

产前缺氧程序控制 6 周龄兔颈动脉内皮依赖性舒张功能及其相关分子机制

陈幼芳¹, 吕国荣², 杜心清², 王振华², 杨维群¹, 吴淳淳²

(1. 福建省泉州医学高等专科学校, 福建省泉州市 362011; 2. 福建医科大学附属第二医院, 福建省泉州市 362000)

[关键词] 产前缺氧; 内皮型一氧化氮合酶; 热休克蛋白 90; 内皮依赖性舒张功能

[摘要] **目的** 研究产前缺氧对 6 周龄新西兰兔颈动脉内皮依赖性舒张功能的影响及相关分子机制。**方法** 同期怀孕的新西兰母兔随机分为常氧对照组($n=5$)和缺氧组(12% O_2 , $n=5$), 于妊娠第 10 天开始相应的干预, 至妊娠第 29 天结束, 自然分娩。每窝随机留 1 只雄性新生兔饲养, 共得 10 只雄性新生兔, 母乳喂养至 6 周。检测 6 周龄兔离体颈动脉内皮依赖性舒张功能; 利用同位素方法测定内皮型一氧化氮合酶活性; 利用 Western blot、免疫组织化学法检测颈动脉内皮型一氧化氮合酶、热休克蛋白 90 表达。**结果** 产前缺氧损伤 6 周龄兔颈动脉内皮依赖性舒张功能, 降低内皮型一氧化氮合酶活性, 下调热休克蛋白 90 表达($P<0.05$)。**结论** 产前缺氧通过下调 6 周龄兔颈动脉热休克蛋白 90 表达, 降低内皮型一氧化氮合酶活性, 从而损伤颈动脉内皮依赖性舒张功能。

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Effects of Perinatal Hypoxia on Carotid Artery Endothelium-dependent Relaxations of 6 Weeks Old Rabbits and Its Molecular Mechanism

CHEN You-Fang¹, LV Guo-Rong², DU Xin-Qing², WANG Zhen-Hua², YANG Wei-Qun¹, and WU Chun-Chun²
(1. Quanzhou Medical College, Quanzhou, Fujian 362011, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou, Fujian 362000, China)

[KEY WORDS] Perinatal Hypoxia; Endothelial Nitric Oxide Synthase; Heat Shock Protein 90; Endothelium-dependent Relaxation

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of perinatal hypoxia on carotid artery endothelium-dependent relaxations of 6 week old rabbits and its molecular mechanism. **Methods** Ten pregnant New Zealand White rabbits were randomly divided into two groups: normoxic control group (21% O_2 , $n=5$) and perinatal hypoxia group (12% O_2 , $n=5$) during day 10 ~ 29 of pregnancy. Pregnant rabbits had spontaneous deliveries, and only one male offspring from each litter was selected randomly and breast-fed for six weeks. Carotid arteries were obtained from 6 week old rabbits, endothelium-dependent relaxation (EDR) and expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and heat shock protein 90 (HSP90) of carotid arteries were examined. **Results** Perinatal hypoxia significantly impaired carotid artery EDR in 6 week old rabbits ($P<0.05$). Perinatal hypoxia significantly decreased carotid artery HSP90 expression ($P<0.05$) and eNOS activities ($P<0.05$) in 6 week old rabbits. **Conclusions** Perinatal hypoxia can induce functional impairment in vascular endothelium from 6 week old rabbits. The molecular mechanism involved is that perinatal hypoxia decrease HSP90 expression and eNOS activities of rabbit artery.

流行病学研究表明,不良的宫内生长环境可促进日后成年期疾病,如高血压、动脉粥样硬化性疾病、2 型糖尿病等的发生与进展^[1]。1995 年 Barker^[2]首次提出了心血管疾病胎儿起源学说。缺氧是胎儿遭受的最重要的与临床最相关的应激^[3]。哺乳动物实验研究表明,产前缺氧可致其动脉内皮依

[收稿日期] 2013-04-28

[基金项目] 福建省教育厅项目(JA11322);泉州市科委重点项目(2012Z72)

