

研究论文

血管平滑肌细胞过表达人EP4受体改善血管紧张素II诱导的高血压

徐虎¹, 王赛仑¹, 包成朕¹, 叶兰¹, 管又飞¹, 张晓燕^{2,*}

¹大连医科大学医学科学研究院, 大连 116044; ²华东师范大学医学与健康研究院, 上海 200241

摘要: 前列腺素E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 在心血管系统中具有重要的调节作用, PGE₂通过G蛋白耦联受体(EP1、EP2、EP3、EP4)参与机体血压的稳态维持。本文旨在利用血管平滑肌细胞特异性人EP4转基因小鼠(VSMC-hEP4 Tg)研究血管平滑肌细胞过表达人EP4受体对小鼠血压的作用及机制。通过转基因技术构建VSMC-hEP4 Tg小鼠并进行鉴定; 使用尾套法测定小鼠在基础状态及高、低盐饮食条件下的血压水平; 在小鼠背部皮下埋置血管紧张素II (angiotensin II, Ang II)缓释泵后检测其血压变化; 颈动脉插管法测量小鼠血压对Ang II静脉灌注的急性反应以及两种EP4特异性激动剂(CAY10580和CAY10598, 0.5 mg/kg)对小鼠血压的影响; 使用血管张力仪测定小鼠肠系膜动脉血管环对Ang II诱导的血管收缩力; 运用Western blot检测EP4特异性激动剂PGE₁-OH对Ang II诱导的肌球蛋白磷酸酶靶亚基1 (myosin phosphatase target subunit 1, MYPT1)磷酸化的作用。结果显示: 与野生型(wild type, WT)小鼠相比, VSMC-hEP4 Tg小鼠基础血压明显较低, 在高、低盐饮食条件下其血压均保持较低水平; VSMC-hEP4 Tg小鼠的血压在Ang II缓释给药及静脉灌注后均显著低于WT小鼠, 其肠系膜血管环对Ang II的反应性也明显下降。此外, CAY10580和CAY10598均能使WT小鼠血压显著降低。进一步研究发现, PGE₁-OH可抑制肠系膜动脉中Ang II介导的MYPT1 Thr696位点的磷酸化。以上结果表明, 血管平滑肌细胞特异性过表达人EP4基因可显著降低小鼠基础血压, 并能减轻Ang II诱导高血压的发生, 其机制可能与EP4抑制Ang II的信号通路有关, 提示基于EP4特异性的长效激动剂的开发可能在高血压防治中有重要价值。

关键词: 前列腺素E₂; EP4受体; 血管平滑肌细胞; 高血压

中图分类号: R3; R54

Overexpression of human EP4 receptor in vascular smooth muscle cells attenuates angiotensin II-induced hypertension in mice

XU Hu¹, WANG Sai-Lun¹, BAO Cheng-Zhen¹, YE Lan¹, GUAN You-Fei¹, ZHANG Xiao-Yan^{2,*}

¹Advanced Institute for Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; ²Health Science Center, East China Normal University, Shanghai 200241, China

Abstract: Prostaglandin E₂ (PGE₂) plays an important role in cardiovascular system. PGE₂ regulates blood pressure through its 4 G protein coupled receptors, i.e., EP1, EP2, EP3, and EP4. The aim of this study was to investigate the role of EP4 receptors in vascular smooth muscle cells (VSMC) in blood pressure regulation. VSMC-specific human EP4 transgenic (VSMC-hEP4 Tg) mice were generated and genotyped. The systolic blood pressure (SBP) of the VSMC-hEP4 Tg mice and the wild-type (WT) littermates was measured under normal, low-salt (LSD) and high-salt diet (HSD) conditions using a tail-cuff method. Both WT and VSMC-hEP4 Tg mice were administered with a chronic infusion of angiotensin II (Ang II) with an osmotic pump and SBP levels were monitored every week. The mean arterial blood pressure (MAP) of WT and VSMC-hEP4 Tg mice upon Ang II intravenous infusion was measured via carotid arterial catheterization. Ang II-induced vasoconstriction of the mesenteric arterial rings from WT and VSMC-hEP4 Tg mice was measured using the multi myograph system. The effect of PGE₁-OH (a selective EP4 agonist) on Ang II-induced phosphorylation

Received 2021-03-16 Accepted 2021-05-24

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 91639201, 81970595, 81970606, 81900267).

*Corresponding author. Tel: +86-21-54836178; E-mail: xyzhang@hsc.ecnu.edu.cn

of myosin phosphatase target subunit 1 (MYPT1) was detected by Western blot. The effect of two additional EP4 specific agonists (CAY10580 and CAY10598, 0.5 mg/kg) on blood pressure of WT mice was measured by carotid arterial catheterization. The results showed that the VSMC-hEP4 Tg mice were successfully generated and their basal SBP levels were lower than those of WT mice. Although blood pressure levels were significantly altered in WT mice under LSD and HSD, little change was observed in the VSMC-hEP4 Tg mice. After a chronic infusion and an acute intravenous injection of Ang II, SBP levels of VSMC-hEP4 Tg mice were significantly lower than those of WT mice. In addition, both CAY10580 and CAY10598 significantly reduced MAP levels of WT mice. *Ex vivo* study showed that treatment of isolated mesenteric arteries with PGE₁-OH inhibited Ang II-induced phosphorylation of MYPT1. Collectively, these results demonstrate that specific overexpression of human EP4 gene in VSMCs significantly reduces basal blood pressure levels and attenuates Ang II-induced hypertension, possibly via inhibiting Ang II/AT1 signaling pathway. Our findings suggest that EP4 may represent an attractive target for the treatment of hypertension.

