

妊娠期缺氧对子代大鼠心脏局部 ACE-Ang II-AT₁ 轴的影响

王凌星¹, 黄子扬², 李美美²

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

[关键词] 妊娠期缺氧; 心脏; 局部血管紧张素转化酶-血管紧张素 II-血管紧张素 II 1 型受体轴

[摘要] **目的** 研究妊娠不同时期缺氧对成年雄性子代大鼠心脏局部血管紧张素转化酶-血管紧张素 II-血管紧张素 III 型(ACE-AngII-AT₁)受体轴的影响。**方法** 将 SD 孕鼠随机分为妊娠早期(G1, 妊娠第 3 天)开始缺氧组、中期(G2, 妊娠第 9 天)开始缺氧组、后期(G3, 妊娠第 15 天)开始缺氧组和空白对照组(G0), 每组各 6 只。缺氧组每日置于氧气浓度为 10% ± 1% 的低压氧舱 3 小时, 直至自然分娩。各组雄性子代大鼠于 3 月龄及 5 月龄时酶联免疫吸附测定(ELISA)检测心脏局部 AngII, 逆转录 PCR 检测心脏 AT₁、AT₂、胶原 I 和胶原 III mRNA, Western blot 检测心脏 ACE、AT₁、AT₂、磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2(phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2, pERK1/2)蛋白表达情况。**结果** 妊娠早、中期缺氧引起 3 月龄雄性子代大鼠心脏局部 ACE、AngII 的升高(均 $P < 0.05$), 以及 3 月龄和 5 月龄子代大鼠心脏 AT₁ 受体 mRNA 及蛋白表达增加(均 $P < 0.05$), 并使 5 月龄子代大鼠心脏 AT₂ 受体 mRNA 及蛋白表达减少($P < 0.05$), 而妊娠晚期缺氧仅会改变 5 月龄子代大鼠心脏 AT₁ 和 AT₂ 受体表达(均 $P < 0.05$)。妊娠中期缺氧引起 3 月龄和 5 月龄雄性子代大鼠心脏局部 pERK1/2、胶原 I mRNA 和胶原 III mRNA 表达增加(均 $P < 0.05$), 妊娠早期缺氧仅引起 5 月龄子代大鼠心脏局部 pERK1/2、胶原 I mRNA 和胶原 III mRNA 表达增加(均 $P < 0.05$), 而妊娠晚期缺氧则无影响(均 $P > 0.05$)。**结论** 妊娠期缺氧会引起成年雄性子代大鼠心脏局部 ACE-AngII-AT₁ 轴活化, 以妊娠早期或中期开始的缺氧对该轴影响最明显, 并促进了下游 ERK 的磷酸化和心脏胶原沉积。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Influence of Hypoxia During Pregnancy on Cardiac ACE-Ang II-AT₁ Axis in the Adult Offspring

WANG Ling-Xing¹, HUANG Zi-Yang², and LI Mei-Mei²

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

[KEY WORDS] Hypoxia During Pregnant; Cardiac; Tissue ACE-Ang II-AT₁ Axis

[ABSTRACT] **Aim** To evaluate whether the timing of maternal hypoxia during pregnancy influenced cardiac angiotensin converting enzyme (ACE) - angiotensin II (Ang II) - angiotensin type 1 receptor (AT₁) in the adult offspring.

Methods Pregnant rats were randomly assigned to maternal hypoxia group starting from early period of pregnancy (G1, day 3 to 21 of pregnancy), group starting from middle period of pregnancy (G2, day 9 to 21 of pregnancy), group starting from late period of pregnancy (G3, day 15 to 21 of pregnancy), or control group. There were 6 rats for each group.

Rats of maternal hypoxia groups were subjected to hypoxia for 3 hours in low pressure cabin with an oxygen concentration of 10% ± 1%. The level of cardiac Ang II was detected by Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in the adult male offspring at the age of 3 months and 5 months. The mRNA expression levels of cardiac AT₁, AT₂, collagen I and collagen III were measured by reverse transcription PCR. The protein levels of cardiac ACE, AT₁, AT₂ and phosphorylated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (pERK1/2) were also detected.

