DOI:10.16016/j.1000-5404.201512082

孕期炎症刺激对子代大鼠肾脏血管紧张素Ⅱ1型受体表达及功能的影响

彭晓玉,罗 浩,王新全,傅春江,曾春雨 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科)

[摘要] **目的** 探讨孕期炎症刺激对子代大鼠肾脏血管紧张素Ⅱ1型受体(angiotensin Ⅱ type 1 receptor,AT_1R)表达及功能的影响,为高血压的防治提供新的依据。**方法** 20周龄SD大鼠雌性(体质量250~280 g)16只、雄性(体质量250~280 g)8只2∶1交配,选择12只孕鼠随机分成脂多糖(LPS)组和对照组(各6只)。LPS组分别于孕8、10、12 d腹腔注射脂多糖0.79 mg/kg,对照组腹腔注射同等体积生理盐水。采用无创鼠尾测压仪监测子代血压,分别从LPS组和对照组子代中随机选取6只雄性大鼠(20周龄,250~280 g)用于实验,代谢笼收集24 h尿液,肾上腺动脉灌注血管紧张素Ⅱ1型受体拮抗剂(坎地沙坦)检测AT_1R功能,实时荧光定量(qRT-PCR)测定子代大鼠肾脏的AT_1R mRNA表达,免疫印迹检测子代大鼠肾脏的AT_1R蛋白表达。**结果** LPS组子代大鼠随着周龄的变化,血压明显高于对照组子代大鼠。24 h尿液检测结果显示,LPS组子代大鼠的尿量及尿钠排泄率均低于对照组,分别为(24.6±1.8)mL *vs* (19.5±1.5)mL、(750.7±48.2)μmol/d *vs* (568.4±52.5)μmol/d($P<0.05$)。肾上腺动脉灌注坎地沙坦后,LPS组子代大鼠的排钠利尿作用即尿量、尿钠排泄率均明显高于对照组[(6.5±0.6)μL/min *vs* (11.7±1.3)μL/min,(856.8±61.6)μmol/min *vs* (1 282.4±89.9)μmol/min,$P<0.05$]。LPS组子代大鼠肾脏AT_1R mRNA及蛋白的表达均显著高于对照组[(1.31±0.07) *vs* (0.56±0.06),(1.41±0.03) *vs* (0.58±0.12),$P<0.05$]。**结论** 孕期LPS暴露导致子代血压升高,其机制可能与子代大鼠肾脏AT_1R表达及功能增强,引起体内水钠潴留有关。

[关键词] 孕期;脂多糖;子代;高血压;血管紧张素Ⅱ1型受体
[中图法分类号] R341;R364.5;R544.102 [文献标志码] A

Effect of LPS exposure during pregnancy on expression and function of renal angiotensin Ⅱ type 1 receptor in adult rat offsprings

Peng Xiaoyu, Luo Hao, Wang Xinquan, Fu Chunjiang, Zeng Chunyu (Department of Cardiology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To explore the effect of lipopolysaccharide (LPS) exposure during pregnancy on the expression and function of renal angiotensin Ⅱ type 1 receptor (AT_1R) in the adult rat offsprings, and provide new evidence for prevention and treatment of hypertension. **Methods** SD female rats (20 weeks old) with body weight of 250~280 g were mated with SD male rats (20 weeks old) with body weight of 250~280 g, and the female rats with vaginal plug of white crystalline particles were identified as the pregnant rats. Twelve pregnant SD rats were randomly divided into LPS group ($n=6$) and control group ($n=6$). On days 8, 10, and 12 after gestation, the LPS group was treated by intraperitoneal injection of 0.79 mg/kg LPS, while the control group was injected with the equal volume of normal saline. Blood pressure of the offsprings was measured by noninvasive tail pressure instrument, and the urine of the offsprings was collected by metabolic cage. The renal AT_1R function of the offsprings was determined by suprarenal artery administration of AT_1R antagonist candesartan. The renal AT_1R mRNA level was measured by qRT-PCR, while the protein

