

降钙素基因相关肽转基因小鼠的建立及血压动态分析

鲍 丹,董 伟,张 旭,刘 宁,高 珊,张海涛,高 翔,葛文平,吕 丹

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 建立降钙素基因相关肽 α (calcitonin gene-related peptide, CGRP α) 和 β (CGRP β) 转基因小鼠,并对其血压进行动态对比分析,建立可用于高血压研究的动物模型。**方法** 把人 CGRP α 和 CGRP β 基因分别插入鸡 β -肌动蛋白启动子下游,构建转基因表达载体,显微注射法建立 C57BL/6J CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠,PCR 鉴定转基因小鼠基因型。采用 Western Blot 鉴定 CGRP α 和 CGRP β 在心脏、肺、肾脏和肝脏组织中的表达,筛选高表达转基因品系。用无创血压测量仪分析转基因小鼠动态血压变化。**结果** 建立了在心脏、肺、肾脏和肝脏组织中均高表达 CGRP α 基因的 CGRP α 转基因小鼠;在肺和肝脏组织中高表达 CGRP β 基因的 CGRP β 转基因小鼠。CGRP α 转基因小鼠血压正常,CGRP β 转基因小鼠在 12 月龄时表现出显著的血压降低。**结论** CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠可作为用于 CGRP 对外周血管阻力和高血压抵抗机制研究的动物模型。

【关键词】 CGRP;转基因;外周血管阻力;高血压抵抗

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 10-0011-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 003

Establishment and dynamic analysis of blood pressure in calcitonin gene-related peptide transgenic mice

BAO Dan, DONG Wei, ZHANG Xu, LIU Ning, GAO Shan, ZHANG Hai-tao, GAO Xiang, GE Wen-ping, LV Dan
(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences Comparative Medicine Center,
Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine,
Peaking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish calcitonin gene-related peptide α (CGRP α) and β (CGRP β) transgenic mice and analyze dynamic changes of blood pressure using this transgenic mouse model in hypertension research. **Methods** The transgenic vector was constructed by inserting the human CGRP α and CGRP β gene into the down stream of chicken β -actin promoter, respectively. The transgenic mice were created by microinjection. The genotype of transgenic line was identified by PCR and the expression level of target gene was determined by Western blot. Dynamic changes of blood pressure was measured by noninvasive blood pressure meter. **Results** One line of human CGRP α C57BL/6J transgenic mice with high levels of CGRP α expression in the heart, lung, kidney and liver tissues was established. One line of human CGRP β C57BL/6J transgenic mice with high levels of CGRP β expression in the lung and liver tissues was established. Mice overexpressing the human CGRP α were normotensive, whereas mice overexpressing the human CGRP β were hypotensive at 12 months of age. **Conclusions** CGRP α and CGRP β transgenic mice may serve as an animal model for the

[基金项目] 国家自然科学基金(31301932)。

[作者简介] 鲍丹(1987-),女,本科,心脏病和高血压动物模型的制备与分析。

[通讯作者] 吕丹(1980-),女,副研究员,心脏病及高血压相关动物模型建立及相关调节基因功能分析。

mechanism research on the roles of CGRP on peripheral vascular resistance and hypertension resistance.

【Key words】 CGRP; Transgene; Peripheral vascular resistance; Hypertension resistance

动脉血压的形成有赖于循环系统内足够的血液充盈、心脏射血和外周阻力三种因素的相互作用。影响动脉血压的因素包括每搏输出量、心率、外周阻力、大动脉管壁的弹性和循环血量与血管系统容量的比例,其中,外周阻力增大是慢性高血压患者血压升高的原因之一^[1-3]。外周血管阻力主要受交感神经肾上腺素能神经和非肾上腺素能非胆碱能(nonadrenergic noncholinergic, NANC)血管扩张神经共同调控^[4-5]。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)是一种主要的 NANC 血管扩张神经的神经递质^[6],在神经内分泌细胞、感觉 C 纤维^[7]、肺的淋巴组织^[8]、心脏和血管^[9]中表达。自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)和高血压患者体内 CGRP 水平显著降低^[10-11]。研究发现,CGRP 对心血管系统具有保护作用,如抗高血压、抗血小板聚集和抗缺血-再灌注损伤等^[12-14]。哺乳动物的 CGRP 有 CGRP α 和 CGRP β 两个亚型,分别由同一个染色体上的两个独立的基因编码,两个亚型的第 3、22 和 25 位上的氨基酸序列不同,但二者的生物学功能相似^[15-17]。研究证实,CGRP α 基因敲除小鼠平均动脉血压(mean arterial pressure, MBP)显著升高^[18]。在日本人群中,CGRP α 是原发性高血压的易感基因^[19]。

