

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-09-0696-05

宫内慢性缺氧对子代大鼠血管内皮功能的影响

王振华¹, 黄子扬¹, 吕国荣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] 宫内缺氧; 血管内皮功能; 胎儿程序控制; 高脂血症; 成年期缺氧

[摘要] 目的 探讨胎儿宫内慢性缺氧对子代成年期血管内皮功能的影响及其与性别、高脂血症和再缺氧的关系。方法 采用四因素两水平析因设计, 研究宫内慢性缺氧、性别、高脂血症、成年期再缺氧对血管内皮依赖性舒张功能的影响。建立大鼠宫内慢性缺氧模型、高脂血症模型与成年期再缺氧模型, 观测大鼠血管内皮依赖性舒张功能以及动脉内皮形态学改变。结果 除性别因素外, 宫内缺氧、高脂血症和再缺氧三个因素均可引起内皮依赖性舒张功能减退(均 $P < 0.01$), 其主效应分别为 14.1%、14.2% 和 12.9%, 其中宫内缺氧与高脂血症对血管内皮功能的影响存在协同交互作用 ($F = 4.889, P < 0.05$), 其余因素之间不存在显著性交互作用。宫内缺氧组部分内皮细胞水肿、坏死、甚至脱落, 局部血小板堆积微血栓形成, 内皮下层水肿, 偶见炎症细胞浸润; 正常对照组动脉内皮细胞层结构完整, 未见上述改变。结论 慢性宫内缺氧可引起子代成年期血管内皮功能与结构的损害, 其作用强度与高脂血症、成年期缺氧相近, 且可与高脂血症协同促进血管内皮损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Role of Intrauterine Chronic Hypoxia on Vascular Endothelial Function in Rats Offspring

WANG Zhen-Hua¹, HUANG Zi-Yang¹, and LV Guo-Rong²

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

[KEY WORDS] Intrauterine Hypoxia, Vascular Endothelial Function, Fetal Programming, Hyperlipemia, Adult Hypoxia

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of fetal intrauterine chronic hypoxia on the vascular endothelial function of adult offspring rats and its relation to gender, hyperlipemia and adult hypoxia. **Methods** Four factorial experiment was designed to explore the role of fetal intrauterine chronic hypoxia, gender, hyperlipemia and adult hypoxia on endothelial dependent diastolic function. Four animal models of intrauterine chronic hypoxia, hyperlipemia and adult hypoxia were established in Sprague-Dawley rats. Endothelial dependent diastolic function and histologic changes were determined in the rats offspring. **Results** Except the factor of gender, the other three factors of intrauterine hypoxia, hyperlipemia and adult hypoxia resulted in an impairment of endothelial dependent diastolic function with main effects of 14.1%, 14.2%, 12.9%, respectively (all $P < 0.01$). There was a positive interaction between intrauterine hypoxia and hyperlipemia on endothelial function ($F = 4.889, P < 0.05$), but no other significant interactions among these four factors. Furthermore, marked histological changes such as edema, necrosis and desquamation of vascular epithelium, platelet aggregation and microthrombosis, subendothelial edema and infiltration of inflammatory cells, were observed in the fetal hypoxia offspring but not in the control group. **Conclusion** Intrauterine chronic hypoxia can induce both functional and morphologic impairment in vascular endothelium from adult offspring rats. This effect on the impaired endothelial function was similar to hyperlipemia and adult hypoxia on that and was enhanced with hyperlipemia.

流行病学和动物实验研究表明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关^[1-3]。因此, 1995年 Barker^[4]首次提出了心血管疾病的胎儿起源学说, 为心血管疾病的病因研究开辟了新方向。胎儿宫内生长迟缓的本质是由氧和/或营养供应受限所致。目前的研究主要集中于母体营养不良与胎儿糖皮质激素接触对胎儿程序控制及日后成年疾病的影响。然而, 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证明产前缺氧与日后成年心血管疾病有关。本研究采用慢性宫内缺氧大鼠模型、慢性缺氧

[收稿日期] 2010-03-04 [修回日期] 2010-08-16

[基金项目] 福建医科大学教授发展基金(61)、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, E-mail为 wzh052@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, E-mail为 huagz@gnail.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。

大鼠模型以及高脂血症大鼠模型,应用血管生理学方法测定血管内皮依赖性舒张功能变化,旨在探讨胎儿宫内慢性缺氧对出生后成年期血管内皮功能的影响并研究其与性别、高脂血症和再缺氧的关系。

