

慢性宫内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

应红安, 黄子扬, 王振华

(福建医科大学附属第二医院心内科, 福建省泉州市 362000)

[关键词] 慢性宫内缺氧; 程序性控制; 诱导型一氧化氮合酶; 内皮素 1

[摘要] 目的 探讨慢性宫内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。方法 建立慢性宫内缺氧大鼠模型, 实验分为缺氧组、空气模拟对照组、空白对照组, 每组 10 只子鼠。监测出生 1 天龄子鼠体重、各脏器重量, 免疫组织化学法检测心肌细胞诱导型一氧化氮合酶的表达, 酶联免疫吸附法检测 1 天龄、6 月龄子鼠血清内皮素 1 的表达。结果 宫内缺氧引起仔鼠主要脏器不成比例生长。宫内缺氧组子代大鼠出生时心肌诱导型一氧化氮合酶表达显著高于空气模拟对照组及空白对照组 ($P < 0.01$), 而空气模拟对照组与空白对照组比较差别无统计学意义。1 天龄子鼠各组间血清内皮素 1 的表达差异无统计学意义, 6 月龄子鼠缺氧组显著高于空气模拟对照组及空白对照组 ($P < 0.01$), 而空气模拟对照组与空白对照组比较差别无统计学意义。结论 慢性宫内缺氧作为孕期不良生长环境应激因素, 可引起子鼠低出生体重以及主要脏器不成比例生长, 并导致心脏诱导型一氧化氮合酶、血清内皮素 1 表达增高, 致使心血管病风险性增高。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Chronic Intrauterine Hypoxic on Myocardial Inducible Nitric Oxide Synthase and Plasma Endothelin-1 in Offspring Rats

YING Hong-An, HUANG Zi-Yang and WANG Zhen-Hua

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

[KEY WORDS] Chronic Intrauterine Hypoxia, Procedural Control, Inducible Nitric Oxide Synthase, Endothelin-1

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of chronic intrauterine hypoxic on myocardial inducible nitric oxide synthase (NOS) and plasma endothelin-1 (ET-1). **Methods** Chronic intrauterine hypoxic rats were divided into three groups: hypoxic group, air-mimic control group and blank control group. Each group included 10 offspring rats. We monitored the weight of organs and birth weight of offspring. Immunohistochemistry was used to examine the expression of myocardial NOS. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure serum ET-1 expression of offspring at 1 day and 6 month old. **Results** Organ/body weight percentage showed chronic intrauterine hypoxia could cause a disproportionate growth of offspring organs. The expression of myocardial NOS of the hypoxic group significantly increased compared with that of the air-mimic control group and that of the blank control group ($P < 0.05$), but the air-mimic control group was not significantly different from that of the blank control group ($P > 0.05$). There was no significant difference of the expression of the serum ET-1 of all groups of offspring at 1 day old ($P > 0.05$). But there was significant difference of the expression of the serum ET-1 of the hypoxic group compared with that of the air-mimic control group and that of the blank control group of offspring at 6 month old ($P < 0.05$), while the air-mimic control group was not significantly different from that of the blank control group ($P > 0.05$). **Conclusions** Intrauterine chronic hypoxia may be a stress factor for development of the cardiovascular system, and it can induce low birth weight and high expression of myocardial NOS and serum ET-1, which lead to increase the risk of cardiovascular disease.