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81570380,81470936)
[通信作者] 曾春雨,E-mail:cyzeng01@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160518.1646.001.html(2016-05-18)

expression was detected by Western blotting. **Results** With the increasing age, the blood pressure of the offsprings was significantly higher in the LPS group than in the control group. 24-h urine results showed that the urine volume and urinary sodium excretion rate of the offsprings from the LPS group were lower than those from the control group (24.6 ± 1.8 *vs* 19.5 ± 1.5 mL, 750.7 ± 48.2 *vs* 568.4 ± 52.5 mol/d, $P < 0.05$). The candesartan-induced natriuretic and diuretic effects in the offsprings from the LPS group were stronger than those in the offsprings from the control group (6.5 ± 0.6 *vs* 11.7 ± 1.3 mL, 856.8 ± 61.6 *vs* 1 282.4 ± 89.9 mol/min, $P < 0.05$). The expression of AT1R at mRNA and protein levels in the offsprings from the LPS group were higher than those from the control group (1.31 ± 0.07 *vs* 0.56 ± 0.06, 1.41 ± 0.03 *vs* 0.58 ± 0.12, $P < 0.05$). **Conclusion** LPS exposure during pregnancy can induce hypertension in the adult rat offsprings, and it may be related with high expression and function of AT_1R in the kidney, which leads to retention of water and sodium.

[**Key words**] pregnancy; lipopolysaccharide; offsprings; hypertension; angiotensin Ⅱ type 1 receptor

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81570380, 81470936). Corresponding author: Zeng Chunyu, E-mail: cyzeng01@163.com

高血压严重危害人类健康,预计到2025年,全球高血压患者可能再增加80%[1]。现代生物学提出了“成人慢性病的胚胎源性学说”,即成人一些慢性疾病如高血压、冠心病、Ⅱ型糖尿病等病因源于胚胎及婴幼儿时期发育的可塑性。众所周知,孕期感染及炎症的发生普遍存在,研究支持孕期感染产生不良妊娠结果[2-3],而孕期宫内感染被认为是导致不良后果的主要因素[4-5],同时临床流行病学研究也证实,孕期炎症刺激与子代高血压的发生关系密切[6]。虽然孕期炎症刺激可引起子代血压升高,但机制不明。我们前期研究发现孕期炎症刺激可导致子代大鼠肾脏多巴胺D1受体功能受损,从而导致多巴胺受体介导的尿钠排泄功能降低、促进水钠潴留,引起血压升高[7]。肾素-血管紧张素系统(RAS)是调节肾脏尿钠排泄,维持血压平衡的重要系统[8],而孕期脂多糖暴露对子代肾脏血管紧张素Ⅱ1型受体的表达及功能是否有影响,尚无定论。本实验拟通过孕鼠腹腔注射脂多糖模拟孕期炎症刺激,检测子代大鼠24 h尿钠排泄、血管紧张素Ⅱ1型受体(angiotensin Ⅱ type 1 receptor, AT_1R)的表达,进一步探讨AT_1R功能,以期为AT_1R在孕期脂多糖暴露致子代血压升高中的作用研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要器材和试剂

戊巴比妥钠(北京普博斯公司),脂多糖(Sigma公司),0.9%生理盐水(北京华兴科诺公司),坎地沙坦(Chemcruz公司),AT_1R抗体(Abcam公司),抗GAPDH抗体(艾美捷公司),荧光二抗(上海碧云天)。无创鼠尾测压仪(北京普升达公司),大鼠代谢笼(淮北正华公司),尿液分析仪(康进医疗器械公司),手术显微镜(深圳瑞沃德公司),显微手术器械(武汉三丰公司),微量注射泵(贝朗公司),PE导管(上海必鼎它公司),血压监测仪(迈瑞公司),普通/荧光定量PCR仪及Western电泳仪(塞飞公司)。

1.2 模型分组及处理方法

SPF级20周龄SD大鼠由第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物中心提供[动物实验合格证号:SCXX(渝)2002003]。其中雌性(体质量250~280 g)16只、雄性(体质量250~280 g)8只按照2:1进行交配,次日将见到阴栓的雌鼠视为孕鼠,定为妊娠第0天。选择12只孕鼠随机分成脂多糖(LPS)组和对照组,各6只。LPS组分别于孕8、10、12 d腹腔注射脂多糖0.79 mg/kg,对照组腹腔注射同等体积生理盐水。分别从LPS组和对照组子代中随机选取6只雄性大鼠(20周龄,250~280 g)用于实验。