Key words: prostaglandin E₂; EP4 receptor; vascular smooth muscle cell; hypertension

高血压是常见的重大慢性非传染性疾病之一, 长期得不到良好控制的高血压可导致严重的冠状动脉、心脏、外周血管、肾脏等脏器的损伤^[1, 2]。随着我国高血压知晓率的逐年升高, 其作为心血管疾病主要危险因素的认识不断深入^[2]。生活方式干预和药物治疗是目前最主要的高血压疾病防治方法, 但总体效果仍十分有限。因此, 对高血压的发病机制进行深入研究并发现更有效的防治方法是目前亟待解决的问题^[2]。

前列腺素 E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂) 是花生四烯酸经环氧合酶 (cyclooxygenase, COX) 1/2 代谢的产物, 主要存在于肾脏和血管系统中, 在血管重构性疾病如动脉粥样硬化、主动脉瘤、血管再狭窄、高血压等发病中发挥重要作用^[3]。PGE₂ 通过四种不同受体 (EP1、EP2、EP3、EP4) 发挥其生物学功能, 而这四种受体的生物学功能各不相同。具体而言, EP1 主要与 Gq 蛋白耦联, 导致胞内钙离子水平升高; EP3 则与 Gi 蛋白耦联, 使胞内 cAMP 水平降低; 而 EP2 和 EP4 两种受体都主要与 Gs 蛋白耦联, 使胞内 cAMP 水平升高^[4]。

给实验小鼠注射 EP1 和 EP3 激动剂 (sulprostone) 后, 动物血压显著上升, 而注射 EP2 激动剂 (butaprost) 和 EP4 激动剂 (PGE₁-OH) 则出现血压的明显降低。因此, EP1 和 EP3 被称为“收缩型受体”, 而 EP2 和 EP4 则被称为“舒张性受体”^[5-8]。利用基因敲除动物的研究进一步阐释了 PGE₂ 不同受体在血压调控中的作用: 用醋酸脱氧皮质酮 (deoxycorticosterone acetate, DOCA) 盐 / 血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导高血压后发现, EP1 敲除小鼠的血压低于野生型 (wild type, WT) 小鼠, 且 EP1 敲除可降低此模型诱导的动脉瘤的破裂及死亡率^[9]; EP1 激活后能够增加 2 型糖尿病小鼠的小动

脉张力和血压^[10]。在基础状态下, EP2 受体缺陷小鼠的收缩压与 WT 对照组小鼠差别不大, 但当给予高盐饮食后, EP2 敲除小鼠的血压则显著升高^[6, 11]。EP3 受体敲除小鼠基础血压降低, 对 Ang II 引起的升压反应明显减弱^[5], 同时伴有其股动脉对 Ang II 诱导的收缩反应的下降^[12]。有研究表明, 他莫昔芬诱导的 EP4 全身敲除小鼠的基础血压升高, 并可加剧 Ang II 依赖的高血压^[13]。我们前期的研究发现血管内皮细胞特异性敲除 EP4 受体可导致小鼠血压显著高于对照小鼠, 而内皮细胞特异性过表达 EP4 后小鼠血压低于 WT 小鼠, 其机制与 EP4 调控内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 活性有关^[14]; 我们也发现血管平滑肌细胞 EP4 受体特异性敲除的小鼠血压较对照小鼠明显升高, 并增加 Ang II 诱导的动脉夹层的发病率, 其机制与平滑肌细胞 EP4 敲除增加 Ang II 诱导的胞内钙离子升高有关^[3]。然而, 目前还缺乏血管平滑肌 EP4 过表达或激活舒张血管、降低血压的直接证据。本研究通过构建平滑肌细胞特异性过表达人 EP4 的转基因小鼠 (VSMC-hEP4 Tg), 研究平滑肌 EP4 在 Ang II 诱导的高血压中的作用, 以期对高血压的防治提供新的实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 Ang II (MedChemExpress, MCE); PGE₁-OH、CAY10580、CAY10598 (Cayman); 兔抗 p-MYPT1 (Thr696) 抗体、兔抗 MYPT1 抗体 (Cell Signaling); 兔抗 EP4 抗体 (Cayman); 兔抗真核翻译起始因子 5 (eukaryotic translation initiation factor 5, eIF5) 抗体 (Santa Cruz); 渗透压缓释泵 (Alzet, 2004); 尾套法血压仪 (北京软隆); BL-420N 信号采集与处理系统 (成都泰盟); 血管环张力测定仪 (丹麦

DMT); 动物饲料、0.3% 低盐饮食和 3% 高盐饮食(江苏美迪森)。

1.2 VSMC-hEP4 Tg 小鼠的构建 首先构建了 *Tagln*-hEP4 载体(图 1A), 即在平滑肌细胞特异性基因 *Tagln* 启动子的后面插入人 *EP4* 基因的编码序列, 然后 DNA 纯化后进行原核注射, 得到 C57BL/6 背景的 VSMC-hEP4 Tg 阳性小鼠。用 VSMC-hEP4 Tg 阳性小鼠与 C57BL/6 背景 WT 小鼠交配获得的同窝阴性小鼠(WT)和阳性小鼠(VSMC-hEP4 Tg)进行实验。实验动物饲养在大连医科大学 SPF 动物中心, 恒温(23 ± 1) °C, 自由饮食和饮水, 12 h 光照/12 h 黑暗交替。本研究所有动物实验方案均获得大连医科大学实验动物伦理委员会的批准。

1.3 Ang II 诱导高血压模型 按照小鼠体重及缓释泵速率计算 Ang II 浓度, 使 Ang II 灌注速率为每分钟 1 000 ng/kg, 对照组缓释泵内装生理盐水。准备好缓释泵后, 小鼠异氟烷麻醉, 后颈部皮肤备皮, 开 1 cm 左右切口, 扩开背部皮下后将缓释泵塞进背部皮下, 缝合开口并进行消毒。小鼠术后 3 天内肌注抗生素预防感染。每 7 天进行一次尾套法血压测定。

1.4 尾套法血压测定 在正式开始实验前需对动物进行 2 周的尾套法血压测定训练, 以防动物因尾部充压夹闭造成应激而产生一过性的血压和心率升高。此后动物将充分适应尾套法血压测定, 不再出现不愿进入测量套或充压测量时摇尾等异常反应。本研究测定动物血压均在 13~16 点期间进行, 每只小鼠记录连续 3 次收缩压值, 取其平均值。

