

高盐饮食诱导 Wistar 大鼠颈动脉重塑的机制及替米沙坦的干预

陈剑玲^{1,2}, 陈涛^{1,2}, 商黔惠^{1,2}, 刘婵¹, 刘华庆³

(1. 遵义医学院临床医学研究所 心血管病研究所 高血压研究室, 2. 遵义医学院附属医院心内科,

3. 遵义医学院附属医院病理科, 贵州省遵义市 563003)

[关键词] 高血压; 颈动脉重塑; 替米沙坦; TGF- β 1/Smads 通路

[摘要] **目的** 探讨高盐饮食对 Wistar 大鼠颈动脉重塑的影响及替米沙坦的干预作用。**方法** Wistar 大鼠 60 只随机分为对照组(0.5% NaCl 颗粒饲料)、高盐组(8% NaCl 颗粒饲料)和干预组(8% NaCl 颗粒饲料 + 替米沙坦)。实验结束后,根据尾动脉血压将高盐组分为高盐高血压组和高盐血压正常组。采用 HE 染色、Masson 染色及免疫组织化学染色检测颈动脉中膜形态结构变化及颈动脉中膜 α -平滑肌肌动蛋白(α -actin)、增殖细胞核抗原(PCNA)、血管紧张素 II(Ang II)、血管紧张素 II 1 型受体(AT1)、血管紧张素 II 2 型受体(AT2)、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、p-Smad2/3、Smad7 的表达水平。放射免疫法测定颈动脉醛固酮(ALD)含量。**结果** 高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉中膜厚度(MT)、颈动脉中膜厚度与腔径比(MT/LD)、颈动脉中膜平滑肌细胞增殖指数(PI)、胶原纤维面积百分比、TGF- β 1 和 p-Smad2/3 表达均增高($P < 0.05$),干预组上述指标均降低($P < 0.05$),Smad7 在高盐高血压组、高盐血压正常组颈动脉表达减少,在干预组颈动脉表达增加($P < 0.05$)。高盐高血压组、高盐血压正常组和干预组颈动脉中膜 Ang II 表达均较对照组增多($P < 0.05$),此三组之间无明显差异($P > 0.05$)。高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉中膜 AT1 表达较对照组增多,干预组颈动脉中膜 AT1 表达减少($P < 0.05$),高盐高血压组与高盐血压正常组相比无明显差异($P > 0.05$)。干预组颈动脉中膜 AT2 表达较对照组、高盐高血压组、高盐血压正常组增多($P < 0.05$),对照组、高盐高血压组和高盐血压正常组之间无明显差异($P > 0.05$)。高盐高血压组颈动脉中膜醛固酮含量高于对照组、高盐血压正常组和干预组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 8% NaCl 盐饮食可诱导 Wistar 大鼠颈动脉重塑,其机制可能与局部 RAS 和 TGF- β 1/Smads 通路中多个组分的表达异常有关,替米沙坦能抑制高盐诱导的颈动脉重构。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of High Salt Diet on the Remodeling of Carotid Arteries and the Intervention of Telmisartan in Wistar Rats

CHEN Jian-Ling^{1,2}, CHEN Tao^{1,2}, SHANG Qian-Hui^{1,2}, LIU Chan¹, and LIU Hua-Qing³

(1. Institute of Clinical Medicine & Institute of Cardiovascular Disease & Hypertension Lab, Zunyi Medical College, 2. Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, 3. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

[KEY WORDS] Hypertension; Carotid Artery Remodeling; Telmisartan; TGF- β 1/Smads Pathway

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of high salt diet on carotid artery remodeling and the intervention of telmisartan in Wistar rats. **Methods** 60 male Wistar rats were fed by normal (given 0.5% NaCl as control group), high salt (given 8% NaCl as high salt group) and high salt + telmisartan (given 8% NaCl + telmisartan as intervention group) diet for 24 weeks, respectively. At the end of experiment, the rats in high salt group were subdivided into high

[收稿日期] 2014-01-22

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81160041);贵州省社会发展攻关计划项目和省高层次人才科研条件特助项目[黔科合 SY 字(2011)3047 号,TZJF-2009 年 42]

[作者简介] 陈剑玲,硕士,主任医师,研究方向为高血压发病机制及冠状动脉介入治疗,E-mail 为 cjlzhx@sina.com。陈涛,硕士,住院医师,现在在济宁医学院附属医院,研究方向为高血压发病机制。通讯作者商黔惠,教授,硕士研究生导师,研究方向为高血压发病机制和药物干预,E-mail 为 qianhui-shang@hotmail.com。

salt hypertension group and high salt normal blood pressure group by the tail-cuff artery pressure. The changes of histology and proliferation in carotid artery were observed by HE, Masson and immunohistochemical staining. TGF- β 1, p-Smad2/3, Smad7, Ang II, AT1 and AT2 protein expression in carotid artery were determined by immunohistochemical staining. The level of aldosterone in carotid artery was measured by radioimmunoassay. **Results** Media thickness (MT), ratio of media to lumen (MT/LD), proliferation index (PI), the collagen volume fraction, TGF- β 1 and p-Smad2/3 were greater in high salt group than those in the control group ($P < 0.05$), but telmisartan prevented these effects ($P < 0.05$), Smad7 protein expression in high salt group was lower compared with control group ($P < 0.05$), whereas higher in intervention group compared with high salt group ($P < 0.05$). Ang II protein expression in high salt group and intervention group increased compared with control group ($P < 0.05$). AT1 protein expression in high salt group increased compared with control group ($P < 0.05$), but decreased in intervention group ($P < 0.05$), high salt hypertension group and high salt normal blood pressure group was unchanged ($P > 0.05$). AT2 protein expression in intervention group increased compared with high salt group and control group ($P < 0.05$), control group, high salt hypertension group and high salt normal blood pressure group was unchanged ($P > 0.05$). The aldosterone level in carotid arteries was greater in high salt hypertension group than that in control group and high salt normal blood pressure group ($P < 0.05$), much greater than that in intervention group ($P < 0.01$). **Conclusions** 8% NaCl diet can cause the carotid artery remodeling in Wistar rats, RAS and TGF- β 1/Smads pathway may participate in the mechanism of carotid artery remodeling. Telmisartan can prevent high salt-induced remodeling of carotid artery.