[收稿日期] 2010-12-05

[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] 应红安, 硕士研究生, 研究方向为慢性宫内缺氧子代成年后心血管疾病相关研究, Email 为 269073862@qq.com。王振华, 博士, 主治医师, 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的胎儿起源, Email 为 huagzy@gmail.com。

近来的流行病学及动物实验研究表明,当胎儿暴露于一个非正常调控的生长环境如孕期营养不良、低氧状态、感染、贫血、高血压、糖尿病等,可致低出生体重,并可导致成年后高血压、冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)、2型糖尿病、肾功能不全、慢性阻塞性肺疾病等慢性成年期疾病的几率明显增高^[1-2]。目前认为,胎儿对生长发育中关键时期的特定损伤和刺激将产生生理、形态和代谢的永久或长期的变化^[3]。当损伤发生在器官发育的关键、易损时期,这些改变将永久存在。这种代谢和生理功能的程序控制改变,使器官产生短期的适应性变化,但长期的程序控制改变使各器官产生病理生理变化而表现为高血压、动脉粥样硬化、糖尿病等各种慢性成年疾病。缺氧是影响内环境稳态的常见应激之一,胎儿遭受的所有应激中,最重要的与临床最相关的就是缺氧。我们先前的研究显示,宫内慢性缺氧可诱导子代血管内皮损伤,导致血压升高、出现早期动脉粥样硬化样改变^[4-5]。提示宫内慢性缺氧与心血管疾病的胎儿程序控制有关。本研究通过建立慢性宫内缺氧模型,监测缺氧子代大鼠的出生体重及主要脏器重量比例,并测定与心血管的发病密切相关的缺氧诱导因子目的基因产物诱导型一氧化氮合酶(NOS)、内皮素1(ET-1)的表达,进一步探讨慢性宫内缺氧与子代心血管病发生的风险及可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

清洁级健康雄性SD大鼠12只(大鼠4月龄,体重350~400g),雌性SD大鼠12只(大鼠2月龄,体重200~250g),均由上海斯莱克实验动物有限公司提供,屏障IVC动物房中饲养,代谢笼动物房备;间断性缺氧密闭箱及空气模拟对照密闭箱(75×65×35 cm³)自制;GAXTH氧浓度检测仪(加拿大BW公司,灵敏度0.1%);医用压缩氧气(浓度>99%)、压缩氮气(浓度>99%)医院氧气房灌取;RapidlabTM 850型血气分析仪为德国拜尔公司产品;兔抗NOS一抗及美国ZYMED公司的过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)染色试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司,二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒购自北京中杉金桥;ET-1 ELISA试剂盒为美国R&D公司进口分装。

1.2 亲代大鼠交配与实验分组

采用SD雄雌大鼠随机交配,托盘阴栓检查法^[6]确定妊娠。饲养于标准屏障动物房中(温度

21℃~27℃,湿度50%±5%)。发现阴栓即可视为怀孕,记为孕0天。随机将孕鼠分为三组,每组4只,分别为缺氧组、空气模拟对照组和空白对照组。每组随机研究10只子鼠。

1.3 宫内缺氧模型的建立

参考[4-5]方法建立慢性宫内缺氧模型。间断性缺氧系统:自制密闭有机玻璃箱。并预留操作孔(由透明薄膜密封)进出气孔及饮水,其中出气孔使用单向活瓣,使舱内气压与大气压平衡。箱内内置一小电扇混匀气体,二氧化碳与水蒸气分别用钠石灰与氯化钙吸收,控制湿度及避免二氧化碳滞留。由微电脑芯片、控制程序、继电器、电磁阀、显示器等组成控制系统。不同气源有不同的通气管道,均由程序控制的电磁阀开关。通过控制程序及设定各种气体的吹入时间及流量,调控箱内氧浓度。各种气体流入状态可通过控制程序经显示器读出。箱内氧浓度由氧浓度检测仪读出。箱内温度保持于22℃~28℃,湿度64%~68%。将缺氧组孕鼠置于缺氧箱,调节氧氮的流量,监测氧浓度,缓慢将箱内氧浓度降至10%,维持氧浓度为10%±1%。缺氧组孕1~21天每天同一时间连续缺氧3h,这样既能达到缺氧目的,又不至由于氧浓度过低、缺氧时间过长引起大鼠不适反应造成交感内分泌等因素干扰。空气模拟对照组同缺氧组将孕鼠模拟放入空气模拟对照密闭箱,保持箱内氧浓度21%,不予缺氧。空白对照组置于饲养笼中自然待产。

