

脑小血管平滑肌细胞表型标志及血管细胞外基质在肾性高血压大鼠中的改变

刘娜 薛扬 唐杰 张苗怡 任雪 付建辉[△]

(复旦大学附属华山医院神经内科 上海 200040)

【摘要】 目的 探讨脑小血管病大鼠小动脉平滑肌细胞表型标志及细胞外基质的改变。方法 随机均分12只SD大鼠,6只行双肾双夹手术建造易卒中肾血管性高血压大鼠模型(stroke-prone renovascular hypertensive rat, RHRsp),6只为假手术组。术后7个月取脑组织,使用免疫荧光法观察脑小动脉血管平滑肌细胞表型标志物 α -平滑肌肌动蛋白、平滑肌22 α 蛋白及细丝蛋白a改变,同时观察脑小动脉及脑小静脉血管壁基质胶原蛋白IV及层粘连蛋白的表达。结果 与假手术组大鼠相比,RHRsp大鼠小动脉平滑肌细胞收缩型标志 α -平滑肌肌动蛋白、平滑肌22 α 蛋白显著增高,合成型标志细丝蛋白a表达也显著增高。同时,RHRsp大鼠脑小动脉及脑小静脉血管壁基质胶原蛋白IV及层粘连蛋白表达均显著增高。结论 RHRsp大鼠脑小动脉平滑肌细胞收缩型标志物及合成型标志物均显著增加,提示细胞处于活跃增殖及分泌状态,导致小动脉血管管壁增厚,内径减小;脑小静脉也出现血管壁基质增生表现。

【关键词】 脑小血管病; 高血压; 平滑肌细胞; 表型转换; 脑小静脉; 大鼠

【中图分类号】 R743.1 **【文献标志码】** A **doi:**10.3969/j.issn.1672-8467.2020.06.007

The phenotypic transition of smooth muscle cells and the change of extracellular matrix in the cerebral small vessels of renovascular hypertensive rat

LIU Na, XUE Yang, TANG Jie, ZHANG Miao-yi, REN Xue, FU Jian-hui[△]

(Department of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Objective To study the phenotypic transition of vascular smooth muscle cells and the change of extracellular matrix in rats with cerebral small vessel disease. **Methods** Two-kidney two clip surgery were adopted in 6 SD rats to build stroke-prone renovascular hypertensive rat (RHRsp). Another 6 rats were in sham-operated group. Seven months after the surgery, the brain tissues of the animals were collected. Immunofluorescence was used to observe the expression of the phenotypic markers (α -smooth muscle cells actin, smooth muscle 22 α protein and filamin a) of vascular smooth muscle cells and the extracellular matrix (collagen IV and laminin) in the cerebral small vessels. **Results** Compared with rats in sham-operated group, RHRsp showed increased expression of the contractile phenotypic markers in vascular smooth muscle cells including α -smooth muscle cells actin and smooth muscle 22 α protein. And the synthetic marker, filament a was also increased in RHRsp. Meanwhile, the expression of collagen IV and laminin in the vascular wall matrix were significantly increased in the cerebral arterioles and cerebral venules of RHRsp. **Conclusion** Both contractile markers and synthetic marker of vascular smooth muscle cells in the cerebral small arteries of RHRsp rats were significantly increased, indicating that the

上海科技创新行动计划(17140900603)

[△]Corresponding author E-mail: jianhuifu@126.com

网络首发时间:2020-07-20 11:24:57 网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1885.R.20200717.0830.010.html>

cells were in active proliferation and secretion state, leading to thickening of the wall of the small arteries and reduction of the inner diameter. Cerebral venules in RHRsp also showed increased vascular wall matrix.

【Key words】 cerebral small vessel disease; hypertension; smooth muscle cells; phenotypic transition; cerebral venules; rat

* This work was supported by the Shanghai Science and Technology Innovation Action Plan (17140900603).

