

网络出版时间:2022-1-20 14:39 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220119.1133.013.html

孕期缺氧对子代肺动脉血管功能的影响及其机制

赵梦,李欢,吉冰玉,徐婷,高芹芹

摘要 目的 探讨孕期缺氧对成年雄性子代大鼠肺动脉血管功能的影响及机制。方法 将清洁级 Sprague-Dawley 孕鼠随机分为缺氧组和对照组。缺氧组孕鼠在孕期第 10~20 天放入缺氧箱(10.5% 氧气和 89.5% 氮气)中;对照组孕鼠在常氧下饲养(21% 氧气)。两组孕鼠第 21 天取出后自然分娩,断奶后将雄性子代饲养至 4 月龄。4 月龄雄性子代大鼠用 4% 水合氯醛麻醉,分离出肺动脉进行血管功能和分子生物学等相关实验。结果 与对照组相比,缺氧组大鼠肺动脉对苯肾上腺素(PE)诱导的收缩反应减弱($P < 0.001$);而乙酰胆碱(ACH)和硝普钠(SNP)诱导的肺动脉的舒张反应在两组之间没有差异。与对照组相比,缺氧组肺血管中 L 型电压门控钙离子通道(Cav1.2)的 mRNA 水平降低($P < 0.001$)、蛋白表达量下降($P < 0.01$)。结论 孕期缺氧导致成年雄性子代大鼠 PE 介导的肺动脉血管收缩反应减弱,这与肺血管中 Cav1.2 基因的表达下调有关。

关键词 孕期缺氧;肺动脉;血管收缩;血管舒张;钙离子通道

中图分类号 R 714.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)02-0235-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.02.014

许多成人疾病的发生,其病因往往可以追溯到儿童、婴幼儿甚至胎儿期。近期大量研究^[1-2]表明:孕期多种不良因素(母体、遗传或环境)均不同程度影响宫内胎儿发育,这为成年后患心血管等疾病埋下“病根”。在胎儿发育晚期,肺循环经历了一系列的结构和功能变化,胎盘的气体交换转变为肺的气体交换,因此肺循环特别容易受到缺氧的影响。孕期宫内缺氧是胎儿发育过程中最为常见的不良因素^[3-4]。已有大量研究^[5-9]表明,孕期缺氧可影响子代冠状动脉、脑动脉、肾动脉等血管的功能。而孕期缺氧对子代肺动脉的影响及其机制知之甚少。该研究主要围绕孕期缺氧对成年雄性子代大鼠肺动脉血管功能的影响及机制进行探讨。

2021-12-23 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81873841,81741024)

作者单位:苏州大学附属第一医院胎儿医学研究所,苏州 215006

作者简介:赵梦,女,硕士研究生;

高芹芹,女,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: jennyq-gao@126.com

1 材料与方法

1.1 实验动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠清洁级,雌性大鼠体质量 240~260 g,雄性大鼠体质量 280~300 g,由苏州大学医学部实验动物中心提供,生产许可证号:XCYK 2002-2008,使用许可证号:SYXK 2002-0037。

1.2 主要试剂 硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)、乙酰胆碱(acetyl choline, ACH)、苯肾上腺素(phenylephrine, PE)、2-氨基乙基联苯基硼酸酯(2-aminoethyl diphenylborinate, 2APB)、硝苯地平(nifedipine, NIFE)和 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)购于美国 Sigma 公司。

1.3 主要仪器 Chart 7 Powerlab 购自澳大利亚 AD Instruments 公司;Myograph System 购自美国 Radnoti LLC 公司;荧光 PCR 仪、NanoDrop 购自上海赛默飞世尔科技有限公司;ML-HCB 数字智能测氧仪购自北京航天鹏诚仪器仪表有限公司。

1.4 常用缓冲液 HEPES 缓冲液:氯化钠 16.58 g、氯化钾 0.7 g、HEPES 4.76 g、EDTA 0.38 g、葡萄糖 1.98 g、磷酸二氢钾 0.32 g、七水硫酸镁 0.84 g、二水氯化钙 0.82 g,单蒸水定容到 2 000 ml,用氢氧化钠调节 pH 值至 7.35~7.45。