1 材料和方法

1.1 实验动物与实验设计

Sprague-Dawley (SD)大鼠孕鼠 20只,孕龄 11天,体重 180~200 g 由福建医科大学实验动物部提供。为避免奶水摄入对新生仔鼠生长的影响,每窝超出 10只者,随机留 10只仔鼠饲养。子代大鼠采用完全随机分组的四因素[宫内缺氧(I)、性别(G)、高脂血症(L)和再缺氧(H)]两水平析因设计,共分 16组:正常雌性组($I_0G_0L_0H_0$)、正常雄性组($I_0G_1L_0H_0$)、宫内缺氧雌性组($I_1G_0L_0H_0$)、宫内缺氧雄性组($I_1G_1L_0H_0$)、高脂饮食雌性组($I_0G_0L_1H_0$)、高脂饮食雄性组($I_0G_1L_1H_0$)、再缺氧雌性组($I_0G_0L_0H_1$)、再缺氧雄性组($I_0G_1L_0H_1$)、宫内缺氧雌性高脂饮食组($I_1G_0L_1H_0$)、宫内缺氧雄性高脂饮食组($I_1G_1L_1H_0$)、宫内缺氧再缺氧雌性组($I_1G_0L_0H_1$)、宫内缺氧再缺氧雄性组($I_1G_1L_0H_1$)、高脂饮食再缺氧雌性组($I_0G_0L_1H_1$)、高脂饮食再缺氧雄性组($I_0G_1L_1H_1$)、宫内缺氧再缺氧高脂饮食雌性组($I_1G_0L_1H_1$)、宫内缺氧再缺氧高脂饮食雄性组($I_1G_1L_1H_1$);每组 3只(表 1)。并对年龄、窝别和体重等因素进行匹配。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℃,湿度 55%,自然采光。

表 1. 四因素两水平析因设计的子代大鼠分组情况

是否 宫内缺氧	是否 高脂血症	是否 再缺氧	雌性	雄性
否	否	否	$I_0G_0L_0H_0$	$I_0G_1L_0H_0$
		是	$I_0G_0L_0H_1$	$I_0G_1L_0H_1$
	是	否	$I_0G_0L_1H_0$	$I_0G_1L_1H_0$
		是	$I_0G_0L_1H_1$	$I_0G_1L_1H_1$
是	否	否	$I_1G_0L_0H_0$	$I_1G_1L_0H_0$
		是	$I_1G_0L_0H_1$	$I_1G_1L_0H_1$
	是	否	$I_1G_0L_1H_0$	$I_1G_1L_1H_0$
		是	$I_1G_0L_1H_1$	$I_1G_1L_1H_1$

1.2 慢性宫内缺氧动物模型与慢性大鼠缺氧模型

参考我们先前发表在《美国生理杂志·心脏循环

生理》的方法建立宫内缺氧模型^[5]。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%±1%。舱内 CO₂ 与水蒸气分别用钠石灰与氯化钙吸收。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 CO₂ 浓度始终 < 3%,温度保持于 19~23℃,维持该状态 3h 后取出动物,置于空气中。以后每天重复如上过程直至分娩。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。12月龄子代大鼠予再次缺氧,方法同前,每日缺氧 8h 每周 6天,共持续 4周。

1.3 子代大鼠高脂血症模型

普通饮食喂养子代大鼠至 10月龄,给予高脂饲料(92%基础饲料,2%胆固醇,5%猪油,0.5%胆酸钠,0.2%丙基硫氧嘧啶)喂养至 16月龄。从给予高脂饲料次日起隔天随机测血脂、绘制血脂曲线,确认成功建立模型。

1.4 子代大鼠离体血管舒张功能检测

16月龄子代大鼠,安定、氯胺酮等体积混匀以 2mg/kg 剂量腹腔注射麻醉,取出大鼠胸主动脉,置于盛有 Krebs' s 溶液(NaCl 115.0, KCl 4.6, MgSO₄ 1.16, NaH₂PO₄ 1.16, NaHCO₃ 21.9, CaCl₂ 2.5, 葡萄糖 11.0 单位 mmol/L; pH 7.4)的培养皿中,持续通以 95% O₂、5% CO₂ 混合气。清除血液、脂肪和结缔组织,截取升主动脉同水平长约 4mm 的动脉环,用两个不锈钢钩将血管环固定于 10mL 的器官浴槽中,并连接肌肉张力换能器,经多通道生理信号采集处理系统描记张力变化。浴槽保持 37℃,持续充以 95% O₂、5% CO₂ 混合气,每隔 10~15min 更换槽中 Krebs' s 液一次。予前负荷 1g 平衡 2h,累积给予终浓度分别为 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mmol/L 的去甲肾上腺素(NE)预收缩血管,待张力上升达稳定平台后,累积给予乙酰胆碱(Ach)舒张血管(终浓度为 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³ mmol/L),同步记录反应曲线。计算乙酰胆碱诱导的最大舒张百分比(最大舒张百分比 = Ach 引起的最大张力下降值 / NE 引起的最大张力增加值 × 100%),表示内皮依赖性舒张功能。

