

缝隙连接在维持血管张力及损伤血管修复中的作用

王捷琼, 谭霞, 于学军, 陈剑飞, 宋明宝

(中国人民解放军陆军军医大学新桥医院全军心血管病研究所, 重庆市 400037)

[关键词] 缝隙连接; 血管张力; 损伤血管修复; 内膜增生

[摘要] **目的** 探讨缝隙连接在维持血管张力及损伤血管修复中的作用。**方法** 取大鼠主动脉制成血管环分别测量在 18 α -甘草次酸(18 α -GA)作用前后血管环对去甲肾上腺素(NE)和乙酰胆碱(Ach)反应性变化;建立大鼠颈动脉损伤模型,给予生胃酮 3 mg/(kg·d)腹腔注射,对照组给予生理盐水腹腔注射(2 mL/d),14 天后处死动物,用 HE 和 DAPI-伊文思蓝染色观察新生内膜厚度,细胞免疫荧光染色法及 Western blot 检测靶血管缝隙连接蛋白 43(Cx43)的表达。**结果** 单纯给予 18 α -GA 处理血管环并未出现明显的收缩或舒张反应。对照组给予去甲肾上腺素或乙酰胆碱后血管环发生明显的收缩或舒张反应,而经 18 α -GA 预处理后,去甲肾上腺素或乙酰胆碱引起的血管环收缩或舒张反应显著降低(去甲肾上腺素:0.60 \pm 0.03 比 0.21 \pm 0.04;乙酰胆碱:0.15 \pm 0.01 比 0.62 \pm 0.03; P <0.05)。损伤 2 周生胃酮干预组血管新生内膜增生明显减少,血管腔狭窄减轻。生胃酮干预组新生内膜细胞核数量显著低于对照组(89 \pm 28 比 236 \pm 15, n =5, P <0.01)。免疫荧光染色显示,在形成的新生内膜中 Cx43 表达丰富。Western blot 结果显示,生胃酮干预组 Cx43 的表达显著低于对照组(0.38 \pm 0.11 比 0.93 \pm 0.06, n =3, P <0.01)。**结论** 缝隙连接在生理条件下参与维持及调节血管张力,在病理条件下能够促进血管损伤后新生内膜的过度增生,在血管损伤性疾病的发生、发展过程中具有重要作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Role of gap junctions on the regulation of vascular tension and the repair of vascular injury

WANG Jieqiong, TAN Xia, YU Xuejun, CHEN Jianfei, SONG Mingbao

(Institute of Cardiovascular Disease of People's Liberation Army, Xinqiao Hospital, Army Medical University, Chongqing 400037, China)

[KEY WORDS] gap junction; vascular tension; repair of vascular injury; neointimal formation

[ABSTRACT] **Aim** To explore the role of gap junctions on the regulation of vascular tension and the repair of vascular injury. **Methods** Vascular rings from rat carotid artery were made and used to compare to the changes of vascular response to norepinephrine (NE) or acetylcholine (Ach) with or without 18 α -GA. The model of vascular injury was established with rat carotid balloon injury. And animals were administrated with intraperitoneal injections of carbenoxolone (3 mg/(kg·d)) in carbenoxolone group or saline (2 mL/d) in control group for 2 weeks after carotid balloon injury. After 2 weeks, HE staining and DAPI-Evens blue double staining were applied to evaluate the neointimal formation of targeted vessels. And cell immunofluorescence staining and Western blot were used to detect connexin 43 (Cx43) expression on targeted vessels. **Results** 18 α -GA alone didn't cause significant response of vascular rings to systole or diastole. In control group, NE or Ach could induce vascular rings to contract or relax, but 18 α -GA could inhibit the contraction or relaxation of vascular rings triggered by NE or Ach (NE: 0.60 \pm 0.03 vs. 0.21 \pm 0.04; Ach: 0.15 \pm 0.01 vs. 0.62 \pm 0.03; P <0.05). 2 weeks after carotid balloon injury, carbenoxolone could significantly reduce the neointimal formation and the stenosis of blood vessel lumen. The number of neointimal nuclei in the carbenoxolone group was significantly lower than that in the control group (89 \pm 28 vs. 236 \pm 15, n =5, P <0.01). Immunofluorescence staining showed that Cx43 was abundant in neointima. Western blot results also suggested that the expression of Cx43 in the carbenoxolone group was significantly