1.5 实验方法

1.5.1 动物模型制备 将 SD 雌性和雄性大鼠饲养在同一房间里,室内温度设为 22℃,每天各 12 h 光照和黑暗,并提供标准饲料和水。取 3 月龄雄性和雌性大鼠 1:1 进行交配。交配一晚后检查雌性大鼠是否有阴道栓。如果有阴道栓,说明雌性大鼠成功受孕,记为妊娠的第 1 天。将受孕成功的雌性大鼠随机分为两组。其中一组在正常条件下饲养(21% O₂),直至分娩,作为对照组;另一组在妊娠第 10 天置于缺氧箱中饲养(10.5% O₂ 和 89.5% N₂),至妊娠第 21 天,作为缺氧组。缺氧箱每天打开 1 次用于替换垫料、食物和水,用钠石灰来吸收呼吸作用产生的水和二氧化碳。缺氧组和对照组孕鼠生下胎鼠,待子代断奶后,继续将雄性后代养至 4 月龄进行动物实验。

1.5.2 血管实验 用4%水合氯醛将雄性子代大鼠麻醉后固定于托盘上,快速取出肺脏,立即浸泡在HEPES缓冲液中;在显微镜下轻柔地分离出肺动脉,将肺动脉剪成3 mm左右的血管环,置于冰上备用;在血管浴槽中加入5 ml 37℃ HEPES缓冲液,在显微镜下,用两根钢丝将肺动脉血管环固定于血管浴槽中的螺丝上;将血管浴槽与Powerlab转换器连接,向血管浴槽中持续通入适量的氧气;在电脑上打开Chart 7软件,将血管的张力调整至生理状态,并让血管环稳定30 min。以60 mmol/L氯化钾200 μ l刺激血管,当血管收缩强度达到最大时,用37℃ HEPES缓冲液冲洗3遍,待血管稳定后再重复刺激2次。当收缩反应达到最大值后,记录并计算血管的平均收缩强度。用37℃ HEPES缓冲液冲洗3遍,待血管张力稳定至基线后,以50 μ l 10^{-4} mol/L的5-HT诱导血管收缩达到平台后,立即加入累积浓度梯度的ACH(10^{-9} ~ 10^{-4} mol/L)和SNP(10^{-9} ~ 10^{-4} mol/L);或用累积浓度梯度PE(10^{-9} ~ 10^{-4} mol/L)刺激肺动脉血管环;或孵育L-型钙离子通道(L-type calcium channels, LTCCs)阻断剂NIFE或三磷酸肌醇(Inositol-1, 4, 5-trisphosphate, IP3)受体阻滞剂2APB后,观察离体肺动脉血管环对累积浓度梯度PE的收缩反应。

1.5.3 RT-PCR检测肺组织中mRNA水平 使用TRIzol试剂提取肺动脉RNA,并使用NanoDrop分光光度计定量。用Takara逆转录试剂盒对RNA进行逆转得到cDNA。以GAPDH为内参,使用SYBR Green Supermix Taq试剂盒,RT-PCR检测成年子代雄

性大鼠肺动脉肾上腺素能 α 1A受体(ADRA1A)、肾上腺素能 α 1D受体(ADRA1D)、肾上腺素能 α 2B受体(ADRA2B)、肾上腺素能 α 2C受体(ADRA2C)、肾上腺素能 β 1受体(ADRB1)、肾上腺素能 β 2受体(ADRB2)、肾上腺素能 β 3受体(ADRB3)、Cav1.2、T型钙离子通道(Cav3.2)的mRNA水平。以GADPH为内参,基因表达的相对定量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算得出。

1.5.4 Western blot检测 取30 mg肺动脉血管组织研磨成粉末,将粉末转移到1.5 ml EP管中,加入RIPA裂解液,置于冰上,反复静置旋转数十次;待管内无明显沉淀,置95℃水浴锅中加热15 min。配制浓缩胶和分离胶,取上清液进行SDS PAGE凝胶电泳。以 β -actin作为内参,检测灰度值,对Cav1.2蛋白的表达水平进行定量分析。

