

室旁核中血管紧张素Ⅱ通过活性氧介导慢性间歇性低氧大鼠的升压作用

唐志强,范一菲,汪金丽,程文慧,沈兵,钟明奎

摘要 **目的** 研究室旁核(PVN)中血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)-活性氧(ROS)通路在慢性间歇性低氧(CIH)大鼠的升压作用。**方法** 将雄性SD大鼠随机分为对照组和慢性间歇性低氧组(CIH组)(8 h/d,连续15 d)。用立体定位仪进行PVN核团定位微量注射,采用颈动脉插管法在体测量大鼠平均动脉压(MAP),ELISA法测量PVN中Ang Ⅱ、ROS含量,Western blot法测定PVN中血管紧张素ⅡⅠ型受体(AT1R)的蛋白表达,应用试剂盒(羟胺法)测定PVN中的总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力。**结果** 与对照组比较,CIH组大鼠PVN中ROS($P < 0.05$)和Ang Ⅱ含量显著升高($P < 0.01$),AT1R的表达显著增加($P < 0.05$),而T-SOD活力则明显下降($P < 0.01$)。双侧PVN内微量注射Ang Ⅱ(0.3 nmol)可升高两组大鼠的MAP,而CIH大鼠MAP升高更显著($P < 0.01$);超氧阴离子清除剂Tempol可降低两组大鼠的

MAP,而CIH大鼠MAP降低更显著($P < 0.01$);Tempol预处理可抑制Ang Ⅱ对两组大鼠的升压作用,且在CIH组中抑制作用更加明显($P < 0.01$)。**结论** 室旁核中ROS介导了Ang Ⅱ在CIH大鼠中的升压作用。

关键词 室旁核;活性氧;血管紧张素Ⅱ;慢性间歇性低氧;高血压

中图分类号 R 331.36

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2016)04-0472-05

睡眠呼吸暂停综合症(sleep apnea syndrome, SAS)与高血压有密切的联系,SAS会增加患中风、心衰等一些高血压相关疾病的风险^[1]。SAS因为慢性间歇性低氧(chronic intermittent hypoxia, CIH)从而导致了交感神经的兴奋,内皮功能的紊乱以及血管的炎症^[2],因此CIH被认为是引起高血压最重要的因素。交感神经活动的过度增强是各种高血压的重要特征之一。研究^[3]显示,CIH引起高血压的发病机制与持续增强的交感神经兴奋有关。下丘脑室旁核(paraventricular nucleus, PVN)是整合心血管活动的重要核团,其下行纤维投射到延髓头端腹外侧区和脊髓中间外侧柱控制着交感节前神经元,因此

2015-12-21 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81070066);安徽省教育厅自然科学重点科研项目(编号:KJ2010A176);安徽医科大学博士科研基金(编号:XJ201221)

作者单位:安徽医科大学生理学教研室,合肥 230032

作者简介:唐志强,男,硕士研究生;

钟明奎,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:zhongmken@aliyun.com

Methods 36 male C57BL/6J mice were randomly assigned into three equal groups: normal control group (NC group), high-fat diet group (HF group) and high-fat diet with *Schistosoma japonicum* infected group (HSJ group). Specimen was collected 6 and 12 weeks after high-fat diet, separately. The levels of fasting blood glucose (FBG), fasting plasma insulin resistance index (FINS) and insulin (HOMA-IR) were detected. Interferon- γ (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4) and signal transducer and activator of transcription-4 (STAT4) signal transducer and activator of transcription-6 (STAT6) were detected by ELISA and immunohistochemical method. **Results** The mice from HF group showed higher levels of HOMA-IR than those from NC groups by the end of 6 and 12 weeks after infection ($P < 0.01$); the levels of HOMA-IR in mice from HSJ group were lower than NC group and HF group by the end of 12 weeks ($P < 0.05$); the levels of IL-4 in mice from HSJ group were higher than NC group and HSJ group by the end of 6 and 12 weeks after infection ($P < 0.05$); the levels of STAT6 in mice from HSJ group were higher than HF group by the end of 12 weeks after infection ($P < 0.05$); the levels of STAT4 in mice from HF group were higher than NC group by the end of 6 and 12 weeks after infection. **Conclusion** *Schistosoma japonicum* chronic infection may improve insulin resistance in obese mice with induced STAT6 protein expressed in liver tissue and secrete IL-4, providing new ideas for the prevention and treatment of diabetes.

