

邱方,周杨,张严焱,等. miR-328 在运动改善高血压大鼠胸主动脉 L 型钙通道表达中的作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 749-758.

Qiu F, Zhou Y, Zhang YY, et al. Effect of miR-328 in the exercise-induced improvement of the L-type calcium channel expression in thoracic aorta from hypertensive rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 749-758.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.06.003

miR-328 在运动改善高血压大鼠胸主动脉 L 型钙通道表达中的作用

邱方¹,周杨¹,张严焱¹,金城¹,刘晓东¹,吴迎^{1,2},吕媛媛³,石丽君^{1,2*}

(1. 北京体育大学运动生理教研室,北京 100084; 2. 北京体育大学运动与体质健康教育部重点实验室,北京 100084; 3. 北京体育大学中国运动与健康研究院,北京 100084)

【摘要】 目的 探讨 microRNA-328(miR-328)在有氧运动改善高血压大鼠胸主动脉平滑肌细胞 L 型电压门控钙通道(voltage-gated L-type Ca^{2+} channel, LTCC)表达的中促进作用。**方法** 选取 12 周龄雄性正常血压大鼠(Wistar Kyoto, WKY)与自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rat, SHR)随机分为正常血压对照组(WKY-C)、正常血压运动组(WKY-EX)、高血压对照组(SHR-C)、高血压运动组(SHR-EX),运动组进行 12 周中等强度跑台训练。12 周后采用股动静脉置管术检测大鼠心血管反应;取大鼠胸主动脉,采用 HE 染色检测胸主动脉形态,qPCR 检测 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基 mRNA、miR-328 表达,Western Blot 检测 α_{1C} 和 β_1 亚基蛋白表达。离体实验,培养 WKY 胸主动脉平滑肌细胞,脂质体转染 miR-328 mimic 和 miR-328 inhibitor 使之过表达或沉默,检测 LTCC α_{1C} 及 β_1 亚基 mRNA 和蛋白表达变化。**结果** (1)有氧运动可显著降低 SHR 体重、血压和心率;(2)运动可显著降低 SHR 胸主动脉壁厚;(3)运动可显著降低 SHR 对去甲肾上腺素的升压反应和硝苯地平 Nifedipine (LTCC 阻断剂)的降压反应;(4)SHR-C 组的 LTCC α_{1C} 及 β_1 亚基 mRNA、蛋白表达显著高于 WKY-C 组,而 SHR-EX 组的 α_{1C} 及 β_1 亚基 mRNA、蛋白表达显著低于 SHR-C 组;(5)SHR-C 组中 miR-328 的表达显著低于 WKY-C 组,12 周有氧运动后 miR-328 表达量显著增加;(6)离体实验中,与对照组相比,转染 miR-328 mimic 组 α_{1C} 和 β_1 亚基 mRNA、蛋白表达显著下调,而转染 miR-328 inhibitor 组 α_{1C} 和 β_1 亚基 mRNA、蛋白表达显著上调。**结论** 规律有氧运动可有效降低 SHR 血压,调控 miR-328 靶向抑制 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基的表达,可能是运动改善高血压胸主动脉 LTCC 重构的机制之一。

【关键词】 高血压;miR-328;有氧运动;LTCC;血管平滑肌细胞

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)06-0749-10

Effect of miR-328 in the exercise-induced improvement of the L-type calcium channel expression in thoracic aorta from hypertensive rats

QIU Fang¹, ZHOU Yang¹, ZHANG Yanyan¹, JIN Cheng¹, LIU Xiaodong¹, WU Ying^{1,2}, LYU Yuanyuan³, SHI Lijun^{1,2*}

(1. Department of Exercise Physiology, Beijing Sport University, Beijing 100084, China.

2. Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing Sport University, Beijing 100084.

3. China Institute of Sport and Health Science, Beijing Sport University, Beijing 100084)

Corresponding author: SHI Lijun. E-mail: shilj@bsu.edu.cn

【基金项目】 国家自然科学基金(32071174,31771312),中央高校基本科研业务费专项资金(2020049)。

Funded by National Natural Science Foundation of China(32071174,31771312), Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (2020049)。

【作者简介】 邱方(1989—),女,在读博士研究生,研究方向:运动和心血管生理学。Email:2019112031@bsu.edu.cn

【通信作者】 石丽君(1972—),女,教授,博士,博士生导师,研究方向:运动和心血管生理学。Email:shilj@bsu.edu.cn

[Abstract] Objective The present study investigated the effect of microRNA-328 (miR-328) during the aerobic exercise-induced improvement of voltage-gated L-type Ca^{2+} channel (LTCC) expression in thoracic aorta smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats (SHRs). **Methods** Twelve-week-old male normotensive Wistar Kyoto rats (WKYs) and SHRs randomly were separated into a control group (SHR-C and WKY-C) and an exercise group (SHR-EX and WKY-EX). Rats in exercise were subjected to moderate-intensity treadmill training for 12 weeks. The cardiovascular responses of rats were then detected by femoral arterial and venous cannulation. The thoracic aorta was stained with hematoxylin and eosin (HE) for histological assays. The mRNA expression levels of LTCC α_{1C} and β_1 subunits and the expression of miR-328 were detected by qPCR. The protein expression levels of LTCC α_{1C} and β_1 subunits were detected by Western Blot. For *in vitro* analysis, primary vascular smooth muscle cells (VSMCs) were isolated and cultured from the thoracic aorta of WKYs. Both miR-328 mimic and miR-328 inhibitor were transfected into cultured arterial myocytes to produce miR-328 overexpression or silencing. The mRNA and protein expression levels of LTCC α_{1C} and β_1 subunits were detected. **Results** Aerobic exercise significantly reduced body weight, blood pressure, and heart rate in SHRs. Aerobic exercise significantly reduced the wall thickness of thoracic aorta in SHRs. Exercise significantly reduced the pressor response to norepinephrine and the depressor response to nifedipine (LTCC blocker) in SHRs. The mRNA and protein expression levels of LTCC α_{1C} and β_1 subunits were significantly upregulated in the SHR-C group, compared with the WKY-C group, while the mRNA and protein expression levels of LTCC α_{1C} and β_1 subunits were downregulated in the SHR-EX group, compared with the SHR-C group. miR-328 expression was significantly lower in the SHR-C group than that in the WKY-C group; this expression significantly increased after aerobic exercise. In the transfection experiment, compared with the negative control (NC) group, the mRNA and protein expression levels of α_{1C} and β_1 subunits were significantly downregulated in the miR-328 mimic transfected group; these expression was significantly upregulated in the miR-328 inhibitor transfected group. **Conclusions** Regular aerobic exercise may effectively reduce blood pressure in SHR and enable miR-328 to inhibit LTCC α_{1C} and β_1 subunit expression. This mechanism might contribute to exercise-mediated improvement of LTCC channel remodeling in hypertensive thoracic aorta.

