

本文引用: 王欢, 苏晓敏, 杨雪峰, 等. 髓系细胞血管紧张素 1 型受体在盐敏感性高血压小鼠血管胰岛素抵抗和血管损伤中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(1): 41-48. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.01.006.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-01-0041-08

· 实验研究 ·

髓系细胞血管紧张素 1 型受体在盐敏感性高血压小鼠血管胰岛素抵抗和血管损伤中的作用

王欢¹, 苏晓敏¹, 杨雪峰², 卓坤萍¹, 徐茜¹, 周明生¹

(1. 沈阳医学院生理学教研室, 辽宁省沈阳市 110034; 2. 锦州医科大学生理学教研室, 辽宁省锦州市 121001)

[摘要] **[目的]** 探究髓系细胞血管紧张素 1 型受体(Myeloid AT1R)在盐敏感性高血压小鼠血管胰岛素抵抗和血管损伤中的作用。**[方法]** 采用左肾切除和去氧皮质酮乙酸酯(DOCA)缓释药片包埋术将 C57BL/6J 雄性小鼠(野生型, WT)和 Myeloid AT1R 敲除小鼠(Myeloid AT1R^{-/-})诱导为盐敏感性高血压小鼠模型, 随机分为 WT 组、DOCA 盐敏感性高血压组(简称 DOCA 组)、Myeloid AT1R^{-/-}组和 Myeloid AT1R^{-/-}/DOCA 组, 每组 8 只。采用尾套袖法测量小鼠收缩压, HE 染色观察主动脉壁厚度, 免疫荧光检测主动脉 F4/80(单核/巨噬细胞标志物), RT-PCR 和 Western blot 检测 AT1R、促炎细胞因子和胰岛素信号通路分子的 mRNA 和蛋白表达, 离体血管灌流系统测定乙酰胆碱和胰岛素介导的内皮依赖性血管舒张功能。**[结果]** 与 WT 组相比, DOCA 组收缩压升高 37%, 主动脉壁厚度增加 57%, 乙酰胆碱和胰岛素介导的内皮依赖性血管舒张功能分别下降 32% 和 36% ($P < 0.05$), 主动脉 F4/80 阳性细胞数量增多 195%, 单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、磷酸化 c-Jun 氨基端激酶(p-JNK)蛋白表达升高 42%、45%、32%, 胰岛素蛋白激酶 B(Akt)/内皮型一氧化氮合酶(eNOS)信号通路受损, p-Akt 和 p-eNOS 的蛋白表达水平下降均为 36% ($P < 0.05$)。敲除 Myeloid AT1R, 主动脉壁厚度降低 14%, F4/80 阳性细胞数减少 44%, 乙酰胆碱和胰岛素介导的内皮依赖性血管舒张功能增加 21% 和 17%, MCP-1、TNF- α 和 p-JNK 蛋白表达水平降低 52%、41% 和 17%, 可修复受损的胰岛素 PI3K/Akt/eNOS 信号通路, p-Akt 和 p-eNOS 的蛋白表达水平升高 48% 和 42% ($P < 0.05$), 但收缩压没有明显降低。**[结论]** 敲除 Myeloid AT1R 可减轻盐敏感性高血压引起的血管胰岛素抵抗和血管损伤, 其机制可能与抑制巨噬细胞在血管壁浸润引起的血管炎症有关。

[关键词] 血管紧张素 1 型受体; 盐敏感性高血压; 胰岛素抵抗; 巨噬细胞; 血管损伤

[中图分类号] R3; R5

[文献标识码] A

Role of myeloid angiotensin type 1 receptor in vascular insulin resistance and vascular injury in salt-sensitive hypertensive mice

WANG Huan¹, SU Xiaomin¹, YANG Xuefeng², ZHUO Kunping¹, XU Qian¹, ZHOU Mingsheng¹

(1. Department of Pathophysiology, Shenyang Medical College, Shenyang, Liaoning 110034, China; 2. Department of Pathophysiology, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of myeloid angiotensin type 1 receptor (Myeloid AT1R) in vascular insulin resistance and vascular injury in deoxycorticosterone acetate (DOCA)/salt-sensitive hypertensive mice. **Methods** C57BL/6J mice (wild type, WT) and Myeloid AT1R^{-/-} mice were randomly divided into WT group, DOCA/salt-sensitive hypertension group (DOCA group), Myeloid AT1R^{-/-} group and Myeloid AT1R^{-/-}/DOCA group, 8 in each group. DOCA/salt-sensitive hypertension was induced by left nephrectomy and DOCA sustained-release tablet implantation. Systolic blood pressure (SBP) was measured by tail cuff method. HE staining was used to observe aortic wall thickness, immunofluorescence was used to detect F4/80 (monocyte/macrophage marker) of aorta, RT-PCR and Western blot were used for mRNA and protein expressions of AT1R, proinflammatory factors and insulin signaling molecules. Acetylcholine or insulin-in-

[收稿日期] 2022-01-06

[修回日期] 2022-11-01

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81670384, 81970357); 沈阳医学院科学发展基金项目(20191031); 辽宁省科学技术计划项目(2019-ZD-0331); 沈阳医学院大学生科研立项项目(20198025)

