DOI:10.16016/j.1000-5404.201907236

# AT1R/miR-26a 通路在高血压血管重塑中的调控机制

张文倩,王巧竹,施佩菲,冯雁京,高登峰,刘 昕 710004 西安,西安交通大学第二附属医院心内科

[摘要] **目的** 阐明 AT1R/miR-26a 通路在高血压血管重塑中的重要作用及分子机制。**方法** ①将 24 只 8 周龄雄性自发性高血压大鼠(SHRs)分为($n$=8):氯沙坦干预组[氯沙坦 20 mg/(kg·d)灌胃]、哌唑嗪干预组[哌唑嗪 5 mg/(kg·d)灌胃]、SHR 模型对照组[纯水 10 mL/(kg·d)灌胃];雄性 WKY 大鼠作为正常对照组[纯水 10 mL/(kg·d)灌胃]($n$=6),干预 8 周;干预前后 3~5 d 测定鼠尾动脉收缩压(SBP),直至干预期满。②将各组大鼠麻醉取胸主动脉,qPCR 检测大鼠胸主动脉 miR-26a 的表达水平。③剩余组织石蜡包埋行 HE、Masson 染色,α-actin 和 PCNA 免疫组化染色。④Western blot 检测大鼠胸主动脉 AT1R、TGFβ1、p-smad3、CTGF 表达情况。⑤将培养传至 3~9 代的大鼠胸主动脉平滑肌细胞(VSMC)分为 AngⅡ处理组(VSMC+AngⅡ,AngⅡ $10^{-7}$ mol/L,作用 24 h 处理细胞)和对照组(VSMC+Ctrl)($n$=6),qPCR 检测 miR-26a 的表达水平,Western blot 检测 smad3 和 p-smad3 表达情况。**结果** ①干预期满时,氯沙坦组、哌唑嗪组 SBP 明显低于模型对照组,但均高于正常对照组($P$<0.05),氯沙坦组、哌唑嗪组间 SBP 差异无统计学意义($P$>0.05)。②氯沙坦组、哌唑嗪组胸主动脉 miR-26a 相对表达高于模型对照组($P$<0.05),且氯沙坦组高于哌唑嗪组($P$<0.05),但均较正常对照组表达低($P$<0.05)。③氯沙坦组、哌唑嗪组中膜厚度/管腔内经(MT/LD)、胶原体积分数(CVF)及平滑肌细胞增值指数均低于模型对照组($P$<0.05),且氯沙坦组低于哌唑嗪组;正常对照组血管管壁未见明显增厚,平滑肌分布均匀且动脉内膜完整,无显著的胶原纤维沉积现象,平滑肌细胞排列整齐,胞核形态规则。④氯沙坦组、哌唑嗪组胸主动脉 AT1R、p-smad3、TGFβ1、CTGF 相对表达低于模型对照组($P$<0.05),且氯沙坦组低于哌唑嗪组($P$<0.05),但均高于正常对照组($P$<0.05)。⑤VSMC+AngⅡ组细胞 miR-26a 表达显著低于对照组,且 p-smad3 表达显著高于 VSMC+Ctrl 组($P$<0.05)。**结论** miR-26a 可阻止血压升高,且在高血压血管重塑进程中具有保护性作用;阻断 AT1 受体可通过上调 miR-26a 改善高血压血管重塑。

[关键词] 高血压;血管重塑;MicroRNA-26a;AT1 受体

[中图法分类号] R544.1; R966; R977.6 [文献标志码] A

# Regulation mechanism of AT1R/miR-26a pathway in hypertensive vascular remodeling

ZHANG Wenqian, WANG Qiaozhu, SHI Peifei, FENG Yanjing, GAO Dengfeng, LIU Xin Department of Cardiology, the Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004, China

[**Abstract**] **Objective** To elucidate the important role and molecular mechanism of AT1R/miR-26a pathway in hypertensive vascular remodeling. **Methods** ① Eight-week-old male spontaneously hypertensive rats (SHRs) were randomly divided into losartan group [gavage with losartan 20 mg/(kg·d) for 8 weeks], prazosin group [gavage with prazosin 5 mg/(kg·d) for 8 weeks], SHR control group [gavage with pure water 10 mL/(kg·d) for 8 weeks], with 8 animals in each groups. Six eight-week-old male WKY rats served as normal control group [gavage with pure water 10 mL/(kg·d) for 8 weeks]. All rats in each group were measured for systolic blood pressure (SBP) through tail artery in 3 to 5 d before and during the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81570382,81872563)

