

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.01.002

Cx37 和 Cx40 在自发性高血压大鼠不同动脉间的表达差异*

潘立君¹, 李新芝², 卓泓宇¹, 李 丽¹, 魏丽丽¹, 于秀石¹, 司军强¹, 马克涛^{1△}

(石河子大学医学院:1. 生理学教研室;2. 病理生理学教研室, 新疆维吾尔自治区石河子 832002)

摘要:目的 观察自发性高血压和正常血压大鼠肠系膜动脉和主动脉上连接蛋白(Cx)表达的变化。方法 应用 RT-PCR 和 Western blot 技术比较自发性高血压大鼠(SHR 组)和正常血压大鼠(对照组)肠系膜动脉和主动脉上 Cx37 和 Cx40 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 SHR 组肠系膜动脉 Cx37 mRNA 的表达降低($P < 0.05$), 主动脉降低更为显著($P < 0.01$); 肠系膜动脉 Cx40 mRNA 的表达显著降低($P < 0.01$), 而主动脉则没有变化($P > 0.05$)。SHR 组肠系膜动脉 Cx37 蛋白的表达降低($P < 0.05$), 主动脉降低更为显著($P < 0.01$); 肠系膜动脉 Cx40 蛋白的表达降低($P < 0.05$), 而主动脉则没有变化($P > 0.05$)。结论 高血压可能通过降低血管细胞上 Cx37 和(或)Cx40 的表达造成细胞间缝隙连接通讯异常。

关键词:大鼠, 近交 SHR; 肠系膜动脉; 主动脉; 电突触; 连接蛋白

中图分类号: R544.1; R331.3

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)01-0004-03

Difference expression of Cx37 and Cx40 of arteries in spontaneously hypertensive rats*

Pan Lijun¹, Li Xinzhi², Zhuo Hongyu¹, Li Li¹, Wei Lili¹, Yu Xiushi¹, Si Junqiang¹, Ma Ketao^{1△}

(1. Department of Physiology, School of Medicine of Shihezi University, Shihezi, the Xinjiang Uygur Autonomous Region 832002, China; 2. Department of pathophysiology, School of Medicine of Shihezi University, Shihezi, the Xinjiang Uygur Autonomous Region 832002, China)

Abstract: Objective To investigate the change of connexin (Cx) in mesenteric artery (MA) and aorta of spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive rats. Methods Quantitative RT-PCR and Western blot technique were used to compare the difference in the expression of Cx37 and Cx40 mRNA and protein in MA and aorta of SHR and normotensive rats. Results The level of Cx37 mRNA expression in MA from SHR was decreased compared with that of the normotensive rats ($P < 0.05$), and more significantly in aorta ($P < 0.01$). Cx40 mRNA expression in MA from SHR was significantly decreased compared with that of the normotensive rats ($P < 0.01$), but no change in aorta ($P > 0.05$). The expression of Cx37 protein in MA from SHR was decreased compared with that of the normotensive rats ($P < 0.05$), and more significantly in aorta ($P < 0.01$). Cx40 protein expression in MA from SHR was significantly decreased compared with that of the normotensive rats ($P < 0.05$), but no change in aorta ($P > 0.05$). Conclusion Hypertension may could decrease gap junctional communication in cells of MA and aorta from SHR by the downregulation of the expression of Cx37 and/or Cx40.

Key words: rats, inbred SHR; mesenteric artery; aorta; electrical synapses; connexin

高血压作为全球人类最常见的慢性病,是心、脑血管疾病导致死亡的主要危险因素。外周血管压力增高是高血压的直接发病的重要环节,而心、脑血管疾病发病的关键部位是血管^[1-2]。冠心病的根本原因在于冠状动脉的病变,心脏只是血管病变的“旁观者”和“受害者”,脑卒中本身是脑血管的病变,继而引起神经系统的损伤。心脑血管疾病发病的关键是血管紧张度的增加,而血管紧张度与通过细胞间缝隙连接为途径进行的电、化学信息交流的异常改变密切相关^[3]。缝隙连接通道存在于相邻的两个细胞间,连接蛋白(connexin, Cx)是构成缝隙连接通道的基本单位。目前研究发现,高血压的发生、发展与连接蛋白的异常改变密切相关。例如,特异性敲除小鼠内皮细胞 Cx40 基因后伴随着高血压和心肌肥厚^[4]。Cx40 基因多态性是高血压的危险因素^[5]。本研究在前期基础上观察了自发性高血压和正常血压大鼠肠系膜动脉和主动脉上 Cx37 和 Cx40 表达的差异,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验选用 20 周龄的雄性正常血压 Wistar 大鼠 10 只为对照组,20 周龄的雄性自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR) 10 只为 SHR 组,大鼠体重均 200~300 g,分别购自新疆医科大学实验动物中心和北京维通利华有限责任公司。

