

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.12.004

去窦弓神经对自发性高血压大鼠主动脉 TRPC3 及 TRPC6 表达的影响

何 杰, 陈 明

(重庆医科大学附属第一医院心血管内科, 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究去窦弓神经(Sinoaortic denervated, SAD)对自发性高血压大鼠(Spontaneous hypertensive rats, SHR)主动脉瞬时受体电位通道(Transient receptor potential canonical 3, TRP)C3 及 C6 亚型表达的影响,探讨 TRPC3 及 TRPC6 与血压变异(Blood pressure variability, BPV)的关系。方法:14 只 10 周龄雄性 SHR 随机分为 SAD 组和假手术组,各 7 只。术后 8 周在清醒、自由活动状态下测定两组大鼠 24 h 动脉血压及 BPV,采用逆转录多聚酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)法检测主动脉组织 TRPC3 及 TRPC6 信使核糖核苷酸(Messenger ribonucleic acid, mRNA)的表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)与免疫组织化学法(Immunohistochemistry, IHC)检测其蛋白的表达。结果:术后 8 周,两组大鼠 24 h 平均收缩压(Systolic blood pressure, SBP)和舒张压(Diastolic blood pressure, DBP)比较无显著性差异;SAD 组 24 h 收缩压变异(Systolic blood pressure variability, SBPV)显著高于假手术组大鼠($P<0.05$),SAD 组 24 h 舒张压变异(Diastolic blood pressure variability, DBPV)亦显著高于假手术组大鼠($P<0.01$),主动脉组织 TRPC3 及 TRPC6 的 mRNA 和蛋白表达均显著高于假手术组大鼠($P<0.01$),差异均有统计学意义。结论:SAD 组大鼠 SBPV 和 DBPV 升高,同时 TRPC3 及 TRPC6 的 mRNA 和蛋白表达升高,提示 TRPC3 及 TRPC6 的升高与其 BPV 升高密切相关,TRPC3 及 TRPC6 可能参与 BPV 的调控。

【关键词】去窦弓神经;瞬时受体电位通道 C3、C6;血压变异

【中国图书分类法分类号】R544.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-05-03

Effect of sinoaortic denervated on expressions of TRPC3 and TRPC6 in the aorta of spontaneous hypertensive rats

HE Jie, CHEN Ming

(Department of Cardiovascular, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of sinoaortic denervated(SAD) on the expressions of transient receptor potential canonical 3(TRPC3) channel and TRPC6 channel in the aorta of spontaneous hypertensive rats(SHR) and to discuss the relationship among TRPC3, TRPC6 and blood pressure variability(BPV). **Methods:** Fourteen male SHR at the age of 10 weeks were randomly divided into two groups; SAD operation group($n=7$) and sham operation group($n=7$). 24 h blood pressure and BPV were measured in conscious, unrestrained rats at 8 weeks after operation. The expression of messenger ribonucleic acid(mRNA) and protein of TRPC3 and TRPC6 were determined by RT-PCR, Western blot and immunohistochemistry staining respectively. **Results:** There was no difference in 24 h average systolic blood pressure(SBP) and diastolic blood pressure(DBP) between the two groups; 24 h systolic blood pressure variability(SBPV) and diastolic blood pressure variability(DBPV) were significantly higher in SAD group than in sham operation group($P<0.05$), ($P<0.01$); expressions of mRNA and protein of TRPC3 and TRPC6 were significantly higher in SAD group than in sham operation group($P<0.01$). **Conclusions:** SBPV and DBPV as well as mRNA and protein expressions of TRPC3 and TRPC6 of rats in SAD group are increased, indicating that the increased expressions of TRPC3 and TRPC6 are closely associated with elevated BPV and might be involved in the regulation of BPV.