[通信作者] 刘 昕,E-mail:liuxin88577026@163.com

intervention period until the end of treatment. ② After the rats were anesthetized, the thoracic aorta were harvested for detecting the expression level of miR-26a by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). ③ The thoracic aorta was embedded in paraffin, and sectioned for HE and Masson staining, α-actin and PCNA immunohistochemistry. ④ The expression of AT1R, TGFβ1, p-smad3 and CTGF in the thoracic aorta were detected by Western blotting. ⑤ The rat thoracic aortic smooth muscle cells (VSMCs) at 3 to 9 passages were divided into Ang Ⅱ treatment group (VSMCs+Ang Ⅱ, Ang Ⅱ $10^{-7}$ mol/L, treated for 24 h), and control group (VSMC+Ctrl). qPCR was used to detect the expression level of miR-26a, and the expression of smad3 and p-smad3 was observed by Western blotting. **Results** ① At the end of treatment received, SBP was significantly lower in the losartan and prazosin groups than the SHR control group, but all of them were obviously higher than that of normal control group ($P<0.05$). There was no significant difference in SBP between the losartan and prazosin groups ($P>0.05$). ②The expression of miR-26a in the thoracic aorta was notably higher in the losartan and prazosin groups than the SHR control group, but statistically lower than the normal control group ($P<0.05$), and that of the losartan group was higher than that of the prazosin group ($P<0.05$). ③ Media thickness/lumen diameter (MT/LD), collagen volume fraction (CVF), and smooth muscle cell proliferation index in the losartan and prazosin groups were remarkably lower than those in the SHR control group ($P<0.05$), and those in the losartan group were lower than those of the prazosin group. The normal control group had no obvious thickening of the vascular wall, with well-arranged smooth muscle cells, and regular morphology of the nucleus, and no significant collagen fiber deposition. ④The expression levels of AT1R, p-smad3, TGFβ1 and CTGF in the thoracic aorta were significantly lower in the losartan and prazosin groups than the SHR control group ($P<0.05$). Although those in the losartan group were lower than those of the prazosin group ($P<0.05$), the levels in the both group were higher than those of normal control group ($P<0.05$). ⑤The expression of miR-26a was significantly lower, and that of p-smad3 was higher in VSMC+Ang Ⅱ group when compared with VSMC+Ctrl group ($P<0.05$). **Conclusion** miR-26a prevents blood pressure from rising and has a protective effect in the process of hypertensive vascular remodeling. Blocking AT1 receptor may improve the remodeling by up-regulating miR-26a.

[**Key words**] hypertension; vascular remodeling; microRNA-26a; AT1 receptor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81570382, 81872563). Corresponding author: LIU Xin, E-mail: liuxin88577026@163.com

原发性高血压(primary hypertension,PH)是心血管疾病发展的主要危险因素,也是心血管疾病发病率和病死率增高的主要原因之一。流行病学数据显示全世界约有10亿PH患者[1]。高血压病程进展可导致血管结构及功能的改变,即血管重塑(vascular remodeling,VR),是导致心血管病死亡的重要因素。随着高血压进展,血管压力负荷增加,血流动力学变化,生长因子如血管紧张素等都会引起血管壁结构及其功能发生改变[2]。血管在重塑时常观察到诸多适应性变化,如血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell,VSMC)和内皮细胞的增殖[3],以及炎症细胞浸润[4]等。长期压力负荷将导致血管壁逐渐增厚,血管不断硬化,管腔变小,抑制血管的顺应性,最终诱发脑、心、肾等关键性靶器官组织发生缺血现象,破坏对应的靶器官。寻找对血管结构产生影响的作用靶点,有助于在较大程度上改善高血压引起的VR。

微小RNAs(microRNAs,miRNAs)属于非蛋白质编码RNA的类别,其含有约18~25个核苷酸,并且结合特定靶基因mRNA的3′或5′UTR区域从而在转录后负性调节靶基因表达,是转录后基因表达中的重要调节剂[5]。现认为microRNA可参与高血压VR的发展[6-7]。miR-26a是各种细胞过程中高度保守的转录后调节因子,包括增殖、分化、迁移和凋亡[8]。miR-26a最近被鉴定为VSMC功能的新型调节剂[9]。目前大量的研究证实,miR-26a基因与心血管疾病密切相关[8,10],但miR-26a在高血压血管重塑中的作用研究尚不深入。同时,先前研究表明血管紧张素Ⅱ(angiotensinⅡ,AngⅡ)可通过下调miR-26a基因表达而引起相关心血管疾病[11]。AngⅡ1型受体(angiotensin Ⅱ type 1 receptor,AT1R)阻断剂可以拮抗AngⅡ引起的

高血压。然而,阻断 AT1R 后 miR-26a 的表达变化及变化后对高血压 VR 的影响尚不明确。

本研究拟以自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHRs)为研究对象,研究 miR-26a 在高血压动物模型中的表达水平及高血压引起的血管重塑情况。然后我们使用 AT1R 阻断剂及扩张血管剂等不同降压药物观察血压、miR-26a 表达和相关血管特异性蛋白的变化,阐明 miR-26a 在高血压诱导的 VR 中的作用,揭示 AT1R/miR-26a 通路在高血压血管重塑中的重要作用及分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物实验

1.1.1 实验动物与分组 雄性 SHRs[8 周龄,体质量(210±10) g,收缩压(190±10) mmHg]及 WKYs[8 周龄,体质量(220±10) g,收缩压(140±5) mmHg]购于北京维通利华实验动物技术有限公司。24 只 SHRs 分为($n$=8):氯沙坦干预组、哌唑嗪干预组、SHR 模型对照组;6 只 WKYs 作为正常对照组。氯沙坦组、哌唑嗪组大鼠每日分别用 AT1R 拮抗剂氯沙坦(20 mg/kg,杭州默沙东制药有限公司)、α-受体阻滞剂哌唑嗪(5 mg/kg,北京双鹤现代医药技术有限责任公司)加入纯水 10 mL/kg 灌胃,干预 8 周;模型对照组与正常对照组大鼠予纯水 10 mL/kg 灌胃 8 周。各组饲养条件均为室温 22~25 ℃,湿度 50%~60%,光照周期 12/12 h,每笼 4~5 只大鼠,标准实验室饮食。所有动物均自由摄食、饮水,定期换笼饲养。实验程序均经西安交通大学动物护理与使用委员会批准。

