文章编号:1000-5404(2009)07-0569-03

论著

孕期暴露于脂多糖对子代中年大鼠血管重构和血压的影响及其机制

苗 莹,唐 渊,李晓辉 (第三军医大学新药研究中心暨药剂学教研室,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨孕期炎症刺激对子代中年大鼠的血管重构及血压的影响。**方法** SD 孕鼠分 2 组:脂多糖(LPS)组在孕期第 8、10、12 天腹腔注射 LPS 0.79 mg/kg;对照组在同时期腹腔注射等体积生理盐水。子代大鼠出生后按随机数字表法分别选取 9 只,分做 2 组进行实验。子代大鼠第 35 周,取主动脉做病理切片后测量中层壁厚(MT)、管腔内径(LD),得 MT/LD 值,ELISA 法检测血管平滑肌细胞的 PCNA 表达量,硝酸还原酶法测血清一氧化氮(NO)浓度,放免法测血浆内皮素-1(ET-1)浓度,无创血压仪测量鼠尾动脉收缩压。**结果** 孕期暴露于 LPS 致子代大鼠主动脉 MT/LD 值明显增大,血管平滑肌细胞增殖,血浆 ET-1 明显升高,尾动脉收缩压明显增高。**结论** 孕期暴露于炎症刺激剂可导致子代中年大鼠血管重构,血管功能紊乱,血压升高。

关键词: 炎症;LPS;高血压;血管重构
中图法分类号: R361.2; R364.5; R714.144 **文献标识码:** A

Alteration of vascular remolding and blood pressure in rat offsprings following maternal exposure to LPS during pregnancy

MIAO Ying, TANG Yuan, LI Xiao-hui (Department of Pharmaceutics and Center for New Drugs Research, College of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of prenatal inflammation on vascular remolding and blood pressure in mid-aged rats. Methods Time-mated pregnant Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into 2 groups, received peritoneal injection of 0.79 mg/kg LPS on the gestation days 8, 10, and 12, or same volume of the sterile saline at the same time points. Nine pups were randomly selected from each group for the later experiments, and the offspring were named as LPS groups for those having prenatal LPS exposure and control group for those having not. Their blood pressure was determined with a rat tail non-invasive instrument by tail-cuff method from 6 weeks old to 35 weeks old, and then their aortas were taken out for media thickness (MT), diameter of lumen (LD), and the ratios of MT/LD. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) on the vessel was detected by ELISA. The serum level of NO and plasma endothelin-1 (ET-1) were measured by nitrate reductase and radioimmunoassay respectively. Results Compared with control group, LPS groups had significantly raised blood pressure, a significantly higher ratio of MT/LD, obviously increased expression of PCNA, and markedly elevated serum ET-1. Conclusion The offspring whose prenatal rats were exposured to LPS result in vascular remolding, vasofunctional disturbances and hypertension.

Key words: inflammation; LPS; hypertension; vascular remolding

原发性高血压(essential hypertension, EH)是最常见的心血管疾病,全球约有 25% 的人患有高血压,危害严重,并发症众多,如中风、心肌梗死、充血性心衰和肾脏衰竭等[1,2]。一项针对 20 525 例 45 岁以上健康女性的大规模临床流行病调查发现,大约 1/4 的女性发生高血压的同时血液中 C 反应蛋白(CRP)水平也升高了,提示炎症与 EH 的发生明显相关[3]。有研究报道 EH 的发生同个体生命早期所遭遇的环境、营

基金项目:国家自然科学基金(30672641);国家高技术研究发展计划(863 计划)(2007AA10Z356)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30672641) and the National High-tech R&D Program (863 Program, 2007AA10Z356)
作者简介:苗 莹,女,青海省西宁市人,硕士研究生,助教,主要从事心血管药理学方面的研究。电话:(023)68753397-83,E-mail: rabbitdoll_2001@163.com
通信作者:李晓辉,电话:(023)68753397-81,E-mail: xhl@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2008-10-20;修回日期:2008-11-03

养等改变存在着密切的关联[4,5]。因此,我室选取了2种炎症免疫刺激剂脂多糖(lipopolysaccharide ,LPS)和酵母多糖(zymosan),诱导孕鼠产生炎症免疫反应,成功的观察到子代大鼠出生后血压升高、体质量增加和炎症反应性增高[6,7]。本实验在已建立的动物模型基础上,进一步就血管结构与功能同高血压的关系展开讨论。