[作者简介] 王欢, 硕士研究生, 研究方向为血管生物学, E-mail: 1277903305@qq.com。通信作者周明生, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为血管生物学, E-mail: zhoums1963@163.com。

duced endothelium-dependent vasodilation was determined by isolated vascular perfusion system. **Results** Compared with WT group, in DOCA group, systolic blood pressure increased by 37%, aortic wall thickness increased by 57%, acetylcholine or insulin-induced endothelium-dependent vasodilation decreased by 32% and 36% respectively ($P < 0.05$), the number of F4/80 positive cells increased by 195%, the protein expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and phosphorylated c-Jun N-terminal kinase (p-JNK) were significantly increased by 42%, 45% and 32% respectively, the protein expression of p-Akt and p-Enos decreased by 36% in the aorta of DOCA mice ($P < 0.05$). Specific knockout of myeloid AT1R, aortic thickness decreased by 14%, the number of F4/80 positive cells decreased by 44%, acetylcholine or insulin-induced endothelium-dependent vasodilation improved by 21% and 17% respectively, the protein expression of MCP-1, TNF- α and p-JNK decreased by 52%, 41% and 17% respectively, damaged insulin protein PI3K/Akt/eNOS signaling pathway was reversed, the protein expression of p-Akt and p-eNOS increased by 48% and 42% respectively ($P < 0.05$) without significant reduction in systolic blood pressure. **Conclusion** Knockout of Mye AT1R can reduce vascular insulin resistance and vascular injury caused by salt-sensitive hypertension, and its mechanism may be related to inhibition of vascular inflammation caused by macrophage infiltration in vascular wall.

[**KEY WORDS**] angiotensin type 1 receptor; salt-sensitive hypertension; insulin resistance; macrophage; vascular injury

高血压常伴有肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的异常激活^[1]。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是 RAS 中的一个重要活性成分,具有调节血压和维持水钠平衡的作用^[2]。此外,Ang II 通过与血管紧张素 1 型受体 (angiotensin type 1 receptor, AT1R) 结合产生众多生物学效应,如增加血管中还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶,诱导活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成,促炎症介质合成等,最终引起血管炎症反应、血管结构重塑和血管内皮功能障碍等^[3]。研究显示,应用 AT1R 受体拮抗剂可降低高血压患者和高血压动物的血压水平,并减轻高血压终末器官损伤^[4]。

众多研究者指出,慢性血管炎症是高血压的重要发病机制之一,其中以单核细胞和巨噬细胞介导的炎症反应为主^[5]。聚集在血管壁的巨噬细胞可产生多种炎症细胞因子,如肿瘤坏死 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等,可诱导氧化应激反应,引起血管炎症和血管损伤^[6]。研究发现,Ang II 是一种重要的促炎介质,Ang II 能增加巨噬细胞在血管壁聚集、浸润,诱导巨噬细胞释放炎症细胞因子,最终诱发高血压^[7]。AT1R 广泛分布于其他细胞或组织中,如免疫细胞、脑细胞或骨骼肌细胞^[5,8-9],其中免疫细胞介导的炎症反应在高血压的进展中发挥重要的作用^[10]。然而,目前尚不清楚免疫细胞中的 AT1R 是否参与高血压的发展。

在临床上,盐敏感性高血压常伴有胰岛素 (in-

ulin, Ins) 抵抗^[11]。胰岛素抵抗不仅发生在一些传统的胰岛素代谢组织,而且也发生在心脏血管等组织,其主要表现为损伤胰岛素诱导的血管舒张功能和胰岛素激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路,也被称为血管胰岛素抵抗^[12]。本研究组前期研究发现,在盐敏感性高血压大鼠中,选择性 AT1R 拮抗剂坎地沙坦或核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 抑制剂明显抑制血管炎症并改善血管胰岛素抵抗,其机制可能与 RAS 激活 NF- κ B 炎症信号通路有关^[13]。目前,关于髓系细胞 AT1R (Mye AT1R) 在高血压和血管胰岛素抵抗中的作用尚无文献报道。本研究通过构建 Mye AT1R 特异性敲除小鼠 (Mye AT1R^{-/-}) 和去氧皮质酮乙酸酯 (deoxycorticosterone acetate, DOCA) 盐敏感性高血压小鼠模型,旨在探索 Mye AT1R 在盐敏感性高血压血管损伤和血管胰岛素抵抗中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验试剂

DOCA 缓释片 (美国 Innovative Research of American 公司), HE 染色试剂盒 (北京索莱宝公司), BCA 试剂盒 (上海碧云天公司), PVDF 膜 (美国 Pall 公司), ECL 化学发光试剂盒 (南京诺唯赞公司), 胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate 1, IRS1)、c-Jun 氨基端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 和 AT1R 一抗 (美国 Santa Cruz Biotechnology 公司), 蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 一抗 (上海 Abmart 公司), 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide

synthase, eNOS) 一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司), 磷酸化 eNOS (phosphorylated eNOS, p-eNOS)、磷酸化 IRS1 (phosphorylated IRS1, p-IRS1) (ser307)、磷酸化 JNK (phosphorylated JNK, p-JNK) 及磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, p-Akt) 一抗(美国 Abcam 公司), GAPDH、F4/80 一抗和二抗(武汉 Proteintech 公司), 液体巯基乙酸盐培养基(青岛海博公司), 去甲肾上腺素、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)和胰岛素(美国 Sigma-Aldrich 公司), RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和荧光定量试剂盒(南京诺唯赞公司)。小鼠 AT1R、GAPDH 引物由上海生工生物工程公司合成。