基于上述研究结果,本研究拟通过建立 CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠,并对其血压进行动态分析,为研究 CGRP 与高血压发病机制的关系提供动物模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

C57BL/6J 小鼠和 ICR 小鼠均购自北京市维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠由本实验室制作。本实验所用动物均在屏障设施的饲养间【SYXK(京)2009-0003】饲养,饲养间温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 12:12 h 明/暗灯照,动物自由饮水和摄食。实验中涉及动物操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准(ILAS-GC-2012-001)。

1.1.2 主要试剂及仪器

限制性内切酶以及 PCR 相关试剂均购自中国宝生物工程有限公司。PCR 引物由中国上海英俊生物技术有限公司合成。NC 膜购自 Millipore 公司。鼠抗 CGRP α 和 CGRP β 抗体均购自德国 Abnova 公司。HRP-偶联的羊抗鼠抗体和 HRP-偶联的 GAPDH 单克隆抗体均购自中国康成生物公司。BP-98A 智能无创血压计购自日本 SoftronTM 公司。普通维持饲料购自中国军事科学院。

1.2 方法

1.2.1 CGRP α 和 CGRP β 表达载体的构建及转基因

以 pCR4-TOPO-h-CGRP α 质粒(GE healthcare, 美国, Clone ID 7939598)为模板,用 PCR 法扩增人 CGRP α 全长 cDNA,上游引物为:5' CCCTCGAGCAGAGAGGTCATGGGCTTC,下游引物为:5' CGGAATTCGAAAGGGAGGAGTTTGTAGTTGGC。反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,62 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s,重复变性到延伸 29 次,完成 30 个循环。目的基因人 CGRP α 片段为 452 bp。将扩增片段插入 pMD18T 载体,经测序并比对正确后,以 Xho I 和 EcoR I 酶切回收 CGRP α 片段,并克隆入 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子下游构建全身表达人 CGRP α 表达载体。提取并酶切鉴定质粒正确后,再用 Pvu II 将其线性化,Sephadex G50 柱纯化 DNA 片段,获得 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动的人 CGRP α 基因的转基因片段,注射前将转基因片段浓度调整至 5 ng/ μL ,用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,用 ICR 小鼠作假孕受体,制备转基因小鼠。

以 pDNR-LIB-h-CGRP β 质粒(GE healthcare, 美国, Clone ID 4287225)为模板,用 PCR 法扩增人 CGRP β 全长 cDNA,上游引物为:5' CCCTCGAGAGAGCGGCATGGGTTTC,下游引物为:5' CGGAATTCGTCATTCATCTGCTCAGGCTTG。反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min,94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,62 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s,重复变性到延伸 29 次,完成 30 个循环。目的基因人 CGRP β 片段为 406 bp。将扩增片段插入 pMD18T 载体,经测序并比对正确后,以 Xho I 和 EcoR I 酶切回收 CGRP β 片段,并克隆入 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子下游构建全身表达人 CGRP β 表达载体。提取并酶切鉴定质粒正确

后,再用 Pvu II 将其线性化, Sephadex G50 柱纯化 DNA 片段,获得 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动的人 CGRP β 基因的转基因片段,注射前将转基因片段浓度调整至 5 ng/ μ L,用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,用 ICR 小鼠作假孕受体,制备转基因小鼠。

1.2.2 PCR 鉴定 CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠的基因型

转基因小鼠在出生后 9~14 d 用剪趾法标记,收集剪下的组织,用碱裂解法提取基因组 DNA,用 PCR 法对转基因小鼠进行基因型检测。CGRP α 上游引物为:5' CTCTCAGCATCTTGCTCCTG,下游引物为:5' GGTCTCTCTCCAAGTCGCT;CGRP β 上游引物为:5' ATGGGTTTCCGGAAGTTCT,下游引物为:5' AGGCTTGAAGTCCCTGC。PCR 反应体系为 20 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,重复变性到延伸 29 次,完成 30 个循环。目的基因 CGRP α 片段为 357 bp,目的基因 CGRP β 片段为 384 bp。