[Keywords] hypertension; miR-328; aerobic exercise; LTCC; vascular smooth muscle cells

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

据世界卫生组织最新的卫生统计数据,高血压是一个主要的公共卫生问题,影响到 25 岁及以上 40% 的成年人,其发病率和死亡率很高。长期高血压时,全身动脉系统受血管内高压力的影响会产生病变,导致血管结构和功能的改变。在高血压病理过程中,大动脉长期承受高应力的影响,导致血管顺应性下降,是心血管功能异常的主要原因。血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 是构成血管壁结构和功能的主要成分, L 型电压门控钙通道 (voltage-gated L-type Ca^{2+} channel, LTCC) 是存在于 VSMC 膜上的一种主要钙通道,控制外钙内流,是 VSMC 收缩的结构基础,在调节血管张力和血压中起重要作用^[1]。LTCC 由成孔 α_{1C} 和辅助 β 、 $\alpha_2\delta$ 和 γ 亚基组成,它们共同调节通道功能^[2]。其中 α_{1C} 亚基是 LTCC 的门控装置和 Ca^{2+} 的渗透孔道,作为支架蛋白, β 亚基可以定位和整合细胞内信号以影响 LTCC 门控特性。研究证实, VSMC 中 LTCC 的上调是高血压的一个标志性特征,且细胞膜中 LTCC 蛋白表达量与体内血压水平呈正相关^[3],但其潜在的机制尚不清楚。有研究发现,与正常血压

大鼠 (Wistar Kyoto, WKY) 相比,自发性高血压大鼠 (Spontaneously hypertensive rat, SHR) 肠系膜动脉 LTCC 转录水平略高,但其蛋白水平高 3.4 倍^[4]。在猪肺动脉高压模型中,肺动脉 LTCC 蛋白表达显著升高,但转录水平没有变化^[5]。因此,转录后调控可能在 LTCC 表达中发挥更重要的作用。

MicroRNA (miRNA, miR) 是一种短的非编码 RNA 片段,通过靶向 mRNA 在转录后调控基因和蛋白质的表达^[6]。miRNAs 的失调可能导致疾病的发展,因参与多种细胞功能,例如增殖、迁移和凋亡。多篇综述报道 miRNA 在高血压的病理生理过程中发挥重要作用^[6-7]。近期研究发现 miRNA 可能是 LTCC 转录后水平的一种调控机制, miR-1、miR-145 和 miR-328 直接靶向或调节 VSMC 中 LTCC 的功能^[8-9]。在血管和心肌细胞中检测发现, miR-328 对 LTCC α_{1C} 亚基基因 (*CACNA1C*) 和 β_1 亚基基因 (*CACNB1*) 有靶向作用,该研究发现 miR-328 可以抑制缺氧性肺动脉高压 LTCC 的表达, miR-328 的过表达可以降低右心室收缩压和肺动脉壁厚度^[10-11]。

长期规律运动是预防和控制高血压推荐的非

药物治疗法。我们前期研究发现,有氧运动可逆转高血压血管平滑肌 LTCC 结构和功能重构,改善血管功能,调控血压水平^[12-14],但运动调控血管平滑肌离子通道功能的潜在机制仍不清楚。规律有氧运动作为一种环境表观遗传调制器,可通过 DNA 甲基化、组蛋白修饰和 miRNA 等表观遗传修饰,调控心血管相关基因表达,进而改善心血管结构和功能^[15-16]。miRNA 作为表观调控的重要组成部分在心血管系统中高度表达,参与调节 VSMC 离子通道功能^[11]。规律有氧运动作为一种良性刺激,在逆转高血压 LTCC 重构过程中,miR-328 是否参与其中,目前尚不清楚。因此,本研究通过建立有氧运动模型,观察有氧运动对正常血压大鼠和高血压大鼠胸主动脉中 LTCC 亚基和 miR-328 的表达影响,并探讨 miR-328 在其中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 12 周龄雄性正常血压大鼠 WKY 和自发性高血压大鼠 SHR 各 24 只, WKY 体重约 270 g、SHR 体重约 245 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】, 饲养于北京体育大学动物实验室【SYXK(京)2016-0033】。大鼠自由饮水进食, 温度 22~24℃, 相对湿度 40%~60%, 所有实验方案获得北京体育大学运动科学实验室伦理委员会批准(IACUC 2017003A)。

1.1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠、去甲肾上腺素(Norepinephrine, NE)和硝苯地平(Nifedipine)均购买于 sigma 公司, Rabbit polyclonal anti- α_{1C} (Alomone Laboratories, Israel), Anti- β_1 (Sigma, USA), GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, USA), Rabbit Polyclonal to α -SM-actin (Abcam, UK), BCA 试剂盒 (Pierce, USA), miRcute miRNA 提取分离试剂盒 (Tiangen, China), RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA), Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG antibody (Life Technologies, USA), Lipofectamine RNAiMAX 试剂 (Invitrogen, USA), DMEM 培养基、HBSS 缓冲液、胎牛血清、双抗 Penicillin/streptomycin 均购买于 Gibco 公司。

实验仪器包括智能无创血压仪 (BP-2010A, Softron Biotechnology, 中国), PowerLab 系统

(PL3504, AD Instruments, Australia), 离体微血管环张力测定系统 (620 M, Danish Myo Technology, Denmark), PCR 仪 (ABI, USA), 荧光定量 PCR 仪 (ABI, USA), Chemi DOC XRS + 成像系统 (Bio-Rad, USA), CO₂ 细胞培养箱 (Thermo, USA), 倒置生物显微镜 (IX71-F22PH, Olympus, Japan), Leica SP8 TCS 激光共聚焦系统 (Leica, Germany)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠分组和有氧运动模型建立

WKY 和 SHR 随机分为安静对照组 (WKY-C, SHR-C) 和有氧运动组 (WKY-EX, SHR-EX), 每组各 12 只。运动组大鼠先进行 1 周的适应训练, 之后进行 12 周中等强度的跑台运动, 坡度 0°, 每周 5 d, 每天 1 h, 速度为 20 m/min, 相当于 55%~65% $\dot{V}O_2$ max。WKY-C 和 SHR-C 作为对照组不做运动干预。