1.1.2 血压测定 采用非侵入性血压分析系统(BP-2000 SERIESII, Visitech)测定大鼠安静清醒状态下鼠尾动脉收缩压(mmHg),分别于干预前和干预期内每 3~5 d 进行血压测定,选取至少 3 次有效结果并计算平均值。

1.1.3 组织收集与处理 待干预期满后,大鼠禁食过夜 10 h,测量体质量后腹腔注射 10% 水合氯醛(1.5 mL/100 g 体质量,西安康桥后勤产业有限公司)麻醉,剪开胸部取大鼠胸主动脉,取一段放入 4% 多聚甲醛溶液中固定,用石蜡包埋,留做形态学及免疫组化检测。另一段胸主动脉迅速放入液氮中,再转入-80 ℃冰箱保存,以备进行蛋白和 RNA 的提取。

1.1.4 qPCR 检测 剪刀剪取长度约 1 cm 胸主动脉组织,使用 TRIzol(Thermo Fisher Scentific)提取总 RNA,并用 RNase 消化。使用 miRNA 逆转录试剂盒(TaKaRa)合成 cDNA。使用 Step One PLus 实时荧光定量 PCR 系统进行 qPCR。采用的引物序列为:miR-26a 上游 5′-TTCAAGTAATCCAGGATAGGCT-3′;miR-26a 下游 5′-CCTATTCTTGGTTACTTGCAC-3′;U6 上游 5′-GGAACGATACAGAGAAGATTAGC-3′;U6 下游 5′-TGGAACGCTTCACGAATTTGCG-3′。反应程序为:95 ℃,10 s;95 ℃,5 s,60 ℃,20 s,40 个循环。最终解离曲线步骤为 95 ℃,1 min;55 ℃,30 s;95℃,30 s。用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法计算 miR-26a 的相对表达水平。

1.1.5 组织形态学检测 将固定在 4% 多聚甲醛中的胸主动脉进行石蜡包埋。HE 染色观察胸主动脉中膜。40 倍光镜(DS-Fi1-Eclipse, Nikon)观察胸主动脉整体图像,测定管腔内径(lumen diameter, LD)。400 倍光镜观察胸主动脉中膜平滑肌细胞结构,排列及细胞核情况,测定胸主动脉中膜厚度(media thickness, MT)。计算 MT/LD,用以评估胸主动脉重塑程度。通过 Masson 三色染色观察胸主动脉纤维化程度。观察胶原纤维沉积情况,每个切片随机选取 10 个视野,用 Image Pro-plus 图像分析软件对 Masson 染色图片进行分析,计算胶原体积分数(collagen volume fraction, CVF)。

1.1.6 免疫组化检测 将石蜡包埋的主动脉组织进行 α-actin 及 PCNA 免疫组织化学染色。α-actin 用于观察胸主动脉平滑肌,在 400 倍的视野下,用光学显微镜拍照,观察平滑肌分布、动脉内膜情况及平滑肌细胞体积与排列情况。核蛋白 PCNA 用于测量胸主动脉平滑肌细胞增殖。棕色染色表示阳性表达,在 400 倍光镜下,随机选取 10 个视野计算总细胞核中阳性细胞核的百分比,即胸主动脉平滑肌细胞增殖指数。

1.1.7 Western blot 检测胸主动脉中相关蛋白的表达

剪取 1~1.5 cm 胸主动脉组织按说明书进行蛋白提取(西安赫特生物科技有限公司),用二辛可宁酸(BCA)定量。相同量蛋白通过 10% SDS-PAGE 电泳,转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。在室温下用 5% 脱脂乳将膜封闭至少 1 h,然后分别与 AT1R(1∶800, Abcam),p-smad3(1∶500, Abcam),TGFβ1(1∶1 000, CST),CTGF(1∶1 000, Abcam)或 GAPDH(1∶2 000, Affinity Biosciences)的特异性一抗孵育,在 4 ℃下过夜。用 TBST 洗涤 3 次(每次 5 min)后,在室温下与山羊抗兔 IgG 抗体(1∶10 000,壮志生物技术)一起温育 1 h,再用 TBST 洗涤 3 次(每次 10 min)。免疫印迹结果使用 Gene Company Limited 成像系统(中国)得到图像,用 Image J 分析显影条带。蛋白相对表达结果表示为靶蛋白/ GAPDH(内参蛋白)的比例。

1.2 细胞实验

取50日龄,体质量150~180 g的雌性SD大鼠胸主动脉,纵向切开血管后放在预冷的4 ℃ DMEM培养基(Gibco,USA)中,分离中膜并剪成1 mm左右的方块,放入培养盘中培养4 h,加入含有20% FBS的DMEM培养基培养至获取胸主动脉平滑肌原代细胞(VSMC)。将原代细胞传代至3~9代,分为AngⅡ处理组(VSMC+AngⅡ,AngⅡ$10^{-7}$ mol/L,作用24 h)和对照组(VSMC+Ctrl)。qPCR检测各组细胞miR-26a的相对表达水平,Western blot检测各组细胞smad3和p-smad3表达情况。