1.2.3 Western blot 鉴定 CGRP α 和 CGRP β 蛋白的表达

提取首建鼠仔代阳性转基因小鼠和同窝转基因阴性(non-transgenic, NTG)小鼠心脏、肺、肾脏和肝脏组织总蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,蛋白转移至 NC 膜上,置于 5% 脱脂奶粉中封闭,鼠抗 CGRP α 和 CGRP β 抗体检测鼠源 CGRP α 和 CGRP β 以及转入的人源 CGRP α 和 CGRP β 蛋白的表达水平,HRP-偶联的羊抗鼠抗体结合一抗,HRP-偶联的 GAPDH 单克隆抗体作为内参。用 Image J 分析软件测定 Western Blot 条带灰度。

1.2.4 智能无创血压计测量 CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠血压

将待测小鼠提前半小时放入血压测量实验室,让小鼠适应测试环境。按智能无创血压计说明书^[20]和 Steven E.^[21]报道的方法于 2、4、8 和 12 月龄进行小鼠尾部血压测量。

1.2.5 统计分析

实验数据以 Mean $\pm$ S. E. M. 表示,用 one-way ANOVA 分析处理数据, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 CGRP α 转基因小鼠的建立

测序结果表明 PCR 法克隆的片段同已报道人

组织 CGRP α 序列完全一致 (GeneBank: BC093753.1),将人 CGRP α 基因插入 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子下游,构建得到人 CGRP α 转基因表达载体(图 1A)并用显微注射法制备转基因小鼠。提取小鼠基因组 DNA,用 PCR 法扩增 357 bp 的 CGRP α 基因目的片段,鉴定小鼠基因型(图 1B)。提取小鼠心脏、肺、肾脏和肝脏组织总蛋白,用 CGRP α 抗体进行 Western Blot 分析,确定转基因小鼠 CGRP α 的高表达(图 1C)。Image J 软件分析条带灰度,定量分析 CGRP α 蛋白表达量(图 1D)。通过分别比较 NTG 和转基因小鼠中 CGRP α 表达水平,筛选到在心脏、肺、肾脏和肝脏组织中都高表达 CGRP α 基因的转基因小鼠品系。

2.2 CGRP β 转基因小鼠的建立

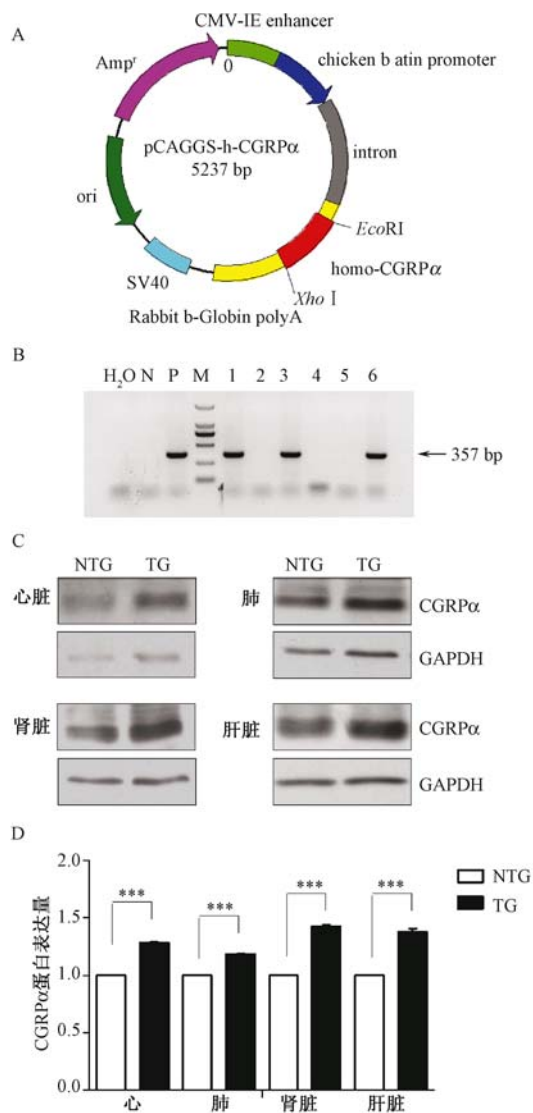
测序结果表明 PCR 法克隆的片段同已报道人组织 CGRP β 序列完全一致 (GeneBank: BC008428.1),将人 CGRP β 基因插入 CMV 增强子/鸡 β -肌动蛋白启动子下游,构建得到人 CGRP β 转基因表达载体(图 2A)并用显微注射法制备转基因小鼠。提取小鼠基因组 DNA,用 PCR 法扩增 384 bp 的 CGRP β 基因目的片段,鉴定小鼠基因型(图 2B)。提取小鼠肺和肝脏组织总蛋白,用 CGRP β 抗体进行 Western Blot 分析,确定转基因小鼠 CGRP β 的高表达(图 2C)。Image J 软件分析条带灰度,定量分析 CGRP β 蛋白表达量(图 2D)。通过分别比较 NTG 和转基因小鼠中 CGRP β 表达水平,筛选到在肺和肝脏组织中都高表达 CGRP β 基因的转基因小鼠品系。