[收稿日期] 2017-11-06

[修回日期] 2018-01-03

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30570765)

[作者简介] 王捷琼,研究方向为心血管介入护理,E-mail 为 63650673@qq.com。通信作者宋明宝,博士,副主任医师,研究方向为血管损伤性疾病的防治,E-mail 为 smb0939@163.com。

lower than that in the control group (0.93 ± 0.06 vs. 0.38 ± 0.11 , $n=3$, $P<0.01$). **Conclusions** Gap junctions participate in maintaining and regulating vascular tension under the physiological condition, and promote the neointimal formation after vascular injury under the pathological condition. Hence, gap junctions play a key role on the development and progression of vascular injury diseases.

血管壁维持适当的张力在调节血压及血流分布中具有重要的作用。而血管壁张力的维持需要血管壁的主要组成成分血管内皮细胞与血管平滑肌细胞间的相互作用及协同反应^[1]。既往认为,血管细胞间通过自分泌和旁分泌产生多种生物活性物质而相互调节^[2]。近年来研究发现,在动脉的细胞层及细胞层之间存在形态学上可辨别的缝隙连接。这种连接允许在内皮细胞-平滑肌细胞之间进行信息传递,而这些功能性细胞偶联可能参与多种调节细胞张力的反应,使内皮细胞与平滑肌细胞在受到各种刺激后能够产生协同反应以维持正常的血管张力^[3]。

血管损伤后不良修复反应是血管损伤性疾病如动脉粥样硬化、血管成形术后再狭窄等主要的病理生理学基础,其中关键环节是血管平滑肌细胞由血管壁中层向内膜迁移并增殖,从而导致新生内膜形成并导致血管狭窄。近年来研究发现,增殖的血管平滑肌细胞中缝隙连接蛋白 43 (connexin 43, Cx43) 表达增加,而抑制 Cx43 的表达能够限制新生内膜的过度增生^[4]。因此,缝隙连接蛋白在血管损伤后不良修复反应中具有重要的作用,但缝隙连接蛋白是通过其形成缝隙连接的作用起作用还是缝隙连接蛋白独立于缝隙连接作用的自身生物学功能起作用,目前仍不清楚。为此,本研究采用颈动脉血管环模型及颈动脉损伤模型来观察缝隙连接特异性阻断剂对血管张力调节及损伤血管新生内膜过度增生的影响,从而为血管损伤性疾病的防治提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

无特定病原体级实验动物级 SD 大鼠,体重 150~180 g,由陆军军医大学实验动物中心提供。生胃酮、伊文思蓝、6-羧基荧光素乙酸乙酰盐 (6-carboxy-fluorescein diacetate, 6-CFDA; 产品号: C5041)、18 α -甘草次酸 (18 α -glycyrrhetinic acid, 18 α -GA) 购于美国 Sigma 公司;羊抗大鼠 Cx37、Cx40、Cx43 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz 公司;兔抗人 VIII 因子相关抗

原抗体、羊抗兔及兔抗羊-FITC IgM 购于北京中杉公司;其它试剂购于美国 Sigma 公司。激光共聚焦显微成像仪 (Leica TCSNT, 德国) 及多导生理记录仪 (PowerLab, 澳大利亚)。

