

宫内慢性缺氧对子代大鼠血压的影响

王振华¹, 黄子扬¹, 吕国荣², 苏瑞娟²

(福建医科大学附属第二医院 1. 心内科, 2. 超声科, 福建省泉州市 362000)

[关键词] 宫内慢性缺氧; 子代大鼠; 胎儿程序控制; 血压

[摘要] 目的 探讨宫内慢性缺氧对子代大鼠血压的影响。方法 SD大鼠孕鼠于妊娠第 7~21天, 每日置于氧气浓度为 10% ±1% 的低压氧舱 3 h 待分娩后观测其子代大鼠体重、主要脏器重量及血压的变化。结果 宫内缺氧组仔鼠出生后第 1天体重显著低于对照组 ($P < 0.01$), 但出生后第 20天体重与对照组无显著性差异; 宫内缺氧组仔鼠肝脏于出生后第 1、20天以及雄性仔鼠肾脏于出生后 3月、7月的重量显著低于对照组 ($P < 0.05$); 5月龄、7月龄宫内缺氧组子代雄性大鼠血压均比同性别对照组显著升高 ($P < 0.05$), 且呈现随年龄增长而逐渐加重趋势, 但宫内缺氧子代雌性大鼠血压与对照组相比无显著性差异。结论 慢性宫内缺氧可能是引起大鼠肝、肾、血管组织程序控制的应激因素之一。它可诱发子代雄性大鼠血压升高, 呈现性别依赖现象, 并随年龄增长有逐渐加重倾向。

[中图分类号] R36

[文献标识码] A

The Role of Intrauterine Chronic Hypoxia on Blood Pressure in Offspring Rats

WANG ZhenHua¹, HUANG ZiYang¹, LV GuoRong², and SU RuiJuan²

(1 Department of Cardiology, 2 Department of Ultrasound, Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000 Fujian, China)

[KEY WORDS] Intrauterine Chronic Hypoxia Offspring Rats Fetal Programming Blood Pressure

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of fetal intrauterine chronic hypoxia on the blood pressure of offspring rats. **Methods** Pregnant Sprague-Dawley rats were subjected to hypoxia for 3 hours in low pressure cabin with an oxygen concentration of 10% ±1% from day 7 to day 21 of pregnancy. The body weight, organs weight and blood pressure were determined in the offspring rats. **Results** Fetal hypoxia offspring growth were retarded at birth ($P < 0.01$) but had similar weight to controls at 20 days of age. There were significant declines in liver weight of offspring at birth and 20 days of age and significant decreases in kidney weight of male offspring at 3 and 7 months of age (all $P < 0.05$). Systolic blood pressures were significantly elevated in male hypoxia offspring rats at 5 and 7 months of age as compared with controls (all $P < 0.05$), and aggravated with age. But it was not significantly different from controls in female hypoxia offspring rats. **Conclusion** Intrauterine chronic hypoxia may be a stress factor for fetal programming in rat liver, kidney and vascular tissues. It can induce the increased blood pressure in the male offspring rats, which aggravated with age and displayed a gender related character.

流行病学和动物实验研究显示, 不利的宫内环境及其导致的宫内生长迟缓与日后成年发生高血压病等心血管疾病的危险性增加有一定的关联^[1-3]。因此, 1995年 Barker^[4]首次提出了以胎儿程序控制为核心的心血管疾病的胎儿起源学说, 为心血管疾病的病因学研究开辟了新方向。胎儿宫内生长迟缓的本质主要是由氧和/或营养供应受限所致。迄今对宫内缺氧及其在胎儿程序控制与日后成年疾病的