2.3 CGRP α 和 CGRP β 转基因小鼠血压动态对比分析

于 2、4、8 和 12 月龄对 NTG 和转基因阳性小鼠进行血压动态分析。结果显示,NTG 和转基因阳性小鼠 MBP [MBP = 舒张压 + 1/3 (收缩压 - 舒张压)]整体均呈现随着年龄的增长而逐渐升高的表型。与 NTG 小鼠(2、4、8 和 12 月龄样本量分别为 $n = 8, 9, 8$ 和 10)相比,CGRP α 转基因小鼠(2、4、8 和 12 月龄样本量分别为 $n = 7, 11, 8$ 和 14)并未出现明显的血压降低,CGRP β 转基因小鼠(2、4、8 和 12 月龄样本量分别为 $n = 7, 12, 8$ 和 11)在 12 月龄时 MBP 显著降低($P = 0.026$,图 3)。

3 讨论

高血压是严重危害人类健康的常见心血管病



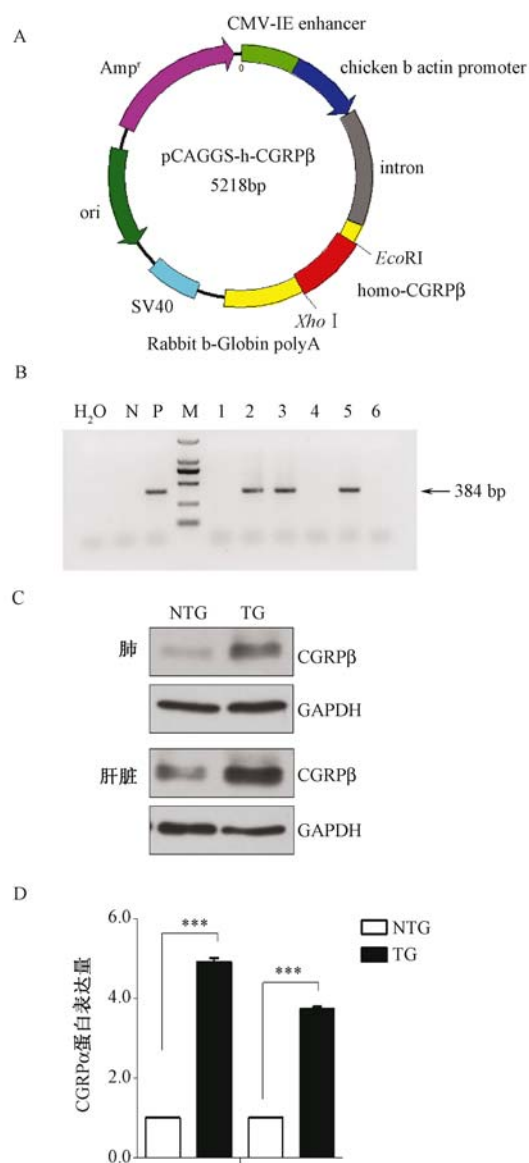
注:A. CGRP α 转基因表达载体的建立;B. PCR 鉴定 CGRP α 转基因小鼠基因型;C. Western Blot 分析 CGRP α 蛋白在转基因小鼠心脏、肺、肾脏和肝脏组织中的表达,GAPDH 为内参;D. CGRP α 蛋白表达的定量分析($n=3$ 次独立实验)。