1.2 实验动物及分组

由上海南方模式实验动物研究中心构建 flox AT1R(AT1R^{flox/flox}, 有完整的 AT1R 活性)和髓系细胞特异性 Cre 转基因(Lyz2^{Cre/Cre})小鼠, 两种小鼠杂交繁殖获得髓系细胞特异性 AT1R 去基因小鼠(AT1R^{flox/flox}Lyz2^{Cre/-}, 即 Mye AT1R^{-/-})。8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠, 野生型(wild type, WT), 购自辽宁长生生物公司, 体质量 20~22 g, 许可证号为 SCXK(辽)2019-0005。上述小鼠均饲养于沈阳医学院实验动物中心, SPF 级, 维持环境温度在(23±2) °C, 光/暗循环 12 h, 给予标准饲料喂养, 自由饮水。在适应性喂养 2 周后, 将小鼠随机分为四组:(1) WT 组($n=8$), 为 WT 小鼠经假手术处理;(2) DOCA/盐敏感性高血压组(简称 DOCA 组, $n=8$), 为 WT 小鼠经左肾切除且皮下埋入 DOCA 缓释药片;(3) Mye AT1R^{-/-}组($n=8$), 为 AT1R^{flox/flox}Lyz2^{Cre/-}小鼠行假手术处理;(4) Mye AT1R^{-/-}/DOCA 组($n=8$), 为 AT1R^{flox/flox}Lyz2^{Cre/-}小鼠经左肾切除且皮下埋入 DOCA 缓释药片。为了诱导盐敏感性高血压, 小鼠经吸入异氟烷麻醉后, 于脊柱左侧、第十二肋下缘消毒并作一长约 2 cm 的切口, 行左侧肾脏切除术, 同时于左侧肩胛区中部皮下植入 75 mg、60 天释放的 DOCA 缓释药片一枚。埋入 DOCA 缓释药片的小鼠饮用含 1% NaCl 和 0.2% KCl 的水 5 周, 其余组别饮用自来水;假手术组小鼠麻醉后于脊柱左侧、第十二肋下缘消毒并作一长约 2 cm 的切口, 无肾脏切除和 DOCA 缓释药片植入。研究结束时, 用戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉小鼠, 打开胸腔和腹腔, 分离主动脉, 并保存于-80 °C 冰箱中备用。

1.3 腹腔巨噬细胞的分离和培养

小鼠腹腔注射 2 mL 液体巯基乙酸盐培养基诱导腹膜炎。3 天后颈椎脱臼法处死小鼠, 剪开皮肤暴露腹膜。腹腔注射 5 mL 预冷的 1640 培养基, 轻

揉小鼠腹部 5 min, 用注射器回抽腹腔灌洗液。将灌洗液于 4 °C、1 000 r/min 离心 8 min, 弃上清。用含 20% 胎牛血清的 1640 培养基重悬细胞, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中过夜。

1.4 血压测量

在安静环境下采用尾袖法测量清醒状态小鼠的尾动脉收缩压。在进行正式实验前, 每天测量小鼠尾动脉收缩压进行适应性训练, 持续 5 天。在埋入 DOCA 缓释药片前以及在治疗过程中每周测量一次收缩压, 直到实验结束, 记录至少 5 次血压连续读数, 每次测量结果取平均值。

1.5 HE 染色

取出胸主动脉放入预冷的含有肝素的 PBS 中, 洗净残余血液。石蜡包埋后取 4 μm 的石蜡切片进行 HE 染色。每组选取 8 个样本, 普通光学显微镜下观察各组主动脉形态变化, 用 Image J 软件统计分析血管壁厚度。

1.6 主动脉舒张功能检测

以 1% 戊巴比妥钠(100 mg/kg)麻醉小鼠, 开胸后分离主动脉, 将主动脉切成 3 mm 长的主动脉环, 立即置于充满 37 °C 生理盐水的离体血管灌流系统中, 并接通 95% O₂ 和 5% CO₂ 的混合气体。使用去甲肾上腺素刺激主动脉收缩至最大收缩量的 70%, 然后再分别添加累积剂量的乙酰胆碱(10⁻⁹~10⁻⁵ mol/L)或胰岛素(10⁻⁹~10⁻⁶ mol/L)舒张血管, 观察血管舒张程度及舒张曲线, 并制作浓度-反应曲线。

1.7 Western blot 检测

用组织细胞裂解液对小鼠主动脉和小鼠腹腔巨噬细胞进行裂解, BCA 法测定蛋白浓度, 根据浓度加入适量上样缓冲液, 充分混匀后, 放入恒温干燥器于 100 °C 加热 10 min。使用 10% SDS-PAGE 进行电泳, 随后转移至 PVDF 膜上, 采用 5% BSA 室温封闭 2 h, 随后对主动脉蛋白膜孵育一抗[GADPH(1:20 000)、TNF-α(1:500)、MCP-1(1:500)、p-Akt(1:500)、Akt(1:500)、p-JNK(1:1 000)、JNK(1:1 000)、p-eNOS(1:500)、eNOS(1:500)、p-IRS1(1:500)及 IRS1(1:500)]以及对巨噬细胞蛋白孵育一抗[GADPH(1:20 000)、AT1R(1:500)]。摇床上室温孵育 2 h, 放入 4 °C 冰箱过夜, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 洗膜后加入相应的辣根过氧化物酶标记的二抗(1:3 000), 室温孵育 1 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 用 ECL 显影液孵育 1 min, 吸去膜上多余显影液, 用化学发光凝胶成像系统进行拍照, 拍照后用 Image J 进行灰度值分析, 结果用目的

蛋白与 GAPDH 的比值表示。

1.8 免疫荧光观察

主动脉石蜡切片放入 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中,高压修复 5 min,内源性过氧化物酶室温孵育 1 h 后 PBS 洗 3 次,山羊血清封闭 1 h 后用 PBS 冲洗 3 次。向标本中加入 F4/80 抗体(1:200),4 °C 孵育过夜。第二天取出,用 PBS 冲洗 3 次,避光条件下加入 594 荧光标记的二抗(1:1 000),作用 1 h 后加入 DAPI 染细胞核,室温孵育 7 min,PBS 洗 3 次,用荧光显微镜观察 F4/80 阳性细胞数量并拍照。对 F4/80 阳性细胞计数,每张切片至少检查 5 张图像,每张图像的阳性细胞以每 mm² 的面积表示。用没有孵育 F4/80 抗体的切片作为阴性对照。