近年来高盐饮食与高血压的相关性备受关注,它不仅可以使血压升高,而且作为一个独立的危险因素,直接或间接通过血压导致心脏、肾脏、主动脉等多种器官重塑^[1-3],但其机制尚未完全明了。肾素-血管紧张素-醛固酮系统和转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)及其 Smads 信号转导通路在高盐饮食导致血管重塑中起着重要作用^[4-6],且高盐饮食对颈动脉重塑鲜于研究,本研究通过观察高盐饮食诱导 Wistar 大鼠颈动脉重构,检测颈动脉中膜血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II)、血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin II type 1 receptor antagonist, AT1)、血管紧张素 II 2 型受体 (angiotensin II type 2 receptor antagonist, AT2)、醛固酮 (aldosterone, ALD)、TGF- β 1、磷酸化 Smad2/3 (phosphorylate-Smad2/3, p-Smad2/3)、Smad7 表达水平及使用替米沙坦进行干预,以探讨高盐致颈动脉重塑的可能机制及替米沙坦的干预效果。

1 材料和方法

1.1 主要材料

5~7 周龄清洁级雄性健康 Wistar 大鼠 60 只,体重 80~100 g,由重庆第三军医大学提供,许可证号:SCXK-(渝)2007-0005。普通级大鼠正常盐(0.5%)和高盐(8%)颗粒饲料由广东省医学实验动物中心提供,许可证号:SCXK-(粤)2008-0002。替米沙坦(海南赛力克公司),BESN-II 多通道动物无创测压仪(南京德赛公司),小鼠抗 α -平滑肌肌动

蛋白(α -actin)、鼠抗增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)单克隆抗体(武汉博士德生物技术有限公司),兔抗 TGF- β 1 多克隆抗体、兔抗 p-Smad2/3、Smad7、Ang II、AT1、AT2 多克隆抗体(Santa Cruz 公司),兔二步法免疫组化检测试剂盒、浓缩型 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),光学显微镜(LEICA DM4000)。

1.2 高血压大鼠模型的建立及分组

参考文献[1-3],60 只 Wistar 大鼠适应性喂养一周后,随机分为三组:对照组 16 只、高盐组 26 只和干预组 18 只。对照组喂含有 0.5% NaCl 的颗粒饲料;高盐组喂含有 8% NaCl 的颗粒饲料;干预组喂含有 8% NaCl 的颗粒饲料,同时用替米沙坦灌胃干预。替米沙坦的起始剂量为 2 mg/kg,视尾动脉测压结果逐周增加剂量,最大剂量至 40 mg/kg。各组大鼠按照实验室的设定环境(12 h 光照/黑暗,室温 22℃~25℃,相对湿度约 45%)进行饲养,自由饮水。共饲养 24 周。高血压大鼠判定标准:处理前后血压增加 20~30 mmHg,且 >120 mmHg^[7]。实验末,根据血压将高盐组又分出高盐血压正常组、高盐高血压组。终末各组大鼠只数:对照组 13 只,高盐血压正常组 12 只,高盐高血压组 12 只,干预组 13 只。

1.3 大鼠尾动脉测压

预热 BESN-II 多通道动物无创测压仪,使其温度达到 45℃,在安静、室温 20℃~28℃的环境下,将大鼠固定于特定鼠盒中,鼠尾置于循环加热的可加压通道内,待大鼠处于安静状态,尾动脉波形稳定

后打气加压测量尾动脉压力,测量 3 次,取平均值。大鼠适应性饲养一周后开始测压,作为基础血压,之后每 2 周测 1 次血压。

1.4 标本的处理和采集

术前禁食 12 h,10% 水合氯醛按照 0.3 mL/100 g 体重腹腔注射麻醉后,迅速分离同一侧颈动脉,于颈动脉分叉处约 0.5 cm 处剪下颈动脉,以冷的生理盐水冲洗血液后,置入 4% 多聚甲醛中固定,然后予脱水、包埋、制成厚度 4 μm 石蜡切片。分离另一侧颈动脉剪下后置于干净 EP 管中经液氮速冻后转移至 -80℃ 冰箱中备用。

1.5 HE 染色和 Masson 染色

组织切片分别进行 HE 染色,使用 LEICA DM4000 光学显微镜采图及 BI2000 图像分析系统进行分析。在 400 倍镜下测量颈动脉中膜厚度(media thickness,MT)及 100 倍镜下测量颈动脉腔径(media thickness,LD),每张切片按照顺时针方向随机测量 12 个值,取平均值,计算中膜厚度与腔径比(MT/LD)。组织切片分别进行 Masson 染色,使用 LEICA DM4000 光学显微镜采图,在 400 倍镜下利用 Image-pro plus 图像分析软件,每张随机选取 5 个视野,测量颈动脉中膜胶原纤维面积百分比。