[作者简介] 陈幼芳,博士,副教授,研究方向为产前缺氧与成年期动脉硬化的关系,E-mail 为 Cyf988@126.com。吕国荣,硕士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向为产前缺氧与成年期动脉硬化的关系。通讯作者杜心清,主任医师,教授,硕士研究生导师,研究方向为动脉硬化的基础与临床,E-mail 为 cyf988@126.com。

赖性舒张功能 (endothelium-dependent relaxation, EDR) 损伤^[4-6], 血压、脉压较对照组显著升高^[7], 但其相关的分子机制目前尚未明确。

内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 主要分布于血管内皮细胞的细胞膜上, eNOS 催化 L-精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 生成的一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是主要的内皮源性舒张因子, 决定着血管 EDR^[8]。eNOS 的刺激性分子伴侣热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 通过与 eNOS 结合而促进其活化, 加强 NO 的释放^[9]。我们前期研究发现妊娠期缺氧上调胎兔颈动脉 eNOS 表达及其活性^[10]。本研究旨在观察该影响是否持续至出生后, 是否对血管 EDR 存在影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及场所

同期妊娠新西兰白兔 10 只 (30 ± 1 天) 由上海实验动物中心提供。妊娠第 10 天, 孕兔随机分为常氧对照组 ($n=5$) 和缺氧组 ($n=5$)。整个妊娠期, 孕兔饲养于标准的兔笼内, 每笼 1 只, 室温 23°C , 湿度 55%, 自然采光, 自由摄食、饮水, 自然分娩。为避免奶水对新生兔生长的影响, 每窝随机留 1 只雄性新生兔饲养, 共得 10 只雄性新生兔。母乳喂养至 6 周。由福建医科大学实验动物中心负责提供饲养和观察场地 [福建省实验动物管理委员会, 合格证为 001 号; 实验动物使用许可证号: SYXK (闽) 2008-0001]。

1.2 产前缺氧模型

参考 Wang 等^[11]的方法, 前期实验成功建立产前缺氧模型^[10]。从妊娠期第 10~29 天, 5 只孕兔置于一个树脂玻璃箱内, 每天 2 次, 上、下午各 4 h, 箱内氧浓度由 S-450 型氧气监测仪持续监测, 实时调节氧氮的流量, 使混合气氧浓度为 $12.0\% \pm 0.5\%$ 。舱内 CO_2 与水蒸气分别用钠石灰与氯化钙吸收。常氧对照组的 5 只孕兔也置于相同的玻璃箱内, 持续通入空气, 余条件同前。

1.3 动物标本采集

6 周龄兔经耳缘静脉用 3% 异戊巴比妥钠麻醉 (30 mg/kg), 小心钝性分离颈动脉, 清除血液、脂肪和结缔组织后, 截取 6 周龄兔右侧颈动脉取 1.5 cm 长的动脉环, 固定于 10% 甲醛溶液过夜, 常规脱水、石蜡包埋后置于室温备用; 余动脉标本液氮中速冻后转存于 -70°C 冰箱保存备检 eNOS、HSP90 蛋白

表达。

1.4 Western blot 检测 eNOS 和 HSP90 蛋白表达

动脉片段置于毛玻璃研钵中, 加入裂解液 (Cat: P0013B, 碧云天) 研磨。将裂解液移至 1.5 mL 离心管中, 4°C 、12500 g 离心 5 min; 取上清液, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Cat: P0010, 碧云天) 测定蛋白浓度。上清液与 $5 \times$ 加样缓冲液 (Cat: P0015, 碧云天) 按 4:1 混合, 100°C 加热 5 min 变性。采用 SDS-PAGE, 等量蛋白 ($30 \mu\text{g}$) 及 Marker (Cat: P0066, 碧云天) 上样, 8% 分离胶, 转移蛋白至 PVDF 膜 (Cat: FFP30, 碧云天) 上, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, eNOS 兔多克隆抗体 (1:200, 博士德)、HSP90 小鼠单克隆抗体 (1:200, 博士德) 稀释, 4°C 孵育过夜。用 PBS、TBST 各洗膜 2 次后, 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 (1:1000, 碧云天) 稀释后 22°C 孵育 1 h, 同时检测 β -actin 的表达作为内参, 洗膜同前。用化学发光试剂 (Cat: P0018, 碧云天) 检测, 压片 1~5 min, 显影定影。扫描胶片, 用 Quantity One v4.62 软件分析各组目标条带的相对吸光度值。

