文章编号:1000-5404(2008)10-0897-03

论著

孕期母体炎症刺激对子代大鼠血压及学习记忆能力的影响

郝丽云,李晓辉 (第三军医大学药学院药剂学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨孕期母鼠的炎症免疫刺激对子代大鼠老年期的血压及学习记忆的影响。**方法** 24只孕鼠分别在孕期接受不同的处理,分为生理盐水对照组、内毒素(LPS)注射组、酵母多糖(Zym)注射组。子代大鼠出生后60周时,每组按随机数字表法选取8只,采用TNF-α ELISA试剂盒检测子鼠血清中炎症因子TNF-α的水平,用鼠尾动脉无创血压测定仪测量子鼠血压,通过Morris水迷宫实验检测其行为学变化,HE染色观察海马结构的病理改变。**结果** 孕鼠在孕期接受炎症免疫刺激后所生的子代大鼠在60周时,血清中TNF-α的水平、动脉血压值均明显升高,学习记忆能力下降,海马CA1区局部神经元排列紊乱、数量减少。**结论** 孕鼠孕期接受免疫炎症刺激可能是导致子代大鼠发生高血压和学习记忆能力降低的重要原因之一。

关键词:炎症;高血压;认知
中图法分类号:R338.64;R544.102;R715.5 **文献标识码**:A

Alternation of blood pressure and behavioral performance in rat offspring following maternal inflammation during pregnancy

HAO Li-yun, LI Xiao-hui (Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of prenatal inflammation on rat offspring's blood pressure and behavioral performance. Methods Twenty-four time-mated Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups, i.e. control, zymosan and LPS. On their gestation days 8, 10, 12, the pregnant rats received i.p. injections of sterile saline, 0.79 mg/kg zymosan or 0.79 mg/kg LPS respectively. When the offspring were sixty weeks old, eight pups were chosen randomly for the later study. Their serum TNF-α level was detected by ELISA using tail blood, arterial blood pressure was measured by tail-cuff method, and their behavioral performance was detected in Morris water maze test. At the end of the experiment, the brains were rapidly taken from the sacrificed offspring, cut into sections and stained with H&E method to investigate the structural changes of hippocampus. Results Compared with control group, all offspring from the inflammation groups showed increased serum level of TNF-α, increased systemic arterial blood pressure, long latency in finding the safe platform and decreased number of neurons in CA1 region of hippocampus. Conclusion Prenatal exposure to LPS or zymosan results in hypertension and disturbance of learning and memory.

Key words: inflammation; hypertension; behavior

随着全球范围内高血压患者患病率的持续上升和由此而引起的心脑血管病病死率的持续增加,高血压对人类健康的危险越来越受到重视,对高血压的研究也在不断深入。目前,关于高血压的发病机制仍在不断探索中,除遗传因素、饮食因素、精神社会心理压力以及神经内分泌机制外,许多大规模的临床流行病学调查结果提示炎症免疫机制在高血压的发生、发展及转归中可能扮演着极其重要的角色[1]。我们还注意到,在社会人口日益老龄化的今天,作为仅次于心血管疾病、癌症的第3位因素,严重影响人类健康和生活质量的Alzheimer病(AD),其患者脑内存在着大量与炎症反应有关的细胞因子如IL-6、TNF-α等,这些炎症因

基金项目:国家自然科学基金(30672641)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30672641)
作者简介:郝丽云,女,山西省长治市人,硕士研究生,主要从事心血管药理学方面的研究。电话:(023)68772240, E-mail:haoliyun58@163.com
通信作者:李晓辉,电话:(023)68753397,E-mail:xhl@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2008-01-15;**修回日期**:2008-03-05

子可能直接参与了 AD 脑内神经炎性病变及老年斑形成过程,因此有学者提出 AD 的神经退行性变可能是脑内免疫和炎症反应不适当激活所致[2,3]。鉴于此,我室通过脂多糖和酵母多糖两种炎症免疫反应诱导剂,诱导孕鼠产生炎症免疫反应后,成功的观察到其子代大鼠出生后血压升高、体质量增加和炎症反应性增高[4]。本实验在已建立的动物模型基础上,进一步观察孕期母体的炎症免疫因素对子代大鼠进入老年期后血清中炎症因子、血压、精神行为及脑部结构的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器

SD 孕鼠 24 只,体质量 250 ~ 320 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)和酵母多糖(Zymosan, Zym)购自美国 Sigma 公司,TNF-α ELISA 试剂盒购自 eBio 公司,大鼠尾动脉无创血压测量仪(DSWY-1)购自成都仪器厂。

1.2 实验分组及处理方法

24 只孕鼠分为生理盐水对照组、LPS 组、Zym 组 3 组,每组 8 只,在孕期的第 8、10、12 天腹腔注射(0.79 mg/kg)。在每组的子代出生后 60 周时按随机数字表法选取 8 只用做后续实验。

1.3 子代大鼠血清 TNF-α 水平检测

采用剪尾取血法,采集的血样室温放置 2 h,然后在室温下以 3 000 r/min 离心 30 min,分离血清,按照 TNF-α 试剂盒说明书操作,采用双抗夹心 ELISA 法检测血清中 TNF-α 的水平。

