

张培森,梁沥文,施真. 肾周白色脂肪组织源外泌体远距调控大鼠血压 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(3): 51-58.
Zhang PS, Liang LW, Shi Z. Perirenal adipose tissue derived exosomes regulate blood pressure in rats [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(3): 51-58.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.03.007

肾周白色脂肪组织源外泌体远距调控大鼠血压

张培森¹, 梁沥文², 施真^{1*}

(1.滨州医学院生理学教研室, 山东 烟台 264003; 2.威海市中心血站, 山东 威海 264200)

【摘要】 目的 研究肾周白色脂肪组织作为内分泌器官是否以外泌体囊泡作为运载体调控大鼠动脉血压。**方法** 采用成年自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 和正常血压的 Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠。将 WKY 大鼠和 SHR 的肾周白色脂肪置于无血清 (无外泌体) 培养基中培养, 使用外泌体分离提取试剂盒 (exoEasy Maxi Kit) 分离分泌囊泡。经纳米粒径测定、透射电镜和表面标志物鉴定符合外泌体囊泡 (Exosomes, Exo) 特征后用于后续实验。SHR 或 WKY 大鼠各随机分为两组, 分别尾静脉注射 SHR 大鼠外泌体 (Exo-SHR) 或 WKY 大鼠外泌体 (Exo-WKY), 每周 1 次, 连续 6 周。在清醒状态下使用无创尾动脉加压系统测量动脉血压, 每周 1 次。注射后第 6 周末进行急性实验。采用颈动脉插管法进行动脉血压直接测定, 采用 HE 染色和 Masson 染色观察心血管病理重构。外周交感神经张力 (peripheral sympathetic tone, PST) 高低以静脉注射盐酸六烃季铵引起的降压反应与 Exo-WKY 处理的 WKY 大鼠的降压反应的比值大小表示。另外, PKH67 绿色荧光染料标记外泌体后尾静脉注射进行体内示踪, 与原代培养的神经元孵育进行体外示踪。**结果** 肾周白色脂肪组织分泌的外泌体囊泡经透射电镜观察到典型外泌体半托杯状囊泡结构, 纳米粒径检测平均直径集中在 100 nm 左右, 且具有表面特异标志物肿瘤易感基因 101 (tumor susceptibility gene, TSG101) 和白细胞分化 9 (cluster of differentiation 9, CD9) 表达。SHR 组收缩压 (Systolic blood pressure, SBP) 在注射 Exo-WKY 后的第 2 周开始下降, 并在整个干预过程中保持低于注射前的水平 ($P<0.05$)。应用 Exo-WKY 可减少 SHR 心肌细胞横截面积、主动脉中膜厚度及降低 PST ($P<0.05$)。而 WKY 大鼠应用 Exo-SHR 后, SBP、心肌细胞横截面积、主动脉中膜厚度及 PST 均未见明显变化 ($P>0.05$)。在体示踪发现 PKH67 标记外泌体囊泡经尾静脉注射 24 h 后, 在下丘脑室旁核 (paraventricular nucleus, PVH)、孤束核 (nucleus tractus solitarius, NTS)、延髓头端腹外侧部 (rostral ventrolateral medulla, RVLN) 可见绿色荧光。体外示踪发现培养神经元也可见绿色荧光。**结论** 这些结果表明, 肾周白色脂肪组织源外泌体可作为运载体发挥远距离调控动脉血压的作用。Exo-SHR 缺乏抑制血压升高的内容物, 补充 Exo-WKY 可降低动脉血压和交感紧张, 并改善心血管重构。

【关键词】 自发性高血压; 肾周白色脂肪; 外泌体; 交感神经活动

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 03-0051-08

Perirenal adipose tissue derived exosomes regulate blood pressure in rats

ZHANG Peisen¹, LIANG Liwen², SHI Zhen^{1*}

(1. Department of Physiology of Binzhou Medical University, Yantai 264003, China.
2. Weihai Central Blood Station, Weihai 264200)

【Abstract】 Objective To investigate whether perirenal adipose tissues as an endocrine organ regulate arterial blood pressure in rats via exosomes. **Methods** Spontaneously hypertensive rats (SHR) and normotensive Wistar-Kyoto (WKY) rats were used in this study. Perirenal fat of normotensive WKY rats and SHRs was cultured in serum-free

[基金项目] 山东省自然科学基金 (ZR2018MC011)。
[作者简介] 张培森 (1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 心血管活动的神经调控。E-mail: zhangpeisen10@126.com
[通信作者] 施真 (1981—), 女, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 心血管活动的神经调控。E-mail: zhen_shizhen@163.com

(exosome-free) medium, and secretory vesicles were isolated using an exoEasy Maxi Kit. The isolated vesicles were identified by nano-size measurement, transmission electron microscopy, and surface markers, which were consistent with the characteristics of exosomes (Exo) and used for subsequent experiments. SHR and WKY rats were randomly divided into two groups and injected with Exo-SHR or Exo-WKY via the tail vein once a week for 6 weeks. Arterial blood pressure was measured while rats were conscious using a non-invasive caudal cuff system. Acute experiments were conducted at the end of week 6 after the injection of exosome-like vesicles. Carotid artery cannulation was used to directly measure arterial blood pressure. HE and Masson staining was used to observe cardiovascular pathological remodeling. Peripheral sympathetic tone (PST) was expressed as the relative ratio of the depression response induced by intravenous injection of hexamethonium hydrochloride to that in WKY rats treated with Exo-WKY. Exosomes labeled with PKH67 green fluorescent dye were injected into the tail vein for *in vivo* tracing, and then incubated with primary cultured neurons for *in vitro* tracing.