Results Maternal hypoxia from day 3 to 21, or from day 9 to 21 of pregnancy induced increased expression levels of cardiac ACE and Ang II in male offspring at the age of

[收稿日期] 2013-06-05

[基金项目] 福建省医学创新课题(2007-CX-16), 泉州市技术与开发项目(2012Z35)和院苗圃基金(2012MP65)资助

[作者简介] 王凌星, 博士, 副主任医师, 研究方向为心脑血管疾病的胎儿起源, E-mail 为 lxingwan@gmail.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 huagzy@gmail.com。李美美, 硕士, 研究方向为心血管疾病。

3 months (all $P < 0.05$). They also induced increased mRNA expression levels and protein levels of cardiac AT_1 in male offspring at the age of 3 months and 5 months (all $P < 0.05$). And they lead to decreased mRNA expression level and protein level of cardiac AT_2 in male offspring at the age of 5 months (all $P < 0.05$). But maternal hypoxia from day 15 to 21 affected the expression of AT_1 and AT_2 only in male offspring at the age of 5 months (all $P < 0.05$). Maternal hypoxia from day 9 to 21 lead to increased protein levels of cardiac pERK1/2 and increased mRNA expression levels collagenI and collagen III (all $P < 0.05$). Maternal hypoxia from day 3 to 21 increased the expression of cardiac pERK1/2, collagenImRNA and collagen III mRNA (all $P < 0.05$), but maternal hypoxia from day 15 to 21 didn't affect the expression of cardiac pERK1/2, collagenImRNA and collagen III mRNA (all $P > 0.05$). **Conclusions** Hypoxia during pregnancy will lead to the activation of cardiac ACE - AngII - AT_1 axis in adult male offspring, which is most obvious when maternal hypoxia starts from day 9 to 21, or from day 9 to 21 of pregnancy, and will lead to the phosphorylation of ERK and cardiac collagen deposition.

心脏内存在局部肾素血管紧张素系统(RAS)^[1]。AngII在ACE的作用下由AngI(angiotensinI)生成,是强的生物活性物,与两个主要受体相结合,即 AT_1 (angiotensin type 1, AT_1)受体和血管紧张素II型(AT_2)受体。AngII主要经 AT_1 受体发挥作用,因此这一经典轴可被称为血管紧张素转化酶-血管紧张素II-血管紧张素III型(angiotensin converting enzyme - angiotensinII- angiotensin type 1, ACE-AngII- AT_1)受体轴ACE-AngII- AT_1 轴。已有研究表明妊娠期蛋白质受限会引起心脏局部RAS改变^[2],提示宫内不良环境对胎儿RAS系统具有程序化调控作用,且这种影响可维持至成年。而妊娠期缺氧对子代成年大鼠心脏局部RAS的影响尚不明确,本研究旨在探讨妊娠期缺氧的时机对子代大鼠心脏ACE-AngII- AT_1 轴的影响,及该轴对成年子代心脏胶原沉积的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和实验设计

健康Sprague-Dawley(SD)雌性12周龄大鼠,体重200~250 g,共24只,健康雄性12周龄大鼠9只,体重300~350g,购自上海斯莱克实验动物有限公司。大鼠按雌:雄1:1比例随机合笼,以发现阴栓为妊娠第0天。孕鼠随机分为4组,即妊娠早期(G1,妊娠第3天)开始缺氧组、中期(G2,妊娠第9天)开始缺氧组、后期(G3,妊娠第15天)开始缺氧组和空白对照组(G0),每组各6只。动物饲养条件:光照7:00am~7:00pm,温度为22±1℃,自由摄取食物和水。

1.2 慢性宫内缺氧模型

参考王振华等^[3, 4]的方法,将SD孕鼠分批置入低氧舱内,低氧舱从两个进气孔通入氧气,另两个进气孔通入氮气,两台内置小电扇不断将空气混匀,出气通路使用单向活瓣,并预留小缝隙与箱外大气相通,使箱内外大气压平衡。箱内放有碱石灰和氯化钙以吸收水蒸汽和二氧化碳。S-450型氧气

检测仪(IST-AIM公司生产)置于箱内中央,实时调节O₂和N₂的流量,将舱内O₂浓度控制在10%±1%。缺氧3小时后取出动物,置于空气中。以后每天重复如上过程直至分娩(妊娠第21天)。对照组孕鼠置于同样的缺氧箱内,持续通入空气,维持舱内氧浓度与舱外一致,置于箱内的时间同缺氧组。