1.5 插管法血压测定 小鼠麻醉后, 置于 37 °C 保温垫上, 颈部皮肤备皮消毒, 经右颈总动脉插管, 连接生理记录仪血压感应器, 从左颈静脉插管, 连接药物进样针。插管完毕后, 静置 15 min 使小鼠血压稳定, 随后利用微量注射泵从左颈静脉给予 Ang II (每分钟 100 pmol/kg) 或单次推注 CAY10580 (0.5 mg/kg) 或 CAY10598 (0.5 mg/kg), 通过生理记录仪观察记录血压变化。

1.6 血管环张力测定 小鼠用过量 CO₂ 处死后, 在富氧 Krebs 液中分离肠系膜动脉, 去除血管周围组织。取 2 mm 长血管环并用 40 μm 钨丝挂在张力测定仪小室中, 置于 5 mL 富氧 Krebs 液中, 维持温度在 37 °C。平衡后使用不同浓度 Ang II 刺激, 观察记录肠系膜动脉收缩张力。

1.7 qPCR 检测 mRNA 血管组织用 TRIzol 法提取总 RNA, 取 2 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA, 检测

小鼠 *EP4*、人 *EP4* mRNA, 小鼠 *GAPDH* mRNA 作为内参基因。引物序列为: 小鼠 *EP4*: 上游 5'-ATGGTCATCTTACTCATCGCCAC-3', 下游 5'-CCTTCA-CCACGTTTGGCTGAT-3'; 人 *EP4*: 上游 5'-AGGCCATCCGAATTGCTTCT-3', 下游 5'-GGCAGG-AGGGTCTGAGATGT-3'; 小鼠 *GAPDH*: 上游 5'-GGGTCCCAGCTTAGGTTTCAT-3', 下游 5'-GCAACA-ATCTCCACTTTGCCA-3'; PCR 反应条件为: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 20 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 进行 40 个循环。得到 Ct 值后, 以 *GAPDH* 为内参, 用 2^{-ΔΔCt} 法计算 *EP4* mRNA 表达水平。

1.8 免疫印迹分析 SD 大鼠肠系膜动脉在体式显微镜下剥离干净外膜后, 置于富氧 PBS 中, 用 PGE₁-OH (1 μmol/L) 预处理 30 min 后, 加入 Ang II (1 μmol/L) 处理 30 min, 处理过程维持 37 °C 恒温。处理结束后用预冷的 PBS 洗涤, 加入含有蛋白酶抑制剂和蛋白磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 进行匀浆提取蛋白。BCA 法测定蛋白浓度。10% SDS 凝胶电泳, 电转至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗 (1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次 (10 min/次), 二抗 (1:1 000 稀释) 室温孵育 1 h, 之后用 TBST 洗 3 次 (10 min/次), 用 ECL 显色。结果用 ImageJ 软件进行灰度分析。

1.9 免疫组化染色 血管组织 4% 多聚甲醛固定后脱水, 石蜡包埋后切片, 切片脱蜡后进行免疫组化染色: 切片置于柠檬酸缓冲液中, 微波炉高火 3 min, 随后低火 10 min 进行抗原修复; PBS 洗涤 3 次后用 3% 过氧化氢溶液消除内源性过氧化物酶活性; PBS 洗去过氧化氢, 用 5% BSA 封闭 1 h, 随后滴加一抗 (1:200 稀释), 4 °C 过夜; PBS 洗涤 3 次, 滴加 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h; PBS 洗涤 3 次后用 DAB 显色; 苏木素染液染色 30 s, 自来水冲洗反蓝, 之后用酒精脱水, 二甲苯透明 (5 min/次, 2 次), 中性树胶封片。晾干后显微镜观察拍照。

1.10 统计学分析 实验数据使用 GraphPad Prism 8 进行统计分析和作图, 实验数据以 mean ± SEM 表示。使用 Student's *t* 检验进行趋于正态分布的两组数据之间的比较, 使用 ANOVA 进行多组间比较。P < 0.05 时认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VSMC-hEP4 Tg 小鼠的鉴定

为了研究血管平滑肌上过表达 EP4 能否抵抗高

血压, 本研究构建了血管平滑肌细胞特异性人 *EP4* 转基因小鼠 (VSMC-hEP4 Tg)。鼠尾 DNA 经 PCR 鉴定可产生 396 bp 的条带 (图 1B), 同窝出生的转基因阴性小鼠 (WT 小鼠) 作为对照小鼠。为了进一步验证人 *EP4* 基因是否转入成功, 我们首先从 mRNA 水平进行验证, 利用人 *EP4* 基因特异性引物进行 PCR, 结果显示, VSMC-hEP4 Tg 小鼠主动脉和肠系膜动脉中均有人 *EP4* 的表达, 而 WT 小鼠没有人 *EP4* 基因的表达 (图 1C); 免疫组化染色结果显示, VSMC-hEP4 Tg 小鼠主动脉的中膜平滑肌层的 *EP4* 表达明显增加 (图 1D), 进一步证明 VSMC-hEP4 Tg 小鼠构建成功。

2.2 VSMC-hEP4 Tg 小鼠血压显著低于 WT 小鼠

结果显示, 在基础状态下, VSMC-hEP4 Tg 小鼠收缩压明显低于 WT 小鼠 (图 2A)。给予低盐饮食后, WT 小鼠血压明显下降, VSMC-hEP4 Tg 小鼠血压保持稳定, 最后两组小鼠血压差异消失并保持在 100 mmHg 左右 (图 2B)。给予高盐饮食后, WT 小鼠血压显著升高, 而 VSMC-hEP4 Tg 小鼠血压始终保持在基础水平 (图 2B)。说明血管平滑肌

细胞过表达人 *EP4* 基因可抵抗高盐饮食引起的血压升高。上述实验表明, 平滑肌细胞过表达人 *EP4* 基因后, 血压维持在低位水平, 且对高盐和低盐的反应性显著降低 (图 2C、D), 提示其降低了小鼠的盐敏感性。