脑小血管病(cerebral small vessel disease, CSVD)导致了全球25%的卒中及45%的痴呆病例,严重增加社会医疗负担^[1]。散发性CSVD的主要危险因素为年龄及高血压^[2]。因此,目前CSVD动物模型主要基于高血压动物模型。以血管壁增厚、内径减小为特征的小血管重构是CSVD最重要的病理表现,而血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)在血管重构中起重要作用。VSMCs是一种可塑性极强的细胞,具有收缩型及合成型两种表型^[3]。在生理状态下,VSMCs表现为收缩表型,维持血管正常收缩舒张功能。然而在病理状态下(包括血管受损,高血压),VSMCs可由收缩型转换为合成型,表现为细胞合成、分泌功能旺盛,血管壁基质因而增加,导致血管重构发生。VSMCs收缩型标志包括 α -平滑肌肌动蛋白(α smooth muscle actin, α SMA),平滑肌22 α 蛋白(smooth muscle 22 alpha, SM22 α)等^[4-5]。细丝蛋白a(filamin a, FLNa)是一种重要的细胞骨架蛋白^[6],有研究发现FLNa的增加提示平滑肌细胞由收缩型向合成型转换^[7-9]。目前,大血管疾病的研究提示VSMCs从收缩型转换为合成型在高血压导致的大血管重构中起重要作用^[10]。然而,在CSVD的研究中,脑小动脉管壁VSMCs表型变化的研究仍然较少。

本文拟采用易卒中型肾血管性高血压大鼠模型(stroke-prone renovascular hypertensive rat, RHRsp)对CSVD病程中脑小血管管壁VSMCs表型标志的改变进行研究。RHRsp是由国内学者主创的一种通过双肾双夹手术产生稳定的高血压表型的动物模型^[11]。RHRsp表现脑小血管管壁增厚、内径减小等血管重构表型,是一种相对理想的CSVD动物模型。同时,小静脉病变也是CSVD的重要病理表现之一,虽然早在1995年Moody等^[12]就曾报道脑静脉血管壁基质的沉积,提出“脑室周围静脉胶原病”一词。但对于脑小静脉病变与高血压的关系目前研究仍然较少。因此本研究同时也观察RHRsp在高血压下脑小静脉的重构表现。

材 料 和 方 法

实验动物 12只雄性SD大鼠(70~90 g)购自北京维通利华实验动物公司,随机均分为RHRsp组及假手术组,所有动物均饲养于复旦大学附属华山医院神经病学研究所。

RHRsp模型制作 对RHRsp组大鼠使用U型银夹缩窄双侧肾动脉^[11],假手术组(正常对照组)行相同开腹及分离肾动脉操作但不钳夹肾动脉。术后8周,使用尾动脉血压计测定大鼠收缩压。

脑组织取材及冰冻切片制作 两组大鼠均正常饲养至术后7个月。实验终点,以戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠,经等渗盐水、4%多聚甲醛依次心脏灌注后,取脑组织继续后固定于4%多聚甲醛中4~6 h。随后进行梯度蔗糖脱水,OCT包埋,制作10 μ m冰冻切片。切片选择层面为前囟前3.0 mm(前囟+3.0 mm)、前囟后0.24 mm(前囟-0.24 mm)及前囟后3.0 mm(前囟-3.0 mm)。

脑组织冰冻切片免疫荧光 取冰冻切片室温复温后,使用0.25%的聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)破膜15 min。5%的山羊血清(武汉博士德生物工程有限公司)室温封闭1 h后一抗4℃孵育过夜。使用一抗包括:抗 α SMA抗体(美国Sigma-Aldrich公司),抗FLNa抗体(上海碧云天生物技术有限公司),抗SM22 α 抗体,抗IV型胶原蛋白(collagen IV, COL4)抗体,抗层粘连蛋白抗体(laminin, LN)均购自英国Abcam公司。随后对应二抗(Alexa Fluor cy3二抗及488-conjugated二抗,1:1 000,美国Invitrogen Carlsbad公司)室温孵育1 h。4',6-二脒基-2-苯基吡啶染核封片,荧光显微镜下观察拍片。每只大鼠选取3张不同层面脑组织切片,每个层面在皮层、基底节、海马、丘脑等不同脑区随机拍摄至少3个视野。拍摄选取10 \times 物镜,同一观察指标在同一曝光时间、背景校正参数下进行拍摄,拍摄图像分辨率为1 600 \times 1 200。选