所有孕鼠均自然分娩,仔鼠每窝随机留8只饲养,以避免奶水摄入不足对新生仔鼠生长的影响。子代大鼠满3周后断乳,仅保留雄性子代大鼠(2~3只/窝)。

1.3 雄性子代大鼠心脏标本收集

子代大鼠分别于3月龄及5月龄时测体重并处死,每个时间点每组各6只,取心脏,留取部分左心室心肌组织置于10%的甲醛固定液中4℃固定12 h,常规石蜡包埋,剩余标本液氮速冻后-70℃冰箱保存。

1.4 ELISA测定心脏组织Ang II

取部分液氮冻存心肌称重,碾磨裂解、匀浆,低温离心后,取上清液测定。按试剂盒步骤依次加入不同试剂。最后于酶标检测仪上492 nm处,以空白对照孔调零后测其OD值,根据软件及公式计算出大鼠心肌组织Ang II浓度。

1.5 检测心肌组织 AT_1 、 AT_2 、胶原I和胶原III mRNA表达

取-70℃冰箱保存的大鼠心肌组织,Trizol试剂抽提总RNA,使用逆转录酶反应获得cDNA,并分别应用上下游引物进行PCR扩增。PCR参数为:94℃预变性3 min,94℃30 s,51℃30 s,72℃45 s,最后72℃延伸5 min,30个循环。 AT_1 、 AT_2 、胶原I、胶原III和GAPDH(磷酸甘油醛脱氢酶)引物序列见表1。取PCR反应产物进行2%琼脂糖凝胶电泳,光密度扫描后经Quantity one软件分析,结果以检测基因/GAPDH的积分光密度比值表示。

1.6 Western blot检测心肌组织ACE、 AT_1 、 AT_2 和pERK1/2蛋白

取-70℃冰箱保存的大鼠心肌组织提取蛋白,BCA法测蛋白浓度,经聚丙烯酰胺琼脂糖凝胶电泳

后,转移到 NC 膜上,5% 脱脂奶粉封闭后加入一抗 4℃ 过夜,洗涤后加入二抗孵育。ECL 显影,扫描后用凝胶成像处理系统比较各组蛋白表达的相对水平,结果以目的带/ β -actin 表达强度比或 pERK1/2 与 ERK1/2 表达强度比表示。

表 1. 各基因 PCR 扩增的特异性引物序列

Table 1. Primer sequence of genes for reverse transcription PCR

基因名称	引物序列	扩增片段长度 (bp)
AT ₁ ^[4]	上游: 5'- AAAGGGCAAGGAACCTTTGT-3'	277
	下游: 5'- CAGATGCGAAATAACGCAGA-3'	
AT ₂ ^[4]	上游: 5'-GATGCTGCTGCTGAGAAAGA-3'	313
	下游: 5'-CAATGTCATAGGCTGCGATA-3'	
胶原I ^[5]	上游: 5'-TTCACCTACAGCAGCTTGT-3'	196
	下游: 5'-TTGGGATGGAGGGAGTTTAC-3'	
胶原Ⅲ ^[6]	上游:5'-GATGCTGTGCTGAGAAGA-3'	397
	下游:5'-CAATGTCATAGGCTGCGATA-3'	
GAPDH	上游:5'-TCGTGGAGTCTACTGGCGTCTT-3'	442
	下游:5'-ACCGATACATTGGGGGTAGAA-3'	

1.7 免疫组化检测心肌组织 pERK1/2 表达

取石蜡包埋的心肌组织连续切片(4 μ m 厚),常规脱蜡水化,抗原修复,pERK1/2(1:500)抗体孵育,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片,显微镜下观察。

1.8 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,检验水准以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,当方差分析得 $P < 0.05$ 时,进一步选用 SNK 检验法进行均数间的两两比较。

2 结 果

2.1 雄性子代大鼠体重和心脏组织 Ang II 水平

3 月龄和 5 月龄雄性子代大鼠各组间体重无显著差异(3 月龄:G1 428.09 \pm 44.66 g,G2 362.65 \pm 47.33 g,G3 395.87 \pm 17.79 g,G0 408.71 \pm 47.06 g;5 月龄:G1 550.69 \pm 57.43 g,G2 504.37 \pm 63.18 g,G3 574.76 \pm 105.29 g,G0 559.25 \pm 37.74 g)。

3 月龄雄性子代大鼠,G1 及 G2 组心肌组织 Ang II 水平均显著高于 G0 组,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),G2 组升高最明显;而 G3 与 G0 组比较,局部 Ang II 水平差异无显著性。5 月龄雄性子代大鼠,G1、G2、G3 与 G0 组比较,心肌组织 Ang II 水平无显著差异(表 2)。