1.5 子代大鼠动脉内皮电镜形态学观察

活体取 16月龄大鼠胸主动脉,经 3% 戊二醛-1.5% 多聚甲醛前固定数天(4℃),1% 钨酸-1.5% 亚铁氰化钾后固定 1.5h, PBS 漂洗; 70% 酒精饱和醋

酸铀染液块染,酒精-丙酮梯度脱水,环氧树脂 618 包埋剂包埋。超薄切片 80 nm,醋酸铀、柠檬酸铅各染色 5 min 在日立 Hu-12A 型或飞利浦 EM 208 型透射电镜下观察、摄影。

1.6 统计学方法

使用 SPSS11.0 统计软件包对数据进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用多因素析因设计方差分析,分析各因素的主效应及交互作用。

2 结果

2.1 孕鼠、大鼠缺氧 1 h 后动脉血气分析情况

与对照组相比,缺氧组血 PaO₂、SaO₂ 明显下降,差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$),而血 PaCO₂、pH 值差异无显著性。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 CO₂ 潴留与酸中毒 (表 2)。

表 2 大鼠血气分析情况 (n = 6)

分 组	pH	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
正常对照组	7.35 ± 0.07	5.52 ± 1.67	10.93 ± 1.30	0.95 ± 0.02

a为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较。

2.2 子代大鼠血脂情况

子代大鼠基础血清总胆固醇 (TC) 和甘油三酯 (TG) 浓度分别为 1.41 ± 0.54 mmol/L 和 1.06 ± 0.39 mmol/L; 予高脂饮食后血清 TC、TG 水平分别由第 3 日和第 8 日开始升高,此后逐步增高,于第 15 日后达稳定平台。第 15 日血清 TC、TG 浓度分别

为 12.14 ± 3.58 mmol/L 和 2.05 ± 0.49 mmol/L,与基础血脂相比,均显著增高 (均 $P < 0.05$),以血清 TC 增高尤为明显。

2.3 子代大鼠动脉内皮功能测定

各因素 (宫内缺氧、性别、高脂血症、再缺氧) 数据均符合正态分布和方差齐性。除性别因素外,宫内缺氧、高脂血症和再缺氧三个因素均可引起内皮依赖性舒张功能减退 (均 $P < 0.01$; 表 3), 主效应分别为 14.1%、14.2%、12.9%, 其中宫内缺氧与高脂血症对血管内皮功能的影响存在交互作用 ($F = 4.889, P < 0.05$), 其余因素之间不存在显著性交互作用 (表 4)。

2.4 子代大鼠动脉内皮结构形态学表现

电镜下见正常对照组动脉内皮细胞层结构完整; 宫内缺氧组部分内皮细胞水肿、坏死、甚至脱落、内皮下层水肿,局部血小板堆积微血栓形成,偶见炎症细胞浸润 (图 1)。

表 3 大鼠胸主动脉环内皮依赖性舒张功能

是否 宫内缺氧	是否 高脂血症	是否 再缺氧	雌性	雄性
否	否	否	87.7% ± 9.5%	77.8% ± 11.0%
		是	42.2% ± 6.2%	54.3% ± 21.9%
	是	否	44.6% ± 32.1%	41.7% ± 10.9%
		是	45.0% ± 15.2%	36.4% ± 10.9%
是	否	否	38.9% ± 18.7%	51.3% ± 7.6%
		是	32.6% ± 7.2%	45.2% ± 6.1%
	是	否	27.8% ± 4.2%	55.1% ± 5.6%
		是	33.5% ± 18.7%	32.7% ± 19.5%