【Key words】 sinoaortic denervated; transient receptor potential canonical 3, 6; blood pressure variability

血压变异(Blood pressure variability, BPV)独立于血压水平是心血管疾病终末靶器官损害的危险

作者介绍:何 杰(1986-),男,硕士,

研究方向:高血压发病机制及治疗。

通信作者:陈 明,男,教授,Email:chenmingcq@126.com。

因素,并与靶器官损害的进展相关^[1],其发病机制尚不明确。瞬时受体电位通道 C 家族(Transient receptor potential canonical, TRPC)是一种非选择型阳离子通道,通过对跨膜离子的调控参与包括调节血管张力、血管平滑肌的收缩等,TRPC3 及 TRPC6 具有

大约 75% 的序列同源性,是近年高血压的研究热点,而与 BPV 的关系知之甚少。利用去窦弓神经(Sino-aortic denervated, SAD)手术制备 BPV 增高模型,探讨 TRPC3 及 TRPC6 与 BPV 的关系,进一步阐明高 BPV 变异发病机制,为 BPV 带来新的治疗思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

14 只 10 周龄雄性自发性高血压大鼠(Spontaneous hypertensive rats, SHR)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.2 主要试剂

硫酸阿托品注射液(西南药业股份有限公司),盐酸去氧肾上腺素注射液(上海禾丰制药有限公司),PCR 引物(北京三博远志生物技术有限责任公司),DNA Marker DL2000 (TaKaRa 公司),Premix LA Taq[®] (Loading dye mix) (TaKaRa 公司),细胞膜蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒(碧云天生物技术研究),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究),兔抗 TRPC3、TRPC6 多克隆抗体(Millipore 公司), β -Actin 多克隆抗体(北京四正柏生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 SAD 大鼠模型的制备及分组 14 只雄性 SHR 随机分为 SAD 组和假手术组,各 7 只。根据 Krieger^[2]方法制备 SAD 大鼠模型。麻醉大鼠,阿托品(1 mg/kg)腹腔注射以抑制术中呼吸道腺体的过度分泌。取仰卧位固定于手术台,颈部正中切开,暴露颈动脉三角区神经及血管,分离双侧颈动脉神经并切断。再清除颈动脉窦区的神经,10%苯酚溶液进行化学烧灼,最后缝合切口。假手术组大鼠在同等条件下行手术,只暴露神经但不分离和切断。术后肌注青霉素抗感染,并予保暖。

1.3.2 模型的检验及清醒、自由活动大鼠血流动力学监测 术后 8 周麻醉大鼠,固定于手术台上,分离暴露左侧股动脉及股静脉,股动脉插入充满经肝素化生理盐水的导管,用于监测血压,静脉导管用于检验 SAD 模型是否完全。动、静脉导管的另一端通过引针经皮下牵引,从大鼠颈后部皮肤穿出皮外,马鞍状固定以防止清醒大鼠抓咬。应用 MPS-2000M 生物多道信号分析系统(上海振科科贸有限公司)进行血压监测。48 h 后静推去氧肾上腺素(3~5 μ g/kg),如果大鼠血压升高 50 mmHg,反射性心率减慢<20 次/min,认为 SAD 完全^[3],进入下一步血流动力学监测。动脉导管经转动装置与压力换能器相连,信号经放大转换,计算机实时记录每搏收缩压(Systolic blood pressure, SBP)及舒张压(Diastolic blood pressure, DBP),记录 24 h 后脱机分析结果,以每搏血压为基础,收集每只大鼠 24 h 内 SBP、DBP 并计算出均值及标准差,通常用特定时间段测量的血压读数的标准差作为 BPV^[4],分别计算 24 h 收缩压变异(Systolic blood pressure variability, SBPV)和舒张压变异(Diastolic blood pressure variability, DBPV)。