在缺氧1h后每组随机选取6只孕鼠,RapidlabTM 850型血气分析仪行血气分析(在预实验中进行),与空气模拟对照组及空白对照组相比,缺氧组血PaO₂、SaO₂明显降低,而血PaCO₂、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,而不引起明显的CO₂滞留与酸中毒,提示模型建立成功。

1.4 标本获取

孕21天自然产子鼠,于出生后1天、1月龄及6月龄每组随机取子鼠10只,测体重,留取血清标本,分离心、肝、肾、肺、脑并称重,标本-80℃冻存。

1.5 心脏NOS的表达检测

免疫组织化学检测1天龄子鼠心肌NOS表达情况(每组10只),使用SP/DAB法检测。心肌切片为横截面,设立阴性对照染色,NOS一抗浓度为1:900(稀释度经已知阳性片预实验得出)。NOS阳性判断标准:避开出血、坏死、切片刀痕及边缘细胞的阳性表达,随机观察5个高倍镜视野,NOS为细胞浆着色,有棕黄色染色者为阳性。根据阳性细胞

百分比及染色强度参照 Bames法进行综合评分^[7]。表达水平用积分表示: 阳性细胞数 $\leq 10\%$ 为阴性, 记为 0分, 11% ~ 25% 记 1分, 26% ~ 50% 记 2分, > 50% 记 3分。根据细胞的阳性强度进行评分, 阳性信号较弱但明显高于阴性对照记为 1分, 阳性信号很强, 呈棕褐色为强阳性记为 3分, 信号强度介于两者之间为中度阳性记为 2分。两项积分的总和为各例的总积分。

1.6 血清 ET-1浓度检测

ELISA 检测 1天龄、6月龄子鼠血清 ET-1 浓度 (每组 10只), 所有测试均做复孔, 弃去溶血样本。酶标包被板设立标准品孔、空白孔 (空白对照孔不加样品及酶标试剂, 其余各步操作相同)、待测样品孔, 其中标准品设立 6个浓度梯度 (分别为 80、40、20、10、5及 2.5 ng/L), 样品最终稀释度为 5倍。测定以空白孔调零, 450 nm 波长依序测量各孔的吸光度 (OD值)。每个样本 OD值对应的浓度通过标准曲线的趋势线方程计算得出。

1.7 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用完全随机设计的方差分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 子代大鼠体重及主要脏器重量比例

宫内缺氧组、空气模拟对照组及空白对照组间

每窝仔鼠的数目无显著性差异 (分别 13.1 ± 2.1 、 13.2 ± 2.3 及 13.4 ± 2.1)。缺氧组 1天龄子鼠体重显著低于空气模拟对照组及空白对照组 ($P < 0.01$), 缺氧组子代大鼠出生时心、脑体重比显著高于空气模拟对照组及空白对照组, 而肝体重比显著低于空气模拟对照组及空白对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肺、肾体重比无显著差异 (表 1)。这之前本课题组的结果吻合^[5]。

表 1. 1天龄子代大鼠体重及各脏器比重 ($n = 10$)

Table 1. Weight and proportion of various organs in offspring rats of 1-day-old

	缺氧组	空气模拟对照组	空白对照组
体重 (g)	5.63 ± 0.65^b	6.52 ± 0.36	6.55 ± 0.32
心/体重	$0.543\% \pm 0.070\%^b$	$0.449\% \pm 0.076\%$	$0.441\% \pm 0.066\%$
脑/体重	$3.717\% \pm 0.218\%^a$	$3.015\% \pm 0.748\%$	$3.042\% \pm 0.779\%$
肺/体重	$1.876\% \pm 0.261\%$	$1.920\% \pm 0.113\%$	$1.803\% \pm 0.307\%$
肾/体重	$0.511\% \pm 0.104\%$	$0.523\% \pm 0.062\%$	$0.527\% \pm 0.067\%$
肝/体重	$4.296\% \pm 0.656\%^a$	$4.894\% \pm 0.506\%$	$4.906\% \pm 0.563\%$

