

· 基础研究 ·

缝隙连接对正常血压和自发性高血压大鼠肠系膜动脉收缩反应的影响*

蒋学伟, 司军强, 李 丽, 赵 磊, 魏丽丽, 陈新燕, 马克涛[△]

(石河子大学医学院生理学教研室, 新疆石河子 832002)

摘要:目的 本研究通过给予 KCl 和 PE, 观察正常血压 Wistar 大鼠和自发性高血压大鼠 (SHR) 肠系膜动脉 (MA) 收缩反应的异同, 并探讨细胞间缝隙连接在血管收缩反应中的作用。方法 应用压力肌动图技术, 在急性分离的 Wistar 大鼠和 SHR 的 MA 2 级动脉分支上, 观察内皮非依赖血管收缩剂 KCl 和 PE 对血管收缩的影响以及应用缝隙连接阻断剂 2-APB 后对血管收缩反应的影响。结果 (1) KCl 和 PE 可以引起浓度依赖的收缩反应, 且在 SHR MA 上 KCl 和 PE 引起的收缩幅度高于 Wistar 大鼠, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 (2) 预灌流缝隙连接阻断剂 2-APB (100 $\mu\text{mol/L}$) 后 KCl 和 PE 引起的血管收缩均显著降低 ($P < 0.05$), 其中 SHR 降低幅度更加显著 ($P < 0.01$)。结论 内皮非依赖收缩剂 KCl 和 PE 引起的 SHR MA 收缩幅度增强可能是通过增强血管平滑肌细胞间缝隙连接通讯增强介导。

关键词: 大鼠, 近交 SHR; 肠系膜动脉; 2-APB; 缝隙连接; 收缩剂

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.12.018

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)12-1365-03

The effects of gap junction on the mesenteric artery contraction activities in normotensive rats and spontaneously hypertensive rats*

Jiang Xuewei, Si Junqiang, Li Li, Zhao Lei, Wei Lili, Chen Xinyan, Ma Ketao[△]

(Department of Physiology, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China)

Abstract: Objective To compare the contraction activities of mesenteric artery (MA) induced by KCl and PE between normotensive Wistar rats and spontaneously hypertensive rats (SHR), and to investigate the effects of gap junction on the vascular contraction activities. Methods Pressure myograph was used to observe the influences of KCl and PE (endothelial independent vasoconstrictor) on the vascular contraction activities, and the differences after applying 2-APB (gap junction blockers) in acute separated MA of Wistar rats and SHR. Results (1) KCl and PE induced concentration-dependently contraction reactions, and the contraction amplitudes induced by KCl and PE was higher in SHR than Wistar rats respectively, there was significant difference ($P < 0.05$). (2) After application 2-APB (100 $\mu\text{mol/L}$), the contraction amplitudes of mesenteric artery induced by KCl and PE was obviously suppressed respectively ($P < 0.05$), and more significantly in SHR ($P < 0.01$). Conclusion the contraction reactions of mesenteric artery in SHR are higher than in Wistar rats through increasing the gap junction communication among smooth muscle cells of MA in SHR.

Key words: rats, inbred SHR; mesenteric arteries; 2-APB; gap junction; vasoconstrictor

高血压是多种心血管疾病的危险因素^[1], 而高血压的直接发病学环节为外周血管压力增高^[2]。微小动脉决定了血管的外周阻力, 即血液循环的阻力主要在微小血管节段形成, 血压落差达 90%^[3]。微小动脉血管由内皮细胞和平滑肌细胞组成, 细胞间都存在着大量的由缝隙连接介导的电和化学信号交流。这就使得血管壁能够在纵向上和横向上保持电和机械活动的同步, 对兴奋或非兴奋作出统一的反应, 维持了血管生理功能的稳定和一致^[4-6]。血管紧张度的增加是高血压发病的关键, 而血管平滑肌舒缩是依赖细胞间的信号物质进行调节的。细胞间的通讯方式可分为间接与直接方式, 以细胞间的缝隙连接为途径进行的细胞间直接的信息交流, 称为直接通讯^[7]。病理情况下, 细胞间缝隙连接的结构组成和功能受到损伤, 使血管细胞间的同步收缩发生障碍^[8]。本实验旨在研究高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 与正常血压 Wistar 大鼠肠系膜动脉 (mesenteric artery, MA) 收缩活动的规律, 并