1.9 实时荧光定量聚合酶链反应检测

按照 RNA 提取试剂盒提取巨噬细胞 RNA, Nanodrop2000 测定 RNA 浓度,并反转录为 cDNA。cDNA 样品分别配制成 20 μL 反应体系。反应条件:95 °C、5 min;40 个 PCR 循环:95 °C、10 s;55 °C、15 s;72 °C、20 s。数据采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析。引物序列:AT1R 正向为 5'-ATGCTTGGGGCAACTTCACTA-3',反向为 5'-GCAGCAAGAGAAGGGCTTCA-3'; GAPDH 正向为 5'-AGGTCGGTGTGAACG-GATTTG-3',反向为 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAG-GTCA-3'。

1.10 统计学分析

采用 Image J 图像分析软件对各染色图片进行定量分析。所有的数据用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,正态分布的计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,血管舒张功能数据采用多因素方差分析,其余数据多组间比较均采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 特异性敲除 Mye AT1R 基因对小鼠腹腔巨噬细胞 AT1R 表达和血压的影响

与 WT 组相比,Mye AT1R^{-/-} 组小鼠腹腔巨噬细胞 AT1R 的 mRNA 含量显著下降,降低幅度达 94% ($P < 0.05$)。与 WT 组相比,DOCA 组小鼠腹腔巨噬细胞 AT1R 蛋白表达明显增加,升高幅度达 36%; Mye AT1R^{-/-} 组和 Mye AT1R^{-/-}/DOCA 组小鼠腹腔巨噬细胞 AT1R 的蛋白表达均明显降低,降低幅度分别为 77% 和 34% ($P < 0.05$)。由此表明,Mye AT1R 基因敲除小鼠构建成功。

与 WT 组比较,DOCA 组小鼠收缩压显著升高,增高幅度达 37% ($P < 0.05$)。敲除 Mye AT1R 基因没有明显影响小鼠的收缩压($P > 0.05$;图 1)。

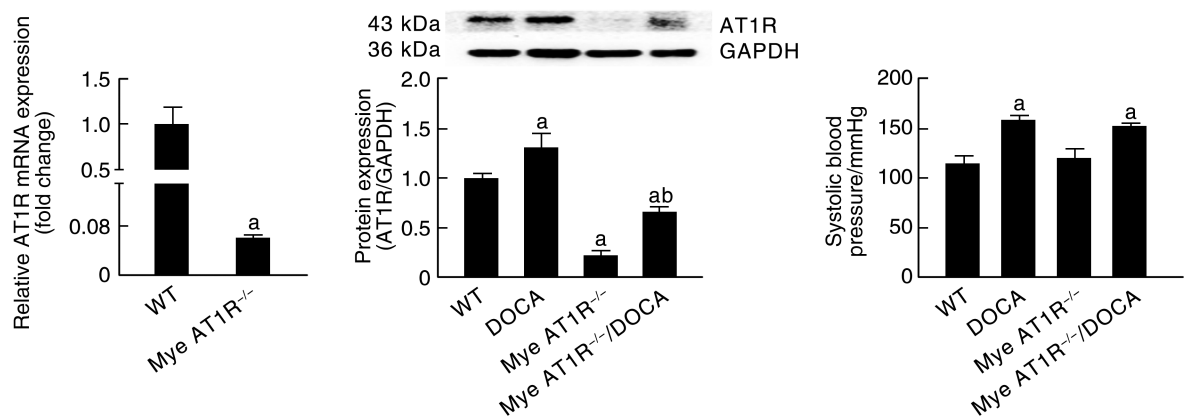


图 1. 特异性敲除 Mye AT1R 基因对小鼠腹腔巨噬细胞 AT1R 的表达和尾动脉收缩压的影响($n=8$)

a 为 $P < 0.05$,与 WT 组比较;b 为 $P < 0.05$,与 DOCA 组比较。

Figure 1. Effect of specific knockout Mye AT1R gene on the expression of peritoneal macrophage AT1R and tail artery systolic blood pressure in mice($n=8$)

2.2 特异性敲除 Mye AT1R 基因对小鼠主动脉厚度、乙酰胆碱和胰岛素诱导的内皮依赖性血管舒张功能的影响

HE 染色显示,与 WT 组相比,DOCA 组小鼠主

动脉壁厚度明显增加,升高幅度达 57% ($P < 0.05$); 与 DOCA 组相比,Mye AT1R^{-/-}/DOCA 组小鼠主动脉壁厚度显著降低,降低幅度达 14% ($P < 0.05$; 图 2)。

与 WT 组比较, DOCA 组小鼠乙酰胆碱和胰岛素诱导的内皮依赖性血管舒张功能明显受损, 降低幅度分别为 32% 和 36% ($P < 0.05$); 与 DOCA 组相比, 敲除 Mye AT1R 基因明显改善 DOCA 盐敏感性