1.1.2 主要试剂和仪器 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司), BCA 蛋白分析试剂盒(美国 Pierce 公司), PrimeScript RT 试剂盒(日本 Takara 公司), ECL 检测试剂盒(美国 GE Healthcare 公司),一抗和二抗(美国 Santa Cruz 公司), NanoDrop™ 1000 分光光度计(美国 Thermo Scientific 公司), BP-6 无创血压监测仪(四川成都泰盟公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠无创血压测定 对照组及 SHR 组于 40 °C 预热

* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2012CB52660011);国家自然科学基金资助项目(31260247);兵团医药专项基金资助项目(2012BA021);石河子大学杰出青年科技人才培养计划项目(2012ZRKXJQ01)。作者简介:潘立君(1980—),主治医师,硕士,主要从事高血压、内分泌方向研究。△ 通讯作者, Tel: (0993)2057137; E-mail: maketao@hotmail.com。

15 min,大鼠清醒安静状态下用 BP-6 无创血压监测仪测量尾动脉血压。

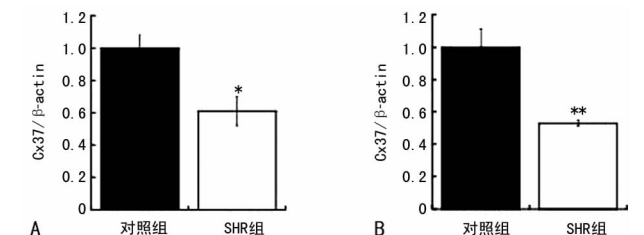
1.2.2 定量 RT-PCR 检测 用 Trizol 试剂提取动脉总 RNA,经 Nano drop 检测 RNA 浓度和纯度。取 200 ng 总 RNA 按照操作说明,将 RNA 逆转录为 cDNA 后,同时扩增目的基因和内参 β -actin。在 GenBank 上获取大鼠 Cx37 和 Cx40 mRNA 序列。Cx37 上游引物:5'-GCA GTG CCT CAG ACC CTT AC-3',下游引物:5'-GGA TGA GAG CCC ATT GTA GG-3',引物序列长度为 20 bp;Cx40 上游引物:5'-CCA CAA GCA CTC TAC GGT CA-3',下游引物:5'-GCA ACC AGG CTG AAT GGT AT-3',引物序列长度为 20 bp。

1.2.3 Western blot 检测 将动脉放入预冷的 RIPA 缓冲液中,用电动匀浆器冰上充分匀浆,离心取上清液后采用 BCA 法测定蛋白浓度。梯度胶(4%~12%)恒压电泳分离,至溴酚蓝指示剂显示蛋白充分分离后,将蛋白电转移至硝酸纤维素膜,置于含 5%脱脂奶粉的 TBST 中室温封闭 1 h,一抗(1:1 000) 4℃过夜,二抗(1:5 000)中室温孵育 1 h,TBST 清洗 3 次后与 ECL 反应 1 min,置于 X 线胶片暗盒中曝光、显影。测定蛋白条带的光密度并进行定量分析^[6]。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,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。

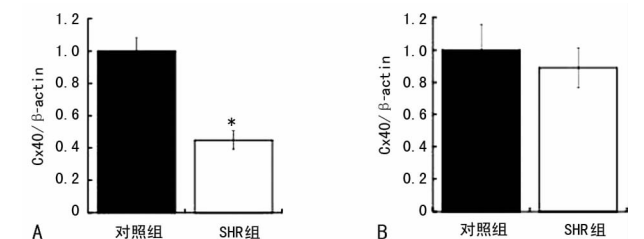
2 结果

2.1 对照组和 SHR 组尾动脉血压 对照组的收缩压为(121.5±6.9) mm Hg,SHR 组的收缩压为(207.3±10.5) mm Hg,两组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。



A: 肠系膜动脉;B: 主动脉。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 1 SHR 组和对照组肠系膜动脉和主动脉 Cx37 mRNA 的表达