Results Exosomes secreted from perirenal white adipose tissue were typical exosome semi-cup-like vesicles under transmission electron microscopy. The average diameter of nanoparticles was approximately 100 nm, and surface-specific markers TSG101 and CD9 were expressed. The systolic blood pressure (SBP) of SHRs began to decrease in the second week after injection of Exo-WKY and remained low throughout experiment ($P < 0.05$). Exo-WKY also decreased the cross-sectional area of cardiomyocytes, aortic media thickening, and PST in SHRs ($P < 0.05$). However, after administering Exo-SHR to WKY rats, no significant changes were observed in SBP, the cross-sectional area of cardiomyocytes, media thickness of the aorta, or PST. Green fluorescence was observed in the cardiovascular center, including the PVH, nucleus tractus solitarius, rostral ventrolateral medulla, and in cultured neurons at 24 h after application of PKH67-labeled exosome-like vesicles. **Conclusions** Perirenal adipose tissue-derived exosomes act as transport carriers to remotely regulate arterial blood pressure. Exo-SHR lack contents that inhibit blood pressure elevation. Exo-WKY supplementation reduces arterial blood pressure and sympathetic tension, which improves cardiovascular remodeling.

[Keywords] spontaneously hypertensive; perirenal adipose tissue; Exosomes; sympathetic activities

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

外泌体含有细胞特异的蛋白和核酸,作为这些信号分子的稳定运输载体,发挥远距调控其它细胞功能的作用^[1]。近年来的研究以外泌体角度重新解释了很多生理、病理生理机制,例如外泌体在肿瘤代谢过程的器官-器官通信中发挥重要作用^[2-3]。循环中的外泌体可来源于多种组织器官^[4]。内脏白色脂肪组织因其与高血压等心血管疾病有密切关系^[5]而得到广泛关注。Thomou 等^[6]发表在 Nature 的研究结果表明脂肪组织来源外泌体运输 microRNAs 远距调节肝合成释放纤维母细胞生长因子 (FGF21) 从而改善糖耐量。另有研究发现脂肪组织来源外泌体可携带生物活性分子介导外周炎症时血脑之间交流通讯^[7]。已知脂肪组织确实可通过神经体液调节影响其它器官的功能。例如,其分泌的脂肪因子瘦素^[8]、脂联素^[9]等是与阿尔茨海默病相关的脂肪因子,并且可作用于脑发挥体液调节 SNS 活动的作用^[10]。有针对肾周白色脂肪组织的研究发现^[11],在未经治疗高血压患者,肾周白色脂肪组织体积量是超重和肥胖患者 24 h 平均舒张压的正相关独立影响因素,表明肾周白色脂肪组织在升高动脉血压中发挥重要作用,但肾周白色脂肪组织引起动脉血压升高的机制仍不清楚。而外泌体

很有可能作为一种稳定的运载体,发挥调节血压稳态的作用。本研究旨在观察自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR) 和正常血压的 Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠交互应用肾周白色脂肪源外泌体对动脉血压、交感神经紧张性和心血管重构的影响,以及体内外示踪肾周白色脂肪源外泌体是否被神经细胞摄取,以明确肾周白色脂肪源外泌体是否作为运载体发挥远距调控动脉血压的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

实验采用 16 周龄雄性清洁级自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR)^[12] 和正常血压的 Wistar-Kyoto (WKY) 大鼠,每组各 16 只,体重 250~300 g。实验动物购自北京斯贝福(北京)生物技术有限公司 [SCXK(京)2019-0010]。在滨州医学院实验动物中心进行饲养和实验 [SYXK(鲁)2021-0036]。24 h 昼夜节律下自由摄食和饮水。伦理审批由滨州医学院动物伦理委员会批准 (IACUC-2021-027),本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》,符合动物伦理学要求的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

外泌体提取试剂盒购自 Qiagen 公司;超滤管购自 Millipore 公司;六烃季铵购自 Sigma 公司;无血清培养基购自 Hyclone 公司;PKH67 染液购自上海宇玫博生物科技有限公司;TSG101、CD9 及 MAP2 抗体购自 Abcam 公司。激光共聚焦显微镜购自德国 Zeiss 公司;台式高速离心机购自德国 Eppendorf 公司;透射电镜购自美国 MinusK 公司;纳米粒径跟踪分析仪购自德国 Pmx 公司;冰冻切片机购自德国 Leica 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肾周白色脂肪组织体外培养

WKY 组和 SHR 组各 6 只,苯巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,无菌条件下腹膜后路径暴露肾周白色脂肪组织,取出脂肪组织放入无菌的 PBS 中冲洗后修剪成约 4 mm³ 脂肪块,分装到 25 cm² 培养瓶中,每瓶约 10 块,加入 16 mL 无血清培养基。CO₂ 培养箱培养 24 h,待培养基颜色略黄时收取上清液。

