

盐敏感性高血压大鼠炎症因子和内皮损伤因子的表达

刘时彦, 黄为民, 张润慧, 刘丰, 周云

(广州市第一人民医院老年科, 广东省广州市 510180)

[关键词] 盐敏感性高血压; 高盐; 炎症反应; 内皮损伤

[摘要] **目的** 观察高盐诱导的高血压大鼠炎症因子和内皮损伤因子的表达水平并探讨其与高血压的相关性。**方法** 选取 8 周龄 Wistar 大鼠 80 只, 随机分为对照组(30 只)和模型组(50 只), 分别给予正常饮水和 2% (质量分数) NaCl 高盐饮水, 喂养 21 天, 测量大鼠尾压以及血流动力学指标; 采用酶联免疫吸附试验测定大鼠血浆高敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)、血管性假血友病因子(vWF)、6-酮前列腺素(6-K-PG)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、一氧化氮(NO)、内皮素 1(ET-1)的含量。**结果** 高盐饮食 21 天后, 模型组大鼠血压显著升高, 盐敏感高血压动物模型构建成功。模型组大鼠左心室质量指数(LVMI)、左心室舒张期末压(LVEDP)与对照组相比有明显升高, 而左心室压最大上升/下降速率($\pm dp/dt_{max}$)降低, 两组差异有统计学意义($P < 0.05$); 而实验后左心室收缩压(LVSP)比较两组差异无统计学意义($P > 0.05$)。与对照组相比, 模型组血浆中炎症因子 hs-CRP、MCP-1、TNF- α 及 IL-6 水平显著升高($P < 0.05$)。相关性分析显示, hs-CRP、MCP-1、TNF- α 及 IL-6 与血压均呈正相关(r 分别为 0.731、0.583、0.858、0.836, $P < 0.05$)。vWF 和 ET-1 浓度也显著增加, 其水平与血压正相关($r = 0.680, 0.739, P < 0.05$)。血管舒张因子 NO、6-K-PG 浓度显著降低, eNOS 水平也显著降低, 且与血压呈负相关(r 分别为 -0.710、-0.658、-0.721, $P < 0.05$)。**结论** 盐敏感高血压大鼠存在血管炎症反应和内皮功能损伤。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Expression of Inflammatory Cytokines and Endothelial Damage Factor in Rat with Salt-Sensitive Hypertension

LIU Shi-Yan, HUANG Wei-Min, ZHANG Run-Hui, LIU Feng, and ZHOU Yun

(Department of Geriatrics, Guangzhou First People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510180, China)

[KEY WORDS] Salt-sensitive Hypertension; High-salt; Inflammatory Reaction; Damage of Endothelium

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of inflammatory factor and endothelial damage factor in high-salt induced hypertensive rat model. **Methods** Wistar rats with 8-week old were randomly divided into control group (fed with tap water, $n = 30$) and model group (fed with high-salt water containing 2% NaCl, $n = 50$). After fed for 21 days, the blood pressure and hemodynamic parameters were determined. The high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), von Willebrand factor (vWF), 6-keto-prostaglandin (6-K-PG), endothelial nitric oxide synthase (eNOS), nitric oxide (NO) and endothelin-1 (ET-1) were detected by the ELISA method. **Results** After 21 days of high salt dietary, the blood pressure in model group was significantly higher than blank control group. The left ventricular mass index (LVMI) and left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) in model group were significantly higher than control group, and the maximal rate of rise and fall of the ventricular pressure ($\pm dp/dt_{max}$) was lower than control group after experiment ($P < 0.05$). Compared with control group, the hs-CRP, MCP-1, TNF- α and IL-6 in blood plasma were significantly increased in model group, and the levels of the hs-CRP, MCP-1, TNF- α and IL-6 were found to be positively correlated with blood pressure ($r = 0.731, 0.583, 0.858, 0.836, P < 0.05$). The vWF and ET-1 were increased and positively correlated with blood pressure too ($r =$

[收稿日期] 2014-12-03

[修回日期] 2015-06-05

[基金项目] 广东省科技计划项目(2012B031800325)

[作者简介] 刘时彦, 副主任医师, 研究方向为心血管专业, E-mail 为 lsy200512@126.com。黄为民, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管专业, E-mail 为 huangwm1103@126.com。刘丰, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管专业, E-mail 为 pfs1103@126.com。

0.680, 0.739, $P < 0.05$). The NO, 6-K-PG and eNOS were reduced in model group, and the levels of NO, 6-K-PG and eNOS were negatively correlated with blood pressure ($r = -0.710, -0.658, -0.721, P < 0.05$). **Conclusion**

After fed with high-salt water for 3 weeks, the blood pressure of model group elevated. There are inflammatory reaction and damage of endothelium in model group.