Key words *Schistosoma japonicum*; insulin resistance; STAT4; STAT6

其功能异常可能是导致 CIH 时交感神经活动增强的重要原因。研究^[4-5]表明中枢活性氧(reactive oxygen species, ROS)及某些气体信号分子与高血压时交感神经活动的增强密切相关,脑内血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)作为调节交感神经活动和动脉血压的重要神经递质,与高血压的发生也有着密切的关系。研究^[6]表明,中枢 ROS 介导了 Ang II 引起的心交感传入反射增强、肾交感神经放电增加等作用。该研究旨在探讨在 CIH 大鼠中,下丘脑 PVN 中 ROS 介导的 Ang II 的升血压效应及其机制,为防治 SAS 引起的高血压提供科学实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性健康 SD 大鼠,190 ~ 230 g,清洁级,由安徽医科大学实验动物中心提供。大鼠分笼饲养,饮水、摄食自由,通风良好,室温(20 ± 5)℃。

1.2 仪器 间歇性低氧舱(CYS-1 型,南京新飞分析仪器制造有限公司);PowerLab 8/30 数据采集分析处理系统(澳大利亚 ADInstrument 公司);酶标仪(美国 Thermo scientific 公司);单臂数字式立体定位仪、颅骨钻(深圳市瑞沃德生命科技有限公司);医用压缩氧气(浓度 > 99.9%)、压缩氮气(浓度 > 99.99%)由合肥众益化工产品有限公司充装。

1.3 试剂 4-羟基-2,2,6,6-四甲基氧基哌啶(Tempol)、Ang II 购自美国 Sigma 公司;兔抗血管紧张素 II 1 型受体(angiotensin II type 1 receptor, AT1R)、鼠抗 β-actin 购自美国 Santa Cruz 公司;Ang II ELISA 检测试剂盒购自美国 RD 公司;总超氧化物歧化酶(total-superoxide dismutase, T-SOD)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4 模型的制作 大鼠适应环境饲养 1 周后进行实验,随机分为对照组($n=6$)和 CIH 组($n=6$),对照组除不充入氮气和氧气外,其余均与 CIH 组做相同处理。通过充入氮气稀释氧浓度的原理,CIH 组放入间歇性低氧舱中,校准舱内的氧气浓度至环境浓度即 21%,随后关闭舱门,在低氧舱内循环充入氮气和氧气,保证一个循环充氮 4 min 后充氧 5 min,在此期间用氧探头监测舱内氧气浓度,调节充气流量使每一个循环中舱内最低氧气浓度达到 6%,并持续约 45 s,然后充入氧气使氧浓度逐渐恢复至 21%,舱内氮气与氧气的切换通过定时电路程序控制,实验每天早上 9 时开始,重复约 8 h,连续 15 d。

1.5 在体血流动力学指标检测 腹腔注射麻醉剂乌拉坦(800 mg/kg)和 α-氯醛糖(40 mg/kg)混合麻醉,仰卧位固定大鼠,依次进行气管、左颈外静脉、左颈总动脉插管手术。左颈外静脉与注入混合麻醉溶液的灭菌注射器连接,方便实验中及时补充麻醉药量;压力换能器与左颈总动脉通过充有肝素钠生理盐水溶液的聚乙烯管相连,并连接 powerlab 8/30 数据采集分析处理系统,实时记录动脉血压、平均动脉压(mean arterial blood pressure, MAP)。药物对 MAP 的改变水平以注射药物前后实测值之差表示, $\Delta\text{MAP} = \text{注射后 MAP} - \text{注射前 MAP}$ 。

1.6 PVN 立体定位及微量注射 将麻醉后大鼠头部俯卧位固定在立体定位仪上,沿矢状中线切开头皮,暴露前囟,根据 Paxinos 和 Watson 的大鼠脑立体定位图谱进行定位,双侧 PVN 具体位置为:前囟后 1.8 mm,中线旁开 0.4 mm,背侧面深 7.9 mm,定位后运用颅骨钻钻孔,插入内径为 0.3 mm 的插管。采用微量进样器沿插管位置双侧注射药物体积均为 50 nl。生理盐水(normal saline, NS) + Ang II 大鼠和 Tempol + Ang II 大鼠中 Ang II 均在上一药物注射 5 min 后注射。在所有药物注射完成后再沿插管位置注射 50 nl 的 2% 伊文斯蓝溶液对注射部位染色,左颈外静脉推入过量麻醉剂处死大鼠,迅速断头取脑,脑组织用 10% 福尔马林溶液固定,通过切片鉴定注射位点是否正确,如经鉴定注射位点不在 PVN 区域内的数据则不进行统计处理。