1.6 统计学处理 统计学分析采用GraphPad Prism 5.01数据分析软件,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。对数据采用双因素方差分析和两样本均数 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACH和SNP介导的肺动脉舒张反应 缺氧组成年子代雄性大鼠的肺动脉血管环对ACH介导的舒张效应与对照组比较,差异无统计学意义($F = 0.2208$)(图1A);缺氧组肺动脉血管环对SNP介导的舒张效应与对照组比较,差异无统计学意义($F = 0.5025$)(图1B)。

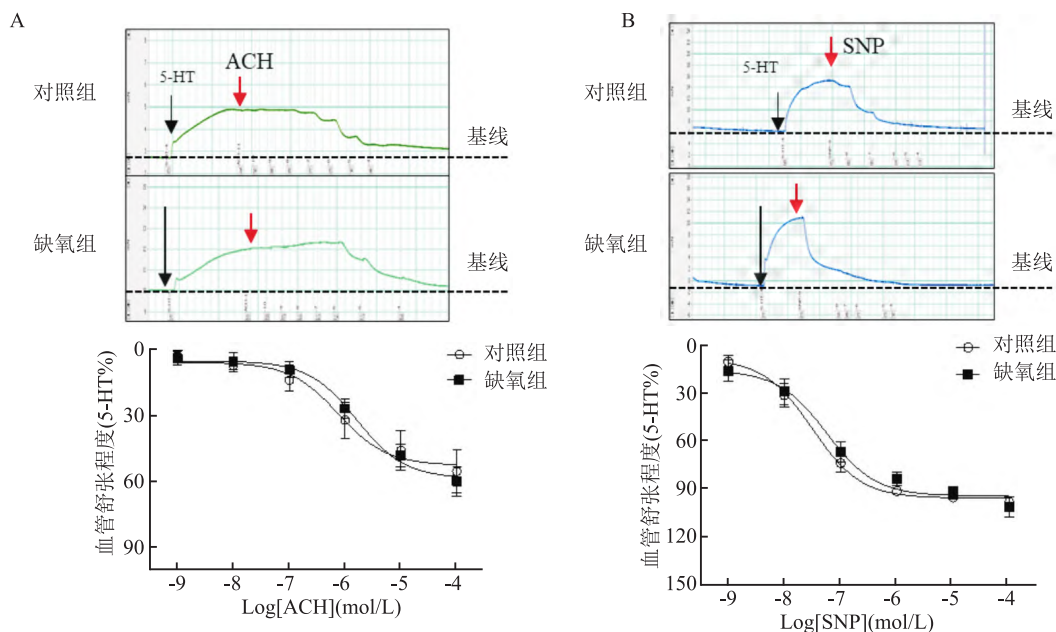


图1 ACH和SNP介导两组子代肺动脉的舒张反应

A: 累积浓度ACH诱导的舒张反应; B: 累积浓度SNP介导的舒张反应

2.2 PE 介导的肺动脉收缩反应 肺动脉对苯肾上腺素均有剂量依赖性收缩反应,缺氧组 PE 引起的肺动脉收缩强度低于对照组 ($F = 4.077$, $P < 0.001$) (图 2A),对 PE 介导的最大收缩反应低于对照组 ($P < 0.001$) (图 2B);两组肺动脉最大收缩强度分别达到 KCL 引起的收缩强度的 $(14.28 \pm 2.572)\%$ 和 $(6.320 \pm 0.712)\%$ ($t = 4.212$) (表 1)。

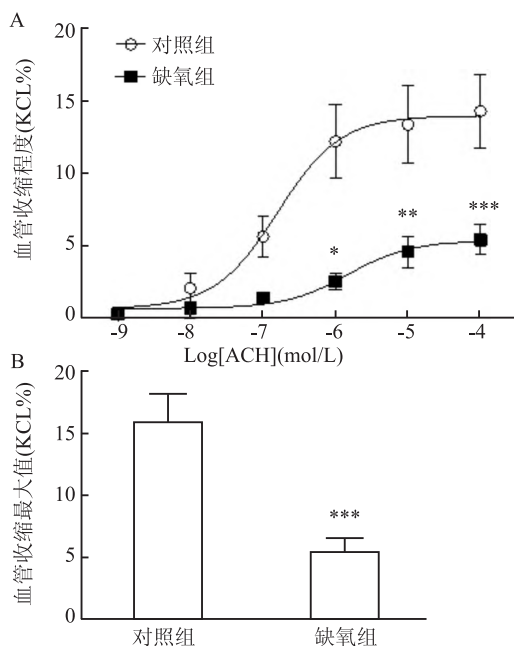


图 2 PE 介导两组子代肺动脉的收缩反应

A: 累积浓度梯度 PE 介导的收缩反应;B: 累积浓度 PE 诱导的最大收缩强度;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