1.2 颈动脉血管环的制备

将 SD 大鼠给予 30 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,固定在手术台上,用组织剪剪开颈部皮肤,用血管钳钝性分离颈部肌肉,暴露两侧颈动脉主干,用角膜剪剪下颈动脉主干后放入盛有 K-H 液的培养皿中,用角膜钳和角膜剪仔细、轻柔的去除周围脂肪及结缔组织并保留血管内皮,将动脉条断离成 2~3 mm 的环以供使用。

1.3 血管反应性测定

1.3.1 收缩反应性测定 保留内皮的动脉环置于含 K-H 液的恒温 (37 $^{\circ}$ C) 离体器官灌流槽中,一端固定,另一端通过张力换能器连接至多导生理记录仪。灌流槽不间断通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体,每 30 min 更换一次液体。动脉环在 0.5 g 前负荷下平衡 60 min,将记录值定为 0,待曲线稳定后方可开始实验。浴槽中加入终浓度为 10⁻⁵ mol/L 去甲肾上腺素以观察颈动脉血管环的反应,记录血管环产生的最大收缩力 (E_{max})。另外,在浴槽中加入 18 α -GA 使其终浓度为 50 μ mol/L,将血管环放入浴槽孵育 1 h 后,在浴槽中加入 10⁻⁵ mol/L 去甲肾上腺素以观察血管环的反应性。

1.3.2 舒张反应性测定 动脉环置于含 K-H 液的恒温 (37 $^{\circ}$ C) 离体器官灌流槽中,一端固定,另一端通过张力换能器连接至多导生理记录仪。灌流槽不间断通入 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体,每 30 min 更换一次液体。动脉环在 1 g 前负荷下平衡 60 min,将记录值定为 1,待曲线稳定后方可开始实验。浴槽中加入终浓度为 10⁻⁵ mol/L 乙酰胆碱以观察颈动脉血管环的反应,记录血管环产生的最大舒张力 (E_{max})。另外,在浴槽中加入 18 α -GA 使其终浓度为 50 μ mol/L,将血管环放入浴槽孵育 1 h 后,在浴槽中加入 10⁻⁵ mol/L 乙酰胆碱以观察血管环的反应性。

1.4 大鼠颈动脉球囊损伤模型的建立

参照韩雅玲等^[5]方法。将 SD 大鼠用 2% 戊巴

比妥 (50 mg/kg) 腹腔麻醉。取颈部正中切口, 颈外静脉注射肝素钠 100 U/kg。无菌条件下纵切颈部皮肤, 分离肌肉, 游离出颈总动脉、颈外动脉和颈内动脉。暂时阻断颈总动脉近心端及颈外动脉血流, 结扎颈内动脉远心端, 用眼科剪在结扎点旁距颈内动脉分叉点约 3 mm 处剪开动脉, 将 1.5F 的 Fogarty 球囊导管从切口处插入颈总动脉约 1.5 cm, 1.5 大气压充盈球囊, 使球囊刚好能在血管中拉动, 在远心端缓慢回拉球囊至颈内、颈外动脉分叉处, 重复拉动 3 次, 每次间隔 2 min, 间隔期球囊处于充盈状态, 以使损伤区缺血缺氧。结扎颈内动脉分叉处, 常规缝合皮下组织和皮肤。18 只大鼠, 随机分 3 组, 每组 6 只: ①单纯球囊损伤组; ②生胃酮干预组: 球囊损伤后给予生胃酮 3 mg/kg 腹腔注射, 每天一次; ③对照组: 球囊损伤后给予生理盐水 2 mL 腹腔注射, 每天一次。2 周后处死动物, 取出病变血管段, OCT 包埋后行冰冻切片, 经冷丙酮固定 5 min, 晾干后置于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.5 DAPI-伊文思蓝双染色