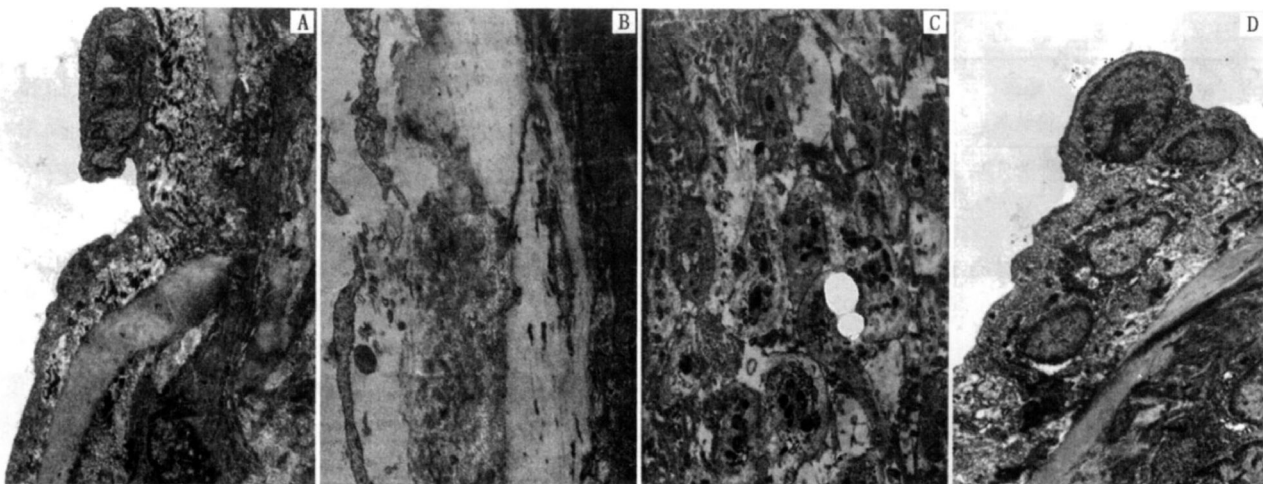


图 1 子代大鼠动脉内皮结构的透射电镜图 A 为正常对照组 (×4800), B 为宫内缺氧组内皮细胞水肿、坏死、甚至脱落、内皮下层水肿 (×7000), C 为宫内缺氧组局部血小板堆积微血栓形成 (×9000), D 为宫内缺氧组炎症细胞浸润 (×4800)。

表 4 宫内缺氧、性别、高脂血症和再缺氧对血管内皮依赖性舒张功能的影响的多因素析因设计方差分析

方差来源	自由度	F 值	P 值
宫内缺氧	1	10 905	0 002
性别	1	1 532	0 225
高脂血症	1	10 993	0 002
再缺氧	1	9 115	0 005
宫内缺氧 + 性别	1	3 165	0 085
宫内缺氧 + 高脂血症	1	4 889	0 034
宫内缺氧 + 再缺氧	1	1 711	0 200
性别 + 高脂血症	1	0 128	0 723
性别 + 再缺氧	1	0 117	0 734
高脂血症 + 再缺氧	1	3 060	0 090
宫内缺氧 + 性别 + 高脂血症	1	0 195	0 662
宫内缺氧 + 性别 + 再缺氧	1	1 668	0 206
宫内缺氧 + 高脂血症 + 再缺氧	1	4 016	0 054
性别 + 高脂血症 + 再缺氧	1	2 680	0 111
宫内缺氧 + 性别 + 高脂血症 + 再缺氧	1	< 0 001	0 983

$R^2 = 0.629$, $F = 3.612$, $P = 0.001$.

3 讨论

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。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。目前已证实妊娠营养不良可致子代大鼠内皮功能异常^[7-9];最近亦有报道宫内缺氧可导致新生大鼠内皮功能损伤^[10],但仅观测到出生 12 h 内的内皮功能情况,且未对其与成年后其他引起内皮功能损伤的因素相互关系进行探讨。本研究采用 SD 大鼠动物模型,持续观测至动物成年期(16 月龄,相当于人类 40~50 岁),首次就宫内缺氧对子代成年期内皮功能的影响及其与成年后高脂血症、再缺氧的关系进行研究。

本研究采用我们先前建立的慢性大鼠宫内缺氧模型^[5]、慢性大鼠缺氧模型与高脂血症模型,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 CO₂ 潴留与酸中毒;子代大鼠予高脂饮食第 8 天后即出现稳定的血浆高脂水平(以胆固醇升高为主)。因此,采用本方法建立的大鼠实验模型是准确可靠的。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。心血管系统在妊娠早期进行重要的生长发育,于妊娠中期已经很好形成,在这个关键生长发育窗出现损伤刺