近年来,由于人们生活水平不断提高以及生活方式的改变,高血压的发生率也不断提高,严重影响人们的生活质量和身心健康,也给患者家庭和社会带来了沉重的负担^[1]。高血压是目前最常见的心血管疾病之一,其发病机制复杂,与遗传因素、饮食、精神以及神经机制等多种因素有关。盐作为一个重要的环境因素,对高血压的发生和发展有很大影响,盐敏感性是我国高血压患者发病的易患因素之一^[2-3]。国内外研究发现炎症因子和内皮损伤因子在高血压的发生和发展过程中起着关键作用,对高血压炎症因子和内皮损伤因子的研究可能为高血压的治疗提供新的思路,能够更有效的改善患者的预后及提高其生活质量^[4-5]。本研究拟通过对盐敏感高血压大鼠模型血浆中与炎症反应密切相关的高敏C反应蛋白(hs-CRP)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素6(IL-6)、血管性假血友病因子(vWF)、6-酮前列腺素(6-K-PG)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)、一氧化氮(NO)、内皮素1(ET-1)等因子表达水平的检测,探讨盐敏感高血压大鼠血浆炎症因子、内皮损伤因子与高血压的关系,以期对盐敏感高血压的预防和治疗提供新的思路。

1 材料与方 法

1.1 实验仪器及试剂

BP-6 动物无创血压测试仪由成都泰盟科技有限公司生产;MK3 酶标仪(Thermo electron corporation);台式离心机(湖南湘仪设备有限公司);洗板机(美国 BIO-RAD 公司);721 紫外分光光度计(岛津)。hs-CRP、MCP-1 和 vWF 检测试剂盒购于上海源叶生物科技有限公司;TNF- α 、IL-6 检测试剂盒购于上海太阳生物科技有限公司;NO、eNOS、ET-1、6-K-PG 检测试剂盒购于上海彩诺生物发展有限公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 实验对象及分组

大鼠模型的建立参考文献[6],选取8周龄健康 Wistar 大鼠 80 只(购于南方医科大学动物实验中心),体重为 160~190 g,雄性。适应性饲养 1 周后,随机分为对照组和模型组两组。其中对照组大

鼠 30 只,给予普通饲料和自来水喂养;模型组大鼠 50 只,给予普通饲料喂养和质量分数为 2% 的 NaCl 盐水,观察 21 天。

1.3 血压测量

分别在实验的第 0、7、14、21 天用动物无创尾压测试仪器,采用尾套加压阻断法测量大鼠尾动脉收缩压。将大鼠预热 10~15 min,固定后休息 2 min,待在大鼠处于安静状态且尾动脉压波稳定后,对其尾动脉压力进行测量,每只大鼠连续测量 3 次,每次间隔 2 min,取平均值作为该大鼠的尾动脉压。

实验结束后采用颈动脉插管法测量血压:称量动物体重,按照 30 $\mu\text{g/g}$ 的标准腹腔注射 5% 戊巴比妥钠,从颈部开口暴露右侧颈动脉,上动脉夹。从远心端切口,将肝素导管经右颈动脉插入左心室,另一端连接生物信息采集系统。记录大鼠左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张期末压(LVEDP)、左心室压最大上升/下降速率($\pm dp/dt_{\max}$)。开胸摘取大鼠心脏以及腹主动脉,沿室间沟剪开,取左心室并称重,计算左心室质量指数(LVMI) = 左心室质量/体重(mg/g)。

1.4 血标本的留取和制备

实验 21 天后,所有大鼠按照 45 mg/kg 的剂量,腹腔注射 5% 戊巴比妥钠进行麻醉,腹动脉取血 6 mL 注入肝素钠真空采血管中,4 $^{\circ}\text{C}$ 、3000 r/min 离心 10 min,收集血浆样品,放于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存备用。

1.5 检测方法

采用酶联免疫吸附双抗夹心(ELISA)法测定大鼠血浆炎症因子 hs-CRP、MCP-1、TNF- α 及 IL-6 的含量以及血管内皮损伤标志物 vWF、6-K-PG、eNOS、NO 及 ET-1 的水平,实验所有操作步骤严格按照试剂盒使用说明书进行。