a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$, 与空气模拟对照组及空白对照组比较。

2.2 心肌 NOS蛋白的表达

缺氧组子代大鼠出生时心肌 NOS蛋白的表达显著高于空气模拟对照组及空白对照组 (分别为 4.200 ± 1.033 、 1.400 ± 0.516 和 1.300 ± 0.483 , $P < 0.01$), 而空气模拟对照组与空白对照组比较差别无统计学意义 (图 1)。

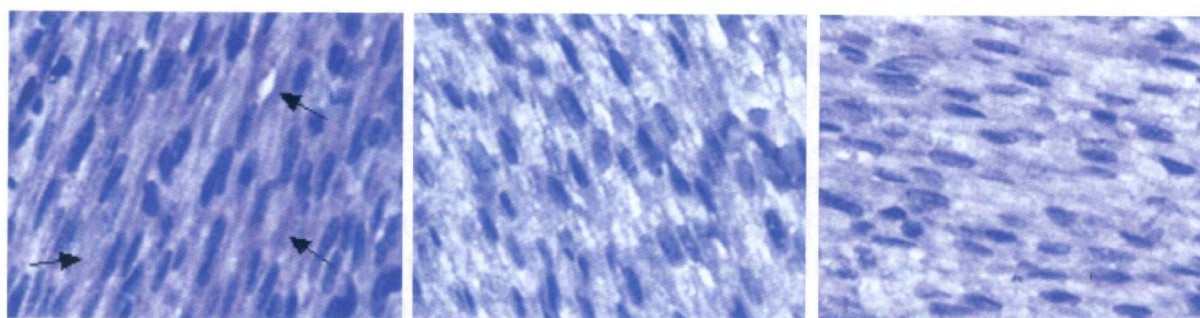


图 1. 1天龄子代大鼠心肌 NOS蛋白的表达 ($\times 400$) 从左至右为缺氧组、空气模拟对照组和空白对照组。

Figure 1. Expression of myocardial NOS protein in offspring rats of 1-day-old

2.3 血清 ET-1浓度

图 2 中蓝线为标准曲线, 红线为标准曲线趋势线, $R^2 = 0.9993$ 表明趋势线相关性很好。通过趋势线方程计算得出样本浓度值。1天龄血清 ET-1 浓度在各组间比较差异无统计学意义; 6月龄血清 ET-1 浓度在缺氧组与空气模拟对照组及空白对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 而在空气模拟对

照组与空白对照组比较差异无统计学意义。表明宫内慢性缺氧在子鼠 1天龄时并未表现出明显表达增高, 但随着年龄增长, 6月龄时这种差别逐渐显现出来。且 6月龄与 1天龄相比各组 ET-1 浓度都减低, 也说明随着年龄增长血管功能减退, ET-1 产生减少 (表 2)。

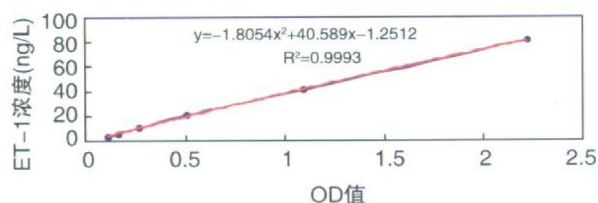


图2 血清 ET-1 标准曲线

Figure 2 Standard curve of serum ET-1

表 2. 血清 ET-1 浓度 (ng/L, n = 10)