1.7 PVN 组织标本的制备 大鼠过量麻醉后迅速断头取脑,立即置于液氮中冷冻固定,用冰冻切片机做大脑冠状切片,根据大鼠脑立体定位图谱确定 PVN 位置,用刀片垂直切取约 2 mm 厚脑片,再使用内径为 1.5 mm 的针头,用打孔法在脑片上取出 PVN 区,称重后置 EP 管中, -80℃ 保存备用。

1.8 Western blot 法检测 PVN 中 AT1R 取适量 RIPA 裂解液与 PVN 组织标本在玻璃匀浆器中研磨,匀浆成均一体系后离心(4℃, 3 000 r/min 离心 20 min),取上清液。采用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白。电泳(浓缩胶:60 V, 30 min;分离胶:120 V, 1.5 h);转膜(150 mA, 2 h),一抗(4℃, 过夜):兔抗 AT1R(1:350)、鼠抗 β-actin(1:1 000),二抗(常温摇床, 2 h):辣根过氧化物酶标记的羊抗兔(1:20 000)、羊抗鼠(1:40 000)。采用化学发光底物显影。使用 Quantity One 软件分析各蛋白条带的灰度值,通过与内参 β-actin 的比值,分析 AT1R 的蛋白相对表达水平。

1.9 ELISA 试剂盒测定 PVN 中 Ang II 及 ROS 含量

取适量 NS 与 PVN 组织标本在玻璃匀浆器中研磨,匀浆成均一体系后离心(4 ℃、3 000 r/min 离心 10 min),取上清液。在预先包被有抗体的微孔中,依次加入标准品、待测样品、辣根过氧化物酶标记的检测抗体,经过温育并彻底洗涤,用底物 TMB 显色,用酶标仪在 450 nm 波长下测定光密度(optical density, OD)值,绘制标准曲线,根据公式计算样品浓度。

1.10 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组均数间的比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 CIH 对大鼠 PVN 中 Ang II 含量及 AT1R 蛋白表达的影响 与对照组比较,ELISA 法检测结果显示,CIH 组大鼠 PVN 中 Ang II 含量 [(186.599 ± 9.329) pg/mgprot vs (246.650 ± 7.031) pg/mgprot, *t* = -5.141, *P* < 0.01] 显著升高;Western blot 法显示 AT1R 蛋白表达 [(0.729 ± 0.090) vs (1.020 ± 0.065), *t* = -2.608, *P* < 0.05] 显著增加。见图 1。

2.2 CIH 对大鼠 PVN 中 ROS 含量及 T-SOD 活力的影响 ELISA 法检测结果显示,与对照组比较,CIH 组大鼠 PVN 中 ROS 含量显著升高 [(196.848 ± 8.151) U/mgprot vs (242.538 ± 16.086) U/mgprot, *t* = -2.534, *P* < 0.05]。T-SOD 活力检测结果显示,与对照组比较,CIH 组大鼠 PVN 中总 SOD 活力明显下降 [(125.081 ± 2.612) U/mgprot vs (95.204 ± 4.269) U/mgprot, *t* = 5.970, *P* < 0.01]。

2.3 PVN 内微量注射 Tempol 对 Ang II 升压作用的影响 双侧 PVN 内微量注射 Ang II (0.3 nmol) 两组大鼠的 MAP 皆升高,与对照组比较,CIH 大鼠 MAP 升高更显著 [(1.489 ± 0.152) kPa vs (2.400 ± 0.298) kPa, *t* = -2.724, *P* < 0.05];超氧阴离子清除剂 Tempol 两组大鼠对 MAP 皆降低,而 CIH 大鼠 MAP 降低更显著 [(-0.333 ± 0.046) kPa vs (-1.556 ± 0.250) kPa, *t* = 4.813, *P* < 0.01];用 Tempol 对两组大鼠预处理,可抑制 Ang II 的升压作用[NS + Ang II vs Tempol + Ang II, 对照组:(1.444 ± 0.080) kPa vs (0.800 ± 0.077) kPa, *t* = 5.800, *P* < 0.01; CIH 组:(2.222 ± 0.174) kPa vs (0.778 ± 0.121) kPa, *t* = 6.799, *P* < 0.01]。见图 2。

