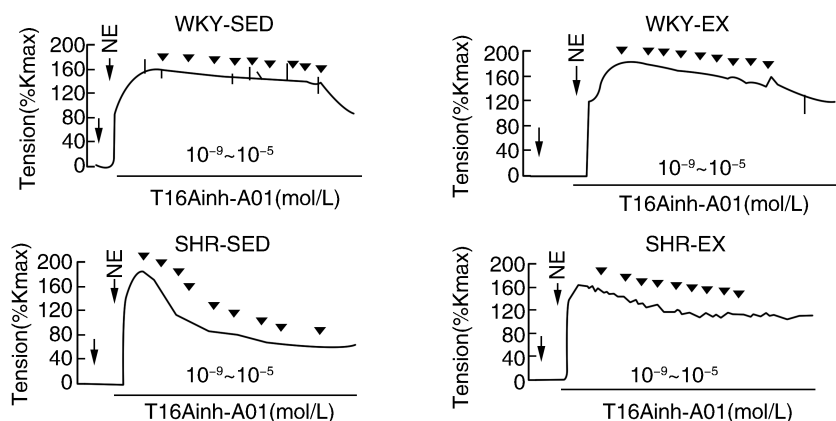


图 5. 各组大鼠肠系膜动脉对 T16 Ainh-A01 的张力反应 ( $n=6$ ) 虚箭头为加入 L-NAME 的时间, 箭头表示 NE 预刺激, 倒三角形为不同浓度 T16Ainh-A01 ( $10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $3 \times 10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-6}$  和  $10^{-5}$  mol/L) 的加入时间。

Figure 5. Tension response of mesenteric artery to T16 Ainh-A01 in each group ( $n=6$ )

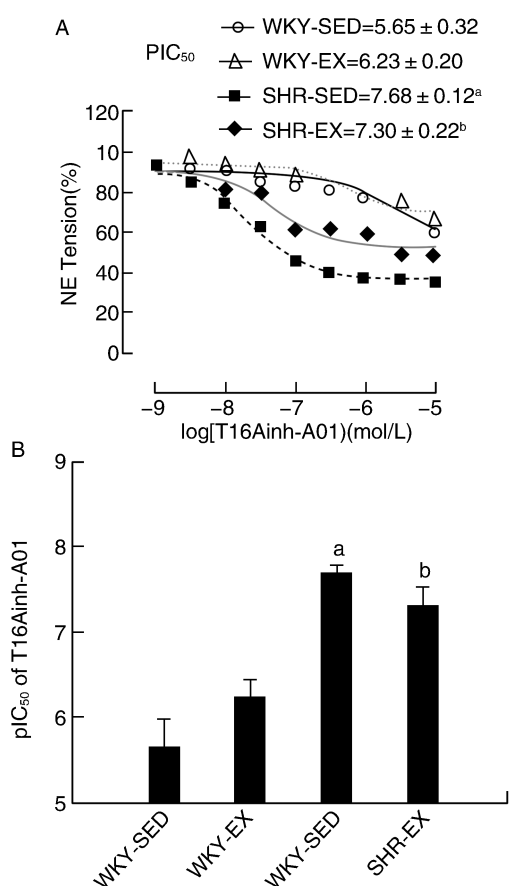


图 6. 半对数浓度递增的 T16Ainh-A01 抑制 NE 收缩的剂量反应曲线 ( $n=6$ ) A 为大鼠肠系膜动脉对 T16Ainh-A01 (浓度梯度为  $10^{-9}$ 、 $3 \times 10^{-9}$ 、 $10^{-8}$ 、 $3 \times 10^{-8}$ 、 $10^{-7}$ 、 $3 \times 10^{-7}$ 、 $10^{-6}$ 、 $3 \times 10^{-6}$  和  $10^{-5}$  mol/L) 的药物敏感性曲线; B 为大鼠肠系膜动脉对 T16Ainh-A01 敏感性的柱状图。a 为  $P < 0.05$ , 与正常安静组 (WKY-SED) 比较; b 为  $P < 0.05$ , 与高血压安静组 (SHR-SED) 比较。

Figure 6. Dose response inhibition of T16Ainh-A01 on the NE-induced contraction with its increasing semilogarithmic concentration ( $n=6$ )