作用研究甚少, 还没有明确的人类流行病学证据可资证明产前缺氧与日后成年心血管疾病有关, 尚未见宫内慢性缺氧与日后成年高血压病相关联的实验研究报告。本研究采用大鼠宫内慢性缺氧模型动态观测血压变化, 旨在探讨胎儿宫内慢性缺氧对出生后血压的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD大鼠孕鼠 20只, 孕龄 7天, 体重 180~200 g 由福建医科大学实验动物部提供, 按体重因素随机分成两组: 缺氧组和对照组, 每组 10只 (每组各获 10窝仔鼠)。动物饲养于带不锈钢盖底的塑料笼内, 每笼 1只, 自由摄食、饮水, 室温 19℃~23℃,

[收稿日期] 2009-07-13 [修回日期] 2010-07-28

[基金项目] 福建医科大学教授发展基金 (61) 和福建省医学创新课题 (2007-CX-16) 资助

[作者简介] 王振华, 博士, 主治医师, 研究方向为心血管疾病的胎儿起源, Email为 wzh0522@126.com。通讯作者黄子扬, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病与心脏超声, Email为 huangzy@gmail.com。吕国荣, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为超声医学。

湿度 55%, 自然采光。为避免奶水摄入对新生仔鼠生长的影响, 每窝随机留 10 只仔鼠饲养。

1.2 慢性宫内缺氧动物模型

参照文献 [5] 的方法建立宫内缺氧模型。将 SD 大鼠孕鼠 10 只于妊娠第 7 天分批置入低压氧舱内 (舱内用小风扇不断将空气混匀), 舱内氧浓度由氧气监测仪持续监测 (S-450 型, IST-AM 公司生产), 实时调节氧气与氮气流量, 使舱内氧气浓度控制在 $10\% \pm 1\%$ 。舱内 CO_2 与水蒸气分别用钠石灰与 CaCl_2 吸收。缺氧舱壁留有小缝隙与舱外相通, 使舱内气压与大气压平衡。饲料及饮水同常。舱内 CO_2 浓度始终 $< 3\%$, 温度保持于 $19^\circ\text{C} \sim 23^\circ\text{C}$, 维持该状态 3 h 后取出动物, 置于空气中。以后每天重复如上过程直至妊娠第 21 天。另设对照组孕鼠 10 只, 置于低氧舱内, 持续通入空气, 维持舱内氧浓度与舱外一致, 余条件同前。于缺氧 1 h 后, 每组随机选取母鼠 6 只行动脉血气分析, 确认模型是否成功建立。

1.3 子代大鼠体重和主要器官重量监测

子代大鼠于出生第 1 天、第 20 天每窝随机取 1 只仔鼠, 于 3 月龄、7 月龄每窝随机取雌雄各 1 只仔鼠, 测定体重及脑、心、肺、肝、肾等主要脏器的重量。各器官相对重量以器官体重百分比表示。

1.4 子代大鼠血压与心率测定

于 3.5 及 7 月龄, 从子代大鼠每窝随机选取雌雄各 1 只, 用于检测血压。应用大鼠血压计 (RBP-1B 型, 中日友好临床研究所) 采用尾容积法测定清醒状态下大鼠收缩压及心率。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用成组 t 检验, 多组间比较采用完全随机设计的方差分析。

2 结果

2.1 孕鼠缺氧 1 h 后动脉血气分析

与对照组相比, 缺氧组血 PaO_2 、 SaO_2 明显下降 ($P < 0.05$), 而血 PaCO_2 、 pH 值无显著性差异。因此, 采用本方法实验动物可诱发出显著的低氧血症, 而且并不引起明显的 CO_2 潴留与酸中毒 (表 1)。

表 1 孕鼠缺氧 1 h 后动脉血气分析 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分 组	pH 值	PaCO_2 (kPa)	PaO_2 (kPa)	SaO_2
缺氧组	7.26 ± 0.09	7.63 ± 2.27	6.47 ± 2.26^a	0.71 ± 0.16^a
对照组	7.35 ± 0.07	5.52 ± 1.67	10.93 ± 1.30	0.95 ± 0.02