1.2.2 大鼠尾动脉无创血压监测

大鼠清醒、安静时的血压和心率 (heart rate, HR) 采用鼠尾动脉智能无创血压仪 (BP-2010A) 测量。

1.2.3 大鼠心血管反应测定

各组大鼠于 12 周有氧运动后, 各选取 6 只, 进行股动静脉置管术测定大鼠心血管反应。大鼠腹腔注射戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 分别于股动脉和股静脉的近心端 (2 根线) 和远心端 (1 根线) 穿线, 用动脉夹夹住血管近心端, 于远心端结扎部位前剪一小口, 将导管沿着血管行走方向插入管腔, 之后固定导管, 注射 50 IU/mL 的肝素钠 0.5 mL 左右进行封管。术后 24 h 大鼠恢复良好, 在清醒安静状态下测试, 通过 PowerLab 系统连接股动脉插管外侧头, 记录大鼠基础血压。之后在大鼠股静脉分别注射去甲肾上腺素 (Norepinephrine, NE, 18 μ g/kg) 和 LTCC 阻断剂硝苯地平 (Nifedipine, 1 mg/kg), 观察大鼠血压变化, 每种药物的注射间隔时间在 5 h 以上, 以保证血压恢复正常水平。

1.2.4 HE 染色

取大鼠胸主动脉, 剥离周边组织后进行固定, 经梯度乙醇二甲苯脱水后溶于石蜡, 切片脱蜡后用苏木素和伊红染色, 乙醇二甲苯处理后封片并拍摄, 用 Image J 软件进行测量。每个样本组织切片随机 5 个视野, 每个视野测量 3 次并取平均值, 将 5 个视野的平均值作为胸主动脉壁厚。

1.2.5 免疫蛋白印迹

大鼠胸主动脉低温下与裂解液混匀, 离心后取

上清液测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 电泳分离等量蛋白质(约 50 μg)并转至 PVDF 膜上,用 5% BSA 封闭。加入一抗 Rabbit polyclonal anti-α_{1C}(1:200), Anti-β₁(1:200) 和 GAPDH(1:500) 4℃ 孵育过夜。第 2 天加入二抗室温孵育 1 h,滴加 ECL 发光液到 PVDF 膜上,放入 Chemi DOC XRS + 成像系统显影。

1.2.6 Real time PCR

LTCC α_{1C}和 β₁ 亚基 mRNA 测定,取胸主动脉的总 RNA 进行常规的 Real time PCR。miR-328 测定采用 miRcute miRNA 提取分离试剂盒提取胸主

动脉的 miRNA;采用 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit,以 U6 为内参基因,使用miR-328含特异茎环结构的引物^[9]进行反转录反应;cDNA 扩增采用 Power SYBR Green PCR Master Mix 进行反应。LTCC α_{1C}亚基(*CACNA1C*)和 LTCC β₁ 亚基(*CACNB1*)以 GAPDH 为内参照,miR-328 以 U6 为内参照。所有 PCR 反应均重复进行,采用 2^{-ΔΔCt}法进行评估,分析目的基因的相对表达。扩增引物由上海吉玛公司合成,序列如下(表 1):

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 RT-PCR primers sequences		
引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
α _{1C}	5'-GCCGCAGTTAAGTCCAATGT-3'	5'-GCACTTCTGTGAGCCAATGA-3'
β ₁	5'-GCCGCGACTACTGCTAATGT-3'	5'-GCACTTAGCTGAGTCAATGA-3'
miR-328	5'-ATTATATCTGGCCCTCTCTGC-3'	5'-TCGTATCCAGTGCAGGGTC-3'
U6	5'-CTCGCTTCGGCAGCACATATACT-3'	5'-ACGCTTCACGAATTTGCGTGTGTC-3'
GAPDH	5'-CCTGCCAAGTATGATGAC-3'	5'-GGAGTTGCTGTTGAAGTC-3'

1.2.7 VSMC 原代与传代培养

取 12 周龄健康雄性 WKY,麻醉后,无菌条件下取出大鼠胸主动脉,浸于 HBSS 溶液中,剥离干净动脉周围的脂肪组织,并将动脉内血液排除,呈白色;在胶原酶培养皿中,37℃ 孵育大鼠动脉约 45 min,剥离动脉外膜,并去除内皮;转移至弹性蛋白酶培养皿中,把动脉剪成细小碎片(1 mm × 1 mm),37℃ 孵育 30~35 min,用巴氏吸管进行反复吹打使组织碎片消失;1800 rpm 离心 10 min,丢弃上清液,将原代 VSMC 用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 培养液培养,放入 37℃ 和 5% CO₂ 培养箱中培养细胞。当培养皿中 VSMC 密度达 80%~90%时,加入胰酶进行消化并传代;VSMC 传至 5~7 代且细胞密度达 60%~80%时进行转染。使用平滑肌特异性肌动蛋白 α-actin 鉴定 VSMC,纯度要达 90%~95%方可进行后续转染实验。

1.2.8 VSMC 免疫荧光染色

吸走培养皿中的培养基,VSMC 于 4%的多聚甲醛固定 30 min;用 0.2% Triton X-100 对细胞进行膜穿孔孵育 15 min,PBS 清洗 3 次;用 5%BSA 孵育 60 min,封闭非特异性结合抗体部位;滴加一抗 Rabbit Polyclonal to α-SM-actin(1:200),4℃ 过夜孵育,PBS 清洗 3 次;滴加二抗 Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG antibody(1:1000),对细胞孵育 60 min,PBS 漂洗后滴加封片剂以盖玻片封片。在 24 h 后激光共聚焦成像系统进行信号捕捉与成像。

1.2.9 脂质体转染

取生长状态良好的 VSMC,将细胞随机分为三组 miR-328 mimic 组、miR-328 inhibitor 组和空脂质体 negative control (NC) 组,采用 Lipofectamine RNAiMAX 试剂将各 miR-328 干扰序列转染进 VSMC(表 2)。于转染后 24、48、72、96 h 收集 VSMC 进行蛋白指标检测,于转染后 12、24、48、72 h 收集 VSMC 进行 mRNA 定量。

表 2 各组 miRNA 干扰序列

Table 2 miRNA interference sequence	
组别 Groups	序列 Sequences
miR-328 mimics	5'-CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU-3'
	5'-GGAAGGGCAGAGAGGGCCAGUU-3'
miR-328 inhibitor	5'-ACGGAAGGGCAGAGAGGGCCAG-3'
NC	5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

1.3 统计学分析

实验数据均以平均值 ± 标准误($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,使用 GraphPad Prism7 软件作图,采用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素或双因素方差分析,*P* < 0.05 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 有氧运动对高血压大鼠体重、血压和心率的影响