表 2. 3 月龄和 5 月龄雄性子代大鼠各组心肌组织 Ang II 水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2. The level of cardiac Ang II in male adult male offspring at the age of 3 months and 5 months

分 组	n	3 月龄	5 月龄
G1 组	6	5.69 \pm 1.10 ^a	5.38 \pm 0.64
G2 组	6	6.01 \pm 0.63 ^b	5.70 \pm 0.62
G3 组	6	4.82 \pm 0.58	5.43 \pm 0.33
G0 组	6	4.53 \pm 0.71	5.16 \pm 0.22

a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与 G0 组比较。

2.2 雄性子代大鼠心脏组织 AT₁、AT₂、胶原 I、胶原Ⅲ mRNA 表达的情况

在 3 月龄雄性子代大鼠,G1 和 G2 组心脏组织 AT₁ mRNA 的表达明显高于 G0 组(均 $P < 0.05$),而 G3 组与 G0 组间无明显差异;各组心脏组织 AT₂ mRNA 表达无明显差异(图 1A,表 3)。在 5 月龄雄性子代大鼠,G1、G2 和 G3 组心脏组织 AT₁ mRNA 的表达明显高于 G0 组,(均 $P < 0.05$),以 G2 组升高最明显;G1、G2 和 G3 组心脏组织 AT₂ mRNA 的表达明显低于 G0 组(均 $P < 0.05$;图 1B;表 3)。

在 3 月龄雄性子代大鼠,G2 组心肌组织胶原I、胶原Ⅲ mRNA 表达较 G0 组显著增加($P < 0.05$),而 G1、G3 组与 G0 组间无明显差异(图 2A,表 4)。在 5 月龄雄性子代大鼠,G1 组和 G2 组的心肌组织胶原I、胶原Ⅲ mRNA 表达较 G0 组显著增加($P < 0.05$),而 G3 组与 G0 组间无明显差异(图 2 和表 4)。

表 3. 3 月龄和 5 月龄雄性子代大鼠各组心肌组织 AT₁、AT₂ mRNA 相对表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 3. The expression of cardiac AT₁ mRNA and AT₂ mRNA in adult male offspring at the age of 3 months and 5 months

分组	n	3 月龄		5 月龄	
		AT ₁ mRNA	AT ₂ mRNA	AT ₁ mRNA	AT ₂ mRNA
G1 组	6	0.56 \pm 0.07 ^a	0.60 \pm 0.09	0.91 \pm 0.08 ^a	0.27 \pm 0.07 ^{bc}
G2 组	6	0.58 \pm 0.11 ^a	0.65 \pm 0.08	1.08 \pm 0.14 ^{bcd}	0.30 \pm 0.03 ^{bc}
G3 组	6	0.43 \pm 0.12	0.63 \pm 0.08	0.90 \pm 0.11 ^a	0.40 \pm 0.09 ^a
G0 组	6	0.39 \pm 0.11	0.62 \pm 0.05	0.75 \pm 0.06	0.61 \pm 0.04

a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与 G0 组比较;c 为 $P < 0.05$,与 G3 组比较;d 为 $P < 0.05$,与 G1 组比较。

2.3 雄性子代大鼠心脏组织 ACE、AT₁ 和 AT₂ 蛋白的 Western blot 检测结果

在 3 月龄雄性子代大鼠心脏组织中,G1、G2 组的 ACE 和 AT₁ 蛋白表达均显著高于 G0 组($P < 0.05$),并以 G2 组升高最明显;各组的 AT₂ 蛋白表达无明显差异(图 3A,表 5)。5 月龄雄性子代大鼠心脏组织中,各组 ACE 蛋白表达无明显差异;G1、G2 和 G3 组 AT₁ 蛋白明显高于 G0 组(均 $P <$