图 1 CGRP α 转基因小鼠的建立

Note: A. Establishment of CGRP α transgenic vector; B. Genotyping of CGRP α transgenic mice by PCR; C. Expression level of CGRP α in the heart, lung, kidney and liver tissues of CGRP α transgenic mice by Western Blot; D. Quantitative analysis of the CGRP α expression level ($n=3$ independent experiment).

Fig. 1 Establishment of CGRP α transgenic mice

之一,目前全球高血压患者约有 10 亿,预计到 2025 年,全球的高血压患者人数可能会再增加 80%^[22]。此外,高血压还是脑卒中、心肌梗死等心血管疾病以及慢性肾脏疾病等最主要的危险因素。高血压已经成为威胁人类生命健康的重要的公共卫生问题,其防治具有重要的现实意义。



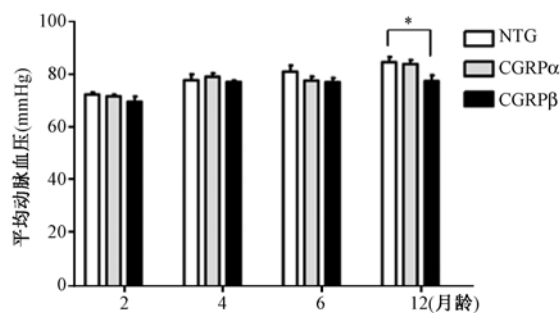
注:A. CGRP β 转基因表达载体的建立;B. PCR 鉴定 CGRP β 转基因小鼠基因型;C. Western Blot 分析 CGRP β 蛋白在转基因小鼠肺和肝脏组织中的表达,GAPDH 为内参;D. CGRP β 蛋白表达的定量分析($n=3$ 次独立实验)。

图 2 CGRP β 转基因小鼠的建立

Note: A. Establishment of CGRP β transgenic vector; B. Genotyping of CGRP β transgenic mice by PCR; C. Expression level of CGRP β in the lung and liver tissues of CGRP β transgenic mice by Western Blot; D. Quantitative analysis of the CGRP β expression level ($n=3$ independent experiment).

Fig. 2 Establishment of CGRP β transgenic mice

外周血管阻力的增大致使慢性高血压患者的血压持续升高^[3],外周阻力调控系统的功能障碍可能是慢性高血压的主要病因之一^[23]。研究发现,交感血管收缩神经的兴奋性增强是外周血管阻力增



注: * $P < 0.05$ 。

图3 CGRPα 和 CGRPβ 转基因小鼠血压动态对比分析

Note: * $P < 0.05$.

Fig.3 Contrastive analysis of dynamic changes of blood pressure in CGRPα and CGRPβ transgenic mice

大的一个重要因素^[24]。交感神经肾上腺素能神经通过释放神经递质—去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)调控外周血管阻力,一方面,NE可引起血管极度收缩,外周血管阻力增加,血压升高;另一方面,NE还可通过激活突触前 α_2 -肾上腺素能受体抑制CGRP包含神经释放具有血管扩张效应的CGRP^[25]。此外,与NE共定位于外周肾上腺素能神经的血管收缩神经肽-Y亦可抑制神经性的血管扩张和CGRP的释放^[26]。CGRP已被证实是一种强而有效的血管扩张神经肽^[27]。CGRP包含神经的功能障碍和CGRP的释放抑制增强了交感血管收缩神经的兴奋性,使得血压进一步升高。