1.6 免疫组织化学检测

α-actin、PCNA、Ang II、AT1、AT2、TGF-β1、p-Smad2/3、Smad7 采用 Elivision 二步法免疫组织化学染色,DAB 显色。使用 Leica DM4000 光学显微镜采图,在 400 倍镜下每张切片随机取 6 个视野进行分析,阳性表达呈棕黄色。α-actin 鉴定颈动脉中膜平滑肌细胞,PCNA 在胞核表达,计数阳性细胞核占中膜细胞总数的百分比,即颈动脉中膜平滑肌细胞的增殖指数(proliferation index,PI)。TGF-β1 在胞浆表达,Smad7 在胞浆、胞核及核周围均有表达,Ang II、AT1、AT2 在胞膜及胞浆表达,利用 Image-pro plus 图像分析软件,测定积分光密度及颈动脉中膜面积,计算积分光密度与颈动脉中膜面积比值,即平均光密度。p-Smad2/3 在胞核表达,计数阳性细胞核占中膜细胞总数的比值。

1.7 放射免疫测定颈动脉 ALD

颈动脉(去除内外膜)在电子天平称重后放入手动匀浆器,按质量体积比(1:100)加入冰生理盐水,进行匀浆(冰上操作)。匀浆后,4℃、2500 r/min 离心 10 min,取上清液装入 EP 管中备用。放射免疫法测定 ALD,操作过程严格按照说明书进行。

1.8 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素

方差分析,有差异后进行两两比较,方差齐使用 LSD 法,方差不齐使用 Tamhane's T2 法,两变量间的相关性分析采用 Pearson 或 Spearman 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠尾动脉压比较

高盐高血压组在喂养 24 周高盐后,血压出现明显升高,与对照组、高盐血压正常组和干预组相比差异显著($P < 0.01$),而高盐血压正常组与干预组血压未出现升高,与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$;表 1)。

表 1. 各组大鼠尾动脉血压比较($\bar{x} \pm s$,mmHg)
Table 1. Comparison of rat tail artery blood pressure in the four groups($\bar{x} \pm s$, ,mmHg)

分 组	基础血压	实验末尾血压
对照组	115.25 ± 2.04	119.50 ± 7.18
高盐高血压组	118.62 ± 11.53	168.32 ± 13.07 ^a
高盐血压正常组	120.97 ± 3.73	127.15 ± 9.68
干预组	118.50 ± 3.75	127.83 ± 4.33

a 为 $P < 0.01$,分别与对照组、干预组、高盐血压正常组比较。

2.2 大鼠颈动脉形态学比较

HE 染色表明,高盐高血压组、高盐血压正常组颈动脉中膜明显肥厚,MT、MT/LD 均明显高于对照组($P < 0.05$);干预组能明显改善颈动脉中膜肥厚($P < 0.05$);高盐高血压组和高盐血压正常组相比无明显差异($P > 0.05$)。免疫组织化学染色显示,与对照组相比,高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉中膜平滑肌细胞层数增多,排列紊乱;干预组上述现象明显改善。高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉中膜 PI 较对照组明显增大($P < 0.01$);而干预组增殖现象明显减少($P < 0.01$);高盐高血压组与高盐血压正常组相比无明显差异($P > 0.05$)。Masson 染色显示,与对照组相比,高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉中膜胶原纤维含量显著增多($P < 0.01$);干预组颈动脉中膜胶原纤维含量减少($P < 0.01$),高盐高血压组和高盐血压正常组相比无明显差异($P > 0.05$;图 1 和表 2)。

2.3 大鼠颈动脉中膜 Ang II、AT1、AT2 的表达及 ALD 含量

高盐高血压组、高盐血压正常组和干预组颈动脉中膜 Ang II 表达均较对照组增多($P < 0.05$),高

盐高血压组、高盐血压正常组和干预组之间无明显差异($P>0.05$)。高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉中膜 AT1 表达较对照组增多($P<0.05$), 干预组颈动脉中膜 AT1 表达减少($P<0.05$), 高盐高血压组与高盐血压正常组相比无明显差异($P>0.05$)。干预组颈动脉中膜 AT2 表达较对照组、高

盐高血压组和高盐血压正常组增多($P<0.05$), 对照组、高盐高血压组及高盐血压正常组之间无明显差异($P>0.05$)。高盐高血压组颈动脉中膜 ALD 含量高于对照组、高盐血压正常组、干预组($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 对照组、高盐血压正常组及干预组之间无明显差异($P>0.05$;图 2 和表 3)。