14 天后处死动物, 取出病变血管段, OCT 包埋后行冰冻切片, 连续切片 30 张, 冷丙酮固定 5 min, 空气晾干, 每隔 10 张取 1 张, 切片厚度 4 μm; PBS 洗涤 2 min×3 次; 滴加 DAPI 工作液于切片上, 避光室温下孵育 2 min; PBS 洗涤 2 min×3 次; 滴加 0.3% 伊文思蓝于切片上, 避光室温孵育 5 min; PBS 洗涤 2 min×3 次; 荧光倒置显微镜观察, 分别用绿色荧光和蓝色荧光对同一视野摄像, 通过计算机图像分析软件 Image-Pro plus 5.0 叠加后测定内膜的细胞核数量以代表新生内膜形成情况。

1.6 损伤血管新生内膜 Cx43 免疫荧光染色

PBS 漂洗 1 次; 0.3% Triton-X100 室温下孵育 10 min; PBS 洗涤 5 min×3 次; 10% 正常兔封闭血清 37℃ 孵育 20 min; 吸弃封闭血清, 滴加羊抗 Cx43 多克隆抗体 (1:100 稀释), 阴性对照组用 PBS 替代一抗, 置于湿盒中 4℃ 冰箱过夜; PBS 洗涤 5 min×3 次; 滴加 FITC 标记兔抗羊 IgG (用 0.3% 伊文思蓝按 1:200 稀释), 37℃ 孵育 60 min; PBS 洗涤 5 min×3 次; 荧光倒置显微镜观察照相。

1.7 Western blot 检测损伤血管新生内膜 Cx43 的表达

常规提取颈动脉总蛋白, 采用二喹啉甲酸法测定蛋白浓度后, 取蛋白样品加入适量的上样缓冲液, 置于沸水中持续 8 min 使蛋白变性, 于 SDS 聚丙

烯酰胺凝胶进行电泳分离, 电泳完毕后将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上, 充分封闭后, 分别加入 Cx43 和 β-actin 抗体, 4℃ 过夜, 洗膜后再加入特定比例稀释好的二抗溶液室温孵育 2 h, 再次洗膜后与增强发光液 (ECL) 反应, 置于 X 线胶片暗盒中曝光、显影。Quantity One 4.0 分析软件检测并分析条带的灰度值。

1.8 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用方差分析。在血管反应性测定中, 加 18α-GA 前后均数比较行配对样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缝隙连接对颈动脉血管环反应性的影响

根据预实验结果血管环对 10^{-5} mol/L 去甲肾上腺素或乙酰胆碱可产生明显的反应, 故本研究采用 10^{-5} mol/L 的药物刺激浓度来进行观察。单纯给予 18α-GA 处理血管环并未出现明显的收缩或舒张反应; 对照组给予去甲肾上腺素或乙酰胆碱后, 血管环发生明显的收缩或舒张反应, 而经 18α-GA 预处理后去甲肾上腺素或乙酰胆碱引起的血管环收缩或舒张反应幅度显著降低 ($P < 0.05$; 表 1)。

表 1. 不同的刺激下血管张力变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 1. The changes of vascular tension after stimulated with different drug ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

项目	去甲肾上腺素	乙酰胆碱
对照组	0.60±0.03	0.15±0.01
18α-GA	0.21±0.04 ^a	0.62±0.03 ^a

^a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.2 缝隙连接在血管损伤后新生内膜形成中的作用

正常血管腔内膜可见一层扁平的内皮细胞层覆盖, 血管各层分界清楚, 未见新生内膜增生。颈动脉经球囊损伤 2 周后, 可见血管腔新生内膜增生明显, 血管腔狭窄 (图 1)。损伤 2 周生胃酮干预组血管新生内膜增生明显减少, 血管腔狭窄减轻 (图 2)。用新生内膜细胞核计数的方法^[6]评价新生内膜形成情况, 结果显示, 生胃酮干预组新生内膜细胞核数量显著低于对照组 (89 ± 28 比 236 ± 15 , $n = 5$, $P < 0.01$; 图 3)。

