

· 论著 ·

孕期慢性缺氧对子代大鼠心脏损伤及氧化应激水平的影响*

陈丽云¹ 王霞丽¹ 黄文森^{1,2,*}

1.泉州医学高等专科学校内科学教研室(福建 泉州 362000)

2.福建医科大学附属第一医院内分泌科(福建 泉州 362000)

【摘要】目的 研究宫内慢性缺氧造成子代宫内生长受限及不同发育阶段心脏结构变化及其与氧化应激(Oxidative Stress, OS)的关系。**方法** 将怀孕的SD大鼠在妊娠第4~21d(GD4~21)进行缺氧处理,使其子代处于缺氧和缺血状态。对照组为正常饮食的健康大鼠。分别于出生后的第5、20、40d分别测量子代鼠的体重、心脏重量等,同时检查心肌细胞中氧化应激参数丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量,抗氧化能力指标谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活力。**结果** 与对照组相比,孕期缺氧诱导后代宫内生长受限,心脏质量指数增高,心肌中MDA生成增多而GSH-Px和SOD的活力下降。**结论** 研究结果表明宫内慢性缺氧与后代心肌结构改变及氧化应激损伤之间存在联系。

【关键词】 宫内慢性缺氧; 宫内生长受限; 氧化应激**【中图分类号】** R542.2; R714.2**【文献标识码】** A**【基金项目】** 泉州市科技计划项目(2020N057s)**DOI:**10.3969/j.issn.1009-3257.2022.07.016

Impact of Chronic Intrauterine Hypoxia on Cardiac Structure and Oxidative Stress of Offspring Rats*

CHEN Li-yun¹, WANG Xia-li¹, HUANG Wen-sen^{1,2,*}

1.Department of Internal Medicine, Quanzhou Medical College, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

2.Department of Endocrinology, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou 362000, Fujian Province, China

Abstract: Objective To investigate the effects of the maternal hypoxia during pregnancy on the fetal growth, changes of cardiac structure and oxidative stress injury at different developmental stages in offsprings. **Methods** Pregnant SD rats were treated with chronic intrauterine hypoxia on the 4th to 21st day of gestation (GD4-21) to make their progeny in a hypoxic and ischemic state. The control group was healthy rats fed with normoxic diet. At the 5th, 20th and 40th day after birth, the weight and heart weight of the offspring were measured. Cardiac oxidative stress parameters such as MDA, the activity of SOD and GSH-Px were detected. **Results** Compared with the control group, the Ratio of heart weight to body weight were increased in female offspring submitted to intrauterine hypoxia(HI) during pregnancy. Compared with the control group, HI group shows that MDA was increased but the activity of SOD and GSH-Px in the myocardium was decreased that suggesting the heart muscle suffers from oxidative stress injury. **Conclusion** Our results suggest there was an association among hypoxia during pregnancy and adult vascular structural changes and oxidative stress.

Keywords: Intrauterine Hypoxia; Fetal Growth Restriction (FGR); Oxidative Stress

宫内慢性缺血缺氧为中枢神经系统和心血管疾病的起源和发展提供了强大的刺激。宫内缺血缺氧可由妊娠母体的不同疾病状态如贫血、妊娠糖尿病、妊娠高血压等引起。母体产前的缺血缺氧导致胎儿获得氧和能量减少,引起宫内生长受限,导致子代以后患心血管疾病的易感性增加;如罹患缺血性疾病,其心肌损伤程度也更重^[1]。其机制主要与宫内缺血缺氧改变子代肾素血管紧张素系统(Renin-angiotensin system, RAS)的发育有关^[2-3]。妊娠期缺氧的子代大鼠成年后心脏RA活化^[4]进而激活下游细胞外调节蛋白激酶1/2进而上调胶原蛋白I和III的合成,导致心肌纤维化^[5]。已有研究探讨宫内慢性缺氧与雄性后代主动脉功能的关系,该研究表明,宫内缺氧导致主动脉中的SOD和GSH-Px活性降低,同时增加血管对去甲肾上腺素的血管收缩剂反应,降低对乙酰胆碱的舒张反应^[6]。但是对宫内缺氧诱导心肌氧化应激及心肌损伤的持续时间及是否存在性别差异未见报道。本研究建立孕期宫内缺氧模型,研究其子代大鼠不同发育阶段心肌内损伤及氧化

应激损伤情况,进而探讨宫内缺氧对心肌的影响及其可能机制。对开展改善缺氧对胎儿的心肌损伤的治疗措施具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 主要试剂 MDA、SOD活力、GSH-Px活性等的检测试剂盒购买于南京建成生物技术有限公司。