各组大鼠于运动干预前(12 周龄)和 12 周有氧运动干预后(24 周龄)采用尾动脉无创血压仪测量

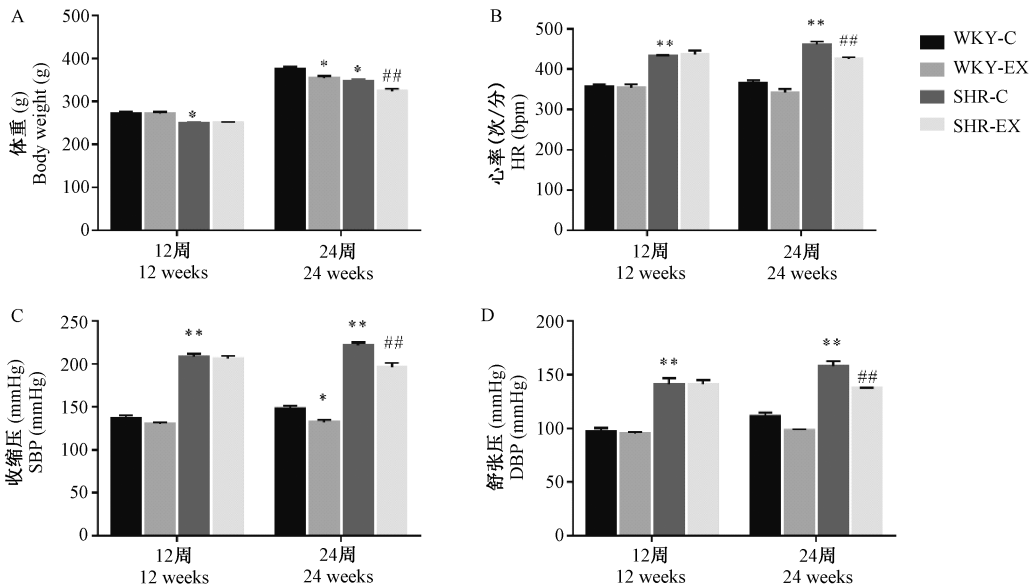
大鼠血压和心率。运动前 SHR-C 组体重显著低于 WKY-C 组 ($P < 0.05$), 而 SHR-C 组的收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP) 和 HR 显著高于 WKY-C 组 ($P < 0.01$)。WKY-EX 组和 SHR-EX 组体重、SBP、DBP 和 HR 与各自对照组相比均无显著差异 (图 1)。

12 周有氧运动后, WKY-EX 组和 SHR-EX 组体重均显著低于各自对照组 ($P < 0.05$), SHR-C 组体重仍显著低于 WKY-C 组 ($P < 0.05$)。WKY-EX 组 SBP

显著低于 WKY-C 组 ($P < 0.05$); SHR-C 组 SBP、DBP 和 HR 显著性高于 WKY-C 组, 而 SHR-EX 组 SBP、DBP 和 HR 显著低于 SHR-C 组 ($P < 0.01$) (图 1)。

2.2 有氧运动对各组大鼠胸主动脉形态学的影响

HE 染色观察各组大鼠胸主动脉壁厚变化 (图 2)。WKY-C 组和 WKY-EX 组大鼠胸主动脉壁厚无明显差异, 与 WKY-C 组相比, SHR-C 组胸主动脉管壁明显增厚 ($P < 0.01$); SHR-EX 组胸主动脉壁厚显著小于 SHR-C 组 ($P < 0.05$)。

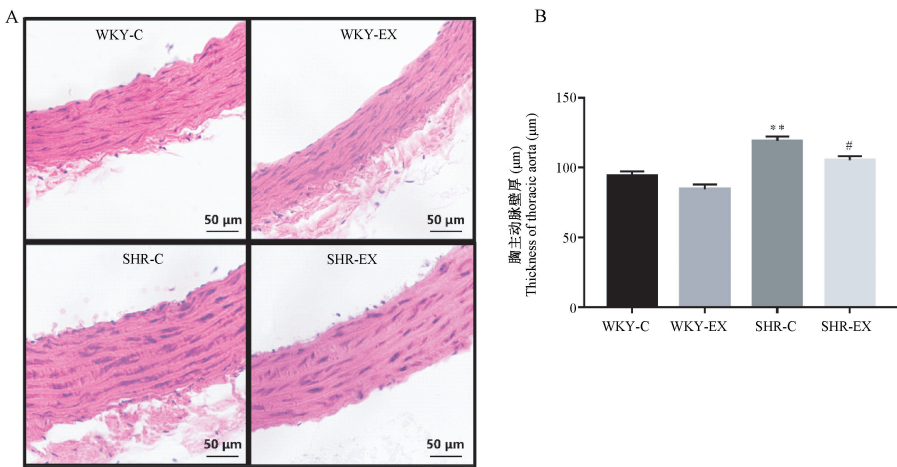


注:与 WKY-C 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 SHR-C 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 有氧运动对 WKY 和 SHR 体重、血压和心率的影响 ($n = 12$)

Note. Compared with group WKY-C, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with group SHR-C, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the next figures)

Figure 1 Effects of aerobic exercise on body weight, blood pressure and heart rate of WKY and SHR ($n = 12$)



注: A: 胸主动脉的组织学结构 (HE 染色, $\times 400$, 标尺 = 50 μm); B: 胸主动脉壁厚统计柱状图。

图 2 有氧运动对各组大鼠胸主动脉壁厚的影响 ($n = 6$)

Note. A. Histological structure of the thoracic aorta (HE staining, $\times 400$. Bar = 50 μm). B. Statistical histogram of thoracic aortic wall thickness.

Figure 2 Effects of aerobic exercise on the thickness of thoracic aortic aorta of rats ($n = 6$)

2.3 有氧运动对各组大鼠心血管反应的影响

各组大鼠于 12 周有氧运动后,采用股动静脉置管术监测大鼠的心血管反应。在体股静脉注射 NE (18 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 后,四组大鼠血压均显著增加;与 WKY-C 组相比,SHR-C 组注射 NE 后平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP) 升高幅度 (ΔMAP) 显著增加 ($P < 0.05$);与 SHR-C 组相比,SHR-EX 组注射 NE

后 ΔMAP 显著下降 ($P < 0.05$) (图 3A、3C)。

股静脉注射 Nifedipine (1 mg/kg) 后,四组大鼠血压明显下降;SHR-C 组大鼠 MAP 下降幅度最明显,且显著高于 WKY-C 组的下降幅度 ($P < 0.05$);与 SHR-C 组相比,SHR-EX 组大鼠 MAP 降低幅度明显减少 ($P < 0.05$);WKY-C 组与 WKY-EX 组 MAP 降低幅度无明显差异 (图 3B、3D)。