Table 2. Levels of serum endothelin-1

	缺氧组	空气模拟对照组	空白对照组
1天龄	81.099 ± 18.958	79.428 ± 17.336	78.163 ± 16.566
6月龄	59.753 ± 9.539 ^a	43.524 ± 3.489	43.006 ± 3.013

a为 $P < 0.01$, 与空气模拟对照组及空白对照组比较。

3 讨 论

慢性宫内缺氧是影响内环境稳态的常见应激之一, 胎儿遭受的所有应激中, 最重要的且与临床最相关的就是缺氧。慢性宫内缺氧将引起基因表达调控改变, 导致胎儿内分泌、代谢等方面发生改变, 这些都将影响各器官的生长发育与整个内环境稳态的变化。因而, 胎儿宫内的生长减缓、低出生体重、各脏器不成比例增长可能是胎儿期对宫内不良环境的适应性反应, 但随着生长发育, 这种不利的基因表达调控长期作用于机体, 最终使多脏器功能失代偿, 而表现为成年期的高血压、动脉粥样硬化、糖尿病、肺源性心脏病等慢性疾病。国外已有流行病学研究证实了胎儿程序控制学说^[8-9]。而我们先前的研究也验证了宫内缺氧与子代血管内皮功能损伤、高血压和动脉粥样硬化的发生密切相关^[4-5, 10]。本研究采用慢性宫内缺氧大鼠模型, 发现宫内慢性缺氧可引起特异性组织器官的程序控制, 并导致子代低出生体重, 主要脏器不成比例生长, 心脏 NOS、血清 ET-1 的表达增高, 子代心血管病风险增高。

本研究中建立的慢性宫内缺氧模型对健康孕鼠进行间断缺氧, 控制摄食、孕鼠基本健康状况等, 可研究缺氧单因素对子代的影响, 且血气分析及子代的脏器比重都与我们先前的结果^[4-5]完全吻合, 该模型已经过数年的不断验证, 证实了具有临床模拟性好、操作简便、可重复操作及可量化等优点, 是可靠成熟的。已有大量的流行病学表明低出生体重者成年后高血压、冠心病等的风险比正常出生体重者明显增高^[10-12], 可见宫内缺氧所致的子代低出生体重是增加其成年后各种心血管病风险增高的一个指

标。

本研究中选测的缺氧诱导因子目的基因产物 NOS 和 ET-1 均与心血管病的发生密切相关。其中 NOS 是 NOS 中的一型, 其在介导内皮功能损伤中起重要的作用, 呈诱导型表达。正常体内水平很低检测不到, 当缺氧诱导时大量表达, 从而产生局部很高的 NO 浓度, 对血管内皮细胞造成很大的损害, 大量有害的 NO 与炎症细胞产生的超氧阴离子反应形成过(氧化)亚硝酸盐, 它可损伤内皮细胞与单核细胞, 加重血管细胞凋亡^[13], 这是致成年大鼠动脉粥样硬化的作用机制之一。同时, 产生的 NO 损伤内皮细胞, 激活 C 反应蛋白等炎症因子, 上调血管紧张素 IV 型受体的表达, 影响肾素-血管紧张素水平, 从而促进高血压的发展^[14]。有研究显示 NOS 的这种作用可能是通过激活血管紧张素 II、ET-1、去甲肾上腺素等诱导心肌肥大起作用的^[15]。本研究显示子代心肌 NOS 的表达明显增高, 这可能是子代成年易患高血压、冠心病等的机制之一。

ET 是 1988 年 Yanagisawa 等从猪主动脉内皮细胞培养液中分离纯化的一种含有 21 个氨基酸的活性肽, 是迄今发现的体内最强的缩血管物质, 具有强烈收缩血管、加强心肌收缩力、促进神经内分泌等作用, 对高血压的发生、调节和维持可能起着重要作用。它对调节局部血流, 维持机体内环境稳定有重要作用, 这些作用大部分是由其亚型 ET-1 介导的, 且组织局部 ET-1 基因的表达在维持正常的心脏功能、心肌细胞的发育以及心脏对血流动力学改变的应激中是必需的。同时, 许多研究证实 ET-1 能诱导心肌细胞的肥大以及在肥大的心肌中可以测到 ET-1 的高表达。油红文等^[16]发现 ET-1 能促进心肌细胞 DNA 及蛋白质的合成, 且呈剂量依赖性, 这种作用主要是通过 ET(A)R 介导的。可见 ET-1 的表达增高与心血管病发生密切相关。本研究检测出血清 ET-1 在出生时并未表现出差异, 但随着生长发育, 于 6 月龄时明显增高, 可见宫内缺氧诱导 ET-1 的表达改变是个长期的程序控制过程, 缺氧子代成年后显现出来的 ET-1 高表达可能是其心血管病风险增加又一影响机制。本研究仅检测血清 ET-1 水平, 今后将继续监测心肌、主动脉等组织的 ET-1 水平, 并将监测时机往后延伸, 以获取更全面的实验数据。