1.4 鼠尾无创血压测量

测量前,子代大鼠在 40 ℃条件下预热 10 min,放入固定装置中,将尾动脉无创测仪的尾部气囊和脉搏换能器一端依次套于子鼠尾部近心端,另一端通过生理四通道信号采集仪连于电脑,待收集信号稳定后,充气加压,直到脉搏信号成为 1 条直线,然后逐渐放气减压,待脉搏信号出现规则波形时,第 1 波同步所指示的压力值即为子鼠动脉收缩压。每只子鼠每隔 3 min 测 1 次,连续测 3 次,取其平均值。

1.5 行为学检测

采用 Morris 水迷宫法。训练包括:①定位航行实验:历时 6 d,为隐蔽平台获得实验,用于测量子鼠的学习和记忆能力。每天训练 4 次,每次间隔 30 min,通过影像跟踪系统记录实验过程子鼠寻找并爬上平台所需时间即逃避潜伏期。②空间搜索实验:第 7 天撤除平台,观察 120 s 内大鼠在原平台象限的停留时间。

1.6 病理形态学观察

行为学测试完成后,断头处死动物,迅速取出脑组织,放入冰冷的生理盐水中漂洗干净,置于 4% 甲醛溶液内固定,进行常规石蜡包埋、切片(厚度为 5 μm),HE 染色,光镜下观察海马区域细胞形态学的变化。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件分别对子鼠血压值、血清中 TNF-α 值和 Morris 结果进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 子代大鼠 60 周时血清中 TNF-α、动脉收缩压水平的变化

孕鼠孕期经过炎症免疫因素刺激后所生子鼠 60 周龄时血清中 TNF-α 的水平、收缩压水平较正常对照组明显升高($P < 0.05$),但两孕期炎症免疫刺激模型组之间差异无统计学意义($P < 0.05$,表 1)。

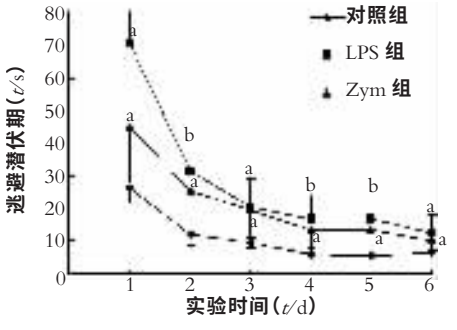
表 1 孕期炎症刺激对子代大鼠 60 周时血清中 TNF-α 水平和收缩压水平的影响($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α (pg/ml)	收缩压(mmHg)
对照组	137.75 ± 82.88	112.61 ± 8.58
LPS 组	794.00 ± 281.88[a]	134.37 ± 14.99[a]
Zym 组	537.75 ± 241.21[a]	142.44 ± 11.10[b]

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$,与对照组比较

2.2 子代大鼠 60 周时行为学检测

在定位航行实验中,两孕期炎症免疫刺激模型组子代大鼠和正常对照组子代大鼠的逃避潜伏期均随训练次数的增加而下降,但是模型组子代大鼠的平均逃避潜伏期在每个训练日均长于正常对照组子代大鼠($P < 0.05$,图 1)。在空间探索实验中,模型组子代大鼠 120 s 内在原平台象限停留的时间少于对照组子代大鼠($P < 0.05$)。两孕期炎症免疫刺激模型组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。



a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$,与对照组比较

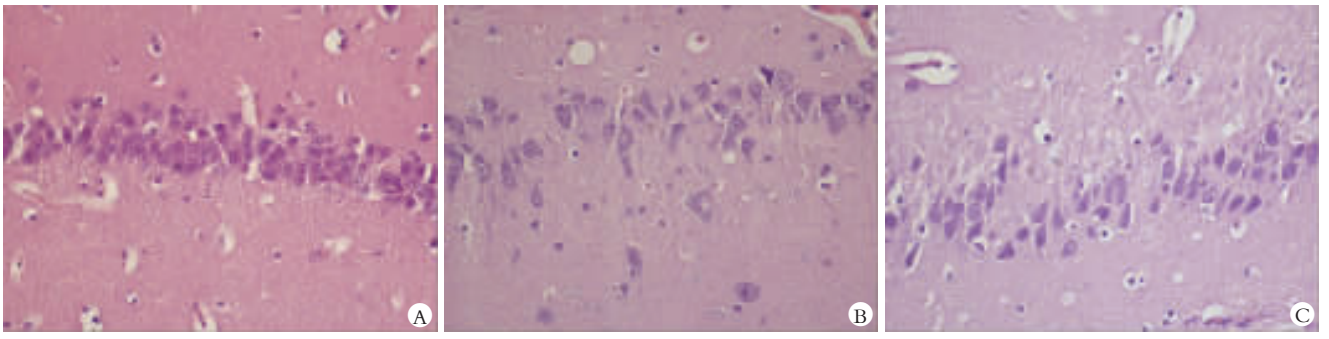
图 1 各组大鼠 Morris 水迷宫定位航行实验逃避潜伏期观察

2.3 脑组织病理学改变

各组子代大鼠 60 周龄时海马区脑组织细胞形态学变化见图 2。正常对照组可见海马 CA1 区神经元排列整齐、密集,形态正常;两孕期炎症免疫刺激模型组可见神经元排列紊乱,神经细胞数量减少。