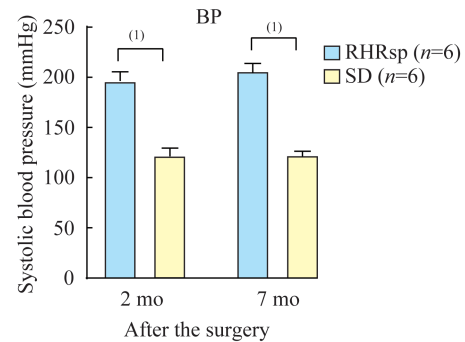
取内径为10~65 μm 的脑小血管进行分析,有连续的 αSMA 表达的血管视为小动脉,否则为小静脉。使用Image J(V1.8.0)软件在图像中选择目标血管,并获取目标血管各参数的荧光值进行统计分析。

统计学分析 应用SPSS 24.0软件处理数据,正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据进行方差齐性检验后,方差齐的两组采用 t 检验,方差不齐的两组行Welch's t 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

血压测量结果 双肾双夹术后2个月测量大鼠尾动脉收缩压,RHRsp组血压显著高于假手术组[(196.5 \pm 9.07) mmHg vs. (121.3 \pm 8.19) mmHg, $t = 15.06$, $P < 0.0001$,图1,1 mmHg=0.133 kPa,下同]。实验终点前,双肾双夹术后7个月重新测量大鼠尾动脉血压,RHRsp组血压仍然维持较高水平[(206.3 \pm 7.6) mmHg vs. (122.5 \pm 3.94) mmHg, $t =$

23.99, $P < 0.0001$,图1]。

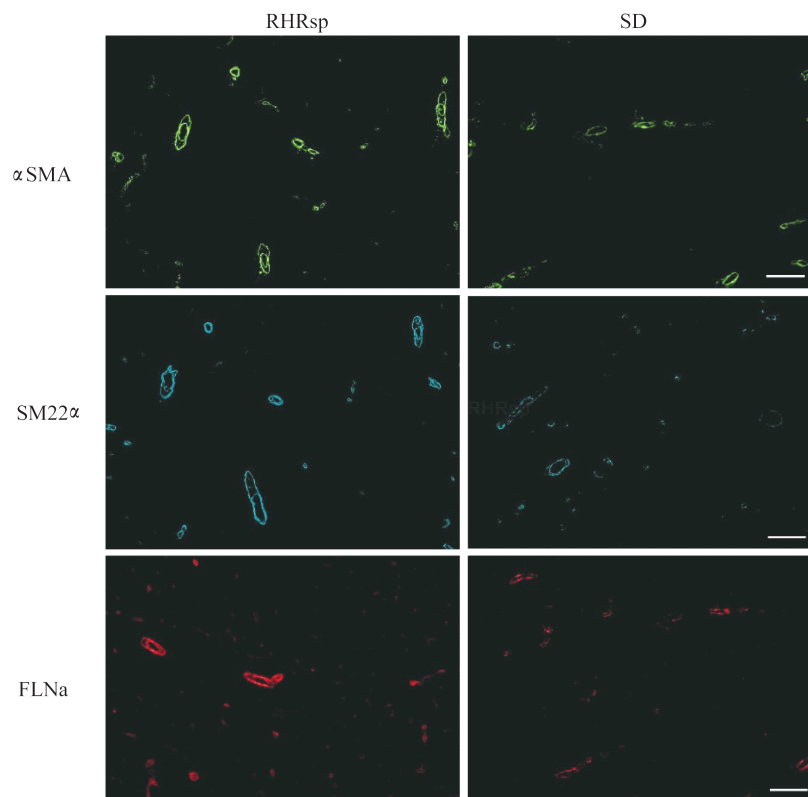


RHRsp: Stroke-prone renovascular hypertensive rat; SD: Sprague dawley rat; ⁽¹⁾ $P < 0.0001$.