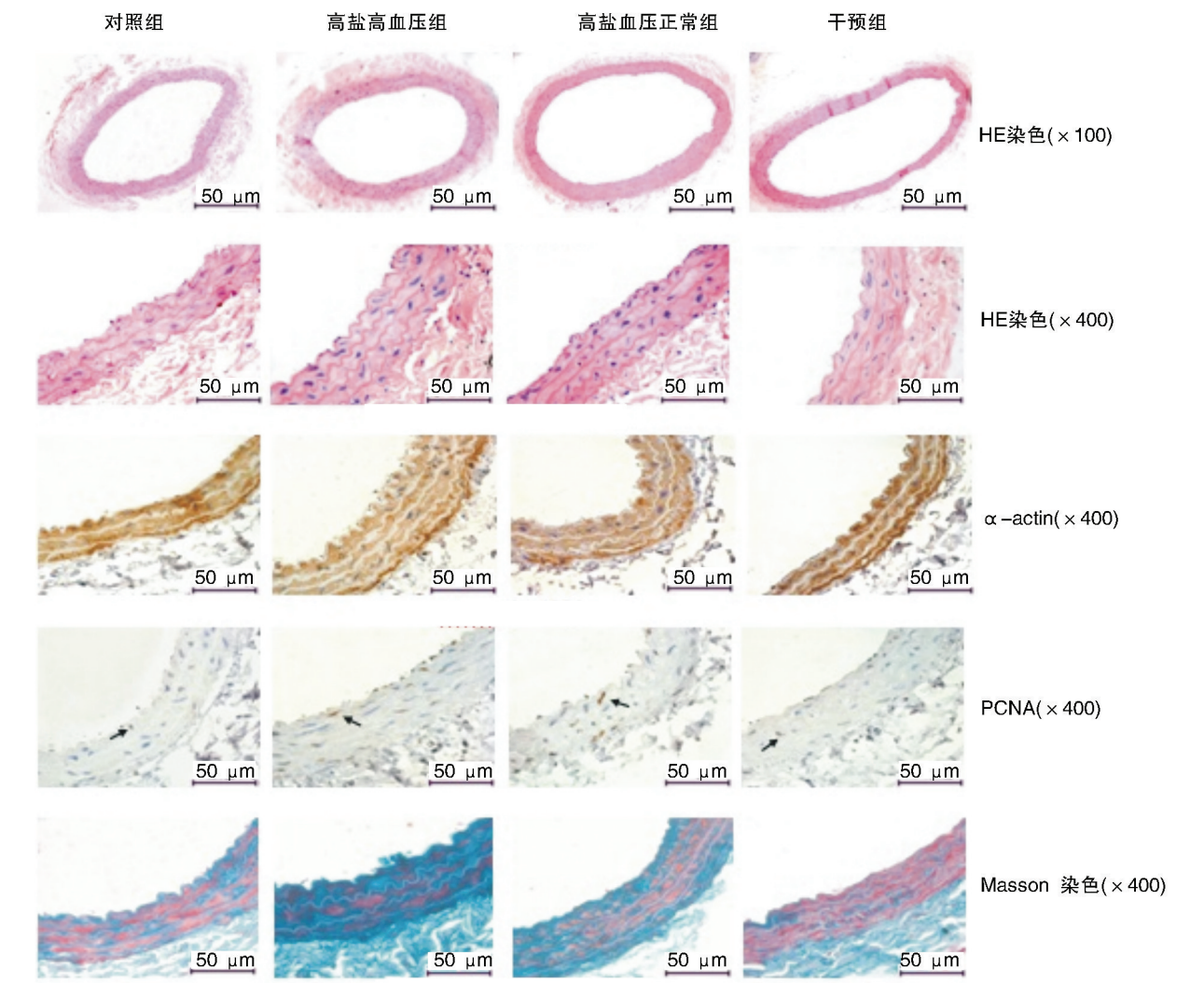


图 1. 各组大鼠颈动脉形态学比较 →为阳性细胞核。

Figure 1. Comparison of rat carotid artery morphology in the four groups

表 2. 各组大鼠颈动脉 MT、LD、MT/LD、PI 及中膜胶原纤维面积比($\bar{x} \pm s, n=10$)

分 组	MT(μm)	LD (μm)	MT/LD(%)	PI (%)	胶原纤维面积比 (%)
对照组	33.10 ± 1.17	168.47 ± 27.29	20.15 ± 4.01	11.20 ± 7.69	18.62 ± 4.79
高盐高血压组	48.11 ± 2.89 ^{bd}	159.35 ± 18.51	30.62 ± 5.04 ^{ac}	31.08 ± 7.23 ^{bd}	40.31 ± 4.14 ^{bd}
高盐血压正常组	44.55 ± 6.48 ^{bc}	151.80 ± 29.33	29.68 ± 3.52 ^{ac}	31.83 ± 6.41 ^{bd}	41.47 ± 4.58 ^{bd}
干预组	35.57 ± 3.94	174.50 ± 31.18	21.05 ± 5.20	12.10 ± 6.34	20.51 ± 5.96