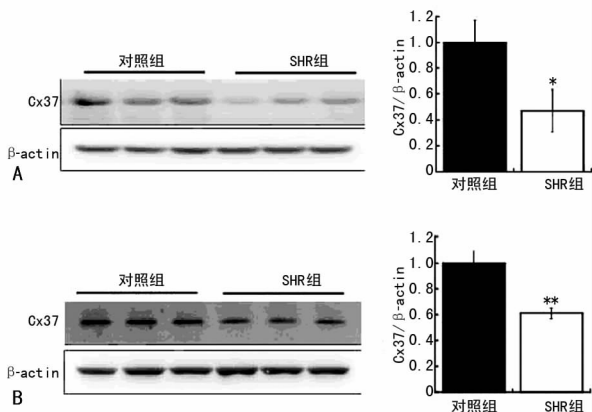
A: 肠系膜动脉;B: 主动脉。*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 2 SHR 组和对照组肠系膜动脉和主动脉 Cx40 mRNA 的表达

2.2 对照组和 SHR 组肠系膜动脉和主动脉 Cx37 和 Cx40 mRNA 的表达 定量 RT-PCR 法检测对照组和 SHR 组肠系膜动脉和主动脉 Cx37 和 Cx40 mRNA 的表达。与对照组相比,SHR 组肠系膜动脉 Cx37 mRNA 的表达降低($P < 0.05$),主动脉降低更为显著($P < 0.01$),见图 1;肠系膜动脉 Cx40

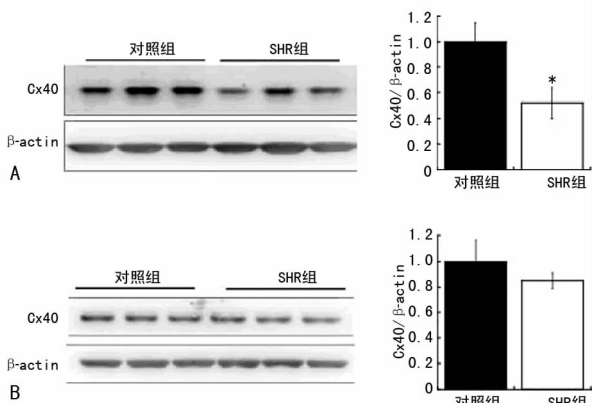
mRNA 的表达显著降低($P < 0.01$),而主动脉则没有变化($P > 0.05$),见图 2。

2.3 对照组和 SHR 组肠系膜动脉和主动脉连接蛋白蛋白水平的比较 Western blot 法检测对照组和 SHR 组肠系膜动脉和主动脉 Cx37 和 Cx40 的蛋白表达,光密度测定及统计学分析显示:与对照组相比,SHR 组肠系膜动脉 Cx37 蛋白的表达降低($P < 0.05$),主动脉降低更为显著($P < 0.01$),见图 3;肠系膜动脉 Cx40 蛋白的表达降低($P < 0.05$),而主动脉则没有变化($P > 0.05$),见图 4。



A: 肠系膜动脉;B: 主动脉。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 3 SHR 组和对照组肠系膜动脉和主动脉 Cx37 蛋白的表达



A: 肠系膜动脉;B: 主动脉。*: $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 4 SHR 组和对照组肠系膜动脉和主动脉 Cx40 蛋白的表达

3 讨论

相邻细胞间通过缝隙连接进行着物质、能量和信息的交换,对细胞的增殖、分化、内环境稳定和新陈代谢等生理过程起着重要的调控作用,在血管调节中尤为突出^[7-8]。例如,血管同步舒缩在正常血管功能的调节中发挥至关重要的作用。通过细胞与细胞之间连接形成的缝隙连接通道是血管同步舒缩的重要结构基础。血管发挥正常的功能需要血管壁细胞之间活动的同步性,因此血管的正常功能活动有赖于管壁细胞之间通讯系统的完整。此外,多种疾病的发生、发展和转归过程中缝隙连接都发挥着重要作用。癫痫形成的重要因素之一就是缝隙连接促使相邻细胞形成同步化活动造成异常放电^[9]。由于缝隙连接的表达或功能的降低可能使某些细胞脱离了与正常

细胞的胞间联系及正常的调控,最终发展成为无序生长的恶性肿瘤^[10]。本研究发现 SHR 组肠系膜动脉上 Cx37 和 Cx40 的表达降低,而主动脉上只有 Cx37 的表达降低,Cx40 的表达没有明显变化。