1.6 统计学方法

实验所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,两组样本均数比较采用 t 检验,相关性分析采用 Pearson 相关分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 高盐诱导大鼠高血压模型的建立

本研究共选用 80 只大鼠,其中模型组 50 只进

行高盐诱导高血压模型改造,实验后对构建后大鼠进行血压测量,与对照组大鼠血压进行比较。实验 7 天后,模型组大鼠血压与对照组大鼠血压相比显著升高($P < 0.01$),并且高血压状态持续到实验结束,说明高盐诱导大鼠高血压模型建立成功。实验过程中不同时间大鼠尾压测量结果见图 1。

2.2 大鼠血流动力学指标

与实验后对照组比较,模型组大鼠 LVMI、LV-EDP 有明显升高, $\pm dp/dt_{max}$ 降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$);两组 LVSP 比较差异无统计学意义($P > 0.05$;表 1)。

2.3 大鼠血浆炎症相关因子水平变化

实验结果显示,与对照组大鼠相比,模型组大

鼠炎症因子 hs-CRP、MCP-1、TNF- α 和 IL-6 水平显著升高,差异均具有统计学意义($P < 0.01$;表 2)。

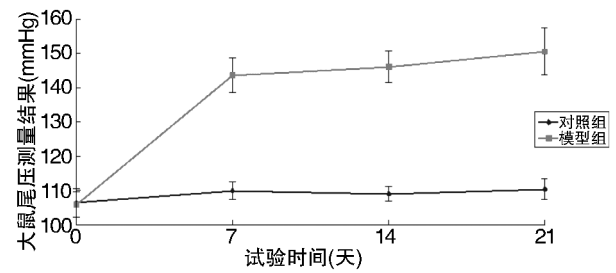


图 1. 不同实验阶段大鼠尾压测量结果

Figure 1. Changes of blood pressure at different stages in two groups

表 1. 两组大鼠血流动力学指标($\bar{x} \pm s$)

Table 1. Hemodynamic parameters between two groups after experiment($\bar{x} \pm s$)

分 组	LVMI(mg/g)	LVSP(mmHg)	LVEDP(mmHg)	+ dp/dt _{max} (mmHg/s)	- dp/dt _{max} (mmHg/s)
对照组	1.87 ± 0.23	194.32 ± 6.37	8.54 ± 4.33	11517.29 ± 1521.68	-11436.63 ± 1368.53
模型组	2.49 ± 0.31 ^b	183.74 ± 12.58	13.73 ± 6.43 ^a	9937.00 ± 1093.25 ^a	-9684.54 ± 1586.36 ^a

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

表 2. 两组大鼠实验后炎症因子水平($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Levels of inflammatory factor between two groups after experiment($\bar{x} \pm s$)

分 组	hs-CRP(μ g/L)	MCP-1(ng/L)	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)
对照组	2539.51 ± 368.79	44.73 ± 9.17	59.77 ± 7.31	19.81 ± 4.85
模型组	3874.79 ± 546.49 ^a	82.85 ± 11.88 ^a	89.38 ± 9.65 ^a	39.06 ± 8.13 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.4 血浆炎症因子水平与血压的相关性

hs-CRP、MCP-1、TNF- α 和 IL-6 的表达水平与血压均呈正相关,相关系数分别为 0.731 ($P < 0.05$)、0.583 ($P < 0.05$)、0.858 ($P < 0.01$) 及 0.836 ($P < 0.01$)。

2.5 大鼠内皮损伤标志物水平

模型组大鼠血浆中 vWF 及 ET-1 的水平均显著高于对照组,两组差异有统计学意义($P < 0.01$);而模型组大鼠血浆中 6-K-PG、eNOS 和 NO 浓度明显低于对照组,差异均具有统计学意义($P < 0.01$;表 3)。

表 3. 两组大鼠实验后血浆中 vWF、6-K-PG、eNOS、NO 和 ET-1 水平($\bar{x} \pm s$)

Table 3. Levels of vWF, 6-K-PG, eNOS, NO and ET-1 between two groups after experiment($\bar{x} \pm s$)

分 组	vWF(g/L)	6-K-PG(ng/L)	eNOS(kU/L)	NO(μ mol/L)	ET-1(ng/L)
对照组	3518.64 ± 836.76	112.56 ± 11.38	13.95 ± 2.56	29.74 ± 3.38	79.86 ± 8.92
模型组	7483.38 ± 1037.06 ^a	57.81 ± 8.47 ^a	7.27 ± 1.08 ^a	15.48 ± 2.57 ^a	125.43 ± 22.85 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与对照组相比。