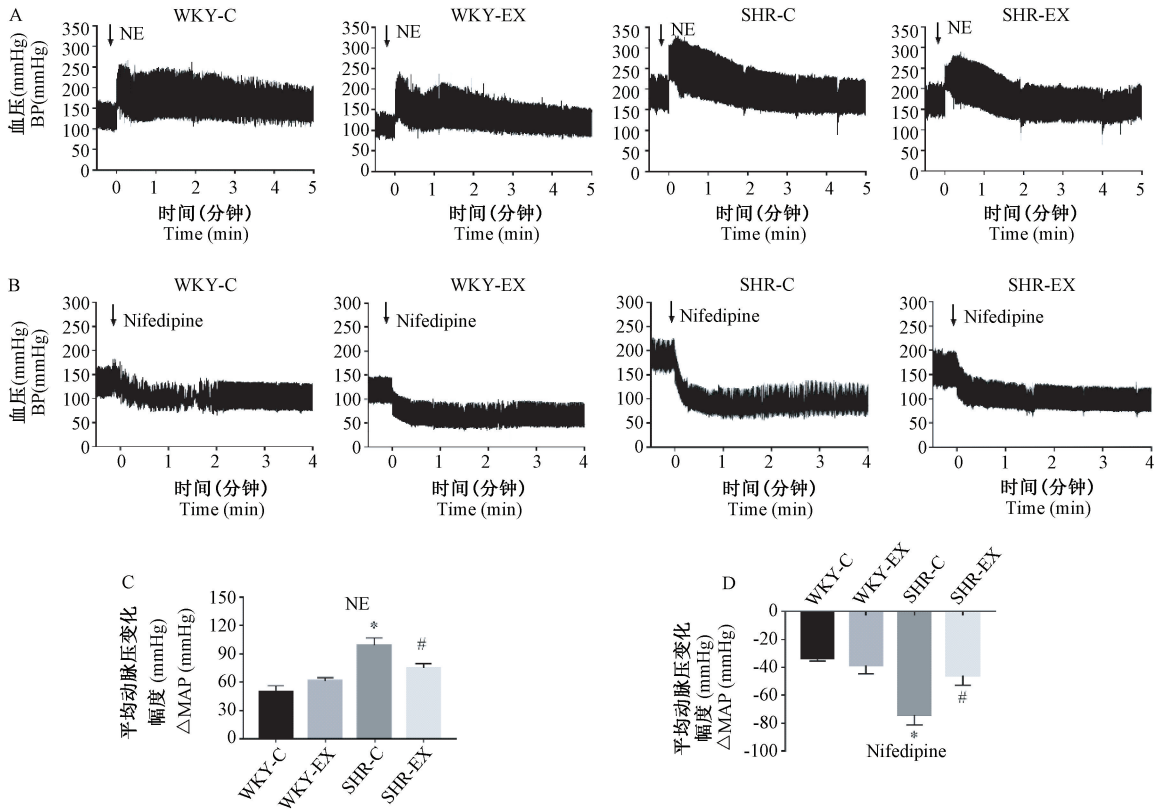


图 3 有氧运动对各组大鼠心血管反应的影响 ($n = 6$)

Figure 3 Effects of aerobic exercise on cardiovascular response of rats ($n = 6$)

2.4 有氧运动对高血压大鼠胸主动脉 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基 mRNA 和蛋白表达的影响

qPCR 检测各组胸主动脉中 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基与相应的 GAPDH 的 mRNA 相对表达值 (图 4A、4B)。SHR-C 组 LTCC α_{1C} 和 β_1 的 mRNA 的表达量明显高于 WKY-C 组 ($P < 0.01$)。经 12 周有氧运动后, WKY-EX 组和 SHR-EX 组的 LTCC α_{1C} 和 β_1 的 mRNA 表达量都呈现下降趋势,但与各自对照组相比较, SHR-EX 的表达量显著性下调 ($P < 0.01$), 而 WKY-EX 组表达量无显著性差异。

Western Blot 检测各组胸主动脉 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基与相应的 GAPDH 的蛋白相对表达值 (图 4B、4D)。与 WKY-C 组相比, SHR-C 组胸主动脉中

LTCC α_{1C} 和 β_1 表达显著上调 ($P < 0.01$)。与 SHR-C 组相比, SHR-EX 组的 LTCC α_{1C} 蛋白表达呈显著性下调 ($P < 0.05$), LTCC β_1 蛋白表达呈非常显著性下调 ($P < 0.01$)。WKY-EX 组中 α_{1C} 蛋白表达相比于 WKY-C 组也有所下降, 但表达不明显。

2.5 有氧运动促进高血压大鼠胸主动脉中 miR-328 表达增加

运动对各组胸主动脉中 miR-328 与相应的 U6 相对表达值 (图 5)。与 WKY-C 相比, SHR-C 组中 miR-328 的表达呈现显著性降低 ($P < 0.01$)。通过 12 周有氧运动后, 与各自对照组相比, SHR-EX 组中 miR-328 表达明显升高 ($P < 0.05$), WKY-EX 组无显著性差异 (图 5)。

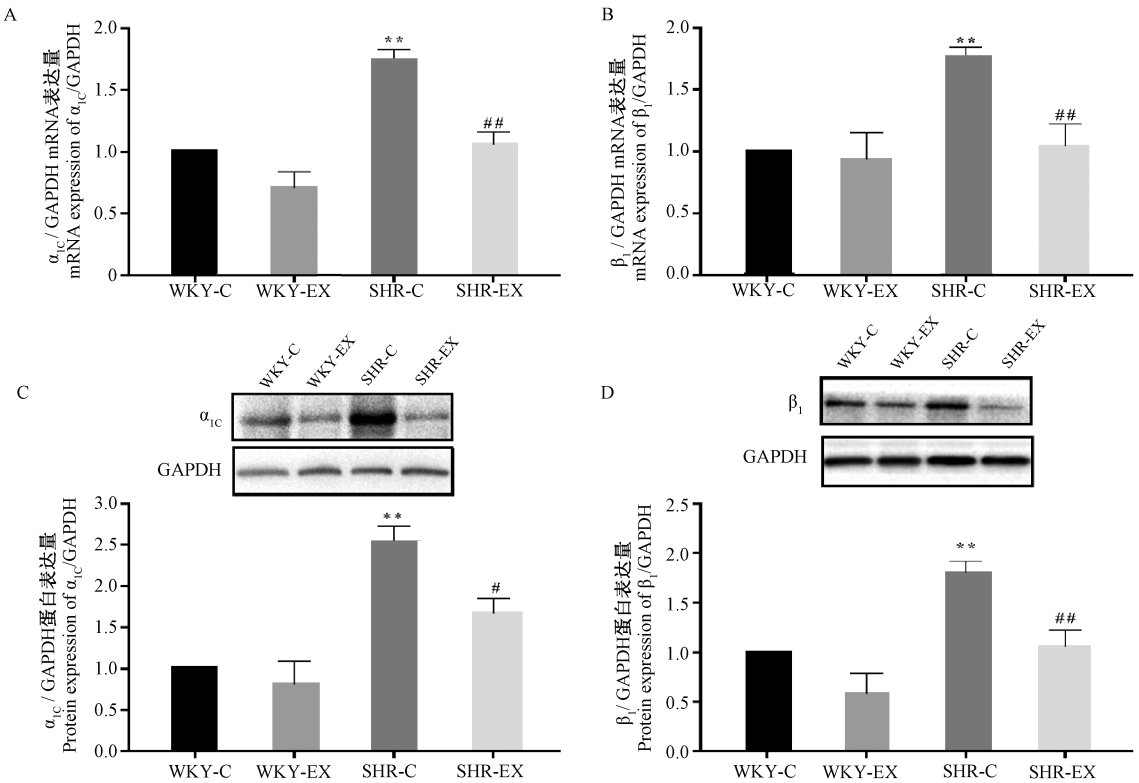


图 4 各组大鼠胸主动脉 LTCC α_{1c} 和 β_1 亚基 mRNA 和蛋白表达($n=6$)