高血压小鼠乙酰胆碱和胰岛素诱导的内皮依赖性血管舒张功能, 升高幅度分别为 21% 和 17% ($P < 0.05$; 图 3)。

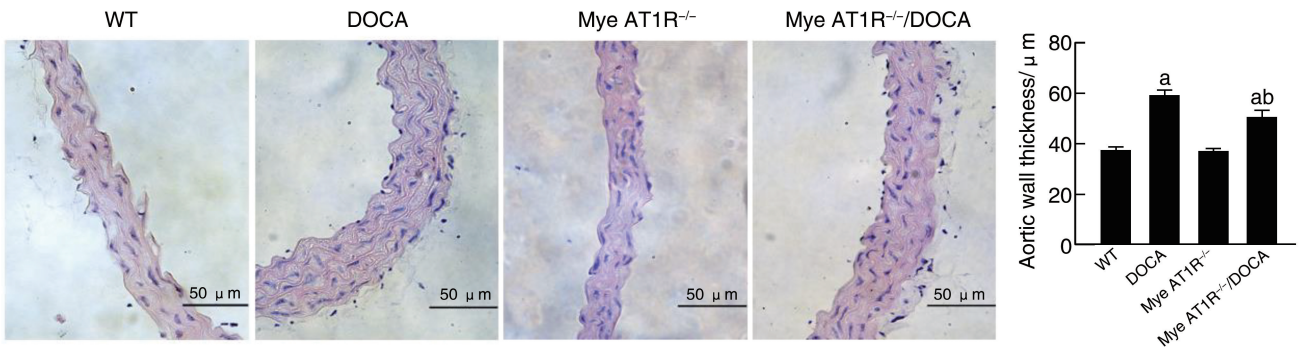


图 2. 特异性敲除 Mye AT1R 基因对小鼠主动脉壁厚度的影响 ($n = 8$)

a 为 $P < 0.05$, 与 WT 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 DOCA 组比较。

Figure 2. Effect of specific knockout of Mye AT1R gene on aortic wall thickness in mice ($n = 8$)

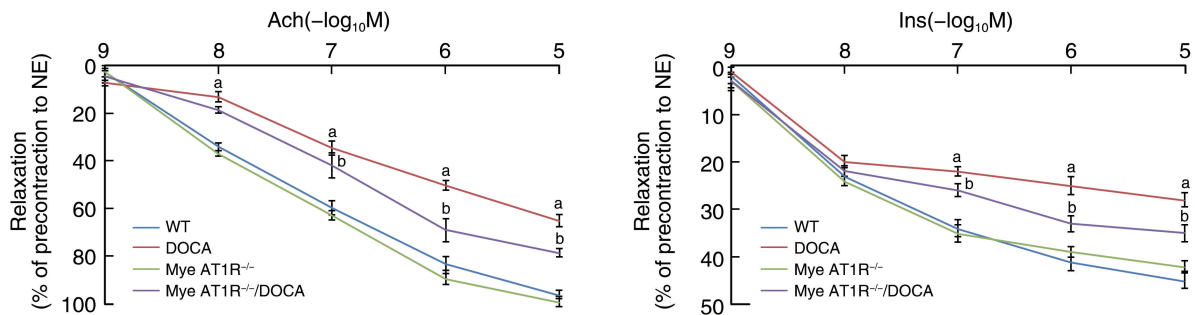


图 3. 特异性敲除 Mye AT1R 基因对小鼠主动脉乙酰胆碱和胰岛素诱导的内皮依赖性血管舒张功能的影响 ($n = 8$)

a 为 $P < 0.05$, 与 WT 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 DOCA 组比较。

Figure 3. Effect of specific knockout of Mye AT1R gene on acetylcholine or insulin-induced endothelium-dependent vasodilation in mice aorta ($n = 8$)

2.3 特异性敲除 Mye AT1R 基因对小鼠主动脉巨噬细胞浸润和血管炎症反应的影响

免疫荧光结果显示, 与 WT 组相比, DOCA 组小鼠主动脉 F4/80 阳性细胞数明显增多, 升高幅度为 195% ($P < 0.05$); 与 DOCA 组相比, 敲除 Mye AT1R 基因可减少 DOCA 盐敏感性高血压小鼠主动脉 F4/80 阳性细胞数, 降低幅度为 44% ($P < 0.05$; 图 4)。

与 WT 组相比, DOCA 组小鼠主动脉 MCP-1 和 TNF- α 的蛋白表达水平明显增加, 升高幅度分别为 42% 和 45% ($P < 0.05$); 与 DOCA 组相比, 敲除 Mye AT1R 基因可减少 DOCA 盐敏感性高血压小鼠主动脉 MCP-1 和 TNF- α 的蛋白表达水平, 降低幅度分别为 52% 和 41% ($P < 0.05$; 图 5)。

2.4 特异性敲除 Mye AT1R 基因对小鼠主动脉 p-JNK 表达及胰岛素信号通路的影响

研究表明, 激活 JNK 可抑制胰岛素 PI3K/Akt/eNOS 信号通路传导, 其机制是通过增加 IRS1 丝氨酸残基的磷酸化抑制胰岛素通路^[14]。与 WT 组相比, DOCA 组小鼠主动脉 p-JNK 和 p-IRS1 的蛋白水平明显增加, 升高幅度分别为 32% 和 54% ($P < 0.05$); 与 DOCA 组相比, 敲除 Mye AT1R 基因可减少 DOCA 盐敏感性高血压小鼠主动脉 p-JNK 和 p-IRS1 (ser307) 的蛋白水平, 降低幅度分别为 17% 和 23% ($P < 0.05$; 图 6)。

与 WT 组相比, DOCA 组小鼠主动脉 p-Akt 和 p-eNOS 的蛋白表达水平明显下降, 降低幅度均为 36% ($P < 0.05$); 与 DOCA 组相比, 敲除 Mye AT1R