1.3.3 主动脉组织 TRPC3、TRPC6 mRNA 的检测 血压测定后两组大鼠均处死,分离主动脉,采用 RT-PCR 法检测主动脉组织 TRPC3、TRPC6 mRNA 相对表达量。TRPC3(443 bp) F:5'-CTGGCACAAATGTGGGCAATA-3', R:5'-GCGTTCCG-GATGAGAAGGTAGG-3', TRPC6(155 bp), F:5'-GTCGGTGG-TCATCAACTACAATC-3', R:5'-CCACATCCGCATCATCCT-CAATT-3', GAPDH(231 bp), F:5'-ACGGCAAATTCACG-GCACAGTCA-3', R:5'-TGGGGGCATCGGCAGAAGG-3'。退火温度依次是 61 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、61 $^{\circ}$ C。扩增产物经过 2%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统采集电泳图像,以 GAPDH 为内参,测定各样本 mRNA 相对表达量。

1.3.4 采用 Western blot 和免疫组织化学法(Immunohistochemistry, IHC)检测大鼠主动脉组织 TRPC3、TRPC6 蛋白表达。 Western blot 检测蛋白相对表达量:利用试剂盒抽提主动脉膜蛋白行 SDS-PAGE 电泳,电转;一抗(TRPC3 为 1:400, TRPC6 为 1:400, β -Actin 为 1:5 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;二抗室温孵育 1 h;ECL 显色,曝光,显影,采集图像, β -actin 为内参,测定各样本蛋白的相对表达量。IHC 检测:剪取一段主动脉,4%多聚甲醛固定 24 h,常规石蜡包埋切片,常规脱蜡至水,微波抗原热修复,滴加内源性过氧化物酶封闭液室温孵育 10 min;山羊血清室温孵育 1 h;一抗(TRPC3 为 1:200, TRPC6 为 1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,滴加生物素标记二抗室温 1 h;滴加 SP 室温 1 h;显色,苏木精复染;脱水透明,中性树脂封片。400 倍光镜下进行图片采集,随机选择 5 个无重叠视野,用 IPP 6.0 软件进行结果分析。

1.4 统计学处理

计量资料以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,所得数据均采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组大鼠血压变异的比较

术后 8 周, SAD 组大鼠 24 h SBPV 与假手术组大鼠比较有显著性差异, SAD 组显著高于假手术组大鼠($t = 2.937$, $P = 0.012$), SAD 组大鼠 24 h DBPV 与假手术组大鼠比较也有显著性差异, SAD 组显著高于假手术组大鼠($t = 4.078$, $P = 0.002$), 差异均有统计学意义(表 1)。

表 1 2 组大鼠 SBPV 及 DBPV 的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison of SBPV and DBPV between two groups

($\bar{x} \pm s$)			
组别	例数(n)	SBPV (mmHg)	DBPV (mmHg)
SAD组	7	13.36 $\pm$ 4.43*	9.59 $\pm$ 3.51**
假手术组	7	7.42 $\pm$ 3.01	3.81 $\pm$ 1.33

注:与假手术组比, ★, $P < 0.05$, ★★, $P < 0.01$

2.2 主动脉组织 TRPC3、TRPC6 mRNA 的扩增结果

TRPC3、TRPC6 和 GAPDH 扩增片段长度分别为 443、155、231 bp(图 1)。SAD 组大鼠主动脉组织 TRPC3 的 mRNA

表达显著高于假手术组大鼠($t=38.081, P=0.000$), 且 SAD 组的 TRPC6 的 mRNA 表达显著高于假手术组大鼠($t=34.661, P=0.000$), 差异均有统计学意义。TRPC3 和 TRPC6 mRNA 相对含量表达(TRPC/GAPDH 吸光度), 见表 2。

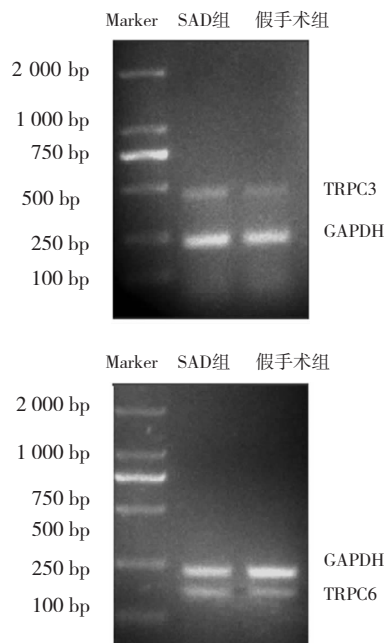


图 1 2 组大鼠主动脉 TRPC3 及 TRPC6 信使核糖核苷酸的表达
Fig.1 Expressions of TRPC3 and TRPC6 in aorta tissues of rats in two groups