0.05),以G2组升高最明显;G1、G2和G3组AT₂蛋白均明显低于G0组($P<0.05$;图3和表5)。

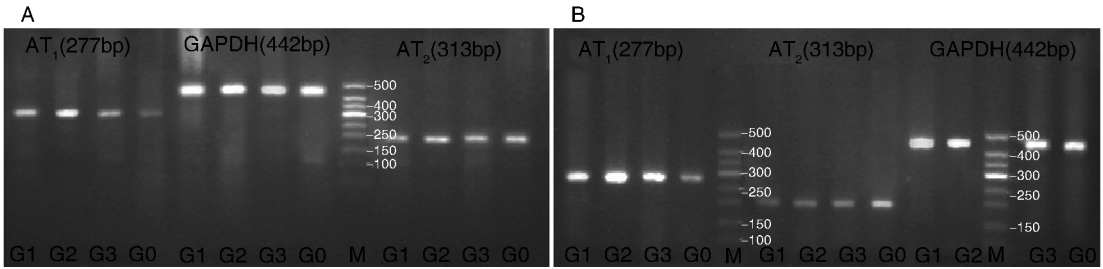


图1. 3月龄(A)及5月龄(B)雄性子代大鼠心肌组织AT₁、AT₂mRNA表达情况

Figure 1. The expression of cardiac AT₁ mRNA and AT₂ mRNA in adult male offspring at the age of 3 months (A) and 5 months (B)

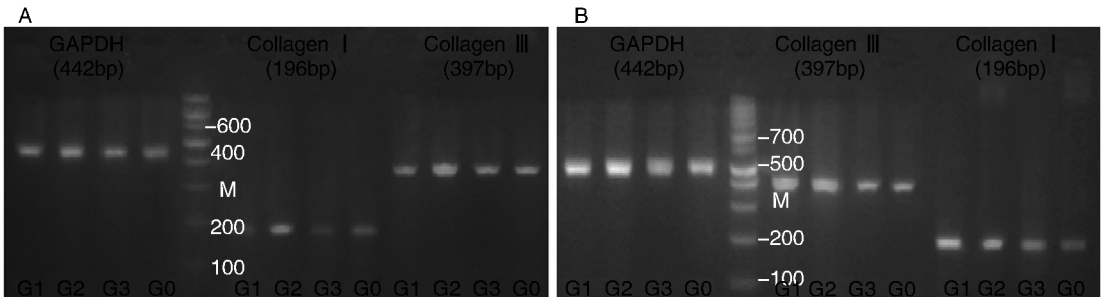


图2. 3月龄(A)及5月龄(B)雄性子代大鼠心肌组织胶原I、胶原ⅢmRNA表达情况

Figure 2. The expression of cardiac collagen I mRNA and collagen III mRNA in adult male offspring at the age of 3 months (A) and 5 months (B)

表 4. 3月龄和5月龄雄性子代大鼠各组心肌组织胶原I、胶原Ⅲ mRNA 相对表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4. The expression of cardiac collagen I mRNA and collagen III mRNA in adult male offspring at the age of 3 months and 5 months

分 组	n	3 月龄		5 月龄	
		胶原 I mRNA	胶原ⅢmRNA	胶原 I mRNA	胶原ⅢmRNA
G1 组	6	0.52 ± 0.05	0.94 ± 0.10	0.72 ± 0.11 ^a	1.63 ± 0.12 ^a
G2 组	6	0.59 ± 0.09 ^a	0.97 ± 0.09 ^a	0.67 ± 0.14 ^a	1.64 ± 0.12 ^a
G3 组	6	0.49 ± 0.04	0.80 ± 0.13	0.39 ± 0.12	0.94 ± 0.06
G0 组	6	0.47 ± 0.09	0.78 ± 0.13	0.25 ± 0.09	0.92 ± 0.14

a 为 $P<0.05$,与G0组比较。

表 5. 3月龄和5月龄雄性子代大鼠心肌组织ACE、AT₁、AT₂ 蛋白相对表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5. The expression of cardiac ACE、AT₁ and AT₂ in adult male offspring at the age of 3 months and 5 months

分 组	n	3 月龄			5 月龄		
		ACE	AT ₁	AT ₂	ACE	AT ₁	AT ₂
G1 组	6	0.87 ± 0.05 ^a	0.90 ± 0.14 ^a	1.80 ± 0.08	0.26 ± 0.11	0.91 ± 0.16 ^a	0.82 ± 0.11 ^b
G2 组	6	0.99 ± 0.13 ^{bc}	0.97 ± 0.11 ^b	1.77 ± 0.04	0.27 ± 0.14	1.16 ± 0.23 ^{bc}	0.83 ± 0.08 ^b
G3 组	6	0.76 ± 0.05	0.69 ± 0.16	1.78 ± 0.06	0.27 ± 0.08	0.89 ± 0.13 ^a	0.92 ± 0.15 ^a
G0 组	6	0.74 ± 0.09	0.65 ± 0.22	1.80 ± 0.06	0.25 ± 0.06	0.65 ± 0.08	1.14 ± 0.21

