

[文章编号] 1007-3949(2009)17-02-0093-04

• 实验研究 •

慢性宫内缺氧对子代兔成年期血管内皮舒张功能及内膜病理改变的影响

林惠通, 吕国荣, 王振华, 李伯义

(福建医科大学附属第二医院超声科, 福建省泉州市 362000)

[关键词] 慢性宫内缺氧; 高脂血症; 内皮依赖性舒张功能; 动脉粥样硬化

[摘要] 目的 探讨慢性宫内缺氧对子代兔成年期血管内皮依赖性舒张功能及内膜病理改变的影响。方法 新西兰孕兔 16只,分慢性宫内缺氧和非慢性宫内缺氧两组,待分娩后去除雌性,再随机取每只母兔的雄性子代 2只,母乳喂养 3个月,慢性宫内缺氧组和非慢性宫内缺氧组子代兔均再分高脂饮食和正常饮食,即得慢性宫内缺氧+高脂饮食组、非慢性宫内缺氧+高脂饮食组、慢性宫内缺氧+普食组和非慢性宫内缺氧+普食组(正常对照组),每组各 8只。至 6个月末用超声和病理手段检测兔腹主动脉内皮舒张功能和内膜病理变化。结果 慢性宫内缺氧可引起子代兔成年期血清总胆固醇和甘油三酯浓度增高,使主动脉内皮依赖性舒张功能降低($P < 0.05$),还可导致腹主动脉内膜发生一系列病理改变。慢性宫内缺氧与高脂血症能协同加重上述各观察指标变化($P < 0.05$)。结论 慢性宫内缺氧引起子代兔成年期腹主动脉内皮依赖性舒张功能降低,是动脉粥样硬化的一个重要因素。经历慢性宫内缺氧的子代兔出生后对高脂饮食损伤更为敏感。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Effects of Chronic Intrauterine Hypoxia on Endothelium Vascular Relaxation and Pathological Change in Adult Rabbit Offspring

LIN HuiTong LV GuoRong WANG ZhenHua and LI BoYi

(Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000 China)

[KEY WORDS] Chronic Intrauterine Hypoxia Hyperlipemia Endothelial Dependent Vasodilation Atherosclerosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of chronic intrauterine hypoxia (CH) on endothelium vascular relaxation and pathological change in adult offspring rabbit. **Methods** Sixteen New-Zealand rabbits were assigned randomly to two groups: CH group (12% O₂, $n = 8$) and normal oxygen group (21% O₂, $n = 8$). After delivery, two male offspring rabbits per litter were selected and breast-fed for 3 months. Then they were randomly separated into high-fat diet and normal diet respectively. Thus 4 groups were got as follow: CH with high fat diet (CH + HFD, $n = 8$), Non-CH with high fat diet (NCH + HFD, $n = 8$), CH with normal diet (CH + ND, $n = 8$) and normal control ($n = 8$). At six months of age, offspring rabbits were evaluated for endothelium vascular relaxation of the abdominal aorta by ultrasonoscopy. Abdominal aorta was then taken out and observed by electron microscope and light microscope. **Results** CH could result in a series of effects in adult rabbit offspring, such as elevated serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) level and attenuated endothelial dependent vasodilation (EDV) of abdominal aorta ($P < 0.05$). There were relevant pathological changes in different groups. All these influences caused by CH were aggravated significantly when hyperlipemia was imposed ($P < 0.05$). **Conclusions** CH cause impaired EDV in adult offspring, which might serve as an important factor that can induce atherosclerosis. The adult offspring rabbit which have ever undergone chronic hypoxia in utero were more sensitive to the impairment of high-fat diet.

流行病学和动物实验研究表明,不良的子宫内环境及其导致的宫内生长迟缓 (intrauterine growth retardation, IUGR)与成年后发生高血压病、冠心病 (coronary heart disease, CHD)等心血管疾病的危险

性增加有关^[1,2]。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)是心血管疾病重要的病变基础。动脉内皮受损是 As发生的始动环节。国内外鲜见慢性子宫内缺氧 (chronic intrauterine hypoxia, CH)对子代活体动脉内皮功能影响的研究,仅有离体动脉内皮功能研究,且多为非哺乳动物^[3]或观察期限短 (仅到胚胎或出生后不久)^[4]。本研究首次采用新西兰兔 CH动物模型,旨在借助超声和彩色多普勒血流显像技术等检查研究 CH对子代兔成年期动脉内皮功能的影响并探讨其可能的病理基础。