1.3 无创鼠尾血压测定

子代大鼠血压测定从8周龄开始,每4周1次至20周龄,共4次。采用尾套法大鼠尾动脉血压测定方法。在进行有效的血压测量前,两组子代大鼠先进行3次适应性测量训练。血压测量时间固定在上午9:00~12:00。安静条件下,保持室温25 ℃,操作台40 ℃预热10 min,将清醒大鼠放入固定笼中,待大鼠安静后,将尾部无创检测仪的尾部气囊置于大鼠尾巴根部,待信号波形稳定后,测量血压并记录。每只大鼠间隔3 min测量血压1次,总共5次,取平均值进行数据分析。

1.4 代谢笼尿液分析

开始收集尿液前,将对照组和LPS组大鼠置于大鼠代谢笼适应1 d。适应期间,给予各组大鼠正常饮食和饮水。开始收集大鼠尿液时,撤去饲料,仅给予正常

饮水,代谢笼下连接离心管以收集 24 h 尿液。收集尿液期间维持环境温度在 25 ℃左右。收集尿液完毕,2 500 ×g 低温离心尿液 10 min,取其上清,测其体积,-20 ℃保存。

1.5 肾脏 AT_1R 功能测定

在对照组和 LPS 组子代 20 周龄时,采用肾上腺动脉灌注 AT_1R 拮抗剂(坎地沙坦)检测其肾脏 AT_1R 功能。参考本课题组前期研究方法[5],简要操作如下:按照大鼠体质量腹腔注射戊巴比妥钠麻醉(50 mg/kg),麻醉成功后将其固定在恒温毯上,维持温度在 36~37 ℃。切开气管,将 PE-240 管插入气管进行辅助呼吸;随后将 PE-50 管置入左侧颈静脉用于输液,将 PE-10 管置入左侧颈静脉用于麻醉维持;将 PE-50 管置入右侧颈动脉用于持续动态监测大鼠血压及心率;将 PE-10 管置入右侧肾上腺动脉以输注实验药物。最后,PE-10 管分别置入双侧输尿管以收集尿液。手术结束后,2.5% 戊巴比妥钠以 0.1 mL/h 持续泵入维持麻醉,生理盐水以 1% 体质量持续泵入,平衡 1 h。平衡结束,通过导管向肾上腺动脉内输注溶剂或者药物,输注速度 40 μL/h。实验分为 3 个阶段:对照期(输注生理盐水)、实验期(输注坎地沙坦)、恢复期(输注生理盐水)。每个阶段收集尿量 45 min,注意维持大鼠动脉血压及心率稳定。实验完毕,计算并测量各阶段尿流速及尿钠排泄率。

1.6 采用 qRT-PCR 检测 AT_1R mRNA 水平

总 RNA 提取采用 Trizol 法,测量两组肾脏总 RNA 浓度,根据逆转录试剂盒(TaKaRa 公司)RNA PCR Kit (AMV)Ver3.0 说明书进行一步法逆转录。AT_1R 引物序列,上游:5′-AAATTGAGTGGCTGTATG-3′,下游:5′-CTTGACCTCCCATCTCCT-3′,片段大小 160 bp。β-actin 引物序列,上游:5′-GACGTTGACATCCGTAAAGACC-3′,下游:5′-TAGGAGCCAGGGCAGTAATCT-3′,片段大小 110 bp。PCR 采用 20 μL 反应体系,应用绿色荧光 qRT-PCR,以 β-actin 为内参。反应体系:预孵育 93 ℃ 120 s;扩增 93 ℃ 20 s,56 ℃ 23 s,72 ℃ 28 s,循环 40 次,最后延伸阶段结束。

1.7 Western blot 检测 AT_1R 表达

用组织匀浆器于冰上研磨两组大鼠肾脏组织进行总蛋白的提取,蛋白质浓度测定使用考马斯亮蓝 G250 比色法。将 100 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,半干转膜,5% 脱脂奶粉封闭 1.5 h,一抗 AT_1R 抗体(1∶300)4 ℃ 孵育过夜。次日复温 30 min 后用 0.1% Tween 的 TBS 缓冲液洗膜 3 次,每次 10 min。二抗山羊抗兔 IgG(1∶15 000)避光室温孵育 1.5 h,0.1% Tween 的 TBS 缓冲液洗膜 3 次,每次 15 min。使用荧光扫描仪对硝酸纤维素膜进行扫描,应用 Quantity One 软件测量、计算 AT_1R 与 GAPDH 灰度比值。