表 1 肺动脉对不同累积浓度 PE 反应的比较

浓度 (mol/L)	对照组	缺氧组
10^{-9}	0.23 ± 0.089	0.09 ± 0.141
10^{-8}	2.05 ± 1.065	0.72 ± 0.185
10^{-7}	5.62 ± 1.456	1.37 ± 0.307
10^{-6}	12.19 ± 2.548	$2.51 \pm 0.545^*$
10^{-5}	13.36 ± 2.689	$5.32 \pm 0.689^{##}$
10^{-4}	14.28 ± 2.572	$6.92 \pm 0.712^{\Delta\Delta\Delta}$

与对照组 10^{-6} mol/L 比较: * $P < 0.05$;与对照组 10^{-5} mol/L 比较: ** $P < 0.01$;与对照组 10^{-4} mol/L 比较: *** $P < 0.001$

2.3 PE 介导的肺动脉收缩反应与 LTCCs 有关

用 NIFE 阻断 LTCCs 后,肺动脉对 PE 引起的收缩反应均减弱,且敷药后两组之间的收缩强度没有差异 (图 3A);孵育 NIFE 后,缺氧组 PE 引起的肺动脉最大收缩效应与对照组之间差异没有统计学意义 (图 3B);两组肺动脉最大收缩强度分别达到 KCL 引起的收缩强度的 $(2.77 \pm 0.608)\%$ 和 $(1.96 \pm 0.234)\%$ (表 2)。用 2APB 阻断 IP₃ 受体后,PE 引起的肺动脉的收缩反应均减弱,且敷药后两组比较,缺氧组仍低于对照组 ($F = 2.342$, $P < 0.05$) (图 3C);孵育 2APB 后,缺氧组 PE 引起的肺动脉最大收缩效应仍低于对照组 ($P < 0.05$) (图 3D);两组肺动脉最大收缩强度分别达到 KCL 引起的收缩强度的 $(8.96 \pm 0.980)\%$ 和 $(3.23 \pm 0.362)\%$ (表 2)。