1.3.2 外泌体提取

用 0.45 μm 滤器过滤肾周白色脂肪培养上清。应用膜亲和离心柱法试剂盒分离提纯外泌体,详细步骤如下:将滤好的上清液与 XBP 溶液以 1:1 的比例轻柔混匀后转移至提取柱,离心(1500 r/min, 1 min, 2 次),弃废液后将 10 mL XWP 溶液加入提取柱中,离心(4000 r/min, 5 min)。将提取柱转移至新的收集管中,加入 1 mL XE 溶液,室温孵育 1 min 后离心(1500 r/min, 5 min),收集洗出液重新放入提取柱中室温孵育 1 min 后离心(4000 r/min, 5 min),收集洗出液获得外泌体。−80℃ 冰箱保存,后续实验使用前超滤管置换溶剂重悬。

1.3.3 外泌体鉴定

Zetaview 粒径仪检测外泌体粒径:在 1.5 mL 的无 RNA 酶 EP 管中加入 990 μL PBS 溶液,加入 10 μL 外泌体悬液,充分稀释均匀;将 1 mL 样品液注入样品池中,使用纳米粒径跟踪分析仪进行测量,根据颗粒运动轨迹的运动位移和时间等分析,检测外泌体的粒径。

透射电镜鉴定外泌体形态:在 1.5 mL 的无 RNA 酶 EP 管中加入 990 μL PBS 溶液,加入 10 μL 外泌体悬液,充分稀释均匀;取 20 μL 混合液滴加在电镜铜网上,室温静置 10 min 后,用滤纸从侧面吸干液体;用 30 μL 20 g/L 的磷钨酸溶液负染 10 min,滤纸吸干染液干燥 20 min;使用透射电镜观察样品,

并拍照。

Western blot 检测外泌体标志物 TSG101 和 CD9 的阳性表达:外泌体悬液离心(5000 r/min, 30 min),含外泌体上清加入 100 μL RIPA 裂解液裂解 30 min;离心(4℃, 12 000 r/min, 15 min)。小心取出上清保存于新的收集管中。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样本加入预制的胶孔中,进行 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,湿法转膜 30~50 min。封闭 1 h,一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤,二抗室温孵育 30 min, TBST 洗涤。ECL 显色凝胶成像系统曝光。使用 Image J 软件进行灰度值检测及分析。

1.3.4 外泌体体内示踪

PKH67 为亲脂染料,可以稳定的与脂质膜结合,PKH67 标记的外泌体可发出绿色荧光。外泌体标准品绘制浓度曲线检测提取外泌体浓度,以备计算后续实验外泌体用量。将提纯的外泌体浓缩置换在 PBS 缓冲液中,用 PKH67 绿色荧光标记外泌体进行大鼠尾静脉注射在体示踪,血液循环 24 h 后过量戊巴比妥麻醉处死大鼠,多聚甲醛灌注后取脑。根据 Paxinos 和 Watson 的大鼠立体定位图谱,用冰冻切片机切取含有下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVH)、延髓头端腹外侧部(rostral ventrolateral medulla, RVLM)和孤束核(nucleus tractus solitarius, NTS)的脑冠状面切片(10 μm)。另切取肝、肾、心血管组织切片进行全身其他主要器官示踪。外泌体经超滤管浓缩置换成 DMEM 细胞基础培养基后,加入原代神经元细胞培养基中培养过夜进行体外示踪。激光共聚焦显微镜下观察组织切片或细胞的绿色荧光。

1.3.5 细胞培养

原代神经细胞培养:胎鼠无菌条件下断头取脑,将剥好的所需要的部位放入盛有解剖液的小皿,手术刀切碎脑组织,移液枪吹打均匀后,加入胰酶,放入培养箱中消化 10 min 后终止消化,转入 15 mL 离心管中用移液枪吹打后静置 10 min,使絮状物沉淀。吸取上清至新的离心管,1500 r/min 离心 5 min,弃去上清留下细胞团块吹打均匀,细胞计数后铺板,放入培养箱 2~3 d 后进行半换液,1 周后进行后续实验。

1.3.6 动脉血压测量

尾动脉加压法进行无创清醒状态下大鼠动脉血压测量。将尾套、压力传感器和气囊与 PowerLab

数据采集分析系统(8SP 型, ADInstruments, Australia)连接,基线调零。将大鼠放入固定器中,尾套和脉搏换能器依次套在大鼠尾巴的根部保持固定,安抚大鼠使其情绪稳定,气囊挤压充气至脉搏完全消失,继续加压 20 mmHg,缓慢放气使脉搏信号恢复到起始水平,读取大鼠的收缩压。

颈动脉插管测量急性麻醉状态下动脉血压。PE-50 聚乙烯管充满肝素生理盐水溶液,插入右侧颈总动脉,连接压力传感器,经四通桥式放大器(QUAD bridge Amp, ADInstruments, Australia)连接 PowerLab 数据分析处理系统记录动脉血压,并对血压信号进行处理,同步记录动脉血压和平均动脉压。

1.3.7 基础外周交感张力(peripheral sympathetic tone, PST)测定

静脉注射神经节阻断剂六烃季铵(30 mg/kg)引起短暂而强烈的降低血压效应,降压幅度与 PST 成正比。

1.3.8 高血压心血管重构的评价

取心脏后称重左心室包括室间隔和右心室,固定左心室组织并切片(5 mm)。在苏木精和伊红染色切片中,测定左室外侧-中部游离壁(包括心外膜和心内膜部分)的心肌细胞横截面面积。分离胸降主动脉(长 2~3 mm),石蜡包埋,切成 5 mm 厚的横