1.8 统计学方法

使用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较使用 t 检验,组内比较使用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 子代大鼠一般生理参数

LPS 组 20 周龄子代大鼠饮食量及体质量显著高于对照组子代大鼠($P<0.05$),而血糖、甘油三酯、心率差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

2.2 子代大鼠肾功能比较

通过 24 h 代谢笼收集尿液,LPS 组尿量、尿钠排泄率显著低于对照组大鼠($P<0.05$),而血肌酐、尿蛋白及肾小球滤过率差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

表 1 对照组和 LPS 组 20 周龄子代大鼠生理参数比较 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	饮食量 (g/d)	体质量 (g)	血糖 (mmol/L)	甘油三酯 (mg/dL)	心率 (/min)
对照组	22.5±1.8	288.3±6.4	5.4±0.4	56.8±7.5	340.8±9.3
LPS 组	26.6±1.4[a]	309.7±7.2[a]	5.3±0.5	58.9±8.3	343.6±10.1

a:$P<0.05$,与对照组比较

表 2 对照组和 LPS 组 20 周龄子代大鼠肾脏功能参数比较 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	肌酐 (mg/dL)	尿蛋白 (mg/24 h)	尿量 (mL/kg)	尿钠排泄率 (μmol/kg)	肾小球滤过率 (mL/min)
对照组	0.7±0.1	11.2±1.2	24.6±1.8	750.7±48.2	1.0±0.1
LPS 组	0.8±0.1	12.1±1.0	19.5±1.5[a]	568.4±52.5[a]	0.9±0.1

a:$P<0.05$,与对照组比较

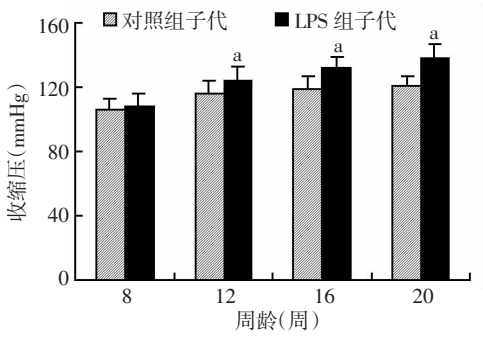
2.3 子代大鼠血压的变化

从 8 周开始持续监测血压,12、16、20 周龄时,LPS 组子代大鼠血压显著高于同龄期对照组子代大鼠($P<0.05$,图 1)。

2.4 子代大鼠肾脏 AT_1R 功能

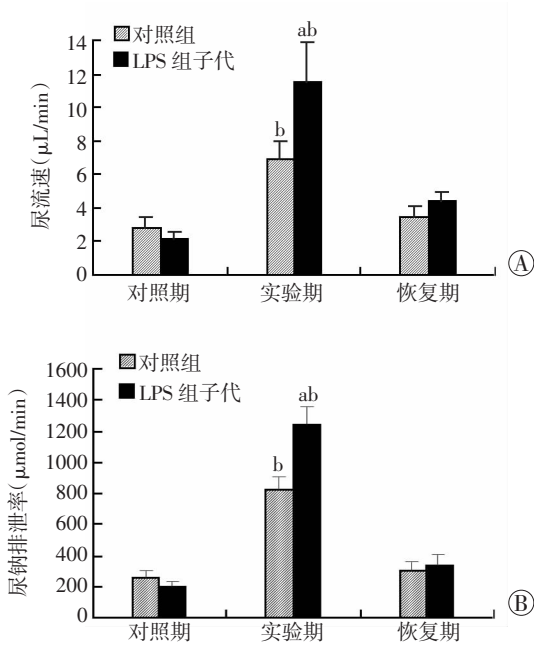
通过肾上腺动脉灌注 AT_1R 拮抗剂(坎地沙坦),LPS 组子代大鼠和对照组子代大鼠均呈现出显著的排钠利尿反应;但 LPS 组子代大鼠对坎地沙坦诱导的排钠利尿反应比对照组子代大鼠更强,表现为尿流速和尿钠排泄率均高于对照子代大鼠,分别为(6.5±0.6)μL/min *vs* (11.7±1.3)μL/min 和(856.8±61.6)μmol/min *vs* (1 282.4±89.9)μmol/min(图 2)。在手