1.2 实验动物 实验用动物为SPF级Sprague-Dawley(SD)大鼠(2月龄,体重170~230g,雌雄各24只),购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司,饲养于福建省泉州医学高等专科学校实验动物中心。动物实验过程均遵循《实验动物管理条例》和《福建省实验动物管理条例实施细则》等相关规定进行。

1.3 模型建立及分组 大鼠适应性喂养一周后,将雌性与雄性按1:1的比例置于笼中交配,次日清晨如检查出阴栓者则判定为成功受孕,记录为妊娠第1d(Gestation Day, GD1)。妊娠大鼠(n=20)分为常氧组(n=8)和缺氧组(n=12),被关在一个

【第一作者】陈丽云,女,主治医师,主要研究方向:内分泌与代谢病。E-mail: fulin36966@163.com

【通讯作者】黄文森,男,副教授,主要研究方向:临床医学教育与人文医学。E-mail: xinghuazd2233@163.com

单独的笼子里,于通风良好,环境温度18℃~20℃,相对湿度50%~60%的环境内,在12h光照/12h黑暗循环下,定期更换垫料。参照Williams^[7]和王振华等^[8]实验方法建立宫内缺氧模型:将孕鼠于妊娠第4d置入低压缺氧箱内(氧气浓度:10%±0.1%),维持4h,移出后随机取4只孕鼠麻醉后抽取动脉血行血气分析检查,判断造模成功与否。在妊娠第4d至妊娠第21d期间,每天上、下午各一次缺氧处理,每次4h。常氧组孕鼠于同期置于氧含量正常、等体积饲养舱中饲养。所有孕鼠给予正常饮食,分笼待产,自然分娩。取子代雌鼠为实验对象继续饲养,出生体重(Body weights, BW)低于对照组平均体重超过2个标准差为胎儿宫内发育迟缓幼崽则将纳入IH(Intrauterine Hypoxia, IH)组(30只),后期进一步分为产后5d(新生儿, IH1)、产后20d(幼年期, IH2)和产后40d(青春期, IH3)^[9]三个亚组;常氧组孕鼠子代纳入对照组(Control, Con),分别Con1、Con2、Con3三个亚组。

1.4 样本制备 子代大鼠饲养至产后5d、产后20d和产后40d,分别留取标本。实验动物在标本采集前禁食12h,测量体重后,腹腔注射1%戊巴比妥钠(1mL/kg)麻醉,迅速取出心脏,称重并记录,计算心脏质量指数[(心重mg/体重g)×10³]。

1.5 心肌氧化应激相关指标检测 用心脏组织制成10%匀浆液,经离心10min(3000r/min)后,取上清液进一步按照试剂盒说明进行检测:采用TBA比色法测定MDA, WST-1法测定总SOD活性,比色法测定GSH-Px。

1.6 统计学方法 应用SPSS 22.0软件进行统计分析。计量资

料均数以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用t检验及方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 各组母体缺氧后生化指标的比较 表1为孕鼠第1次缺氧处理4h后的动脉血气分析结果显示,结果显示:缺氧组血PaO₂、SaO₂较常氧组明显下降,差异具有统计学意义;血PaCO₂、pH值差异无统计学意义($P > 0.05$)。可见,该模型导致大鼠出现低氧血症,但没有酸中毒及二氧化碳潴留,适用于单纯缺氧因素的研究。

表1 孕鼠血气分析结果(n=4)

	pH	PaCO ₂ (kPa)	PaO ₂ (kPa)	SaO ₂ (%)
Con组	7.34±0.02	5.87±0.28	11.54±0.45	95.80±1.19
IH组	7.32±0.06	5.88±0.26	7.27±1.25*	76.33±10.92*

注: *表示与常氧组比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 宫内慢性缺氧对体重及心脏指数的影响 如表2所示,与常氧组相比,缺氧组在产后第5d的平均体重降低27%(对照组12.6±0.6 vs 缺氧组9.2±1.0, $P < 0.05$)($P < 0.05$),于产后第20d,两组体重无显著差别($P > 0.05$),提示子代鼠出现“追赶生长”现象。两组心脏重量无显著性差异,但缺氧组心脏重量指数(心脏与体重比, HW: BW)增大,差异有统计学意义。缺氧组大鼠心脏指数明显高于常氧组大鼠($P < 0.05$),显示缺氧导致心脏肥大。

表2 缺氧组及常氧组子代大鼠体重(g)及心脏重量: 体重比值(g/g)