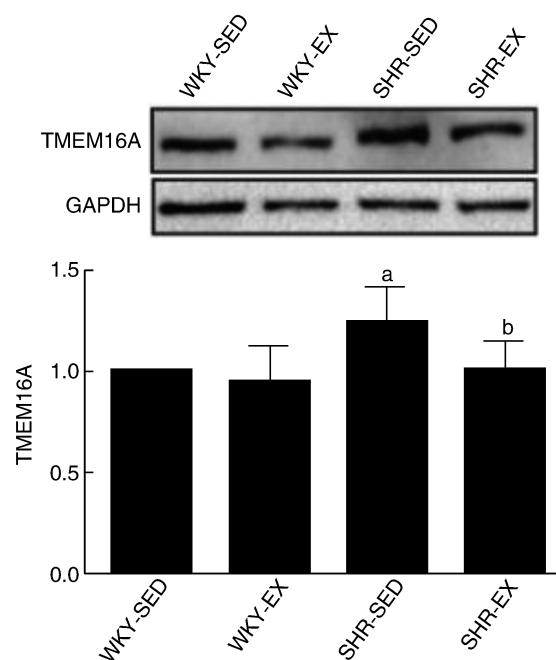


图 7. TMEM16A 蛋白表达量 ( $n=6$ ) a 为  $P < 0.05$ , 与正常安静组 (WKY-SED) 比较; b 为  $P < 0.05$ , 与高血压安静组 (SHR-SED) 比较。

Figure 7. Expression of TMEM16A protein ( $n=6$ )

### 3 讨论

血管的形态结构和功能会在血流动力学和体液因素的影响下发生适应性改变。高血压发生时血管张力持续增加, 血管内皮结构和功能发生病理性改变, 管壁硬度增加、弹性下降, 严重时管壁增厚, 管腔变窄, 甚至内膜出现钙化和脂类物质沉积, 堵塞血管。而正常血压的动脉血管管壁光滑且富有弹性、血流速度畅通, 血管的舒缩功能良好。在本实验中, 高血压大鼠的收缩压、体质量和心率明

显高于正常血压大鼠,且高血压大鼠的形态学观察显示,高血压大鼠的肠系膜动脉血管结构发生了中层增厚、管腔变窄的变化。血管表型的转换是导致高血压大鼠血管平滑肌层增厚、管腔狭窄的重要原因之一。血管结构的改变影响血管功能,这与本研究高血压大鼠肠系膜动脉对 NE 的收缩反应增加和药物敏感性增加结果一致。有氧运动能够缓解高血压引起的血管结构改变,这可能与运动改变血管平滑肌细胞表型相关。经过 12 周的运动后发现,高血压诱导的大鼠收缩压和心率的升高得到了明显的抑制,而且体质量也得到了降低。同时大鼠的肠系膜动脉血管结构也得到了明显的改善。这表明高血压在没有运动干预的情况下,会随着年龄的增长而恶化,血管结构也会随之发生退行性病变。而有氧运动可以延缓动脉血管结构衰老,抑制血压的增龄性增长。