探讨缝隙连接通讯对 MA 收缩活动的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 选择 SHR (购自北京维通利华实验动物有限责任公司, 许可证编号 SCXK 京 2007-0001) 及 Wistar 大鼠 (购自新疆医科大学实验动物中心, 许可证编号 SCXK 新 2003-0001)。体质量在 200~250 g, 雌雄不拘, 清洁级。SHR 为实验组, Wistar 大鼠为对照组。

1.2 方 法

1.2.1 主要试剂与仪器 2-Aminoethoxydiphenyl Borate (2-APB)、苯肾上腺素 (phenylephrine, PE)、乙酰胆碱 (acetylcholine, ACh)、购于 Sigma 公司; 去甲肾上腺素 (norepinephrine, NE)、KCl 及其余试剂均为国产分析纯。压力型小动脉测量仪 (pressure myograph system, DMT, 110P, Denmark)。

1.2.2 溶液制备 生理盐溶液 (physiologic salt solution, PSS) 成分 (mmol/L): NaCl 118.9, KCl 4.69, MgSO₄ · 7H₂O

* 基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2012CB526600); 国家自然科学基金 (31260247); 国家人力资源和社会保障部留学回国人员科技活动项目 (2011LX003); 兵团博士基金项目 (2010JC16); 兵团医药专项 (2012BA021, 2010GG33); 杰出青年科技人才培养计划 (2012ZRKXJQ01)。作者简介: 蒋学伟 (1986~), 硕士, 主要从事心血管生理的研究。△ 通讯作者, Tel: (0993) 2057137; E-mail: maketao@hotmail.com。

1.17, KH_2PO_4 1.18, CaCl_2 2.5, NaHCO_3 25, 乙二胺四乙酸 (ethylenediamine tetracetic acid, EDTA) 0.026, 葡萄糖 5.5; K-PSS 溶液成分是 (mmol/L): KCl 123.70, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.17, KH_2PO_4 1.18, CaCl_2 2.5, NaHCO_3 25, EDTA 0.026, 葡萄糖 5.5; 将液体充入混合气体 95% O_2 、5% CO_2 调节 pH 至 7.40 使用。去甲肾上腺素及乙酰胆碱分别配制为 10 nmol/L 及 10 $\mu\text{mol/L}$ 备用。

1.2.3 大鼠无创血压测定 大鼠于 37 $^\circ\text{C}$ 预热 15 min, 用 BP-6 无创血压监测仪测量大鼠清醒安静状态下尾动脉的血压, 以测量 3 次后平均值为大鼠收缩压。

1.2.4 大鼠 MA 段的制备^[9] 大鼠麻醉后断头处死, 迅速打开腹腔, 找到近幽门 10 cm 内的带系膜的肠管, 延肠系膜血管走行方向扇形剪断, 将其放置于已用 95% O_2 、5% CO_2 混合气体氧饱和的 4 $^\circ\text{C}$ 的 PSS 中。在解剖显微镜下小心分离肠系膜血管 2 级动脉分支。剪取 2~3 mm 无分支的血管段后, 移入装有 PSS 液的灌流槽内。将血管套接在玻璃插管上, 用 10-0 眼科尼龙线扎牢。血管内、外持续灌流 95% O_2 、5% CO_2 混合气体平衡的 37 $^\circ\text{C}$ PSS 液。