a 为 $P<0.05$, b 为 $P<0.01$, 与对照组比较; c 为 $P<0.05$, d 为 $P<0.01$, 与干预组比较。

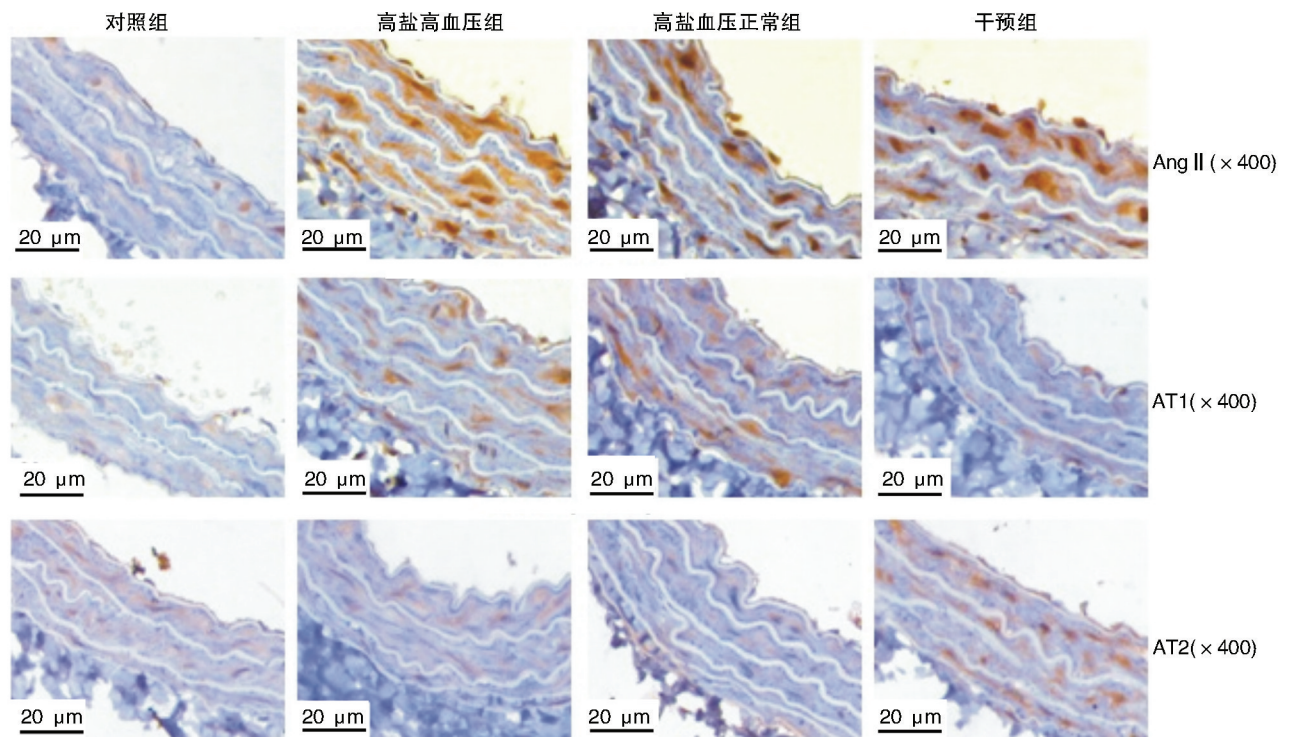


图 2. 免疫组织化学显示各组大鼠颈动脉中膜 Ang II、AT1 和 AT2 的表达

Figure 2. Expression of rat carotid media Ang II , AT1 and AT2 by immunohistochemical staining

表 3. 各组大鼠颈动脉 Ang II、AT1、AT2 的表达($\bar{x} \pm s, n = 11$) 和 ALD 含量($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3. Expression of rat carotid artery Ang II , AT1 and AT2($\bar{x} \pm s, n = 11$) and ALD concentration($\bar{x} \pm s, n = 11$) in the four groups

分 组	Ang II	AT1	AT2	ALD (ng/g)
对照组	0. 0027 ± 0. 0016	0. 0036 ± 0. 0027	0. 0032 ± 0. 0026	1. 74 ± 0. 60
高盐高血压组	0. 0190 ± 0. 0068 ^a	0. 0163 ± 0. 0062 ^{ab}	0. 0038 ± 0. 0024 ^b	2. 79 ± 0. 90 ^{acd}
高盐血压正常组	0. 0164 ± 0. 0075 ^a	0. 0143 ± 0. 0057 ^{ab}	0. 0026 ± 0. 0015 ^b	1. 87 ± 1. 04
干预组	0. 0176 ± 0. 0091 ^a	0. 0047 ± 0. 0011	0. 0079 ± 0. 0026 ^a	1. 51 ± 0. 87

a 为 $P < 0. 05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0. 05$, c 为 $P < 0. 01$, 与干预组比较; d 为 $P < 0. 05$, 与高盐血压正常组比较。

2. 4 大鼠颈动脉中膜 TGF-β1、p-Smad2/3 和 Smad7 的表达

与对照组相比,高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉中膜 TGF-β1 和 p-Smad2/3 的表达增多,

Smad7 的表达降低 ($P < 0. 05$), 而干预组颈动脉中膜 TGF-β1 和 p-Smad2/3 的表达减少, Smad7 的表达增高 ($P < 0. 05$), 高盐高血压组与高盐血压正常组相比无明显差异 ($P > 0. 05$; 图 3 和表 4)。

表 4. 各组大鼠颈动脉中膜 TGF-β1、p-Smad2/3、Smad7 的表达($\bar{x} \pm s, n = 11$)

Table 4. Expression of rat carotid media TGF-β1 , Smad2/3 and Smad7 in the four groups($\bar{x} \pm s, n = 11$)

分 组	TGF-β1	p-Smad2/3	Smad7
对照组	0. 0003 ± 0. 0001	0. 0595 ± 0. 0272	0. 0077 ± 0. 0027
高盐高血压组	0. 0060 ± 0. 0032 ^{ab}	0. 3697 ± 0. 1524 ^{ab}	0. 0020 ± 0. 0011 ^{ab}
高盐血压正常组	0. 0053 ± 0. 0028 ^{ab}	0. 2533 ± 0. 0958 ^{ab}	0. 0022 ± 0. 0010 ^{ab}
干预组	0. 0004 ± 0. 0002	0. 0918 ± 0. 0407	0. 0060 ± 0. 0020