2.3 VSMC-hEP4 Tg 小鼠抵抗 Ang II 诱导的高血压

在 Ang II 诱导的高血压模型中, 虽然两组小鼠血压在 Ang II 处理后均明显升高, 但 VSMC-hEP4 Tg 小鼠血压最终低于 WT 小鼠, 最终其血压升高幅度比 WT 小鼠低约 20 mmHg (图 3A、B)。插管法血压测定结果显示, 急性推注 Ang II 后, VSMC-hEP4 Tg 小鼠的血压升高反应较 WT 小鼠显著降低, 并保持约 14 mmHg 的差距 (图 3C)。上述结果表明, 血管平滑肌细胞过表达人 *EP4* 能够改善 Ang II 诱导的高血压。肠系膜动脉血管环实验显示, VSMC-hEP4 Tg 小鼠肠系膜动脉对 Ang II 诱导的血管收缩力明显低于 WT 小鼠 (图 3D)。Western blot 结果显示, *EP4* 特异性激动剂 PGE₁-OH 能够显著抑制 Ang II 诱导的 SD 大鼠肠系膜动脉中促进平滑肌细胞收缩蛋白 MYPT1 Thr696 的磷酸化 (图 3E)。以上结

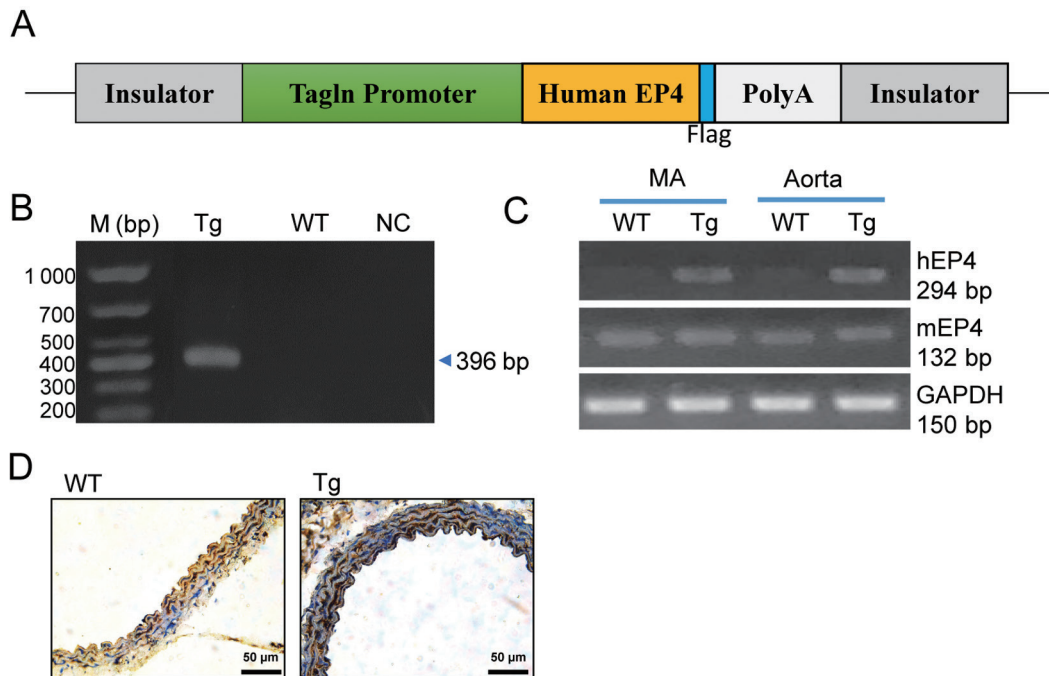


图 1. VSMC-hEP4 Tg 小鼠的构建示意图与鉴定

Fig. 1. Generation and validation of VSMC-hEP4 Tg mice. *A*: Schematic diagram showing the Tagln-hEP4 fragment inserted allele. *B*: Genotyping of the wild type (WT) and transgenic allele (Tg) using mouse tail DNA. The 396 bp band represents the Tg allele. M: molecular marker; NC: negative control. *C*: qPCR products of human *EP4* (hEP4), mouse *EP4* (mEP4) and mouse GAPDH in mesenteric arteries (MA) and aortas of WT and VSMC-hEP4 Tg mice. *D*: The representative immunohistochemical staining of *EP4* in WT and VSMC-hEP4 Tg mouse aortas. Scale bar, 50 μ m.