Figure 4 The mRNA and protein expression of LTCC α_{1c} and β_1 subunits in thoracic aorta from four groups($n=6$)

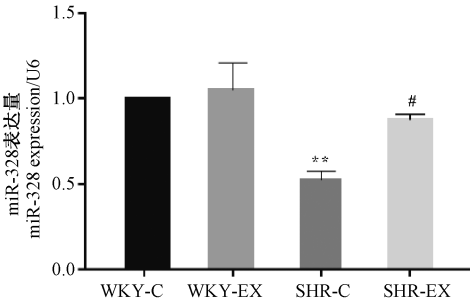


图 5 各组大鼠胸主动脉 miR-328 表达($n=6$)

Figure 5 Expression of miR-328 normalized to U6 in rat thoracic aorta($n=6$)

2.6 miR-328 靶向调控 LTCC α_{1c} 和 β_1 亚基 mRNA 和蛋白表达

2.6.1 VSMC 鉴定

如图 6 所示,大鼠 VSMC 原代提取、培养并传代,用平滑肌特异性肌动蛋白 α -actin 免疫荧光染色进行鉴定,通过激光共聚焦显微镜拍摄发现,VSMC 骨架蛋白 α -actin 清晰可见,细胞质内存在大量红色的细丝,表明培养的细胞为 VSMC。

2.6.2 miR-328 对 LTCC α_{1c} 亚基 mRNA 和蛋白表达量的影响

离体转染 12、24、48、72 h 后检测 VCSMs 内

LTCC α_{1c} 亚基 mRNA 表达,qPCR 结果如图 7A,与相同时间段的 NC 组相比, α_{1c} mRNA 表达在瞬时转染 miR-328 mimic 组 24 h 出现下降趋势($P>0.05$),48 h 表达呈显著性降低($P<0.01$);转染 miR-328 inhibitor 组的 α_{1c} mRNA 表达量在 24 h($P<0.01$)和 48 h($P<0.05$)呈显著性上调。

离体转染 24、48、72、96 h 后检测 VCSMs 内 LTCC α_{1c} 亚基蛋白表达,Western Blot 结果如图 7B、7C,与同时段 NC 组相比,转染 miR-328 mimic 组的 α_{1c} 蛋白表达量在 48 h($P<0.05$)和 72 h($P<0.01$)蛋白

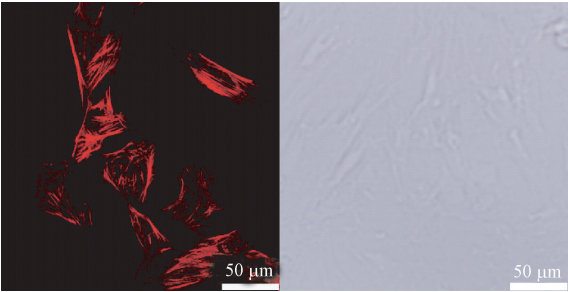


图 6 平滑肌特异性肌动蛋白 α -actin 免疫荧光标记的 VSMC 代表图

Figure 6 Representative immunofluorescence images of VSMC stained with α -SM-actin

表达量显著降低,而 miR-328 inhibitor 组中 α_{1C} 的蛋白表达量在 48 h ($P < 0.01$) 和 72 h ($P < 0.05$) 显著上调。由此可见,miR-328 对体外培养的 VSMC 的 LTCC α_{1C} 亚基有明显的抑制作用。

2.6.3 miR-328 对 LTCC β_1 亚基 mRNA 和蛋白表达量的影响

离体转染 12、24、48、72 h 后检测 VCSMs 内 LTCC β_1 亚基 mRNA 表达,qPCR 结果显示如图 7D,与相同时间段 NC 组相比,转染 miR-328 mimic 组的 β_1 mRNA 表达在 24 h 显著下调($P < 0.05$),而转染 miR-328 inhibitor 组的 β_1 mRNA 的表达量在 24 h ($P < 0.05$)、48 h ($P < 0.01$) 和 72 h ($P < 0.05$) 呈显著性上调。

离体转染 24、48、72、96 h 后检测 VCSMs 内 LTCC β_1 亚基蛋白表达,Western Blot 结果如图 7B、7E,与同时间段 NC 组相比,转染 miR-328 mimic 组的 β_1 蛋白表达在 48 h ($P < 0.01$) 和 72 h ($P < 0.05$) 呈显著性下调,而转染 miR-328 inhibitor 组中 β_1 的蛋白表达 48 h ($P < 0.01$) 和 72 h ($P < 0.05$) 呈显著性上调。由此可见,miR-328 对体外培养的 VSMC 的 LTCC β_1 亚基有明显的抑制作用。

3 讨论

本文研究了 12 周规律有氧运动对 SHR 胸主动脉 LTCC 表达的影响,并探讨了 miR-328 在其中的

靶向作用。结果表明,与 WKY-C 组相比,SHR-C 胸主动脉 miR-328 表达下调,LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基的表达上调;12 周有氧运动后可增加 SHR 胸主动脉 miR-328 表达,靶向抑制 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基的表达,从而有效降低 SHR 血压。

胸主动脉作为人体最大的弹性血管,在维持整个心动周期中动脉血压的相对稳定起重要作用。因此,我们选取胸主动脉作为研究对象。研究表明,高血压的发生、发展与血管结构和功能变化密切相关,主要表现为血管内皮细胞功能障碍,血管平滑肌细胞增生,血管壁增厚,管腔狭窄,血管顺应性下降,导致血压增加^[17]。有氧运动可有效降低高血压大鼠的血压和心率作用涉及多种机制^[18]。如长期运动导致心脏和动脉结构及功能发生适应性变化,心交感神经减弱,迷走张力增高,主动脉及大动脉血管顺应性变大,外周血管阻力减弱,内皮功能改善等,从而降低心率和血压^[19]。本研究 SHR-C 组胸主动脉的管壁厚度明显高于 WKY-C 组,而 SHR-EX 组胸主动脉壁厚明显低于 SHR-C 组,说明 12 周有氧运动可以明显改善高血压大鼠血管壁厚的现象。