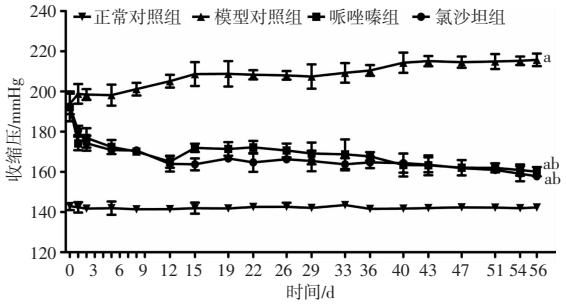
1.3 统计学分析

数据分析使用GraphPad Prism5软件。实验数据以$\bar{x}\pm s$表示。使用单因素方差分析和LSD-$t$检验进行组间比较。

## 2 结果

2.1 各组大鼠在干预前后收缩压的变化

各组SHRs干预前鼠尾动脉收缩压均显著高于正常对照大鼠($P<0.05$),SHRs各组之间差异无统计学意义($P>0.05$),表明SHRs造模成功,SHRs各组之间具有可比性。于首次灌胃后第1天,氯沙坦组、哌唑嗪组鼠尾动脉收缩压开始下降,分别下降(12.0±6.3)、(18.0±7.0)mmHg。模型对照组鼠尾动脉收缩压持续升高,从基线(193.8±5.1)mmHg(8周)升高到(215.7±3.1) mmHg(16周)。干预8周后,氯沙坦组、哌唑嗪组收缩压显著低于模型对照组,但仍高于正常对照组($P<0.05$)。氯沙坦组、哌唑嗪组间收缩压无统计学差异($P>0.05$,图1)。




0代表第8周(基线);a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与模型对照组比较

**图1 各组大鼠在干预前后收缩压的变化**($n=6,\bar{x}\pm s$)

2.2 各组大鼠胸主动脉miR-26a相对表达水平

氯沙坦组、哌唑嗪组胸主动脉miR-26a相对表达分别为[(0.490±0.080)、(0.237±0.072),均高于模型对照组(0.095±0.031),$P<0.05$],且氯沙坦组高于哌唑嗪组($P<0.05$);但均较正常对照组表达低($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠胸主动脉组织形态学变化

灌胃8周后,模型对照组血管管壁明显增厚,平滑肌细胞增生、肥大、排列紊乱,平滑肌层数增多,细胞核深染,失去原有的梭形形态和典型的层状结构,氯沙坦组、哌唑嗪组胸主动脉增厚不明显,平滑肌细胞排列相对整齐,胞核形态相对规则,MT/LD显著低于模型对照组,但均高于正常对照组($P<0.05$),且氯沙坦组MT/LD较哌唑嗪组低($P<0.05$,表1),正常对照组血管管壁未见明显增厚,平滑肌细胞排列整齐,胞核形态规则(图2)。在Masson三色染色后,胶原纤维染成蓝色,肌纤维染成红色,细胞核染成蓝紫色。氯沙坦组、哌唑嗪组胸主动脉中膜胶原纤维沉积明显较模型对照组少,胶原体积分数(CVF)明显低于模型对照组,但均高于正常对照组($P<0.05$),且氯沙坦组CVF较哌唑嗪组低($P<0.05$)。正常对照组则无显著的胶原纤维沉积现象(图2、表1)。

2.4 各组大鼠胸主动脉免疫组化检测

灌胃8周后,α-actin免疫组织化学染色显示,正常对照组中平滑肌分布均匀,动脉内膜完整,模型对照组平滑肌细胞形成内膜增生,在一些区域中相对密集,并且血管壁的一部分突出到动脉内腔中。氯沙坦与哌唑嗪的治疗改善了动脉平滑肌肥大和排列紊乱,且氯沙坦治疗组改善更明显。PCNA免疫组织化学染色结果显示,氯沙坦组、哌唑嗪组平滑肌细胞增殖指数较模型对照组降低($P<0.05$),且氯沙坦组降低更明显($P<0.05$),但均较正常对照组高($P<0.05$,图2、表1)。

2.5 各组大鼠胸主动脉相关蛋白相对表达水平

氯沙坦组、哌唑嗪组胸主动脉AT1R、p-smad3、TGFβ1、CTGF相对表达均低于模型对照组($P<0.05$),且氯沙坦组低于哌唑嗪组($P<0.05$);但均较正常对照组表达高($P<0.05$,图3、表2)。