切面。苏木精和伊红染色,光镜下观察这些动脉的结构变化,以中膜(media, M)厚度为血管重塑指标。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计分析。所有数据以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性。多组样本间的多重比较采用单因素方差分析。

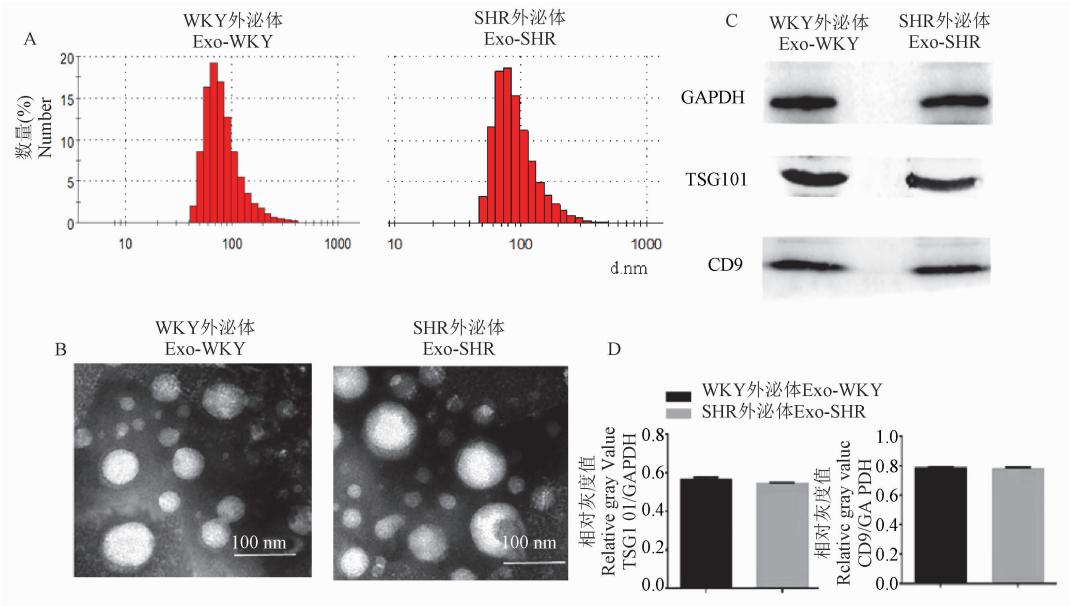
2 结果

2.1 外泌体鉴定

纳米粒径检测用外泌体提纯试剂从大鼠肾周白色脂肪纯化得到的外泌体直径峰值为 80~100 nm(见图 1A),通过透射电子显微镜观察到外泌体半托杯状囊泡结构(见图 1B)。CD9、TSG101 是外泌体的代表性标志物,通过 Western blot 检测到提纯的外泌体具有 CD9、TSG101 表达(见图 1C),WKY 大鼠外泌体(Exosome-WKY, Exo-WKY)和 SHR 大鼠外泌体(Exosome-SHR, Exo-SHR)无统计学差异(见图 1D)。

2.2 外泌体示踪

如图 2 所示,尾静脉注射 PKH67 绿色荧光染料标记的外泌体 24 h 后,在含有 NTS、PVH、RVLM 的



注:A:外泌体囊泡粒径;B:外泌体囊泡电镜检测图;C:外泌体标志物 TSG101 和 CD9 蛋白表达条带;D:外泌体标志物 TSG101 和 CD9 蛋白表达统计图。

图 1 肾周白色脂肪组织来源的外泌体鉴定

Note. A, Exosome vesicle particle size range. B, Electron microscopy of exosomal vesicles. C, Bands for exosome marker TSG101 and CD9 protein expression. D, Protein expression statistics of exosome markers TSG101 and CD9.