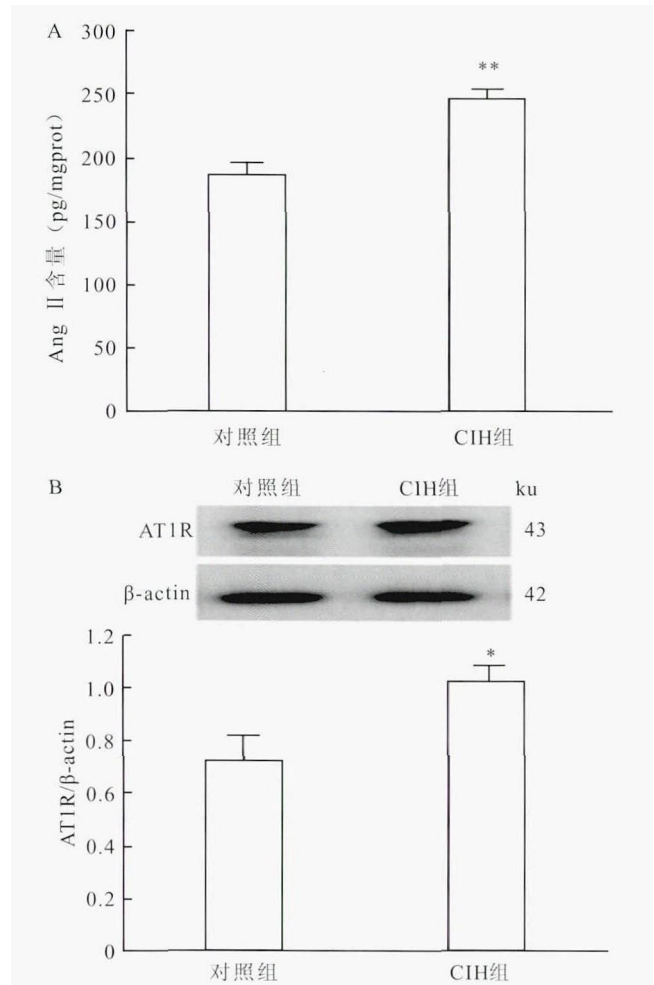


图1 CIH对大鼠PVN中Ang II含量及AT1R蛋白表达的影响 A:ELISA法检测各组PVN中Ang II含量;B:Western blot法检测各组PVN中AT1R蛋白表达;与对照组比较:**P* < 0.05, ***P* < 0.01

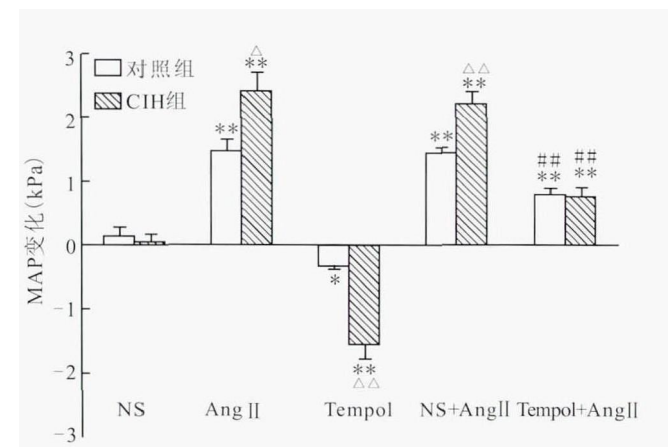


图2 PVN中分别微量注射NS、Ang II、Tempol对大鼠血压的影响 与同组NS比较:**P* < 0.05, ***P* < 0.01;与同组NS + Ang II比较:##*P* < 0.01;与对照组比较:△*P* < 0.05, △△*P* < 0.01

3 讨论

睡眠呼吸暂停是神经源性和难治性高血压的主要原因之一。CIH 是睡眠呼吸暂停最重要的病理生理学特征及引起机体各器官损伤的主要机制, CIH 引起高血压的具体机制还不十分清楚, 但交感神经系统过度激活在高血压的发生、发展中起了重要的作用^[3,7]。CIH 时, 反复刺激颈动脉体化学感受器, 使其敏感性增加, 从而诱导交感神经活动的过度增强。PVN 是调节交感神经活动和动脉血压的重要中枢结构之一, 通过与化学感受性反射中枢(孤束核和延髓腹侧面头端)的纤维联系对化学感受性反射进行调节。研究^[8]显示, 与对照组大鼠比较, 注射 γ -氨基丁酸 A 型受体激动剂抑制 PVN 神经元活动, 引起 CIH 大鼠血压和交感神经活动下降更为显著。CIH 大鼠, PVN 内血管升压素能神经元释放血管升压素, 通过 V1a 受体作用于延髓腹外侧头端引起交感神经活动增强^[9]。光遗传学和逆行示踪技术显示, 在 CIH/高 CO₂ 暴露大鼠, PVN 投射到脑干副交感核的兴奋性通路被抑制, 使心迷走神经活动减弱^[10]。这些研究^[9-10]显示, PVN 在 CIH 时交感神经活动过度增强中起着重要作用。