[收稿日期] 2008-10-03 [修回日期] 2009-01-09

[基金项目] 福建省自然科学基金项目 (2007J0076)

[作者简介] 林惠通,博士,医师,研究方向为心血管疾病超声诊断, E-mail为 linhuitiong@126.com。通讯作者吕国荣,主任医师,教授,博士研究生导师,主要从事介入治疗、产科和心血管疾病超声诊断研究, E-mail为 lgr_feu@sina.com。王振华,留德博士研究生,医师,主要从事心血管疾病基础与临床研究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

压缩氧气 (浓度 > 99%) 和压缩氮气 (浓度 > 99%) 购自福建省晋江市东石东堤制氧厂; 胆固醇和胆酸钠购自上海惠兴生物化学试剂公司; 氯化乙酰胆碱 (acetylcholine, Ach) 购自上海三爱思试剂有限公司; 硝酸甘油 (nitroglycerin, NTG) 购自武汉友和医药公司; 戊巴比妥钠购自北京北实纵横科技发展有限公司。ALOKA SSD 5500 彩色多普勒超声诊断仪 (日本阿洛卡公司生产), 探头频率 4~10 MHz; S-450 型氧浓度检测仪 (美国 IST-AM 公司生产)。

1.2 动物模型的制备和分组

健康新西兰孕兔 16 只, 孕龄 10 天, 体重 3.0~3.5 kg 由上海斯莱克实验动物有限公司提供。参考 Williams 等^[4]的方法建立 CH 模型: 新西兰孕兔 16 只于孕第 10 天随机分为缺氧组和非缺氧组, 每组各 8 只。将怀孕 10 天的母兔置于自制玻璃缺氧舱内, 调节氧氮的流量, 并充分混合, 使混合气氧浓度为 12% ± 0.1%, 每天分两次缺氧, 一次 4 h, 共 20 天, 直到孕 30 天分娩为止, 此即缺氧组。将非缺氧组孕兔模拟放进缺氧箱, 但不予缺氧处理。子代兔出生后, 在每只母兔的子代随机抽取 2 只雄性仔兔由兔乳喂养至 3 月龄, 缺氧组和非缺氧组子代此时均再随机分为正常饮食和高脂饮食 (胆固醇 2%、猪油 5%、蛋黄粉 10%、胆酸钠 0.5%, 其余为基础饲料) 组, 成为以下四组: 即慢性宫内缺氧 + 高脂饮食组 (CH + HFD)、非慢性宫内缺氧 + 高脂饮食组 (NCH + HFD)、慢性宫内缺氧 + 正常饮食组 (CH + ND) 和非慢性宫内缺氧 + 正常饮食组即正常对照组, 每组各 8 只, 喂养至 6 月龄。

1.3 超声检查

6 个月末, 实验兔麻醉后, 参照张梅等^[5]人测量

腹主动脉内皮依赖性舒张功能 (endothelium-dependent vasodilation, EDV) 和非内皮依赖性舒张功能 (endothelium-independent vasodilation, EV)。EDV = (D1 - D0) / D0 × 100%, EV = (D2 - D0) / D0 × 100%, D0 为理化因素作用前目标血管内径, ΔD (D1 - D0 或 D2 - D0) 为理化因素作用前后目标血管相同部位同时相内径变化值 (于 M 超上测量收缩期最大内径或舒张期末内径)。

1.4 生物化学指标测定

高脂饮食前、后从耳缘静脉抽取子代兔的血液标本, 离心后, 取血清 50 μL, 应用全自动生物化学分析仪, 检测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC) 和甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平。

1.5 病理学检查

以上四组兔均于出生后 6 个月末处死, 取腹主动脉约 1 cm, 甲醛固定, 石蜡包埋, 行 HE 染色光镜检查, 另取 1 mm³ 用戊二醛固定, 行电镜检查。

1.6 统计学分析

计量资料 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用一般线性模型的 Univariate 过程, 进行完全随机分组析因设计的两因素两水平方差分析, 分析各因素的主效应及交互作用。两组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 子代兔血清总胆固醇和甘油三酯水平

四组子代兔 3 月龄末血清 TC 和 TG 浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 3 月龄末相比, 6 月龄末 TC 和 TG 浓度除正常对照组无显著改变外 ($P > 0.05$), 其余各组均明显升高 (均 $P < 0.01$)。与正常对照组比较, 6 月龄末其余三组 TC 和 TG 浓度均明显升高 (均 $P < 0.01$, 表 1)。