1.5 免疫组织化学法检测 eNOS 和 HSP90 表达

包埋 6 周龄兔右侧颈动脉蜡块连续切片 ($5 \mu\text{m}$ 厚), 经常规二甲苯脱蜡、梯度酒精水化后蒸馏水冲洗; 于 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液 ($\text{pH} 6.0$) 中进行抗原修复; 载玻片置于盛有枸橼酸盐缓冲液的烧杯中, 烧杯置于沸水中 10 min, 后取出烧杯, 冷却至室温。3% 过氧化氢室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次。非免疫动物血清室温下孵育 10 min 后甩去动物血清; 在标本上滴加一抗, 均以 1:100 稀释, 阴性对照组用封闭液代替一抗, 4°C 湿盒中过夜, PBS 冲洗 3 次; 滴加生物素标记的第二抗体, 室温下孵育 10 min 后 PBS 冲洗 3 次; 滴加即用型链霉亲和素辣根过氧化物酶, 室温下孵育 10 min 后 PBS 冲洗 3 次; DAB 显色, 光镜下观察; 自来水冲洗终止显色; 苏木素复染, 梯度酒精脱水、二甲苯透明后用中性树胶封片, 自然晾干; 光学显微镜下观察拍摄。

1.6 同位素方法测定 eNOS 活性

采用 eNOS 试剂盒 (美国 Calbiochem 公司) 检测动脉组织 eNOS 活性。利用 eNOS 试剂盒中平衡树脂 (Dowex AG 50-WX8) 分离标记 L-Arg 和 L-瓜氨酸 (L-Cit), 用液闪仪测定 eNOS 催化生成的瓜氨酸放射强度 (cpm), 反映 eNOS 活性。具体步骤严格按照说明书实施。

1.7 EDR 检测

6 月龄兔经耳缘静脉用 3% 异戊巴比妥钠麻醉 (30 mg/kg), 取出颈动脉, 置于盛有 Krebs's 溶液的

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 3 ~ 4 mm 的动脉环,动脉环固定在 10 mL 的浴槽中,浴槽保持 37℃,持续充以 95% O₂、5% CO₂ 混合气,每隔 20 min 更换槽中 Krebs's 液一次。标本负荷 1.5 g,平衡 2 h。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。累积给予终浓度分别为 10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶ 及 10⁻⁵ mmol/L 去甲肾上腺素 (norepinephrine, 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 (acetylcholine, 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 Ach 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。

1.8 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 eNOS 和 HSP90 蛋白表达

Western blot 检测显示,eNOS、HSP90 均表达于 6 周龄兔颈动脉,产前缺氧组兔颈动脉 eNOS 的表达较常氧对照组差异无显著性 (*P* > 0.05),HSP90 的表达较常氧对照组降低 (*P* < 0.05;图 1)。免疫组织

化学检测显示,eNOS 蛋白仅表达于内膜,沿着颈动脉内膜腔表面暗褐色的着色;HSP90 蛋白主要表达于内、中膜,定位于核周胞浆,呈棕黄色。产前缺氧组 eNOS 表达较常氧对照组差异无显著性 (*P* > 0.05),HSP90 的表达较常氧对照组降低 (*P* < 0.05;图 2)。