	产后第5d			产后第20d			产后第40d		
	IH组(n=10)	Con组 (n=10)	P	IH组(n=10)	Con组(n=10)	P	IH组(n=10)	Con组(n=10)	P
BW	9.2±1.0	12.6±0.6	<0.05	53.8±6.5	54.1±7.1	>0.05	146.7±26.6	153.2±16.8	>0.05
HW:BW×10 ²	0.48±0.1	0.41±0.1	<0.05	0.46±0.1	0.38±0.1	<0.05	0.43±0.2	0.36±0.1	<0.05

注: 子代鼠体重: BW; 心脏重量: HW; HW:BW×10²: 心脏重量与体重比。

2.3 宫内慢性缺氧致子代大鼠心肌内氧化应激损伤 与常氧组相比,缺氧组心脏组织呈氧化应激状态,MDA增加(图1A),而抗氧化应激能力指标总SOD(图1B)和GSH-Px(图1C)活力明显降低($P < 0.05$)。如图1所示,各缺氧组心肌MDA含量分别较常氧组增加了16.8%、15.1%、13.9%;各缺氧组心肌SOD活力明显降低,产后5d时下降约20.5%,产后20d时下降约23.4%,产后40d时下降约23.4%。各缺氧组GSH-Px活力分别较常氧组降低了23.5%、21.9%、23.3%。MDA、SOD、GSH-Px活力等缺氧组与常氧组比较,差异均有统计学意义,MDA、SOD、GSH-Px活力等在各缺氧组间差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。

3 讨论

孕期缺氧导致胎儿宫内生长受限,本研究以宫内生长受限子代大鼠为研究对象,选取三个时间点分别为出生后5d、20d、40d为研究时间点,分别代表新生期、幼年期和青春期。研究发现,子代大鼠胎儿期受母体缺氧影响,出现生长受限,体重减低一直持续至幼儿期,但是在青春时期出现

“生长追赶现象”,出生后40d的时候,缺氧组体重与常氧组无明显差异。这与Wang等^[10]的研究结果是一致的。

胎儿起源假说认为宫内环境的质量与我们的基因组成相互作用,以增加晚年患病的风险。许多研究还证实了胎源性疾病的发生在性别上存在差异^[11-13]。有研究证明宫内缺血缺氧诱导的大鼠后代认知能力下降在青春期是性别依赖性的,并且可以在成年大鼠中恢复。Verschuren等^[14]研究发现宫内缺氧以性别依赖的方式改变了肾血管功能,雌性的血管功能显示出比雄性更强的收缩、舒张反应性。da Silva等^[15]研究发现宫内缺氧导致雄性后代主动脉中的SOD和GSH-Px活性降低,同时增加血管对去甲肾上腺素的血管收缩剂反应,降低对血管扩张剂(乙酰胆碱)的舒张反应。相关研究还表明,雌性不论是在“追赶性”生长还是在行为学实验,乃至中枢Ang II受体的表达方面都未发现存在性别相关的差异。本实验表明孕期缺氧可导致子代雌性大鼠心肌氧化应激损伤,证实了宫内慢性缺氧对氧化应激方面的影响不存在性别差异。

氧化应激是指体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态。本实验通过检测MDA、SOD、GSH-Px反映氧化应激状态。

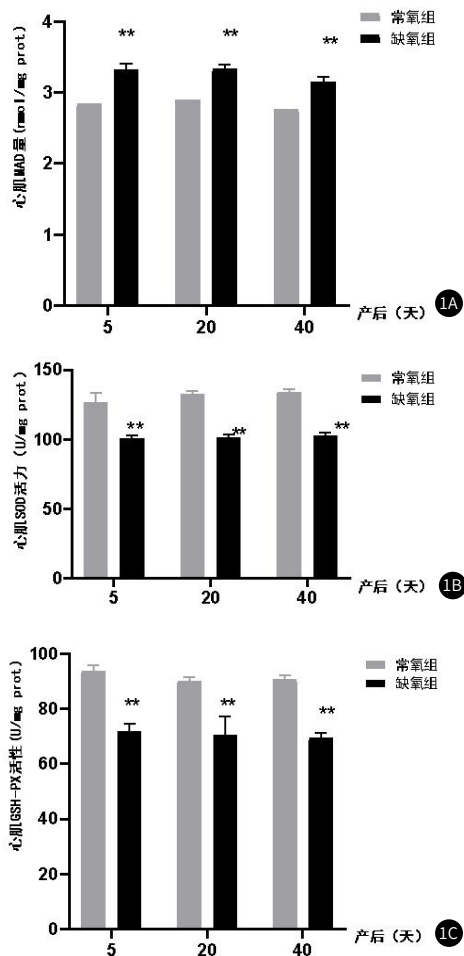


图1 各组心肌组织氧化应激指标检测。图1A: 心脏组织MDA(malondialdehyde)含量; 图1B: 心脏组织SOD(superoxide dismutase)活力; 图1C: 心脏组织GSH-Px(Glutathione peroxidase)活性, 与常氧组相比, ** $P < 0.01$ 。