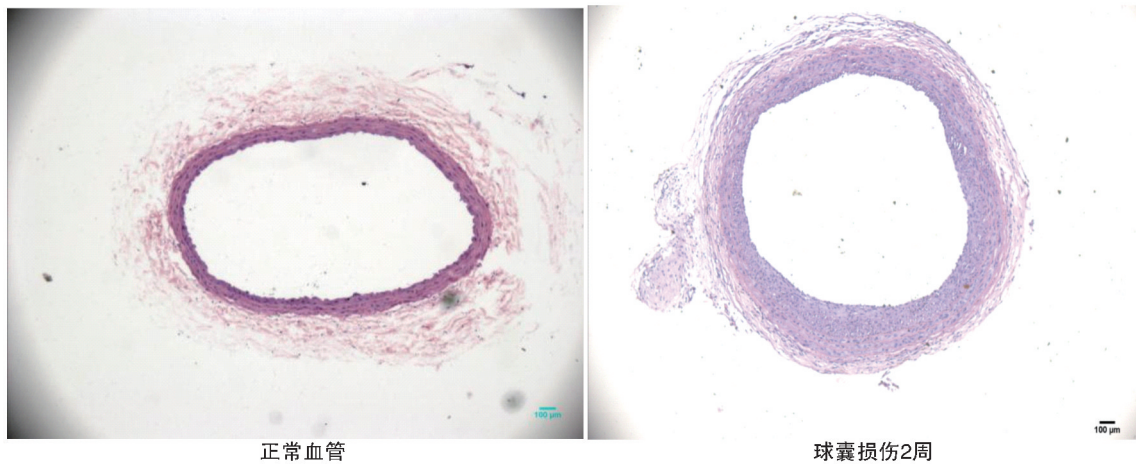


图 1. 血管 HE 染色

Figure 1. HE staining of target vessels

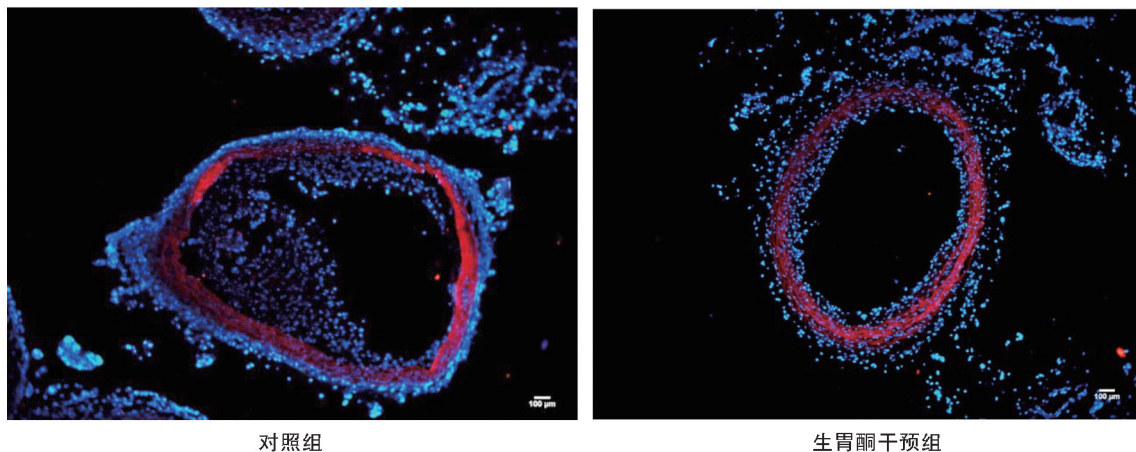
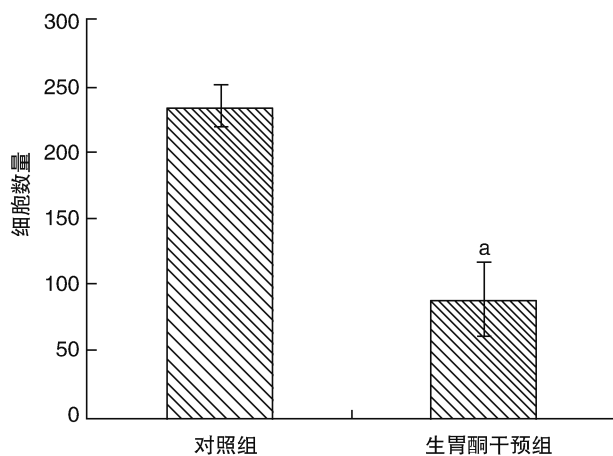