1.2.5 血管收缩和舒张功能检测 血管段在 PSS 液中平衡 1 h 后进行标准化^[10]。孵育 30 min, 先用血管活性剂 10 nmol/L NE 激动动脉段收缩, 收缩达到最大或平稳后, 用 10 $\mu\text{mol/L}$ ACh 舒张, 之后用 PSS 液洗涤 4 次, 准备实验。在标准化中, 以 K-PSS 液检测动脉段收缩性, 两次收缩幅度相差小于 10%, 用 ACh 舒张时, 舒张率大于 80% 认为内皮完整, 可用于实验。

1.2.6 记录药物对微小动脉段离体标本作用前后血管直径的变化 用 Myoview 软件(丹麦 DMT 公司)控制血管内压力稳定在 60 mm Hg, 温度维持在 37 $^\circ\text{C}$ 。打开负压吸引器, 将水浴槽内的 PSS 液控制在 5 mL, 依次用微量移液器向浴槽中以累积法依次加入不同浓度 KCl(10~120 mmol/L) 和 PE(0.1~100.0 $\mu\text{mol/L}$), 记录实验前后血管直径的变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 分析软件完成统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 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 SHR 和 WKY 尾动脉血压 SHR 的收缩压为 (187.7 \pm 9.6, $n=9$) mm Hg, 明显高于 Wistar 大鼠的收缩 (121.2 \pm 10.6, $n=12$) mm Hg, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

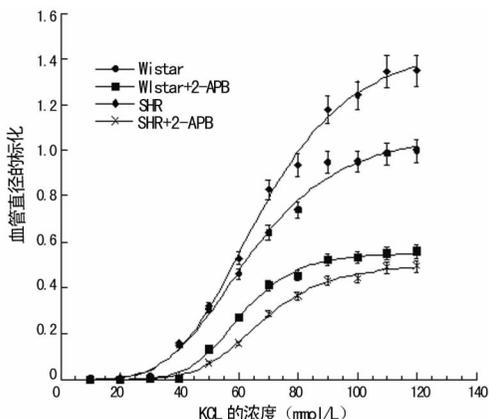
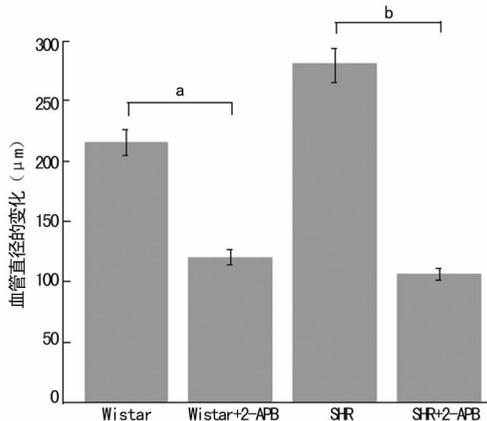


图 1 血管收缩剂 KCl 引起的血管直径变化曲线

2.2 SHR 上 KCl 对 MA 收缩作用增强 内皮非依赖血管收

缩剂 KCl(10~120 mmol/L)可引起 SHR 和 Wistar 大鼠 MA 浓度依赖的收缩, 且在 SHR 上 KCl(60~120 mmol/L)引起的收缩幅度高于 Wistar 大鼠, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1。其中 120 mmol/L KCl 在 SHR 和 Wistar 大鼠 MA 上引起的收缩幅度分别为 (279.8 \pm 14.5) μm ($n=6$) 和 (215.7 \pm 9.8) μm ($n=4$)。应用缝隙连接阻断剂 2-APB(100 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 20 min 后, KCl 引起 SHR 和 Wistar 大鼠 MA 收缩幅度显著降低。KCl 引起的收缩幅度分别下降至 (106.5 \pm 13.0) μm 和 (120.9 \pm 11.2) μm , SHR 下降更为显著 ($P < 0.01$), 见图 2。