基因显著增加 DOCA 盐敏感性高血压小鼠主动脉 p-Akt 和 p-eNOS 的蛋白表达水平,升高幅度分别为

48% 和 42% ($P < 0.05$; 图 6)。

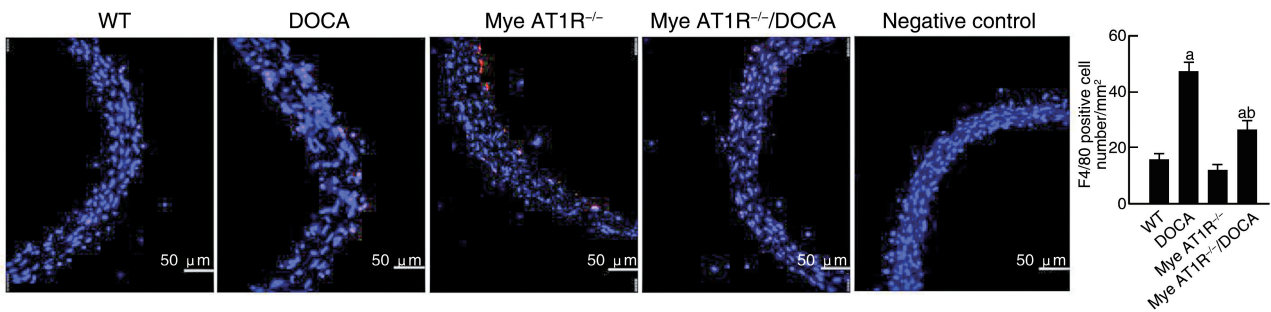


图 4. 特异性敲除 Mye AT1R 基因对小鼠主动脉 F4/80 阳性细胞数的影响 ($n = 8$)

a 为 $P < 0.05$, 与 WT 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 DOCA 组比较。

Figure 4. Effect of specific knockout of Mye AT1R gene on the number of F4/80 positive cells in mouse aorta ($n = 8$)

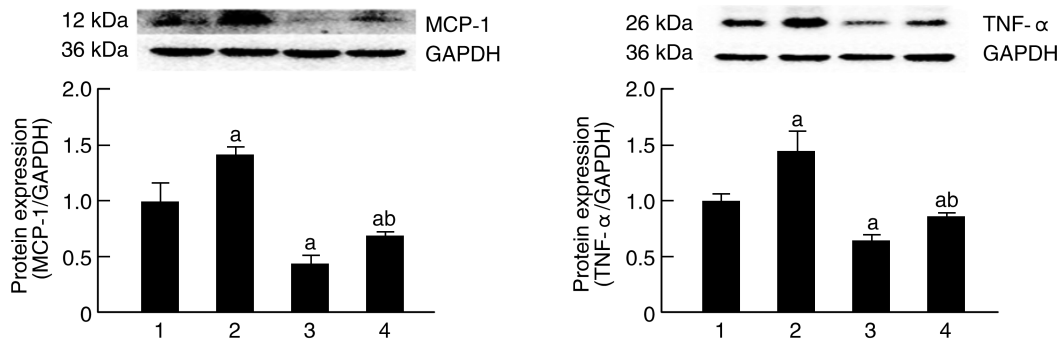


图 5. 特异性敲除 Mye AT1R 基因对小鼠主动脉 MCP-1、TNF- α 蛋白表达的影响 ($n = 8$)

1 为 WT 组, 2 为 DOCA 组, 3 为 Mye AT1R^{-/-} 组, 4 为 Mye AT1R^{-/-}/DOCA 组。

a 为 $P < 0.05$, 与 WT 组比较; b 为 $P < 0.05$, 与 DOCA 组比较。

Figure 5. Effect of specific knockout of Mye AT1R gene on the expression MCP-1 and TNF- α protein in mice aorta ($n = 8$)

3 讨论

近年来, 众多研究表明炎症反应在高血压的发生发展和高血压终末器官损害中发挥着重要的作用^[15-16]。Ang II 是一种重要的促炎因子, 通过激活 RAS 促进 T、B 淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞在血管和组织中浸润, 进而引起血管和组织炎症^[17]。聚集在血管壁的巨噬细胞可释放多种炎症细胞因子, 如 TNF- α 、IL-1 β 等, 促进血管炎症, 增加血管 ROS 的产生, 从而引起血管结构和功能的损害^[18]。本研究组前期研究发现, 在 Dahl 盐敏感性高血压大鼠和 Ang II 诱导的高血压大鼠中, 用化学药物脂质体氯磷酸盐去除鼠的巨噬细胞可以明显改善高血压鼠的血管结构和功能损害, 说明 Ang II 可以通过巨噬细胞而影响血管功能, 但其确切的机制还不清楚^[7]。研究表明, 巨噬细胞可表达 RAS 的多种成分, 包括血管紧张素原、Ang I、Ang II、血管紧张素

转换酶和 AT1R^[19]。本研究发现, 在 DOCA 诱导的盐敏感性高血压小鼠的腹腔巨噬细胞中, AT1R 基因表达显著增加; 而敲除 Mye AT1R 基因明显降低主动脉血管壁的巨噬细胞浸润、血管炎症, 改善乙酰胆碱和胰岛素诱导的血管舒张功能。这些结果提示, 盐敏感性高血压可能通过提高巨噬细胞 AT1R 的表达改变巨噬细胞功能, 最终影响血管结构和功能, 这是高血压通过免疫机制引起血管损害的一个新发现。

高血压常伴有胰岛素抵抗, 包括血管胰岛素抵抗^[20]。在血管内皮细胞, 胰岛素通过激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路释放一氧化氮 (nitric oxide, NO)^[21], 引起血管舒张, 维持心血管内环境功能稳定, 对心血管系统起保护作用^[13]。此外, 胰岛素通过 NO 诱导的骨骼肌血管舒张, 促进葡萄糖在骨骼肌摄取和代谢, 因此, 血管胰岛素通路也参与糖代谢的调节^[22]。损害血管胰岛素信号通路可能是高