图 2. 生胃酮对血管损伤后新生内膜形成的影响

Figure 2. The effect of carbenoxolone on neointima formation after artery injury

图 3. 生胃酮对血管损伤后新生内膜形成的影响 ($n=5$)a 为 $P<0.01$, 与对照组比较。Figure 3. The effect of carbenoxolone on neointima formation after artery injury ($n=5$)

2.3 Cx43 在损伤血管新生内膜中的表达

颈动脉球囊损伤 2 周后, 损伤血管内膜增生明显, 血管管腔显著狭窄, 而假手术组则未见血管新生内膜形成及血管腔狭窄。球囊损伤后 2 周血管组织切片免疫荧光染色发现, 在形成的新生内膜中 Cx43 表达丰富 (图 4)。Western blot 结果显示, 对照组 Cx43 的表达显著高于生胃酮干预组 (0.93 ± 0.06 比 0.38 ± 0.11 , $n=3$, $P<0.01$; 图 5), 新生内膜形成与 Cx43 的表达量相关。

3 讨论

内皮细胞和血管平滑肌细胞是血管壁主要组成细胞, 而维持正常的血管功能需要内皮细胞与血管平滑肌细胞间的相互作用, 而两种细胞间相互作用的异常或丢失可能是血管损伤性疾病发生的关