本文建立了人CGRPα和CGRPβ转基因小鼠,并对其进行血压动态对比分析。结果发现,与NTG小鼠相比,CGRPα转基因小鼠血压正常,CGRPβ转基因小鼠在12月龄时出现平均动脉压的显著降低。研究发现,CGRPα是人甲状腺髓样癌的主要降钙素基因产物,而CGRPβ是人正常组织中的主要CGRP成分^[28];再者,CGRP对阻力血管的调控效应随着年龄的增长逐渐减弱^[4],外源性的CGRP能抑制CGRP包含神经的血管扩张效应^[29]。这可能是CGRPβ转基因小鼠仅在12月龄表现血压降低的原因。小月龄时,内源性CGRP的血管扩张效应足以维持外周阻力的平衡,外源性CGRP的效应被抑制,血压维持正常水平;随着年龄的增长,内源性CGRP对外周阻力的调控能力逐渐减弱,此时,外源性CGRP发挥血管扩张功能,CGRP转基因小鼠外周血管阻力减小,血压下降。此外,有研究报道,CGRPα基因敲除小鼠MBP显著升高^[18],而本文建立的人CGRPα转基因小鼠在未经病理刺激时血压表现正

常,推测,CGRPα转基因小鼠在给予压力负荷等病理刺激后,抵抗高血压的能力会显著增强。

尽管外周阻力调控系统中CGRP神经的功能抑制对高血压的维持和发展至关重要,但CGRP包含神经功能的减弱的潜在机制仍不清楚。近期研究发现,SHR肠系膜动脉中的血管紧张素II(angiotensin II, Ang II)可通过Ang II受体抑制CGRP包含神经的神经传导^[30],长期抑制肾素-血管紧张素系统可阻止或恢复CGRP包含神经的功能减弱和重构^[31]。

综上所述,CGRP与外周血管阻力的调控密切相关,本文建立的CGRPα和CGRPβ转基因小鼠为CGRP对外周血管阻力和病理刺激下的高血压抵抗机制的研究提供了理想的动物模型。

参考文献:

- [1] Mulvany, M. J. C. Aalkjaer, Structure and function of small arteries[J]. *Physiol Rev*, 1990. 70(4): 921-961.
- [2] Mulvany, M. J., Structure and function of small arteries in hypertension[J]. *J Hypertens Suppl*, 1990. 8(7): S225-232.
- [3] Zimmerman, B. G., Peripheral neurogenic factors in acute and chronic alterations of arterial pressure[J]. *Circ Res*, 1983. 53(2): 121-130.
- [4] Kawasaki, H., Regulation of vascular function by perivascular calcitonin gene-related peptide-containing nerves [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2002. 88(1): 39-43.
- [5] Kawasaki, H., C. Nuki, A. Saito, *et al.*, Role of calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the vascular adrenergic neurotransmission[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1990. 252(1): 403-409.
- [6] Kawasaki, H., K. Takasaki, A. Saito, *et al.*, Calcitonin gene-related peptide acts as a novel vasodilator neurotransmitter in mesenteric resistance vessels of the rat[J]. *Nature*, 1988. 335(6186): 164-167.
- [7] Goodman, E. C. and L. L. Iversen, Calcitonin gene-related peptide: novel neuropeptide[J]. *Life Sci*, 1986. 38(24): 2169-2178.
- [8] Komatsu, T., M. Yamamoto, K. Shimokata, *et al.*, Distribution of substance P-immunoreactive and calcitonin gene-related peptide-immunoreactive nerves in normal human lungs [J]. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 1991. 95(1): 23-28.
- [9] Mulderry, P. K., M. A. Ghatei, J. Rodrigo, *et al.*, Calcitonin gene-related peptide in cardiovascular tissues of the rat [J]. *Neuroscience*, 1985. 14(3): 947-954.
- [10] Kawasaki, H., Y. Nuki, N. Yamaga, *et al.*, Decreased depressor response mediated by calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing vasodilator nerves to spinal cord stimulation and levels of CGRP mRNA of the dorsal root ganglia in spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertens Res*, 2000. 23