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.2 子代大鼠体重和主要器官重量变化

缺氧组与对照组间每窝仔鼠的数目无显著性差异 (13.1 ± 2.1 比 13.2 ± 2.3 , $P > 0.05$)。缺氧组仔鼠于出生后第 1 天体重显著低于对照组 (4.87 ± 0.51 g 比 5.86 ± 0.31 g, $P < 0.01$), 但于出生后第 20 天, 体重与对照组之间无显著性差异 (52.5 ± 6.0 g 比 53.2 ± 5.6 g, $P > 0.05$)。缺氧组仔鼠脑和心脏重量于出生后第 1 天, 肝脏重量于出生后第 1、20 天显著低于对照组 ($P < 0.05$); 雄性仔鼠肾脏重量于出生后 3、7 月龄显著低于对照组 ($P < 0.05$); 而肺脏重量两组间无显著性差异 (表 2)。

表 2 各组子代大鼠主要器官相对重量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10\%$)

	脑	心	肺	肝	肾
1 天龄					
对照组	4.64 ± 0.67	0.65 ± 0.06	2.32 ± 0.48	5.10 ± 0.40	1.03 ± 0.10
缺氧组	5.52 ± 0.41^b	0.75 ± 0.08^a	2.14 ± 0.24	4.45 ± 0.65^b	1.06 ± 0.12
20 天龄					
对照组	3.84 ± 0.35	0.57 ± 0.06	1.30 ± 0.30	3.68 ± 0.26	1.08 ± 0.06
缺氧组	4.00 ± 0.75	0.59 ± 0.03	1.23 ± 0.16	3.12 ± 0.28^a	1.10 ± 0.06
3 月龄					
对照组 雄性	0.46 ± 0.06	0.28 ± 0.05	0.37 ± 0.04	2.80 ± 0.21	0.58 ± 0.05
对照组 雌性	0.69 ± 0.03	0.33 ± 0.06	0.44 ± 0.07	2.82 ± 0.19	0.59 ± 0.07
缺氧组 雄性	0.47 ± 0.03	0.28 ± 0.04	0.34 ± 0.04	2.79 ± 0.28	0.53 ± 0.04^a
缺氧组 雌性	0.71 ± 0.06	0.32 ± 0.03	0.42 ± 0.05	2.77 ± 0.10	0.57 ± 0.05
7 月龄					
对照组 雄性	0.42 ± 0.10	0.28 ± 0.05	0.32 ± 0.07	2.98 ± 0.39	0.57 ± 0.05
对照组 雌性	0.61 ± 0.07	0.28 ± 0.06	0.40 ± 0.07	2.65 ± 0.98	0.56 ± 0.05
缺氧组 雄性	0.40 ± 0.06	0.27 ± 0.04	0.31 ± 0.05	3.00 ± 0.54	0.51 ± 0.04^a
缺氧组 雌性	0.60 ± 0.06	0.30 ± 0.05	0.39 ± 0.04	2.70 ± 0.40	0.53 ± 0.06

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 子代大鼠血压和心率的变化

除 3 月龄外, 5、7 月龄宫内缺氧子代雄性大鼠血压均比同性别对照组显著升高 ($P < 0.05$), 但宫内缺氧子代雌性大鼠血压与对照组无显著性差异。

缺氧组和对照组均显示血压随年龄的增长而增加, 且 7 月龄血压均比 3 月龄显著增加 ($P < 0.05$)。各组间心率无显著性差异 ($P > 0.05$ 表 3)。