激时,可改变细胞表型平衡,或诱导妊娠期不适合的基因表达,从而引起心血管疾病的程序控制。因此,本研究从妊娠早期(第 7 天)即开始缺氧并持续至妊娠后期(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。

在众多的多因素实验设计中,析因设计结果最可信,属于完全设计。该实验设计要求各组例数相等,每组至少 2 例^[11]。本研究采用四因素两水平析因设计,对宫内缺氧、性别、成年后高脂血症和再缺氧 4 个因素对内皮功能的影响进行多因素分析。血管内皮细胞具有许多重要的调节功能,其中最重要的功能是通过释放内皮源性因子调节血管平滑肌细胞以维持血管张力。内皮依赖性血管舒张功能对维持血管张力起关键作用^[12]。目前已证实许多因素可影响内皮功能,性别、高脂血症、缺氧等均与内皮功能损伤有关^[13-15]。本研究亦显示类似结论,除性别因素外,高脂血症、缺氧均可导致内皮依赖性舒张功能损伤。此外,本研究也提示,单独的性别因素并不能引起内皮功能紊乱,不同性别间的内皮功能无明显差异,可能需合并其他危险因素方可体现出其对内皮功能的影响。

本研究显示,宫内缺氧可导致成年期大鼠内皮功能异常,其对内皮功能损伤的主效应大小与高脂血症、成年期再缺氧相似,提示宫内缺氧对子代内皮功能的影响不仅存在于新生期,而且尚可持续作用至成年期,它与高脂血症、成年期缺氧对成年期内皮功能损伤的作用强度相近,因此可能是引起成年期内皮损伤的另一个重要的独立危险因素。同时,本研究也显示,与血管内皮功能异常相伴,血管内皮结构出现相应的病理变化,提示宫内缺氧等因素不仅引起血管内皮功能异常,还导致内皮结构的病理性损伤。此外,本研究还发现宫内缺氧与高脂血症之间对内皮功能损伤存在协同交互作用,这可能是由于宫内缺氧通过胎儿血管组织程序控制机制,导致血管组织结构与功能的永久改变,于出生后可持续存在并终生易损,在成年后高脂血症应激作用下协同促进内皮功能损伤,具体机制有待以后进一步研究。另外,本研究也发现宫内缺氧与性别及成年期再缺氧不存在交互作用,提示宫内缺氧预设的血管内皮功能易损性对性别及成年后再缺氧等危险因素不敏感。

总之,本研究通过建立慢性大鼠宫内缺氧模型、慢性大鼠缺氧模型以及大鼠高脂血症动物模型,观测血管内皮依赖性舒张功能和内皮形态学的改变,发现慢性宫内缺氧可引起子代成年期内皮功能与结

构的损害, 并可与高脂血症协同促进内皮损伤。有关慢性宫内缺氧与成年血管内皮功能的确切关系及其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]. *Thromb Haemostasis*, 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] Brawley L, Torrens C, Anthony FW, et al. Glycine rectifies vascular dysfunction induced by dietary protein imbalance during pregnancy [J]. *J Physiol*, 2004, **554** (Pt 2): 497-504
- [8] Holmans K, Geber R, Meurrens K, et al. Maternal food restriction in the second half of pregnancy affects vascular function but not blood pressure of rat female offspring [J]. *Br J Nutr*, 1999, **81** (1): 73-79
- [9] Brawley L, Itoh S, Torrens C, et al. Dietary protein restriction in pregnancy induces hypertension and vascular defects in rat male offspring [J]. *Pediatr Res*, 2003, **54** (1): 83-90
- [10] Williams SJ, Campbell ME, Mullen 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** (2): 360-367
- [11] 郭祖传. 医学统计学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2001: 126
- [12] 李建军. 血管内皮功能障碍及其检测与防治[J]. 中国动脉硬化杂志, 2001, **9** (2): 175-178
- [13] Orshal M, Khalil RA. Gender, sex hormones and vascular tone [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004, **286** (2): 233-249
- [14] 伍海涛, 熊小明, 王双喜, 等. 银杏叶提取物对高脂饮食所致血管内皮功能损伤的保护及与对氧磷酶活性的关系[J]. 中国动脉硬化杂志, 2004, **12** (4): 410-414
- [15] Kraiczi H, Caidah I K, Samuelsson A, et al. Impairment of vascular endothelial function and left ventricular filling: association with the severity of apnea-induced hypoxemia during sleep [J]. *Chest*, 2001, **119** (4): 1085-091

(此文编辑 许雪梅)