1 材料与方法

1.1 主要材料、试剂及仪器

SD孕鼠,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。LPS购自美国Sigma公司,NO试剂盒由南京建成生物工程有限公司生产, ET RIA kit由北京北方生物有限公司提供。抗PCNA抗体(Zymed公司产品ZM-0213,北京中杉金桥生物技术有限公司分装),抗体稀释液(博士德公司),羊抗鼠免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),DAB显色试剂盒(博士德公司),大鼠尾动脉无创血压测量仪(DSWY-1)购自成都仪器厂,DU7500紫外/可见光分光光度仪(美国Beckman公司),γ计数器(FJ-2003ps,西安核仪器厂)。

1.2 模型分组及处理方法

SD孕鼠分2组:①LPS组,在孕期第8、10、12天腹腔注射LPS 0.79 mg/kg;②对照组,在同时期腹腔注射同体积生理盐水。每组9只。子代大鼠出生后按随机数字表法分别选取9只分做2组进行实验,同为LPS组和对照组。

1.3 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仔鼠尾部近心端,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仔鼠动脉收缩压。每只仔鼠每隔3 min测1次,连续测3次,取其平均值。

1.4 主动脉MT/LD值的测量

子代大鼠35周时,10%戊巴比妥钠溶液40 mg/kg腹腔内注射麻醉,取出胸主动脉,放于4%多聚甲醛固定,经过脱水、透明、浸蜡、包埋与切片,用HE染色,在光镜下观察、摄片,用Image Pro Plus软件测量血管中层壁厚(MT)和管腔内径(LD),每个标本测量5次,取平均值,并计算二者的比值(MT/LD)。

1.5 PCNA表达含量的检测

用ELISA法,每个标本随机取4个血管环状切片,所有组织标本切片在同一条件下按照PowerVision™二步法进行免疫组织化学染色,并以苏木精复染,检测细胞增殖所用抗体为小鼠增殖细胞核抗原(PCNA)单抗,PCNA阳性染色呈棕黄色细颗粒状,主要位于细胞核,每个切片观察4个相互垂直的视野,计数细胞总数及阳性细胞数。计算平滑肌细胞增殖数目与平滑肌细胞数目比值,即增殖指数(PI)。

1.6 血清NO与血浆ET-1的测定

子代大鼠35周时,10%戊巴比妥钠溶液40 mg/kg腹腔内注射麻醉,打开胸腔心脏采血4 ml ,取2 ml注入含10% EDTA-Na_2 30 μl和抑肽酶20 μl的试管中,4 ℃ 3 000 r/min离心10 min ,分离血浆,置-20 ℃保存待测,余下2 ml血液注入玻璃试管中,室温静置一段时间后分离血清,置-20 ℃保存待测。血清NO用硝酸还原酶法测定,血浆ET用放射免疫分析法测定,均按说明书操作。

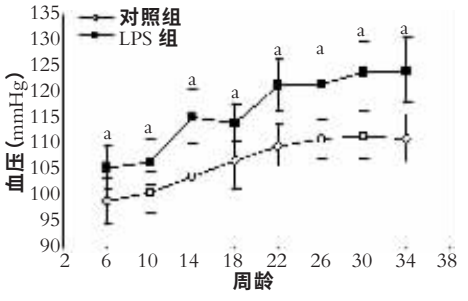
1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 10.0统计软件进行独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 子代大鼠动脉收缩压的变化

孕期暴露于LPS出生的子代大鼠从6周龄起,同对照组子代大鼠相比较,血压均出现显著升高($P<0.01$),到24周龄时达到了高血压水平,到34周龄时LPS组血压[(124.24±6.28) mmHg]与对照组血压[(111.24±4.56) mmHg]相比仍有统计学差异($P<0.01$,图1)。



a:$P<0.01$, 与对照组比较

图1 孕期暴露于LPS致子代大鼠动脉收缩压的变化

2.2 主动脉MT/LD值的变化及PCNA的表达

与对照组相比,LPS组胸主动脉MT明显增加, LD也明显增大,而MT/LD值也明显增大,表明LPS组大鼠胸主动脉存在着明显的血管重构现象。与对照组相比,LPS组胸主动脉PCNA表达增加65%($P<0.01$),提示血管平滑肌细胞明显增殖。见表1。

表1 主动脉中层壁厚及管腔内径的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	MT(μm)	LD(μm)	MT/LD	PCNA表达量(阳性细胞率,%)
对照组	84.66±12.72	1 452.01±117.91	0.058±0.005	40.35±7.76
LPS组	116.48±14.61[b]	1 756.79±156.98[b]	0.066±0.003[a]	66.61±9.44[b]

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$, 与对照组比较

2.3 血浆ET-1和血清NO的含量

LPS组血浆ET-1水平为(148.23±13.42) pg/ml,较对照组[(76.36±14.22) pg/ml]明显升高了($P<0.01$),但NO水平

[(55.73 ± 3.24)μmol/L]与对照组[(38.17 ± 17.53) μmol/L]相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3　讨论