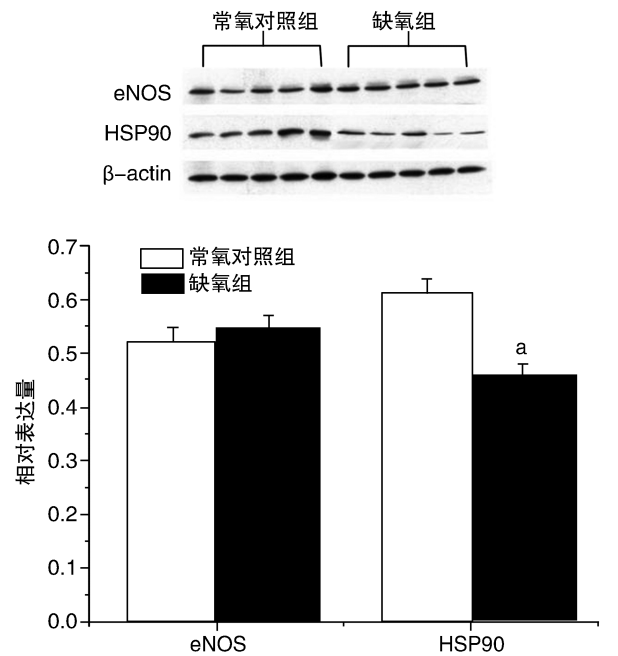


图 1. 6 周龄兔颈动脉 eNOS、HSP90 蛋白表达 (*n* = 5) a
为 *P* < 0.05,与常氧对照组比较。

Figure 1. Expression of carotid artery eNOS, HSP90 protein from 6 week old rabbits

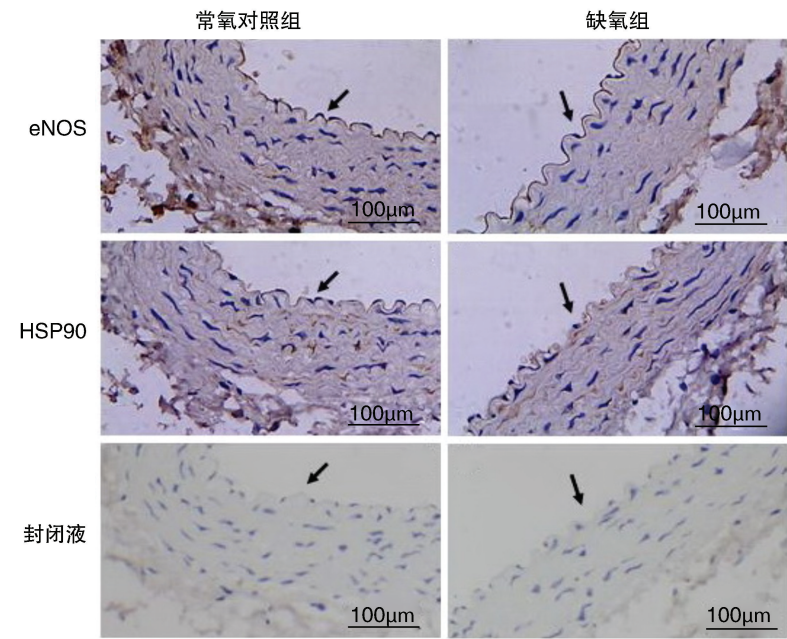


图 2. 6 周龄兔颈动脉 eNOS、HSP90 免疫组织化学染色 (×400) a
为 *P* < 0.05,与常氧对照组比较。

Figure 2. Immunohistochemistry for carotid artery eNOS and HSP90 from 6 week old rabbits