大量有关 SHR 或诱导大鼠高血压病模型的研究报道发现,连接蛋白的表达会在疾病状态下发生改变。遗憾的是,研究的实验条件差异较大,导致结论不甚一致。例如,前期研究发现应用 NO 合酶抑制剂所致的高血压模型动物的主动脉上 Cx40 的表达没有变化,而 Cx37 的表达则相对于对照组减少^[11],与本实验的研究结果相一致。但是在两肾一夹所致的肾性高血压模型动物血管上 Cx40 的表达却是增加的。此外,在 SHR 上连接蛋白的变化相对于其他原因所致的高血压更加复杂,有研究发现 Cx40 和 Cx37 在血管平滑肌细胞和内皮细胞表达都减少^[12-13],与本实验的研究结果相一致。但也有报道称在 SHR 肾入球动脉和肠系膜动脉上 Cx37 的表达既有增多亦有减少,但 Cx40 的表达没有变化^[14-15]。上述连接蛋白在高血压中的表达差异可能与动物模型、检测方法及部位的不同相关。本实验选择了不同部位的动脉进行比较研究,也发现 Cx40 在肠系膜动脉和主动脉在高血压时的表达改变是不同的。

综上所述,本实验结果提示高血压通过降低血管细胞上 Cx37 和(或)Cx40 的表达造成细胞间缝隙连接通讯异常,引起血管功能紊乱,加重了高血压造成的损害。因此,血管细胞间的缝隙连接的异常改变可能在高血压的发生、发展中发挥了重要的作用。

参考文献:

- [1] Looft-Wilson RC, Billaud M, Johnstone SR, et al. Interaction between nitric oxide signaling and gap junctions: effects on vascular function[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(8): 1895-1902.
- [2] Socha MJ, Segal SS. Isolation of microvascular endothelial tubes from mouse resistance arteries[J]. *J Vis Exp*, 2013 (81): e50759.
- [3] Nishida S, Satoh H. Role of gap junction involved with endothelium-derived hyperpolarizing factor for the quercetin-induced vasodilatation in rat mesenteric artery[J]. *Life Sci*, 2013, 92(13): 752-756.
- [4] Koval M, Billaud M, Straub AC, et al. Spontaneous lung dysfunction and fibrosis in mice lacking connexin 40 and endothelial cell connexin 43[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178 (6): 2536-2546.
- [5] Firouzi M, Kok B, Spiering W, et al. Polymorphisms in human connexin40 gene promoter are associated with increased risk of hypertension in men[J]. *J Hypertens*, 2006, 24(2): 325-330.
- [6] 李新芝, 司军强, 陈新燕, 等. 自发性高血压大鼠和 Wistar 大鼠脑动脉 Cx45 表达的差异[J]. *山东大学学报: 医学版*, 2012, 50(11): 39-42.
- [7] Mese G, Richard G, White TW. Gap junctions: basic structure and function[J]. *J Invest Dermatol*, 2007, 127(11): 2516-2524.
- [8] Rackauskas M, Neverauskas V, Skeberdis VA. Diversity and properties of connexin gap junction channels[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2010, 46(1): 1-12.
- [9] Shimizu K, Stopfer M. Gap junctions[J]. *Curr Biol*, 2013, 23(23): R1026-1031.
- [10] Evans WH, Martin PE. Gap junctions: structure and function (Review) [J]. *Mol Membr Biol*, 2002, 19(2): 121-136.
- [11] 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.
- [12] Kansui Y, Fujii K, Nakamura K, et al. Angiotensin II receptor blockade corrects altered expression of gap junctions in vascular endothelial cells from hypertensive rats [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(1): H216-224.
- [13] Rummery NM, Grayson TH, Hill CE. Angiotensin-converting enzyme inhibition restores endothelial but not medial connexin expression in hypertensive rats[J]. *J Hypertens*, 2005, 23(2): 317-328.
- [14] Goto K, Rummery NM, Grayson TH, et al. Attenuation of conducted vasodilatation in rat mesenteric arteries during hypertension: role of inwardly rectifying potassium channels[J]. *J Physiol*, 2004, 561(Pt 1): 215-231.
- [15] Braunstein TH, Sorensen CM, Holstein-Rathlou NH. Connexin abundance in resistance vessels from the renal microcirculation in normo- and hypertensive rats[J]. *APMIS*, 2009, 117(4): 268-276.

(收稿日期: 2014-08-11 修回日期: 2014-10-25)

(上接第 3 页)

- yield assay). *Techniques in HIV research [M]*. New York: Stockton Press, 1990: 71-76.
- [12] Montefiori DC. Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2009 (485): 395-405.
- [13] Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens [J]. *Science*, 1998, 280(5371): 1884-1888.

- [14] Chan DC, Kim PS. HIV entry and its inhibition[J]. *Cell*, 1998, 93(5): 681-684.
- [15] Shang H, Han X, Shi X, et al. Genetic and neutralization sensitivity of diverse HIV-1 env clones from chronically infected patients in China [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (16): 14531-14541.

(收稿日期: 2014-08-18 修回日期: 2014-10-30)