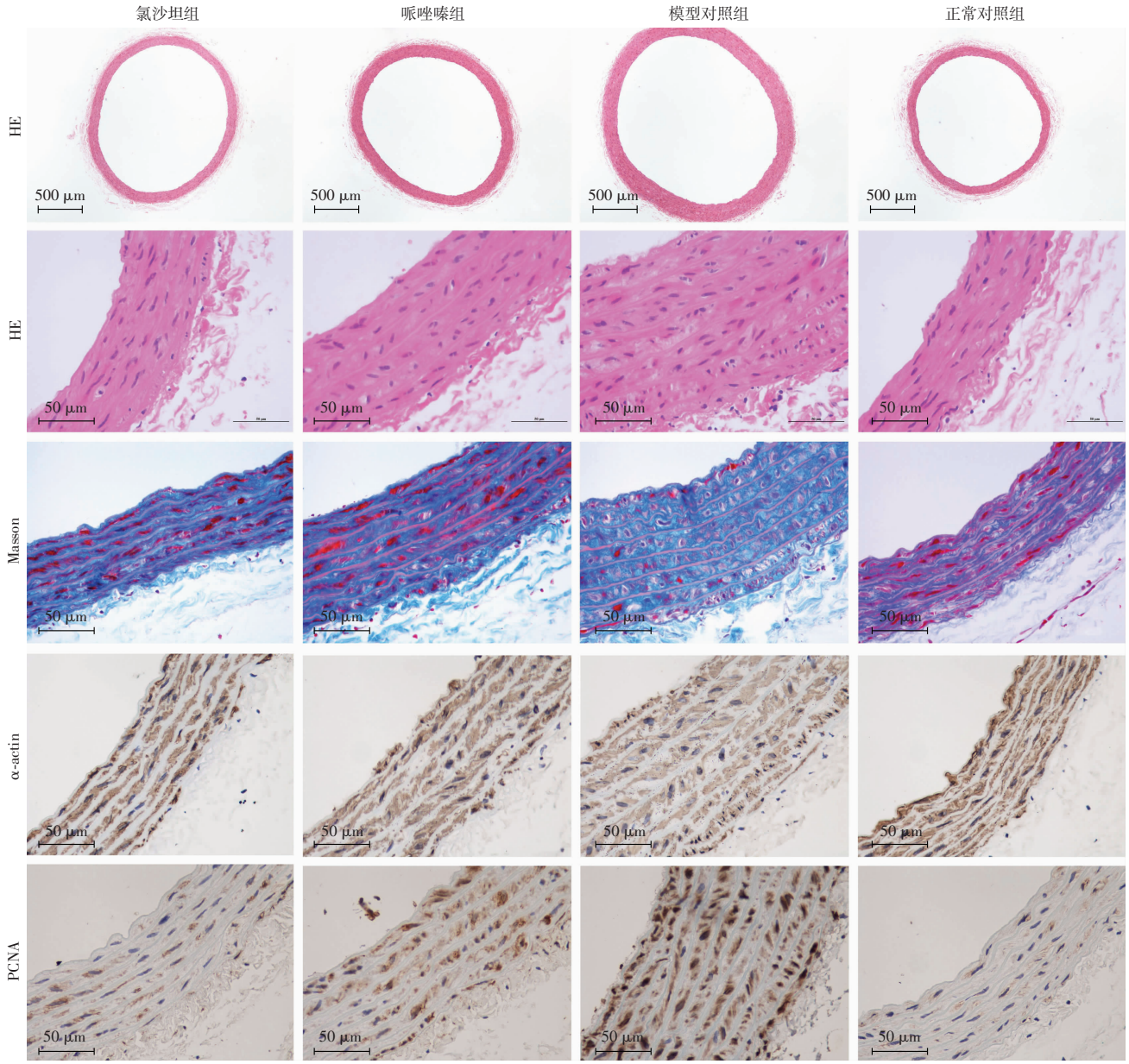
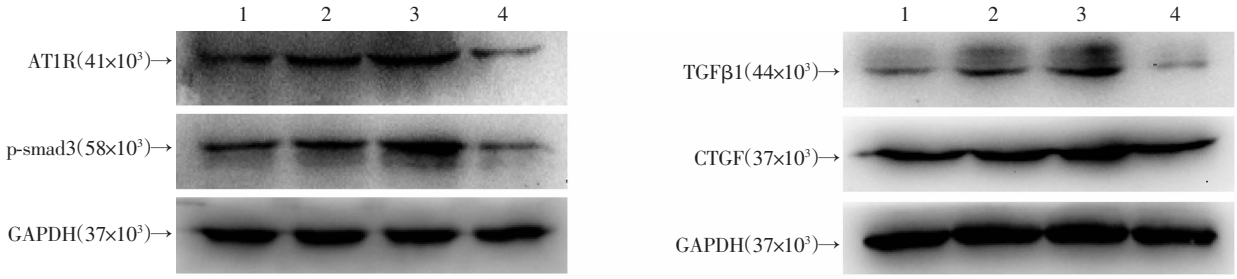



**图 2　灌胃 8 周后各组大鼠胸主动脉 HE、Masson、α-actin 及 PCNA 染色情况**

**表 1　各组大鼠胸主动脉形态学与免疫组化统计结果**($n=6, \bar{x}\pm s$)

| 组别 | MT/μm | LD/μm | MT/LD (%) | CVF (%) | 平滑肌细胞增殖指数 (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 氯沙坦组 | 90.26±1.47$^{abc}$ | 1 557.00±59.51$^{b}$ | 5.81±0.22$^{abc}$ | 26.56±2.22$^{abc}$ | 15.03±1.06$^{abc}$ |
| 哌唑嗪组 | 114.60±1.99$^{ab}$ | 1 570.00±38.13$^{b}$ | 7.30±0.18$^{ab}$ | 40.31±2.43$^{ab}$ | 27.59±1.88$^{ab}$ |
| 模型对照组 | 172.10±30.29$^{a}$ | 1 698.00±100.50$^{a}$ | 10.13±1.68$^{a}$ | 56.57±4.52$^{a}$ | 57.12±5.22$^{a}$ |
| 正常对照组 | 64.80±2.56 | 1 495.00±39.38 | 4.34±0.16 | 20.76±2.28 | 8.68±1.25 |