正常血压动脉血管舒缩功能良好,对药物的敏感性是处在生理功能的正常水平,而高血压动脉血管因舒缩功能的退行性病变,使其对药物的敏感性处在生理功能的非正常水平。T16Ainh-A01 作为 CaCCs/TMEM16A 通道的特异性阻断剂,对 CaCCs/TMEM16A 的  $\text{Cl}^-$  能明显抑制且不干扰细胞信号通路上游的  $\text{Ca}^{2+}$ 。T16Ainh-A01 能够减弱 PE 诱导的胞内钙荧光信号强度,抑制 CaCCs/TMEM16A 活性,降低 VSMCs 胞内  $\text{Ca}^{2+}$  来引起血管舒张<sup>[17]</sup>。NE 作为血管的收缩剂,可以诱发动脉血管收缩。高浓度的 KCl 溶液可以引起血管平滑肌的收缩,导致血管的外周阻力增大并升高血压。eNOS 在有氧运动的干预下表达增多,内皮细胞受刺激后会生成更多 NO,增强血管舒张功能<sup>[18]</sup>,即肠系膜动脉的 eNOS 生物利用率<sup>[19]</sup>可以在有氧运动的干预下提高。关于有氧运动对 VSMCs 的影响,需用 L-NAME 处理以排除内皮功能干扰,然后才能测定血管张力。本实验中血管环研究结果表明,相比于正常安静组大鼠,高血压组大鼠肠系膜动脉血管对药物的敏感性显著升高(对 NE 和 T16Ainh-A01 更敏感),但经过 12 周有氧运动后,高血压大鼠肠系膜动脉血管对药物的敏感性显著降低。表明长期规律的有氧运动可以抑制高血压诱导的大鼠肠系膜动脉血管对药物的敏感性,并有助于恢复血管的生理功能。对于 WKY 来说有氧运动可以使肠系膜动脉对药物的敏感性适当提高。SHR 对 NE 诱导的肠系膜动脉收缩性明显高于 WKY,这可能与高血压上调血管平滑肌  $\alpha 1$  肾上腺素能受体有关<sup>[20]</sup>。T16Ainh-A01 可显著抑制 NE 诱导的大鼠肠系膜动脉环收缩,并呈浓度

依赖性。SHR 肠系膜动脉环对 T16Ainh-A01 的药物敏感性较 WKY 大鼠显著增加,这表明 TMEM16A 在 SHR 大鼠肠系膜动脉中的表达高于 WKY,与本研究的蛋白结果相一致。

在动脉血管中,当 CaCCs 被激活打开时,氯离子外流,细胞膜发生去极化,细胞膜的去极化可进一步激活细胞膜上的电压依赖型钙通道,从而引起钙离子内流;钙离子与钙调蛋白结合,诱发肌丝滑行,导致血管平滑肌收缩。也就是说,VSMCs 膜上的 CaCCs 可以通过 VDCCs 来调节增加细胞内钙的浓度,诱导血管收缩,使血管壁的张力增加,从而参与调节人体的动脉血压。高血压会增强 CaCCs 通道在维持血管基础张力中的作用,使 VSMCs 收缩性增加。这可能与 CaCCs 通道的主要蛋白 TMEM16A 表达有关。在本研究中相比于正常血压大鼠,高血压大鼠的 TMEM16A 蛋白表达值明显升高,12 周有氧运动后,这种增高明显得到了抑制。可见高血压可以诱发肠系膜动脉中 CaCCs 的蛋白 TMEM16A 表达上调,有氧运动可抑制这种表达上调。同时有氧运动也可以抑制因年龄增加而诱导的 TMEM16A 蛋白表达上调。研究结果发现,CaCCs 通道的代偿性可以因高血压的作用而升高,但是,长期规律的有氧运动可以缓解因高血压而致使的 CaCCs 通道的代偿性增加,调节 CaCCs 通道重构。

在本实验的研究中,对高血压安静组、高血压运动组以及正常安静组和正常运动组的肠系膜动脉的 CaCCs 结构和功能进行了功能、结构和分子水平的研究。本实验研究发现,CaCCs 通道在高血压大鼠的肠系膜动脉血管基础张力中的作用是增加的,这可能是 CaCCs 通道的病理性代偿的结果,但是有氧运动可以抑制这种病理代偿。从形态学观察可知,高血压导致大鼠肠系膜动脉血管平滑肌层增厚,管腔变窄,实验室前期研究发现高血压大鼠血管平滑肌发生表型转换,由收缩表型向合成表型转换,引起血管平滑肌细胞增殖和迁移<sup>[21]</sup>。然而长期规律的有氧运动可抑制此变化。同时有氧运动也可使大鼠肠系膜动脉血管壁增厚的速率减慢,延缓动脉管壁结构的衰老<sup>[20]</sup>。从细胞分子水平上看,有氧运动能够抑制高血压病诱导的 CaCCs 通道的主要结构蛋白 TMEM16A 表达上调趋势,来调节 CaCCs 通道功能。同时也为有氧运动改善肠系膜动脉血管结构和功能提供了依据。在本次实验中,我们发现有氧运动可以对 SHR 肠系膜动脉血管平滑肌细胞 CaCCs 离子通道的调节产生有利作用,这是本研究的创新之处。