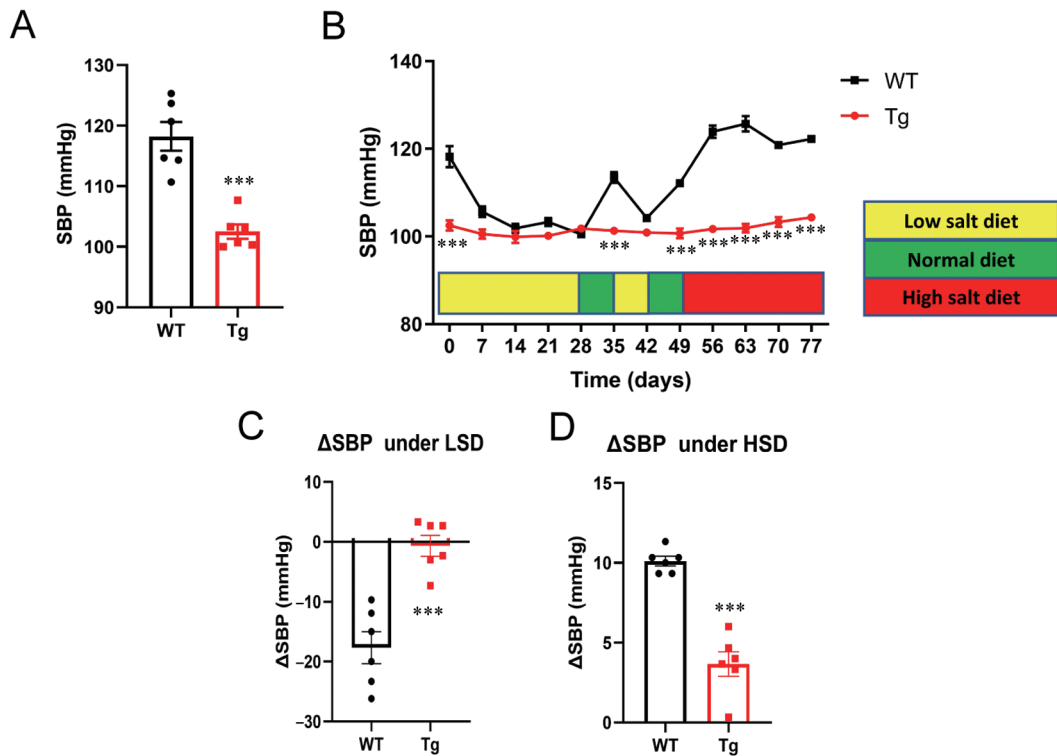


图 2. VSMC-hEP4 Tg小鼠血压低于WT小鼠

Fig. 2. VSMC-hEP4 Tg mice displayed lower blood pressure compared to WT mice. *A*: Systolic blood pressure (SBP) in the WT and VSMC-hEP4 Tg mice at basal condition. *B–D*: SBP (*B*) and net change of SBP (*C* and *D*) in the WT and VSMC-hEP4 Tg mice under low salt diet (LSD, yellow period), normal diet (ND, green period) and high salt diet (HSD, red period). Data are presented as mean \pm SEM, $n = 6$, *** $P < 0.001$ vs WT. Two-tailed Student's *t* tests were used.

果提示 EP4 可抑制 Ang II 的缩血管作用。

2.4 EP4特异性激动剂显著降低小鼠血压

为了进一步验证 EP4 激动剂是否降低血压, 本研究使用插管法测量小鼠血压, 观察 EP4 特异性激动剂 CAY10580 和 CAY10598 是否能够降低小鼠血压。结果显示, 颈静脉注射 CAY10580 后, 小鼠血压在 30 s 内下降约 30 mmHg, 但在 1 min 左右回到初始血压 (图 4A、B)。而注射 CAY10598 后, 小鼠血压同样在 30 s 内下降 30 mmHg, 但血压恢复时间较慢 (图 4C、D)。以上结果证明 EP4 激动剂能够降低小鼠血压, 但不同激动剂对小鼠的降压作用不同。

3 讨论

高血压是一种常见病、慢性病和多发病, 是引发心脑血管和肾脏损害的一个重要危险因素, 长期血压控制不良最终会导致心力衰竭、脑出血、肾功能衰竭、眼底病变等严重并发症, 严重影响健康, 甚至威胁生命^[1,2]。PGE₂ 是花生四烯酸通过 COX

和 PGE 合酶的催化作用合成, 是一种主要存在于肾脏和血管系统中的前列腺素^[15], 在血压调控中发挥重要作用^[8]。针对 PGE₂ 四种受体在血压调控中的研究多为基于使用特异性的激动剂或拮抗剂进行的药理学研究以及使用全身敲除小鼠进行的系统性研究^[5-7]。上述手段在提供 PGE₂ 四种受体与血压调控关系方面发挥了重要作用, 但也具有一定的局限性, 因为血压的调控受到包括血容量、心输出量、血管张力等多种因素的影响^[16,17]。因此, 利用组织或细胞特异性敲除小鼠将可能揭示某个器官、某个组织, 甚至某种特定细胞中 PGE₂ 四种受体在血压调控中的作用。我们前期的研究结果显示, 血管内皮细胞 EP4 和血管平滑肌细胞 EP4 受体特异性敲除后均导致小鼠血压升高, 但各自的机制不同; 血管平滑肌细胞 EP4 敲除是通过增加 Ang II 诱导的细胞内钙离子水平而导致血管收缩增强, 最后表现为血压升高; 而血管内皮细胞 EP4 缺陷则通过抑制 AMPK、阻断 eNOS 177 位点丝氨酸磷酸化, 进而减少一氧化氮的生成, 从而导致血压的升高。尽