表 3 各组子代大鼠血压和心率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

	缺氧组 (雄性)	对照组 (雄性)	缺氧组 (雌性)	对照组 (雌性)
3 月龄				
血压 (mmHg)	110.0 \pm 4.3	108.5 \pm 4.4	109.0 \pm 5.8	107.0 \pm 5.1
心率 (次/分)	412.0 \pm 11.2	403.2 \pm 12.4	398.4 \pm 13.4	375.2 \pm 13.6
5 月龄				
血压 (mmHg)	117.6 \pm 7.9 ^a	110.4 \pm 5.1	113.0 \pm 4.6	111.3 \pm 3.5
心率 (次/分)	386.2 \pm 12.2	365.5 \pm 16.4	393.2 \pm 10.6	367.0 \pm 16.1
7 月龄				
血压 (mmHg)	122.6 \pm 8.9 ^{ab}	114.4 \pm 5.1 ^b	116.0 \pm 4.6 ^b	116.3 \pm 3.5 ^b
心率 (次/分)	415.9 \pm 10.1	408.1 \pm 12.2	410.3 \pm 17.2	399.7 \pm 20.6

a 为 $P < 0.05$ 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$ 与 3 月龄时比较。

3 讨论

胎儿程序控制是指胎儿对生长发育中关键时期的特定损伤和刺激产生生理、形态和代谢的永久或长期变化的过程。胎儿生长发育中的特定损伤和刺激作用于早期发育关键时期来改变生命基因的表达形式以及细胞表型平衡, 这些改变可能在器官永久存在, 导致组织器官结构与功能改变, 从而引起疾病的程序控制, 对成年后产生健康危害。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且与临床最相关的应激。由于氧是胎儿发育的主要营养, 缺氧与胎儿宫内生长迟缓有确切关系^[6]。最近有研究提示胎儿缺氧暴露也能导致胎儿程序控制并增加成年疾病的危险^[7-9]。本研究采用大鼠宫内慢性缺氧模型, 发现宫内慢性缺氧可引起特异性组织器官的程序控制, 并导致子代大鼠血压升高, 且该作用可能具有性别依赖性。

国内尚未见实验动物宫内缺氧模型的应用。本研究参考我们先前发表在《美国心脏循环生理》的方法建立宫内缺氧模型^[5], 所有实验动物均达到预期效应, 慢性缺氧期间孕鼠血气分析均呈明显缺氧状态, 而且并不引起明显的 CO_2 潴留与酸中毒, 这说明采用本模型可以研究单纯缺氧因素的效应。在胎羊慢性缺氧模型中, 孕羊予氧浓度 12% ~ 13% 缺氧 28 天, 可减少胎羊动脉 PO_2 至 29.7 ~ 19.1 mmHg^[10]; 在胎羊急性缺氧模型中, 降低孕羊吸入气氧浓度至 8% 可导致胎羊血 PO_2 减少至 23.8 ~ 14.6 mmHg^[11]。因此, 本宫内慢性缺氧模型 (氧浓度 10%) 估计应减少胎鼠血 PO_2 至 25 ~ 15 mmHg 之间, 可引起胎鼠明显缺氧, 而且此范围与临床上常见

的导致胎儿缺氧的妊高征、子厥前期^[12]相符。本模型采用孕鼠间断性每日 3 h 缺氧, 诱发胎鼠宫内缺氧。虽然全身缺氧可能导致母鼠神经体液因素的代偿性反应, 但每日长达 22 h 的缺氧间期足够其充分进行恢复, 使可能的神经体液因素对胎儿生长发育的影响减至最小。与母体缺氧可能诱导的母鼠多种神经体液因素改变相比, 胎盘氧与营养物质的转运减弱是影响胎儿生长发育最重要的因素。本研究显示宫内缺氧组大鼠出生体重较对照组显著降低, 提示本缺氧模型成功诱发出明显的胎鼠宫内生长迟缓, 说明胎鼠宫内缺氧是本模型诱导的最主要效应。以上说明本缺氧动物模型可以适用于宫内慢性缺氧的研究, 而且可以较好地模拟临床实际的胎儿宫内缺氧。以往的研究从妊娠中晚期 (第 15 天) 开始缺氧, 本研究从妊娠早中期 (第 7 天) 即开始缺氧持续至妊娠后期 (第 21 天), 以便使缺氧损伤刺激直接作用于心血管系统的关键生长发育窗。直至缺氧结束, 全部动物均未见早产、死胎、母鼠死亡等不良结局, 因此采用本方法建立的大鼠宫内慢性缺氧模型是安全可靠的。