Figure 1 Identification of exosomes derived from perirenal white adipose tissue

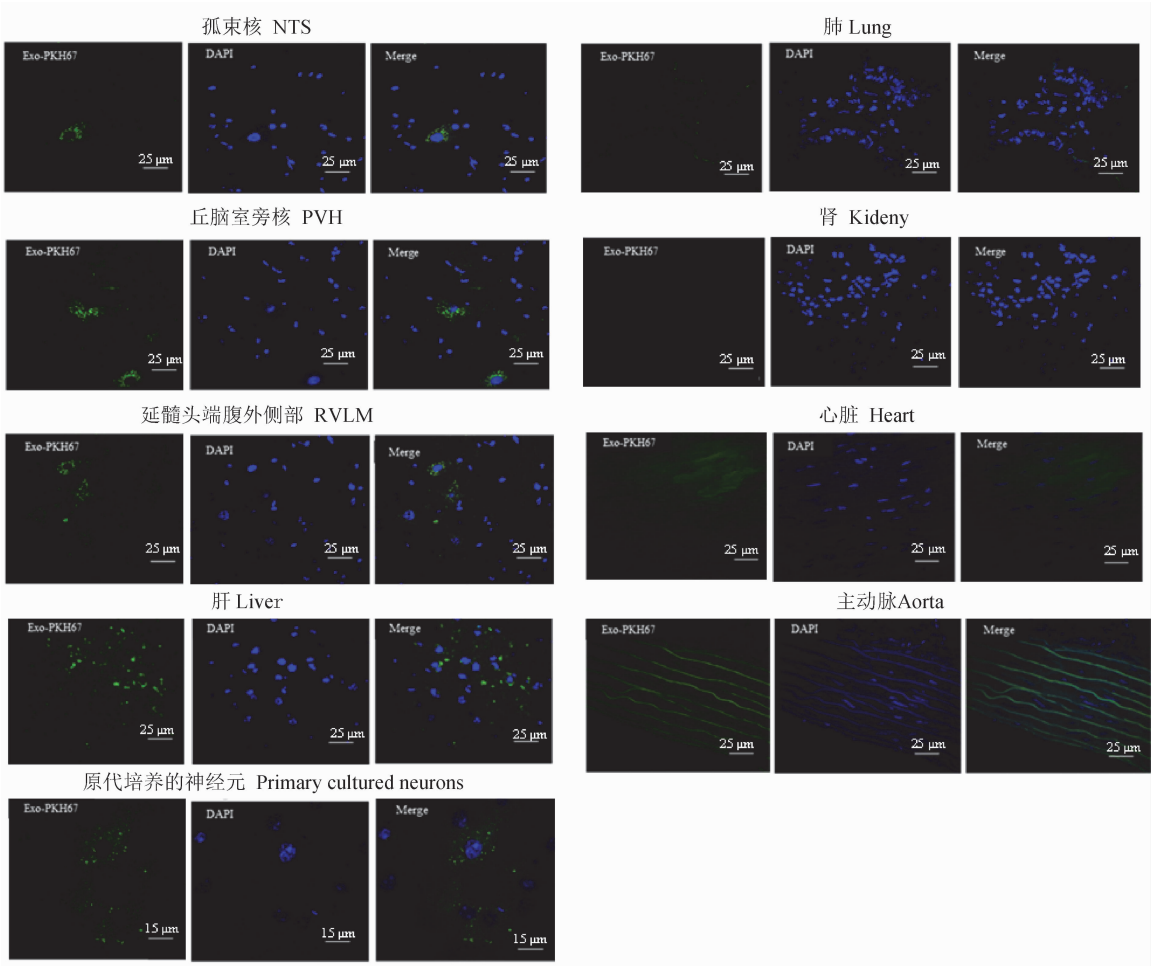


图 2 体内外示踪 PKH67 标记的外泌体
Figure 2 tracing PKH67 labeled exosomes *in vivo* and *in vitro*

脑片及肝观察到绿色荧光,肺、肾、心脏及主动脉未观察到明显的绿色荧光。另外,将 PKH67 标记的外泌体添加到小鼠的原代培养神经元培养基中 24 h 后在细胞中亦发现绿色荧光。

2.3 静脉注射 Exo-WKY 降低 SHR 动脉血压

对 SHR 和 WKY 大鼠连续 6 周每周 1 次尾静脉交互注射彼此的外泌体悬液,并每周使用无创尾套系统测量清醒大鼠的动脉血压。注射外泌体后第 6 周末进行急性实验,通过对静脉插管注射六烃季铵诱导的神经节阻滞的抑制作用来评估 PST。如图 3 所示,与应用 Exo-SHR 的 SHR 大鼠相比,应用 Exo-WKY 的 SHR 大鼠的收缩压(systolic blood pressure, SBP)在注射外泌体后的第 2 周开始显著下降($P<0.05$),并在 3~6 周均显著降低($P<0.05$),而 WKY 大鼠注射 Exo-WKY 或 Exo-SHR 后的 SBP 在 7 周内均无显著变化。

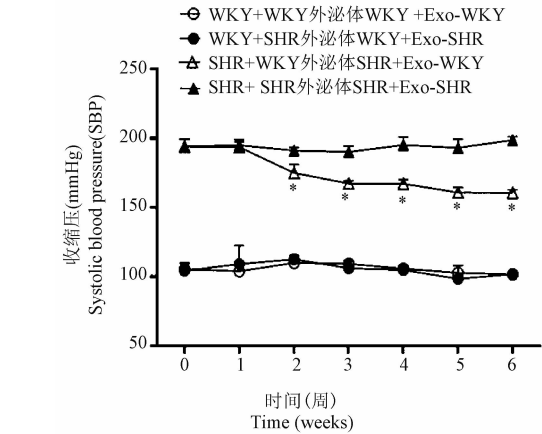
2.4 静脉注射 Exo-WKY 降低 SHR 的 PST

大鼠静脉注射神经节阻断剂六烃季铵均引起

降压反应,降压幅度与 PST 成正比。以应用 Exo-WKY 的 WKY 组大鼠降压反应为参考,其他各组大鼠降压反应的相对比率越大说明降压反应越大,即 PST 越大。与注射 Exo-WKY 相比,WKY 大鼠注射 Exo-SHR 后 PST 无显著变化($P>0.05$)(图 4);而注射 Exo-SHR 的 SHR 组 PST 显著高于 WKY 大鼠($P<0.05$),但注射 Exo-WKY 的 SHR 组 PST 显著降低($P<0.05$)(图 4)。

2.5 静脉注射 Exo-WKY 改善 SHR 心血管重构

与尾静脉注射 Exo-WKY 6 周的 WKY 大鼠相比,注射 Exo-SHR 6 周的 SHR 大鼠心肌细胞横截面积显著增大($P<0.05$),胸主动脉中膜厚度也显著增加($P<0.05$);与尾静脉注射 Exo-WKY 6 周的 SHR 组相比,注射 Exo-SHR 6 周的 SHR 大鼠心肌细胞横截面积显著增大($P<0.05$),胸主动脉中膜厚度也显著增加($P<0.05$)说明尾静脉注射 Exo-WKY 6 周后能显著减小 SHR 心肌细胞横截面积(图 5A)和胸主动脉中膜厚度(图 5B)。