表 1 各组子代兔高脂饮食前后血清总胆固醇和甘油三酯水平变化 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	n	TC		TG	
		3月龄末	6月龄末	3月龄末	6月龄末
正常对照组	8	1.71 ± 0.13	3.53 ± 2.18	0.74 ± 0.02	0.82 ± 0.04
CH + ND 组	8	1.85 ± 0.16	8.91 ± 0.82 ^{ab}	0.78 ± 0.02	1.19 ± 0.08 ^{ab}
NCH + HFD 组	8	1.61 ± 0.08	17.59 ± 1.14 ^{ab}	0.73 ± 0.02	1.28 ± 0.07 ^{ab}
CH + HFD 组	7	1.85 ± 0.13	25.84 ± 1.58 ^{ab}	0.77 ± 0.02	2.50 ± 0.09 ^{ab}

a 为 $P < 0.01$ 与本组 3 月龄末比较; b 为 $P < 0.01$ 与正常对照组比较, CH + HFD 组高脂饲养过程中有 1 只兔因右肾梗死而死亡。

2.2 兔主动脉内皮依赖性舒张功能和非内皮依赖性舒张功能

注射 Ach 后, EDV 由大到小依次为正常对照

组、CH + ND 组、NCH + HFD 和 CH + HFD 组, 且与正常对照组相比较, 其余三组差别有显著性意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。注射 NTG 后, 各组间腹主

动脉内径变化率(即 EN)差异无显著性意义($P > 0.05$, 表 2)。采用一般线形模型的 Univariate 过程对子代兔 6 个月末腹主动脉 EDV 行析因分析, 腹主动脉 EDV 分析模型: $F = 63.23$, $P < 0.001$, $R^2 = 0.86$ 。宫内缺氧可引起子代兔 6 个月末腹主动脉 EDV 降低($P < 0.001$), 其主效应为 28.2%。高脂饮食也可引起子代兔 6 个月末腹主动脉 EDV 减弱($P < 0.001$), 其主效应为 39.4%。宫内缺氧与高脂血症对子代兔 6 个月末腹主动脉 EDV 的影响存在交互作用($P = 0.006$), 说明宫内缺氧与高脂血症有协同损伤腹主动脉 EDV 的作用。

表 2 各组实验兔内皮依赖性舒张功能和非内皮依赖性舒张功能变化 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	例数	EDV	EN
正常对照组	8	9.2% \pm 0.9%	8.8% \pm 0.4%
CH + ND 组	8	7.4% \pm 1.0% ^a	8.8% \pm 0.2%
NCH + HFD 组	8	6.3% \pm 1.1% ^a	9.1% \pm 0.5%
CH + HFD 组	7	2.4% \pm 0.8% ^b	9.0% \pm 0.8%

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

2.3 子代成年兔腹主动脉光镜下形态特点

光镜下正常对照组腹主动脉管腔呈圆形, 内膜、中膜和外膜分界清晰, 管腔面由单层内皮细胞覆盖, 内皮细胞完整, 内膜光滑, 中膜主要由同心排列的弹性纤维膜组成, 弹力膜由弹力纤维相连, 基质内可见环行的平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC)。CH + ND 组腹主动脉壁层次尚清晰, 内膜内皮细胞仍在, 但部分可见内皮细胞受损, 内膜粗糙略增厚, 偶有小斑块, 中膜平滑肌排列紊乱、增厚、无明显萎缩, 管壁可见偏心性微小的动脉粥样斑块。NCH + HFD 组腹主动脉壁明显增厚, SMC 增生明显, 细胞

排列紊乱, 弹力纤维层次不清, 纤维组织增生伴片状、局部管壁向管腔凸出, 形成纤维增生性动脉粥样硬化斑块。CH + HFD 组腹主动脉内皮细胞脱落, 内膜明显增厚, 凸出的斑块含有大量的泡沫细胞, SMC 减少, 呈典型的成熟动脉粥样硬化斑块 (图 1)。

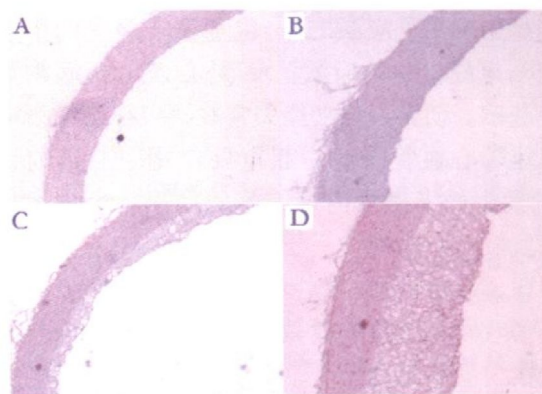


图 1 子代成年兔腹主动脉光镜照片 (HE 染色, $\times 40$) A 为正常对照组, B 为 CH + ND 组, C 为 NCH + HFD 组, D 为 CH + HFD 组。