术和收集尿液期间,大鼠血压和心率维持平稳,前后差异无统计学意义($P>0.05$)。



a:$P<0.05$,与对照组比较

图 1 对照组和 LPS 组不同周龄子代大鼠血压比较

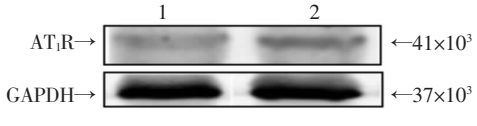


A:尿流速;B:尿钠排泄率 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与对照期比较

图 2 对照组和 LPS 组大鼠肾脏 AT_1 受体功能比较

2.5 子代大鼠肾脏 AT_1R 表达

LPS 大鼠子代肾脏 AT_1R mRNA 表达水平显著高于对照组子代[(1.31 ± 0.07) *vs* (0.56 ± 0.06),$P<0.05$]。LPS 组子代大鼠肾脏 AT_1R 蛋白表达水平也明显高于对照组子代大鼠[(1.41 ± 0.03) *vs* (0.58 ± 0.12),$P<0.05$],见图 3。



1:对照组;2:LPS 组

图 3 Western blot 检测两组子代大鼠肾脏组织中 AT_1R 的表达

3 讨论

高血压是脑卒中、冠心病及肾脏病发病及死亡的最重要的危险因素之一[9]。现代生物学提出了“成人慢性病的胚胎源性学说”,该学说认为,胚胎阶段,机体各组织器官处于发生、分化和发育的最敏感时期,胎儿受到的一些来自外界环境的刺激如炎症刺激,可能会对其成年后发生的一些慢性疾病如高血压、糖尿病等起决定性的作用[10]。临床流行病学资料表明,孕期炎症刺激与子代高血压的发生关系密切,但机制还有待阐明。

肾脏是人体负责尿钠排泄的主要器官,在血压的长期调控中发挥重要作用,它可通过对尿钠重吸收的调控达到调节血压的目的[11]。临床流行病学研究结果显示钠盐的摄入及排泄与高血压发病呈正相关[12]。本研究发现,孕期炎症刺激的子代大鼠血压明显较对照组升高,同时进一步检测 24 h 尿液,结果显示孕期炎症刺激的子代大鼠 24 h 尿钠排泄功能明显降低,即体内存在尿钠潴留的现象。本课题组前期研究发现,孕期炎症刺激可引起子代血压升高,其机制与子代大鼠肾脏多巴胺 D1 受体介导的尿钠排泄功能失调有关。同时研究已证实,肾脏肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensinsystem,RAS)是调节尿钠排泄,维持血压稳定的重要系统之一。RAS 的活性通过血管紧张素 II 作用于 AT_1R,促进血管收缩、肾脏水钠的重吸收,从而促进血压的升高[13]。相关研究显示,在原发性高血压及肥胖相关性高血压大鼠肾脏 AT_1R 表达及功能明显增强,其是引起血压升高的重要原因之一[14]。孕期炎症刺激的子代大鼠血压升高是否与肾脏 AT_1R 功能失调有关呢? 本研究进一步分析发现,通过肾上腺动脉灌注 AT_1R 拮抗剂(坎地沙坦),孕期 LPS 组子代大鼠 AT_1R 介导的尿钠排泄功能明显高于对照组子代大鼠,其功能的增强是否与受体的表达有关。前期相关研究显示,孕期炎症刺激子代大鼠胸主动脉及肠系膜动脉 AT_1R 介导的收缩功能明显增强,其与 AT_1R mRNA 及蛋白的表达增强密切相关[15]。本研究结果显示,与对照组子代大鼠相比,孕期 LPS 刺激组子代大鼠 AT_1R mRNA 和蛋白表达均显著增强。以上结果提示肾脏 AT_1R 表达及功能增强可能是孕期 LPS 刺激引起子代大鼠尿钠排泄障碍,促进血压升高的因素之一。相关研究显示,孕期 LPS 刺激的子代大鼠体内氧化应激活性明显升高[16],其是否促进了肾脏 AT_1 受体表达及功能增强,还有待进一步研究阐明。

综上所述,肾脏 AT_1R 表达及功能增强可能是孕期 LPS 刺激引起子代尿钠排泄功能障碍,促进血压升高的重要原因之一。

参考文献:

[1] Gelfer M, Dawes M, Kaczorowski J, *et al*. Diagnosing hypertension: Evidence supporting the 2015 recommendations of the Canadian Hypertension Education Program[J]. Can Fam Physician, 2015, 61(11): 957-961.