2.2 eNOS 活性

产前缺氧组 eNOS 活性较常氧对照组明显下降 ($P < 0.05$; 图 3)。

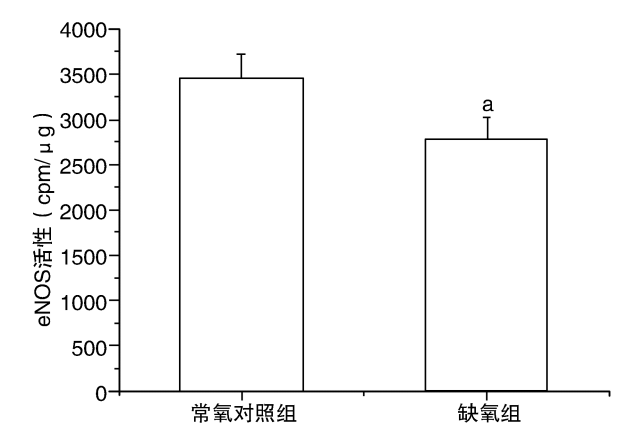


图 3. 6 周龄兔颈动脉 eNOS 活性 a 为 $P < 0.05$, 与常氧对照组比较。

Figure 3. eNOS activities of carotid artery from 6 week old rabbits

2.3 EDR 变化

产前缺氧组颈动脉 EDR 较常氧对照组明显下降 ($P < 0.05$; 图 4)。

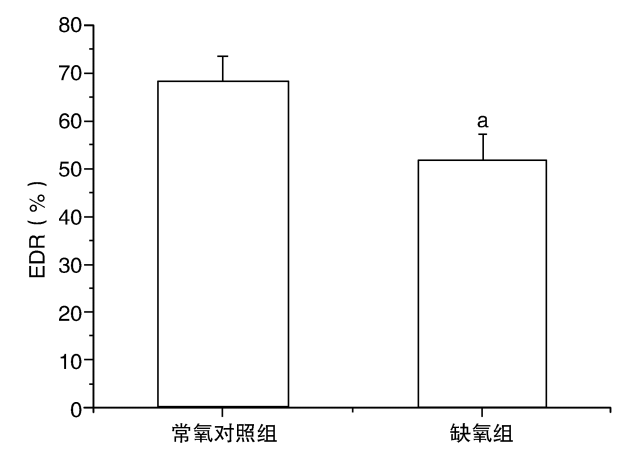


图 4. 6 周龄兔颈动脉 EDR 变化 a 为 $P < 0.05$, 与常氧对照组比较。

Figure 4. EDR changes of carotid artery from 6 week old rabbits

3 讨论

缺氧是影响内环境稳态的常见应激之一,也是胎儿遭受最重要且与临床最相关的应激。许多情况下可引起妊娠期缺氧,并进一步造成胎儿产前缺氧。如孕妇居住在高海拔地区、吸烟以及一氧化碳

污染等^[12],此外,许多临床疾病可导致胎儿长期慢性缺氧,包括贫血、胎盘功能不良、脐带受压、先兆子痫、心肺肾等脏器疾患和血红蛋白病等。我们前期实验参考 Wang 等^[11]的方法建立产前缺氧模型,为了确定产前缺氧是否引起胎兔的慢性低氧血症,检测了胎兔的红细胞比容、红细胞计数、促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO) 水平,结果表明,产期缺氧明显升高胎兔的红细胞比容、红细胞计数、EPO 水平,证实成功建立产前缺氧模型^[10]。

哺乳动物实验研究表明,产前缺氧可导致胎鼠及新生仔鼠血管 EDR 损伤,但仅观测到出生 12 h 内的内皮功能情况,未对成年后内皮功能的影响进行研究^[4];产前缺氧大鼠其成年期、老年期的血压、脉压较对照组显著升高^[7];我们之前的研究也表明,产前缺氧致成年期 EDR 降低^[5,6],但其相关的分子机制目前尚未明确。而对非哺乳类动物研究发现,卵内低氧暴露孵育 19 天鸡胚通过减少 NO 的释放降低股动脉对 Ach 的敏感性^[13],而这些动脉内皮特性的改变在卵内低氧暴露的小鸡出生后 3 ~ 4 周、14 ~ 15 周还存在^[14]。产前缺氧引起 EDR 的改变可能提示一个心血管疾病的胎儿程序控制的内皮功能损伤机制。血管内皮功能损伤主要表现在血管对 Ach 诱导的 EDR 下降。eNOS 表达减少或生物学活性降低,均会导致 eNOS 催化生成的 NO 减少,导致 EDR 损伤^[15]。EDR 降低是血管内皮功能损伤最重要的特征,与高血压及动脉粥样硬化等心血管疾病的发生进展密切相关^[16,17]。

我们前期研究发现产前缺氧上调胎兔颈动脉 eNOS 表达,升高 eNOS 活性^[10],本研究选取出生后 6 周龄 (断奶期) 作为持续观察的时间点。研究结果表明,6 周龄兔颈动脉 eNOS 表达较常氧对照组升高,但差异无显著性;随之我们检测离体颈动脉 EDR,发现产前缺氧致 EDR 降低;产前缺氧组 eNOS 活性较常氧对照组也相应降低;而 eNOS 表达在两组间差异无显著性。因此,我们转而关注 eNOS 分子伴侣的表达情况,发现刺激性分子伴侣 HSP90 的表达较常氧对照组降低,终于揭示产前缺氧降低 6 周龄兔颈动脉 EDR 的分子机制。

eNOS 主要分布于血管内皮细胞,富集于细胞膜上的小窝结构,在生物体内各种刺激作用下,进入胞质发挥其生物活性作用。eNOS 催化产生的 NO 通过激活血管平滑肌细胞中的可溶性鸟苷酸环化酶,促进细胞内环磷酸鸟苷 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 的合成,通过 eNOS-NO-cGMP 通道,对内皮下的血管平滑肌舒张功能起着重要的