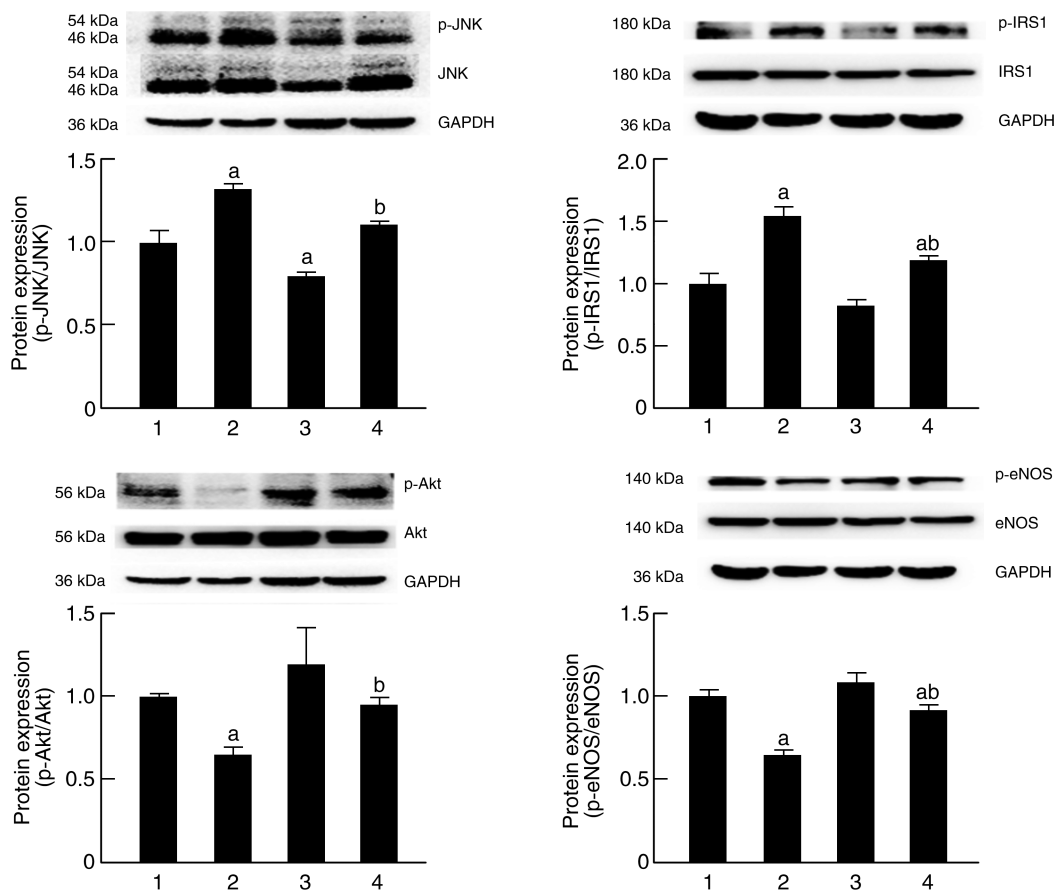


图 6. 特异性敲除 Mye AT1R 基因对小鼠主动脉 p-JNK、p-IRS1 表达及 Akt/eNOS 信号通路的影响 ($n=8$)

1 为 WT 组, 2 为 DOCA 组, 3 为 Mye AT1R^{-/-} 组, 4 为 Mye AT1R^{-/-}/DOCA 组。

a 为 $P<0.05$, 与 WT 组比较; b 为 $P<0.05$, 与 DOCA 组比较。

Figure 6. Effect of specific knockout of Mye AT1R gene on the expression of p-JNK, p-IRS1 and Akt/eNOS signal pathway in mice aorta ($n=8$)

血压、心血管疾病和代谢性疾病发病的一个共同的病理生理基础^[11]。本课题组前期的研究显示,在盐敏感性高血压大鼠中,使用选择性 AT1R 拮抗剂坎地沙坦或抑制 NF- κ B 可改善血管胰岛素抵抗,用化学药物脂质体氯磷酸盐去除巨噬细胞治疗也可改善胰岛素诱导的血管舒张功能和血管胰岛素信号通路^[7,23]。这些结果表明过度激活 RAS 和炎症反应可能是盐敏感性高血压引起血管损害和血管胰岛素抵抗的一个重要机制。

本研究发现,特异性敲除 Mye AT1R 可降低巨噬细胞血管壁浸润引起的血管炎症,降低血管炎症细胞因子 TNF- α 和 JNK 磷酸化,现已有文献报道磷酸化 JNK 可以引起 IRS-1 丝氨酸磷酸化,从而抑制胰岛素 PI3K/Akt/eNOS 通路^[24-25]。本研究还发现,特异性敲除 Mye AT1R 可降低血管壁炎症细胞因子 TNF- α 和 JNK 的激活,减少 p-IRS1 表达,并增加 p-Akt 和 p-eNOS 的蛋白表达。因此认为盐敏感

性高血压通过促进巨噬细胞 AT1R 表达,引起巨噬细胞向血管壁浸润,诱导血管炎症,可能是高血压引起血管损害和血管胰岛素抵抗的一个重要原因。

综上所述,本研究显示盐敏感性高血压促进巨噬细胞 AT1R 表达,从而引起巨噬细胞浸润和血管炎症,损害血管胰岛素信号通路;敲除 Mye AT1R 可改善盐敏感性高血压引起的炎症反应和血管胰岛素抵抗,保护血管功能。免疫细胞 AT1R 可能作为高血压激活 RAS 的一部分参与高血压及血管损害的发病机制。本研究结果将增加对 RAS 参与高血压以及高血压免疫损害发病机制的新知识。

[参考文献]

- [1] YU J, WANG S, SHI W, et al. Roxadustat prevents AngII hypertension by targeting angiotensin receptors and eNOS [J]. JCI Insight, 2021, 6(18): e133690.
- [2] 周华, 张翠芳, 陈瑞瑞, 等. RNA 干扰下调 ACE 和 AT1R 对自发性高血压大鼠血压及脑组织损伤的影响