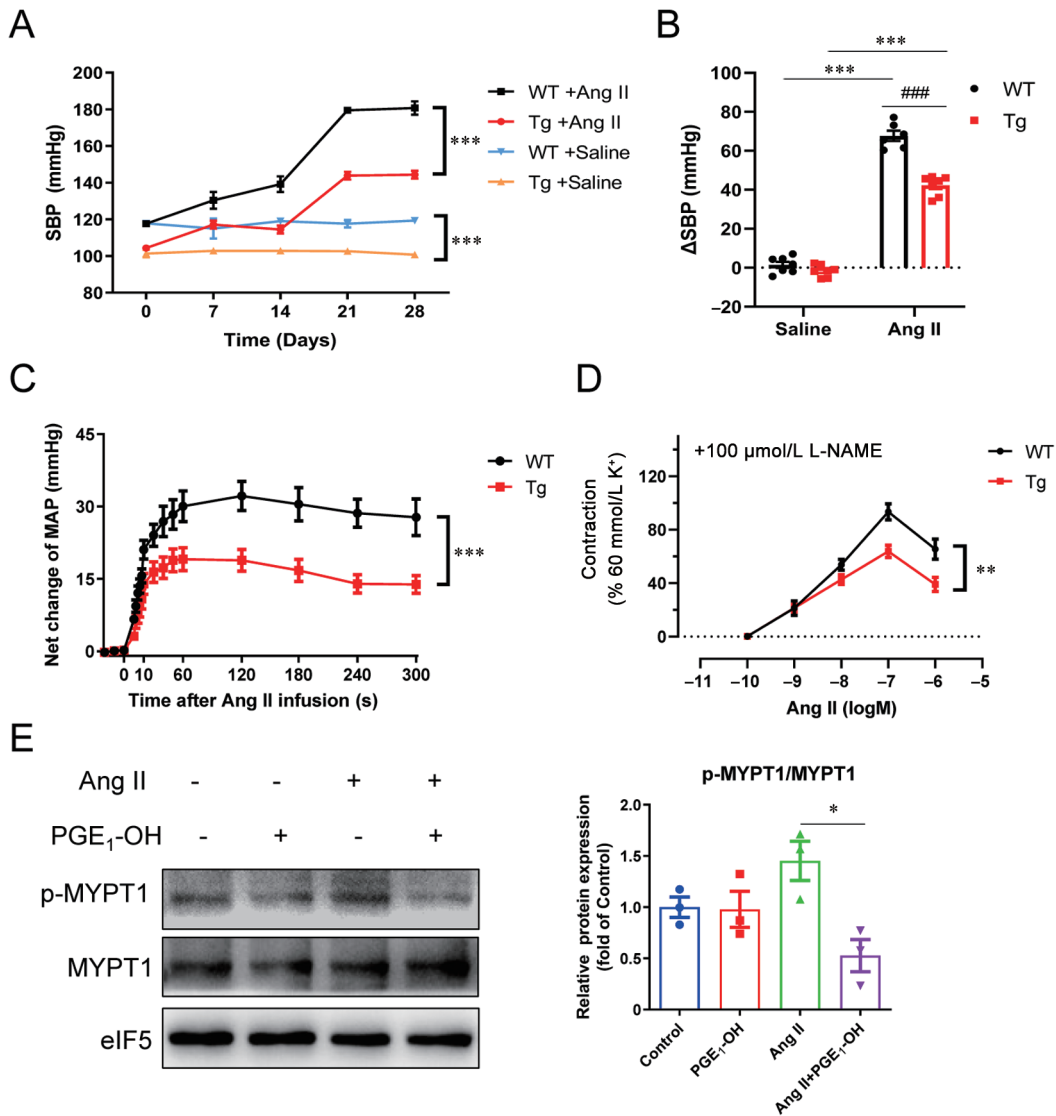


图 3. 血管平滑肌细胞过表达人EP4改善Ang II诱导的高血压

Fig. 3. Overexpression of human EP4 in VSMC improved Ang II-induced hypertension. *A* and *B*: SBP in the WT and VSMC-hEP4 Tg mice under saline or Ang II chronic infusion (*A*), and the net changes of SBP (Δ SBP) after 28 days of treatment were calculated (*B*). The blood pressure was measured by tail cuff every week. *C*: Net changes of mean atrial blood pressure (MAP) in the WT and VSMC-hEP4 Tg mice upon Ang II (100 pmol/kg/min) intravenous infusion. MAP was measured by carotid arterial catheterization. *D*: Ang II-induced vasoconstriction of mesenteric arterial rings from WT and VSMC-hEP4 Tg mice. The rings were pretreated with *N*^o-nitro-*L*-arginine methyl ester (*L*-NAME, 100 μ mol/L) and then challenged with various doses of Ang II. *E*: Western blot results of p-MYPT1 and MYPT1, with eIF5 as internal control. The relative protein level was analyzed using ImageJ software. Data are presented as mean \pm SEM, $n = 6-7$ (*A* and *B*), $n = 7-9$ (*C*), $n = 4$ (*D*), $n = 3$ (*E*), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, #### $P < 0.001$. Two-way ANOVA tests for *A-D*. One-way ANOVA tests for *E*.

管有可信的证据支持血管平滑肌 EP4 缺陷与高血压发生的关系^[3, 14], 但血管平滑肌细胞过表达 EP4 后是否可以降低血压仍缺乏直接的证据。因此, 本研究旨在利用 VSMC-hEP4 Tg 小鼠提供血管平滑肌细胞 EP4 激活或高表达能够降低小鼠血压的证据。

盐敏感性高血压是高盐摄入所引起的高血压,

我国北方地区人群以高盐饮食为主, 原发性高血压患者中超过一半为盐敏感者, 而血压正常人群中约三分之一是盐敏感者^[18]。长期以来, 盐敏感性高血压的发生机制尚不甚清楚, 多种因素参与了盐敏感高血压的发生; 其中, 肾脏水钠潴留是被广泛接受的解释^[19]。本研究结果显示, VSMC-hEP4 Tg 小鼠