表 2 2 组大鼠主动脉 TRPC3 及 TRPC6 信使核糖核苷酸相对含量表达 (TRPC/GAPDH 吸光度, $\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Relative mRNA expressions of TRPC3 and TRPC6 in aorta tissues of rats in two groups (TRPC/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	TRPC3	TRPC6
SAD组	7	0.663 1 $\pm$ 0.008 9**	0.789 9 $\pm$ 0.009 4**
假手术组	7	0.495 2 $\pm$ 0.007 6	0.628 9 $\pm$ 0.008 0

注:与假手术组比, ** $P < 0.01$

2.3 TRPC3、TRPC6 蛋白免疫印迹结果

TRPC3、TRPC6 和 β -actin 蛋白分子量分别为 84、106、42 kD(图 2)。SAD 组大鼠主动脉组织 TRPC3 的蛋白表达显著高于假手术组大鼠($t=80.530, P=0.000$), SAD 组的 TRPC6 蛋白表达亦显著高于假手术组大鼠($t=32.694, P=0.000$), 差异均有统计学意义。TRPC3 及 TRPC6 蛋白相对含量表达(TR-PC/ β -actin 吸光度), 见表 3。

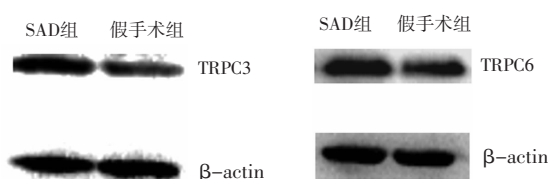


图 2 免疫印迹检测 2 组大鼠主动脉 TRPC3 及 TRPC6 蛋白表达
Fig.2 Protein expressions of TRPC3 and TRPC6 detected by Western blot in two groups

表 3 2 组大鼠主动脉 TRPC3 及 TRPC6 蛋白相对含量表达 (TRPC/ β -actin 吸光度, $\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Relative protein expressions of TRPC3 and TRPC6 in aorta tissues of rats in two groups (TRPC/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数(n)	TRPC3	TRPC6
SAD组	7	0.530 5 $\pm$ 0.008 1**	0.960 6 $\pm$ 0.018 7**
假手术组	7	0.224 0 $\pm$ 0.006 0	0.671 0 $\pm$ 0.014 2

注:与假手术组比, ** $P < 0.01$

2.4 TRPC3 及 TRPC6 免疫组织化学染色结果

主动脉内皮细胞及平滑肌细胞均表达 TRPC3 蛋白及 TRPC6 蛋白(图 3、4), 箭头所示为阳性表达。SAD 组大鼠主动脉组织 TRPC3 蛋白及 TRPC6 蛋白表达均显著高于假手术组大鼠($P < 0.01$), 差异均有统计学意义。

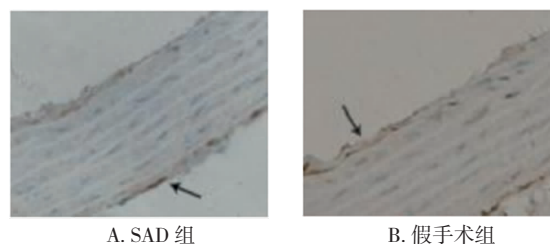


图 3 大鼠主动脉组织 TRPC3 免疫组织化学染色 (400 $\times$)

Fig.3 Immunohistochemistry staining of TRPC3 in aorta tissues of rats in two groups (400 $\times$)