图1 大鼠尾动脉收缩压

Fig 1 Systolic blood pressure of rats

脑小动脉血管壁平滑肌细胞表型标志表达情况 与假手术组大鼠相比,RHRsp大鼠脑小动脉平滑肌细胞收缩型标志 αSMA 、SM22 α 表达均显著增高。同时RHRsp大鼠脑小动脉平滑肌细胞合成型标志FLNa亦显著高于假手术组(表1、图2)。



RHRsp: Stroke-prone renovascular hypertensive rat; SD: Sprague Dawley rat; αSMA : α smooth muscle actin; SM22 α : Smooth muscle 22 alpha; FLNa: Filamin a. Bar: 100 μm .

图2 大鼠脑小动脉平滑肌细胞表型标志表达情况

Fig 2 Phenotypic markers of the smooth muscle cells in cerebral small arteries of rats

表1 大鼠脑小动脉平滑肌细胞表型标志表达情况

Tab 1 The expression of phenotypic markers of the smooth muscle cells in cerebral small arteries of rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	α SMA	SM22 α	FLNA
RHRsp	6	141.60 \pm 3.73	90.29 \pm 1.96	78.50 \pm 5.74
SD	6	128.20 \pm 3.41	84.64 \pm 2.64	64.55 \pm 4.61
t		6.46	4.22	4.64
P		<0.0001	0.0018	0.0009

RHRsp: Stroke-prone renovascular hypertensive rat; SD: Sprague Dawley rat; α SMA: α smooth muscle actin; SM22 α , smooth muscle 22 alpha; FLNa: Filamin a.

脑小动脉血管壁LN及COL4表达情况 细胞外基质是血管壁结构和功能完整性的重要组成部

分。其中COL4以及LN是血管壁细胞外基质的两大重要组成成分。VSMCs是参与分泌血管壁细胞外基质的重要细胞。我们发现,与假手术组大鼠相比,RHRsp大鼠脑小动脉血管壁细胞外基质LN及COL4表达均增高,差异有统计学意义(表2、图3、4)。

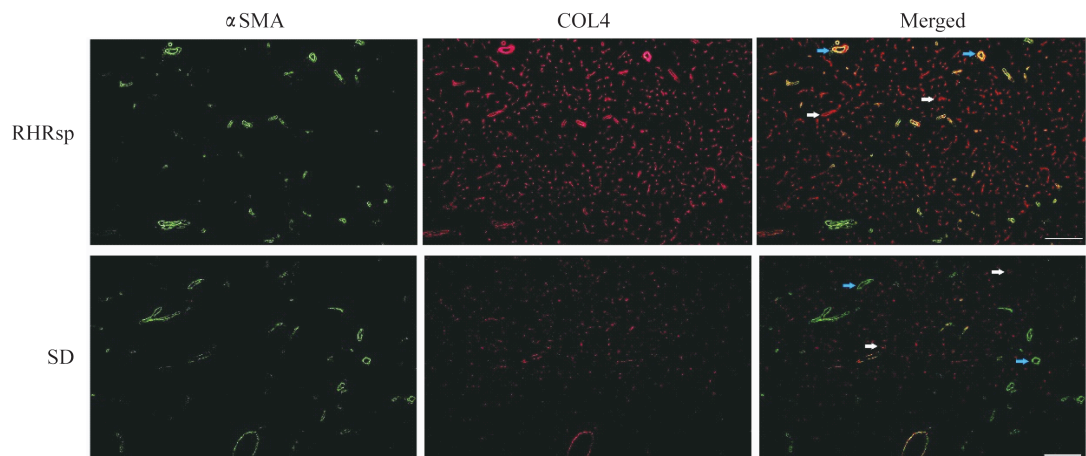
脑小静脉血管壁LN及COL4表达情况 根据既往研究报道^[13],我们将直径在10~60 μ m,没有连续 α SMA表达的小血管视为小静脉。与假手术组大鼠相比,RHRsp大鼠脑小静脉血管壁LN及COL4表达均显著增高(表2、图3、4)。