a 为 $P < 0. 05$, 与对照组比较; b 为 $P < 0. 05$, 与干预组比较。

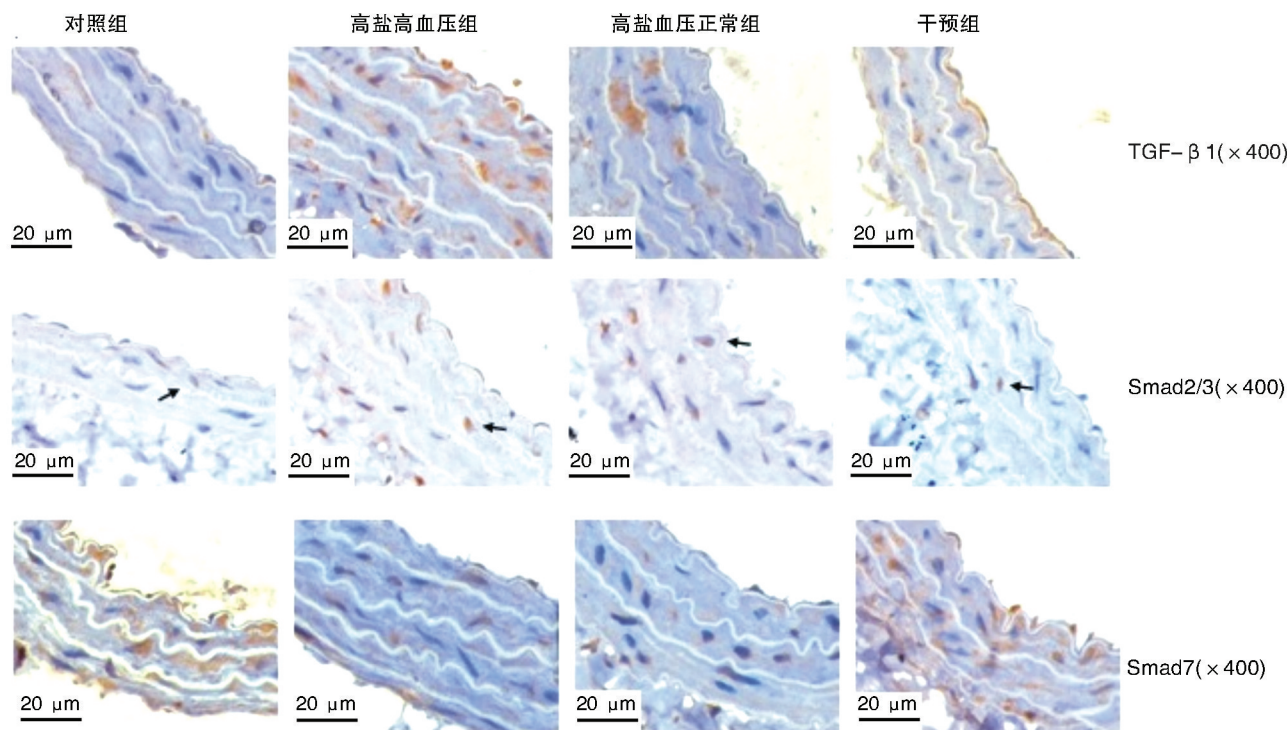


图 3. 免疫组织化学显示大鼠颈动脉中膜 TGF-β1、Smad2/3、Smad7 的表达 →为阳性细胞核。

Figure 3. Expression of rat carotid media TGF-β1, Smad2/3 and Smad7 by immunohistochemical staining

2.5 高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉重构与 Ang II、AT1、AT2、ALD、TGF-β1、p-Smad2/3 及 Smad7 表达的相关性

高盐高血压组颈动脉 MT、MT/LD、PI 及中膜胶原纤维面积比与 Ang II、AT1、ALD、TGF-β1、p-Smad2/3 表达呈正相关($P < 0.05$),与 Smad7 表达

呈负相关($P < 0.01$),与 AT2 表达无相关($P > 0.05$);高盐血压正常组颈动脉 MT、MT/LD、PI 及中膜胶原纤维面积比与 Ang II、AT1、TGF-β1、p-Smad2/3 表达呈正相关($P < 0.05$),与 Smad7 表达呈负相关($P < 0.01$),与 AT2、ALD 表达无相关($P > 0.05$;表 5 和 6)。

表 5. 高盐高血压组颈动脉 MT、MT/LD、PI、中膜胶原纤维面积比与 Ang II、AT1、AT2、ALD、TGF-β1、p-Smad2/3 及 Smad7 的相关性

Table 5. Correlation between carotid MT, MT/LD, PI, collagen fiber area ratio and Ang II, AT1, AT2, ALD, TGF-β1, p-Smad2/3, Smad7 in the high salt hypertension group

高盐高血压组	MT		MT/LD		PI		胶原纤维面积比	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Ang II	0.877	0.001	0.664	0.036	0.753	0.012	0.714	0.020
AT1	0.897	0.000	0.720	0.019	0.867	0.001	0.875	0.001
AT2	0.176	0.627	0.038	0.917	0.196	0.588	0.306	0.390
ALD	0.819	0.004	0.688	0.028	0.878	0.001	0.826	0.003
TGF-β1	0.881	0.001	0.686	0.028	0.824	0.003	0.819	0.004
p-Smad2/3	0.896	0.000	0.815	0.004	0.954	0.000	0.933	0.000
Smad7	-0.799	0.006	-0.713	0.016	-0.854	0.002	-0.783	0.007

3 讨论

大量流行病学和动物实验证实高盐摄入可导致高血压,于海荣等^[8]分别以 4%、6% 及 8% 高盐饲

料组为研究模型,发现 8% 高盐饲料组高血压形成率最高;既往文献报道高盐引起血管重构主要观察主动脉及肠系膜动脉,鲜于研究高盐饮食致颈动脉重塑,故本实验设计高盐组给予 8% NaCl 颗粒饲料

表 6. 高盐血压正常组颈动脉 MT、MT/LD、PI、中膜胶原纤维面积比与 Ang II、AT1、AT2、ALD、TGF-β1、p-Smad2/3、Smad7 的相关性

Table 6. Correlation between carotid MT, MT/LD, PI, collagen fiber area ratio and Ang II, AT1, AT2, ALD, TGF-β1, p-Smad2/3, Smad7 in the high salt normal blood pressure group

高盐高血压 正常组	MT		MT/LD		PI		胶原纤维面积比	
	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>	<i>r</i>	<i>P</i>
Ang II	0.556	0.025	0.683	0.030	0.909	0.000	0.838	0.002
AT1	0.894	0.000	0.669	0.034	0.685	0.029	0.812	0.004
AT2	0.381	0.278	-0.042	0.907	0.277	0.439	0.328	0.355
ALD	0.523	0.120	-0.153	0.672	-0.920	0.801	0.052	0.886
TGF-β1	0.709	0.022	0.865	0.001	0.790	0.007	0.748	0.013
p-Smad2/3	0.903	0.000	0.724	0.018	0.815	0.004	0.843	0.002
Smad7	-0.741	0.014	-0.693	0.026	-0.804	0.005	-0.778	0.008