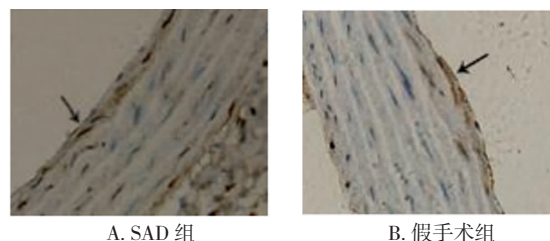


图 4 大鼠主动脉组织 TRPC6 免疫组织化学染色 (400 $\times$)

Fig.4 Immunohistochemistry staining of TRPC6 in aorta tissues of rats in two groups (400 $\times$)

3 讨论

Krieger^[2]首先利用 Wistar 大鼠通过破坏血压调节的颈动脉窦和主动脉弓神经创建 SAD 动物模型, 具有 24 h 平均血压不增高, 而 24 h BPV 显著增高的特征, 本研究利用 SHR 大鼠行 SAD 手术, 研究结果表明, SAD 组 24 h 平均 SBP 和 DBP 与假手术组比较无显著性差异, 24 h SBPV 和 DBPV 均显著高于假手术组, 此结果提示 SHR 大鼠行 SAD 手术可作为研究高血压 BPV 增高的理想模型。

高血压患者 BPV 增高常见, 机制复杂, 受多方面因素影响。TRPC 是一种新型的多功能阳离子通道, 与高血压关系密切, 通过对跨膜离子的调控来调

节血管平滑肌收缩、血管通透性等,参与多种心血管疾病的病理生理过程。既往研究发现,在原发性高血压病人和 SHR 大鼠的单核细胞中 TRPC3 蛋白表达上调,伴有钙内流增加^[5,6]。恶性高血压病人肾小球入球小动脉内皮 TRPC3 表达增加,TRPC3 可能参与了血压水平的调节机制^[7]。对比 WKY 大鼠,SHR 大鼠平滑肌细胞及组织 TRPC3 蛋白表达均增高,利用小干扰 RNA (Small interfering RNA, siRNA) 靶向抑制 TRPC3 表达可减少血管紧张素 II (Angiotensin II, Ang II) 诱导的钙离子 (Ca^{2+}) 内流^[8]。本研究结果表明,在两组 SHR 大鼠中,对比假手术组, SAD 组大鼠 SBPV 和 DBPV 升高,同时主动脉组织 TRPC3 mRNA 及蛋白升高。与以往研究不同,本研究推测,SHR 大鼠行 SAD 手术后,TRPC3 参与 BPV 的调控强于血压水平的调控,因此尽管 SBP 与 DBP 未见升高,在 SBPV 及 DBPV 升高的 SAD 组中,TRPC3 的表达仍然增高。结果提示 TRPC3 可能与 BPV 的调节有关,具体机制有待进一步研究。抑制 TRPC3 的表达可能成为治疗 BPV 升高的药物靶点。

有研究发现,在血管平滑肌细胞中,TRPC6 与 α_1 -肾上腺素激活的非选择性阳离子通道具有分子结构相关性, α_1 -肾上腺素激活 TRPC6 诱发包括 Ca^{2+} 在内的阳离子内流,引起阻力动脉收缩^[9]。醛固酮和血管加压素也能激活血管平滑肌细胞中的 TRPC6,诱发 Ca^{2+} 在内的阳离子内流^[10,11]。本研究结果表明,SAD 组 SBPV、DBPV、主动脉组织 TRPC6 mRNA 及蛋白均显著高于假手术组。此结果提示 SAD 术后 8 周,大鼠体内醛固酮和血管加压素的水平可能发生异常的变化,激活血管平滑肌 TRPC6,诱发 Ca^{2+} 内流,引起阻力动脉的异常收缩,介导了 24 h BPV 的升高。新近研究发现,TRPC6 与钠钙交换体 1 ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger-1, NCX1) 具有协同作用,促使 Ca^{2+} 大量内流^[12]。抑制 TRPC6 及 NCX1 的表达也可能成为治疗 BPV 异常的新药物靶点。