2.6 血浆内皮损伤标志物水平与血压的相关性

vWF 和 ET-1 的表达水平与血压呈正相关,相

关系数分别为 0.680 ($P < 0.05$) 和 0.739 ($P < 0.05$)。6-K-GP、eNOS、NO 的表达水平与血压呈负

相关,相关系数分别为 $-0.710 (P < 0.05)$ 、 $-0.658 (P < 0.05)$ 和 $-0.721 (P < 0.05)$ 。

3 讨论

有研究表明,高盐饮食可以导致血液中血管紧张素 II 浓度降低,醛固酮下降,而引起血压升高^[7]。本研究对 50 只盐敏感 Wistar 大鼠进行高盐饮食 21 天后,大鼠血压有明显升高,LVMI、LVEDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 也有明显改变,Wistar 大鼠盐敏感高血压动物模型造模成功,左心室压力负荷明显增加,提示高盐饮食对大鼠血压有明显影响,可导致大鼠血压升高。

高血压患者存在血管壁炎症反应,炎症反应能诱导血管内皮功能的改变,刺激内皮细胞等分泌炎症因子,进而导致血管舒张功能减退,促进血管收缩引起高血压^[8]。hs-CRP 是炎症反应的一种重要生物标志物^[9],可参与血管内皮细胞与其他血管细胞的相互作用,促进血管炎症;还可以增加血管紧张素受体,使血压升高和发生动脉粥样硬化;另外 hs-CRP 能够预测高血压和心血管疾病的发生。MCP-1 是由单核细胞和内皮细胞合并分泌到外周血的一类蛋白,能够诱导单核细胞积聚,是炎症反应的启动因子^[10]。在 MCP-1 的诱导下,单核细胞黏附于血管内皮表面,扩大炎症反应,损伤血管内皮细胞。TNF- α 和 IL-6 是机体分泌的重要促炎性因子,对血压调节具有重大影响^[11]。本实验发现与对照组相比,模型组大鼠血浆中 hs-CRP、MCP-1、TNF- α 和 IL-6 含量有明显升高,相关性分析可知炎症因子 hs-CRP、MCP-1、TNF- α 和 IL-6 水平与血压呈正相关,高血压大鼠存在炎症反应。

高血压引发的炎症反应主要表现在炎症因子对血管内皮功能的影响。血管内皮是存在于血液和血管平滑肌之间的一层屏障。血管内皮细胞通过自分泌、旁分泌和内分泌等机制合成 vWF、ET-1、NO 等多种活性介质而产生生理功能,它们对调节血管舒张和收缩具有重要作用^[12]。正常状态下,这些活性物质会维持相对平衡状态,当血管内皮受损时,这些活性物质或底物、酶等在体内会出现增高或降低,通过测定这些活性物质的浓度变化,可以反应血管内皮损伤或功能紊乱。vWF 是由血管内皮细胞合成的一种糖基化蛋白,当血管内皮细胞受损时,血浆中 vWF 水平会升高,因此,血浆中 vWF 浓度是反应血管内皮细胞受损或功能紊乱的主要

标志^[13]。ET-1 是由血管内皮细胞分泌的的血管活性肽,对血管具有强烈的收缩作用,能促进平滑肌细胞分裂和增殖以及血栓的形成^[14],增加血管阻力形成高血压。NO 是由 eNOS 催化合成的生物活性物质,内皮来源的 NO 可调节血管张力,引起平滑肌松弛,降低血压^[15]。NO 是已知的抗高血压保护因子,也是机体重要的信息和效应因子。NO 和 ET-1 是一对重要的内皮依赖性血管舒张和收缩因子^[16],两者共同维持血管张力,调节血管内皮功能。NOS 是合成 NO 的关键酶,分为 iNOS 和 eNOS 两种亚型,eNOS 主要分布在血管内皮细胞,对维持血管正常功能起重要作用。ET-1 和 NO 也是细胞内皮损伤的传统标志物。本研究结果显示,模型组大鼠血浆中 eNOS 和 NO 水平都显著降低,vWF 和 ET 浓度显著升高,且相关性分析发现 vWF 和 ET 浓度与血压正相关,而 eNOS 和 NO 与血压负相关;提示高血压可导致大鼠血管内皮细胞中 eNOS 的表达异常,eNOS 表达降低,抑制了 NO 的合成,促进 vWF 和 ET 分泌增加,血管扩张作用减弱,导致血管内皮功能失衡,促进高血压的发生和发展。