综上所述, 本研究表明宫内缺氧作为子代宫内发育的一项重要应激因素, 可引起子鼠低出生体重、以及主要脏器不成比例生长, 并导致心脏 NOS、血清 ET-1 表达增高, 致使子代高血压、冠心病等心血管病风险性增高。明确慢性宫内缺氧与子代大鼠

心血管病关联及可能发病机制将为心血管病的预防诊治开辟新的思路,更是实现优生优育的一项重要手段。目前相关的研究仍不够深入,相关临床证据也较为欠缺,有必要做进一步系统深入的研究。

[参考文献]

- [1] Gluckman PD, Hanson MA, Cooper C, et al Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease [J]. *N Engl J Med* 2008, 359 (1): 61-73
- [2] Rueda-Clausen CF, Morton JS, Davidge ST. Effects of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on cardiopulmonary structure and function during adulthood [J]. *Cardiovasc Res* 2009, 81 (4): 713-722
- [3] Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health [J]. *Public Health Nutr* 2001, 4 (2B): 611-624
- [4] 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): H1321-328
- [5] 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
- [6] 李彦清, 邵龙江, 李森, 等. 大鼠阴栓的实验观察和孕鼠模型鉴定方法的比较 [J]. *中国实验动物学杂志*, 2002, 12 (1): 100-104
- [7] 林震, 陈仕平, 叶传忠, 等. 一氧化氮合酶在膀胱癌中的表达及与肿瘤血管形成的关系 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2003, 24: 99-101
- [8] ZandiNejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult hypertension and kidney disease: the role of fetal programming [J]. *Hypertension* 2006, 47 (3): 502-508
- [9] Ojeda NB, Grigore D, Alexander BT. Intrauterine growth restriction: fetal programming of hypertension and kidney disease [J]. *Adv Chronic Kidney Dis* 2008, 15 (2): 101-106
- [10] 林惠通, 吕国荣, 王振华, 等. 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 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2009, 17 (2): 93-96
- [11] Frasch MG, Müller T, Wicher C, et al. Fetal body weight and the development of the control of the cardiovascular system in fetal sheep [J]. *J Physiol* 2007, 579 (Pt3): 893-907
- [12] Lackland DT, Egan BM, Syddall HE, et al. Associations between birth weight and antihypertensive medication in black and white medical recipients [J]. *Hypertension* 2002, 39 (1): 179-183
- [13] Novelli G, Borgiani P, Giardina E, et al. Role of genetics in prevention of coronary atherosclerosis [J]. *Curr Opin Cardiol* 2003, 18 (5): 368-371
- [14] Wang CH, Li SH, Weisel RD, et al. C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle [J]. *Circulation* 2003, 107 (13): 1783-790
- [15] 詹昌德, 王庭槐, 潘敬运. 一氧化氮在血管紧张素^②诱导心肌细胞肥大中的作用 [J]. *生理学报*, 1999, 51: 660-666
- [16] 油红文, 陈曦, 油红捷, 等. 内皮素及其受体对心脏细胞肥大与增殖的作用 [J]. *中国医学科学院学报*, 2006, 28 (4): 520-523

(此文编辑 文玉珊)