原发性高血压是常见病、多发病,是目前造成人类心脑血管疾病死亡的主要原因之一。然而,EH 根本的病因至今未明。根据临床流行病调查及实验研究结果显示[3, 8-10],炎症免疫机制在高血压的发生、发展中扮演了重要的角色。有研究报道 EH 的发生同个体生命早期所遭遇的环境、营养等因素存在着密切的关联[4]。我室从生命早期的炎症免疫刺激追溯 EH 的起病原因,通过 LPS 和酵母多糖在孕期对孕鼠的刺激,诱导孕鼠产生炎症免疫反应,成功的观察到子代大鼠出生后血压升高[6]。本实验在重复此动物模型基础上,进一步研究了高血压发生的病理生理机制。

高血压可导致血管结构改变,主要包括血管壁增厚及组织学异常,血管壁/腔值增大,以及随之产生血管功能异常,这些变化被称之为高血压血管重构(vascular remodeling in hypertension)。在本实验模型中,我们观察到 LPS 组较对照组主动脉 MT 明显增加,LD 明显增大,而 MT/LD 值也明显增大,表明 LPS 组主动脉存在着明显的血管重构现象。重构的血管对缩血管物质的反应性增强,导致血压进一步升高,形成恶性循环,最终诱发严重的并发症。不仅如此,PCNA 是评价细胞增殖状态的一个良好指标。实验结果显示,LPS 组 PCNA 表达增加,说明血管平滑肌细胞发生了增殖。

高血压病不仅仅是一种动力学异常的疾病, 而且还是一种伴有多种物质代谢障碍的综合征, 其中内皮细胞功能紊乱等因素直接影响着高血压研究的进展及并发症的发生。ET-1 主要由血管内皮细胞产生。本研究结果显示,LPS 组动物血浆 ET-1 较对照组显著升高($P < 0.01$),原因可能是高血压病存在着血管收缩功能障碍,使外周血管内皮细胞 ET 基因表达增强,ET 分泌增多。同时, 高血压时血管内皮受损,大量 ET 释放到血浆中,使血浆 ET 含量增高。ET-1 导致血管重构的机制可能有:①ET-1 是最强的血管平滑肌细胞促有丝分裂剂;②ET-1 与 ET 受体结合后可促进细胞外 Ca^{2+} 内流和内质网释放 Ca^{2+},促使平滑肌收缩蛋白合成增加。

在心血管系统中, NO 主要来源于血管内皮细胞,具有降压、抑制血管平滑肌细胞生长和增殖的作用。但在本研究中并没有观察到 NO 水平的降低。LPS 组大鼠的血管重构,增大了内皮细胞层和平滑肌细胞群之间的距离,进而"阻隔" 半衰期极短的 NO 对平滑肌细胞的作用,造成了对 NO 的空间阻隔作用[11]。

综上所述,本实验在母体孕期暴露于炎症免疫刺激因素所导致的子代高血压动物模型的基础上,进一步探索其高血压的发生可能存在的病理生理机制,为早期高血压的发现提供了新的理论依据,但其具体的分子机制仍需进一步研究。

参考文献:

[1] Wexler R K. Treatment of hypertension critical in reducing morbidity and mortality[J]. J Am Board Fam Med, 2007,20(3):322.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Pradhan A. Obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes: inflammatory basis of glucose metabolic disorders[J]. Nutr Rev, 2007,65(12 Pt 2):S152 - S156.

[5] Bautista L E, Vera L M, Arenas I A, *et al*. Independent association between inflammatory makers (C-reactive protein, interleukin-6, and JNF-alpha) and essential hypertension[J]. J Hum Hpertens, 2005, 19(2): 149 - 154.

[6] 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.

[7] 郝丽云,李晓辉. 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[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(10): 897 - 899.

[8] Savoia C, Schiffrin E L. Inflammation in hypertension [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2006,15(2):152 - 158.

[9] Sesso H D, Wang L, Buring J E, *et al*. Comparison of interleukin-6 and C-reactive protein for the risk of developing hypertension in women [J]. Hypertension, 2007,49(2): 304 - 310.

[10] 徐　涛,曾邦雄,李世忠. 脂多糖对大鼠中性粒细胞基质金属蛋白酶-8 mRNA 表达的影响[J]. 郑州大学学报:医学版,2008,43(3):566 - 567.

[11] Van-de-Vcorde J, Leusen I. Endothelium-dependent and independent relaxation of aortic rings from hypertensive rats[J]. Am J physiol, 1986, 250(5 Pt 2): H711 - H717.

(编辑　王小寒)