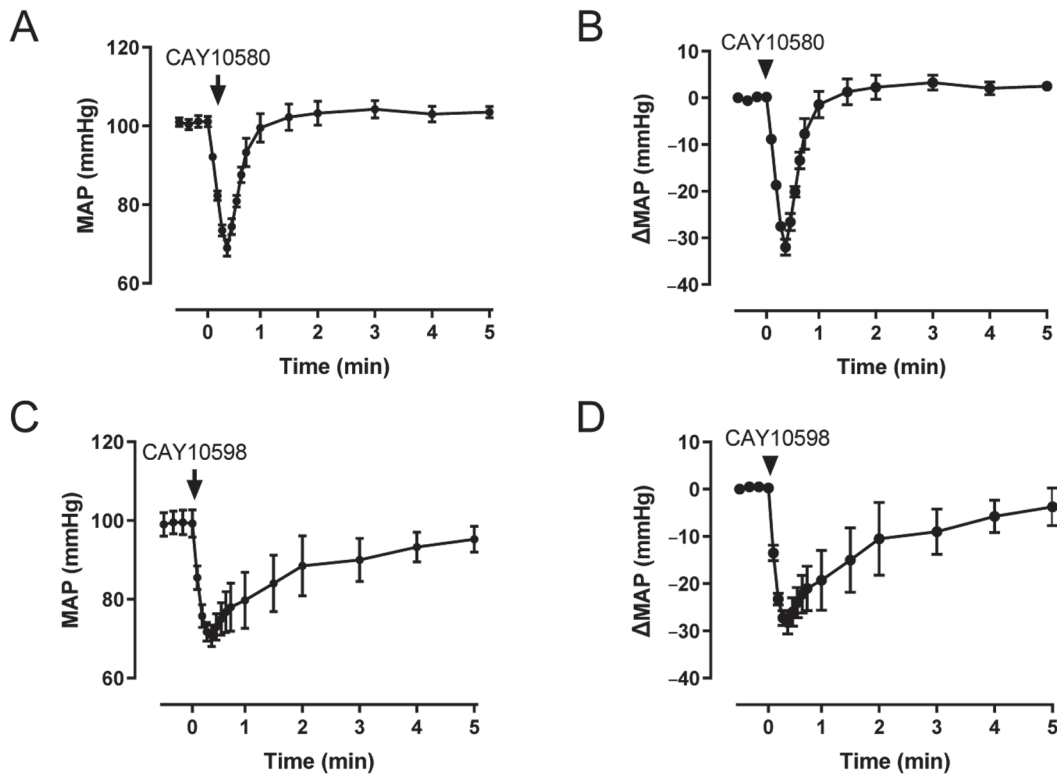


图 4. EP4特异性激动剂降低小鼠血压

Fig. 4. Administration of the EP4 agonists decreases mean atrial blood pressure (MAP) in mice. *A* and *B*: Changes and net changes of MAP in mice after intravenous injection of CAY10580 (0.5 mg/kg). *C* and *D*: Changes and net changes of MAP in mice after intravenous injection of CAY10598 (0.5 mg/kg). The MAP was measured by carotid arterial catheterization. Data are presented as mean \pm SEM, $n = 4$.

高盐饮食后饮水量和尿量没有改变(高盐饮食后, WT与VSMC-hEP Tg小鼠饮水量为: 10.66 ± 0.44 vs 9.90 ± 0.14 , $P = 0.16$; 尿量为: 5.913 ± 0.153 vs 5.593 ± 0.429 , $P = 0.536$, $n = 6$), 但VSMC-hEP4 Tg小鼠对低盐饮食及高盐饮食引起的血压反应较WT小鼠显著下降, 提示血管平滑肌中EP4受体表达或功能缺陷可能与盐敏感性高血压的发生和发展有关。此外, 我们的研究也显示, 在给予醛固酮注射造成的小鼠高血压模型中, 其血管EP4的表达明显下调(待发表); 而该模型的高血压发生主要与水钠潴留有关, 进一步支持血管平滑肌细胞EP4表达或/和功能异常与盐敏感性高血压的发生有关。

Ang II诱导的高血压模型是被广泛采用的高血压模型^[20]。我们前期的研究显示, VSMC特异性敲除EP4受体可加剧Ang II缓释诱导的血压升高^[3]。本研究中, 我们利用VSMC特异性过表达人EP4受体的小鼠得到了相反的结果, 即VSMC-hEP4 Tg小鼠血压显著低于WT小鼠, 且Ang II缓释诱导的血压升高幅度较WT小鼠明显减少。同时, 利用颈

动脉插管法进一步证明, Ang II诱导的瞬时血压升高幅度在VSMC-hEP4 Tg小鼠中也显著降低。上述结果表明, 血管平滑肌细胞EP4受体的过表达可显著改善Ang II诱导的升压反应和高血压。

之前的研究显示, 来自VSMC-EP4^{-/-}小鼠的肠系膜动脉对Ang II诱导的血管收缩反应强于对照小鼠; 进一步利用细胞的研究显示, EP4受体拮抗剂能够增加Ang II诱导的平滑肌细胞内钙离子浓度^[3]。MYPT1 Thr696和Thr853位点的磷酸化能够抑制肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin-light-chain phosphatase, MLCP)的活性, 从而增加Ca²⁺的敏感性, 促进平滑肌细胞收缩^[21], Ang II处理后MYPT1 Thr696位点的磷酸化增加^[22]。本研究结果显示, EP4激动剂PGE₁-OH能够显著抑制Ang II介导的MYPT1 Thr696位点的磷酸化, 进一步证实了EP4对Ang II作用的负调节作用。然而, 同样作为G蛋白耦联受体, EP4受体与Ang II受体AT1之间是否存在相互作用, 还有待进一步研究。

我们前期的研究已证实血管内皮细胞EP4对血

压调控的重要作用, 血管内皮细胞过表达 EP4 受体可通过促进 NO 的产生降低血压^[14]。因此, 尽管机制不同, 但血管内皮细胞 EP4 和血管平滑肌细胞 EP4 都具有降低血压的作用, 这为使用 EP4 激动剂降低高血压患者的血压水平提供了直接的依据。事实上, 本研究也发现两种不同的 EP4 激动剂都能够明显降低小鼠的血压, 然而究竟是内皮细胞 EP4 的作用更强还是平滑肌细胞 EP4 起主要作用, 还需要进一步研究。此外, 两种 EP4 激动剂的降压效果不尽相同, CAY10598 的降压效果较 CAY10580 的效果维持更长时间, 可能有如下几方面的原因: (1) 两种激动剂与 EP4 的亲合力不一样, CAY10580 的 K_i 值为 35 nmol/L, CAY10598 的 K_i 值为 1.2 nmol/L。因此, 注射相同剂量的药物, CAY10598 的作用可能更加持久; (2) 两种激动剂在体内的降解速率可能不一样, 但需要进一步的研究和证实; (3) 两种激动剂的特异性不一样, CAY10580 与 EP1、EP2 和 EP3 的 K_i 值分别为 3 000 nmol/L、2 000 nmol/L 和大于 3 000 nmol/L, 而 CAY10598 与 EP1、EP2 和 EP3 的 K_i 值均大于 13 000 nmol/L, 因此也可能造成两种激动剂降压效果的差异^[23]。

综上所述, 本研究发现血管平滑肌细胞 EP4 过表达能够有效降低小鼠基础血压, 并明显减轻高盐和 Ang II 介导的高血压水平, 这一发现提示 EP4 有可能为潜在的高血压防治药物研发的靶点。