2.4 肺动脉中 PE 受体、Cav1.2 和 Cav3.2 的 mRNA 水平

与对照组相比,缺氧组肺动脉血管 PE 的

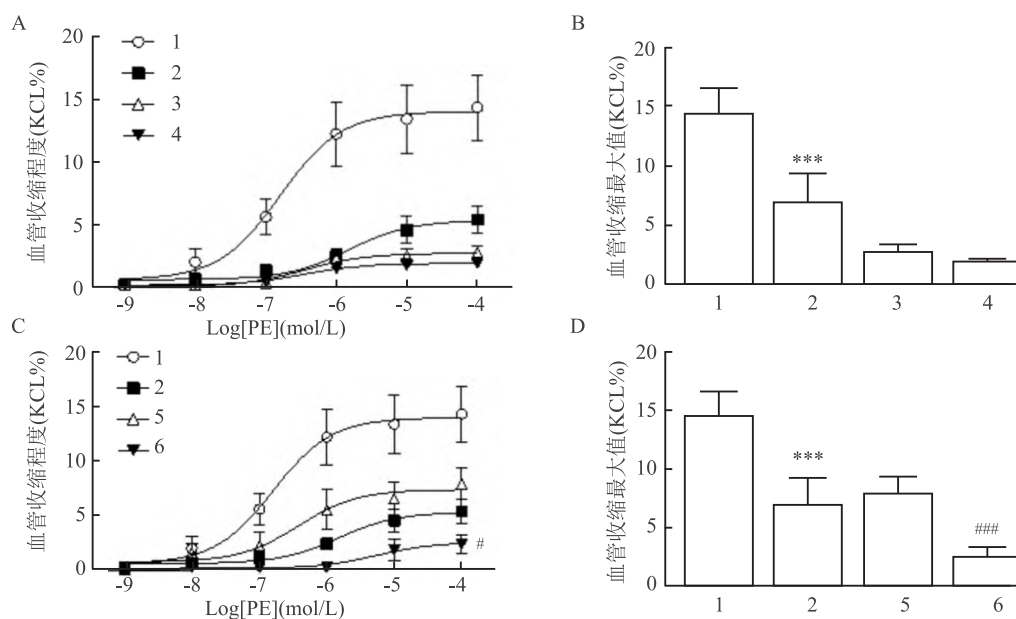


图 3 PE 介导两组子代肺动脉血管收缩与 LTCC 和 2APB 的关系

A: 离体肺动脉血管环对 PE、NIFE + PE 的反应;B: 离体肺动脉血管环对 PE、NIFE + PE 的最大收缩强度;C: 离体肺动脉血管环对 PE、2APB + PE 的收缩反应;D: 离体肺动脉血管环对 PE、2APB + PE 的最大收缩强度;1: 对照组;2: 缺氧组;3: 对照组 + NIFE;4: 缺氧组 + NIFE;5: 对照组 + 2APB;6: 缺氧组 + 2APB;与对照组比较: *** $P < 0.001$;与对照组 + 2APB 比较: # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$

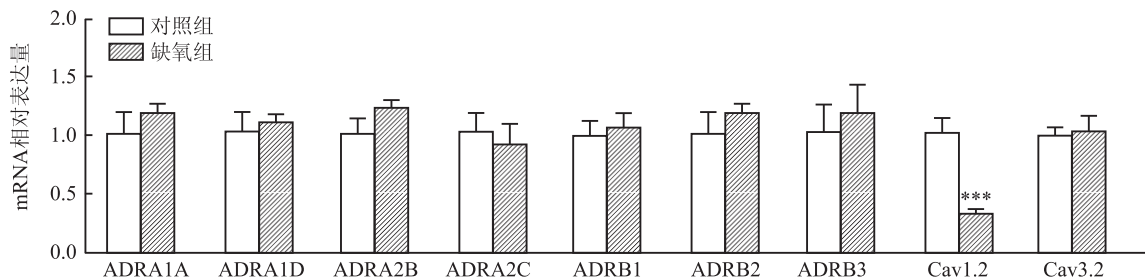


图4 肺动脉血管 PE 和 LTCCs 相关受体 mRNA 的表达情况

与对照组比较:*** $P < 0.001$

表2 肺动脉对孵育 NIFE 或 2APB 后不同累积浓度 PE 反应的比较

浓度 (mol/L)	对照组 + NIFE	缺氧组 + NIFE	对照组 + 2APB	缺氧组 + 2APB
10^{-9}	0.21 ± 0.130	0.23 ± 0.114	0.71 ± 0.853	0.24 ± 0.101
10^{-8}	0.19 ± 0.141	0.25 ± 0.101	1.42 ± 1.080	0.29 ± 0.121
10^{-7}	0.42 ± 0.246	0.51 ± 0.091	2.78 ± 1.030	0.31 ± 0.165
10^{-6}	2.31 ± 0.628	1.57 ± 0.318	5.86 ± 1.067	$0.91 \pm 0.124^*$
10^{-5}	2.48 ± 0.622	1.83 ± 0.259	7.97 ± 1.067	$2.98 \pm 0.523^{\#}$
10^{-4}	2.77 ± 0.608	1.96 ± 0.234	8.96 ± 0.980	$3.23 \pm 0.362^{\Delta\Delta\Delta}$

与对照组 + 2APB 10^{-6} mol/L 比较: * $P < 0.05$; 与对照组 + 2APB 10^{-5} mol/L 比较: $^{\#}P < 0.05$; 与对照组 + 2APB 10^{-4} mol/L 比较: $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.001$

A 型受体 [ADRA1A ($t = 0.8738$)、ADRA1D ($t = 0.4027$)、ADRA2B ($t = 1.165$) 和 ADRA2C ($t = 0.6094$)] 和 B 型受体 [ADRB1 ($t = 0.2682$)、ADRB2 ($t = 0.4053$) 和 ADRB3 ($t = 0.6569$)] 的 mRNA 水平没有变化 (图 4); 缺氧组肺动脉血管 Cav1.2 的 mRNA 表达水平低于对照组 ($P < 0.001$, $t = 4.859$), 而 Cav3.2 的 mRNA 表达在两组之间没有差异 ($t = 0.1624$) (图 4)。