3 讨论

心血管疾病是当今世界威胁人类最严重的疾病之一,高血压发病率日益增高,成为心血管疾病最主要的



A:对照组; B:LPS 组; C:Zym 组

图 2　各组子代大鼠 60 周时海马 CA1 区脑组织细胞形态学观察　(HE×200)

危险因素。AD 不仅严重影响老年人的生活质量,还是继肿瘤、心脑血管疾病后引起老年人病死率增高的第 3 大病因。对心血管和 AD 疾病的发生、发展学术界提出了很多学说,但是其根本病因至今未明,现有药物的治疗效果难以令人满意,因而探求病因对疾病的早期预防、及时治疗都有极其重要的意义。

近年来许多临床流行病学调查表明炎症在心血管疾病、神经元退行性疾病[5]过程中可能发挥着重要的作用。有研究观察了一些炎症因子如高敏感-C 反应蛋白(hs-CRP)[6]、IL-6[7]、前列腺素[8]等与疾病的关联,结果提示具有炎症因子高水平的人群发生上述疾病的概率明显升高。

为了探索炎症与高血压、认知行为降低之间存在的潜在联系,即究竟是炎症因子水平升高,机体的炎症免疫系统紊乱导致疾病的发生,还是在疾病发生的基础上,引发了炎症因子水平上升? 本实验室通过反复预实验和采用炎症免疫刺激剂内毒素脂多糖(LPS)和啤酒酵母真菌酵母多糖(zymosan),低剂量腹腔注射于孕鼠,使孕鼠腹腔注射刺激剂 1 h 后血清中炎症因子 TNF-α 水平较正常对照组明显升高,有效的激活母体的炎症免疫反应[4]。子代大鼠出生后血清中 TNF-α 水平无统计学差异,维持在正常水平。而给予腹腔注射 LPS 后 2、4、8 h 时孕期炎症免疫刺激模型组子代大鼠血清中 TNF-α 水平较正常对照组子代大鼠显著升高,表明孕期母体的炎症免疫反应使子代大鼠的炎症免疫系统处于一种易激活状态,这种状态与其血压升高、体质量增加密切相关。本实验成功的将母体孕期炎症和个体成年性疾病的发生发展联系起来,为进一步探索生命早期炎症在成年疾病中的作用提供了良好的基础[4]。本实验在此基础上进一步观察子代大鼠老年时血清中炎症因子水平、血压水平、学习记忆能力和脑组织形态结构的改变,结果显示孕鼠孕期暴露于炎症免疫刺激因素后所生子鼠在 60 周龄时,血清中炎症因子 TNF-α 的水平较正常对照组显著升高,这提示孕期母体的免疫炎症反应初始可导致子代大鼠处于一种炎症免疫易激发状态,随着年龄的增长和各种环境因素的影响,在没有明显的感染或自身免疫性疾病等典型促使炎症发生的情况下,转变为一种持续的、轻度的炎症状态。这种持续的炎症因子水平的升高又促进了子鼠血压的进一步升高并引起了其脑组织海马部结构发生改变,进而导致了学习记忆能力的下降,其具体的分子机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Engstrom G, Hedblad B, Janzon L, *et al*. Fatality of acute coronary events in relation to hypertension and low-grade inflammation: a population-based cohort study[J]. J Hum Hypertens, 2006, 20(8): 581 – 586.

[2] 肖淑萍, 吉中国. IL-6 与 Alzheimer 病研究进展[J]. 脑与神经疾病杂志, 2003, 11 (6): 380 – 381.

[3] 洪　亮, 杨文明. Alzheimer 病与前炎性因子[J]. 医学综述,2006, 12(10): 628 – 630.

[4] Wei Y L, Li X H, Zhou J Z. Prenatal exposure to lipopolysaccharide results in increases in blood pressure and body weight in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2007, 28 (5): 651 – 656.

[5] Blasko I, Grubeck-Loebenstein B. Role of the immune system in the pathogenesis, prevention and treatment of Alzheimer's disease[J]. Drugs Aging, 2003, 20(2): 101 – 113.

[6] Sesso H D, Buring J E, Rifai N, *et al*. C-reactive protein and the risk of developing hypertension[J]. JAMA, 2003, 290 (22): 2945 – 2951.

[7] Yaffe K, Lindquist K, Penninx B W, *et al*. Inflammatory markers and cognition in well-functioning African-American and white elders[J]. Neurology, 2003, 61 (1): 76 – 80.

[8] Teeling J L, Felton L M, Deacon R M, *et al*. Sub-pyrogenic systemic inflammation impacts on brain and behavior, independent of cytokines[J]. Brain Behav Immun, 2007, 21 (6): 836 – 850.

(编辑　王小寒)