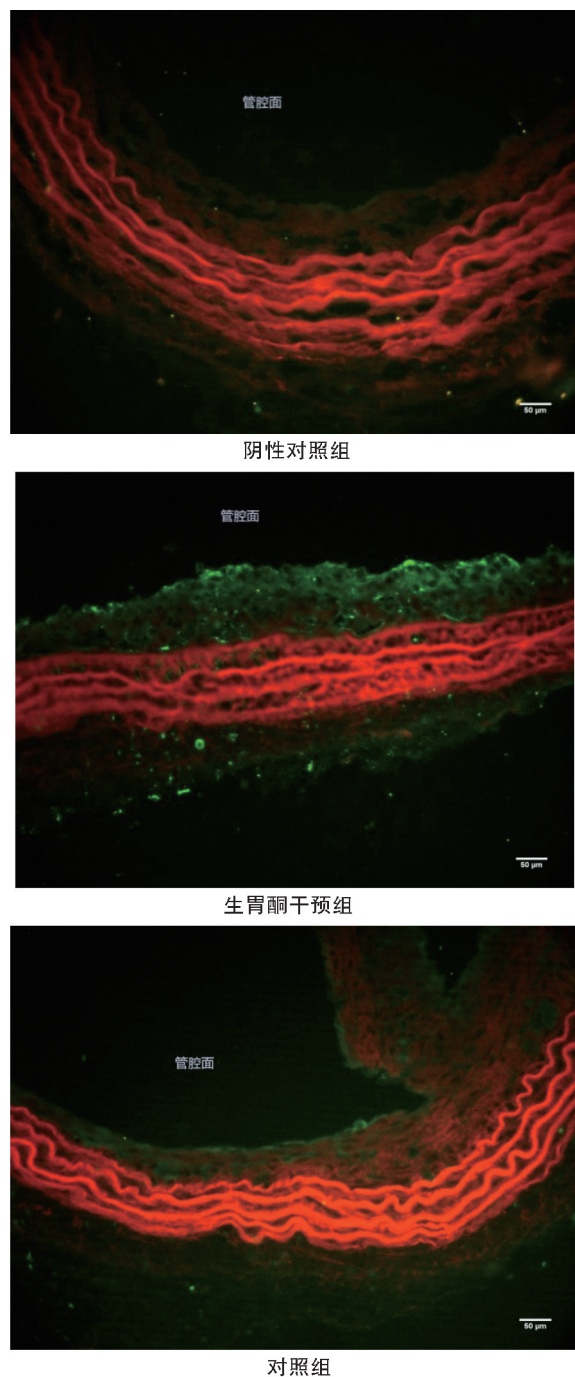


图 4. 免疫荧光染色检测生胃酮对新生内膜中 Cx43 蛋白表达的影响 (200×)

Figure 4. The effect of carbenoxolone on the expression of Cx43 in neointima by immunofluorescence staining (200×)

键步骤^[6]。近来研究发现,缝隙连接为细胞间的相互作用提供了一个简便、直接的通讯平台。同种细胞间可形成丰富的缝隙连接以便进行信息传递,而异种细胞间也可形成缝隙连接。通过细胞间的缝隙连接就使得整个动脉壁作为一个功能单位,对于兴奋性和非兴奋性刺激做出统一的反应,使血管能够迅速、及时的发挥其作用^[7],从而维持血管的生

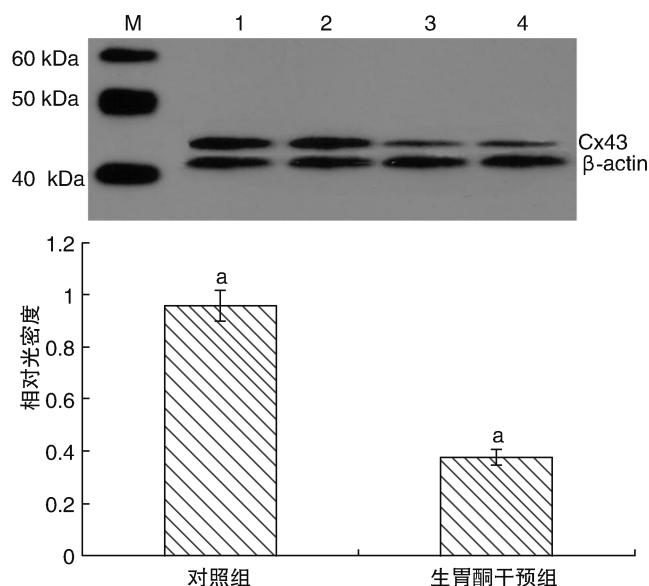


图 5. Western blot 检测生胃酮对新生内膜中 Cx43 蛋白表达的影响 ($n=3$) M 为 Marker, 1、2 道为对照组, 3、4 道为生胃酮干预组。a 为 $P<0.01$, 与对照组比较。

Figure 5. The effect of carbenoxolone on the expression of Cx43 in neointima by Western blot

理学作用,也为进行特异性干预提供基础。

本研究结果发现,在颈动脉血管环模型中,给予去甲肾上腺素或乙酰胆碱刺激后,血管环出现明显的收缩或舒张反应,而在给予缝隙连接特异性阻断剂 18α -GA 预处理后,血管环对相同浓度的去甲肾上腺素或乙酰胆碱刺激的反应性显著被抑制。这些均提示缝隙连接在维持血管正常功能中起重要作用。