肾素-血管紧张素系统在 CIH 时被激活, Ang II 通过外周和中枢途径升高血压, 系统或中枢应用 AT1 受体阻断剂氯沙坦可抑制 CIH 引起的高血压^[11-12]。本研究表明, CIH 大鼠 PVN 内 Ang II 水平及 AT1 受体表达显著增加; 双侧 PVN 内微量注射 Ang II 使对照组和 CIH 组大鼠的 MAP 皆升高, 不过 CIH 大鼠 MAP 升高更为显著。长期应用 γ -氨基丁酸 A 型受体激动剂可抑制 PVN 神经元活动或 AT1 的受体阻断剂可显著抑制 CIH 大鼠血压的升高^[13]。这些结果表明, 室旁核中 Ang II 及 AT1R 功能上调在 CIH 诱发大鼠高血压中起重要作用。

CIH 类似于缺血和再灌注损伤作用, 导致氧化应激和 ROS 产生增多, 与高血压的产生密切相关^[14], 在中枢 ROS 可作为第二信使介导 Ang II 引起的交感兴奋和升压作用^[15]。本实验向 PVN 内注射一种可以透过细胞膜的 SOD 类似物 Tempol, 可降低对照组和 CIH 组大鼠的动脉血压, CIH 大鼠降低更显著; 并且用 Tempol 预处理可抑制 Ang II 对两组大鼠的升压作用, 而且在 CIH 组中的抑制作用更加明显; CIH 大鼠 PVN 中总 SOD 活性检测显著降低。提示 PVN 中 ROS 介导了 Ang II 在 CIH 大鼠中的升压作用。Ang II 引起 ROS 增加可能与参与 ROS 代

谢的酶的活性变化有关。产生 ROS 系统包括 NAD(P)H 氧化酶、黄嘌呤氧化酶、线粒体链和非耦合的一氧化氮合酶等, 其中 NAD(P)H 氧化酶是高血压病时引起 ROS 增多的关键酶。PVN 中 ROS 升高可能与 NAD(P)H 氧化酶活性增加而 SOD 活性降低有关, 即产生 ROS 的能力增加和(或)清除 ROS 的能力下降引起了 ROS 的增多。

PVN 中 Ang II-ROS 信号通路在 CIH 引起交感神经活动过度激活及高血压的具体机制还不清楚。可能的推测是: CIH 引起 RAS 激活, 中枢的 Ang II 和 PVN 内 AT1 受体结合, 通过 PKC/c-Src 途径激活 NAD(P)H 氧化酶产生 ROS。一方面, ROS 改变细胞膜对 Ca²⁺ 或 K⁺ 通透性使 PVN 神经元兴奋, 或通过 p38 MAPK 途径促进 PVN 投射到延髓腹外侧头的神经纤维末梢释放兴奋性递质谷氨酸, 引起交感神经兴奋和血压升高; 另一方面, ROS 经 ERK 信号途径调节转录因子 NF- κ B、AP-1 或 HIF 的活性, 使 Ang II、AT1 受体、NAD(P)H 氧化酶表达上调, SOD 表达下调, 引起血压长期增加^[15]。

综上所述, PVN 中 Ang II-ROS 通路在 CIH 引起高血压中起着及其重要的作用, PVN 中 Ang II、ROS 及其相关的酶或受体可能成为治疗 CIH 诱发的高血压的潜在靶点。