ROS可氧化细胞膜上的不饱和脂肪酸, 形成脂质过氧化物, 进一步造成功能蛋白损伤、RNA合成受阻, 从而引起细胞衰老和凋亡。物进一步代谢产生MDA, 因此, MDA水平可间接反映细胞损伤。SOD、GSH-Px是ROS重要的清除剂, 共同将ROS浓度控制在较低的稳态水平^[16-17]。胎儿心脏和脉管系统中的氧化应激是产前缺氧在以后心血管功能障碍发病机制的基础^[18]。Giussani等^[19]研究发现用维生素C干预可改善氧化应激损伤宫内缺氧孕鼠子代胎儿期、成年雄性大鼠的主动脉功能及氧化应激状态, 也确认了氧化应激是宫内缺氧雄性大鼠的血管功能障碍发生发展中的重要地位。本研究显示不同发育阶段的雌性大鼠心肌MDA增加, 提示心肌遭受氧化损伤; 各缺氧组SOD、GSH-Px活性降低显示宫内缺氧降低了后代心肌内的抗氧化能力, 以上数据与Giussani等的研究结果是一致的。

本实验针对经历慢性宫内缺氧的子代雌性大鼠在不同发育阶段的心肌损伤情况及其机制进行探讨, 这些数据为预防高危妊娠后代心脏功能障碍的发育起源的机制和可能的干预靶点提供了参考。

参考文献

- [1] Xu Y, Williams S J, O'Brien D, et al. Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs postischemic recovery in adult male offspring[J]. *FASEB J*, 2006, 20(8): 1251-1253.
- [2] Chan W P, Fung M L, Nobiling R, et al. Activation of local renin-angiotensin system by chronic hypoxia in rat pancreas[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 160(1-2): 107-114.
- [3] Ojeda N B, Grigore D, Alexander B T. Intrauterine growth restriction: fetal programming of hypertension and kidney disease[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2008, 15(2): 101-106.
- [4] Yan X, Schuldt A J, Price R L, 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): 1274-1281.
- [5] 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.
- [6] da Silva T F G, de Bem G F, da Costa C A, et al. Prenatal hypoxia predisposes vascular functional and structural changes associated with oxidative stress damage and depressive behavior in adult offspring male rats[J]. *Physiol Behav*, 2021, 230: 113293.
- [7] Williams S J, Campbell M E, McMillen I C, 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): R360-367.
- [8] 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.
- [9] Picut C A, Dixon D, Simons M L, et al. Postnatal ovary development in the rat: Morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters[J]. *Toxicol Pathol*. 2015, 43(3): 343-353.
- [10] 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): H1321-8.
- [11] Rexhepaj R, Boini K M, Huang D Y, et al. Role of maternal glucocorticoid inducible kinase SGK1 in fetal pro-programming of blood pressure in response to prenatal diet[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294(6): 2008-2013.
- [12] Vickers P D, Gluckman A H, Coveny P L, et al. The effect of neonatal leptin treatment on postnatal weight gain in male rats is dependent on maternal nutritional status during pregnancy[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(4): 1906-1913.
- [13] 祝晖, 王爱清, 周安稳, 等. 妊娠晚期母鼠脱水对胎鼠及成年子代肾素血管紧张素系统功能的影响及其“印迹”效应[J]. *苏州大学学报: 医学版*, 2010, 30(4): 669-672.
- [14] Verschuren M T, Morton J S, Abdalvand A, et al. The effect of hypoxia-induced intrauterine growth restriction on renal artery function[J]. *Dev Orig Health Dis*, 2012, 3(5): 333-41.
- [15] Tian T, Wang Z, Zhang J. Pathomechanisms of oxidative stress in inflammatory bowel disease and potential antioxidant therapies[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 4535194.
- [16] Toldo S, Mauro A G, Cutter Z, et al. Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(6): H1553-H1568.
- [17] Giussani D A, Niu Y, Herrera E A, et al. Heart disease link to fetal hypoxia and oxidative stress[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, 814: 77-87.
- [18] Giussani D A, Camm E J, Niu Y, et al. Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress[J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31017.

(收稿日期: 2022-03-04)