2.4 子代成年兔腹主动脉透射电镜下形态特点

透射电镜下见正常对照组血管内皮细胞完整, 内皮间隙紧密; 内皮下无间质水肿 (箭头所示), 内弹力板完整, 未见异常病理改变。CH + ND 组部分内皮细胞水肿、内皮间隙增宽, 内皮下水肿, 间以较多纤维等基质 (箭头所示), 前弹力板断裂。NCH + HFD 组内膜进一步加宽, SMC 增殖, 其胞质丰富, 粗面内质网空泡化 (箭头所示), 肌丝减少; 成纤维细胞和 SMC 周围均有明显的胶原增生。CH + HFD 组腹主动脉内膜增厚加剧; 大量胶原纤维、弹力纤维增生; 吞噬了较多脂滴的泡沫细胞内的脂质融合成长形、针形或不规则的结晶 (箭头所示) (图 2)。

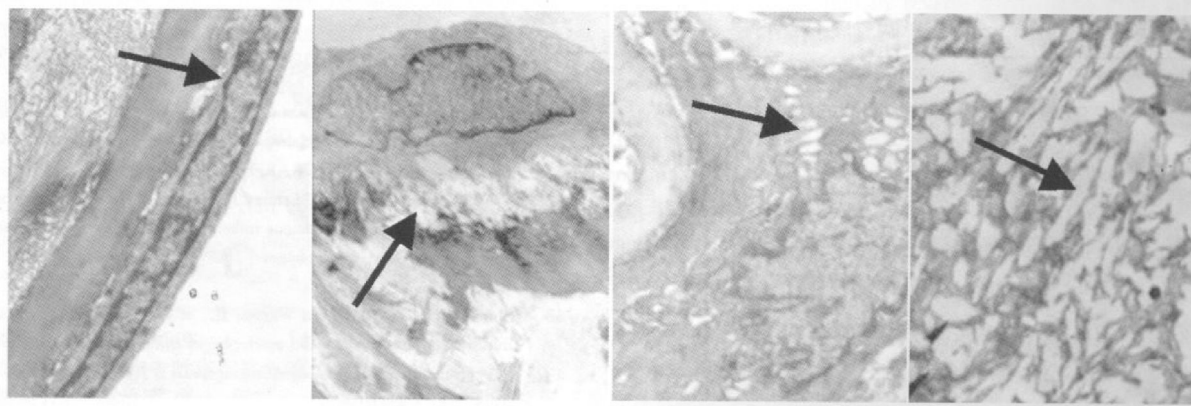


图 2 子代成年兔腹主动脉透射电镜图像

从左到右依次为正常对照组 ($\times 12500$), CH + ND 组 ($\times 12000$), NCH + HFD 组 ($\times 9000$), CH + HFD 组 ($\times 6300$)。

3 讨论

1995年 Barker^[6-7]首次提出了心血管疾病胎儿起源模型,认为对不良宫内环境,胎儿将产生一系列生理、形态和代谢的适应,这些适应将持续到出生后并导致成年后易于发生心血管疾病。缺氧是影响内环境稳态的常见应激之一,也是胎儿遭受的最重要的与临床最相关的应激。As是心血管疾病重要的病变基础。动脉内皮功能失常在As心功能衰竭及高血压等心血管疾病中起重要作用^[8]。目前认为As的发生始于血管内皮细胞的受损。血管内皮不仅是血液与管壁间的一层屏障,更是一个重要的功能器官,EDV即内皮在各种刺激因素作用下产生血管舒张活性物质并借此调节血管张力及血流量,是内皮极为重要的功能^[9]。目前已经证实EDV障碍是As早期最为突出的病理生理改变,并在整个过程中持续存在^[10]。