^a: $P < 0.05$; ^b: $P < 0.01$ 。

图 2 不同组别的血管给予 120 mmol/L KCl 引起的血管直径的变化

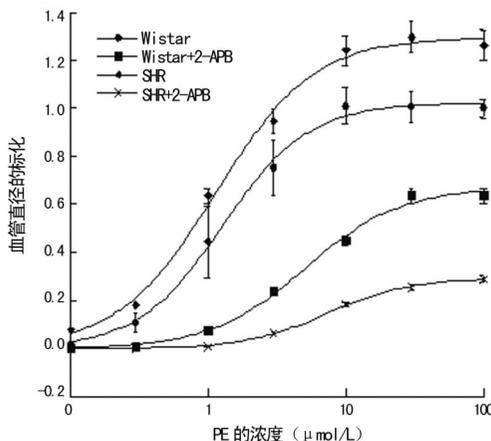
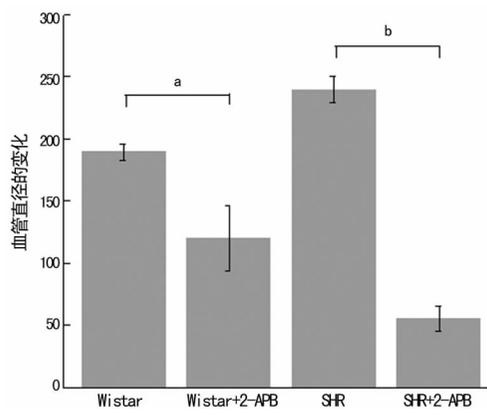


图 3 血管收缩剂 PE 的血管反应曲线



^a: $P < 0.05$; ^b: $P < 0.01$ 。

图 4 不同组别的血管给予 100 $\mu\text{mol/L}$ PE 引起的血管直径的变化

2.3 缝隙连接在 PE 引起 MA 收缩反应中的作用 内皮非依赖血管收缩剂 PE(0.1~100.0 $\mu\text{mol/L}$)可引起 SHR 和 Wistar 大鼠 MA 浓度依赖的收缩,且在 SHR 上 PE(1~100 $\mu\text{mol/L}$)引起的收缩幅度高于 Wistar 大鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3。其中 100 $\mu\text{mol/L}$ PE 在 SHR 和 Wistar 大鼠 MA 上引起的收缩幅度分别为(239.5 ± 10.9) μm ($n=3$)和(189.7 ± 6.6) μm ($n=8$)。应用 2-APB(100 $\mu\text{mol/L}$)后,PE 引起 SHR 和 Wistar 大鼠 MA 收缩幅度显著降低。PE 引起的收缩幅度分别下降至(54.7 ± 9.9) μm 和(120.8 ± 26.0) μm ,SHR 下降更为明显($P < 0.01$),见图 4。

3 讨论

SHR 作为人类原发性高血压研究及高血压药物筛选的动物模型,其心输出量不变而外周总阻力明显增高,导致血压升高,但其发病机制尚不清楚。在高血压发展过程中,血管病变主要包括结构改变和功能异常两方面,结构改变表现在血管平滑肌细胞肥大、增殖及结缔组织水平增加。血管功能改变主要为血管反应性变化,即血管对各种缩血管物质的反应明显增高。外周血管阻力主要来自内脏器官小血管与骨骼肌血管^[11],MA 的 2~3 级分支符合此特点,因此,选择以 MA 为研究对象更接近于阻力血管对血压的调节。

血管平滑肌舒缩是依赖细胞间的信号物质进行调节的。平滑肌细胞之间相互调节作用除了由旁分泌及自分泌介导的间接通讯外,可能还涉及由缝隙连接介导直接通讯的作用^[12]。血管平滑肌细胞增殖、迁移和表型的变化导致的血管壁增厚和血管紧张度的增加是高血压发病的关键。由缝隙连接蛋白构成的直接通讯—缝隙连接在调节血管舒缩、血管平滑肌细胞增殖、平滑肌的表型转变中起着重要作用,并与高血压发生密切相关^[13]。