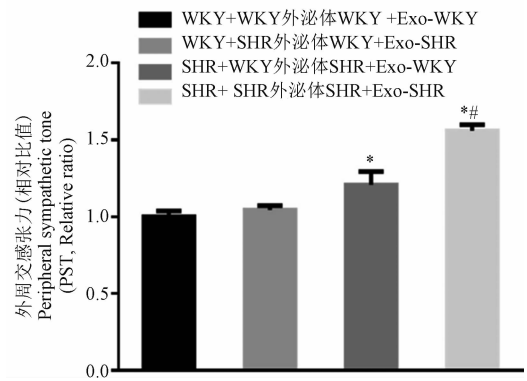


注:与应用 Exo-SHR 的同种系大鼠相比, $^*P<0.05$ 。

图 3 静脉应用外泌体对大鼠 SBP 的影响 ($n=8$)

Note. Compared with the same lineage of rats treated with Exo-SHR, $^*P<0.05$.

Figure 3 Effect of intravenous application of exosomes on SBP in rats

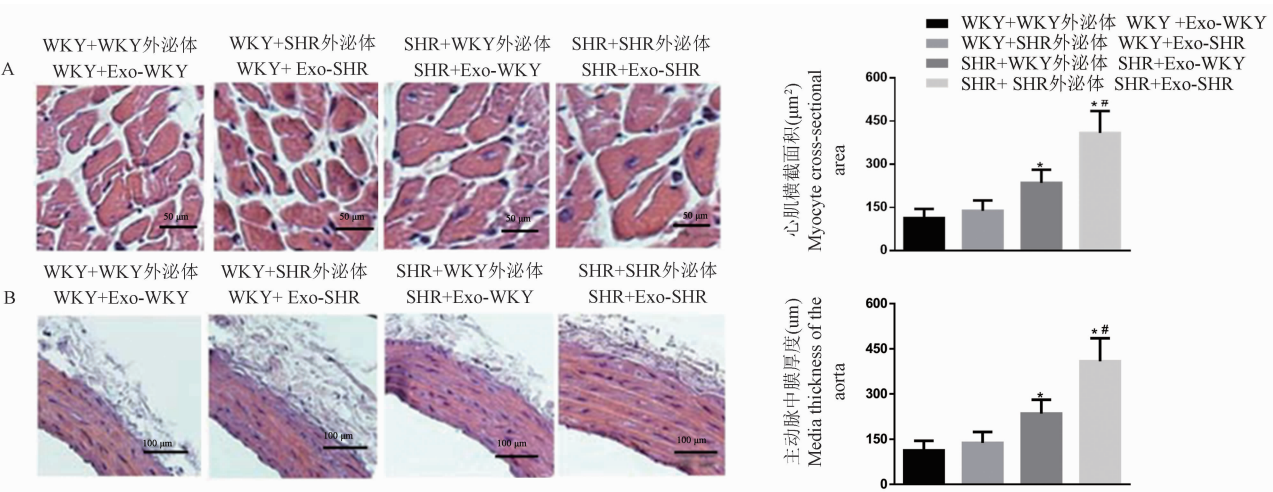


注:与注射 Exo-WKY 的 WKY 大鼠相比, $^*P<0.05$; 与注射 Exo-WKY 的 SHR 组相比, $^*P<0.05$ 。

图 4 静脉应用外泌体对大鼠 PST 的影响 ($n=6$)

Note. Compared with WKY rats treated with Exo-WKY, $^*P<0.05$. Compared with SHR treated with Exo-WKY, $^*P<0.05$.

Figure 4 Effects of intravenous application of exosomes on PST in rats



注:A:心肌细胞横截面积;B:主动脉中膜厚度。与注射 Exo-WKY 的 WKY 组相比, $^*P<0.05$;与注射 Exo-WKY 的 SHR 组相比, $^*P<0.05$ 。

图 5 静脉应用外泌体对大鼠心血管重构的影响 ($n=6$)

Note. A. Myocyte cross-sectional area. B. Media thickness of the aorta. Compared with WKY rats treated with Exo-WKY, $^*P<0.05$. Compared with SHR treated with Exo-WKY, $^*P<0.05$.

Figure 5 Effects of intravenous application of exosomes on cardiovascular remodeling in rats

3 讨论

本研究发现肾周白色脂肪组织可分泌外泌体,在体示踪发现该外泌体可随血液循环到达中枢重要心血管自主神经调控核团,体外示踪也发现该外泌体可被神经细胞摄取。另外,SHR 静脉注射 WKY 大鼠肾周白色脂肪组织分泌的外泌体能够降低 SBP、PST 并改善心血管重构,而 WKY 大鼠静脉注射 SHR 肾周白色脂肪源外泌体对 SBP、PST 和心

血管重构均无显著影响。这些结果表明肾周白色脂肪源外泌体可作为运载体发挥远距离调控动脉血压的作用。Exo-SHR 缺乏抑制血压升高的内容物,SHR 补充 Exo-WKY 可降低动脉血压和交感紧张,并改善心血管重构。