LTCC 是 VSMC 上的一种 Ca^{2+} 通道,有两个主要亚基 α_{1C} 和 β_1 , α_{1C} 主要控制细胞外的钙离子内流, β_1 则负责 α_{1C} 生理功能的激活,二者共同作用参与 LTCC 功能的多样性^[20]。研究证明,血管 LTCC 亚单位组成是动脉张力和血压水平的决定因素^[21]。

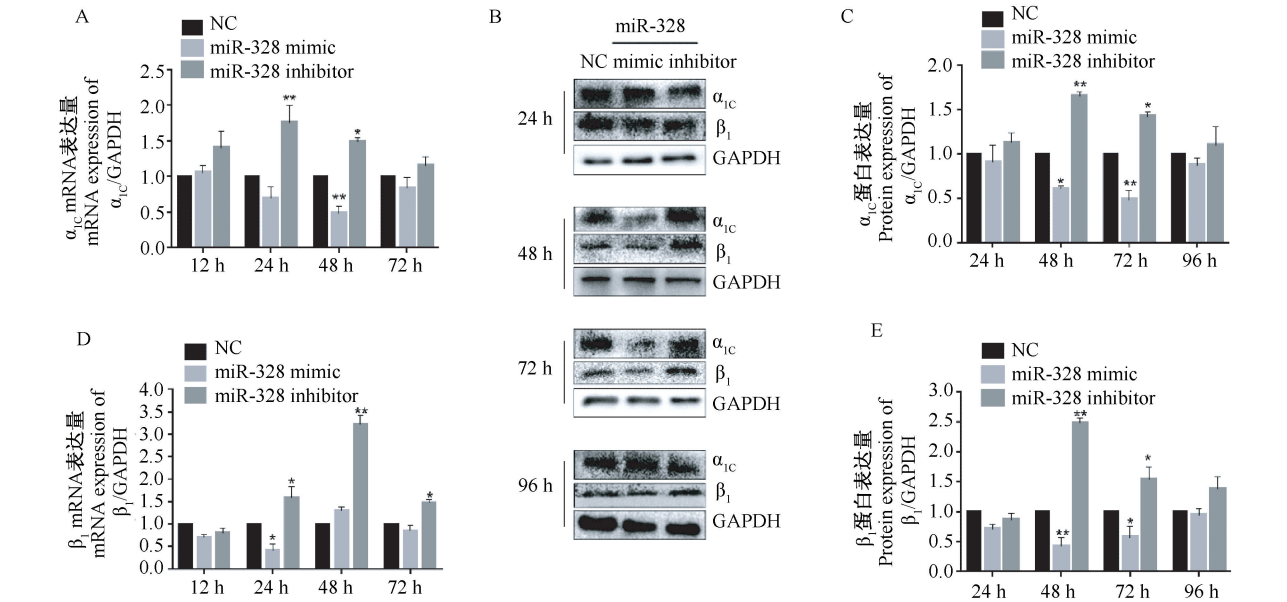


图 7 VSMC 转染 miR-328 mimic 或 inhibitor 后 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基 mRNA 和蛋白表达 ($n=6$)

Figure 7 The mRNA and protein expression of LTCC α_{1C} and β_1 subunits after transfection with miR-328 mimic or inhibitor in VSMC ($n=6$)

LTCC 表达和功能异常会导致肌源性张力和血压的异常变化, VSMC 中 LTCC 上调是高血压的一个特异性标志^[22]。为了研究 LTCC 功能在血压调控中的作用, 我们通过体静脉注射 NE 和 Nifedipine (LTCC 特异性阻断剂), 结果发现运动可明显降低高血压大鼠对 NE 的升压反应和 Nifedipine 的降压反应。说明高血压大鼠 LTCC 功能显著上调, 而有氧运动后可显著降低 LTCC 在调控血压中的功能亢奋。高血压血管平滑肌 LTCC 表达的增多被认为是其功能上调的原因。高血压模型 VSMC 膜上 LTCC 表达增加, 胞外 Ca^{2+} 内流增加, 从而引起血管收缩^[23]。本研究 Western Blot 和 qPCR 检测结果亦表明, 高血压大鼠胸主动脉中 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基 mRNA 和蛋白表达显著高于正常血压大鼠, 而经 12 周有氧运动后高血压大鼠的 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基 mRNA 和蛋白表达明显降低。运动后 LTCC 表达降低可导致 LTCC 功能下调, 这可能是导致血管功能改善的因素之一。

表观遗传学是指在没有改变基因序列的情况下发生的基因表达的变化, 表观遗传修饰主要包括 DNA 甲基化、组蛋白质修饰和非编码 miRNA^[24]。已证实 miRNA 在高血压血管重构中具有重要作用, 可调控 VSMC 的增殖、分化、凋亡和表型转换, 为心血管疾病提供新的治疗靶点^[25]。miRNA 作为重要的表观调控机制之一, 很多研究表明, 规律运动可以通过表观遗传调控改善高血压^[26-27]。有氧运动可使 SHR 主动脉中 miR-27a 和 miR-155 上调, miR-143 下调, 改善肾素-血管紧张素系统平衡, 进而减弱胸主动脉重构和血压^[28]。Liao 等^[29]发现在运动干预过程中, miR-145 上调可能参与了高血压动脉 VSMC 从去分化表型向收缩表型的转变, 从而改善血压。在本研究中, SHR-C 组胸主动脉 miR-328 的表达显著低于 WKY-C 组, 而 SHR-EX 组胸主动脉 miR-328 表达显著高于 SHR-C 组。说明 miR-328 的表达与 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基 mRNA 和蛋白表达呈高度负相关, 有氧运动可诱导高血压大鼠胸主动脉 miR-328 升高, 靶向抑制 LTCC 亚基表达从而降低血压。研究发现肺动脉高压时, miR-328 可以抑制 LTCC α_{1C} 亚基的表达, 减弱肺动脉重塑^[11]。Lu 等^[10]在小鼠心肌细胞培养过程中发现, 敲除 miR-328 导致 α_{1C} 和 β_1 蛋白表达的增高。为了进一步验证 miR-328 对胸主动脉 VSMC LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基表达的负调控作用。我们进行了胸主动脉 VSMC 体

外培养, 脂质体转染 miR-328 mimic, miR-328 inhibitor 使之过表达或沉默, 也证实 miR-328 可靶向抑制 LTCC α_{1C} 及 β_1 亚基 mRNA 和蛋白表达。

有氧运动可通过调节 miRNA 的水平, 调控心血管相关基因及蛋白表达, 进而起到保护心血管作用。本研究通过股动静脉置管术、HE 染色、qPCR、Western Blot、细胞培养和转染等技术, 从心血管反应、动脉形态结构、LTCC 及 miR-328 表达, 证明了规律有氧运动可有效降低 SHR 血压, 调控 miR-328 在转录后靶向抑制 LTCC α_{1C} 和 β_1 亚基的表达, 提示 miR-328 可能是运动改善高血压胸主动脉 LTCC 重构的机制之一, 为运动促进心血管健康提供了理论依据。