2.5 肺动脉血管中 Cav1.2 的蛋白水平 与对照组比较, 缺氧组肺动脉血管中 Cav1.2 的蛋白水平降低 ($P < 0.01$, $t = 5.313$) (图 5)。

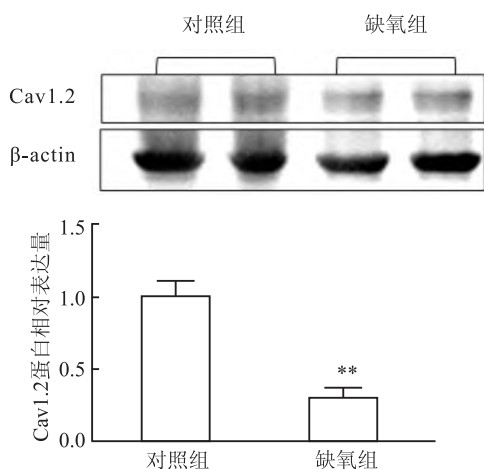


图5 肺动脉血管 Cav1.2 的蛋白表达情况

与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

本研究表明孕期缺氧可导致成年雄性子代大鼠肺动脉血管对苯肾上腺素引起的收缩反应减弱, 且此收缩反应减弱主要与 Cav1.2 表达下调有关, 而与胞内钙释放通路和苯肾上腺素受体的表达无关。孕期缺氧并不影响成年雄性子代大鼠肺动脉血管的舒张功能。

肾上腺素能受体广泛分布于外周血管参与血管张力的调节。本研究显示孕期缺氧成年子代肺动脉对苯肾上腺素介导的收缩减弱与其受体无关, 可能由平滑肌细胞内的其他收缩机制引起的。血管平滑肌细胞胞内 Ca^{2+} 浓度, 在血管收缩中起着关键作用^[10]。在阻力血管中, 胞内 Ca^{2+} 浓度升高主要有内质网 Ca^{2+} 释放和外 Ca^{2+} 内流介导完成。IP3Rs 是一种广泛表达于内质网膜上的 Ca^{2+} 释放通道, 本研究显示通过抑制血管环 IP3Rs 后, 缺氧子代肺血管环对苯肾上腺素的收缩反应仍明显减弱, 这说明孕期缺氧导致子代肺血管收缩功能减弱与内质网 IP3Rs 介导内 Ca^{2+} 释放无关。细胞外 Ca^{2+} 进入细胞内主要通过电压门控 Ca^{2+} 通道, 其中 LTCCs 家族中 Cav1.2 通道对调节平滑肌细胞 Ca^{2+} 浓度至关重要^[10]。本研究表明通过抑制血管环 LTCCs 后, 缺氧子代肺血管环对苯肾上腺素的收缩反应与对照组间无明显差异, 这说明孕期缺氧导致子代肺血管收缩功能减弱与细胞膜 LTCCs 介导外 Ca^{2+} 内流有关。

肺动脉平滑肌细胞内钙稳态的破坏被认为是肺动脉高压发病的一个重要触发因素^[11-12]。在以往的研究^[12]中缺氧可导致子代肺动脉血管 LTCCs 表达上调。本研究显示孕期缺氧下调子代大鼠肺动脉中 Cav1.2 的表达。肺循环作为一个高流量和低压力的系统, 旨在优化气体交换过程, 因此这一差异可能是机体的保护效应; Cav1.2 下调极有可能是对缺氧诱导的高收缩的代偿性保护, 从而提高肺循环血

流量。

研究表明孕期缺氧降低成年雄性子代大鼠肺动脉血管的收缩能力。这与以往提出的急性缺氧引起肺动脉高压、肺动脉收缩增强截然不同^[12]。此外,以往的研究^[5-8]发现,孕期缺氧可导致成年子代肠系膜、肾动脉及大脑中动脉的收缩功能增加,而本研究显示孕期缺氧导致子代肺血管收缩降低,这说明孕期缺氧对子代血管功能的影响因血管类型的不同而不同。本研究创新性的从离子通道水平揭示孕期缺氧导致子代肺血管功能障碍的机制;研究结果提示应加强孕期发生缺氧胎儿出生后的随访,也为产前孕期缺氧子代心血管疾病的临床治疗提供实验支持。