并观察颈动脉重构情况。实验观察到高盐组只有部分大鼠在饲养第 6 周后尾动脉收缩压明显增高,并持续至实验结束,而另一部分大鼠尾动脉收缩压不增高,既往文献鲜见 8% 高盐饲料饲养 Wistar 大鼠血压不增高的研究报道,进而将高盐组分为高盐高血压组和高盐血压正常组。通过 HE 染色、Masson 染色及 α-actin 和 PCNA 免疫组织化学染色显示高盐高血压组颈动脉 MT 和 MT/LD 增大,胶原纤维沉积,弹性膜紊乱、断裂,平滑肌细胞肥大、增殖、排列紊乱,与曾昭华等^[9]及本课题组前期研究所观察高盐对 Wistar 大鼠主动脉和肠系膜动脉重构^[1,10]是一致的。同时本研究发现高盐血压正常组颈动脉出现与高盐高血压组类似的重塑,提示高盐可独立于血压诱导 Wistar 大鼠颈动脉重塑。Simon 等^[11]的研究亦证明了这点,2% 高盐饮食虽没引起大鼠血压升高,但血管却发生重构。

高盐刺激会导致血管紧张素受体敏感性上调和 Ang II 升高^[12,13], Ang II 在高血压血管重塑中起关键调控作用,它通过 AT1 受体来激活细胞外信号调节激酶 1/2 和 p38MAPK,进一步促进平滑肌细胞增殖和 I 型胶原的合成^[14,15]。本研究发现 Ang II、AT1 在高盐高血压组与高盐血压正常组颈动脉表达均较对照组增多,高盐高血压组和高盐血压正常组之间 Ang II、AT1 的表达无统计学意义;高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉 MT、MT/LD、PI、中膜胶原纤维面积比与 Ang II、AT1 表达呈正相关。提示高盐可独立于血压通过增加 Ang II 及 AT1 的受体密度引起 Wistar 大鼠颈动脉重塑。另一方面,本研究发现高盐高血压组颈动脉中膜 ALD 含量增高,而在高盐血压正常组却没有升高,提示 ALD 可能是高盐导致血压升高的重要因素。以往的研究提示,高血压时,心肌、血管、肾脏中 ACE mRNA 及蛋白表达增加^[16],从而在局部产生更多的 Ang II,后者通过刺

激肾上腺球状带细胞,增加 ALD 含量,进而促进和维持高血压状态;另一方面,过量的盐摄入使醛固酮-盐皮质激素受体轴受抑,导致高血压。

TGF-β1 是目前已知最重要的致纤维化细胞因子之一^[17],其主要作用是增加细胞外基质合成的同时减少其蛋白降解,促进纤维化的发生。Smads 蛋白家族是目前发现 TGF 下游重要的作用底物,Smad2/3 介导 TGF-β 主要的生物学效应;而 Smad7 是 TGF-β 的拮抗蛋白,可以阻止 Smad2/3 磷酸化,从而阻断 TGF-β 的生物学效应^[18]。卫娜等^[19]和 Ying 等^[20]的研究发现,高盐饮食能够导致 TGF-β1 的表达增加,盐促进动脉重构可能部分是通过增加 TGF-β1 的表达而实现的。本研究发现,高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉中膜 TGF-β1、p-Smad2/3 蛋白表达上调,Smad7 蛋白表达降低;高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉 MT、MT/LD、PI、中膜胶原纤维面积比与 TGF-β1、p-Smad2/3 表达呈正相关,与 Smad7 表达呈负相关。提示 TGF-β1 表达的上调促进高盐大鼠颈动脉重构,其下游信号通道蛋白 Smad2/3 表达也相应增多,Smad7 负反途径表达受抑制,而高盐高血压组和高盐血压正常组 TGF-β1、p-Smad2/3、Smad7 蛋白表达无差异。该结果表明 TGFβ1/Smads 信号通路可不依赖于血压增高而诱导高盐大鼠颈动脉重塑。

文献报道 TGF-β 和肾素-血管紧张素系统 (renin angiotensin system, RAS) 相互调节,TGF-β 能刺激肾小球旁细胞释放肾素,使 Ang II 形成增加^[21]; Ang II 在体外能诱导血管平滑肌细胞中 TGF-β 基因表达^[22],并能通过 AT1 受体、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶、蛋白激酶 C、p38MAPK、激活蛋白 1 的序贯活化上调 TGF-β1 的表达,刺激 TGF-β1 转化为活性状态^[23]。基于此理论基础,本研究设置 8% 高盐 + AT1 受体拮抗剂替米沙坦作为干预

组,观察到干预组颈动脉中膜增厚,平滑肌细胞增殖、肥大、排列紊乱明显改善。干预组颈动脉中膜 Ang II 表达较对照组增多,与高盐高血压组和高盐血压正常组无差异,AT1 表达较高盐高血压组和高盐血压正常组减少,ALD 较高盐高血压组减少,其机制考虑是 AT1 拮抗剂通过抑制 Ang II 与 AT1 受体结合,阻断 Ang II 的作用,减少 ALD 分泌。干预组颈动脉中膜 AT2 表达较对照组、高盐高血压组及高盐血压正常组增高,但后三组之间无明显差异;高盐高血压组和高盐血压正常组颈动脉 MT、MT/LD、中膜胶原纤维面积比及 PI 与 AT2 表达无相关。考虑可能是因为 AT1 受体拮抗剂导致血浆 Ang II 增加,通过反馈机制增强了 AT2 受体的作用,AT2 受体激活具有促血管扩张,抑制血管平滑肌及间质成纤维细胞增殖,抑制基质蛋白、胶原蛋白合成等效应^[24]。本研究还观察到干预组颈动脉中膜 TGF-β1、p-Smad2/3 表达明显减少,Smad7 表达明显增多,提示替米沙坦可阻断 Ang II 作用,干扰 TGF-β1/Smads 信号通路,从而逆转颈动脉重构。

综上所述,高盐饮食可直接或通过血压升高导致颈动脉中膜增厚、平滑肌细胞肥大和增殖及胶原堆积,其机制可能与高盐激活 RAS,使 TGF-β1、p-Smad2/3 上调及 Smad7 下调有关,替米沙坦抑制高盐诱导的高血压和颈动脉重构可能是通过抑制 Ang II 与 AT1 结合,调控 TGF-β1/smads 信号通路中 TGF-β1、p-Smad2/3 和 Smad7 的表达。

(致谢:感谢遵义医学院预防医学教研室邹焰教授在实验数据分析上给予的帮助!)