有氧运动可有效下调 SHR 大鼠的血压,下调 CaCCs 通道蛋白 TMEM16A 的表达,抑制高血压诱导的 CaCCs 通道的病理性代偿,从而引起血管功能改善。

#### [参考文献]

- [1] Manoury B, Tamuleviciute A, Tammaro P. TMEM16A/anoctamin 1 protein mediates calcium-activated chloride currents in pulmonary arterial smooth muscle cells[J]. J Physiol, 2010, 588(13): 2305-2314.
- [2] 徐岩,张亚菲. 有氧运动对高血压患者的影响[J]. 体育世界, 2012, 12: 136-137.
- [3] Stephan AB, Shum EY, Hirsh S, et al. ANO2 is the cilia calcium-activated chloride channel that may mediate olfactory amplification[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(28): 11776-11781.
- [4] Stöhr H, Heisig JB, Benz PM, et al. TMEM16B, a novel protein with calcium-dependent chloride channel activity, associates with a presynaptic protein complex in photoreceptor terminals [J]. J Neurosci, 2009, 29(21): 6809-6818.
- [5] Sagheddu C, Boccaccio A, Dibattista M, et al. Calcium concentration jumps reveal dynamic ion selectivity of calcium-activated chloride currents in mouse olfactory sensory neurons and TMEM16b-transfected HEK 293T cells[J]. J Physiol, 2010, 588(21): 4189-4204.
- [6] Billig GM, Pál B, Fidzinski P, et al.  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  currents are dispensable for olfaction[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(6): 763-769.
- [7] Angermann JE, Forrest AS, Greenwood IA, et al. Activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels by store operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in arterial smooth muscle cells does not require reverse mode  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2012, 90(7): 903-921.
- [8] Wiwchar M, Ayon R, Greenwood IA, et al. Phosphorylation alters the pharmacology of  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels in rabbit pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. Br J Pharmacol, 2010, 158(5): 1356-1365.
- [9] 潘宣任,王凯,庞玉生. 钙激活性氯离子通道抑制剂对肺动脉平滑肌作用的研究进展? [J]. 重庆医学, 2015(26): 3699-3701.
- [10] 高尚邦,李臣鸿. 钙激活氯通道电生理特性及调节机制[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(1): 160-163.
- [11] Green DJ, Spence A, Halliwill JR, et al. Exercise and vascular adaptation in asymptomatic humans [J]. Exp Physiol, 2011, 96(2): 57-70.
- [12] Pedemonte N, Galletta LJ. Structure and function of TMEM16 proteins (anoctamins)[J]. Physiol Rev, 2014, 94(2): 419-459.
- [13] Niwa NI, Nerbonne JM. Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current ( $I_{\text{to}}$ ) expression and regulation [J]. Mol Cell Cardiol, 2010, 48(1): 12-25.
- [14] Caputo A, Caci E, Ferrera L, et al. TMEM16A, a membrane protein associated with calcium-dependent chloride channel activity [J]. Science, 2008, 322(5901): 590-594.
- [15] Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, et al. Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit[J]. Cell, 2008, 134(6): 1019-1029.
- [16] Yang YD, Cho H, Koo JY, et al. TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance [J]. Nature, 2008, 455(7217): 1210-1215.
- [17] Ferrera L, Caputo A, Ubbly I, et al. Regulation of TMEM16A chloride channel properties by alternative splicing[J]. J Biol Chem, 2009, 284(48): 33360-33368.
- [18] Davis AJ, Forrest AS, Jepps TA, et al. Expression profile and protein translation of TMEM16A in murine smooth muscle[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2010, 299(5): C948-C959.
- [19] Thomasgatewood C, Neeb ZP, Bulley S, et al. TMEM16A channels generate  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  currents in cerebral artery smooth muscle cells[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2011, 301(5): 1819-1827.
- [20] Wu MM, Lou J, Song BL, et al. Hypoxia augments the calcium-activated chloride current carried by anoctamin-1 in cardiac vascular endothelial cells of neonatal mice[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(15): 3680-3692.
- [21] Chen H. Role of thromboxane A2 signaling in endothelium dependent contractions of arteries [J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2018, 134: 32-37.

(此文编辑 朱雯霞)