本研究中, 虽然宫内缺氧导致妊娠期胎鼠生长减缓, 但随后即出现赶超生长现象。宫内缺氧子代大鼠于出生后第 20 天体重追赶上对照组, 这与以往报道的胎儿营养不良导致低出生体重子代呈现出生后赶超生长现象类似^[13]。另外, 胎鼠宫内缺氧引起的妊娠期生长减缓伴随主要器官与体重不成比例生长, 心、脑相对重量增加, 而肝脏相对重量减少。这可能是由于胎儿通过血流重新分布对慢性宫内缺氧进行再适应的结果。胎儿心输出以躯干为代价优先

供应到心、脑等重要脏器,从而保护这些脏器的正常生长^[14]。组织器官在胎儿生长发育中的不同妊娠阶段以不同速度生长,在妊娠期经历的快速生长分化时期各不相同,因此每个器官都有自身的关键生长发育窗。组织器官的程序控制可以认为是对不良宫内环境进行必要的生存适应的过程,通过改变胎儿代谢以及内分泌环境重新调节生长发育过程,以确保胎儿的生存。然而,当损伤发生在这个关键、易损时期,这些改变可能在特定器官永久存在,从而对成年后产生健康危害。本研究中,肝脏持续至出生后第20天、肾脏于出生后3月持续至出生后7月的相对重量均较对照组显著降低,提示虽然宫内缺氧导致的低出生体重可通过出生后赶超生长进行补偿,但某些特定脏器的损害却持续存在,这可能是由于宫内慢性缺氧应激作用于肝、肾关键生长发育窗,而引起该脏器特异性组织器官的程序控制所致。这也证实了胎儿慢性缺氧暴露是导致胎儿程序控制的重要应激因素之一。

最近研究发现,妊娠营养不良可导致子代大鼠血压增高^[13]。人类流行病学研究亦显示了低出生体重与高血压病之间的关联^[15]。本研究则发现宫内缺氧子代雄性大鼠血压显著高于对照组。这可能是由于妊娠早期开始的慢性宫内缺氧应激直接作用于心血管系统生长发育的关键时间窗,通过心血管系统的程序控制诱发子代大鼠血压增高。但与营养不良导致子代大鼠血压增高有所不同,本研究发现宫内缺氧仅导致子代雄性组血压增高,其作用呈现性别依赖现象,提示雄性对宫内缺氧引起心血管系统程序控制更为敏感。而且,子代血压从5月龄才开始升高,并呈现逐渐加重趋势,较之宫内营养不良从2月龄即升高为晚。另外,宫内缺氧雄性子代肾脏相对重量于3月龄开始降低,其后才出现血压升高,提示宫内缺氧引起子代血压升高可能与肾脏病变有关^[16]。长期的宫内慢性缺氧导致胎儿生长迟缓,胎儿通过减少底物利用与降低代谢率增强其生存能力。此时,生长迅速的组织器官受到的影响最大。肾脏在妊娠晚期生长发育迅速,此时宫内缺氧暴露可导致肾脏生长发育减缓。而且,由于出生后肾脏细胞丧失了分裂能力来“赶超生长”,胎儿期肾脏细胞增殖减少可永久性地减少细胞数,导致永久性肾单位和功能容量的丧失^[17,18]。因此,推测宫内慢性缺氧可能通过肾脏的程序控制,引起出生后肾功能障碍,激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统,从而导致子代血压升高。这可能是宫内缺氧引起子代血压升高的一个重要原因。其具体机制有待进一步研