[参考文献]

[1] 刘 婵, 商黔惠, 闵晓强, 等. TGF-β1/Smads 与 ERK 表达在高盐饮食诱导血管重构中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2012, 28 (10): 1 766-772.

[2] 李 同, 商黔惠, 刘 婵, 等. 转化生长因子 β1/Smads 表达在高盐饮食致 Wistar 大鼠心肌纤维化中的作用及替米沙坦干预[J]. 中华高血压杂志, 2013, 21 (7): 648-653.

[3] 刘 燕, 商黔惠, 刘 婵, 等. 替米沙坦降低转化生长因子 β1/Smads 在高盐诱导肾脏纤维化中的表达[J]. 中华高血压杂志, 2013, 21 (7): 659-665.

[4] 宋铁山, 李旭光, 唐茂林. 导入人内皮型一氧化氮合酶基因对高盐饮食大鼠的血压及肾脏功能的影响[J]. 中华高血压杂志, 2007, 15 (4): 303-306.

[5] 余 毅, 吴可贵. 坎地沙坦对盐负荷高血压大鼠肾脏肾素-血管紧张素系统表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2007, 23 (6): 785-790.

[6] Ying WZ, Aaron K, Sanders PW. Mechanism of dietary salt-mediated increase in intravascular production of TGF-β1[J]. Am J Physi-

ol Renal Physiol, 2008, 295 (2): F 406-414.

[7] 顾德官. 实验性高血压大鼠的血压观察[J]. 上海第二医学院学报, 1985, 88 (2): 102-104.

[8] 于海荣, 范洪亮, 梅爱敏, 等. 不同浓度高盐饲料喂养致高血压模型的实验研究[J]. 山东医药, 2012, 52 (32): 34-36.

[9] 曾昭华, Robert MK, 罗碧辉, 等. 一种新的高盐致高血压动物模型及其血管重构改变[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10 (1): 24-28.

[10] 闵晓强, 刘 婵, 商黔惠, 等. 长期高盐饮食及替米沙坦干预对 Wistar 大鼠动脉重构的影响[J]. 中华高血压杂志, 2013, 21 (10): 930-937.

[11] Simon G, Jaeckel M, Illyes G. Development of structural vascular changes in salt-fed rats[J]. Am J Hypertens, 2003, 16 (6): 488-493.

[12] 于国东, 全洪兵, 周 路, 等. 不同钠水摄入对大鼠血压的影响[J]. 中华高血压杂志, 2011, 19 (2): 125-128.

[13] 李旭光, 王家宁, 杨仕林, 等. 重组腺相关病毒介导血管紧张素 II 受体 1 反义基因对高盐饮食诱导的高血压大鼠血压的影响[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2006, 6 (4): 204-207.

[14] 杨 宇, 陈 灿, 黄石安. 肾素-血管紧张素系统与高血压血管重构关系研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14 (13): 1 941-943.

[15] 于潇华, 徐竞欧, 汪煜华, 等. 降钙素基因相关肽通过 p38MAPK/Nox1 通路抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌细胞增殖[J]. 中国动脉硬化杂志, 2012, 20 (3): 246.

[16] Zhou J, Pavel J, Macova M, et al. AT1 receptor blockade regulates the local angiotensin II system in cerebral microvessels from spontaneously hypertensive rats[J]. Stroke, 2006, 37 (5): 1 271-276.

[17] Nathan C. Points of control in inflammation[J]. Nature, 2002, 420 (6917): 846-852.

[18] Goumans MJ, Liu Z, Dijke P. TGF-beta signaling in vascular biology and dysfunction[J]. Cell Res, 2009, 19 (1): 116-127.

[19] 卫 娜, 牟建军, 刘富强, 等. 慢性盐负荷诱导高血压大鼠胸主动脉重构作用[J]. 中国公共卫生, 2011, 5 (27): 591-593.

[20] Ying WZ, Aaron KJ, Sanders PW. Transforming growth factor-β regulates endothelial function during high salt intake in rats[J]. Hypertension, 2013, 62: 951-956.

[21] Touyz RM, Wu XH, He G, et al. Increased angiotensin II-mediated Src signaling via epidermal growth factor receptor transactivation is associated with decreased c-terminal Src kinase activity in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats[J]. Hypertension, 2002, 39 (2): 479-485.

[22] 胡群员, 孙银平, 王 省, 等. 颈总动脉损伤大鼠血浆 Ang II 水平与血管 TGFβ1 的表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2009, 44 (4): 808-811.

[23] Wenzel S, Taimor G, Piper HM, et al. Redox-sensitive intermediates mediate angiotensin II-induced p38 MAP kinase activation, AP-1 binding activity, and TGF-beta expression in adult ventricular cardiomyocytes[J]. FASEB J, 2001, 15 (12): 2 291-293.

[24] Moore MA. Choosing initial antihypertensive drug therapy for the uncomplicated hypertensive Patient[J]. J Clin Hyperten, 2001, 3 (1): 37.