- (6): 693–639.
- [11] Zhou, Z., J. Peng, C. J. Wang, *et al.*, Accelerated senescence of endothelial progenitor cells in hypertension is related to the reduction of calcitonin gene-related peptide [J]. *J Hypertens*, 2010. 28(5): 931–939.
- [12] Peng, J. and Y. J. Li, The vanilloid receptor TRPV1: role in cardiovascular and gastrointestinal protection [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010. 627(1–3): 1–7.
- [13] Zheng, L. R., J. Han, L. Yao, *et al.*, Up-regulation of calcitonin gene-related peptide protects streptozotocin-induced diabetic hearts from ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Cardiol*, 2012. 156(2): 192–198.
- [14] Li, D., J. Peng, H. Y. Xin, *et al.*, Calcitonin gene-related peptide-mediated antihypertensive and anti-platelet effects by rutaecarpine in spontaneously hypertensive rats [J]. *Peptides*, 2008. 29(10): 1781–1788.
- [15] Steenbergh, P. H., J. W. Hoppener, J. Zandberg, *et al.*, A second human calcitonin/CGRP gene [J]. *FEBS Lett*, 1985. 183(2): 403–407.
- [16] Schutz, B., D. Mauer, A. M. Salmon, *et al.*, Analysis of the cellular expression pattern of beta-CGRP in alpha-CGRP-deficient mice [J]. *J Comp Neurol*, 2004. 476(1): 32–43.
- [17] Wimalawansa, S. J., Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials [J]. *Endocr Rev*, 1996. 17(5): 533–585.
- [18] Gangula, P. R., H. Zhao, S. C. Supowit, *et al.*, Increased blood pressure in alpha-calcitonin gene-related peptide/calcitonin gene knockout mice [J]. *Hypertension*, 2000. 35(1 Pt 2): 470–475.
- [19] Morita, A., T. Nakayama, M. Soma, *et al.*, Association between the calcitonin-related peptide alpha (CALCA) gene and essential hypertension in Japanese subjects [J]. *Am J Hypertens*, 2007. 20(5): 527–532.
- [20] 鲍丹,董伟,刘宁,等, 三种突变 GRK4 转基因小鼠的血压动态分析 [J]. *中国实验动物学报*, 2013. 21(5): 26–31.
- [21] Whitesall, S. E., J. B. Hoff, A. P. Vollmer, *et al.*, Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004. 286(6): H2408–2415.
- [22] 高飞,高焱莎,我国高血压流行病学现状 [J]. *中日友好医院学报*, 2012. 26(5): 307–309.
- [23] Head, R. J., Hypertensive innervation: its relationship to functional and hyperplastic changes in the vasculature of the spontaneously hypertensive rat [J]. *Blood Vessels*, 1989. 26(1): 1–20.
- [24] Kawasaki, H., W. H. Cline, Jr., C. Su, Enhanced angiotensin-mediated facilitation of adrenergic neurotransmission in spontaneously hypertensive rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1982. 221(1): 112–116.
- [25] Kawasaki, H., C. Nuki, A. Saito, *et al.*, Adrenergic modulation of calcitonin gene-related peptide (CGRP)-containing nerve-mediated vasodilation in the rat mesenteric resistance vessel [J]. *Brain Res*, 1990. 506(2): 287–290.
- [26] Kawasaki, H., C. Nuki, A. Saito, *et al.*, NPY modulates neurotransmission of CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric arteries [J]. *Am J Physiol*, 1991. 261(3 Pt 2): H683–290.
- [27] Brain, S. D., T. J. Williams, J. R. Tippins, *et al.*, Calcitonin gene-related peptide is a potent vasodilator [J]. *Nature*, 1985. 313(5997): 54–56.
- [28] Petermann, J. B., W. Born, J. Y. Chang, *et al.*, Identification in the human central nervous system, pituitary, and thyroid of a novel calcitonin gene-related peptide, and partial amino acid sequence in the spinal cord [J]. *J Biol Chem*, 1987. 262(2): 542–545.
- [29] Nuki, C., H. Kawasaki, K. Takasaki, *et al.*, Pharmacological characterization of presynaptic calcitonin gene-related peptide (CGRP) receptors on CGRP-containing vasodilator nerves in rat mesenteric resistance vessels [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1994. 268(1): 59–64.
- [30] Kawasaki, H., M. Okazaki, A. Nakatsuma, *et al.*, Long-term treatment with angiotensin converting enzyme inhibitor restores reduced calcitonin gene-related peptide-containing vasodilator nerve function in mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1999. 79(2): 221–229.
- [31] Nakatsuma, A., H. Kawasaki, Y. Kurosaki, *et al.*, Effects of long-term treatment with calcium antagonists on periaarterial nerve function in the mesenteric artery of spontaneously hypertensive rats [J]. *Jpn J Pharmacol*, 2000. 84(2): 156–162.

[修回日期]2015-08-18