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与模型对照组比较;c: $P<0.05$,与哌唑嗪组比较




1:氯沙坦组;2:哌唑嗪组;3:模型对照组;4:正常对照组

**图 3 Western blot 检测各组大鼠胸主动脉 AT1R、p-smad3、TGFβ1、CTGF 蛋白表达**

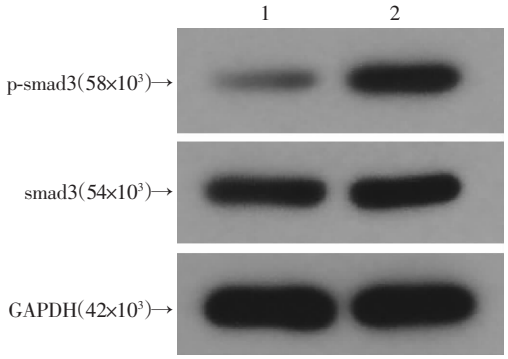
**表 2 各组大鼠胸主动脉蛋白相对表达量结果($n=6,\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | AT1R | p-smad3 | TGFβ1 | CTGF |
|---|---|---|---|---|
| 氯沙坦组 | 1.82±0.46$^{abc}$ | 1.85±0.27$^{abc}$ | 3.13±0.56$^{abc}$ | 1.72±0.24$^{abc}$ |
| 哌唑嗪组 | 2.70±0.30$^{ab}$ | 2.29±0.29$^{ab}$ | 4.46±0.51$^{ab}$ | 2.32±0.10$^{ab}$ |
| 模型对照组 | 3.29±0.15$^{a}$ | 2.88±0.10$^{a}$ | 6.07±0.68$^{a}$ | 3.04±0.16$^{a}$ |
| 正常对照组 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |

a:$P<0.05$,与正常对照组比较;b:$P<0.05$,与模型对照组比较;c:$P<0.05$,与哌唑嗪组比较

2.6 不同处理组细胞 miRNA-26a 相对 mRNA 表达水平及相关蛋白相对表达水平

VSMC+Ang Ⅱ组细胞 miR-26a 表达显著低于 VSMC+Ctrl 组($P<0.05$)。VSMC+Ang Ⅱ组细胞 p-smad3 相对表达显著高于 VSMC+Ctrl 组($P<0.05$),而各组间 smad3 相对表达差异无统计学意义($P>0.05$,图 4、表 3)。




1:VSMC+Ctrl 组;2:VSMC+Ang Ⅱ组

**图 4 Western blot 检测各组细胞 p-smad3、smad3 蛋白表达**

**表 3 各组细胞 miR-26a 相对 mRNA 表达水平和 smad3 及 p-smad3 相对蛋白表达水平($n=6,\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | miR-26a | smad3 | p-smad3 |
|---|---|---|---|
| VSMC-Ctrl 组 | 1.00±0.08 | 1.00±0.00 | 1.00±0.00 |
| VSMC+Ang Ⅱ组 | 0.32±0.03$^{a}$ | 1.07±0.04$^{a}$ | 2.50±0.21$^{a}$ |

a:$P<0.05$,与 VSMC-Ctrl 组比较

## 3 讨论

高血压相关血管损伤的特征是功能、结构和机械改变,包括过度收缩、内皮功能障碍、炎症、钙化和纤维化。随着高血压病程进展,血管经历结构和功能变化,其特征在于内皮功能障碍,管壁增厚,可扩张性降低和动脉硬化[12]。研究表明大动脉结构和功能变化与高血压的发生、发展和预后密切相关,同时与心脏结构和功能具有重要联系[13]。因此,我们选取大动脉作为研究对象。我们发现自发性高血压大鼠血压持续升高可导致胸主动脉纤维化,动脉中膜明显增厚,平滑肌细胞增生、肥大、排列紊乱,平滑肌层数增多,细胞核深染,失去原有的梭形形态和典型的层状结构。近年来,一些研究阐明了 miRNA 在心血管系统中具有关键作用,可参与心血管疾病的各种生理和病理过程,被认为是心血管疾病的新型治疗策略[14-16]。在本研究中,SHR 模型对照组胸主动脉 miR-26a 表达均比正常对照大鼠低,因而胸主动脉中膜明显增厚,平滑肌层数增多,胶原纤维有明显沉积,平滑肌细胞增生、肥大、排列紊乱,细胞核深染;而氯沙坦和哌唑嗪的治疗均可上调 SHRs 胸主动脉中 miR-26a 的表达,并降低血压。进而我们发现经药物治疗后血管中膜平滑肌细胞排列较整齐,细胞形态较规整,血管纤维化情况明显改善。说明 miR-26a 可阻止血压升高,且在高血压 VR 进程中具有保护性作用,可作为治疗高血压 VR 的潜在靶点。

Ang Ⅱ作为强效血管收缩剂对高血压引起的血管壁的结构变化及血管阻力增加具有重要作用,Ang Ⅱ是一种可以增加蛋白质合成并引起血管平滑肌细胞肥大的因子[17-18]。之前已有研究证明持续泵入 Ang Ⅱ会导致血管中 miR-26a 下调[11],本研究中也证明了这一观点,我们给 VSMC Ang Ⅱ处理,发现 Ang Ⅱ处理组细胞 miR-26a 表达明显低于对照组,同时 Ang Ⅱ处理