参考文献

- [1] Floras J S. Hypertension and Sleep Apnea[J]. Can J Cardiol, 2015, 31(7):889-97.
- [2] Silva A Q, Schreihof A M. Altered sympathetic reflexes and vascular reactivity in rats after exposure to chronic intermittent hypoxia[J]. J Physiol, 2011, 15, 589(Pt 6):1463-76.
- [3] 李艳, 钟明奎, 邹坤, 等. 慢性间歇性低氧对大鼠血压和交感神经活动的影响[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(23):5162-4.
- [4] Sun H J, Zhou H, Feng X M, et al. Superoxide anions in the paraventricular nucleus mediate cardiac sympathetic afferent reflex in insulin resistance rats[J]. Acta Physiol (Oxf), 2014, 212(4):267-82.
- [5] 邹坤, 李艳, 王烈成, 等. 室旁核中活性氧在高血压大鼠交感神经活动过度增强中的作用[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(7):753-7.
- [6] Braga V A, Medeiros I A, Ribeiro T P, et al. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension[J]. Braz J Med Biol Res, 2011, 44(9):871-6.
- [7] Xing T, Pilowsky P M, Fong A Y. Mechanism of sympathetic activation and blood pressure elevation in humans and animals following acute intermittent hypoxia[J]. Prog Brain Res, 2014, 209:

- 131 - 46.
- [8] Sharpe A L, Calderon A S, Andrade M A, et al. Chronic intermittent hypoxia increases sympathetic control of blood pressure: role of neuronal activity in the hypothalamic paraventricular nucleus[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013, 305(12): H1772 - 80.
- [9] Kc P, Balan K V, Tjoe S S, et al. Increased vasopressin transmission from the paraventricular nucleus to the rostral medulla augments cardiorespiratory outflow in chronic intermittent hypoxia-conditioned rats[J]. *J Physiol*, 2010, 588(Pt 4): 725 - 40.
- [10] Dergacheva O, Dyavanapalli J, Pinol R A, et al. Chronic intermittent hypoxia and hypercapnia inhibit the hypothalamic paraventricular nucleus neurotransmission to parasympathetic cardiac neurons in the brain stem[J]. *Hypertension*, 2014, 64(3): 597 - 603.
- [11] Knight W D, Saxena A, Shell B, et al. Central losartan attenuates increases in arterial pressure and expression of FosB/ Δ FosB along the autonomic axis associated with chronic intermittent hypoxia[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2013, 305(9): R1051 - 8.
- [12] 余孝海, 李艳, 丁扬, 等. 室旁核血管紧张素 II 在慢性间歇性低氧诱发大鼠高血压中的作用及机制[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(5): 716 - 20.
- [13] da Silva A Q, Fontes M A, Kanagy N L. Chronic infusion of angiotensin receptor antagonists in the hypothalamic paraventricular nucleus prevents hypertension in a rat model of sleep apnea[J]. *Brain Res*, 2011, 1368: 231 - 8.
- [14] Braga V A, Medeiros I A, Ribeiro T P, et al. Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2011, 44(9): 871 - 6.
- [15] Chan S H, Chan J Y. Angiotensin-generated reactive oxygen species in brain and pathogenesis of cardiovascular diseases[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(10): 1074 - 84.

Angiotensin II inparaventricular nucleus contributes to hypertension in chronic intermittent hypoxia rats by reactive oxygen species

Tang Zhiqing, Fan Yifei, Wang Jinli, et al

(Dept of Physiology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of Ang II-ROS signal pathway in the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) on chronic intermittent hypoxia (CIH) induced-hypertension in rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into control and CIH groups. The control rats were exposed to continuous normoxia, while the CIH rats were submitted to CIH (8 h per day for 15 days). Rats were fixed on the stereotaxic instrument to conduct microinjection in the PVN according to Paxinos and Watson rat atlas. Mean arterial pressure (MAP) was recorded *in vivo* on a PowerLab data acquisition system. We used ELISA kit to measure the content of Ang II, ROS, total-superoxide dismutase (T-SOD) and Western blot to measure Ang II type 1 receptor (AT1R) protein expression in PVN. **Results** The contents of PVN ROS ($P < 0.05$) and Ang II ($P < 0.01$) were significantly higher than that in control rats, along with increased AT1R protein expression ($P < 0.05$). The activity of PVN T-SOD in CIH rats was significantly lower than that in control rats ($P < 0.01$). Microinjection of Ang II (0.3 nmol) in bilateral PVN increased MAP in both CIH and control rats, and this response was significantly augmented in CIH rats ($P < 0.01$). ROS scavenger Tempol caused significant MAP decreases in CIH rats than that in control group ($P < 0.01$). Tempol prevented Ang II-induced increases in MAP in both CIH and control rats, and this response was significantly augmented in CIH rats ($P < 0.01$). **Conclusion** The results suggest that the ROS in PVN mediates the increased blood pressure induced by Ang II in CIH induced-hypertension rats.

Key words paraventricular nucleus; reactive oxygen species; angiotensin II; chronic intermittent hypoxia; hypertension