表2 大鼠脑小动脉及脑小静脉血管壁基质表达情况

Tab 2 The expression of vessel wall extracellular matrix in cerebral small arteries and venules of rats ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Small arteries		Small venules	
		COL4	LN	COL4	LN
RHRsp	6	137.40 \pm 16.93	159.10 \pm 10.43	128.70 \pm 14.09	130.10 \pm 12.99
SD	6	101.20 \pm 6.13	125.90 \pm 9.12	95.60 \pm 5.73	103.90 \pm 7.85
t		4.91	5.88	5.34	4.23
P		0.0006	0.0002	0.0003	0.0017

RHRsp: Stroke-prone renovascular hypertensive rat; SD: Sprague Dawley rat; COL4: Collagen IV; LN: Laminin.



RHRsp: Stroke-prone renovascular hypertensive rat; SD: Sprague Dawley rat; α SMA: α smooth muscle actin; COL4: Collagen IV. Bar: 200 μ m. In this study, α SMA was used to indicate the artery (blue arrow in the Merge diagram), and vessels without continuous α SMA expression were considered as venules (white arrow in the Merged diagram).

图3 大鼠脑小动脉及脑小静脉血管壁COL4表达情况

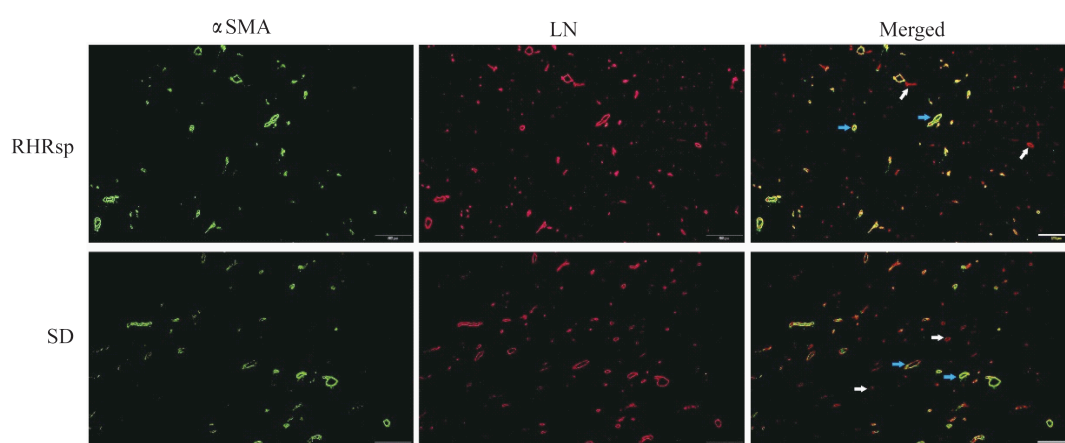
Fig 3 The expression of COL4 in cerebral small arteries and venules of rats

讨论

本研究中,RHRsp大鼠在双肾双夹术后2个月开始表现稳定的高血压,术后7个月的病理检测发现RHRsp大鼠脑小动脉VSMCs收缩型标志及合

成型标志均显著增加,同时大鼠脑小动脉及小静脉血管壁基质均显著增加,表现出管壁增厚,内径减小的脑小血管病血管重构表现。

高血压是CSVD的重要危险因素,高血压大鼠模型被广泛应用于CSVD的动物研究。RHRsp模型建模成功后大鼠可表现长时间持续的高血压,适



RHRsp: Stroke-prone renovascular hypertensive rat; SD: Sprague Dawley rat; α SMA: α smooth muscle actin; LN: Laminin. Bar: 200 μ m. In this study, α SMA was used to indicate the artery (blue arrow in the Merged diagram), and vessels without continuous α SMA expression were considered as venules (white arrow in the Merged diagram).