在病理条件下,机械、炎症等损伤因素损伤血管内皮可诱导炎性细胞浸入、血管平滑肌细胞增殖,最终导致粥样硬化、斑块破裂及血管再狭窄,是粥样硬化斑块形成的始动因素,也是血管损伤后不良修复反应的主要原因之一^[8]。本研究也证实,在用球囊损伤颈动脉血管内皮后,出现血管平滑肌细胞增殖、迁移,14 天后内膜显著增生并导致血管管腔狭窄。因此,抑制血管损伤后出现的新生内膜形成是血管损伤性疾病防治的关键。Yeh 等^[9]研究发现,在大鼠颈动脉损伤后 9 天,新生内膜开始形成,并且在新生内膜中合成血管平滑肌细胞表达丰富的缝隙连接蛋白 Cx43。本研究也发现,在颈动脉损伤后形成的新生内膜中免疫荧光染色可见丰富的 Cx43 表达,Western blot 也进一步证实形成新生内膜的血管中 Cx43 表达量显著高于生胃酮干预组。这些均提示缝隙连接蛋白在血管平滑肌细胞增殖、

迁移以形成新生内膜的过程中扮演重要角色。

为此,本研究采用了大鼠颈动脉损伤模型,观察生胃酮对颈动脉损伤血管新生内膜形成的影响,结果发现,颈动脉损伤2周后,对照组血管损伤部位内膜增生显著、管腔显著狭窄,而生胃酮干预组形成的新生内膜明显少于对照组而且管腔狭窄较轻。生胃酮是一种缝隙连接特异性的阻断剂,可有效阻断经缝隙连接介导的细胞间的通讯。因此,本研究也说明表达上调的Cx43通过组成细胞间的缝隙连接以增强细胞间的通讯从而发挥缝隙连接促进细胞增殖、迁移等细胞生物学过程以促进新生内膜的过度增生。我们以前的研究证实,缝隙连接阻断剂能够抑制血管平滑肌细胞增殖并促进血管平滑肌细胞由合成型转化为收缩型^[10]。而血管平滑肌细胞表型的转化是血管平滑肌细胞参与新生内膜形成的起始环节。因此,生胃酮抑制新生内膜形成可能主要与抑制血管平滑肌细胞由收缩型转化为合成型有关。因此,探讨缝隙连接在血管损伤性疾病中的作用将为血管损伤性疾病的防治提供新的策略。

[参考文献]

- [1] Leybaert L, Lampe PD, Dhein S, et al. Connexins in cardiovascular and neurovascular health and disease: pharmacological implications[J]. *Pharmacol Rev*, 2017, 69(4): 396-478.
- [2] Dora KA. Cell-cell communication in the vessel wall[J]. *Vasc Med*, 2001, 6(1): 43-50.
- [3] Wang LJ, Liu WD, Zhang L, et al. Enhanced expression of Cx43 and gap junction communication in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(5): 4083-4090.
- [4] Sun W, Huang Y, Yin T, et al. Effects of elemene on inhibiting proliferation of vascular smooth muscle cells and promoting reendothelialization at the stent implantation site[J]. *Biomater Sci*, 2017, 5(6): 1144-1155.
- [5] 韩雅玲, 康建, 王效增, 等. 低浓度脂多糖加速大鼠颈动脉球囊损伤后新生内膜的过度增生[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(5): 849-854.
- [6] Pfenniger A, Chanson M, Kwak BR. Connexins in atherosclerosis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1828(1): 157-166.
- [7] de Wit C, Wolfle SE, Hopfl B. Connexin-dependent communication within the vascular wall: contribution to the control of arteriolar diameter[J]. *Adv Cardiol*, 2006, 42: 268-283.
- [8] Orekhov AN, Andreeva ER, Bobryshev YV. Cellular mechanisms of human atherosclerosis: Role of cell-to-cell communications in subendothelial cell functions[J]. *Tissue Cell*, 2016, 48(1): 25-34.
- [9] Yeh HI, Lee PY, Su CH, et al. Reduced expression of endothelial connexins 43 and 37 in hypertensive rats is rectified after 7-day carvedilol treatment[J]. *Am J Hypertens*, 2006, 19(2): 129-135.
- [10] 宋明宝, 黄岚, 于学军, 等. 缝隙连接阻断剂对体外培养的大鼠血管平滑肌细胞表型转化的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(2): 85-88.

(此文编辑 文玉珊)