组细胞纤维化指标 p-smad3 表达显著高于对照组。本研究还发现通过给予 SHRs 氯沙坦和哌唑嗪不同药物灌胃处理,收缩压均可以明显降低,相较于哌唑嗪干预组而言,氯沙坦干预组 VR 情况改善更明显,同时血管 miR-26a 的表达更高。综上可说明 AT1R 对 miR-26a 表达有直接调控作用,阻断 AT1R 可上调 miR-26a 表达。

研究表明 miR-26a 可以下调 TGFβ1 及 CTGF 的表达,进而激活 smad3 并抑制 p-smad3 的核转位,从而发挥抗纤维化作用[19]。因此,miR-26a 在高血压 VR 中的保护作用可能与下游分子的调节有关。结缔组织生长因子是一种新定义的细胞因子,参与调节成纤维细胞分泌细胞外基质,在各种器官的纤维化中起重要作用,包括肝脏、肾脏、心室及血管[20]。抑制 CTGF 蛋白的表达能阻止纤维化过程[21-22]。转化生长因子 β1 是高血压血管重塑的重要促纤维化因子。它使膜受体和细胞质转导物磷酸化,主要是针对 smad 家族,并调节其基因表达[23]。smad3 在发挥 TGFβ1 诱导的纤维化过程中起重要作用[24]。除此,TGFβ1 可调节 ECM 的积累和胶原沉积,血管细胞活化、分化和迁移[25-26],抑制 TGFβ1 可减轻高血压和改善血管结构[27-29]。自发性高血压动物表现出血管重塑,表现为显著的血管壁变化,较高的胶原沉积和受损的血管舒张,这与 TGF-β1 和 CTGF 的表达和活化增加有关。生物信息学表明 CTGF 和 TGFβ1 都是 miR-26a 的靶基因。我们的研究发现 miR-26a 下调后可以增加 CTGF、TGFβ1 的表达。因此可认为 miR-26a 可通过下调 TGFβ1、CTGF 等抑制血管纤维化进而改善血管重塑。

综上,miR-26a 在高血压血管重塑中具有保护性作用,可以成为高血压血管重塑的一个新的诊断和治疗靶点。阻断 AT1R 可直接上调 miR-26a 表达,进而通过对其靶基因 TGFβ1 和 CTGF 表达抑制改善血管纤维化,从而降低血管张力并降低血压,最终减缓高血压血管重塑进程。

**参考文献:**


[1] CAI G J, ZHANG X Y, WENG W J, *et al*. Associations between PPARG polymorphisms and the risk of essential hypertension[J]. PLoS ONE, 2017, 12(7): e0181644. DOI:10.1371/journal.pone.0181644.

[2] MULVANY M J. Small artery remodelling in hypertension [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2012, 110(1): 49-55. DOI:10.1111/j.1742-7843.2011.00758.x.

[3] LIU J, HUANG Y Q, CHEN S, *et al*. Role of endogenous sulfur dioxide in regulating vascular structural remodeling in hypertension[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 4529060. DOI:10.1155/2016/4529060.

[4] WENZEL U, TURNER J E, KREBS C, *et al*. Immune mechanisms in arterial hypertension[J]. J Am Soc Nephrol, 2016, 27(3): 677-686. DOI:10.1681/ASN.2015050562.

[5] HAN Y C, LI H C. MiRNAs as biomarkers and for the early detection of non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. J Thorac Dis, 2018, 10(5): 3119-3131. DOI:10.21037/jtd.2018.05.32.

[6] HOLMBERG J, BHATTACHARIYA A, ALAJBEGOVIC A, *et al*. Loss of vascular myogenic tone in miR-143/145 knockout mice is associated with hypertension-induced vascular lesions in small mesenteric arteries[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018, 38(2): 414-424. DOI:10.1161/ATVBAHA.117.310499.

[7] HAN W, HAN Y C, LIU X K, *et al*. Effect of miR-29a inhibition on ventricular hypertrophy induced by pressure overload [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(2): 821-826. DOI: 10.1007/s12013-014-0269-x.

[8] YANG X Y, DONG M, WEN H, *et al*. MiR-26a contributes to the PDGF-BB-induced phenotypic switch of vascular smooth muscle cells by suppressing Smad1[J]. Oncotarget, 2017, 8(44): 75844-75853. DOI:10.18632/oncotarget.17998.

[9] LEEPER N J, RAIESDANA A, KOJIMA Y, *et al*. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(4): 1035-1043. DOI: 10.1002/jcp.22422.

[10] WU W, SHANG Y Q, DAI S L, *et al*. MiR-26a regulates vascular smooth muscle cell calcification in vitro through targeting CTGF[J]. Bratisl Lek Listy, 2017, 118(8): 499-503. DOI:10.4149/BLL_2017_096.

[11] 张益珊, 袁苗, 黄园, 等. MiR-26a/b 在 AngⅡ导致的高血压血管重塑中的作用[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2017, 38(5): 649-654. DOI:10.7652/jdyxb201705005.
ZHANG Y S, YUAN M, HUANG Y, *et al*. Role of miR-26a/b in Ang Ⅱ-induced hypertensive vascular remodeling [J]. J Xi'an Jiaotong Univ Med Sci, 2017, 38(5): 649-654. DOI:10.7652/jdyxb201705005.