图4 大鼠脑小动脉及脑小静脉血管壁LN表达情况

Fig 4 The expression of laminin in cerebral small arteries and venules of rats

合用于观察长期慢性高血压对靶器官的损害^[11]。研究报道RHRsp表现脑小血管管壁增粗,内径减小等CSVD病理特征^[13],同样在本研究中也发现相似表现,是良好的CSVD动物模型。

在疾病早期,血管重构可以视为机体对抗病理状态的代偿反应,但持续的血管重构将导致血管正常功能的丧失,进而表现为失代偿。VSMCs在血管重构中起重要作用。高血压状态下,剪切力、环形张力等血流动力学的改变可引起VSMCs的表型发生改变。既往研究提示5月龄自发性高血压大鼠^[14]以及术后6个月的RHRsp^[13]脑小动脉VSMCs收缩型标志 α SMA表达增加。而本研究发现,双肾双夹术后7个月的RHRsp大鼠脑小动脉VSMCs不仅 α SMA表达上升,其另一重要收缩型标志SM22 α 表达也显著增高。SM22 α 仅在收缩型VSMCs中高表达,参与VSMCs表型转换中丝状肌动蛋白的聚合过程,具有高度特异性^[15]。与之相反的是,肺动脉高压疾病中肺小动脉平滑肌细胞收缩型表型标志下降^[16],同时在自发性高血压大鼠中肠系膜小动脉也存在 α SMA表达下降^[17]。我们猜测实验结果的不同可能是由于不同组织血管床的特异性或疾病进程的不同导致的。同时,本研究也发现,术后7个月的RHRsp大鼠中脑小动脉VSMCs中的FLNa表达上升。FLNa是一种在平滑肌细胞丰富表达的细胞骨架蛋白^[6],有研究提示FLNa在合成型VSMCs中表达增加^[8-9],同时抑制FLNa表达可以阻碍VSMCs向合成型转换^[7]。这些都提示VSMCs

中的FLNa表达上升指示VSMCs从收缩型向合成型转换。我们的研究进一步确认了术后7个月的RHRsp大鼠中脑小动脉血管壁基质LN及COL4表达均显著增加,提示平滑肌细胞合成、分泌细胞外基质的功能旺盛。因此,我们猜测,在双肾双夹术后7个月,RHRsp大鼠脑小动脉平滑肌细胞处于活跃增殖及分泌状态,导致血管壁厚增粗、内径减小。CSVD患者的尸检研究提示CSVD终末期病理改变为血管平滑肌的瓦解及血管壁基质的增生^[18]。事实上,目前大部分的动物模型病理研究均能发现脑小血管的管壁基质增生,但平滑肌瓦解仍然较少见,提示后续研究可能需要进一步优化动物模型。

此外,本研究进一步证实,在高血压动物模型中,脑小动脉血管重构同时脑小静脉也出现显著血管壁基质增生。既往研究也提示,术后6个月的RHRsp表现脑小静脉管壁胶原沉积增加^[13],本研究也证实,高血压大鼠脑小静脉管壁不仅胶原类型的基质沉积增加,其他管壁基质例如LN也沉积增加。事实上,我们的早期研究亦提示自发性高血压大鼠也存在脑小静脉重构的表现^[19],高血压作为危险因素与脑小静脉管壁重构的关系及其中的机制仍需进一步研究,缺氧及低灌注后的氧化应激可能是重要因素^[13,20]。目前已有研究提示,白质静脉病变影响静脉血回流可能在皮质下微梗死中起重要作用^[21]。因此后续针对CSVD的研究应该对于脑小静脉的病变给予同样的重视。