究探讨。

总之,本研究通过建立慢性宫内缺氧动物模型,对宫内缺氧与子代血压的关系进行初步研究,发现慢性宫内缺氧可能是引起大鼠肝、肾、心血管组织程序控制的应激因素之一,慢性宫内缺氧可诱发子代雄性大鼠的血压升高。有关慢性宫内缺氧与成年高血压的确切关系、性别因素及具体机制值得进一步深入研究探讨,以丰富心血管疾病胎儿起源学说,为优生优育及高血压病的防治提供新的理论依据。

[参考文献]

- [1] Barker DJ. In utero programming of cardiovascular disease [J]. *Thrombogenesis*, 2000 **53** (2): 555-574
- [2] Langley-Evans SC, Mullen S. Developmental origins of adult disease [J]. *Med Princ Pract* 2010 **19** (2): 87-98
- [3] Moore LG. Fetal growth restriction and maternal oxygen transport during high altitude pregnancy [J]. *High Alt Med Biol* 2003 **4** (2): 141-156
- [4] Barker DJ. The Wellcome Foundation Lecture: The fetal origins of adult disease [J]. *Proc Biol Sci* 1995 **262** (1363): 37-43
- [5] Wang Z, Huang Z, Lu G, et al. Hypoxia during pregnancy in rats leads to early morphological changes of atherosclerosis in adult offspring [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009 **296** (5): 1321-328
- [6] Moore LG. Fetal growth restriction and maternal oxygen transport during high altitude pregnancy [J]. *High Alt Med Biol* 2003 **4** (2): 141-156
- [7] Li G, Xiao Y, Estrella JL, et al. Effect of fetal hypoxia on heart susceptibility to ischemia and reperfusion injury in the adult rat [J]. *J Soc Gynecol Invest* 2003 **10** (5): 265-274
- [8] Hennings DG, Williams SJ, Davidge SL. Increased myogenic tone in 7-month-old adult male but not female offspring from rat dams exposed to hypoxia during pregnancy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005 **289** (2): 674-682
- [9] Williams SJ, Hennings DG, Mitchell M, et al. Effects of maternal hypoxia or nutrient restriction during pregnancy on endothelial function in adult male rat offspring [J]. *J Physiol* 2005 **565** (pt 1): 125-135
- [10] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. *Science* 1998 **281** (5381): 1309-312
- [11] Adams MR, Brown RE, Gibson C, et al. Tyrosine hydroxylase protein content in the medulla oblongata of the fetal sheep brain increases in response to acute but not chronic hypoxia [J]. *Neurosci Lett* 2001 **316** (2): 63-66
- [12] Okamura K, Murotsuki J, Watanabe T, et al. Relation between fetal blood gas levels and the outcome of babies in severe preeclampsia [J]. *Tohoku J Exp Med* 1992 **167** (4): 279-285
- [13] Ozaki T, Nishina H, Hanson MA, et al. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring [J]. *J Physiol* 2001 **530** (Pt 1): 141-152
- [14] Rudolph AM. The fetal circulation and its response to stress [J]. *J Dev Physiol* 1984 **6** (1): 11-19
- [15] Law CM, Egger P, Dada O, et al. Body size at birth and blood pressure among children in developing countries [J]. *Int J Epidemiol* 2001 **30** (1): 52-57
- [16] 叶峰,秦旭平,邓晟,等. 降钙素基因相关肽在肾性高血压早期及培哚普利或哌唑嗪干预后的变化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2004 **12** (6): 635-638
- [17] Hinchliffe SA, Lynch MR, Sargent PH, et al. The effect of intrauterine growth retardation on the development of renal nephrons [J]. *Br J Obstet Gynaecol* 1992 **99** (4): 296-301
- [18] Mackenzie HS, Brenner BM. Fewer nephrons at birth: a missing link in the etiology of essential hypertension [J]? *Am J Kidney Dis* 1995 **26** (1): 91-98 (此文编辑 文玉珊)