[12] HARVEY A, MONTEZANO A C, LOPES R A, *et al*. Vascular fibrosis in aging and hypertension: molecular mechanisms and clinical implications[J]. Can J Cardiol, 2016, 32(5): 659-668. DOI:10.1016/j.cjca.2016.02.070.

[13] SAFAR M E, TOTO-MOUKOUO J J, BOUTHIER J A, *et al*. Arterial dynamics, cardiac hypertrophy, and antihypertensive treatment[J]. Circulation, 1987, 75(1 Pt 2): I156-I161.

[14] JONES BUIE J N, GOODWIN A J, COOK J A, *et al*. The

role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors[J]. Atherosclerosis, 2016, 254: 271-281. DOI:10.1016/j.atherosclerosis.2016.09.067.

[15] MELMAN Y F, SHAH R, DANIELSON K, *et al*. Circulating microRNA-30d is associated with response to cardiac resynchronization therapy in heart failure and regulates cardiomyocyte apoptosis: A translational pilot study[J]. Circulation, 2015, 131(25): 2202-2216. DOI:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013220.

[16] LI H S, GAO F, WANG X W, *et al*. Circulating microRNA-378 levels serve as a novel biomarker for assessing the severity of coronary stenosis in patients with coronary artery disease [J]. Biosci Rep, 2019, 39(5): BSR20182016. DOI:10.1042/BSR20182016.

[17] SHEN M C, MORTON J, DAVIDGE S T, *et al*. Loss of smooth muscle cell disintegrin and metalloproteinase 17 transiently suppresses angiotensin II-induced hypertension and end-organ damage[J]. J Mol Cell Cardiol, 2017, 103: 11-21. DOI:10.1016/j.yjmcc.2016.12.001.

[18] LI R, XIAO J, QING X T, *et al*. Sp1 mediates a therapeutic role of MiR-7a/b in angiotensin II-induced cardiac fibrosis *via* mechanism involving the TGF-β and MAPKs pathways in cardiac fibroblasts[J]. PLoS ONE, 2015, 10(4): e0125513. DOI:10.1371/journal.pone.0125513.

[19] LIANG H H, XU C Q, PAN Z W, *et al*. The antifibrotic effects and mechanisms of microRNA-26a action in idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Mol Ther, 2014, 22(6): 1122-1133. DOI:10.1038/mt.2014.42.

[20] LI A Y, WANG J J, YANG S C, *et al*. Protective role of Gentianella acuta on isoprenaline induced myocardial fibrosis in rats via inhibition of NF-κB pathway[J]. Biomedecine Pharmacother, 2019, 110: 733-741. DOI:10.1016/j.biopha.2018.12.029.

[21] SAKAI N, NAKAMURA M, LIPSON K E, *et al*. Inhibition of CTGF ameliorates peritoneal fibrosis through suppression of fibroblast and myofibroblast accumulation and angiogenesis [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 5392. DOI:10.1038/s41598-017-05624-2.

[22] AN E, PARK H, LEE A C. Inhibition of fibrotic contraction by C-phycocyanin through modulation of connective tissue growth factor and α-smooth muscle actin expression[J]. Tissue Eng Regen Med, 2016, 13(4): 388-395. DOI:10.1007/s13770-015-0104-5.

[23] ZHANG Q H, HUANG F, YAO Y L, *et al*. Interaction of transforming growth factor-β-Smads/microRNA-362-3p/CD82 mediated by M2 macrophages promotes the process of epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells[J]. Cancer Sci, 2019, 110(8): 2507-2519. DOI:10.1111/cas.14101.

[24] ZHANG Y G, CHENG C T, WANG S, *et al*. Knockdown of FOXM1 inhibits activation of keloid fibroblasts and extracellular matrix production via inhibition of TGF-β1/Smad pathway[J]. Life Sci, 2019, 232: 116637. DOI:10.1016/j.lfs.2019.116637.

[25] CALVIER L, CHOUVARINE P, LEGCHENKO E, *et al*. PPARγ links BMP2 and TGFβ1 pathways in vascular smooth muscle cells, regulating cell proliferation and glucose metabolism[J]. Cell Metab, 2017, 25(5): 1118-1134. e7. DOI:10.1016/j.cmet.2017.03.011.

[26] GUAN T, ZHAO G Y, DUAN H H, *et al*. Activation of type 2 cannabinoid receptor (CB2R) by selective agonists regulates the deposition and remodelling of the extracellular matrix[J]. Biomedecine Pharmacother, 2017, 95: 1704-1709. DOI:10.1016/j.biopha.2017.09.085.

[27] POPOVIC N, BRIDENBAUGH E A, NEIGER J D, *et al*. Transforming growth factor-beta signaling in hypertensive remodeling of Porcine aorta[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2009, 297(6): H2044-H2053. DOI:10.1152/ajpheart.01015.2008.

[28] TANG L H, PEI H F, YANG Y, *et al*. The inhibition of calpains ameliorates vascular restenosis through MMP2/TGF-β1 pathway[J]. Sci Rep, 2016, 6: 29975. DOI:10.1038/srep29975.

[29] LAN T H, HUANG X Q, TAN H M. Vascular fibrosis in atherosclerosis[J]. Cardiovasc Pathol, 2013, 22(5): 401-407. DOI:10.1016/j.carpath.2013.01.003.

(**收稿**:2019-07-30;**修回**:2019-10-18)

(编辑 栾 嘉)