参 考 文 献

- [1] CANNISTRARO RJ, BADI M, EIDELMAN BH, *et al.* CNS small vessel disease: A clinical review[J]. *Neurology*, 2019, 92(24): 1146-1156.
- [2] CHARIDIMOU A, PANTONI L, LOVE S. The concept of sporadic cerebral small vessel disease: A road map on key definitions and current concepts[J]. *Int J Stroke*, 2015, 11(1): 6-18.
- [3] OWENS GK, KUMAR MS, WAMHOFF BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 767-801.
- [4] WAMHOFF BR, HOOFNAGLE MH, BURNS A, *et al.* A G/C element mediates repression of the SM22alpha promoter within phenotypically modulated smooth muscle cells in experimental atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2004, 95(10): 981.
- [5] OWENS GK, KUMAR MS, WAMHOFF BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease [J]. *Physiol Rev*, 2004, 84(3): 767-801.
- [6] SUTHERLAND-SMITH AJ. Filamin structure, function and mechanics: are altered filamin-mediated force responses associated with human disease?[J]. *Biophys Rev*, 2011, 3(1): 15-23.
- [7] ZHU G, CHEN H, ZHANG W. Phenotype switch of vascular smooth muscle cells after siRNA silencing of filamin[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 61(1): 47-52.
- [8] MALMQVIST U, ARNER A, OCCADIVISION, *et al.* Isoform distribution and tissue contents of contractile and cytoskeletal proteins in hypertrophied smooth muscle from rat portal vein[J]. *Circ Res*, 1990, 66(3): 832-845.
- [9] HUANG L, LI L, HU E, *et al.* Potential biomarkers and targets in reversibility of pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease: an explorative study [J]. *Pulm Circ*, 2018, 8(2): 1567791725.
- [10] LU QB, WANG HP, TANG ZH, *et al.* Nesfatin-1 functions as a switch for phenotype transformation and proliferation of VSMCs in hypertensive vascular remodeling[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(6 Pt A): 2154-2168.
- [11] ZENG J, ZHANG Y, MO J, *et al.* Two-kidney, two clip renovascular hypertensive rats can be used as stroke-prone rats[J]. *Stroke*, 1998, 29(8): 1708-1713, 1713-1714.
- [12] MOODY DM, BROWN WR, CHALLA VR, *et al.* Periventricular venous collagenosis: association with leukoaraiosis[J]. *Radiology*, 1995, 194(2): 469-476.
- [13] LIN J, LAN L, WANG D, *et al.* Cerebral venous collagen remodeling in a modified white matter lesions animal model [J]. *Neuroscience*, 2017, 367: 72-84.
- [14] BAILEY EL, WARDLAW JM, GRAHAM D, *et al.* Cerebral small vessel endothelial structural changes predate hypertension in stroke-prone spontaneously hypertensive rats: a blinded, controlled immunohistochemical study of 5- to 21-week-old rats[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2011, 37(7): 711-726.
- [15] FEIL S, HOFMANN F, FEIL R. SM22alpha modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis [J]. *Circ Res*, 2004, 94(7): 863-865.
- [16] FERNANDEZ RA, WAN J, SONG S, *et al.* Upregulated expression of STIM2, TRPC6, and Orai2 contributes to the transition of pulmonary arterial smooth muscle cells from a contractile to proliferative phenotype [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2015, 308(8): C581-C593.
- [17] 廖静雯, 张琳, 张严焱, 等. 运动干预高血压小动脉平滑肌细胞表型转换中 miR-143/145 对蛋白激酶 B 信号的调节作用[J]. *中国运动医学杂志*, 2018, 37(2): 127-137.
- [18] PANTONI L. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges[J]. *Lancet Neurol*, 2010, 9(7): 689-701.
- [19] 薛扬, 刘娜, 张苗怡, 等. 高盐饮食自发性高血压大鼠脑小静脉管壁基质改变观察[J]. *中国脑血管病杂志*, 2019, 16(10): 539-544.
- [20] PETTERSEN J A, KEITH J, GAO F, *et al.* CADASIL accelerated by acute hypotension: Arterial and venous contribution to leukoaraiosis[J]. *Neurology*, 2017, 88(11): 1077-1080.
- [21] HARTMANN DA, HYACINTH HI, LIAO FF, *et al.* Does pathology of small venules contribute to cerebral microinfarcts and dementia? [J]. *J Neurochem*, 2018, 144(5): 517-526.

(收稿日期:2019-12-16; 编辑:王蔚)