血管微小动脉主要是由内皮细胞和平滑肌细胞组成,其中内皮细胞、平滑肌细胞间、内皮细胞与平滑肌细胞间都存在着大量的有缝隙连接介导的电和化学信号交流,这就使得血管壁能够在纵向上和横向上保持点活动、机械活动的同步性,使得整个血管成为统一的功能单位,对兴奋或非兴奋作出统一的反应,维持了血管生理功能的稳定和一致^[4-6]。病理情况下,细胞间缝隙连接的机构和功能受到损伤,使血管细胞间的同步收缩发生障碍^[8]。各种类型高血压都源于血管紧张度的改变,缝隙连接在血管运动中起到关键的调节作用,为血管提供了血管舒缩运动的直接通路。通过以上研究发现缝隙连接在血管上发挥着重要的作用。

本实验结果更验证了缝隙连接在 SHR MA 上表达增强。这与已有文献报道一致^[13]。

总之,通过文献及本实验得知,在高血压状态下,肠系膜阻力血管对血管收缩剂的反应性明显提高,考虑自发性高血压可能造成的 MA 血管上的缝隙连接蛋白表达增强,缝隙连接功能增加。这一结果显示,缝隙连接在高血压患者引起血管性疾病中发挥重要作用,缝隙连接功能异常可能是一个重要发病因素,积极有效地预防和检测缝隙连接功能,将会有助于为高血压患者血管性疾病的预防和治疗。

参考文献:

- [1] Sally IS, Dag A, Sarah D, et al. Hypertension is a potential risk factor for vascular dementia: systematic review[J]. *Int J Geriatr Psychiatry*, 2011, 26(7): 661-669.
- [2] Figueroa XF, Isakson BE, Duling BR. Vascular gap junctions in hypertension[J]. *Hypertension*, 2006, 48(5): 804-811.
- [3] 孙宁玲. 高血压治疗学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 185-186.
- [4] Alonso F, Boittin FX, Beny JL, et al. Loss of connexin40 is associated with decreased endothelium-dependent relaxations and Enos levels in the mouse aorta[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(5): 1365-1373.
- [5] Matchkov VV. Mechanisms of cellular synchronization in the vascular wall. Mechanisms of vasomotion [J]. *Dan Med Bull*, 2010, 57(10): B4191.
- [6] Milkau M, Kohler R, de Wit C. Crucial importance of the endothelial K^+ channel SK3 and connexin40 in arteriolar dilations during skeletal muscle contraction[J]. *Faseb*, 2010, 24(9): 3572-3579.
- [7] 付勇男, 王梦洪. 缝隙连接和高血压[J]. *中华高血压杂志*, 2008, 5(5): 397-399.
- [8] Schmidt VJ, Wolfle SE, Boettcher M, et al. Gap junctions synchronize vascular tone within the microcirculation[J]. *Pharmacol Rep*, 2008, 60(1): 68-74.
- [9] Chan YC, Leung FP, Wong WT, et al. Therapeutically relevant concentrations of raloxifene dilate pressurized rat resistance arteries via calcium-dependent endothelial nitric oxide synthase activation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30(5): 992-999.
- [10] Musha Y, Itoh S, Hanson MA, et al. Does estrogen affect the development of abnormal vascular function in offspring of rats fed a low-protein diet in pregnancy[J]. *Pediatr Res*, 2006, 59(6): 784-789.
- [11] 贾宏钧. 离子通道与心脑血管疾病[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 56-70.
- [12] Haefliger JA, Nicod P, Meda P. Contribution of connexins to the function of the vascular wall[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2): 345-356.
- [13] Azzam EI, Toledo SM, Little JB, et al. Evidence for the participation of gap junction mediated intercellular communication in the transmission of damage signals from irradiated to nonirradiated cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2): 247-248.

(收稿日期: 2012-12-01 修回日期: 2013-03-01)