花生四烯酸在血管内皮细胞内,在环氧化酶的催化下生成 PGI₂,其具有与 NO 相似的舒张血管的功能^[17]。PGI₂ 与血栓素 A₂ 在体内相对平衡,共同维持内环境稳定,当两者失去平衡后,可能造成血管痉挛或血栓形成,就形成了高血压。PGI₂ 性质极不稳定,在血液中迅速降解为 6-K-PG,故国内外以检测 6-K-PG 作为判断 PGI₂ 浓度的指标。本研究结果显示模型组大鼠血浆中 6-K-PG 浓度比对照组降低 48.6%,6-K-PG 水平与血压负相关;可能由于血管内皮受损,PGI₂ 合成酶减少,血管痉挛或血小板聚集增加而诱导高血压的发展。

总之,高盐饮食可诱导大鼠高血压,其血浆炎症因子 hs-CRP、MCP-1、TNF- α 和 IL-6 的水平都有明显增加,血管内皮损伤标志物 vWF、NO、ET-1、6-K-PG 浓度都有明显改变,推断高盐诱导高血压存在炎症反应和血管内皮损伤。

[参考文献]

- [1] 温西京. 硝苯地平联合卡托普利治疗原发性高血压的临床效果分析[J]. 中国当代医药, 2014, 21(17): 90-92.
- [2] He J, Gu D, Chen J, et al. Gender difference in blood pressure responses to dietary sodium intervention in the GenSalt study [J]. J Hypertens, 2009, 27(1): 48-50.
- [3] 牟建军. 盐与高血压研究进展[J]. 中国医学前沿杂志

- (电子版), 2011, 3(2): 22-25.
- [4] 邱宇珍, 龙辉. 2 型糖尿病并非酒精性脂肪肝病患者炎症反应及氧化应激水平与动脉硬化的关系[J]. 临床内科杂志, 2013, 30(2): 89-91.
- [5] 李丽娟, 李琼, 魏玲. 亚高原地区高血压与外周动脉硬化相关性探讨[J]. 西南国防医药, 2011, 21(10): 1 053-055.
- [6] 王倩, 张翼, 陆敏, 等. 高盐诱导的高血压大鼠模型肾组织可溶性表氧化物酶高表达及其作用初步探讨[J]. 北京大学学报(医学版), 2010, 42(2): 126-130.
- [7] 陈剑玲, 陈涛, 商黔惠, 等. 高盐饮食诱导 Wistar 大鼠颈动脉重塑的机制及替米沙坦的干预[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(7): 655-662.
- [8] Simon DI. Inflammation and vascular injury: basic discovery to drug development [J]. *Circ J*, 2012, 76(8): 1 811-818.
- [9] 徐腾飞, 刘巍. 高血压与炎症反应的关系[J]. 国际免疫学杂志, 2013, 36(5): 347-350.
- [10] Martinovic I, Abegunewardene N, Seul M, et al. Elevated monocyte chemo attractant protein-1 serum levels in patients at risk for coronary artery disease [J]. *Circ J*, 2005, 69(12): 1 484-489.
- [11] 杨志远, 马承华, 袁明远, 等. 柿叶黄酮制剂及辛伐他汀对高血压病患者血清炎症因子和脂蛋白(a)水平的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2014, 22(10): 1 044-048.
- [12] 陈明, 陈志武, 龙子江, 等. 无患子皂苷对自发性高血压大鼠主动脉血管内皮功能调节作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3 283-287.
- [13] Lopes AA, Barreto AC, Maeda NY, et al. Plasma von Willebrand factor as a predictor of survival in pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2011, 44(12): 1 269-275.
- [14] Tian Z, Liu YT, Fang Q, et al. Hemodynamic parameters obtained by transthoracic echocardiography and right heart catheterization: a comparative study in patients with pulmonary hypertension [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(12): 1 796-801.
- [15] 白亚玲, 徐金升, 孙利军, 等. 维持性血液透析中并发高血压患者血清 ET-1、NO 水平变化[J]. 山东医药, 2013, 53(18): 6-8.
- [16] 李建微, 金元哲, 孙小强, 等. 辛伐他汀对高血压病患者血管内皮功能的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 17(5): 728-730.
- [17] Preston IR, Sagliani KD, Roberts KE, et al. Comparison of acute hemodynamic effects of inhaled nitric oxide and inhaled epoprostenol in patients with pulmonary hypertension [J]. *Pulm Circ*, 2013, 3(1): 68-73.

(此文编辑 许雪梅)