本研究结果表明,术后 8 周 TRPC3 及 TRPC6 表达同时升高。此结果提示,SAD 大鼠主动脉可能主要存在 TRPC3/6/7 异聚体。已有研究发现,TRPC3/6/7 异聚体属于受体操纵性离子通道,可直接被二酰甘油激活^[13],导致 Ca^{2+} 在内的阳离子内流,使血管平滑肌收缩,加剧血压的波动性,具体机制有待于进一步研究。

本研究首次阐述 BPV 与 TRPC3 及 TRPC6 的关系,TRPC3 及 TRPC6 的激活可能参与 BPV 的调

节,为下一步应用特异性阻断剂或者药物阻断 TRPC3 及 TRPC6 后是否能降低血压波动提供了广阔的研究空间,也为进一步研究机制及药物治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Sander D, Kukla C, Klingelhofer J, et al. Relationship between circadian blood pressure patterns and progression of early carotid atherosclerosis: a 3-year follow-up study[J]. *Circulation*, 2000, 102(13): 1536-1541.
- [2] Krieger E M. Neurogenic hypertension in the rat[J]. *Circ Res*, 1964, 15(6): 511-521.
- [3] Miao C Y, Su D F. The importance of blood pressure variability in rat aortic and ventricular hypertrophy produced by sinoaortic denervation[J]. *J Hypertens*, 2002, 20(9): 1865-1872.
- [4] Kikuya M, Hozawa A, Ohokubo T, et al. Prognostic significance of blood pressure and heart rate variabilities: the Ohasama study[J]. *Hypertension*, 2000, 36(5): 901-906.
- [5] Liu D, Scholze A, Zhu Z, et al. Increased transient receptor potential channel TRPC3 expression in spontaneously hypertensive rats[J]. *Am J Hypertens*, 2005, 18(11): 1503-1507.
- [6] Liu D, Scholze A, Zhu Z, et al. Transient receptor potential channels in essential hypertension[J]. *J Hypertens*, 2006, 24(6): 1105-1114.
- [7] Thilo F, Loddenkemper C, Berg E, et al. Increased TRPC3 expression in vascular endothelium of patients with malignant hypertension[J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(3): 426-430.
- [8] Liu D, Yang D, He H, et al. Increased transient receptor potential canonical type 3 channels in vasculature from hypertensive rats[J]. *Hypertension*, 2009, 53(1): 70-76.
- [9] Inoue R, Okada T, Onoue H, et al. The transient receptor potential protein homologue TRP6 is the essential component of vascular α_1 (1)-adrenoceptor-activated Ca^{2+} permeable cation channel[J]. *Circ Res*, 2001, 88(3): 325-332.
- [10] Bae Y M, Kim A, Lee Y J, et al. Enhancement of receptor-operated cation current and TRPC6 expression in arterial smooth muscle cells of deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats[J]. *J Hypertens*, 2007, 25(4): 809-817.
- [11] Li M, Zacharia J, Sun X, et al. Effects of siRNA knock-down of TRPC6 and InsP(3)R1 in vasopressin-induced Ca^{2+} oscillations of A7r5 vascular smooth muscle cells[J]. *Pharmacol Res*, 2008, 58(5-6): 308-315.
- [12] Zulian A, Baryshnikov S G, Linde C I, et al. Upregulation of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger and TRPC6 contributes to abnormal Ca^{2+} homeostasis in arterial smooth muscle cells from Milan hypertensive rats[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(3): H624-633.
- [13] Dietrich A, Kalwa H, Rost B R, et al. The diacylglycerol-sensitive TRPC3/6/7 subfamily of cation channels: functional characterization and physiological relevance[J]. *Pflügers Arch*, 2005, 451(1): 72-80.

(责任编辑:关蕴良)