缺氧是EDV障碍的一个重要因素,可能引发As。Nakano等^[11]研究表明慢性缺氧可促进载脂蛋白E基因敲除鼠的动脉粥样硬化进展。已有研究表明缺氧可通过缺氧诱导因子旁路促进微血管生成,加速As发展,缺氧诱导因子 α 是血管化生的关键调节因子,且与As炎症反应相关^[12];缺氧还与As斑块内的巨噬细胞存在相关^[13],在缺氧条件下,As斑块内的巨噬细胞表达15-脂氧化酶2上调,后者可诱导大量细胞因子分泌及T细胞迁移到血管壁。Ruijtenbeek等^[3]研究了慢性缺氧孵化对鸡胚胎动脉内皮功能的影响,结果发现,慢性缺氧孵化可通过减少动脉内皮细胞合成与释放一氧化氮(nitric oxide, NO)来降低动脉对ACh扩张血管作用的敏感性,表明慢性缺氧使子代动脉EDV受损。Williams等^[4]研究也表明CH可降低子代小鼠动脉内皮细胞内NO的生物活性,使得乙酰甲胆碱扩血管作用减弱,降低动脉EDV。但是这两个实验都是离体观测EDV。

本实验采用与人类As发生较相近的新西兰兔为研究对象,借用超声无创技术首次进行活体动脉功能(即EDV)的检测,其结果更贴近活体实际,与人类的As发生更为相近。研究结果表明,CH可引起子代兔6个月龄末腹主动脉EDV降低,其主效应有显著性意义。宫内缺氧与高脂血症对子代兔6个月龄末腹主动脉EDV的影响存在交互作用。这说明CH可导致子代兔EDV受损,进一步证实了前两个实验的结论。本研究还发现有CH经历的子代兔出生后给予高脂饮食,其EDV损伤程度比单纯高

脂饮食组严重。从血脂和病理检查结果可以看出,CH可导致子代兔成年期血清TC和TG升高,腹主动脉内皮结构损伤,有CH经历的子代兔出生后再给予高脂饮食后上述病变最严重,这说明慢性宫内缺氧的子代兔出生后对高脂饮食的损伤比正常兔更为敏感。这可能是慢性宫内缺氧使子代兔产生了某些适应性改变,这种改变使得它在出生后对高脂饮食损伤更为敏感。然而,慢性宫内缺氧究竟是通过何种机制导致这种适应性改变尚有待进一步深入探讨。

本研究结果还表明,腹主动脉EDV损伤程度与病理改变程度较为一致,因此通过测量动脉EDV的变化可以推测动脉内皮损伤程度,并较及时、准确预测As的发生,对早期发现As具有重要意义。

[参考文献]

- [1] Barker DJ, Fall CH. Fetal and infant origins of cardiovascular disease [J]. *Arch Dis Child*. 1993; **68**: 797-799.
- [2] Byrne CD, Philips DI. Fetal origins of adult disease: epidemiology and mechanisms [J]. *J Clin Pathol*. 2000; **53**: 822-828.
- [3] Ruijtenbeek K, Kessels LC, De Mey JG, et al. Chronic moderate hypoxia and protein malnutrition both induce growth retardation, but have distinct effects on arterial endothelium-dependent reactivity in the chicken embryo [J]. *Pediatr Res*. 2003; **53**: 573-579.
- [4] Williams SJ, Campbell ME, Millen K, et al. Differential effects of maternal hypoxia or nutrient restriction on carotid and femoral vascular function in neonatal rats [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; **288**: 360-367.
- [5] 张梅, 张运, 张园园, 等. 四种药物对兔动脉粥样硬化血管内皮功能的影响 [J]. *中华超声影像学杂志*, 2003; **12** (8): 496-498.
- [6] Barker DJ. The fetal origins of adult disease [J]. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1995; **262**: 37-43.
- [7] Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease [J]. *Br Med J*. 1995; **311**: 171-174.
- [8] Kinlay S, Ganz Peter. Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implication for therapy [J]. *Am J Cardiol*. 1997; **80**: 111-161.
- [9] Andersson TJ, Gerhard MD, Meredith JE, et al. Systemic nature of endothelial dysfunction in atherosclerosis [J]. *Am J Cardiol*. 1995; **75**: 71-74.
- [10] Zehner AM, Drexler H, Saurbier H, et al. Endothelium mediated coronary blood flow modulation in humans: effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia and hypertension [J]. *J Clin Invest*. 1993; **92**: 652-662.
- [11] Nakano D, Hayashi T, Tazawa N, et al. Chronic hypoxia accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Hypertens Res*. 2005; **28**: 837-845.
- [12] Vink A, Schoneveld AH, Laners D, et al. HIF-1 α expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages [J]. *Atherosclerosis*. 2007; **195**: 69-75.
- [13] Sluiter JC, Gasc JM, van Wanroij JL, et al. Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis [J]. *J Am Coll Cardiol*. 2008; **51**: 1258-265.

(此文编辑 许雪梅)