a 为 $P<0.05$,b 为 $P<0.01$,与G0组比较;c 为 $P<0.05$,与G3组比较。

2.4 雄性子代大鼠心脏组织 pERK1/2 蛋白的免疫组化和 Western blot 检测结果

在3月龄雄性子代大鼠心肌组织中 pERK1/2 主要表达于细胞核内,使核呈现棕黄色,在G2组的免疫

组化结果中可见大量心肌细胞核呈现棕黄色(图4A)。Western blot 检测示 G2 组 pERK1/2 蛋白表达明显高于G0组($P<0.05$),G1和G3组 pERK1/2 蛋白表达与G0组无明显差异(图5A和表6)。

5 月龄雄性子代大鼠,G1、G2、G3 组心肌细胞核中均可见棕黄色 pERK1/2 表达(图 4B)。Western blot 检测示 G1 和 G2 组 pERK1/2 蛋白表达明显高于 G0 组(均 $P < 0.05$),其中以 G2 组升高最明显,而 G3 与 G0 组无明显差异(图 5B 和表 6)。

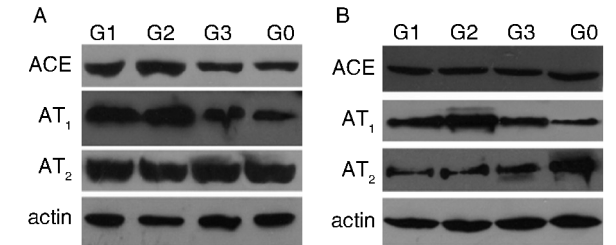


图 3. 3 月龄 (A) 及 5 月龄 (B) 雄性子代大鼠心肌组织 ACE、AT₁、AT₂ 蛋白表达情况

Figure 3. The expression of cardiac ACE、AT₁ and AT₂ in adult male offspring at the age of 3 months (A) and 5 months (B)

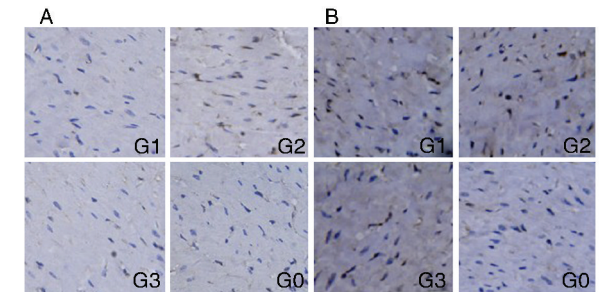


图 4. 3 月龄 (A) 及 5 月龄 (B) 雄性子代大鼠心肌组织 pERK1/2 蛋白免疫组化检测

Figure 4. The expression of cardiac pERK1/2 in adult male offspring at the age of 3 months (A) and 5 months (B)

表 6. 3 月龄和 5 月龄雄性子代大鼠各组心肌组织 pERK1/2 蛋白相对表达情况($\bar{x} \pm s$)

Table 6. The level of cardiac Ang II in male adult male offspring at the age of 3 months and 5 months			
分 组	n	3 月龄	5 月龄
G1 组	6	1.47 ± 0.23	0.18 ± 0.02 ^a
G2 组	6	1.65 ± 0.26 ^a	0.20 ± 0.03 ^b
G3 组	6	1.27 ± 0.11	0.13 ± 0.02
G0 组	6	1.11 ± 0.20	0.08 ± 0.02

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与 G0 组比较。

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,与临床最相关的应激^[8]。动物模型提示雄性子代对发育过程中的伤害更敏感,而雌性动物表现出对营养不良、氧气供应不足,或两者皆有的保护作用^[9]。因此我们的实验以雄性

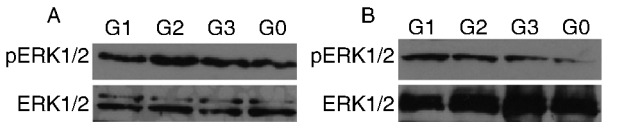


图 5. 3 月龄 (A) 及 5 月龄 (B) 雄性子代大鼠心肌组织 pERK1/2 蛋白表达情况

Figure 5. The expression of cardiac pERK1/2 in adult male offspring at the age of 3 months (A) and 5 months (B)