参 考 文 献 (References)

- [1] Wamhoff BR, Bowles DK, McDonald OG, et al. L-type voltage-gated Ca^{2+} channels modulate expression of smooth muscle differentiation marker genes via a Rho kinase/myocardin/SRF-dependent mechanism[J]. Circ Res, 2004, 95(4): 406-414.
- [2] de Waard M, Gurnett CA, Campbell KP. Structural and functional diversity of voltage-activated calcium channels[J]. Ion Channels, 1996, 4: 41-87.
- [3] Cheng J, Wen J, Wang N, et al. Ion channels and vascular diseases[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(5): e146-e156.
- [4] Pratt PF, Bonnet S, Ludwig LM, et al. Upregulation of L-type Ca^{2+} channels in mesenteric and skeletal arteries of SHR[J]. Hypertension, 2002, 40(2): 214-219.
- [5] Hirenallur-S DK, Haworth ST, Leming JT, et al. Upregulation of vascular calcium channels in neonatal piglets with hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008, 295(5): L915-L924.
- [6] Bútkai S, Thum T. MicroRNAs in hypertension: mechanisms and therapeutic targets[J]. Curr Hypertens Rep, 2012, 14(1): 79-87.
- [7] Shi L, Liao J, Liu B, et al. Mechanisms and therapeutic potential of microRNAs in hypertension[J]. Drug Discov Today, 2015, 20(10): 1188-1204.
- [8] Liao J, Zhang Y, Ye F, et al. Epigenetic regulation of L-type voltage-gated Ca^{2+} channels in mesenteric arteries of aging hypertensive rats[J]. Hypertens Res, 2017, 40(5): 441-449.
- [9] 张严焱, 徐召霞, 陈渝, 等. 运动改善高血压肠系膜动脉 LTCC 和 BKCa 通道功能的表观遗传调控机制[J]. 体育科学, 2018, 38(11): 39-49.
- [10] Zhang YY, Xu ZX, Chen Y, et al. Epigenetic regulation of exercise-improved LTCC and BKCa channels function in hypertension mesenteric arteries[J]. Chin Sport Sci, 2018, 38(11): 39-49.
- [10] Lu Y, Zhang Y, Wang N, et al. MicroRNA-328 contributes to adverse electrical remodeling in atrial fibrillation [J].

- Circulation, 2010, 122(23): 2378–2387.
- [11] Guo L, Qiu Z, Wei L, et al. The microRNA-328 regulates hypoxic pulmonary hypertension by targeting at insulin growth factor 1 receptor and L-type calcium channel- α_{1C} [J]. Hypertension, 2012, 59(5): 1006–1013.
- [12] Shi L, Zhang H, Chen Y, et al. Chronic exercise normalizes changes in Cav 1.2 and KCa 1.1 channels in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats[J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(7): 1846–1858.
- [13] 鲁妮, 陈渝, 邱方, 等. 不同强度运动对自发性高血压大鼠肠系膜动脉 CaV1.2 通道重构的影响[J]. 体育科学, 2015, 35(06): 57–63.
- Lu N, Chen Y, Qiu F, et al. Effects of varied-intensity of exercise on Cav1.2 channel remodeling in mesenteric artery from spontaneously hypertensive rats[J]. Chin Sport Sci, 2015, 35(6): 57–63.
- [14] 单美玲, 陈渝, 张严焱, 等. PKC α /CaV1.2 在有氧运动改善高血压肠系膜动脉功能中的作用[J]. 体育科学, 2019, 39(11): 57–66.
- Shan ML, Chen Y, Zhang YY, et al. The effect of aerobic exercise on the improvement of the mesenteric artery function in hypertension through PKC α /CaV1.2 pathway [J]. Chin Sport Sci, 2019, 39(11): 57–66.
- [15] Ling C, Rönn T. Epigenetic adaptation to regular exercise in humans[J]. Drug Discov Today, 2014, 19(7): 1015–1018.
- [16] Wang J, Gong L, Tan Y, et al. Hypertensive epigenetics: from DNA methylation to microRNAs[J]. J Hum Hypertens, 2015, 29(10): 575–582.
- [17] Safar ME, Toto-Moukouo JJ, Bouthier JA, et al. Arterial dynamics, cardiac hypertrophy, and antihypertensive treatment [J]. Circulation, 1987, 75(1): I156–I161.
- [18] Vina J, Sanchis GF, Martinez BV, et al. Exercise acts as a drug; the pharmacological benefits of exercise [J]. Br J Pharmacol, 2012, 167(1): 1–12.
- [19] Sabbahi A, Arena R, Elokda A, et al. Exercise and hypertension: uncovering the mechanisms of vascular control[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2016, 59(3): 226–234.
- [20] Perez RE, Schneider T. Molecular biology of calcium channels [J]. Kidney Int, 1995, 48(4): 1111–1124.
- [21] Sonkusare S, Palade PT, Marsh JD, et al. Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications[J]. Vascul Pharmacol, 2006, 44(3): 131–142.
- [22] Joseph BK, Thakali KM, Moore CL, et al. Ion channel remodeling in vascular smooth muscle during hypertension: Implications for novel therapeutic approaches [J]. Pharmacol Res, 2013, 70(1): 126–138.
- [23] Wellman GC, Cartin L, Eckman DM, et al. Membrane depolarization, elevated Ca^{2+} entry, and gene expression in cerebral arteries of hypertensive rats[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 281(6): H2559–H2567.
- [24] 汪波, 占贞贞, 曾麒麟. 心肌纤维化的表观遗传调控研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(03): 92–97.
- Wang B, Zhan ZZ, Zeng QY. The epigenetic regulation of myocardial fibrosis: an update[J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 92–97.
- [25] Jones Buie JN, Goodwin AJ, Cook JA, et al. The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors[J]. Atherosclerosis, 2016, 254: 271–281.
- [26] Denham J. Exercise and epigenetic inheritance of disease risk [J]. Acta Physiol, 2018, 222(1): e12881.
- [27] Improta CAC, Nonaka CKV, Pereira CS, et al. Exercise training-induced changes in micromas: beneficial regulatory effects in hypertension, type 2 diabetes, and obesity[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3608.
- [28] Gu Q, Wang B, Zhang XF, et al. Contribution of renin-angiotensin system to exercise-induced attenuation of aortic remodeling and improvement of endothelial function in spontaneously hypertensive rats[J]. Cardiovasc Pathol, 2014, 23(5): 298–305.
- [29] Liao J, Zhang Y, Wu Y, et al. Akt modulation by miR-145 during exercise-induced VSMC phenotypic switching in hypertension[J]. Life Sci, 2018, 199: 71–79.

[收稿日期] 2020-06-08