作用^[8]。HSP90 作为 eNOS 的刺激性分子伴侣,在胞浆中呈高水平表达,目前关于 HSP90 对 eNOS 信号转导的调节功能的描述大部分集中于内皮细胞。HSP90 对 eNOS 的作用主要通过 eNOS 结合、促进 eNOS 磷酸化、上调 NO 的合成,从而影响血管 EDR。

总之,我们之前研究发现,产前缺氧上调胎兔颈动脉 eNOS 表达,升高 eNOS 活性^[9]。本研究发现产前缺氧组 eNOS 高表达在出生后 6 周龄新西兰兔颈动脉已经消失,但产前缺氧通过程序控制 eNOS 的刺激性分子伴侣 HSP90 的表达,降低 eNOS 活性,损伤 EDR。后续我们将继续选取不同的时间点,持续观察产前缺氧对血管结构、功能及相关分子水平的影响。

[参考文献]

[1] Morrison JL. Sheep models of intrauterine growth restriction: fetal adaptations and consequences [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35 (7): 730-743.

[2] Barker DJ. Fetal origins of coronary heart disease [J]. BMJ, 1995, 311 (6998): 171-174.

[3] Patterson AJ, Zhang L. Hypoxia and fetal heart development [J]. Curr Mol Med, 2010, 10 (7): 653-666.

[4] Williams SJ, Campbell ME, McMillen IC, 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): R 360-367.

[5] 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.

[6] 王振华, 黄子扬, 吕国荣. 宫内慢性缺氧对子代大鼠血管内皮功能的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2010, 18 (9): 696-700.

[7] Schreuder MF, van WJA, de Waal HAD. Intrauterine growth restriction increases blood pressure and central pulse pressure measured with telemetry in aging rats [J]. J Hypertens, 2006, 24 (7): 1 337-343.

[8] Atochin DN, Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase

transgenic models of endothelial dysfunction [J]. Pflugers Arch, 2010, 460 (6): 965-974.

[9] Liu J, Gao Y, Negash S, et al. Long-term effects of prenatal hypoxia on endothelium-dependent relaxation responses in pulmonary arteries of adult sheep [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 296 (3): L 547-554.

[10] Chen YF, Wang ZH, Chen ZK, et al. Intermittent maternal hypoxia has an influence on regional expression of endothelial nitric oxide synthase in fetal arteries of rabbits [J]. Pediatr Res, 2013, 73 (6): 706-712.

[11] 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.

[12] Habek D. Effects of smoking and fetal hypokinesia in early pregnancy [J]. Arch Med Res, 2007, 38 (8): 864-867.

[13] 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 (4): 573-579.

[14] Ruijtenbeek K, Kessels CG, Janssen BJ, et al. Chronic moderate hypoxia during in ovo development alters arterial reactivity in chickens [J]. Pflugers Arch, 2003, 447 (2): 158-167.

[15] Broughton BR, Miller AA, Sobey CG. Endothelium-dependent relaxation by G protein-coupled receptor 30 agonists in rat carotid arteries [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 298 (3): H1 055-061.

[16] Gao J, Bellien J, Gomez E, et al. Soluble epoxide hydrolase inhibition prevents coronary endothelial dysfunction in mice with renovascular hypertension [J]. J Hypertens, 2011, 29 (6): 1 128-135.

[17] d'Uscio LV, Das P, Santhanam AV, et al. Activation of PPARdelta prevents endothelial dysfunction induced by overexpression of amyloid-beta precursor protein [J]. Cardiovasc Res, 2012, 96 (3): 504-512.

(此文编辑 文玉珊)