内脏白色脂肪组织因其与高血压等心血管疾病有密切关系^[13]而得到广泛关注。有针对肾周白色脂肪组织的研究发现^[11],在未经治疗高血压患者,肾周脂肪组织体积量是超重和肥胖患者 24 h 平

均舒张压的正相关独立影响因素,表明肾周脂肪组织在升高动脉血压中发挥重要作用,但肾周脂肪组织引起动脉血压升高的机制仍不清楚,极有可能是通过远距离调控心血管或中枢心血管核团活动发挥作用,那就需要某种介质介导二者之间的信息交流。Thomou 等^[6]研究表明脂肪组织来源外泌体运输 microRNAs 远距调节肝等其它组织合成释放纤维母细胞生长因子(FGF21)改善糖耐量。本研究在体外培养的肾周白色脂肪组织分泌物中提取到囊泡,经纳米粒径检测其直径峰值为 80 nm,符合外泌体囊泡直径;通过透射电子显微镜观察到外泌体特征性半托杯状囊泡结构;通过 Western blot 检测到其具有外泌体特征性 CD9、TSG101 蛋白表达。经三方面指标的鉴定,提取的囊泡符合外泌体的特征。PKH67 是一种亲脂性膜染料,可与外泌体囊泡结合发出绿色荧光。本研究中在体示踪将 PKH67 标记的外泌体经尾静脉注射 24 h 后,在脑片 PVH、RVLM 和 NTS 内均发现绿色荧光,说明肾周白色脂肪源外泌体经血液循环可到达中枢调控心血管活动的重要自主神经核团。另外,在体外示踪实验中,将 PKH67 标记的外泌体加入培养的原代神经元 24 h 后在神经元胞浆内发现绿色荧光,说明肾周白色脂肪源外泌体可被神经元摄取。PVH、RVLM 和 NTS 均为心血管活动和自主神经活动整合的重要中枢结构,是高血压病交感神经活动亢进的关键核团,在高血压发生、发展中起重要作用。我们既往研究表明这些核团中血管紧张素 II^[14]、活性氧^[15]、促炎性细胞因子^[16]等多种神经递质或信号分子异常参与调控高血压大鼠增强的交感传出活动。与高血压密切相关的肾周白色脂肪分泌的外泌体既可以经血液循环到达中枢心血管和交感神经活动整合核团,那么很有可能会通过外泌体运载的内容物影响其中的神经递质或信号分子功能,从而调控交感神经活动和动脉血压。这也是后续研究需要证实的内容,我们将分析 SHR 和 WKY 大鼠肾周白色脂肪组织源外泌体内差异表达基因,以及差异表达基因在调控心血管和交感神经活动整合核团内神经递质或信号分子中的作用。另外,外泌体也不排除经血液循环直接到达心脏、血管及肾,从而直接影响动脉血压,但是本研究在体示踪实验在心肌、血管及肾均未发现绿色荧光,当然也不排除外周循环速度快或绿色荧光被遮掩等原因,这可在后续研究中设计实验加以证实。而肝内发现绿色荧

光是由于肝是代谢的必经之路。

本研究中 WKY 和 SHR 大鼠连续 6 周每周 1 次尾静脉交互注射彼此的外泌体悬液,结果发现,SHR 大鼠的 SBP 在注射 WKY 大鼠肾周白色脂肪源外泌体(Exo-WKY)后的第 2 周开始下降,并且干预期间持续保持较低水平,而补充自身外泌体(Exo-SHR)对动脉血压无显著影响;WKY 大鼠注射 Exo-WKY 或 Exo-SHR 后的 SBP 均无显著变化。这些结果表明 SHR 补充 WKY 大鼠肾周白色脂肪源外泌体显著降低动脉血压,可能是源于 SHR 肾周白色脂肪源外泌体缺乏某些能抑制血压升高的机制,而不是具有某些能促进血压升高的机制。外泌体囊泡中含有丰富的内容物,为了进一步探究上述实验结果出现的机制,我们将在后续实验中对 SHR 和 WKY 大鼠肾周白色脂肪源外泌体进行高通量测序筛选差异表达基因及功能研究。

六烃季铵是神经节阻断剂,静脉注射六烃季铵阻断神经节后可引起短暂而强烈的降低血压效应^[17]。基础交感神经活动水平越高,在阻断神经节后,动脉血压降低越明显。本研究中以应用 Exo-WKY 的 WKY 组大鼠降压反应为参考,计算其他各组大鼠降压反应的与参考值的相对比率,比率越大说明降压反应越大,即外周交感神经张力越大。结果发现,在注射外泌体后第 6 周后的急性实验中,四组大鼠颈静脉注射六烃季铵均引起降压反应,与 WKY 大鼠注射 Exo-WKY 相比,WKY 大鼠注射 Exo-SHR 后 PST 无显著变化而 SHR 注射 Exo-SHR 后 PST 显著升高。但 SHR 注射 Exo-WKY 后 PST 显著降低。这些结果表明 SHR 补充 WKY 大鼠肾周白色脂肪源外泌体显著降低交感神经活动水平,可能是源于 SHR 肾周白色脂肪源外泌体缺乏某些能抑制交感活动过度激活的机制,而不是具有某些能促进交感神经活动过度激活的机制。另外,交感神经系统活动过度激活是高血压发生的重要原因^[18-19],而交感神经中枢核团神经递质和信号分子异常在交感神经过度激活中发挥重要作用,Exo-WKY 很可能是通过改变中枢交感核团相关机制从而降低外周交感张力,从而降低动脉血压。