参考文献

- Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE Jr, Collins KJ, Dennison Himmelfarb C, DePalma SM, Gidding S, Jamerson KA, Jones DW, MacLaughlin EJ, Muntner P, Ovbigele B, Smith SC Jr, Spencer CC, Stafford RS, Taler SJ, Thomas RJ, Williams KA Sr, Williamson JD, Wright JT Jr. 2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ASPC/NMA/PCNA Guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Clinical Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2018; 71(19): e127–e248.
- China Hypertension Prevention and treatment guidelines revision Committee (中国高血压防治指南修订委员会), Hypertension Alliance (China), Cardiovascular Branch of Chinese Medical Association, Hypertension Professional Committee of Chinese Physicians Association, Hypertension Branch of China Association for the Promotion of International Communication of Health Care, Hypertension Branch of Chinese Geriatrics Association. Guidelines for the prevention and treatment of hypertension in China (revised in 2018). *Chin J Cardiovasc* (中国心血管杂志) 2019; 24(1): 24–56 (in Chinese).
- Xu H, Du S, Fang B, Li C, Jia X, Zheng S, Wang S, Li Q, Su W, Wang N, Zheng F, Chen L, Zhang X, Gustafsson JA, Guan Y. VSMC-specific EP4 deletion exacerbates angiotensin II-induced aortic dissection by increasing vascular inflammation and blood pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019; 116(17): 8457–8462.
- Sugimoto Y, Narumiya S. Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 2007; 282(16): 11613–11617.
- Chen L, Miao Y, Zhang Y, Dou D, Liu L, Tian X, Yang G, Pu D, Zhang X, Kang J, Gao Y, Wang S, Breyer MD, Wang N, Zhu Y, Huang Y, Breyer RM, Guan Y. Inactivation of the E-prostanoid 3 receptor attenuates the angiotensin II pressor response via decreasing arterial contractility. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32(12): 3024–3032.
- Kennedy CR, Zhang Y, Brandon S, Guan Y, Coffee K, Funk CD, Magnuson MA, Oates JA, Breyer MD, Breyer RM. Salt-sensitive hypertension and reduced fertility in mice lacking the prostaglandin EP2 receptor. *Nat Med* 1999; 5(2): 217–220.
- Guan Y, Zhang Y, Wu J, Qi Z, Yang G, Dou D, Gao Y, Chen L, Zhang X, Davis LS, Wei M, Fan X, Carosino M, Hao C, Imig JD, Breyer RM, Breyer MD. Antihypertensive effects of selective prostaglandin E2 receptor subtype 1 targeting. *J Clin Invest* 2007; 117(9): 2496–2505.
- Zhang Y, Guan Y, Schneider A, Brandon S, Breyer RM, Breyer MD. Characterization of murine vasopressor and vasodepressor prostaglandin E₂ receptors. *Hypertension* 2000; 35(5): 1129–1134.
- Bartlett CS, Boyd KL, Harris RC, Zent R, Breyer RM. EP1 disruption attenuates end-organ damage in a mouse model of hypertension. *Hypertension* 2012; 60(5): 1184–1191.
- Rutkai I, Feher A, Erdei N, Henrion D, Papp Z, Edes I, Koller A, Kaley G, Bagi Z. Activation of prostaglandin E2 EP1 receptor increases arteriolar tone and blood pressure in mice with type 2 diabetes. *Cardiovasc Res* 2009; 83(1): 148–154.
- Tilley SL, Audoly LP, Hicks EH, Kim HS, Flannery PJ, Coffman TM, Koller BH. Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *J Clin Invest* 1999; 103(11): 1539–1545.
- Kraemer MP, Choi H, Reese J, Lamb FS, Breyer RM. Regulation of arterial reactivity by concurrent signaling through the E-prostanoid receptor 3 and angiotensin receptor 1. *Vascul Pharmacol* 2016; 84: 47–54.
- Herrera M, Yang T, Sparks MA, Manning MW, Koller BH,

- Coffman TM. Complex role for E-prostanoid 4 receptors in hypertension. *J Am Heart Assoc* 2019; 8(4): e010745.
- 14 Xu H, Fang B, Du S, Wang S, Li Q, Jia X, Bao C, Ye L, Sui X, Qian L, Luan Z, Yang G, Zheng F, Wang N, Chen L, Zhang X, Guan Y. Endothelial cell prostaglandin E2 receptor EP4 is essential for blood pressure homeostasis. *JCI Insight* 2020; 5(13): e138505.
- 15 Qi Z, Cai H, Morrow JD, Breyer MD. Differentiation of cyclooxygenase 1- and 2-derived prostanoids in mouse kidney and aorta. *Hypertension* 2006; 48(2): 323–328.
- 16 van Thiel BS, van der Pluijm I, te Riet L, Essers J, Danser AH. The renin-angiotensin system and its involvement in vascular disease. *Eur J Pharmacol* 2015; 763(Pt A): 3–14.
- 17 Magder S. The meaning of blood pressure. *Crit Care* 2018; 22(1): 257.
- 18 Mou JJ (牟建军), Chu C. Research progress and prospect of salt-sensitive hypertension. *Chin J Hypertension (中华高血压杂志)* 2016; 24(8): 706–708 (in Chinese).
- 19 Pavlov TS, Staruschenko A. Involvement of ENaC in the development of salt-sensitive hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017; 313(2): F135–F140.
- 20 Lerman LO, Kurtz TW, Touyz RM, Ellison DH, Chade AR, Crowley SD, Mattson DL, Mullins JJ, Osborn J, Eirin A, Reckelhoff JF, Iadecola C, Coffman TM. Animal models of hypertension: a scientific statement from the American Heart Association. *Hypertension* 2019; 73(6): e87–e120.
- 21 Tsai MH, Chang AN, Huang J, He W, Sweeney HL, Zhu M, Kamm KE, Stull JT. Constitutive phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit-1 in smooth muscle. *J Physiol* 2014; 592(14): 3031–3051.
- 22 Chiu WC, Juang JM, Chang SN, Wu CK, Tsai CT, Tseng YZ, Chiang FT. Angiotensin II regulates the LARG/RhoA/MYPT1 axis in rat vascular smooth muscle *in vitro*. *Acta Pharmacol Sin* 2012; 33(12): 1502–1510.
- 23 Billot X, Chateauneuf A, Chauret N, Denis D, Greig G, Mathieu MC, Metters KM, Slipetz DM, Young RN. Discovery of a potent and selective agonist of the prostaglandin EP4 receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13(6): 1129–1132.