- [J]. 中国动脉硬化杂志, 2018, 26(2): 157-164.
- ZHOU H, ZHANG C F, CHEN R R, et al. Effects of RNA interference on blood pressure and brain tissue injury in spontaneously hypertensive rats by downregulating ACE and AT1R[J]. Chin J Arterioscler, 2018, 26(2): 157-164.
- [3] NGUYEN DINH CAT A, MONTEZANO A C, BURGER D, et al. Angiotensin II, NADPH oxidase, and redox signaling in the vasculature [J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 19(10): 1110-1120.
- [4] GONZALEZ A A, SALINAS-PARRA N, CIFUENTES-ARANEDA F, et al. Vasopressin actions in the kidney renin angiotensin system and its role in hypertension and renal disease[J]. Vitam Horm, 2020, 113: 217-238.
- [5] WENZEL P. Monocytes as immune targets in arterial hypertension[J]. Br J Pharmacol, 2019, 176(12): 1966-1977.
- [6] CAI R, HAO Y, LIU Y Y, et al. Tumor necrosis factor alpha deficiency improves endothelial function and cardiovascular injury in deoxycorticosterone acetate/salt-hypertensive mice[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 3921074.
- [7] LIU Y Y, LUO J, CAI R, et al. Macrophage depletion improves endothelial insulin resistance and protects against cardiovascular injury in salt-sensitive hypertension[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 5073762.
- [8] SIMÕES E S A C, MIRANDA A S, ROCHA N P, et al. Renin angiotensin system in liver diseases: friend or foe? [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(19): 3396-3406.
- [9] ZHOU M S, LIU C, TIAN R, et al. Skeletal muscle insulin resistance in salt-sensitive hypertension: role of angiotensin II activation of NFκB[J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14: 45.
- [10] GAO P, YOU M, LI L, et al. Salt-induced hepatic inflammatory memory contributes to cardiovascular damage through epigenetic modulation of SIRT3[J]. Circulation, 2022, 145(5): 375-391.
- [11] SCHULMAN I H, ZHOU M S. Vascular insulin resistance: a potential link between cardiovascular and metabolic diseases[J]. Curr Hypertens Rep, 2009, 11(1): 48-55.
- [12] TAN C, WANG A, LIU C, et al. Puerarin improves vascular insulin resistance and cardiovascular remodeling in salt-sensitive hypertension[J]. Am J Chin Med, 2017, 45(6): 1169-1184.
- [13] ZHOU M S, SCHULMAN I H, RAIJ L. Role of angiotensin II and oxidative stress in vascular insulin resistance linked to hypertension [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 296(3): H833-839.
- [14] XIA T, DUAN W, ZHANG Z, et al. Polyphenol-rich extract of Zhenjiang aromatic vinegar ameliorates high glucose-induced insulin resistance by regulating JNK-IRS-1 and PI3K/Akt signaling pathways [J]. Food Chem, 2021, 335: 127513.
- [15] MOUTON A J, LI X, HALL M E, et al. Obesity, hypertension, and cardiac dysfunction: novel roles of immunometabolism in macrophage activation and inflammation [J]. Circ Res, 2020, 126(6): 789-806.
- [16] 盘冰洁, 田晓婷, 李晓晖. 炎症 Caspase 调控固有免疫在心血管疾病中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(6): 536-541.
- PAN B J, TIAN X T, LI X H. Inflammatory caspase regulate the innate immunity and its implication in cardiovascular diseases [J]. Chin J Arterioscler, 2019, 27(6): 536-541.
- [17] ZHOU B, QIU Y, WU N, et al. FNDC5 attenuates oxidative stress and NLRP3 inflammasome activation in vascular smooth muscle cells via activating the AMPK-SIRT1 signal pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 6384803.
- [18] 刘恒, 孙凡, 徐倩倩, 等. 高血压脑小血管病认知功能障碍患者 VCI 程度与血清炎症因子的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(7): 604-609.
- LIU H, SUN F, XU Q Q, et al. Relationship between VCI degree and serum inflammatory factors in patients with cognitive dysfunction of hypertensive cerebral small vessel disease[J]. Chin J Arterioscler, 2020, 28(7): 604-609.
- [19] JUSTIN RUCKER A, CROWLEY S D. The role of macrophages in hypertension and its complications[J]. Pflugers Arch, 2017, 469(3-4): 419-430.
- [20] SASAKI N, MAEDA R, OZONO R, et al. Adipose tissue insulin resistance predicts the incidence of hypertension: the Hiroshima study on glucose metabolism and cardiovascular diseases [J]. Hypertens Res, 2022, 45(11): 1763-1771.
- [21] MADONNA R, PIERAGOSTINO D, ROSSI C, et al. Simulated hyperglycemia impairs insulin signaling in endothelial cells through a hyperosmolar mechanism [J]. Vascul Pharmacol, 2020, 130: 106678.
- [22] CZECH M P. Insulin action and resistance in obesity and type 2 diabetes[J]. Nat Med, 2017, 23(7): 804-814.
- [23] ZHOU M S, SCHULMAN I H, RAIJ L. Vascular inflammation, insulin resistance, and endothelial dysfunction in salt-sensitive hypertension: role of nuclear factor kappa B activation[J]. J Hypertens, 2010, 28(3): 527-535.
- [24] CHEN C C, LII C K, LIN Y H, et al. Andrographis paniculata improves insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice and TNFα-treated 3T3-L1 adipocytes[J]. Am J Chin Med, 2020, 48(5): 1073-1090.
- [25] ZHU Q, AN Y A, KIM M, et al. Suppressing adipocyte inflammation promotes insulin resistance in mice[J]. Mol Metab, 2020, 39: 101010.