动脉血压长期升高,左心室后负荷增加,左心室代偿性肥厚,同时动脉血管在长期异常血流动力学作用下亦发生重构。为了探究静脉注射肾周白色脂肪源外泌体对 SHR 心血管重构的影响,我们在注射外泌体后的第 6 周末进行了相关急性实验。通

过 HE 染色观察左心室肌细胞横截面积和胸主动脉中膜厚度变化。结果发现,尾静脉注射 Exo-WKY 显著减小 SHR 大鼠心肌细胞横截面积和胸主动脉中膜厚度;而无论应用 Exo-WKY 的 WKY 大鼠还是应用 Exo-SHR 的 WKY 和 SHR 大鼠的心肌细胞横截面积和胸主动脉中膜厚度均无显著变化。这些结果说明 WKY 大鼠肾周白色脂肪源外泌体具有改善 SHR 心血管重构的作用。结合外泌体在体示踪未在心血管中发现绿色荧光的结果,提示上述效应,很有可能是继发于动脉血压改善的效果。

综上所述,与高血压密切相关的肾周白色脂肪组织能够分泌外泌体,经远距离血液循环运输至中枢心血管和交感调控核团,且能被神经元摄取。WKY 大鼠外泌体可降低 SHR 外周交感张力,降低动脉血压并改善心血管重构,表明 SHR 大鼠肾周白色脂肪源外泌体很可能缺失某种内容物导致不能抑制其增强的交感张力,从而升高动脉血压。

参考文献:

[1] Nazarenko I, Rupp AK, Altevogt P. Exosomes as a potential tool for a specific delivery of functional molecules [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1049: 495-511.

[2] 郭静, 徐桂英, 黄昊, 等. 外泌体在肿瘤诊疗中的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(2): 86-92.

[3] Ying W, Riopel M, Bandyopadhyay G, et al. Adipose tissue macrophage-derived exosomal miRNAs can modulate *in vivo* and *in vitro* insulin sensitivity [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 372-384.

[4] Amintas S, Vendrely V, Dupin C, et al. Next-generation cancer biomarkers; extracellular vesicle DNA as a circulating surrogate of tumor DNA [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 622048.

[5] Hall JE, do Carmo JM, da Silva AA, et al. Obesity-induced hypertension: interaction of neurohumoral and renal mechanisms [J]. *Circ Res*, 2015, 116(6): 991-1006.

[6] Thomou T, Mori MA, Dreyfuss JM, et al. Adipose-derived circulating miRNAs regulate gene expression in other tissues [J]. *Nature*, 2017, 542(7642): 450-455.

[7] Balusu S, van Wonerghem E, de Rycke R, et al. Identification of a novel mechanism of blood-brain communication during

peripheral inflammation via choroid plexus-derived extracellular vesicles [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(10): 1162-1183.

[8] Hamilton K, Harvey J. The neuronal actions of leptin and the implications for treating Alzheimer ' s disease [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(1): 52.

[9] Ng RCL, Jian M, Yick LW, et al. Adiponectin gene therapy for Alzheimer disease in a mouse model: abridged secondary publication [J]. *Hong Kong Med J*, 2020, 26(6): 27-33.

[10] Shi Z, Pelletier NE, Wong J, et al. Leptin increases sympathetic nerve activity via induction of its own receptor in the paraventricular nucleus [J]. *Elife*, 2020, 9: e55357.

[11] De Pergola G, Campobasso N, Nardecchia A, et al. Para- and perirenal ultrasonographic fat thickness is associated with 24-hours mean diastolic blood pressure levels in overweight and obese subjects [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2015, 15: 108.

[12] 屈会化, 赵琰, 曲荣波, 等. 两种高血压大鼠模型证候特征差异性的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2008, 16(1): 31-35.

[13] Koenen M, Hill MA, Cohen P, et al. Adipose tissue and vascular dysfunction [J]. *Circ Res*, 2021, 128(7): 951-968.

[14] Zhu GQ, Xu Y, Zhou LM, et al. Enhanced cardiac sympathetic afferent reflex involved in sympathetic overactivity in renovascular hypertensive rats [J]. *Exp Physiol*, 2009, 94(7): 785-794.

[15] Shi Z, Chen AD, Xu Y, et al. Long-term administration of tempol attenuates postinfarct ventricular dysfunction and sympathetic activity in rats [J]. *Pflugers Arch*, 2009, 458(2): 247-257.

[16] Shi Z, Jiang SJ, Wang GH, et al. Pro-inflammatory cytokines in paraventricular nucleus mediate the cardiac sympathetic afferent reflex in hypertension [J]. *Auton Neurosci*, 2014, 186: 54-61.

[17] Li P, Gong JX, Sun W, et al. Hexamethonium attenuates sympathetic activity and blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(5): 7116-7122.

[18] 吴金峰, 尹新华. 高血压交感神经相关发病机制 [J]. *临床与病理杂志*, 2021, 41(1): 210-215.

[19] Grassi G, Mark A, Esler M. The sympathetic nervous system alterations in human hypertension [J]. *Circ Res*, 2015, 116(6): 976-990.

[收稿日期] 2022-09-04