[2] Gibbs R S. The relationship between infections and adverse pregnancy outcomes: an overview[J]. Ann Periodontol, 2001, 6(1): 153-163.

[3] Khandaker G M, Zimbron J, Lewis G, *et al*. Prenatal maternal infection, neurodevelopment and adult schizophrenia: a systematic review of population-based studies[J]. Psychol Med, 2013, 43(2): 239-257. DOI: 10.1017/S0033291712000736

[4] Huleihel M, Golan H, Hallak M. Intrauterine infection/inflammation during pregnancy and offspring brain damages: possible mechanisms involved[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2004,2: 17.

[5] Urakubo A, Jarskog L F, Lieberman J A, *et al*. Prenatal exposure tomaternal infection alters cytokine expression in the placenta, amniotic fluid, and fetal brain[J]. Schizophr Res, 2001, 47(1): 27-36.

[6] Lane R H. Fetal programming, epigenetics, and adult onset disease[J]. Clin Perinatol, 2014, 41(4): 815-831. DOI: 10.1016/j.clp.2014.08.006

[7] Wang X, Luo H, Chen C, *et al*. Prenatal lipopolysaccharide exposure results in dysfunction of the renal dopamine D1 receptor in offspring[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 76: 242-250. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.010

[8] Miyazaki H, Babazono A, Nishi T, *et al*. Does antihypertensive treatment with renin-angiotensin system inhibitors prevent the development of diabetic kidney disease? [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2015, 16: 22. DOI: 10.1186/s40360-015-0024-y

[9] Kai H. Hypertension: The Points of Management of Hypertensions--Based on the JSH 2014 Hypertension Guidelines--. Topics: IV. Treatment for hypertension associated with cerebrovascular disease/heart disease[J]. Nihon Naika Gakkai Zasshi, 2015, 104(2): 232-239.

[10] Shortliffe L M, Hammam O, Han X, *et al*. Dietary fructose in pregnancy induces hyperglycemia, hypertension, and pathologic kidney and liver changes in a rodent model[J]. Pregnancy Hypertens, 2015, 5(4): 308-314. DOI: 10.1016/j.preghy.2015.08.002

[11] Xiao L, Kirabo A, Wu J, *et al*. Renal Denervation Prevents Immune Cell Activation and Renal Inflammation in Angiotensin II-Induced Hypertension[J]. Circ Res, 2015,117(6): 547-557. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306010

[12] Goraya N, Wesson D E. Dietary interventions to improve outcomes in chronic kidney disease[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2015, 24(6): 505-510. DOI: 10.1097/MNH.0000000000000160

[13] 罗浩, 王新全, 王甲良, 等. Tempol 通过降低氧化应激下调肥胖相关性高血压大鼠肾脏 AT_1 受体表达[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(9): 902-905. DOI: 10.16016/j.1000-5404.2014.09.012

[14] Gjorgjievska K, Zafirov D, Jurhar-Pavlova M, *et al*. Protective effects of AT1-receptor blocker and CA antagonist combination on renal function in salt loaded spontaneously hypertensive rats[J]. Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki), 2015, 36(1): 85-91.

[15] 王甲良, 王新全, 罗浩, 等. 孕期脂多糖刺激对子代大鼠肠系膜动脉血管紧张素Ⅱ介导的血管收缩功能的影响[J]. 中华高血压杂志, 2014, 22(6): 536-539. DOI: 10.16439/j.cnki.1673-7245.2014.06.040

[16] Wang X, Wang J, Luo H, *et al*. Prenatal lipopolysaccharide exposure causes mesenteric vascular dysfunction through the nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate pathway in offspring[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 86: 322-330. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.040

(**收稿**:2015-12-08;**修回**:2016-03-08)

(编辑 栾 嘉)