子代大鼠为研究对象。

在本实验中,我们发现妊娠期缺氧改变了成年子代大鼠心脏局部 RAS 系统。妊娠早、中期缺氧引起 3 月龄雄性子代大鼠心脏局部 ACE、AngII 的升高,以及 3 月龄和 5 月龄雄性子代大鼠心脏 AT₁ 受体表达增加,并使 5 月龄子代大鼠心脏 AT₂ 受体表达减少,而妊娠晚期缺氧仅会改变 5 月龄雄性子代大鼠心脏 AT₁ 和 AT₂ 受体表达。这一结果提示妊娠期缺氧对成年子代大鼠的心脏局部 RAS 具有程序化调控的作用,引起 ACE-AngII-AT₁ 轴活化,且这种调控与妊娠期缺氧的时机有关,妊娠早期或中期开始的缺氧对子代大鼠心脏局部 RAS 系统的影响最明显。大鼠心血管系统在胚胎的第 9 天至第 13 天处于最大分化和发育阶段^[10],可以认为该时间窗是大鼠心血管系统发育的关键时间窗,因此妊娠早期或中期开始的缺氧会明显改变胎鼠心血管系统发育关键时间窗前后的内环境,从而明显影响成年子代大鼠心脏局部 RAS 系统。此外,我们还注意到妊娠早、中期缺氧组子代心脏局部 ACE、AngII 在 3 月龄升高,但在 5 月龄恢复正常,提示随着年龄增加,妊娠期缺氧造成的指标改变具有一定的可逆性。而与此同时,妊娠早、中期缺氧组有些指标,如 AT₁ mRNA 及蛋白在 3 月龄时是正常的,在 5 月龄时则出现了降低,这说明妊娠期缺氧可能产生长远的不利影响。

在成年心脏组织,局部生成的 AngII 以自分泌和/或旁分泌的形式产生各种效应,影响胶原转换^[11]。大鼠和人类心脏成纤维细胞的体外实验表明 AngII 经 AT₁ 受体刺激纤维胶原合成^[12]。ERK 是丝裂素活化蛋白激酶 (MAPK) 家族中最具有特征的亚家族成员之一,由 p42ERK 和 p44ERK (ERK1/2) 组成,涉及细胞生长、增殖和分化过程^[13]。在与 AT₁ 受体结合后,AngII 通过广泛认识的通路活化 ERK1/2,在这条通路的最后步骤中,ERK1/2 被磷酸化,磷酸化的 ERK 移位入细胞核并刺激转录因子如 fos 的磷酸化和活化,促进胶原转录^[14]。成年心脏的胶原纤维中最主要是 I 型胶原和 III 型胶原^[15]。

本实验中,心脏局部 ACE-Ang II -AT₁ 轴活化最明显的妊娠中期缺氧组最早观察到 pERK1/2 蛋白和胶原 I、胶原 III mRNA 表达的增加,在 3 月龄的子代大鼠即已出现。而妊娠早期缺氧组到 5 月龄时才出现心脏局部 pERK1/2 蛋白和胶原 I、胶原 III mRNA 表达增加,推测这与该组子代大鼠心脏局部 ACE-Ang II -AT₁ 轴活化不如妊娠中期缺氧组明显有关。以上结果提示妊娠早期、中期开始缺氧通过活化子代大鼠心脏局部 ACE-Ang II -AT₁ 轴,介导下游 ERK1/2 磷酸化,促进胶原 I 和 III 聚集。

而在妊娠晚期缺氧组子代大鼠,虽然同样观察到心脏局部 AT₁ 受体表达上调,提示同样存在局部 ACE-Ang II -AT₁ 轴的活化,但我们并未在该组观察到 pERK1/2 蛋白和胶原表达增加,这可能有以下原因:①该组子代大鼠心脏局部 ACE、Ang II 无论在 3 月龄或 5 月龄均未出现明显改变,提示局部 ACE-Ang II -AT₁ 轴活化远不如妊娠早期或妊娠中期缺氧组明显;②该组心脏局部 AT₂ 受体表达减少不如妊娠早期或妊娠中期缺氧组明显有关。有研究表明 AT₂ 受体是细胞生长和胶原合成的负调节物^[16], AT₂ 受体的活化减少了 AT₁ 受体介导的 ERK 活化, AT₂ 受体表达的增加可以通过减少 AngII 诱导的成纤维细胞增殖和细胞外基质聚集而抑制间质的纤维化进展^[14]。因此,在妊娠早、中期缺氧组,明显减少的 AT₂ 受体表达减轻了对 AT₁ 受体的拮抗作用,促进了 ERK 的磷酸化和胶原沉积,这对子代大鼠心血管系统的健康将是不利的^[17]。