参考文献

- [1] Barker D J, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales[J]. Lancet, 1986, 1(8489):1077-81.
- [2] 岳鹤声, 陈旭东, 刘红敏, 等. 宫内缺氧对新生大鼠神经元的影响及当归的保护作用[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(9): 2327-9.
- [3] 朱晓琳, 何阿信, 仲元, 等. 孕期缺氧对胎鼠血管功能的影响[J]. 中华围产医学杂志, 2017, 20(4): 282-6.
- [4] 张瑞, 蒋丽君, 李秀兰, 等. 围术期胎儿宫内缺氧对产妇产氧化应激损伤的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2014, 49(6): 894-5.
- [5] Liu B, Liu Y, Shi R, et al. Chronic prenatal hypoxia down-regulated BK channel beta1 subunits in mesenteric artery smooth muscle cells of the offspring[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 45(4): 1603-16.
- [6] Chen X, Qi L, Fan X, et al. Prenatal hypoxia affected endothelium-dependent vasodilation in mesenteric arteries of aged offspring via increased oxidative stress[J]. Hypertens Res, 2019, 42(6): 863-75.
- [7] Tang J, Li N, Chen X, et al. Prenatal hypoxia induced dysfunction in cerebral arteries of offspring rats[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(10): e006630.
- [8] Tang J, Zhu Z, Xia S, et al. Chronic hypoxia in pregnancy affected vascular tone of renal interlobar arteries in the offspring[J]. Sci Rep, 2015, 5: 9723.
- [9] Chen X, Qi L, Su H, et al. Prenatal hypoxia attenuated contraction of offspring coronary artery associated with decreased PKCbeta Ser660 phosphorylation and intracellular calcium[J]. Life Sci, 2020, 261: 118364.
- [10] 陈良余, 毛雨, 周扬, 等. TRPC1/C4/C5 通道调节胸主动脉平滑肌收缩作用研究[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(10): 1501-5.
- [11] 黄子旭, 沈捷. 钙通道在肺动脉高压发病机制中的研究进展[J]. 临床儿科杂志, 2016, 34(11): 861-5.
- [12] Wan J, Yamamura A, Zimnicka A M, et al. Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca^{2+} channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013, 305(2): L154-64.

The effect and mechanism of pulmonary vascular dysfunction in prenatal hypoxic offspring

Zhao Meng, Li Huan, Ji Bingyu, Xu Ting, Gao Qinqin

(Institute for Fetology, The First Hospital of Soochow University, Suzhou 215006)

Abstract Objective To investigate the effect and mechanism of prenatal hypoxia on pulmonary artery vascular function in adult male offspring. **Methods** Sprague-Dawley pregnant rats were randomly divided into hypoxia group and control group. Pregnant rats in the hypoxia group were housed in the hypoxia chamber (a mixture of 89.5% nitrogen gas and 10.5% oxygen) from gestational day 10th to 20th. Pregnant rats in the control group were fed under normal oxygen. All animals were fed with standard rat food and tap water, and allowed to give birth naturally. After weaning, the male offspring were raised to 4 months old. Male offspring rats were anesthetized with chloral hydrate, and pulmonary artery was isolated for vascular function and molecular experiments. **Results** Compared with the control group, phenylephrine (PE)-induced contraction response in prenatal hypoxic pulmonary artery was decreased ($P < 0.001$). There was no difference in acetylcholine (ACH)- and sodium nitrate (SNP)-induced diastolic responses between the two groups. Compared with control group, Cav1.2 protein ($P < 0.01$) and mRNA levels ($P < 0.001$) in hypoxia group were reduced. **Conclusion** Prenatal hypoxia can lead to a decreased PE-induced vasoconstriction response in adult male offspring, which is related to the down-regulation of Cav1.2 expression in pulmonary artery.

Key words prenatal hypoxia; pulmonary artery; vasoconstriction; vasodilation; calcium channels