总之,本研究表明妊娠不同时期的缺氧均会引起成年雄性子代大鼠心脏局部 ACE-Ang II -AT₁ 轴活化,以妊娠早、中期开始缺氧对该轴的影响最明显,并会导致下游 ERK1/2 磷酸化,最终引起心脏 I、III 型胶原表达增加。本研究提示妊娠期缺氧与心血管疾病的胎儿程序控制有关,且妊娠期缺氧的时机会影响子代心脏疾病的程序化,丰富了心血管疾病胎儿起源学说。

[参考文献]

[1] LINO CA, SHIBATA CE, BARRETO-CHAVES ML. Maternal hyperthyroidism alters the pattern of expression of cardiac renin-angiotensin system components in rat offspring [J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2012, 13(4): 1 341-349.

[2] KAWAMURA M, ITOH H, YURA S, et al. Undernutrition in utero augments systolic blood pressure and cardiac remodeling in adult mouse offspring: possible involvement of local cardiac angiotensin system in developmental origins of cardiovascular disease [J]. Endocrinology, 2007, 148(3): 1 218-225.

[3] 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): H1 321-328.

[4] 王振华,黄子扬,吕国荣,等. 宫内慢性缺氧对子代大鼠血压的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18(8): 617-620.

[5] SILVA-ANTONIALI M M, TOSTES R C, FERNANDES L, et al. A lower ratio of AT₁/AT₂ receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats [J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(3): 587-593.

[6] 郭张强,廖玉华,程翔,等. 大鼠急性心肌梗死心室重塑中细胞因子与胶原的变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(12): 2 322-327.

[7] TANG M, ZHONG M, SHANG Y, et al. Differential regulation of collagen types I and III expression in cardiac fibroblasts by AGEs through TRB3/MAPK signaling pathway [J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(18): 2 924-932.

[8] 应红安,黄子扬,王振华. 宫内慢性缺氧对子代大鼠心脏诱导型一氧化氮合酶、血清内皮素 1 的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19(8): 655-9.

[9] GRIGORE D, OJEDA N B, ALEXANDER B T. Sex differences in the fetal programming of hypertension [J]. Gend Med, 2008, 5 Suppl A:121-132.

[10] ANDERSEN H S, GAMBLING L, HOLTROP G, et al. Maternal iron deficiency identifies critical windows for growth and cardiovascular development in the rat postimplantation embryo [J]. J Nutr, 2006, 136(5): 1 171-177.

[11] PARTHASARATHY A, GOPI V, UMADEVI S, et al. Suppression of atrial natriuretic peptide/natriuretic peptide receptor-A-mediated signaling upregulates angiotensin-II-induced collagen synthesis in adult cardiac fibroblasts [J]. Mol Cell Biochem, 2013, 378 (1-2): 217-228.

[12] HAN Y S, LAN L, CHU J, et al. Epigallocatechin gallate attenuated the activation of rat cardiac fibroblasts induced by angiotensin II via regulating beta-arrestin1 [J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 31 (2-3): 338-346.

[13] 汪念东,杜礼兵,王安才,等. 阿托伐他汀逆转腹主动脉缩窄型高血压大鼠心肌重构的机制 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 118(3): 208-212.

[14] LE CORVOISIER P, ADAMY C, SAMBIN L, et al. The cardiac renin-angiotensin system is responsible for high-salt diet-induced left ventricular hypertrophy in mice [J]. Eur J Heart Fail, 2010, 12(11): 1 171-178.

[15] 蔡姿丽,杨敏,黄林枫,等. 病毒性心肌炎小鼠心肌桥蛋白和 I 型胶原表达的动态变化 [J]. 中南大学学报(医学版), 2012, 37(3): 271-277.

[16] YAN X, SCHULDT AJ, PRICE RL, et al. Pressure overload-induced hypertrophy in transgenic mice selectively overexpressing AT₂ receptors in ventricular myocytes [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 294(3): H1 274-281.

[17] 陈永权,胡光祥,付群,等. 星状神经节阻滞对自发性高血压大鼠左心室重构的影响 [J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(1): 43-47.

(此文编辑 李小玲)